

**Bayerische Julius-Maximilians-Universität**

**Würzburg**

Fakultät für Biologie



**Funktionelle Charakterisierung zweier Lipid Transfer Proteine in der  
*Arabidopsis thaliana* Pathogenantwort**

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Bieber

geboren in Würzburg

Würzburg 2013

---

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wolfgang Rössler

Gutachter: PD. Dr. Frank Waller

Gutachter: PD. Dr. Dirk Becker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>9</b>
1.1 Lipid Transfer Proteine .....	9
1.1.1 Struktur und Spezifität.....	10
1.1.2 Lokalisation.....	13
1.1.3 Biologische Aktivität .....	14
1.2 Das pflanzliche Immunsystem .....	16
1.2.1 PAMP/MAMP-abhängige Immunität (PTI/MTI) .....	17
1.2.2 Effektor-abhängige Immunität (ETI) .....	18
1.2.3 Induzierte pflanzliche Abwehrmechanismen.....	19
1.2.4 Systemisch induzierte Resistenz .....	20
1.3 Lipid Transfer Proteine und deren Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	23
1.3.1 DIR1 .....	23
1.3.2 AZI1 .....	24
1.3.3 LTPIV.4.....	25
1.4 Zielsetzung und Vorgehensweise .....	26
<b>2 Material .....</b>	<b>28</b>
2.1 Chemikalien.....	28
2.2 Standardsubstanzen und Lipide .....	28
2.3 Enzyme, weitere Materialien, Reagenzien und Kits .....	31
2.4 Laborgeräte .....	32
2.5 Nährmedien .....	34
2.6 Antibiotika.....	35
2.7 Lösungen und Puffer .....	36
2.8 Pflanzenmaterialien .....	38
2.9 Bakterien und Pilze.....	38
<b>3 Methoden .....</b>	<b>40</b>
3.1 Arbeiten mit Pflanzenmaterial .....	40
3.1.1 Anzucht der <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen auf Erde .....	40
3.1.2 Anzucht der <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen auf MS-Platten .....	40
3.1.3 Trockensterilisation von <i>Arabidopsis</i> Samen .....	40
3.1.4 Selektion transgener <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	41

---

3.1.5 Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation .....	41
3.1.6 Behandlung der Pflanzen.....	42
3.1.6.1 Verwundung von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
3.1.6.2 Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Pseudomonas syringae</i> .....	42
3.1.6.3 Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	44
3.2 Molekularbiologische Methoden .....	44
3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	44
3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	47
3.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte.....	47
3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem binären pGEM T easy Vektor.....	47
3.2.5 Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsenzymen.....	48
3.2.6 Dephosphorylierung des pET28b Vektors.....	48
3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem pET28b Vektor.....	49
3.2.8 Isolation von Plasmid-DNA .....	50
3.2.9 Gateway™-Klonierung .....	50
3.2.10 Transformation von Bakterien.....	51
3.2.11 Transformation von Agrobakterien .....	51
3.2.12 Kolonie Screen PCR.....	51
3.2.13 Herstellung von Glycerinstocks .....	52
3.2.14 Sequenzierung.....	53
3.2.15 DNA-Extraktion.....	53
3.2.16 RNA-Extraktion .....	54
3.2.17 cDNA Synthese .....	54
3.2.18 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) .....	55
3.2.19 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA .....	57
3.3 Biochemische Methoden.....	58
3.3.1 Heterologe Proteinexpression und -isolierung.....	58
3.3.2 Proteinaufreinigung über IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography) .....	58
3.3.3 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial .....	59
3.3.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	59
3.3.5 Immunoblotting (Elektrophoretischer Proteintransfer) .....	60
3.3.6 Fat Blot .....	61
3.3.7 Immunodetektion (Detektion der Chemilumineszenz).....	62
3.3.8 Coomassie Färbung .....	62
3.3.9 Gesamtproteinbestimmung .....	63

---

3.3.10 Detektion der GUS Expression .....	63
3.3.11 Transiente Transformation von <i>Arabidopsis</i> Epidermiszellen.....	63
3.3.12 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.....	64
3.4 Analytische Methoden .....	64
3.4.1 Extraktion und Analyse von Phytohormonen und Dicarbonsäuren .....	64
3.4.2 Ungerichtete Metabolomanalyse .....	67
3.5 Statistische Auswertung .....	69
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>70</b>
4.1 Erzeugung transgener <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	70
4.2 Lokalisation von LTPIV.4 .....	72
4.2.1 Subzelluläre Lokalisation .....	72
4.2.2 Gewebespezifische Lokalisation .....	74
4.3 Selektion einer homozygoten T-DNA Insertions Mutante von LTPIV.4 .....	75
4.4 Expressionsanalyse der <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Mutanten.....	76
4.5 Analyse der Immunantwort in <i>Arabidopsis Col-0</i> , <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit verschiedenen Pathogenen .....	77
4.5.1 Infektion von WT, <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> .....	77
4.5.2 Infektion von WT und <i>ltpIV.4</i> Pflanzen mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	79
4.5.3 Infektion von WT und <i>ltpIV.4</i> Pflanzen mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	80
4.6 Analyse der Phytohormonlevel von WT, <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir <i>Psm</i> .....	81
4.7 Expressionsmuster von LTPIV.4 und verschiedener Markergene in WT, <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir <i>Psm</i> .....	83
4.7.1 Relative Genexpression von LTPIV.4.....	83
4.7.2 Relative Genexpression verschiedener Markergene .....	85
4.8 Analyse der systemischen Immunantwort in <i>Arabidopsis</i> WT, <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir <i>Psm</i> .....	88
4.9 Analyse der LTPIV.4 Expression im systemischen Gewebe in <i>Arabidopsis</i> WT, <i>ltpIV.4</i> und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit avr <i>Psm</i> .....	89
4.10 <i>In vitro</i> Test potentieller Substrate von LTPIV.4 .....	91
4.10.1 Heterologe Expression von LTPIV.4-/DIR1-GFP Fusionsproteinen in <i>Escherichia coli</i> BL21star Bakterien .....	91
4.10.2 Fat Western Blot Analysen .....	93
4.10.2.1 Analyse der Affinität von LTPIV.4 mit freien, gesättigten Fettsäuren .....	93

4.10.2.2 Abhängigkeit der Signaldetektion von der Lipidmenge und -konzentration für die LTPIV.4-Lipid-Interaktion .....	94
4.10.2.3 Analyse der Interaktion von LTPIV.4-GFP mit verschiedenen pflanzlichen Lipiden .....	96
4.11 Ungerichtete Metabolomanalyse der <i>ItpIV.4</i> , 35S::LTPIV.4 Mutanten und des <i>Arabidopsis</i> WTs	98
4.12 Subzelluläre Lokalisation von AZI1 .....	100
4.13 Analyse der Phytohormonspiegel in <i>Arabidopsis</i> WT und <i>azi1-1</i> .....	101
4.13.1 Analyse der basalen Phytohormonspiegel.....	101
4.13.2 Analyse der Oxylipinspiegel nach Verwundung.....	102
4.13.3 Analyse der Dicarbonsäurelevel in <i>Arabidopsis thaliana</i> WT und <i>azi1-1</i> nach Verwundung .....	103
4.14 Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> WT und <i>azi1-1</i> Pflanzen mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	104
4.15 Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> – <i>azi1-1</i> Resistenz aufgrund eines systemischen Signals? .....	105
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>106</b>
5.1 Gewebespezifische Expression und intrazelluläre Lokalisation von LTPIV.4 und AZI1 in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	106
5.2 LTPIV.4 in der Pseudomonas Resistenzreaktion .....	107
5.3 LTPIV.4 und AZI1 in der Abwehrreaktion gegen <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	107
5.4 Die AZI1 Funktion in der <i>Arabidopsis</i> Verwundung .....	108
5.5 LTPIV.4 in der Hormon-induzierten und primären Immunantwort .....	109
5.6 LTPIV.4 in der systemischen Resistenz .....	112
5.7 LTPIV.4 Substratcharakterisierung .....	112
5.8 Modell für die Funktion von LTPIV.4 in der pflanzlichen Immunabwehr.....	115
5.8.1 Intrazelluläre Funktion von LTPIV.4 .....	116
5.8.2 Extrazelluläre Funktion von LTPIV.4 .....	117
5.9 Ausblick .....	119
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>121</b>
<b>Summary .....</b>	<b>124</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>126</b>
<b>Anhang .....</b>	<b>142</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>153</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>154</b>

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
A	Ampere
ABA	Abscisinsäure
APS	Ammoniumpersulfat
BHT	Buthylhydroxytoluol
bp	Basenpaare
BSA	„Bovine Serum Albumine“ (Rinderserumalbumin)
ca.	Circa
cDNA	komplementär DNA
cfu	„colony forming units“ (koloniebildende Einheit)
CID	„collision-induced dissociation“
cm	Zentimeter
CLSM	Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
d	Durchmesser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESI <sup>-</sup>	negative Elektronenspray-Ionisation
f	femto
FAF	„fatty acid free“ (Fettfrei)
g	Erdbeschleunigung
GFP	Grünfluoreszierendesprotein
GUS	Glucoronidase
h	Stunde
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	Meerrettichperoxidase
Hz	Hertz
IMAC	Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäureisoleucin
kb	Kilobasen
l	Liter
ml	Milliliter
m	Meter
M	Molar
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
mg	Milligramm
min	Minute
mM	Millimolar
MRM	„multiple reaction monitoring“
MS	Massenspektrometer
μ	Mikro

---

µg	Mikrogramm
µmol	Mikromol
n	Nano
OD	optische Dichte
OPDA	12-Oxophytodiensäure
p	Piko
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	Pyrococcus furiosus
pv.	Pathovar
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Salicylsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	„standard error“ (Standardfehler)
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermus aquaticus
TBS	Puffer Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPP	Triphenylphosphat
TOF	„time of flight“ (Flugzeit)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
v/w	Massenverhältnis
X-Gluc	Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure

# 1 Einleitung

## 1.1 Lipid Transfer Proteine

Pflanzliche Zellen und deren Kompartimente unterliegen ständigen Stoffwechselfvorgängen und Erneuerungsprozessen. Organellmembrane wie beispielsweise Chloroplasten-, Mitochondrien-, oder Glyoxysomen- wie auch die Plasmamembran sind dafür auf den Transport von membranstabilisierenden Lipiden, insbesondere Phospholipiden, angewiesen, da ihnen entsprechende Enzyme zur selbstständigen Biosynthese fehlen. Ein interzelluläres Transportsystem, welches die lipophilen Moleküle durch das wässrige Zellmilieu schleust, ist für diesen Prozess unabdingbar (Moreau et al., 1998; Carvalho and Gomes, 2007). Erstmals wurde 1975 eine Familie von Proteinen beschrieben, welche möglicherweise eine derartige Transportfunktion *in vivo* übernehmen könnte. Diese These beruht auf der Beobachtung, dass Proteine *in vitro* einen bidirektionalen Transport von Phospholipiden zwischen zwei Membranen ausführen können (Kader, 1975). Aufgrund dessen wurden Proteine mit eben dieser Eigenschaft „phospholipid exchange proteins“ (PLEPs) genannt (Kader, 1996). Da es sich dabei jedoch nicht um einen echten 1:1 Austausch von Phospholipiden handelt, setzte sich in den 90iger Jahren die Bezeichnung „phospholipid transfer proteins“ (PLTP) durch (Wirtz, 1991; Yamada, 1992). Die derzeit für diese Proteinfamilie gängige Bezeichnung „lipid transfer proteins“ (LTP) etablierte sich erst nachdem aufgezeigt werden konnte, dass neben Phospholipiden auch andere Lipide transportiert werden können (Zachowski et al., 1998). LTPs weisen demnach keine Spezifität für Phospholipide auf und werden daher typischerweise auch als nicht-spezifische Lipid Transfer Proteine (nsLTPs) bezeichnet (Kader, 1996). Da auch nichtblühende Pflanzen, wie Lebermoose, Bärlappgewächse, Farne und Gymnospermen im Gegensatz zu Algen LTP-kodierende Gene besitzen, lassen evolutionsbiologische Studien den Rückschluss zu, dass sich die Genfamilie der nsLTPs erst nach der pflanzlichen Landbesiedelung ausgebildet hat (Edstam et al., 2011). Auch in anderen nicht pflanzlichen Organismen, wie Hefe (Connerth et al., 2012) oder Tieren (Wirtz, 1991), konnten LTPs nachgewiesen werden, was auf eine auf dem Land ubiquitär wichtige Funktion dieser Proteinfamilie hinweist.

### 1.1.1 Struktur und Spezifität

Dem strukturellen Aufbau und den verschiedenen Transportmöglichkeiten von LTPs wurde in den letzten zwanzig Jahren besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Erstmals erfolgte 1996 eine Zuordnung verschiedenster LTPs in zwei Unterfamilien, LTP<sub>1</sub> (9 kDa) und LTP<sub>2</sub> (7 kDa), ausgehend von deren Masse (Kader, 1996; Douliez et al., 2001; Samuel et al., 2002; Carvalho and Gomes, 2007). Aufgrund der Vielzahl neu identifizierter LTPs in den folgenden Jahren wurde 2008 durch Boutrot et al. eine spezifischere Klassifikation vorgenommen (Boutrot et al., 2008). Diese Unterteilung der LTPs in neun Untergruppen erfolgte auf Grundlage von Sequenzuntersuchungen an *Oryza sativa* (Reis), *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) und *Triticum aestivum* (Weizen). Wang et al. kritisierten an dieser Klassifikation, dass einige LTPs keiner der 9 Untergruppen zugeordnet werden können (Wang et al., 2012). Daraus resultierte 2012 die jüngste Unterteilung in 5 Typen. Ausgangspunkt dafür bilden Untersuchungen an 121 verschiedenen Pflanzenspezies, wobei 595 LTPs identifiziert und zur Typisierung herangezogen wurden (Wang et al., 2012). Basierend auf diesen Erkenntnissen bauten Wang et al. eine Datenbank auf, in der Sequenzinformationen, Strukturinformationen, biologische Daten sowie relevante Literatur zu allen pflanzlichen LTPs zusammengestellt sind (<http://nsltpdb.life.nthu.edu.tw/>) (Wang et al., 2012).

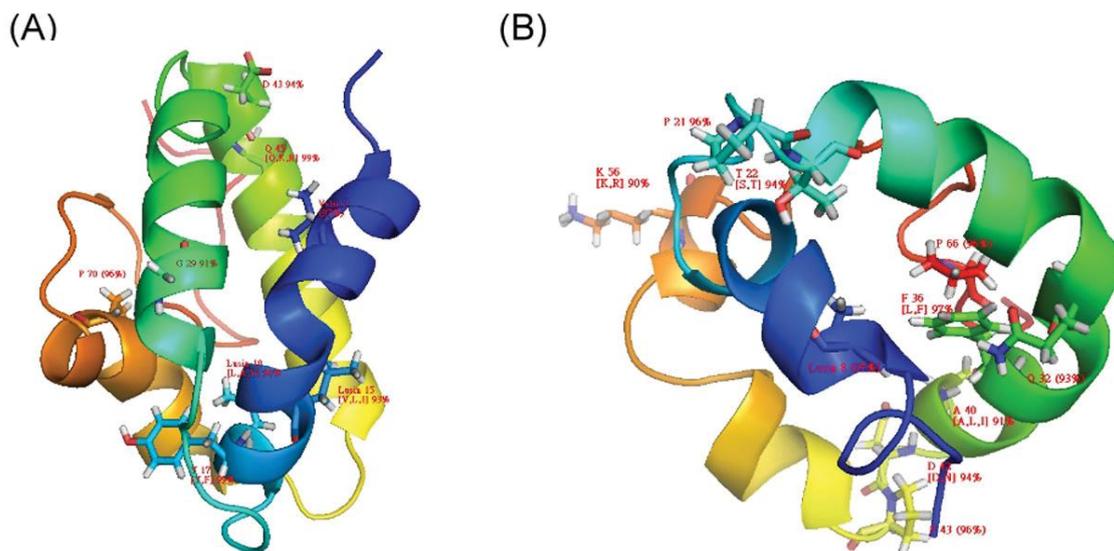


Abbildung 1.1 Mit Prostyle erzeugte Modelle von (A) Type I und (B) Type II LTPs (Wang et al., 2012)

Alle identifizierten LTPs zeigen eine starke Homologie ihrer Proteinsequenz sowie ähnliche Charakteristika (Kader, 1996; Wang et al., 2012). Besonders konserviert ist ein 8 Cystein (Cys)

beinhaltendes Motiv, welches miteinander 4 Disulfidbrücken ausbildet und zur hohen Stabilität der LTPs beiträgt (Tai and Kaplan, 1985; Kader, 1997).

C-Xn-C-Xn-CC-Xn-CXC-Xn-CXn-C (8-Cys-Motiv)

Weiter bestehen zwischen den verschiedenen Typen spezieübergreifend keine großen Ladungsunterschiede. Die Anzahl der geladenen Aminosäuren eines LTPs beläuft sich zwischen 6-13 Stück (Sterk et al., 1991; Pelese-Siebenbourg et al., 1994; Castro et al., 2003; Lin et al., 2005; Wang et al., 2012). Die fünf verschiedenen LTP Typen nach Wang et al. unterscheiden sich jedoch in ihren physikochemischen Eigenschaften.

Tabelle 1.1 Physikochemische Unterschiede der fünf LTP Typen (Wang et al., 2012)

	Type I	Type II	Type III	Type IV	Type V
<b>Molekulargewicht (kDa)</b>	9	7	9	> 9	> 9
<b>pI-Wert</b>	alkalisch	alkalisch	alkalisch	schwach alkalisch	sauer
<b>Aminosäure X zwischen Cys 5 und 6 (CxC Motiv)</b>	hydrophil	hydrophob	hydrophob	hydrophob	hydrophob

Während LTPs der Typen I und III ein Molekulargewicht von 9 kDa besitzen, haben Proteine des Typs II 7 kDa und der Typen IV und V mehr als 9 kDa. Proteine der Typen I-III weisen im Gegensatz zu den Proteinen mit einem sauren pI-Wert der Typ V Unterfamilie einen alkalischen pI-Wert auf, während Mitglieder des Typ IV einen nur schwach alkalischen isoelektrischen Punkt haben (Wang et al., 2012). Ein weiteres Zuordnungskriterium stellt die Untersuchung der Aminosäure (X) zwischen den Cysteinen 5 und 6 (CxC-Motiv) dar. LTPs der Typ I Unterfamilie zeigen hier in den meisten Fällen eine hydrophile Aminosäure, während bei alle anderen Unterfamilien an dieser Stelle größtenteils eine hydrophobe Aminosäure zu finden ist (Wang et al., 2012). Typ I und II sind abundant in allen untersuchten Spezies (121) vorhanden, während LTPs des Typ III nur in *Oryza sativa* und *Arabidopsis* und Typ IV und V nur in *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse) und *Arabidopsis* identifiziert wurden (Wang et al., 2012).

Durch die differenzielle Ausbildung der vier charakteristischen Disulfidbrücken von LTPs ergeben sich Unterschiede innerhalb der Sekundärstrukturen (Douliez et al., 2001; Liu et al., 2002; Samuel et al., 2002). Während einige LTPs vier  $\alpha$ -Helices ausbilden und ein langes carboxy-terminales Schleifenende aufweisen, besitzen andere LTPs nur drei  $\alpha$ -Helices, eine Region mit zwei einfach geschwungenen Helices und keine definierte Sekundärstruktur am carboxy-terminalen Ende (Shin et al., 1995; Lee et al., 1998; Douliez et al., 2001; Samuel et al., 2002).

Die dreidimensionale Struktur von pflanzlichen LTPs konnte erstmals Mitte der 90er Jahre dargestellt werden. Dies gelang mittels Kristallisierung von LTPs der Spezies Mais (Shin et al., 1995), Weizen (Pebay-Peyroula et al., 1992) und Reis (Hwang et al., 1993) sowie anhand von  $^1\text{H-NMR}$ -Daten eines Mais-LTPs (Gincel et al., 1994). Das interessanteste tertiäre Strukturmerkmal ist das Vorhandensein einer flexiblen hydrophoben Höhle in Form eines Tunnels, auch Tasche genannt, welches allen LTPs gemein ist (Carvalho and Gomes, 2007). Es zeigen sich jedoch maßgebliche Unterschiede im Aufbau dieser Tunnel. Bei einigen LTPs befindet sich eine Reihe von Aminosäuren, wie Alanin, Arginin, Leucin, Isoleucin, Lysin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin und Valin, darin, um die Hydrophobizität der Tasche zu ermöglichen. Charakteristisch für diesen Tunnel ist das Vorhandensein eines kleinen und eines großen Eingangs sowie zwei geladener Aminosäuren an Position 44 (Arg) und 35 (Lys) mit einer möglichen Schlüsselrolle für die Lipidinteraktion am großen Eingang (Shin et al., 1995; Lee et al., 1998). Andere LTPs haben indes einen triangelförmigen Tunnel, indem vor allem die Aminosäuren Alanin, Cystein, Isoleucin, Leucin, Phenylalanin und Valin zu finden sind (Samuel et al., 2002).

Durch die unterschiedlich ausgeprägten Tertiärstrukturen ist einerseits eine Substratspezifität möglich, andererseits sind durch deren Flexibilität auch unspezifische Interaktionen denkbar. Wie 1975 erstmals gezeigt, ermöglichen LTPs den Transport von Phospholipiden zwischen zwei Membranen (Kader, 1975). Im Jahr 2000 konnten Douliez et al. beispielsweise ein LTP (nsLTP1) aus Weizen näher auf dessen Bindungsaffinität im Zusammenhang mit der Kettenlänge sowie der Sättigung der einzelnen Fettsäuren charakterisieren (Douliez et al., 2000). Mit Tyrosin-Fluoreszenzmessungen ergaben sich keine Interaktionen mit Fettsäuren oder Phospholipiden mit einer Kettenlänge von 10 Kohlenstoffatomen (C-Atomen). Die Affinität stieg in diesem Falle mit Zunahme der Fettsäurekettenlänge. Dabei zeigte sich die stärkste Bindungsintensität bei Kettenlängen von 14-18 C-Atomen, sowie bei ein- bzw. zweifach ungesättigten C18 Fettsäuren (Douliez et al., 2000). LTPs sind ebenfalls in der Lage, durch die jeweilige Form des Tunnels entweder ein oder zwei Fettsäuren gleichzeitig oder auch ein Lipid mit zwei Acylketten zu binden (Shin et al., 1995; Sodano et al., 1997; Charvolin et al., 1999). Des Weiteren können pflanzliche LTPs Phospholipide mit unterschiedlichsten Kopfgruppen, wie Phosphoglycerole, Phosphoinositole, Phosphocholine und Phosphoethanolamine, transportieren (Kader, 1996). Beispielsweise konnten

Lascombe et al. 2008 mit Fluoreszenzmessungen der Tryptophan<sup>51</sup>-Fluoreszenz eine sehr hohe Affinität ( $KD = 0,03 \mu M$ ) eines LTPs (DIR1) zu C16-18 Lysophosphatidylcholinen belegen (Lascombe et al., 2008). Weiteren Forschungsergebnissen zufolge sind LTPs jedoch in der Lage, weitaus mehr verschiedene Substrate, wie zum Beispiel Fettsäuren, Acyl-CoA, Prostaglandin B oder Galaktolipide, zu binden bzw. zu transportieren (Nishida and Yamada, 1985; Tsuboi et al., 1992; Yamada, 1992; Castagnaro and Garcia-Olmedo, 1994; Zachowski et al., 1998; Tassin-Moindrot et al., 2000; Douliez et al., 2001).

### 1.1.2 Lokalisation

Wichtige Punkte für die *in vivo* Charakterisierung eines LTPs sind vor allem auch wo, wann und wie dieses gebildet wird (Carvalho and Gomes, 2007). Bisher konnten LTPs in den unterschiedlichsten pflanzlichen Geweben nachgewiesen werden, unter anderem in Blättern, Blüten, Blattstielen, Stämmen und Wurzeln (Thoma et al., 1993; Pyee et al., 1994; Thoma et al., 1994; Chae et al., 2010). Typisch für die Gesamtheit der LTPs ist deren Synthese als Proprotein. Charakteristisch hierfür ist eine 7-49 Aminosäuren lange Signalsequenz am N-terminalen Ende, welche den primären Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) initiiert (Arondel et al., 2000; Wang et al., 2012). Dort wird diese Signalsequenz abgespalten und die prozessierten Proteine werden aus dem ER an ihre intra- oder extrazellulären Zielorte geleitet (Tsuboi et al., 1992; Thoma et al., 1993). Nachdem am C-terminalen Ende der LTPs kein ER Aufenthaltssignal (KDEL) vorhanden ist, werden diese sekretiert (Kader, 1996). Mehrere gewebespezifische Untersuchungen und Proteomstudien bestätigen die sekretionsbedingte extrazelluläre Lokalisation in verschiedenen pflanzlichen Spezies. In Gerste wurde ein LTP aus den Samen in Aleuron Zellkulturmedium sekretiert (Mundy and Rogers, 1986). Auch in Karotten konnte ein LTP in embryonalen Zellkulturen neben anderen extrazellulären Proteinen detektiert werden (Sterk et al., 1991). Noch dazu konnten LTPs neben diesen Studien auch extrazellulär in *Arabidopsis* (Maldonado et al., 2002), Tabak (Dani et al., 2005), Wein (Coutos-Thevenot et al., 1993), Sojabohne (Djordjevic et al., 2007), Mungobohne (Kusumawati et al., 2008) und einigen anderen Spezies nachgewiesen werden (Pagnussat et al., 2012). Ein weiteres LTP (WAX9) in *Brassica oleracea* (Brokkoli) ist mit der äußeren Wachsschicht der Blätter assoziiert und weist ein besonders hohes Expressionsmuster in jungen Blättern auf (50 % aller gebildeten Proteine). In älteren Blättern verringert sich die Expression (nur noch 4 %) (Pyee et al., 1994). Dies deutet auf eine Rolle im Kutinmonomertransport in wachsenden Geweben hin (Pyee et al., 1994). Einige LTPs werden aber nicht nur sekretiert, sondern sind zusätzlich an der Zellwand assoziiert (Thoma et al., 1993; Zhang et al., 2012). Jedoch konnten LTPs nicht nur extrazellulär, sondern auch intrazellulär

detektiert werden (Diz et al., 2011). In Rizinussamen befindet sich ein LTP in den Glyoxysomen, welches möglicherweise eine Rolle in der  $\beta$ -Oxidation spielt (Tsuboi et al., 1992). Weiterhin konnte ein LTP in der Vakuole (für die Proteinspeicherung) in Kuhbohnsensamen (*V. unguiculata*) nachgewiesen werden (Carvalho et al., 2001; Carvalho et al., 2004). Die Funktion von LTPs ist weiterhin ein großes, bislang nicht völlig entschlüsseltetes Diskussionsthema, vor allem nachdem Pagnussat et al. 2012 zeigen konnten, dass mit der Wässerung und Keimung von Sonnenblumensamen (*H. annuus*) die Relokalisation eines LTPs (*HaAP10*) eingeleitet wird. Dabei wird das in trockenen Samen intrazellulär lokalisierte LTP während der Keimungsphase aus der Zelle heraus geschleust (Pagnussat et al., 2009; Pagnussat et al., 2012).

### 1.1.3 Biologische Aktivität

Die Identifikation der genauen biologischen Aktivität und Funktion der LTP-Familie hat sich als besonders komplex erwiesen. Insbesondere da diese Proteine zu einer Multigenfamilie gehören, in der viele Gene in verschiedenen Geweben zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien und durch unterschiedlichste Stimuli induziert werden (Carvalho and Gomes, 2007). Durch die diversen Lokalisationsbeispiele aus Kapitel 1.1.2 und anderen Untersuchungsergebnissen ist es möglich, LTPs eine Reihe an putativen Funktionen und Aktivitäten zu zuordnen. Neben dem möglichen Einfluss in der  $\beta$ -Oxidation (Tsuboi et al., 1992) und der somatischen Embryogenese (Sterk et al., 1991) besitzen LTPs einige weitere physiologische Funktionen in der Pflanze. Untersuchungen an Osterlilien (*Lilium longiflorum*) zeigen die Notwendigkeit eines LTPs für die Pollenanhaftung (Park et al., 2000). Weiterhin wird LTPs im Zusammenhang mit einigen Lokalisationsstudien in jungen, sich entwickelnden Blättern eine Rolle beim Aufbau von Wachsen und der Bildung der Kutikula durch den Transport von Kutinmonomeren zugeschrieben (Pyee et al., 1994; Hollenbach et al., 1997; Han et al., 2001; Cameron et al., 2006).

Unzählige Studien haben weiter belegt, dass die Mehrheit pflanzlicher Allergene LTPs sind (Carvalho and Gomes, 2007). Neben Früchten von Rosaceae (Pastorello et al., 1999; Pastorello et al., 2001; Diaz-Perales et al., 2002; Ramazzina et al., 2012) und Vitaceae (Pastorello et al., 2003) enthalten auch andere Pflanzenspezies, wie Mais (Kuppanan et al., 2011), Sellerie (Gadermaier et al., 2011) oder Erdnüsse (Lauer et al., 2009) allergene LTPs. Physikochemische Eigenschaften, wie die große Stabilität und die erhöhte Resistenz gegen chemische und thermische Denaturierung sowie enzymatischen Verdauung, erlauben es LTPs in einer immun-reaktiven Form bis in den Säugetierdarm vorzudringen und diesen zu reizen (Asero et al., 2000; Lindorff-Larsen and Winther, 2001; Pastorello

et al., 2003; Vassilopoulou et al., 2006; Cavatorta et al., 2010). Wie diese Reizung im Einzelnen erfolgt, ist bisher nicht genauer bekannt. Möglicherweise dient die pflanzliche Allergenproduktion vor allem in Früchten als Abwehrmechanismus gegen Frassfeinde.

Die Expression verschiedener pflanzlicher LTP Gene wird weiterhin durch eine Vielzahl an abiotischen und biotischen Stressfaktoren induziert (Jang et al., 2004; Wu et al., 2004). Beispielsweise konnte die Genexpression eines Erdbeer-LTPs durch die Phytohormone Abscisinsäure (ABA) und Salicylsäure (SA) sowie durch Kältestress und Verwundung induziert werden, währenddessen Hitze- und Trockenstress keine Induktion auslösten (Yubero-Serrano et al., 2003). Die antimikrobielle Wirkung von LTPs konnte erstmals 1993 von Molina et al. gezeigt werden (Molina et al., 1993). So konnte in Experimenten mit homologen LTPs aus Gerste und Mais eine wachstumshemmende Wirkung gegen *Pseudomonas solanacearum* Bakterien, wie auch gegen den Pilz *Fusarium solani* nachgewiesen werden (Molina et al., 1993). Auch weitere LTPs sind in der Lage, sich direkt negativ auf Pathogene auszuwirken. Manche zeigen *in vitro* als auch in infizierten Pflanzen antibakterielle und antifungale Wirkungen (Thoma et al., 1993; Cammue et al., 1995).

Ein weiterer wichtiger Punkt neben der direkten antimikrobiellen Funktion von LTPs ist deren Rolle in verteidigungsassoziierten Signalwegen (Blein et al., 2002; Ng et al., 2012). Im Jahr 2006 beschrieben Roy-Barman et al. die Funktion eines LTPs (*Ace-AMP1*) aus *Allium cepa* (Zwiebel) in transgenen Weizen Pflanzen. Dabei wurden durch die dauerhafte Expression von *Ace-AMP* verteidigungsassoziierte Gene, wie beispielsweise die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), die eine Rolle bei der Bildung von SA aus Phenylalanin spielt, und die *Pathogenesis-Related (PR)*-Gene *PR-2* und *PR-3*, induziert (Roy-Barman et al., 2006). Neben der Induktion von antimikrobiellen Proteinen zeigte sich der Zusammenhang zwischen der pflanzlichen Immunantwort und LTPs auch darin, dass LTP-Gene selbst durch verschiedene Stress-induzierte Phytohormonsignalwege, wie durch SA, Ethylen (ET) oder Jasmonate, reguliert werden konnten (Jung et al., 2003; Jung et al., 2005; Jung et al., 2006).

In mehreren Fällen wurde gezeigt, dass LTPs für pflanzliche Prozesse notwendig sind (Pyee et al., 1994; Yubero-Serrano et al., 2003; Roy-Barman et al., 2006), trotzdem ist die genaue Rolle der LTPs nicht vollständig geklärt.

## 1.2 Das pflanzliche Immunsystem

Ein großes Unterscheidungsmerkmal zwischen Pflanzen und Tieren ist die pflanzliche Sesshaftigkeit. Außer einigen Organellen, die der Reproduktion dienen, ist es Pflanzen nicht möglich, ihren Standort zu verändern und damit auf gegebene Umwelteinflüsse zu reagieren. Ihr ganzes Leben ist darauf ausgelegt, an demselben Ort genug Wasser und Nährstoffe zu erhalten und sich dort weiter zu vermehren. Durch diese Unbeweglichkeit sind Pflanzen in der Natur ständigen Bedrohungen und dem Befall von Pathogenen, wie Viren, Bakterien, Pilzen oder Insekten, ohne Fluchtmöglichkeit ausgesetzt. Dabei hat jeder Angreifer seine eigene spezielle Strategie entwickelt Pflanzen zu befallen und zu parasitieren. Aufgrund ihrer Lebensweise können Pflanzenpathogene generell in biotrophe oder nekrotrophe Pathogene unterteilt werden (Glazebrook, 2005). Während nekrotrophe Pathogene ihre Wirtszellen zerstören, beispielsweise durch den Einsatz von Phytotoxinen (Collado et al., 2007), um dann die benötigten Nährstoffe aus der Zelle aufzunehmen, erhalten Biotrophe ihre Nährstoffe von lebenden Zellen. Dafür dringen sie mittels spezieller Strukturen, zum Beispiel Haustorien, in die lebenden Pflanzenzellen ein, ohne diese zu zerstören (Glazebrook, 2005). Viele pflanzliche Pathogene zeigen abhängig vom Stadium ihres Lebenszykluses beide Lebensweisen (Pieterse et al., 2009). Im Gegensatz zu Tieren haben Pflanzen kein mobiles, somatisches adaptives Immunsystem. Um sich gegen die Vielzahl an unterschiedlichen Pathogenen verteidigen zu können, greifen Pflanzen auf passive strukturelle Barrieren, wie Dornen, Stacheln, die Kutikula oder auch auf präinvasive antimikrobielle Metabolite, wie Saponine, zurück, um potentielle Angreifer abzuwehren (Papadopoulou et al., 1999). Gelingt es Pathogenen diese Barrieren zu überwinden, ist es der Pflanze möglich, ein breites Spektrum an induzierbaren Abwehrmechanismen zu aktivieren (Pieterse et al., 2009). Sie ist dabei auf ihr angeborenes Immunsystem und auf systemische Signale von infizierten Gewebe angewiesen (Jones and Dangl, 2006). Das angeborene Immunsystem von Pflanzen zeichnet sich insbesondere durch zwei weitreichende und frühe Mechanismen der primären Immunreaktion aus, die das Eindringen von Pathogen verhindern sollen: die PAMP/MAMP-abhängige Immunität (PTI; „PAMP-triggered immunity“; MTI; „MAMP-triggered immunity“) und die Effektor-abhängige Immunität (ETI; „effector-triggered immunity“).

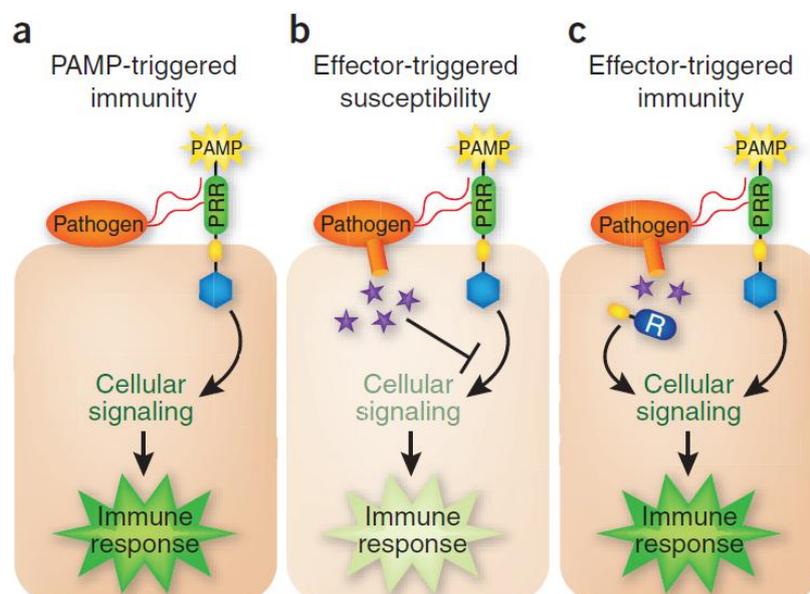


Abbildung 1.2 Vereinfachtes Schema des pflanzlichen Immunsystems (a) Nach einer Pathogeninfektion aktivieren PAMPs PRRs im Wirt und lösen damit eine Signalkaskade aus, welche zur PAMP-abhängigen Immunität (PTI) führt; (b) Virulente Pathogene entwickeln Effektoren (lila Sterne) die die PTI unterdrücken. Daraus resultiert die Effektor-abhängige Suszeptibilität (ETS); (c) Für die Erkennung der spezifischen Effektoren haben Pflanzen Resistenzproteine (R) entwickelt. Diese Erkennung führt zu einer zweiten Immunantwort, der sogenannten Effektor-abhängigen Immunität (ETI) (Pieterse et al., 2009).

### 1.2.1 PAMP/MAMP-abhängige Immunität (PTI/MTI)

Während einer Infektion erkennen in der Plasmamembran sitzende „Muster-erkennende Rezeptoren“ (PRRs; „pattern recognition receptors) konservierte, molekulare Pathogenstrukturen, sogenannte Pathogen-/Mikroben-assoziierte molekulare Muster (PAMPs/MAMPs; „pathogen-/microbe-associated molecular patterns“) (Zipfel, 2008). Diese MAMP Erkennung führt zu einer intrazellulären Aktivierung von MAP-Kinase Signalwegen und anschließender Induktion spezifischer Abwehrgene (Asai et al., 2002; Nürnberger et al., 2004). Als MAMPs sind bisher neben dem bakteriellen Flagellin (Felix et al., 1999), der bakteriellen Elongationsfaktor Tu (Kunze et al., 2004), Chitin (Felix et al., 1993; Watt et al., 2006), einige Lipopolysaccharide, Peptidoglykane und einige Proteine bekannt (Newman et al., 1995; Gust et al., 2007). Das bakterielle Protein Flagellin ist dabei eines der meist untersuchten MAMPs in Pflanzen. Bereits ein 22 Aminosäure langes Motiv am N-terminalen Ende des Proteins, das Peptid (*flg22*), bildet das aktive Epitop, welches in *Arabidopsis* vom Flagellin spezifischen Rezeptor FLS2 erkannt wird (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 2001; Newman et al., 2013). Die Rezeptorkinase FLS2 mit einer Leucin-reichen, extrazellulären Domäne (LRRs; „leucin rich repeats“) und einer intrazellulären Serin/Threonin-Protein Kinase Domäne, löst

nach der Pathogenerkennung eine Kaskade aus MAP-Kinase Signalwegen und Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie aus und induziert damit spezifische Abwehrreaktionen (Asai et al., 2002; Chisholm et al., 2006; Guo et al., 2009).

### 1.2.2 Effektor-abhängige Immunität (ETI)

Bedingt durch die Ko-Evolution von Pathogenen und ihren Wirtspflanzen entwickelten Pathogene sogenannte Effektormoleküle, welche in die pflanzlichen Zellen transportiert werden und dort die PTI unterdrücken. Pathogene erhalten damit eine gesteigerte Virulenz (Pieterse et al., 2009). Dieser Prozess wird als Effektor-abhängige Suszeptibilität (ETS; „effector-triggered susceptibility“) bezeichnet (Jones and Dangl, 2006). Beispielsweise führen bakterielle Effektorproteine, die über das pathogene Type III Sekretionssystem (T3SS) in das Zytoplasma von Wirtszellen geschleust werden, zu einer Unterdrückung der PTI (Jamir et al., 2004; He et al., 2006; Nomura et al., 2006). Innerhalb der natürlichen Anpassungsmechanismen konnten Pflanzen einen entsprechenden Abwehrmechanismus gegen Effektormoleküle entwickeln. Die Pflanze schützt sich durch die sogenannte ETI, indem eine Reihe von Resistenz (R)-Proteinen Effektoren erkennen und eine entsprechende Immunreaktion auslösen. Diese R-Proteine werden nach ihren Domänen als NB-LRR-Proteine (NB; „nucleotide binding“; LRR; „leucine rich repeats“) bezeichnet und von spezifischen R-Genen kodiert (Dangl and Jones, 2001). Das R-Protein weist dabei eine sehr hohe Spezifität auf, indem dieses nur ein bestimmtes avirulentes (avr) Genprodukt detektieren kann (Gen für Gen Antwort) (Flor, 1956; Dangl and McDowell, 2006). R-Proteine können dabei möglicherweise nicht direkt mit den avirulenten Genprodukten interagieren, sondern detektieren Veränderungen an Wirtspoteinen, welche durch die pathogenen Proteine verursacht wurden (Van der Biezen and Jones, 1998). Nachdem die R-Proteine den kompatiblen Effektor „entdeckt“ haben, kommt es zu einer extrem schnellen und starken Abwehrreaktion, bei der vor allem reaktive Sauerstoff Spezies (ROS; „reactive oxygen species“) und reaktive Stickstoff Spezies („reactive nitrogen species“) gebildet werden und eine hypersensitive Antwort (HR; „hypersensitive response“) ausgebildet und damit lokal programmierter Zelltod (PCD „programmed cell death“) induziert wird (Mur et al., 2008; Hiruma et al., 2013). Diese lokalen Abwehrmechanismen sorgen für eine Reduktion des Pathogenwachstums, die Isolierung der Pathogene vom Rest der Pflanze und können weitere lokal induzierte und systemische pflanzliche Abwehrmechanismen anregen. Beispielsweise führt die ETI zur Änderung des zellulären Redoxpotenzials, welches direkt oder durch die damit verbundene, vermehrte Produktion von SA, zu einer Induktion mehrerer lokaler, sowie systemischer, abwehrspezifischer Gene und Mechanismen führt (Jones and Dangl, 2006; Miller et al., 2009).

### 1.2.3 Induzierte pflanzliche Abwehrmechanismen

Durch die primäre Immunreaktion der PTI und ETI angestoßene weitere Signalwege werden allgemein als induzierte pflanzliche Abwehrmechanismen bezeichnet. Die Vielzahl dieser Mechanismen zielt darauf ab, die Ausbreitung eingedrungener Pathogene in der Pflanze zu verhindern. Dabei übernehmen vor allem Phytohormone, wie SA, Jasmonsäure (JA) und ET, die Regulation der Signale von der primären Immunreaktion zu den später induzierten Mechanismen. In Abhängigkeit von der Art des Pathogens werden ein oder mehrere Phytohormonsignalwege induziert (De Vos et al., 2005). Studien mit den Modellpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* (Tabak) konnten zeigen, dass biotrophe Pathogene generell sensitiv auf Abwehrmechanismen reagieren, welche durch SA reguliert sind. Dabei kommt es nach der Pathogeninfektion zu einer starken Zunahme an SA und darauffolgend an NPR1 (NON EXPRESSOR OF PR GENES 1). NPR1 wirkt als transkriptioneller Ko-Aktivator und verursacht durch die Interaktion mit verschiedenen TGA-Transkriptionsfaktoren die Aktivierung SA-responsiver Gene, wie beispielsweise *Pr1* (PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN 1) (Mou et al., 2003; Dong, 2004; Pieterse and Van Loon, 2004). Markergene für den SA-Signalweg sind neben *Pr1*, *Cbp60g* (CALMODULIN BINDING PROTEIN 1) und *Sid2* (ISOCHORISMATE SYNTHASE) (Wildermuth et al., 2001; Wang et al., 2009). Im Gegensatz zu SA reagieren JA und ET regulierte Mechanismen auf nekrotrophe Pathogene (Thomma et al., 2001; Glazebrook, 2005). Auch bei Verwundung werden JA regulierte Signalmechanismen induziert (Koo et al., 2009). Neben den Hauptkomponenten SA, JA, und ET spielen auch noch weitere Phytohormone und Dicarbonsäuren, wie Gibberellinsäure (GA), Abscissinsäure (ABA), Auxin (IAA) und Azelainsäure (AzA), eine Rolle in den Signalmechanismen der angeborenen Immunantwort (Pieterse et al., 2009).

Pflanzen sind in der Natur oft mehreren Aggressoren gleichzeitig oder kurz hintereinander ausgesetzt, was wiederum einen erheblichen Einfluss auf die Immunreaktionen der Wirtspflanzen hat (Stout et al., 2006; Poelman et al., 2008; Pieterse et al., 2009). Wichtig für Pflanzen ist die schnelle Regulierbarkeit von Abwehrmechanismen um zielgerichtet auf komplexe Umwelteinflüsse reagieren zu können, da die Aktivierung der Abwehrmechanismen auch auf Kosten der ökologischen Fitness geht (Walters and Heil, 2007). Um Pflanzen vor immenser Energievergeudung zu bewahren, können sich die verschiedenen Phytohormonsignalwege gegenseitig beeinflussen und dadurch schnell und effektiv verschiedene Abwehrmechanismen regulieren (Reymond and Farmer, 1998; Kunkel and Brooks, 2002; Pieterse and Dicke, 2007). Während die JA und ET synergistisch arbeiten können, zeigen der SA und der JA Signalweg antagonistische Interaktionen (Penninckx et al., 1998; Koornneef et al., 2008). Erhöhte Level an SA unterdrücken die Expression von JA responsiven Markergenen, wie *Lox2* (LIPOXYGENASE 2), *Pdf1.2* (PLANT DEFENSIN 1.2) oder auch *Vsp2* (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2) (Spoel et al., 2003; Koornneef et al., 2008). In der Literatur finden sich jedoch auch

Beispiele für synergistische Wechselwirkungen von JA und SA, die zeigen, dass sowohl das Timing, die relative Konzentration sowie die Abfolge der Initiierung wichtig für die Signalinteraktion sind (Mur et al., 2006; Koornneef et al., 2008).

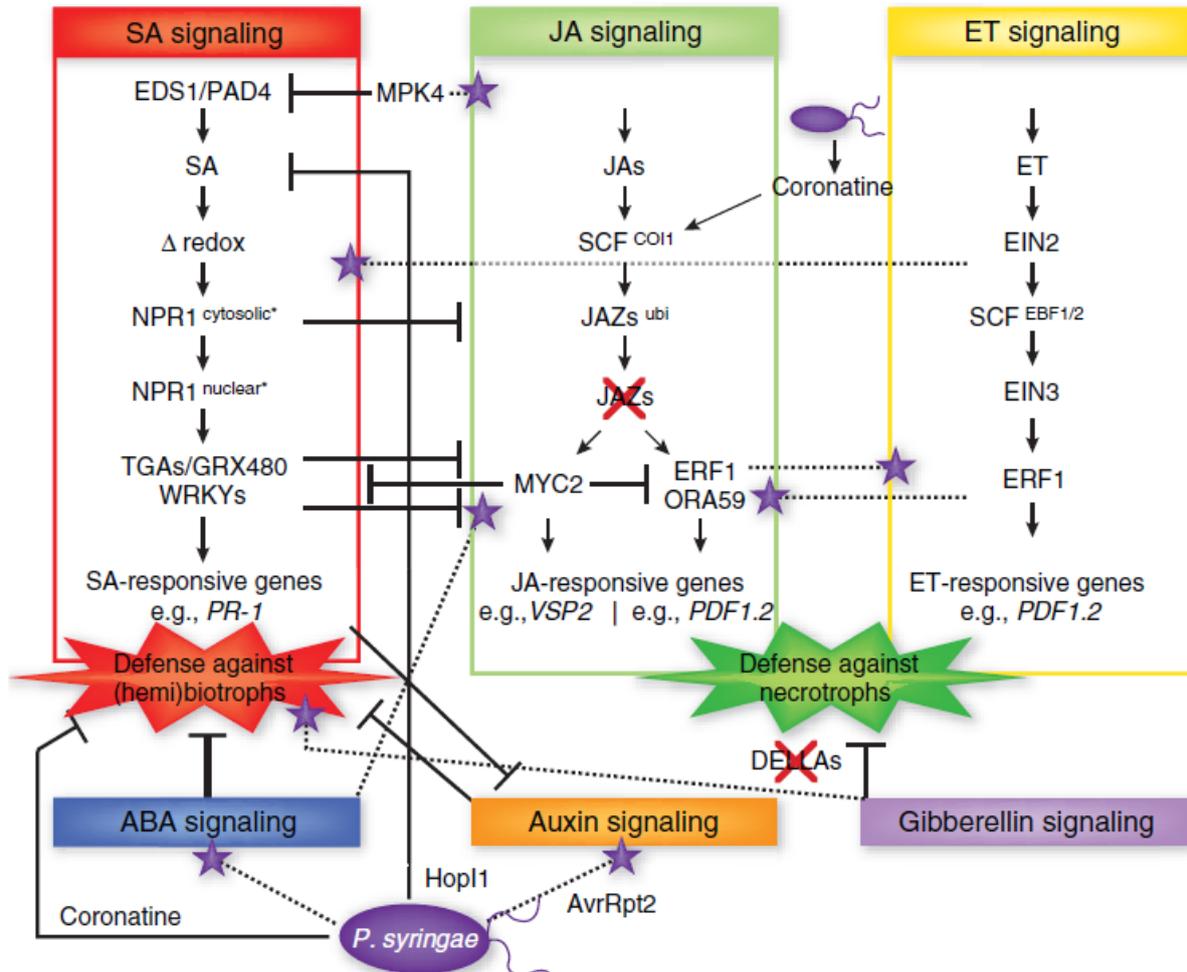


Abbildung 1.3 Übersicht über das Netzwerk der in der pflanzlichen Immunantwort beteiligten Phytohormonsignalwege (Pieterse et al., 2009)

### 1.2.4 Systemisch induzierte Resistenz

Die Immunisierung des restlichen Gewebes (systemisch induzierte Resistenz) gegen weitere Infektionen nach einer lokalen Pathogeninfektion wurde als erstes in den 1930er Jahren erwähnt und 1966 von Ross et al. erstmals als systemisch erworbene Resistenz (SAR; „systemic acquired resistance“) beschrieben (Chester, 1933; Ross, 1966). Die SAR kann durch PTI und ETI ausgelöst werden und ist mit erhöhten Leveln an SA an der lokalen Infektionsstelle sowie in den systemischen Geweben verknüpft. Davon ausgehend erfolgt eine Signalübertragung über das regulatorische

Protein NPR1 und damit verbunden die Aktivierung spezifischer PR Gene, welche häufig eine antimikrobielle Funktion besitzen (Dong, 2004; van Loon et al., 2006; Mishina and Zeier, 2007; Tsuda et al., 2008). Durch SAR wird noch nicht infiziertes Gewebe auf einen möglichen Befall vorbereitet. Dieses Zustand wird „Priming“ genannt und löst eine stärkere und schnellere Immunantwort auf erneute Infektionen aus (Conrath, 2011). Die Kommunikation zwischen dem primär infizierten Gewebe und den pathogenfreien Pflanzenteilen ist ein kritischer Punkt in der Ausbildung der SAR. Für die Aktivierung eines systemischen Signals ist ein intaktes Phloemgewebe nötig. Dies konnte anhand von Pfropfungsexperimenten nachgewiesen werden (Jenns and Kuc, 1979; Tuzun and Kuc, 1985). In Tabak wurde das Phloemgewebe oberhalb der Infektionsstelle entfernt, dabei zeigte sich, dass keine SAR ausgebildet werden konnte (Tuzun and Kuc, 1985). Auch bei Experimenten in Gurke blieb eine SAR Ausbildung aus, wenn die Petiole des infizierten Blattes abgeschnürt wurde (Guedes et al., 1980). Weiter konnten aus infizierten *Arabidopsis* Blättern gesammelte Phloemexudate, SAR in nicht infizierten Geweben neuer Pflanzen auslösen (Maldonado et al., 2002; Chaturvedi et al., 2008; Jung et al., 2009). Demnach scheint das Phloem als Medium für den Transport des systemischen Signals zu fungieren. Trotzdem ist es nicht das exklusive Transportsystem, da Kiefer und Slusarenko 2003 auch in Geweben, welche nicht an den Photoassimilattransportweg des primär infizierten Organs angeschlossen waren, SAR induzieren konnten (Kiefer and Slusarenko, 2003). Weiterführend konnte mittels aus infizierten *Arabidopsis* Pflanzen gesammelten Phloemexudaten sowohl in Tabak, Tomate, wie auch in Weizen eine entsprechende SAR ausgelöst werden (Chaturvedi et al., 2008; Chaturvedi et al., 2012). Diese speziessübergreifende SAR Induktion erlaubt den Rückschluss, dass ein SAR-Signal nicht speziesspezifisch ist. In den letzten 5 Jahren konnten einige pflanzliche Metabolite identifiziert werden, welche nach einer Infektion erhöht in Phloemexudaten vorliegen und/oder systemisch transportiert werden und somit potentiell an der Ausbildung der SAR beteiligt sind (Shah and Zeier, 2013).

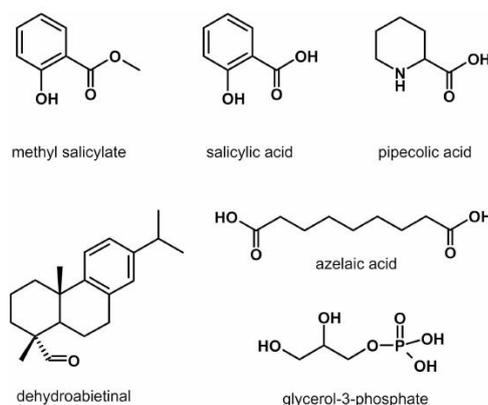


Abbildung 1.4 Von Pflanzen synthetisierte Metabolite mit einer Funktion im Langstreckentransport und/oder der Signalamplifikation während der Ausbildung der SAR (Shah and Zeier, 2013)

Diese Metabolite lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. In der ersten Gruppe befinden sich Methylsalicylat (MeSA) und Dehydroabietal (DA). Beide induzieren nach lokaler Applikation eine Akkumulation von SA in distalen Geweben (Park et al., 2007; Chaturvedi et al., 2012). Die zweite Gruppe setzt sich aus AzA und Pipecolinsäure (Pip) zusammen, welche Pflanzengewebe „primen“ und somit eine stärkere und schneller SA Akkumulation als Antwort auf eine Pathogeninfektion auslösen (Jung et al., 2009; Navarova et al., 2012). Ein Glycerol-3-Phosphat abhängiger Faktor ist ebenfalls in die SAR involviert, indem dieser die Verlagerung eines LTPs (DIR1) ermöglicht (Chanda et al., 2011; Mandal et al., 2011; Yu et al., 2013).

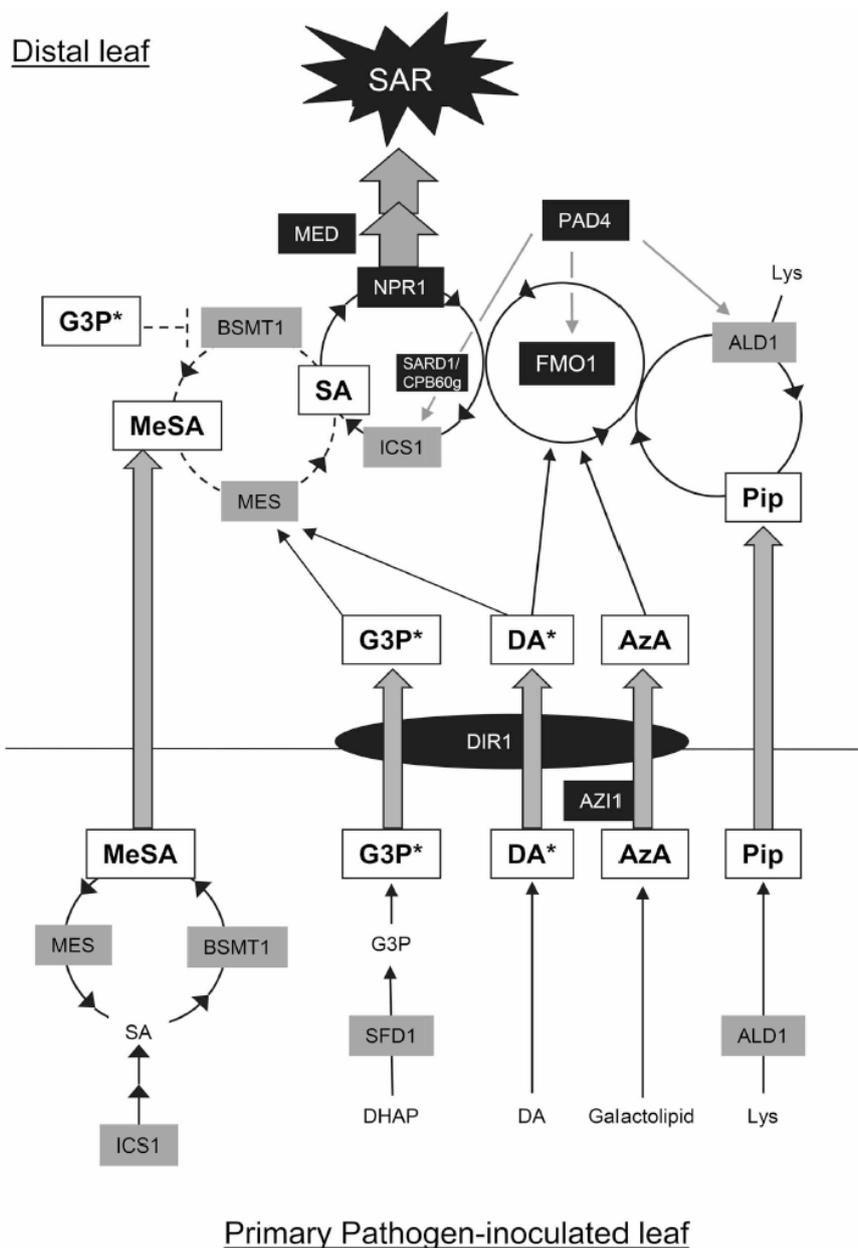


Abbildung 1.5 Schematische Übersicht des SAR Schaltkreises, sowie darin involvierter Signalmoleküle und deren Netzwerk (Shah and Zeier, 2013)

## 1.3 Lipid Transfer Proteine und deren Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die SAR ist ein komplexer Prozess, welcher nicht nur durch ein einfaches Signal ausgelöst wird, sondern vielfältigen speziesübergreifenden Mechanismen unterliegt und damit zum Schutz der Pflanze vor Pathogeninfektionen beiträgt. Auch LTPs haben innerhalb dieser Prozesse eine wichtige Rolle.

### 1.3.1 DIR1

Wie bereits dargestellt konnten gesammelte Phloemexudate von infizierten Blättern eine SAR in nicht infizierten Pflanzen auslösen. Dabei ist die Fähigkeit, eine SAR zu induzieren, sensitiv zu einem ProteinaseK und Trypsinverdau (Chanda et al., 2011; Chaturvedi et al., 2012). Folglich muss ein Protein an der Akkumulation und/oder der Translokation des systemischen Signals beteiligt sein. Ein guter Kandidat für diese Rolle ist das DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1 (DIR1) Protein. Dieses LTP aus der Typ II Unterfamilie nach Wang et al. wird in den Siebelementen und den Begleitzellen des Phloems exprimiert und besitzt ein N-terminales Signalpeptid für die extrazelluläre Sekretion (Champigny et al., 2011; Wang et al., 2012). Schon 2002 haben Maldonado et al. *dir1* in einem genetischen Screening von Arabidopsis Mutanten, welche keine SAR mehr ausbilden konnten, identifiziert (Maldonado et al., 2002). Weitere Experimente zeigten, dass *dir1* nicht mehr in der Lage war ein systemisches Signal zu erzeugen, jedoch konnten *dir1* Mutanten, welche mit Wildtyp-Phloemexudaten behandelt wurden, die SAR ausbilden. Phloemexudate von *dir1* waren weder in der Lage in Wildtyppflanzen eine erhöhte *PR1* Expression noch eine systemische Resistenz in distalen Blättern zu induzieren (Maldonado et al., 2002; Chaturvedi et al., 2008). Demnach ist die Funktion von DIR1 spezifisch für die Ausbildung der SAR, da die PTI in der *dir1* Mutante nicht verändert war (Maldonado et al., 2002). Weiterhin haben auch DIR1 Homologe in Tabak eine wichtige Funktion in der systemischen Verstärkung der Pathogenresistenz (Liu et al., 2011). Eine neue Studie zeigt weiterhin, dass auch ein nah verwandtes LTP (DIR1-Like) teilweise in der *dir1* Mutante die Ausbildung der SAR ermöglicht (Champigny et al., 2013). DIR1 besitzt zwei SH3 Domänen, welche die Interaktion von Proteinen unterstützen und diese somit eine Interaktion von DIR1 mit anderen Proteinen ermöglichen könnten (Lascombe et al., 2008). In diesem Zusammenhang konnten Yu et al. eine Interaktion zwischen DIR1 und AZI1 zeigen, deren Transkripte durch Glycerol-3-phosphat (G3P) stabilisiert werden (Yu et al., 2013). Umgekehrt regulieren DIR1 und AZI1 die G3P Biosynthese (Yu et al., 2013). Diese Funktionen und Strukturen lassen den Schluss zu, dass DIR1 für die Akkumulation

und/ oder den systemischen Transport eines SAR induzierenden Faktors unabdingbar ist (Shah and Zeier, 2013).

### 1.3.2 AZI1

Ein weiteres interessantes, an der pflanzlichen Immunantwort beteiligtes LTP ist AZELAIC ACID INDUCED 1 (AZI1). Erstmals wurde dieses von Jung et al. 2009 untersucht und näher beschrieben. Dabei konnte gezeigt werden, dass AZI1 3 bzw. 6 Stunden nach AzA- oder aktive Phloemexudatgabe signifikant induziert wurde (Jung et al., 2009). *azi1-1* Mutanten zeigten zudem nach lokaler Pathogenbehandlung mit verschiedenen *Pseudomonas syringae* Linien normale SA und *PR1* Akkumulation sowie einen normalen lokalen Phänotyp. Im Gegensatz dazu konnte in den *azi1-1* Mutanten keine SAR nach lokaler Behandlung mit avirulenten Pseudomonaden erzeugt werden (Jung et al., 2009). AZI1 wird demnach durch AzA induziert und reguliert und/oder transferiert direkt ein SAR induzierendes Signal aus dem lokal-infizierten Gewebe (Jung et al., 2009). Entgegen dieser Behauptung konnten Zöller et al. zeigen, dass die Genexpression von *AZI1* nicht durch AzA induziert wird und die Vorbehandlung von *Arabidopsis* Blättern mit AzA keine induzierte Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* hervorruft (Zoeller et al., 2012). Auch Yu et al. zeigten, dass die Transkription von *AZI1* nicht direkt von AzA induziert wird. AzA reguliert dabei nur die G3P Biosynthese, welche regulierend auf AZI1 und DIR1 wirkt (Yu et al., 2013). Ein weiterer Hinweis auf eine Funktion in den pflanzlichen Abwehrmechanismen ist die erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea* durch die konstitutive Expression von *AZI1* (Chassot et al., 2007). Weiterhin kann die *AZI1* Genexpression in lokalen Blättern sehr stark durch Verwundung induziert werden (Heß, 2011). Daraus resultierend wäre der Transport von Schaden-assoziierten molekularen Mustern (DAMPs; „damage-associated molecular patterns“) als eine mögliche molekulare Funktion von AZI1 denkbar. Auch bei abiotischen Stressreaktionen, wie der Kältetoleranz ist AZI1 beteiligt, denn bei einer Kältebehandlung bei 4 °C wird die *AZI1* Genexpression in *Arabidopsis thaliana* induziert (Xu et al., 2011). Desweiteren zeigt auch die heterologe Expression von AZI1 in Hefezellen eine stärkere Resistenz dieser Zellen gegenüber Erfrierungen (Xu et al., 2011).

### 1.3.3 LTPIV.4

Die Nomenklatur des Proteins At5g55450 als LTPIV.4 ergibt sich durch den Umstand, dass dieses Protein nach Boutrot et al. als das vierte Mitglied der Typ IV Unterfamilie eingeordnet ist (Boutrot et al., 2008). LTPIV.4 ist ein bisher kaum charakterisiertes, an der pflanzlichen Immunantwort beteiligtes LTP. Bartsch et al. unterstützen diese These, indem sie mit Microarray Daten eine EDS1 und PAD4 abhängige Induktion der *LTPIV.4* Genexpression 3 bzw. 6 h nach der Infiltration mit avirulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*avrRPS4*) Bakterien aufzeigen konnten (Bartsch et al., 2006). Weiterhin erzeugen sowohl avirulente als auch virulente *Pseudomonas syringae* Bakterien eine starke Induktion der *LTPIV.4* Genexpression in *Arabidopsis thaliana* (Heß, 2011). Dies wird auch durch Transkriptomstudien (Genvestigator), in denen die Geneexpression von *LTPIV.4* sehr stark nach Behandlungen mit verschiedenen *Pseudomonas*stämmen induziert ist, bestärkt (Hruz et al., 2008). Unter basalen Bedingungen zeigt die Genexpression von *LTPIV.4* sich nach Abbildung 1.6 vor allem in der Blattrosette, reduziert auch im Stängel und nicht mehr sichtbar in der Wurzel (Winter et al., 2007). LTPIV.4 lässt sich nach Wang et al./Boutrot et al. genauso wie DIR1 in die Typ II/Typ IV Unterfamilie der LTPs einordnen und ein Sequenzvergleich mit DIR1 zeigt eine große Identität beider Aminosäuresequenzen (Phylogenetischer Stammbaum der LTP Genfamilie in Arabidopsis nach Boutrot et al., 2008; Anhang I) (Boutrot et al., 2008; Wang et al., 2012). Im Gegensatz zu DIR1 konnten für LTPIV.4 keine spezifischen Interaktionsdomänen identifiziert werden.

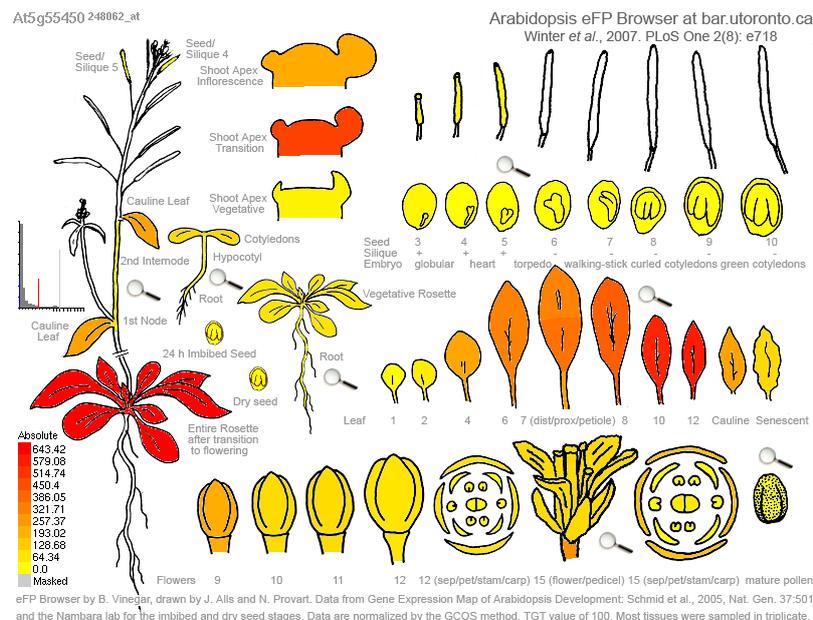


Abbildung 1.6 eFP Browser (Winter et al., 2007): Entwicklungsspezifische Genexpression von LTPIV.4 in *Arabidopsis thaliana*; Daten gewonnen aus Schmid et al. (Schmid et al., 2005)

## 1.4 Zielsetzung und Vorgehensweise

Die Multigenfamilie der Lipid Transfer Proteine stellt eine Gruppe von kleinen Proteinen dar, welche in allen höheren Landpflanzen vorkommt. Für einige Proteine dieser Familie wurde gezeigt, dass sie *in vitro* Lipide zu transportieren vermögen. Die exakte Rolle dieser Proteine in unterschiedlichen physiologischen Prozessen *in vivo* ist jedoch kaum entschlüsselt. Ein Mechanismus, für den die Beteiligung von LTPs in Pflanzen funktionell gezeigt wurde, ist die pflanzliche Abwehrreaktion nach Infektion mit unterschiedlichen Pathogenen. Für die Induktion der systemischen Resistenzbildung in *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass zwei LTPs, DIR1 (DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1) und AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1), benötigt werden (Maldonado et al., 2002; Jung et al., 2009). Für ein weiteres LTP, LTPIV.4 (At5g55450), wurde gezeigt, dass dieses in *Arabidopsis* auf Transkriptionsebene signifikant durch verschiedene Pathogene sowie durch Salizylsäure reguliert ist. Im Rahmen dieser Arbeit soll daher die funktionelle Rolle von LTPIV.4 und AZI1, in der pflanzlichen Verteidigungsantwort auf Pathogene in funktionellen Studien charakterisiert werden.

Ein wichtiger Punkt bei der funktionellen Einordnung von LTPIV.4 ist die Identifizierung dessen subzellulärer und gewebespezifischer Lokalisation. Die Rolle von LTPIV.4 in der lokalen, sowie systemischen Immunantwort in *Arabidopsis thaliana* steht im Fokus dieser Arbeit. Dazu sollen transgene *Arabidopsis thaliana* Pflanzen generiert werden, welche *LTPIV.4* konstitutiv oder nicht mehr exprimieren. Nachfolgend sollen diese verschiedenen Pflanzenlinien mit dem Wildtyp auf phänotypische Unterschiede nach der Infektion mit zwei biotrophen *Pseudomonaden*stämmen und dem nekrotrophen Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* verglichen werden. Im Anschluss folgen die Identifikation des verantwortlichen Signaltransduktionswegs mittels Phytohormon- und Genexpressionsanalysen sowie die funktionelle Einordnung von LTPIV.4 in die primäre und sekundäre Immunantwort. Ergänzend dazu, sollen durch *in vitro* Bindestudien und einer ungerichteten Metabolomanalyse der verschiedenen Pflanzenlinien mögliche Substrate von LTPIV.4 identifiziert werden.

Für AZI1 soll einer möglichen Rolle bei der Verteidigungsantwort gegenüber nekrotrophen Pathogenen in funktionellen Ansätzen nachgegangen werden. Ausgehend von der Annahme das AZI1 an der Ausbildung der systemischen Resistenz beteiligt ist, soll auch dessen subzelluläre Lokalisation in *Arabidopsis thaliana* für eine nähere funktionelle Einordnung identifiziert werden. Da die Rolle von AZI1 in der Abwehr gegen das biotrophe Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* bereits beschrieben wurde, widmet sich diese Arbeit der Fragestellung, ob AZI1 eine Funktion in der Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* hat. Für diese Untersuchung wird die Knockoutlinie *azi1-1* herangezogen. Da die *AZI1* Genexpression durch Verwundung stark induziert

wird, soll im Rahmen dieser Arbeit weiterhin eine Funktion von AZI1 in der pflanzlichen Signaltransduktion nach Verwundung überprüft werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Immobilon™ Western Chemiluminescent

HRP Substrate	Millipore, Schwalbach
Murashige & Skoog (MS) Salze	Duchefa, Haarlem, NL
peqGOLDUniversal-Agarose	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Phyto-Agar	Duchefa, Haarlem, NL
Silwet® L-77	Leu+Gygax, Birmenstorf AG, Schweiz
X-Ray Entwickler XL 24	Kodak, Stuttgart
X-Ray Fixierer Al 4	Kodak, Stuttgart
X-Gluc	Thermo Fischer Scientific, Hamburg

Alle nicht aufgeführten Chemikalien und Lösungsmittel wurden von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) Biosolve (Valkenswaard, Niederlande) oder Sigma (Deisenhofen) bezogen.

### 2.2 Standardsubstanzen und Lipide

[ <sup>18</sup> O] <sub>2</sub> OPDA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
[D <sub>4</sub> ] SA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
[D <sub>6</sub> ] ABA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Arachinsäure (C20:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Azelainsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Behensäure (C22:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

---

Cerotinsäure (C26:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Cholesterol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DGDG-18:0-18:0	Matreya LLC, Pleasant Gap, USA
DGDG Mix aus Weizen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dhJA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Diacylglycerol-18:1-18:1	Larodan, Malmö, Schweden
Dodecandisäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Glycerol-3-phosphat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
JA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
JA-Nva	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Laurinsäure (C12:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lignocerinsäure (C24:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Linolensäure (C18:3)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Linolsäure (C18:2)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lysophosphatidylcholin-17:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Lysophosphatidylcholin-18:0	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lysophosphatidylcholin Mix	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Melissinsäure (C30:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
MGDG-18:0-18:0	Matreya LLC, Pleasant Gap, USA
MGDG Mix aus Weizen	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Montansäure (C28:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Myristinsäure (C14:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
N-decanoyl-D- <i>erythro</i> -Sphingosin (d18:1/C10:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
N-nervonoyl-D- <i>erythro</i> -Sphingosin (15Z) (d18:1/C24:1)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
N-lignoceroyl-D- <i>erythro</i> -Sphinganin (d18:0/C24:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

---

OPDA	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Palmitinsäure (C16:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Phosphatidsäure-16:0-16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidsäure-17:0-17:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylcholin-17:0-17:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylcholin-18:1-16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin-14:0-14:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin-17:0-17:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin-18:0-18:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin-18:1-16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylethanolamin-18:1-18:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol -14:0-14:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol-16:0 -16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol-18:0-18:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylglycerol-18:1-16:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylinositol-18:1-18:1	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phosphatidylserin-17:0-17:0	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Phytosteran A <sub>1</sub>	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Phytosphingosin (t18:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
SA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sebacinsäure	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Sphinganin (d18:0)	Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA
Stearinsäure (C18:0)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Stigmasterol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Triacylglycerid-18:1-18:1-18:1	Larodan, Malmö, Schweden

## 2.3 Enzyme, weitere Materialien, Reagenzien und Kits

ABsoluteQPCR SYBR Green Capillary Mix	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Biopsiestanzer ( $\varnothing = 5 \text{ mm}$ )	Ratiomed, Schloss Holte-Stukenbrock
BP-Clonase <sup>TM</sup> II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blau R250	Appllichem, Darmstadt
DNase-I, RNase-frei	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
dNTP Set molecular biology grade	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
E.Z.N.A.® Plant RNA Kit	Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA
FAF-BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
GeneJET Plasmid Midiprep Kit	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
GeneRuler <sup>TM</sup> -100bp DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
GeneRuler <sup>TM</sup> -1kb DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
IPTG	Appllichem, Darmstadt
LR-Clonase <sup>TM</sup> II Enzyme Mix	Invitrogen, Karlsruhe
Lysozym	Appllichem, Darmstadt
M-MLV ReverseTranskriptase RNase	
H Minus, Point Mutant	Promega, Mannheim
NheI	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Ni <sup>2+</sup> -NTA Resin	Amocol Bioprocudures Ltd., Teltow
NucleoSpin Extract II Kit	Macherey und Nagel, Düren
Page Ruler <sup>TM</sup> Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Pfu DNA Polymerase (recombinant, 2,5u/ $\mu$ l)	Thermo Fischer Scientific, Hamburg

RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
T4 DNA Ligase	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
TrueStart™ Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5u/μl)	Thermo Fischer Scientific, Hamburg
Wolframpartikel	Bio-Rad Laboratories, München
XhoI	Thermo Fischer Scientific, Hamburg

## 2.4 Laborgeräte

Absorptionsmessung	NANODROP 1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA; Software: ND-1000 V3.5.2  MRX <sub>TC</sub> Revelation, Dynextechnologies, Berlin  V1200 Spectrophotometer, VWR, Darmstadt
Analysenwaage	BP211D und Laborwaage 1600, Sartorius, Göttingen
Autoklav	Tuttnauer Systec 5075ELV, New York, USA
Durchmischung	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA, Vortex vv3, VWR, Darmstadt
Elektrophorese (horizontal)	Werkstatt des Julius-von-Sachs-Instituts, Würzburg
Elektrophorese (vertikal)	Perfect Blue Doppelgelsystem Twin S, PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Geldokumentation	UV-Systeme, INTAS, Ahmedabad, India
Klimaschrank	AR-36L3, Percival Scientific, USA
Kühl-und Gefrierschränke	-20 °C Gefrierschrank, Liebherr, Ochsenhausen  -80 °C Gefrierschrank, New Brunswick Scientific, Nürtingen
Massenspektrometer	Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer, WatersMicromass, Milford, USA

---

	SYNAPT G2 HDMS Hybrid Quadrupol Orthogonal time-of-flight Massenspektrometer (qTOF-MS), WatersMicromass, Manchester, U.K.).
Mikroskop	Leica EZ4D Stereomikroskop, Leica Camera AG, Solms, Axio Observer.Z1 Fluoreszenzmikroskop, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Darmstadt, Konfokales Laser Scanning Mikroskop CLSM 5 Pascal Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Darmstadt
Pipetten	PIPETMAN Classic™P10, P100, P1000 Luftpolsterpipetten, Gilson Inc., Middleton, WI, USA
PCR-Geräte	Mastercycler® ep realplex S, Eppendorf, Hamburg  CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, München
pH-Meter	HI 9321 microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Probenkonzentrierung	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 und RVC 2-25, Heraeus-Christ, Osterode mit Membranvakuumpumpe MZ 2C, Vakuubrand, Wertheim
Querstromsterilbank	Ceag Envirco, Dortmund
Reinstwasseranlage	RiOs Water Purification System, Millipore, Schwalbach
Schwingmühle	MM 301,Retsch, Haan
Schüttler	Multitron Standard, InforsHT, Bottmingen, Schweiz, PMR30, Grant Bio, Hillsborough, USA
Sonifizierung	diverse Ultraschallbäder (VWR, Darmstadt)
Thermoblock	Thermo Stat Plus, Eppendorf, Hamburg
UPLC-Anlage	Acquity™ Ultra Performance LC, Waters Micromass, Milford, USA
UPLC-Säulen	Acquity UPLC® BEH C18 Column, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters Micromass, Milford, USA  Acquity UPLC® BEH C18 Column, 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, Waters Micromass, Milford, USA  Acquity UPLC® BEH C8 Column, 1,7 µm, 2,1 x 50 mm, Waters Micromass, Milford, USA
Waage	PC4400, Mettler-Toledo, Gießen

Zentrifugen

Centrifuge 5424, 5415C, 5417R und 5804 (alle Eppendorf, Hamburg), Minifuge RF (Heraeus, Hanau), Avanti®J-E (Beckman Coulter, Krefeld)

## 2.5 Nährmedien

**Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)** (Sambrock et al., 1989)

10 g/l Trypton

5 g/l Hefeextrakt

10 g/l NaCl

pH 7,0

für Festmedium 15 g/l Agar für die Bakteriologie

**YEB-Medium**

5 g/l Beefextrakt

1 g/l Hefeextrakt

5 g/l Trypton

5 g/l Saccharose

0,3 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

pH 7,0

für Festmedium 15 g/l Agar für die Bakteriologie

**Kings B-Medium (KB-Medium)** (King et al, 1954)

20 g/l Glycerin

40 g/l Proteose Pepton Nr.3

10 ml/l 10 % (w/v)  $\text{MgSO}_4$

10 ml/l 10 % (w/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

für Festmedium 15 g/l Agar für die Bakteriologie

**Murashige-Skoog-Medium (MS-Medium)** (Murashige and Skoog, 1962)

4,8 g/l MS-Salze (inkl. MES)

0,1 g/l myo-Inositol

1 ml/l B5-Vitamine (100 mg/ml Myo-Inositol, 10 mg/ml Thiamine/HCl, 1 mg/ml Nicotinsäure,

1 mg/ml Pyridoxin/HCl)

pH 5,7

für Festmedium 9 g/l Phytoagar

**Minimal-Medium**

1 g/l NaOH

3 g/l DL-Äpfelsäure

2 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$

0,1 g/l  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$

für Festmedium 39 g/l Agar für die Bakteriologie

**Potatodextroseagar-Medium (PDA-Medium)**

39 % (w/v) Potatodextroseagar

Alle Medien wurden vor ihrer Verwendung für 30 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

## 2.6 Antibiotika

In Tabelle 2.1 sind die Stockkonzentrationen, die Lösungsmittel und der Hersteller der verwendeten Antibiotika aufgelistet. Verwendet wurden die Antibiotika in einer 1:1000 Verdünnung und aufgrund ihrer Thermosensitivität erfolgte die Zugabe zu den Medien erst nach dem Autoklavieren.

Tabelle 2.1 Verwendete Antibiotika

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stockkonzentration (mg/ml)</b>	<b>gelöst in</b>	<b>Hersteller</b>
<b>Ampicilin</b>	100	H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt
<b>Kanamycin</b>	50	H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt
<b>Rifampicin</b>	50	DMSO	Duchefa, Harlem, NL
<b>Tetracyclin</b>	5	H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt
<b>Hygromycin</b>	40	H <sub>2</sub> O	Applichem, Darmstadt

## 2.7 Lösungen und Puffer

### Aufschlusspuffer

20 mM Tris-HCl (pH 7,9)  
500 mM NaCl

### Äquilibrationpuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol

### Blocking Solution

5 % Magermilchpulver  
in TBS

### Dialysepuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
300 mM NaCl

### DNA-Ladepuffer (10x)

0,25 % Bromphenolblau  
0,25 % Xylencyanol  
20 mM EDTA  
30 % Glycerin

### Elutionspuffer

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
300 mM NaCl  
500 mM Imidazol

**Harnstoffextraktions-Puffer**

4 M Harnstoff  
16,6 % Glycerin  
5 %  $\beta$ -Mercaptoethanol  
5 % SDS  
0,5 % Bromphenolblau

**Phosphatpuffer**

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   
50 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$   
pH 7,0

**Säulenwaschpuffer**

50 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
300 mM NaCl  
20 mM Imidazol

**SDS-Page Laufpuffer**

25 mM Tris  
192 mM Glycin  
0,1 % SDS

**TAE-Puffer**

40 mM Tris-Acetat (pH 8,6)  
1 mM EDTA

**TBS-Puffer**

7,7 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
150 mM NaCl

**TBST-Puffer**

7,7 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
0,1 % Tween20

**TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
1 mM EDTA

**Transferpuffer**

25 mM Tris-HCl (pH 8,3)  
192 mM Glycin  
20 % Methanol  
0,05 % SDS

**Waschpuffer**

20 mM Tris-HCl (pH 7,9)  
150 mM NaCl

## 2.8 Pflanzenmaterialien

Für die durchgeführten Experimente wurde als Wildtyp Pflanzenmaterial des *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia-0 (Col-0) verwendet. Zudem wurde für die funktionelle Charakterisierung von AZI1 die T-DNA Insertionslinie SALK\_017709 (*azi1-1*, Genlocus: At4g12470, Ökotyp Col-0) eingesetzt. Zwei weitere T-DNA Insertionslinien SALK\_074488 (*ltpIV.4*, Genlocus: At5g55450, Ökotyp Col-0) und SALK\_109557 (Genlocus: At5g55450, Ökotyp Col-0) (nur ein Versuch) wurden in Bezug auf die Funktionsanalyse von LTPIV.4 eingesetzt (Positionen der T-DNA Insertionen in den genomischen Sequenzen von LTPIV.4 und AZI1; Anhang II). Alle weiteren erzeugten transgenen Pflanzen (Kapitel 4.1) hatten den Ökotyp Col-0 als Hintergrund.

## 2.9 Bakterien und Pilze

Die verwendeten Bakterienstämme und Pilze, sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 2.2 und 2.3 aufgelistet. Die Kultivierung der *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterien erfolgte in flüssigem LB-Medium unter kontinuierlichem Schütteln oder auf LB-Agar Platten bei 37 °C. Die Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) erfolgte in flüssigem YEB-Medium unter kontinuierlichem Schütteln oder auf YEB-Agar Platten bei 28 °C.

Tabelle 2.2 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Eigenschaften
<i>E. coli</i> BL21star™(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])
<i>E. coli</i> DB3.1	F- gyrA462 endA1 glnV44 Δ(sr1-recA) mcrBmrr hsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) ara14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl5 Δleu mtl1
<i>E. coli</i> TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ <sup>-</sup>
<i>A. tumefaciens</i> C58C1	AmpR, RifR
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> avrRpm1	RifR, TetR

Stamm	Eigenschaften
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> ES4326	RifR
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000 pv. <i>tomato</i>	RifR

Tabelle 2.3 Verwendeter Pilzstamm

Stamm	Eigenschaften
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> N1980	

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit Pflanzenmaterial

#### 3.1.1 Anzucht der *Arabidopsis thaliana* Pflanzen auf Erde

Die verwendeten Samen wurden auf Anzuchterde ausgesät und nach anschließender zweitägiger Stratifizierung bei 4 °C in einer Klimakammer unter Kurztagesbedingungen (22 °C/20°C, 9 h Licht/15 h Dunkel, 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  Lichtintensität) angezogen. Nach zwei Wochen wurden die gekeimten Pflanzen pikiert und in der Klimakammer kultiviert. Für alle Experimente wurden 4-5 Wochen alte Pflanzen verwendet. Zur Samenproduktion wurden die Pflanzen nach 4 Wochen in Langtagesbedingungen (24 °C, 16 h Licht, 100  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2}\text{s}^{-1}$  Lichtintensität) umgesetzt.

#### 3.1.2 Anzucht der *Arabidopsis thaliana* Pflanzen auf MS-Platten

Die zur Anzucht verwendeten Samen wurden nach der Trockensterilisation (Kapitel 3.1.3) auf MS-Platten ausgelegt. Je Platte wurden hierfür 10 Samen verwendet und gleichmäßig verteilt. Die fest mit Parafilm verschlossenen Platten wurden danach für 2 Tage bei 4 °C im Kühlschrank zum Stratifizieren gelagert. Im Anschluss wurden die Platten in einen Klimaschrank (AR-36L3, Percival Scientific, USA) transferiert und nach erfolgreicher Keimung weiterkultiviert. Die Keimlinge wurden nach 1, 2 bzw. 3 Wochen für die Lokalisation der spezifischen Promoter aktivierten GUS-Expression ( $\beta$ -Glucuronidase) verwendet.

#### 3.1.3 Trockensterilisation von *Arabidopsis* Samen

Um die Keimung von *Arabidopsis* Samen unter sterilen Bedingungen zu ermöglichen, wurden die Samen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß unter dem Abzug in einem Exsikkator neben ein Becherglas mit einer 100 ml Danklorix®-Lösung gestellt. Durch die Zugabe von 5 ml konzentrierter Salzsäure zur Chlorbleich-Lösung und dem Schließen des Exsikkators wurde die Trockensterilisation gestartet. Nach einem 2 ½ stündigen Sterilisationsprozess wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf die verschiedenen Agarplatten ausgelegt.

### 3.1.4 Selektion transgener *Arabidopsis* Pflanzen

Die Selektion transgener *Arabidopsis* Pflanzen erfolgte auf MS-Agarplatten mit Hygromycin (40 µg/ml). Dabei wurden ca. 100 Oberflächen-sterilisierte Samen (Kapitel 3.1.3) auf einer Agarplatte verteilt welche dicht mit Parafilm verschlossen wurde. Nach 2 Tagen Stratifizierung bei 4 °C im Kühlschrank erfolgte die Induktion der Samenkeimung für 6 h bei 24 °C im Lichtregal (100 µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>). Die Platte wurde daraufhin mit Aluminiumfolie Licht-dicht umschlossen um für zwei Tage bei 24 °C zu ruhen. Für die weitere Entwicklung der Keimlinge wurde die Platte weitere 48 h Dauerlicht (100 µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup>) ausgesetzt. Die gekeimten transgenen Samen zeigten nach der Dunkelinkubation ein längeres Hypokotylwachstum im Vergleich zu den nicht transgenen Keimlingen (Harrison et al., 2006). Nach anschließender 10-tägiger Kultivierung bei Dauerlicht konnten Pflanzen, mit entsprechendem verlängertem Hypokotylwachstum zur Samenbildung und weiteren Charakterisierung in Erde umgesetzt werden (Kapitel 3.1.1). Die gewonnenen Pflanzen wurden nach 2 Wochen nochmals mittels DNA Isolation (Kapitel 3.2.15), PCR (Kapitel 3.2.1) und Agarose Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.2) mittels eines spezifischen Primerpaares (Tabelle 3.1) auf die Hygromycingeninsertion hin untersucht.

Tabelle 3.1 Bezeichnung und Sequenz der verwendeten Primer für die PCR

Bezeichnung	Primersequenz 5`-> 3`
<b>hygromycin forward</b>	GAATTCAGCGAGAGCCTGAC
<b>hygromycin reverse</b>	GATGTTGGCGACCTCGTATT

### 3.1.5 Agrobakterien vermittelte Pflanzentransformation

Für die stabile Transformation der *Arabidopsis* Pflanzen wurde die „Floral Dip“ Methode (Clough and Bent, 1998) verwendet. Transgene Agrobakterien wurden dabei in 200 ml YEB Medium mit Antibiotika injiziert und über Nacht bei 28 °C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden am folgenden Tag pelletiert (15 min, 7000 rpm, 4 °C) in einer 5 % Glucose-Lösung resuspendiert und bis zu einer optischen Dichteeinstellung bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 0,8 wachsen gelassen. Um eine bessere Benetzung der Blütenstände zu erreichen, wurden der Bakteriensuspension zusätzlich 0,05 % Silwet® L-77 hinzugefügt. Die auf Erde angezogenen Pflanzen wurden für 10 bis 15 s in die Glucoselösung getaucht und anschließend mit Frischhaltefolie umwickelt, um ein Austrocknen der Bakteriensuspension an den Blütenständen zu vermeiden. Die eingewickelten Pflanzen inkubierten

für 24 h in einem abgedunkelten Raum und wurden daraufhin wieder in Langtagbedingungen gestellt. Um die Transformationseffizienz zu erhöhen, wurde die gesamte Prozedur nach einer Woche wiederholt. Vor der ersten Transformation wurden den Pflanzen bereits entwickelte Schoten entfernt und damit die Anzahl an nicht transformierten Samen verringert.

### 3.1.6 Behandlung der Pflanzen

#### 3.1.6.1 Verwundung von *Arabidopsis thaliana*

Für Verwundungsversuche wurden 4-5 Wochen alte, auf Erde angewachsene *Arabidopsis* Pflanzen herangezogen. Dabei wurden jeweils 5 mittelalte Blätter einer Pflanze an 6 verschiedenen Stellen durch 3 maliges Quetschen mit einer Pinzette verwundet, ohne dabei die Mittelrippe zu verletzen. Zu den festgesetzten Zeitpunkten (0, 3, 6, 12, 24, 48 h) wurden die verwundeten Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des gefrorenen Materials erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

#### 3.1.6.2 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Pseudomonas syringae*

##### Vorbereitung der verwendeten Bakterienstämme

Für die Pflanzeninfektion wurden Bakterien der Stämme avirulente/virulente (*avr/vir*) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato/maculicola* (*Pst/Psm*) verwendet. Diese wurden aus einem Glycerinstock auf eine KB-Platte mit Antibiotika ausgestrichen.

Tabelle 3.2 Antibiotika Resistenzen

<b>Avirulente Pseudomonaden</b>	Rifampicin (50 µg/ml) + Tetracyclin (50 µg/ml)
<b>Virulente Pseudomonaden</b>	Rifampicin (50 µg/ml)

Nach zwei Tagen Inkubation bei 26 °C wurden die angewachsenen Kolonien auf eine neue KB-Platte, mit den jeweiligen Antibiotika, versetzt, ausgestrichen und für einen Tag bei 26 °C erneut angezogen. Die erhaltenen Bakterienkolonien wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> von den Platten gewaschen und

zentrifugiert (10 min, 3000 g, 25 °C). Das Pellet wurde im Anschluss zweimal mit 20 ml MgCl<sub>2</sub> (10 mM) gewaschen und wiederum zentrifugiert (10 min, 3000 g, 25 °C). Anschließend wurde die OD der Bakteriensuspension auf 0,1 (OD<sub>600</sub> = 0,1) für die Sprühinfektion bzw. auf 0,02 für die Infiltration eingestellt. Bei der Sprühinfektion wurde durch die Zugabe von Silwet® L-77 (0,4 µl/ml Suspension) die Oberflächenspannung der Suspension erhöht, um eine verlängerte Verweildauer der Lösungstropfen auf den Blättern und damit eine verbesserte Infektion der Pflanzen durch die Bakterien zu erzielen.

### **Sprühinfektion**

Für die Sprühinfektion wurden 4-5 Wochen alte *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Diese wurden an der Blattober- und -unterseite mit Bakteriensuspension besprüht und anschließend, um Austrocknung zu vermeiden, in der Klimakammer unter eine lichtdurchlässige Haube gestellt. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Pflanzen mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> besprüht und ebenso kultiviert.

Für die weitere analytische Analyse sowie die Detektion der Genexpression wurden die Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Quantifizierung der in den Blättern gewachsenen Bakterienkolonien wurden von jeder Pflanze mehrere Blätter geerntet und anschließend für jeweils 30 s in 70 % Ethanol und Wasser gewaschen. Aus jedem geernteten Blatt wurden zwei Blattscheiben mit einem Biopsiestanzer (∅ = 5 mm) (Ratiomed, Schloss Holte-Stukenbrock) ausgestochen. Jeweils 4 Blattscheiben von unterschiedlichen Blättern kamen in ein mit 100 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM) und 5 Stahlkugeln (d = 1 mm) gefülltes 2 ml Schraubdeckelgefäß. Die mechanische Zerkleinerung der Blattscheiben erfolgte in der Schwingmühle bei 25 Hz für 90 s. Nachdem die Suspension mit 900 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM) aufgefüllt wurde, wurden die Pflanzenteile für 10 s abzentrifugiert. In einer 96-well Platte erfolgte die Erstellung einer Verdünnungsreihe. Dabei wurde jeweils aus der nächsthöheren Verdünnung 10 µl entnommen und mit 90 µl MgCl<sub>2</sub> (10 mM) gemischt (Chaturvedi et al., 2008). Dadurch ergaben sich die Verdünnungen von 1\*e<sup>-1</sup> bis 1\*e<sup>-5</sup>. Von den jeweiligen Verdünnungen wurden anschließend 10 µl Suspension auf LB-Platten mit Rifampicin (50 mg/ml) ausplattiert. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation bei 26°C wurden die angewachsenen Kolonien ausgezählt.

### **Infiltration**

Bei der Infiltration wurden 4-5 Wochen alte, auf Erde angezogene *Arabidopsis* Pflanzen mit der Bakteriensuspension infiltriert, indem diese mit einer 1 ml-Einwegspritze an der Blattunterseite von mittelalten Rosettenblättern durch die offenen Stomata gepresst wurde. Um Austrocknung zu

vermeiden, kamen die Pflanzen anschließend in der Klimakammer unter eine lichtdurchlässige Haube. Als Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an Pflanzen mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert und ebenso kultiviert.

Für die weitere analytische Analyse sowie die Detektion der Genexpression wurden die Pflanzen zu den jeweiligen Zeitpunkten (0, 3, 6, 12, 24, 48 h) geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Für die Untersuchung der systemischen Resistenz der verschiedenen Pflanzenlinien wurden die vorher infiltrierten Pflanzen nach 48 h wie im Kapitel 3.1.6.2 Sprühinfektion beschrieben mit virulenten Pseudomonaden infiziert und die Bakterienzahl ermittelt.

### **3.1.6.3 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Sclerotinia sclerotiorum***

Für die Infektion wurden 4-5 Wochen alte, auf Erde angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Der verwendete Pilz wurde auf einer Minimalmedium-Platte kultiviert. Hierfür wurde eine Sclerotia aus einem Glycerolstock genommen, in die Plattenmitte gesetzt und bei 23 °C über mehrere Tage bei normalen Lichtverhältnissen im Labor stehen gelassen. Für die Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit *Sclerotinia sclerotiorum* wurden von dem auf der Plattenoberseite gewachsenen Pilz runde Agarblöcke an der Hyphenwachstumszone mit einem Stanzer (d = 2 mm) ausgestochen und mit der Hyphenseite mittig auf ein Blatt gelegt (Guo and Stotz, 2007). Um eine Austrocknung zu vermeiden, wurden die Pflanzen nach der Infektion unter eine lichtdurchlässige Haube gestellt und inkubierten für 48 h unter Langtagbedingungen (24 °C, 16 h Licht, 100 µmol Photonen m<sup>-2</sup>s<sup>-1</sup> Lichtintensität). Die gezeigten Läsionen wurden zu dem gegebenen Zeitpunkt (48 h) mit einer Schieblehre gemessen und anschließend statistisch ausgewertet.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente sowie die Anheftung von Sequenzabschnitten an DNA-Fragmente erfolgten nach der PCR-Methode von Mullis und Faloona (Mullis and Faloona, 1987). Als Matrize (*template*) für die Amplifikation diente sowohl Plasmid-DNA, cDNA als auch genomische DNA

aus *Arabidopsis thaliana*. Als thermostabile DNA-Polymerase wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (*Thermus aquaticus*) für die Reaktionen eingesetzt. Für Produkte, welche für die Klonierung eingesetzt wurden, wurde die *Taq*-DNA-Polymerase zusätzlich mit der *Pfu*-DNA-Polymerase (*Pyrococcus furiosus*) im Verhältnis 1:5 (v/v) gemischt, da diese einen Korrekturlesemechanismus besitzt und die Anzahl von Mutationen in der kopierten DNA-Sequenz erheblich senkt.

Tabelle 3.3 PCR-Ansatz für eine Reaktion

<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	2,0 µl
<b>Taq-Puffer (10x)</b>	2,5 µl
<b>dNTP`s (2,5 mM)</b>	0,5 µl
<b>Primer 1 (10 µM)</b>	1,0 µl
<b>Primer 2 (10 µM)</b>	1,0 µl
<b>Taq Polymerase</b>	0,3 µl
<b>Template</b>	10-100 ng
<b>Wasser</b>	ad 25 µl

In Tabelle 3.4 ist das verwendete Thermocyclerprotokoll dargestellt.

Tabelle 3.4 Thermocyclerprotokoll

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zyklenzahl</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	3 min	95	1
<b>Denaturierung</b>	45 s	95	
<b>Annealing</b>	45 s	50-66	36
<b>Elongation</b>	45 - 90 s	72	
<b>Finale Elongation</b>	5 min	72	1

In Tabelle 3.5 sind die Sequenzen und Bezeichnungen der spezifisch verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 3.5 Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Primer

<b>Bezeichnung</b>	<b>Primersequenz 5`-&gt; 3`</b>
<b>Azi1 forward</b>	TCAATAACCCTTACAACACCGAA
<b>Azi1 reverse</b>	CGATATTGTGCACTGGCATCGC
<b>Azi1gen forward</b>	TGGATGTATGTGGGGACACTACCA
<b>Azi1gen reverse</b>	ATTGTGCACTGGCATCGCATCGT
<b>attAzi1 forward</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGCTTCAAAGAACTCAGCCTCTC
<b>attAzi1 reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGCACATTGGAAACCAGATGGAAGC
<b>attAzi1gen forward</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTATGTGGGGACACTACCAAGAATC
<b>attAzi1gen reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGCACATTGGAAACCAGATGGAAGC
<b>attAzi1gen-gus (pro) reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTTGTTTTTTTTTCAAAGTTATATT
<b>LtpIV.4 forward</b>	CACATATCACAAACAGAGTTGAGTGAGA
<b>LtpIV.4 reverse</b>	ACAAAGTCTGTGGGAGACTGGG
<b>LtpIV.4gen forward</b>	CCTGCCTTGTGCTTTTGTGTCTAA
<b>LtpIV.4gen reverse</b>	TGCACGGAAGATACATAAGGAGTCA
<b>attLtpIV.4 forward</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAAAGAGAGAATGGGTAAGGA
<b>attLtpIV.4 reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGAAACAGGAAGGACTGTTTACACCA
<b>attLtpIV.4gen for</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCTTGTGCTTTTGTGTCTAATATTGT
<b>attLtpIV.4gen reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTGAAACAGGAAGGACTGTTTACACCA
<b>attLtpIV.4gen-gus (pro) reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTCTTTTTTCTAATCCCTTATTC
<b>LtpIV.4-GFP forward</b>	GGCGCTAGCATTCCCGTTTGCAACATTGA
<b>LtpIV.4-GFP reverse</b>	GGCCTCGAGTACTTGTACAGCTCGTCCA
<b>Dir1 forward</b>	TCACGGGTTTCTCTAAAACCTTGATA
<b>Dir1 reverse</b>	TTTGGCAGAAAATACGATTATTA
<b>attDir1 forward</b>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGCGAGCAAGAAAGCAGCTAT
<b>attDir1 reverse</b>	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTACAAGTTGGGGCGTTGGCTAGACCA
<b>Dir1-GFP forward</b>	GGCGCTAGCATAGATCTCTGCGGCATGAG
<b>Dir1-GFP reverse</b>	GGCCTCGAGTACTTGTACAGCTCGTCCA
<b>Salk_074488 forward</b>	CCGACTTGGCTAAAAATACCC
<b>Salk_074488 reverse</b>	TGCAAGTTGCAAAGAGACATG
<b>LB1.3 forward</b>	ATTTTGCCGATTTCCGGAAC

### 3.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um die in der PCR amplifizierten oder durch den Restriktionverdau erhaltenen DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dafür wurde ein 0,8-1 % Agarosegel mit 1x TAE-Puffer hergestellt und mit 0,04 µl/ml Ethidiumbromid-Lösung versetzt. Zu den DNA Proben wurde jeweils 2,5 µl 10x Ladepuffer gegeben und das Gemisch in die Taschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein spezifischer Größenmarker (1 kb/100 bp Marker; Anhang V) für die genaue Größenbestimmung in eine leere Tasche gegeben. Zur Auftrennung der Fragmente nach ihrer Größe wurde das Gel 20 bis 45 min in einer Elektrophoresekammer, gefüllt mit 1x TAE-Puffer, unter eine elektrische Spannung von 80-120 V gesetzt. Anschließend erfolgte die Detektion der Auftrennung unter UV-Licht bei 364 nm.

### 3.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Für die Aufreinigung der erhaltenen PCR-Produkte wurde entweder die unter UV-Licht detektierte Bande aus dem Agarosegel (Kapitel 3.2.2) ausgeschnitten oder der PCR-Ansatz (Kapitel 3.2.1) direkt herangezogen. Die Aufreinigung wurde mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey und Nagel, Düren) und dem zugrundeliegenden Protokoll durchgeführt. Abweichend zum Protokoll erfolgte die Elution der DNA mit 20 µl TE-Puffer.

### 3.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem binären pGEM T easy Vektor

Die Ligation von isolierten DNA Fragmenten mit dem Klonierungsvektor pGEM T easy erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Dieses Enzym verbindet sowohl glatte als auch überhängende DNA-Enden. Dabei verknüpft es kovalent die 3'-OH-Enden mit den 5'-Phosphatenden der doppelsträngigen DNA. Der Ligationsansatz (Tabelle 3.6) wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert und anschließend 5 µl für die Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien (Kapitel 3.2.10) eingesetzt.

Tabelle 3.6 Reaktionsansatz

<b>Linearisierter Vektor (pGEM T easy)</b>	1 µl (50 ng)
<b>Aufgereinigtes PCR Produkt</b>	Je nach PCR Produkt (Vektor : Insert-Verhältnis 1:3)
<b>Ligasepuffer</b>	5 µl
<b>Ligase</b>	1 µl
<b>Wasser</b>	ad 10 µl

### 3.2.5 Spaltung von DNA-Fragmenten mit Restriktionsenzymen

Der enzymatische Verdau der DNA-Fragmente erfolgte über Nacht bei RT.

Tabelle 3.7 Ansatz für eine Reaktion

<b>Puffer (10x Tango)</b>	5 µl
<b>NheI</b>	1 µl
<b>XhoI</b>	4 µl
<b>Plasmid</b>	7 µl
<b>Wasser</b>	ad 50 µl

Die Fragmente wurden am folgenden Tag elektrophoretisch (Kapitel 3.2.2) aufgetrennt. Im Anschluss wurden die unter dem UV-Licht detektierten, ausgewählten Banden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey und Nagel, Düren) entsprechend der Anleitung des Herstellers aus der Gelmatrix isoliert (Kapitel 3.2.3).

### 3.2.6 Dephosphorylierung des pET28b Vektors

Um zu verhindern, dass sich eine linearisierte Vektor-DNA bei der Ligationsreaktion wieder religiert wurden die 5'-endständigen Phosphatreste enzymatisch durch den Einsatz eine Phosphatase

entfernt. 1 µg des in Kapitel 3.2.5/3.2.6 linearisierten und aufgereinigten pET28b Vektors (Novagen) wurde für 5 min bei 37 °C im Thermoschüttler für die Dephosphorylierung inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Deaktivierung des Enzyms durch 5 minütiges Erhitzen bei 75 °C.

Tabelle 3.8 Reaktionsansatz

<b>Linearisierter Vektor (pET28b)</b>	14 µl
<b>10x Puffer</b>	2 µl
<b>Phosphatase</b>	1 µl
<b>Wasser</b>	ad 20 µl

### 3.2.7 Ligation von DNA-Fragmenten mit dem pET28b Vektor

Die Ligation von isolierten DNA Fragmenten mit dem dephosphorylierten (Kapitel 3.2.6) Expressionsvektor pET28b erfolgte mittels T4-DNA-Ligase. Der Ligationsansatz (Tabelle 3.9) wurde über Nacht bei 18 °C inkubiert und anschließend 5 µl für die Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien (Kapitel 3.2.10) eingesetzt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert-DNA sollte 1:3 betragen, deshalb wurde die Menge an Insert DNA nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Insertmenge} = 3 \times 50 \text{ ng (Vektormenge)} \times \frac{\text{Länge Insert [bp]}}{\text{Länge Vektor [bp]}}$$

Tabelle 3.9 Ligationsansatz

<b>Dephosphorylierter, linearisierter Vektor</b>	5 µl
<b>T4-Ligasepuffer (10x)</b>	1,5 µl
<b>Insert</b>	je nach Insert ( Vektor : Insert-Verhältnis 1:3)
<b>T4-Ligase</b>	0,5 µl
<b>Wasser</b>	ad 15 µl

### 3.2.8 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation der verschiedenen Mengen an Plasmid-DNA erfolgte mit dem Pure Extreme: GenJET Plasmid Miniprep Kit, dem GenJET Plasmid Midiprep Kit und dem GenJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo Fischer Scientific, Hamburg) entsprechend nach deren zugehöriger Protokolle. Abweichend zu den Protokollen erfolgte die Elution der Plasmid-DNA mit TE-Puffer.

### 3.2.9 Gateway™-Klonierung

Die Klonierung der DNA-Sequenzen erfolgte mit den für die BP-Reaktion zugehörigen BP-Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen, Darmstadt) und dem für die LR-Reaktion zugehörigen LR-Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen, Darmstadt). Dabei wurde für die Erzeugung eines *entry clones* die rekombinante Reaktion wie sie im Protokoll beschrieben ist durchgeführt, allerdings nur mit der halben Vektor- und Insertmenge. Die eingesetzte Menge an attB-PCR-Produkt war demnach 25 fmol und die eingesetzte *donor vector* (pDONR™201) Konzentration betrug 75 ng/μl. Im Anschluss an die *entry clone* Generierung erfolgte die LR-Reaktion. Dafür wurden 75 ng/μl *entry clone* und 150 ng/μl der verschiedenen *destination vectors* verwendet. Durch diese Reaktion wurde ein für die stabile Pflanzentransformation geeigneter *expression clone* generiert. In Tabelle 3.10 sind die verschiedenen Eigenschaften der unterschiedlichen *destination vectors* dargestellt (Nakagawa et al., 2007).

Tabelle 3.10 Vektorbezeichnungen und Eigenschaften der unterschiedlichen *destination vectors*. (c: C-terminale Fusion)

Vektorbezeichnung	Promotor	Sequenz des Fusionsproteins/ Tags
pGWB 3	-	c-GUS
pGWB 5	35S	c-sGFP
pGWB 7	-	c-6x His
pGWB 8	35S	c-6x His
pGWB 14	35S	c-3x HA
pGWB 19	-	c-10x Myc
pGWB 41	35S	c-YFP
pGWB 44	35S	c-CFP
pGWB 204	-	c-sGFP

### 3.2.10 Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurde zu 50 µl chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien der jeweilige Reaktionsansatz der Gateway™ Klonierung beziehungsweise Ligationsansatz der herkömmlichen Klonierung gegeben und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Hitzeschocktransformation erfolgte bei 42 °C für 45 s und anschließender Kühlung für 90 s auf Eis. Einem Reaktionsansatz wurden 200 µl LB-Medium hinzugegeben und für mindestens 90 min im Thermoschüttler inkubiert (900 rpm, 37 °C). Die Selektion der positiv transformierten Bakterien erfolgte auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika bei 37 °C über Nacht.

### 3.2.11 Transformation von Agrobakterien

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1, Koncz and Schell, 1986) wurde zu 200 µl chemisch-kompetenten Bakterien vor dem Auftauen 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA gegeben und diese für 30 min auf Eis gelassen. Die Transformation erfolgte durch einen einminütigen Kälteschock in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen (10 min, 37 °C). Einem Reaktionsansatz wurde 1 ml YEB-Medium hinzugegeben und für 4 Stunden im Thermoschüttler inkubiert (300 rpm, 28 °C). Die Bakteriensuspension wurde darauffolgend 1 min zentrifugiert und das erhaltene Bakterienpellet in 100 µl YEB-Medium resuspendiert. Die Selektion der positiv transformierten Bakterien erfolgte auf YEB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika bei 28 °C über 2-3 Tage.

### 3.2.12 Kolonie Screen PCR

Mittels einer Kolonie Screen PCR wurde der Erfolg der durchgeführten Transformation überprüft. Dafür wurde eine einzelne angewachsene Kolonie in 25 µl sterilem Wasser gelöst und 10 µl davon als *template* für eine PCR (Kapitel 3.2.1) eingesetzt. Im Anschluss wurde eine Gelelektrophorese (Kapitel 3.2.2) der PCR-Proben durchgeführt, um die positiven Bakterienkolonien anhand der entsprechenden Banden zu identifizieren. Die verbleibenden 15 µl konnten nach der Identifizierung direkt für das Animpfen von Selektionsmedium verwendet werden.

Tabelle 3.11 PCR Ansatz für eine Reaktion

<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1,6 µl
<b>Taq-Puffer (10x)</b>	2,0 µl
<b>dNTP`s (2,5 mM)</b>	1,6 µl
<b>Primer 1 (10 µM)</b>	0,2 µl
<b>Primer 2 (10 µM)</b>	0,2 µl
<b>Taq Polymerase</b>	0,2 µl
<b>Template</b>	10 µl
<b>Wasser</b>	ad 20 µl

In Tabelle 3.12 ist das verwendete Thermocyclerprotokoll dargestellt.

Tabelle 3.12 Thermocyclerprotokoll

	<b>Zeit</b>	<b>Temperatur [°C]</b>	<b>Zyklenzahl</b>
<b>Initiale Denaturierung</b>	3 min	95	1
<b>Denaturierung</b>	45 s	95	
<b>Annealing</b>	45 s	50-66	36
<b>Elongation</b>	45 - 90 s	72	
<b>Finale Elongation</b>	5 min	72	1

### 3.2.13 Herstellung von Glycerinstocks

Für die dauerhafte Lagerung positiver Bakterienkolonien wurden von diesen Glycerinstocks hergestellt. Hierfür wurden 450 µl einer frischen Übernachtskultur mit 150 µl Glycerin (20 %) in einem 2 ml Schraubdeckelgefäß gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Glycerinstocks erfolgte bei -80 °C.

Für die dauerhafte Lagerung des nekrotrophen Pilzes *Sclerotinia sclerotiorum* wurde eine Sklerotie in die Mitte einer sterilen PDA-Platte gelegt. Die mit Parafilm verschlossene Platte wurde für zwei bis drei Wochen bei RT auf der Laborbank stehen gelassen, bis sich am Rand neue Sklerotien gebildet hatten. Nachdem sich die Calciumoxalat-haltigen Kristalle zurückgebildet hatten, konnten die Sklerotien mit einer sterilen Pinzette in steriles, 20 % Glycerin überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Die Lagerung der Pilzstocks erfolgte bei -80 °C.

### 3.2.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung bestimmter DNA Abschnitte wurde von der Firma LGC-Genomics in Berlin durchgeführt. Hierfür wurde 1 µg Plasmid-DNA in 10 µl sterilem Wasser gelöst und eingeschickt. Die entsprechenden Sequenzierprimer wurden von LGC-Genomics zur Verfügung gestellt und in einer Konzentration von 5 pmol/µl zur jeweiligen Probe hinzugegeben. In Tabelle 3.13 sind die Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Sequenzierprimer dargestellt.

Tabelle 3.13 Sequenzierprimer

Bezeichnung	Primersequenz 5`->3`
<b>M13 forward</b>	TGTAAAACGACGGCCAGT
<b>M13 reverse</b>	CGGATAACAATTTACACAGG
<b>pDONR201 forward</b>	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC
<b>pDONR201 reverse</b>	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC

### 3.2.15 DNA-Extraktion

Für die Isolierung der Gesamt-DNA aus *Arabidopsis thaliana* wurden circa 100 mg Pflanzenmaterial in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß mit einer Keramikkugel überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die mechanische Zerkleinerung für 30 s bei 20 Hz in der Schwingmühle. Nach dem Versetzen und Durchmischen mit 750 µl Isolationspuffer und 750 µl Chloroform inkubierte die Probe für 1 h bei 65 °C im Wasserbad. Durch die Zentrifugation (10 min, 7500 g, 4 °C) ergab sich eine Phasentrennung, wobei die obere Phase abgenommen und mit demselben Volumen an Isopropanol versetzt wurde. Nach erneutem Zentrifugieren (10 min,

14000 rpm, 4 °C) wurde der vollständige Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 750 µl 70 % Ethanol gewaschen. Die gesamte Flüssigkeit wurde nach dem Zentrifugieren (1 min, 14000 rpm, 4 °C) abgenommen und das getrocknete Pellet in 15 µl TE-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der aufgereinigten Pflanzen-DNA erfolgte bei -20 °C.

### **Isolationspuffer**

1 % Sarcosyl  
0,8 M NaCl  
22 mM EDTA  
0,22 mM Tris-HCl pH 7,8  
0,8 % CTAB  
0,14 M Mannitol

Vor der Extraktion wurden 14 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml Isolationspuffer hinzugegeben.

### **3.2.16 RNA-Extraktion**

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde das E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA) verwendet. Es wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes, gemörsertes Pflanzenmaterial eingesetzt und nach dem zugehörigen Protokoll aufgearbeitet. Ein zusätzlicher Schritt bei der Aufarbeitung war der Verdau der restlichen, unerwünschten genomischen DNA auf der RNA-bindenden Säule mit dem DNase I Enzym (Invitrogen, Karlsruhe). Die aufgereinigte RNA wurde in 50 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser gelöst und bei -20 °C gelagert.

### **3.2.17 cDNA Synthese**

Für die Synthese von cDNA aus RNA (reverse Transkription) wurde in einem PCR-Gefäß 1 µg RNA in 16,65 µl DEPC Wasser gelöst und bei 70 °C für 5 min denaturiert. Die Probe wurde anschließend auf Eis abgekühlt und mit 8,35 µl reverse Transkriptase-Mastermix (Tabelle 3.14) versetzt. Die Synthese der cDNA erfolgte für 1 Stunde bei 42 °C. Um die reverse Transkriptase zu inaktivieren, inkubierten die Proben für weitere 15 min bei 70 °C. Zum Erhalt einer Konzentration von 5 ng/µl wurde die erhaltene cDNA mit HPLC Wasser 1:8 (v/v) verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Tabelle 3.14 Reaktionsansatz für die reverse Transkription

<b>5x RT-Puffer</b>	5,0 µl
<b>dNTPs (10 mM)</b>	1,5 µl
<b>Poly T27 Primer (100 pmol) (TIB Molbiol)</b>	1,2 µl
<b>RNAse Inhibitor</b>	0,25 µl
<b>MMLV reverse Transkriptase (200 u/µl)</b>	0,4 µl

### 3.2.18 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Für eine quantitative und qualitative Detektion der Expression bestimmter Gene wurde die quantitative Real-Time PCR Methode eingesetzt. Dabei wird die Fluoreszenz detektiert, die bei der Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green mit doppelsträngiger DNA während einer PCR Reaktion emittiert wird. Rückschlüsse auf die eingesetzte DNA-Menge bleiben möglich, da in der exponentiellen Phase der Amplifikation die DNA-Konzentration proportional zum Fluoreszenzsignal zunimmt. Zusätzlich kann durch die Analyse der Amplifikatschmelzkurven deren Spezifität überprüft werden. Zur Quantifizierung spezifischer Genprodukte wurden zu 2 µl der verdünnten cDNA (Kapitel 3.2.17) in einer 96-well PCR-Platte 10 µl Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix und 4 µl der entsprechenden *forward* und *reverse* Primer (Tabelle 3.16) gegeben und die qRT-PCR im CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, München) nach dem in Tabelle 3.15 angegebenen Protokoll durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde anstelle der cDNA der zu untersuchenden Proben 2 µl HPLC Wasser eingesetzt. Als Bezugsgen für die relative Quantifizierung ( $2^{-\Delta Ct}$  Methode) wurde ein konstitutiv exprimiertes Gen (Aktin 2/8) eingesetzt (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabelle 3.15 Thermocyclerprotokoll

	Zeit	Temperatur [°C]	Zyklenzahl
<b>Initiale Denaturierung</b>	15 min	95	1
<b>Denaturierung</b>	15 s	95	
<b>Annealing</b>	20 s	55	39
<b>Elongation</b>	20 s	72	
<b>Finale Denaturierung</b>	10 s	95	1
<b>Schmelzkurve</b>	Je 5 s	70-95 (in 0,5 Schritten)	

Tabelle 3.16 Genbezeichnung und verwendete Primersequenzen für die qRT-PCR

Gen	Primersequenz <i>forward</i> (5' → 3')	Primersequenz <i>reverse</i> (5' → 3')
<b>LTPIV.4</b> (At5g55450)	GTCAATGGAAACAACCT	AGATGGGTCTATCCCGAC
<b>AZI1</b> (At4g12470)	TAATCCTAGGCCGGTCACAC	GTCGACGTCAACCAAACCT
<b>MYB51</b> (At1g18570)	ACCAACCTCGAATCTTCTCTG	TTTCAACACAAGACTCCTCCA
<b>Aktin2/8</b> (At3g18780)	GGTGATGGTGTGTCT	ACTGAGCACAATGTTAC
<b>DIR1</b> (At5g48485)	TGCGGCATGAGCCAGGAT	ACAAGTTGGGGCGTTGGC
<b>PR1</b> (At2g14610)	TCTAAGGGTTCACAACCAG	CGCAGCGTAGTTGTAGTTA
<b>VSP2</b> (At5g24770)	TTGAACCCATCATACTCAG	CCATTGATCTCCGATATTG
<b>CBP60g</b> (At5g26920)	AAGAAGAATTGTCCGAGAGGAG	GGCGAGTTTATGAAGCACAG

Gen	Primersequenz <i>forward</i> (5' → 3')	Primersequenz <i>reverse</i> (5' → 3')
<b>SID2</b> (At1g74710)	TCCGTGACCTTGATCCTTTC	ACAGCGATCTTGCCATTAGG
<b>WRKY22</b> (At4g01250)	ATCTCCGACGACCACTATTG	TCATCGCTAACCACCGTATC
<b>OXI1</b> (At3g25250)	TCATCTACATTGGCCGTGTC	CGTCGCTCCATACAACATCT
<b>SAG13</b> (At2g29350)	TGTCCTTGGTATATCACAAC	TTCATAGATTATGGATGCGG
<b>PDF1.2</b> (At5g44420)	TCTCTTTGCTGCTTTCGAC	AAGTTACTCATAGAGTGAC
<b>LOX2</b> (At3g45140)	GTACGTCTGACGATACC	TCTGGCGACTCATAGAA

### 3.2.19 Photometrische Quantifizierung von DNA/RNA

Durch die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260$  nm konnte die Konzentration der aufgereinigten DNA/RNA bestimmt werden. Dabei ergibt sich für eine Absorption von 1 eine doppelsträngige DNA Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l beziehungsweise eine einzelsträngige RNA Konzentration von 40 ng/ $\mu$ l. Die Formel für die DNA/RNA Bestimmung lautet somit:

$$\text{Konzentration} \left[ \frac{\text{ng}}{\mu\text{l}} \right] = E_{260} \times 50 \text{ (DNA) bzw. } 40 \text{ (RNA)} \times \text{Verdünnung}$$

Die Bestimmung der verschiedenen Probenkonzentrationen wurde am NANODROP 1000 Spektrometer (Thermo Scientific, USA) durchgeführt. Die Kalibrierung des Gerätes erfolgte mit 1  $\mu$ l des jeweiligen Lösungsmittels der unterschiedlichen Proben. Für die Probenmessung bei 260 nm wurde 1  $\mu$ l Lösung eingesetzt und automatisch durch die Software des Gerätes der Gehalt an DNA/RNA in ng/ $\mu$ l ermittelt.

### 3.3 Biochemische Methoden

#### 3.3.1 Heterologe Proteinexpression und -isolierung

Für die heterologe Proteinexpression wurde 100 ml flüssiges LB-Medium mit Antibiotika (Kanamycin 50 µg/ml) aus einem Glycerinstock mit Bakterien (BL21star™(DE3)) angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (160 rpm) inkubiert. 20 ml dieser Vorkultur wurden in 800 ml LB-Medium mit Antibiotika übergeimpft und wieder auf dem Schüttler (160 rpm, 37 °C) gestellt, bis die Bakteriensuspension eine OD von 0,5 erreicht hat. Anschließend wurden die Kolben in einen anderen Schüttler (130 rpm, 15 °C) transferiert. Nach 30 min Abkühlen erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit Zugabe von 820 µl IPTG (1 M). Nach 2 Tagen Inkubation wurden die Bakterien in der Zentrifuge pelletiert (20 min, 6000 rpm, 4 °C). Nach einmaligem Lösen in Waschpuffer und erneutem Zentrifugieren (20 min, 6000 rpm, 4 °C) wurden die Bakterienpellets bis zur weiteren Verwendung in Alufolie bei -20 °C eingefroren. Die Resuspension der Bakterien erfolgte unter ständigem Rühren in 100 ml Aufschlusspuffer für 30 min auf Eis. Für eine primäre Lyse der Peptidoglykanstrukturen der Bakterienmembranen wurde der Lösung beim Resuspendieren 4 ml Lysozym (20 µg/ml) hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die sekundäre Lyse durch 12 min Beschallung mit Ultraschallwellen (Intervall: 10 s an, 30 s aus). Sofortiges Zentrifugieren (45 min, 32000 g, 4 °C) trennte die löslichen Proteine von den unlöslichen Bestandteilen. Die Proteinlösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 3.3.2 Proteinaufreinigung über IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography)

Die Metallchelatchromatographie (IMAC) ist eine Affinitätschromatographie bei der Proteine, welche N/C-terminal mit mehreren Histidinresten fusioniert sind, über eine Säule isoliert werden können. Dabei interagieren die Histidinreste mit den an eine Trägermatrix gebundenen Ni<sup>2+</sup>-Ionen und bilden einen Chelatkomplex aus. Die Elution des Proteins erfolgt durch die Zugabe von Imidazol, welches das Protein aus dem Chelatkomplex kompetitiv verdrängt. Für die Proteinaufreinigung wurde 5 ml Ni<sup>2+</sup>-NTA Material (resuspendiert in 20 % Ethanol) in eine Säule gegeben. Das Säulenmaterial wurde dreimal mit 10 ml Äquilibrierungspuffer versetzt. Die Proteinlösung wurde vollständig auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde das Säulenmaterial dreimal mit je 20 ml Äquilibrierungspuffer und dreimal mit je 10 ml Säulenwaschpuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte dreimal mit 3 ml Elutionspuffer. Weiterhin erfolgte eine weitere Aufreinigung der gewonnenen rekombinanten Proteine durch eine Dialyse. Dafür wurde ein

Dialyseschlauch mit einer Porengröße von 3,5 µm verwendet. Die Proteinlösung wurde zuerst für 1 h bei 4 °C gegen 2 l Dialysepuffer dialysiert. Eine weitere Dialyse erfolgte unter den gleichen Bedingungen über Nacht. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.3.3 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial**

Für die Proteinextraktion wurden 100 mg in flüssigem Stickstoff gefrorenes, gut gemörstertes Pflanzenmaterial in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Harnstoffextraktionspuffer versetzt, gemischt und für 10 min bei 95 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (15 min, 14000 rpm, RT) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch eine weitere Inkubation für 10 min bei 75 °C im Thermoschüttler wurden die Harnstoff-Proteinextrakte denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt.

### **3.3.4 Diskontinuierliche Polyacrylamid Gelelektrophorese**

Für die Auftrennung der Proteinextrakte beziehungsweise für den Nachweis der Sauberkeit der Auftrennung der heterolog exprimierten Proteine wurde die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) eingesetzt. Dabei erfolgte die Trennung der Proteine nach ihrer Größe im elektrischen Feld nach Lämmli (Laemmli, 1970).

Für das Gießen der Minigele wurden die 1,0 mm dicken, 10 cm x 10 cm fluoreszierenden Glasplatten mit Ethanol gereinigt. Ein Gelsystem besteht aus zwei 10 cm x 10 cm großen Glasplatten, die durch 1 mm Spacer getrennt sind. In einer Gelgießapparatur konnten je zwei Gele eingespannt werden und für die Trenngelflüssigkeit (Tabelle 3.17) vorbereitet werden. Mit der Zugabe von TEMED und APS (10 %) startete die Polymerisierungsreaktion und die Trenngellösung konnte mit einer 10 ml Glaspipette zwischen die Glasscheiben bis zu einer Höhe von 8 cm gegeben werden. Für eine gerade Kante wurde das Trenngel mit 500 ml Isopropanol überschichtet und für 20 min zum auspolymerisieren stehen gelassen. Das Isopropanol wurde darauffolgend abgegossen und die übrige Flüssigkeit mit einem Streifen Whatman Paper entfernt. Anschließend erfolgte das Gießen des Sammelgels (Tabelle 3.17) auf das Trenngel, indem die Flüssigkeit auf das auspolymerisierte Trenngel gegeben und ein Probenkamm eingesetzt wurde. Nach 20 min war auch das Sammelgel auspolymerisiert und die gesamte Apparatur konnte in eine Elektrophoresekammer gestellt werden.

Das fertige Gel wurde mit SDS-Laufpuffer überschichtet und der Probenkamm aus dem Sammelgel gezogen, damit die Taschen mit SDS-Laufpuffer durchspült werden konnten. Für die Trennung der in Kapitel 3.3.3 hergestellten Pflanzenextrakte wurden 40 µl Extrakt in eine Tasche aufgetragen. Für die Überprüfung der Isolierung der rekombinant hergestellten Proteine wurden von jeder Probe 10 µl aufgetragen. Zusätzlich zu allen Proben wurden 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder zur Größenbestimmung in eine Tasche pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst 15 min bei einer Spannung von 80 V. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreichte, wurde die Spannung für 1 h auf 200 V erhöht. Die aufgetrennten Proteingele wurden anschließend entweder mit Coomassie Brilliant Blue (Kapitel 3.3.8) gefärbt oder für das Immunoblotting (Kapitel 3.3.5) verwendet.

Tabelle 3.17 Pipettierschema für je 2 Trenn- und Sammelgele, Angaben in ml

	<b>Trenngel 12 %</b>	<b>Sammelgel 5 %</b>
<b>Acrylamid Lösung (30 %)</b>	4	1,7
<b>Tris-HCl (1 M pH 8,8)</b>	4,2	-
<b>Tris-HCl (0,5 M pH 6,8)</b>	-	2,5
<b>Wasser</b>	1,65	5,85
<b>SDS (10 %)</b>	0,1	0,1
<b>APS (10 %)</b>	0,05	0,04
<b>TEMED</b>	0,04	0,01

### 3.3.5 Immunoblotting (Elektrophoretischer Proteintransfer)

Für die Immunodetektion mussten die aufgetrennten Proteine zunächst auf eine Membran transferiert werden. Der Transfer erfolgte mit dem sogenannten Nass-Blot Verfahren. Hierfür wurde eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran verwendet, welche vorher aktiviert werden musste. Dafür wurde diese einige Sekunden in Methanol getaucht und anschließend in Transferpuffer äquilibriert. Das Proteingel, 6 Lagen zurechtgeschnittenes Filterpapier und 7 Schwamm pads wurden ebenfalls für den Blot gebraucht und deshalb vorher in Transferpuffer äquilibriert bzw. eingelegt. Der Aufbau der Blotapparatur und deren verschiedener Bestandteile erfolgte wie in Abbildung 3.1 schematisch gezeigt. Auch war darauf zu achten, dass die Bestandteile luftblasenfrei aufeinander geschichtet wurden. Der Blot-Einsatz wurde im Anschluss in eine Blotkammer geklemmt und mit Transferpuffer überschichtet. Der Proteintransfer erfolgte für 45 min bei einer konstanten Stromstärke von 140 mA.

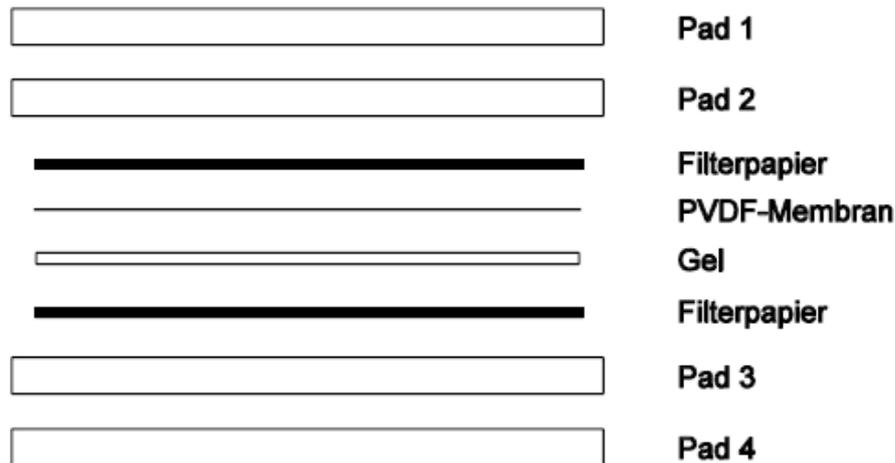


Abbildung 3.1 Schematischer Aufbau eines Nassblots

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF Membran kurz in TBS-Puffer gewaschen und für 1 h bei RT in Blocking Solution zur Absättigung freier Bindungsstellen und damit zur Verhinderung unspezifischer Bindung des/der Antikörper an die Membran geschüttelt. Anschließend wurde die Membran mit einer 1:1000 Verdünnung eines polyklonalen GFP-Primärantikörpers (Roche Diagnostics, Mannheim) in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran dreimal für je 5 min in TBST-Puffer gewaschen und 2 h mit einer 1:5000 Verdünnung eines Meerrettich Peroxidase Enzym (HRP) gekoppelten Anti Maus Sekundärantikörpers (GE-Healthcare, München) in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver inkubiert. Anschließend wurde die Membran fünfmal je 5 min mit TBS-Puffer gewaschen und wie in Kapitel 3.3.7 weiter verwendet.

### 3.3.6 Fat Blot

Für die Identifizierung möglicher Substrate der Lipid Transfer Proteine wurden membranbasierte *in vitro* Tests mittels Fat Western Blot durchgeführt (Stevenson et al., 1998). Dabei wurden verschiedene Lipide (5 nmol) in Chloroform oder Methanol/Chloroform gelöst und davon jeweils 5 µl auf eine vorher mit Methanol aktivierte PVDF Membran gespottet. Die Membran trocknete bei Raumtemperatur für 1 h, bevor sie mit 3 % fettfreiem BSA (FAF-BSA) (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) gelöst in TBS-Puffer auf dem Schüttler (1 h, RT) geblockt wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht mit der aufgereinigten Proteinlösung (2 µg/ml) (gelöst in 3 % FAF-BSA/TBS-Puffer) auf

dem Schüttler (40 rpm, 4 °C). Die folgenden Schritte erfolgten alle bei Raumtemperatur auf dem Schüttelinkubator bei 40 rpm. Am nächsten Tag wurde die Membran für 5 min mit 3 % FAF-BSA/TBS-Puffer gewaschen und mit dem primären Antikörper (Anti-GFP, 1:2000 Verdünnung), gelöst in 3 % FAF-BSA/TBS-Puffer, für 1 h versetzt. Nach zweimaligem, fünfminütigem Waschen mit TBS-Puffer wurde die Membran mit dem HRP-konjugiertem sekundärem Antikörper (Anti-Maus, 1:10000) für 1 h inkubiert. Nach zweimaligem, fünfminütigem Waschen mit TBS-Puffer erfolgte die Detektion der Chemilumineszenz wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben.

### **3.3.7 Immunodetektion (Detektion der Chemilumineszenz)**

Die Detektion erfolgte durch die Katalyse der oxidativen Umsetzung von Luminolderivaten (Substrat) durch das am sekundären Antikörper gekoppelte HRP-Enzym und der daraus entstehenden Chemilumineszenz. Hierfür wurde die mit den Antikörpern inkubierte Membran zwischen zwei Plastikfolien gelegt und mit dem vorbereiteten Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat bedeckt, bevor die Folien übereinander gelegt wurden, um so die Substratflüssigkeit gleichmäßig auf der Membran zu verteilen und gleichzeitig ein Austrocknen zu verhindern. Nach 5 min Inkubation wurde mit saugfähigem Papier überschüssiges Substrat am Rand der Membran aufgesaugt und die Membran in Klarsichtfolie eingepackt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen. Die Detektion der Chemilumineszenz wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt, indem ein medizinischer Röntgenfilm (Fuji) auf die Membran aufgelegt wurde. Die Entwicklung des Films erfolgte für 2 min in einer Entwicklerlösung (Kodak), 1 minütigem Waschen in Wasser, Fixieren für 3 min (Kodak) und anschließendem Waschen und Trocknen.

### **3.3.8 Coomassie Färbung**

Zur Detektion der Proteine im Gel nach der SDS-PAGE wurde die Coomassie-Brilliant-Blue®-Färbung verwendet. Dieser Farbstoff benötigt ein saures Milieu, um an die Proteine zu binden. Die Färbung der aufgetrennten Proteine mit Coomassie Blue R-250 Färbelösung (0,1 % Coomassie R-250, 10 % Essigsäure) erfolgte über Nacht unter ständigem Schütteln bei 40 rpm. Durch diesen Prozess lagern sich die Farbmoleküle unspezifisch unter Komplexbildung an die basischen Seitenketten der Aminosäuren an. Um einzelne Proteinbanden in den zunächst völlig blau gefärbten Gelen sichtbar zu machen, ist es nötig, den ungebundenen Farbstoff mit Wasser wieder zu entfernen. Dazu muss das

Wasser mehrmals gewechselt werden. Zur Auswertung wurden die Gele gescannt und die Bilder auf einem Rechner gespeichert.

### 3.3.9 Gesamtproteinbestimmung

Die quantitative Bestimmung des Gesamtproteingehalts wurde modifiziert nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Dazu wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) eine Standardreihe bekannter Konzentrationen hergestellt und damit die Konzentrationen der Proteinproben quantitativ über deren Adsorptionen am ELISA Reader bei 595 nm ermittelt.

### 3.3.10 Detektion der GUS Expression

Die auf MS-Platten steril angezogenen Keimlinge wurden in vorgekühltem, 90 % Aceton (-20 °C) im Exsikkator Vakuum infiltriert (3x 1 min Vakuum angelegt). Die weitere Fixierung erfolgte bei -20 °C für 1 h. Nach 2x 10 min Waschen mit 50 mM Phosphatpuffer wurden die Keimlinge in 1 mM X-Gluc-Lösung (Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure) Vakuum infiltriert (6x 1 min Vakuum angelegt) (Jefferson et al., 1987). Die weitere Färbung erfolgte über Nacht bei 37 °C im Klimaschrank. Am nächsten Tag wurden die Keimlinge für 10 min in 70 % Ethanol gewaschen und inkubierten anschließend in 70 % Ethanol über Nacht im Dunkeln bei RT. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion der GUS-Expression unter dem Stereomikroskop (Olympus SZ61, Kamera von Leica, Software Leica LAS EZ.) und dem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer.Z1 Carl Zeiss Microscopy GmbH).

### 3.3.11 Transiente Transformation von *Arabidopsis* Epidermiszellen

Die transiente Transformation von *Arabidopsis* Epidermiszellen erfolgte nach der „*particle bombardement*“ Methode. An kleinste Partikel (Gold oder Wolfram) gebundene DNA wird hierbei mit einem hohen Druck in der sogenannten Genkanone in pflanzliche Zellen geschossen. Für die transiente Transformation wurden Wolframpartikel mit einem Durchmesser von 4  $\mu$ m (25 mg/ml) in 50 % Glycerin durch 30 min im Ultraschallbad resuspendiert. Für einen Schuss wurden 12,5  $\mu$ l Wolframpartikel unter ständigem Mischen mit 1  $\mu$ g Vektor für die GFP-fusions Proteine und 0,5  $\mu$ g

Vektor für das mCherry Protein und 12,5 µl Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (1 M, pH 10) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß tropfenweise vereint. Anschließend wurde die Suspension 6x für 1 min in das Ultraschallbad gestellt und für 10 min bei RT stehen gelassen. Die Partikel wurden kurz pelletiert und ein Teil des Überstandes abgenommen, so dass für einen Schuss 6 µl Suspension vorhanden waren. Die Partikel wurden darauffolgend nochmals durch Mischen und Ultraschall (6x 1 min) resuspendiert. Die *Arabidopsis* Blattunterseiten wurden mit einer selbstgebauten Genkanone beschossen. Dabei hatte der Apparat einen Druck von 7,5 bar und die Schusskammer einen Unterdruck von 0,8 bar. Die beschossen Blätter wurden dann für 16 h bei RT im Dunkeln gelagert und anschließend mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

### 3.3.12 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) ist eine fluoreszenzmikroskopische Technik, welche eine reale dreidimensionale Auflösung eines Objekts ermöglicht. Der dabei als Lichtquelle dienende punktförmige Laser wird über die Probe geführt und das dadurch emittierte Licht wird über einen Farbteiler zum Photomultiplier reflektiert. Eine Besonderheit dieser Systems im Gegensatz zum konventionellen Lichtmikroskop besteht darin, dass nur Strukturen abgebildet werden, die in der Fokusebene des Objektivs liegen.

In dieser Arbeit wurde das Mikroskop LSM 5 Pascal Axioskop 2 (Carl Zeiss Microscopy GmbH) und die zugehörige Software AxioVision 4.8 (2010, Carl Zeiss Microscopy GmbH) verwendet. Mithilfe eines Argonlasers (488 nm) und eines HeNe1 Lasers (543 nm) wurden die verschiedenen Fluorophore angeregt. Folgende Filter wurden für die Detektion verwendet: Für GFP-Emissionswellenlängen von 505-550 nm; für rote Fluoreszenz (mCherry) Emissionswellenlänge von 560 nm.

## 3.4 Analytische Methoden

### 3.4.1 Extraktion und Analyse von Phytohormonen und Dicarbonsäuren

Für die Extraktion und Analyse von Phytohormonen und Dicarbonsäuren wurde frisches Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und 200 mg gefrorenes Material in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß abgewogen. Die Probe wurde mit 1 ml Ethylacetat/Ameisensäure (99:1, v/v) extrahiert (Grebner et al., 2013). Darin gelöst waren jeweils 50 ng Dihydro-JA (dHJA), JA-Norvalin (JA-Nval), [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] OPDA, [D<sub>6</sub>]

ABA, [D<sub>4</sub>] SA als interne Standards für die spätere Quantifizierung. Für die Analyse der Dicarbonsäuren wurde als interner Standard 50 ng Sebacinsäure (SEA) und als Antioxidationsmittel 5 mg Triphenylphosphat (TPP) und 0,5 mg Butylhydroxytoluol (BHT) hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen. Während der Überstand im Rotationsvakuumkonzentrator bei 40 °C eingengt wurde, erfolgte eine zweite Extraktion des Pellets, wie zuvor beschrieben, mit reinem Extraktionsmittel. Der gewonnene Überstand wurde erneut in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem restlichen Überstand aus der ersten Extraktion vereint. Nach zwei weiteren Extraktionen erfolgte das Einengen der Probe bis zur vollständigen Trockenheit. Der Rückstand wurde in 40 µl Acetonitril/Wasser (1:1, v/v) gelöst und zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT). Der Überstand wurde für die weitere Analyse in ein UPLC-Probengefäß überführt und bei -20 °C bis zur Messung mit dem UPLC-Tandem-Massenspektrometer (MS) gelagert.

Für die Analyse und Auftrennung der Phytohormone wurde eine Acquity BEH C18 Säule (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm Partikelgröße) und eine Acquity BEC C18 Vorsäule mit Vorfilter (beide Waters, Milford, MS, USA) verwendet. Die Lösungsmittel waren: A = 0,1 % wässrige Ameisensäure und B = Acetonitril. Die Gradienten-Elution wurde bei 40 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 250 µl/min durchgeführt. Dabei startete der Gradient mit 3 % Lösemittel B und erreichte nach 7 min 100 % Lösemittel B. Detektiert wurden die Phytohormone mit einem Waters Micromass Quattro Premier Massen-Spektrometer (Tandem-MS). Dabei wurden Ionen durch negative Elektronen Spray Ionisation (ESI) erzeugt und durch die selektive Multiple Reaction Monitoring (MRM)-Methode detektiert. Während in Tabelle 3.18 die Tandem-MS Parameter angegeben sind, sind in Tabelle 3.19 die Masse/Ladungsverhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Ionenprodukte sowie deren Detektionsparameter aufgelistet.

Tabelle 3.18 Tandem-MS Parameter zur Detektion von Phytohormonen

<b>Ionisationsmodus</b>	Negative ESI
<b>Kapillarspannung (kV)</b>	3
<b>Quellentemperatur (°C)</b>	120
<b>Derivatisierungsgasfluss (1/h) N<sub>2</sub></b>	800
<b>Konusgasfluss (1/h) N<sub>2</sub></b>	50
<b>Desolvatisierungstemperatur (°C)</b>	400
<b>Kollisionsgasdruck (bar) Ar</b>	3.10 x 10 <sup>-3</sup>

Tabelle 3.19 Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und Detektionsparameter der Precursor-Ionen und deren Produkt-Ionen von dHJA, JA, JA-Nval, JA-Ile, [<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] OPDA, OPDA, dnOPDA, [D<sub>6</sub>] ABA, ABA, [D<sub>4</sub>] SA und SA

<b>Analyt</b>	<b>Precursor-Ion (m/z)</b>	<b>Produkt-Ion (m/z)</b>	<b>Konusspannung (V)</b>	<b>Kollisionsenergie (eV)</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>
<b>dHJA</b>	211,1	59	19	17	3.91
<b>JA</b>	209,1	59	19	17	3.58
<b>JA-Nval</b>	308,1	116	24	18	3.83
<b>JA-Ile</b>	322,1	130	24	18	4.13
<b>[<sup>18</sup>O<sub>2</sub>] OPDA</b>	295,1	165	22	26	5.11
<b>OPDA</b>	291,1	165	22	26	5.11
<b>dnOPDA</b>	263,1	165	22	26	4.42
<b>[D<sub>6</sub>] ABA</b>	269,1	159	26	14	3.09
<b>ABA</b>	263,1	153	26	14	3.10
<b>[D<sub>4</sub>] SA</b>	141,1	97	17	17	2.95
<b>SA</b>	137,1	93	17	17	2.97

Für die Analyse und Auftrennung der Dicarbonsäuren wurde eine Acquity BEH C18 Säule (2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm Partikelgröße) und eine Acquity BEH C18 Vorsäule mit Vorfilter (beide Waters, Milford, MS, USA) verwendet. Die Lösungsmittel waren: A = 0,1 % wässrige Essigsäure und B = Methanol (0,1 % Essigsäure). Die Gradienten-Elution wurde bei 40 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 250 µl/min durchgeführt. Dabei startete der Gradient mit 5 % Lösemittel B und erreichte nach 10 min 100 % Lösemittel B. Detektiert wurden die Dicarbonsäuren mit einem Waters Micromass Quattro Premier Massen-Spektrometer (Tandem-MS). Dabei wurden Ionen durch negative ESI erzeugt und durch die selektive MRM-Methode detektiert. Während in Tabelle 3.20 die Tandem-MS Parameter angegeben sind, sind in Tabelle 3.21 die Masse/Ladungsverhältnisse der Precursor-Ionen und ihrer Ionenprodukte sowie deren Detektionsparameter aufgelistet.

Tabelle 3.20 Tandem-MS Parameter zur Detektion von Dicarbonsäuren

<b>Ionisationsmodus</b>	Negative ESI
<b>Kapillarspannung (kV)</b>	3,25
<b>Quellentemperatur (°C)</b>	120
<b>Derivatisierungsgasfluss (1/h) N<sub>2</sub></b>	800
<b>Konusgasfluss (1/h) N<sub>2</sub></b>	50
<b>Desolvatisierungstemperatur (°C)</b>	420
<b>Kollisionsgasdruck (bar) Ar</b>	$3.10 \times 10^{-3}$

Tabelle 3.21 Masse/Ladungsverhältnis (m/z) und Detektionsparameter der Precursor-Ionen und deren Produkt-Ionen von AzA, PIM und SEA

<b>Analyt</b>	<b>Precursor-Ion (m/z)</b>	<b>Produkt-Ion (m/z)</b>	<b>Konusspannung (V)</b>	<b>Kollisionsenergie (eV)</b>	<b>Retentionszeit (min)</b>
<b>AzA</b>	187	125	20	14	3.91
<b>PIM</b>	159	97	20	14	3.58
<b>SEA</b>	201	139	20	14	3.83

### 3.4.2 Ungerichtete Metabolomanalyse

Für die Extraktion der Metabolite von *Arabidopsis thaliana* Col-0, *ItpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen wurde frisches Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und 100 mg gefrorenes Material in ein 2 ml Schraubdeckelgefäß abgewogen.

Die Probe wurde mit 0,5 ml Isopropanol extrahiert. Zusätzlich wurde als Antioxidationsmittel 5 mg TPP und 0,5 mg BHT hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Probe für 5 min in das Ultraschallbad gestellt und anschließend 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde als interner Standard 50 ng MGDG-18:0-18:0 für eine mögliche Quantifizierung hinzugegeben. Nach weiteren 5 min im Ultraschallbad wurde die Probe zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT) und der Überstand in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Rotationsvakuumkonzentrator bei 40 °C zur Trockene eingengt. Das nach der Zentrifugation erhaltene Pellet wurde weiter mit 0,5 ml Chloroform/Isopropanol

(1:2, v/v) versetzt, gemischt und nach 5 min im Ultraschallbad zentrifugiert (10 min, 14000 rpm, RT). Eine dritte Extraktion erfolgte, indem das Pellet mit 0,5 ml Chloroform/Methanol (2:1, v/v) vermischt und nach 5 min im Ultraschallbad zentrifugiert wurde (10 min, 14000 rpm, RT). Der erhaltene Überstand wurde erneut in das 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit dem restlichen Überständen aus den beiden ersten Extraktionen vereint. Danach erfolgte das Einengen der Probe bis zur vollständigen Trockenheit. Der Rückstand wurde in 100 µl Isopropanol gelöst und nach 5 min im Ultraschallbad zentrifugiert (5 min, 12000 rpm, RT). Der Überstand wurde für die weitere Analyse in ein UPLC-Probengefäß überführt und bei -20 °C bis zur Messung mit dem UPLC-qTOF-MS gelagert.

Für die Analyse und Auftrennung der Metabolite wurde eine Acquity BEH C18 Säule (2,1 mm x 100 mm, 1,7 µm Partikelgröße) (Waters, Milford, MS, USA) verwendet. Die Lösungsmittel waren: A = 10 mM Ammoniumacetat in Wasser und Acetonitril (60:40, v/v) und B = 1 mM Ammoniumacetat in Isopropanol und Acetonitril (90:10, v/v). Die Gradienten-Elution wurde bei 60 °C Säulentemperatur und einer Flussrate von 300 µl/min durchgeführt. Dabei startete der Gradient mit 30 % Lösemittel B und erreichte nach 10 min 100 % Lösemittel B. Detektiert wurden die Metabolite mit einem *hybrid quadrupole orthogonal time-of-flight mass spectrometer* (qTOF-MS, SYNAPT G2 HDMS, Waters, Manchester, U.K.).

Dabei wurden Ionen durch negative/positive ESI erzeugt. In Tabelle 3.22 sind die qTOF-MS Parameter angegeben. Das System enthielt eine integrierte Lock Spray Einheit mit einem eigenen Referenzsprüher. Als interne Referenz wurde Leucin-Enkephalin ( $[M+H]^+$  = 556.2771 und  $[M-H]^-$  = 554.2615) verwendet. Für den Quadrupol wurde der offene RF-Mode ausgewählt und die Daten Akquisition erfolgte für einen Massenbereich von 50 - 1200 Da. Dabei wurden zwei unabhängige und aufeinander folgende Datenerfassungen automatisch erzeugt. Die erste erfasste die Niedrigenergie Daten der Molekulionen, die zweite Funktion erfasste die Fragmente der Molekulionen (Hochenergie Daten), die durch eine der Kollisionsenergie von 15 bis 35 eV erzeugt wurden. In beiden Fällen wurde Argon als Gas für den CID benutzt. Das Prozessieren der Chromatogramme, die Peakidentifizierung und -integration erfolgte automatisch durch die MassLynx Software (Version 4.1, Waters, Manchester, U.K.). Das Präprozessieren der Daten für die ungerichtete Metabolomanalyse der Niedrigenergie Daten wurde mit der Markerlynx Software und zusätzlicher statistischer „*principal component*“ Analyse durchgeführt (Waters Corporation, Milford, MA, USA). Die weitere Markeridentifizierung erfolgte in Excel 2007 (Microsoft, USA). Dabei erfolgte eine erste Einschränkung möglicher Metabolite durch die Voraussetzung, dass zwischen den normalisierten Flächenmittelwerten des Wildtyps/35S::LTPIV.4 und der *ltpIV.4* Mutanten ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) vorliegen muss. Im Weiteren wurden nur Metabolite herangezogen, welche diese Unterschiede in allen vier unabhängigen Analysen gezeigt hatten. Ein wichtiger Punkt für die

weitere Analyse war nicht nur die Übereinstimmung der gemessenen Metabolitmassen ( $\pm 0,005$ ), sondern auch die Übereinstimmung der Retentionszeiten ( $\pm 0,5$ ). Im Anschluss erfolgte die Analyse der Rohdaten der möglichen Metabolite für den Vergleich der nicht normalisierten Flächenunterschiede.

Tabelle 3.22 qTOF-MS Parameter

Ionisationsmodus	Negative/ Positive ESI
Kapillarspannung (kV)	0,8
Konusspannung (V)	25
Derivatisierungsgasfluss (l/h) N <sub>2</sub>	800
Konusgasfluss (l/h) N <sub>2</sub>	50
Desolvatisierungstemperatur (°C)	350

### 3.5 Statistische Auswertung

Die Unterschiede von Wildtyp und transgenen Pflanzen erfolgte statistisch mit Microsoft Excel 2007 (Microsoft, USA). Hierfür wurde der Student's t-Test unabhängiger Stichproben angewendet und das Signifikanzniveau wurde mit \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  oder \*\*\* für  $p < 0,001$  angegeben.

## 4 Ergebnisse

Die grundlegende Beteiligung von LTPs in der pflanzlichen Pathogenabwehr gilt im Allgemeinen als unbestritten. Um sich den zentralen Zielsetzungen dieser Arbeit anzunähern wurde anhand transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen die subzelluläre bzw. gewebespezifische Lokalisation von LTPIV.4 und AZI1 untersucht. Im Anschluss daran wurden mögliche phänotypische Unterschiede zwischen Wildtypen (WT) und transgenen Pflanzen in der Reaktion auf die Infektion mit verschiedenen biotischen Stressoren sowie deren Einordnung in verwundungs- bzw. abwehrspezifische Signalwege, in den Fokus der Betrachtung gerückt. Weiter wurden verschiedene Lipid-Bindungsmöglichkeiten durch LTPIV.4 *in vitro* beleuchtet. DIR1 als bereits weitgehend charakterisiertes LTP in Bezug auf die pflanzliche Pathogenabwehr wurde dabei zum Vergleich bzw. als Positivkontrolle herangezogen.

Zur Gewährleistung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurden die Versuche, außer die Klonierung, mindestens dreimal durchgeführt. Für die Präsentation in dieser Arbeit wurden die aussagekräftigsten Abbildungen ausgewählt.

### 4.1 Erzeugung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Aufgrund ihrer kurzen Reproduktionszeit und des vollständig entschlüsseltem Genoms gilt *Arabidopsis thaliana* als beliebter pflanzlicher Modellorganismus und wurde daher auch für diese Arbeit in Form von Wildtyp- als auch transgener Pflanzen herangezogen. Zur Generierung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurde zunächst mittels konventioneller Klonierung die genomische DNA- und die cDNA-Sequenz von LTPIV.4 und AZI1 aus WT-DNA gewonnen und in das pGEM-T easy Vektorsystem eingebaut. Um die Expression unter möglichst natürlichen Bedingungen darzustellen, wurde bei der Klonierung der genomischen DNA-Sequenz zusätzlich ein 558 bp langer Sequenzabschnitt als Promotorsequenz belassen (Anhang IV). Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die DNA-Abschnitte im weiteren mit dem GATEWAY™ Klonierungssystem über den Donorvektor (pDONR™201) in verschiedene Expressionsvektoren (Nakagawa et al., 2007) (Anhang III) eingebaut und anschließend in Bakterien (*E.coli TOP10*, *Agrobacterium tumefaciens C58C1*) eingeschleust.

Abbildung 4.1 zeigt exemplarisch die Überprüfung des korrekten Einbaus der cDNA Sequenzen von AZI1 und LTPIV.4 in den Expressionsvektor pGWB5. Für die Überprüfung wurde eine Colony Screen PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese von transformierten *E.coli TOP10* Bakterien durchgeführt.

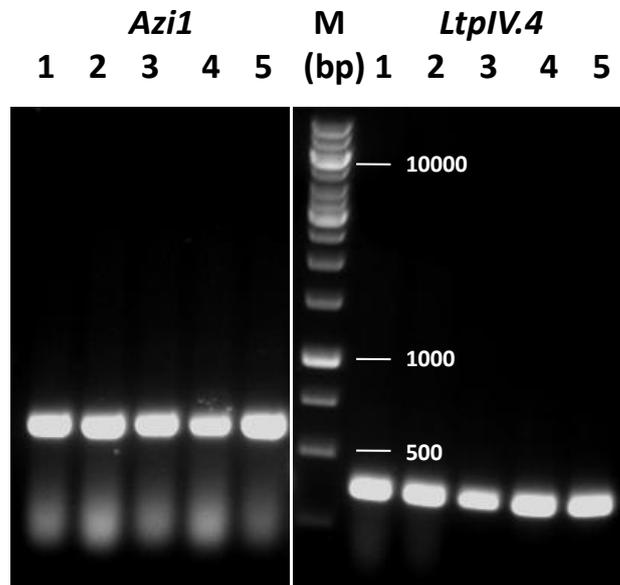


Abbildung 4.1 Gelbild des Colony Screen PCR-Ergebnisses erfolgreich transformierter *E.coli TOP10* Bakterien mit den kodierenden Sequenzen für *Azi1* und *LtpIV.4*, eingebaut in den Expressionsvektor pGWB5.

Mit dem spezifischen Primerpaar (Kapitel 3.2.1) für *Azi1* wird eine Bande mit einer Produktlänge von 543 bp erwartet, was auch in *Azi1* 1-5 zu erkennen ist. Auch für die *LtpIV.4* Proben zeigen sich die typischen Banden bei der erwarteten Produktlänge von 384 bp.

Als Ausgangspunkt für die weiteren Studien konnten insgesamt je 9 Expressionskassetten für LTPIV.4 und AZI1 erzeugt werden, welche mittels Agrobakterientransformation in *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen eingebaut wurden. Für die weitere experimentelle Verwendung wurden die erzeugten, transgenen Pflanzen und deren Nachkommen mittels DNA-Isolation und PCR auf Homozygotie getestet und selektiert.

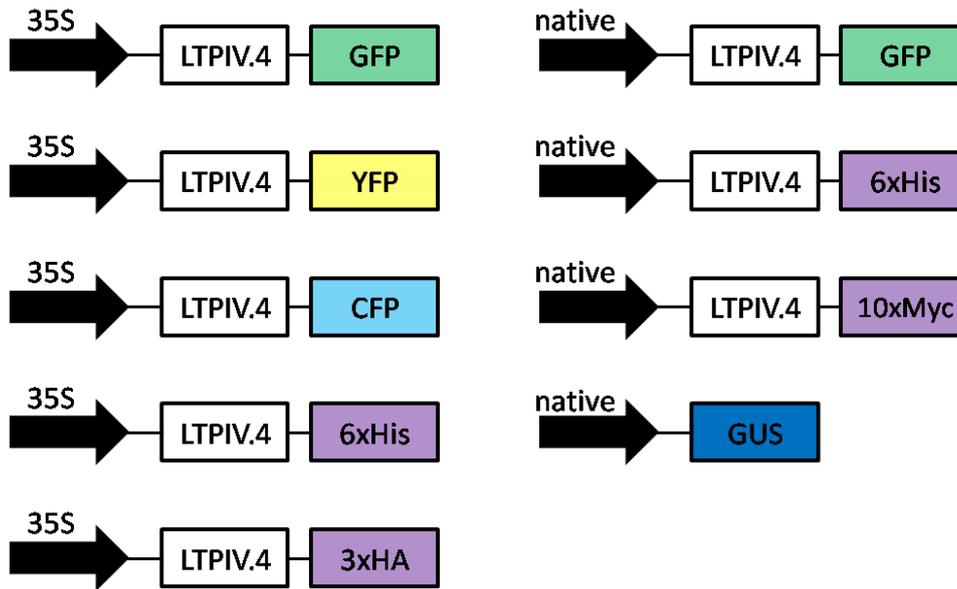


Abbildung 4.2 Erzeugte Expressionskassetten von LTPIV.4 und AZI1 für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* WT Pflanzen. Exemplarisch sind nur die Expressionskassetten mit LTPIV.4 gezeigt.

In Abbildung 4.2 werden alle erzeugten Expressionskassetten, die in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 Bakterien transformiert wurden, dargestellt. Die transgenen Pflanzen mit der 35S::LTPIV.4-6xHis Expressionskassette werden in der folgenden Arbeit immer mit 35S::LTPIV.4 beschrieben.

## 4.2 Lokalisation von LTPIV.4

Zur exakten Lokalisation von LTPIV.4 in Pflanzen liegen derzeit keine wissenschaftlichen Erkenntnisse vor. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die subzelluläre und gewebespezifische Lokalisation in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen nachgewiesen werden.

### 4.2.1 Subzelluläre Lokalisation

Zur genaueren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von LTPIV.4 wurden ca. 3 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Die transiente Transformation der *Arabidopsis* Blätter erfolgte, wie in Kapitel 3.3.11 näher beschrieben, mit einem 35S::LTPIV.4-GFP Expressionsvektor (pGWB5). Als Markerprotein für die Lokalisation im Zytoplasma und im Zellkern wurde das Fluoreszenzprotein mCherry (rote Fluoreszenz) benutzt. Die anschließende Detektion der

Proteinexpression erfolgte nach einer 24 stündigen Inkubationszeit mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops.

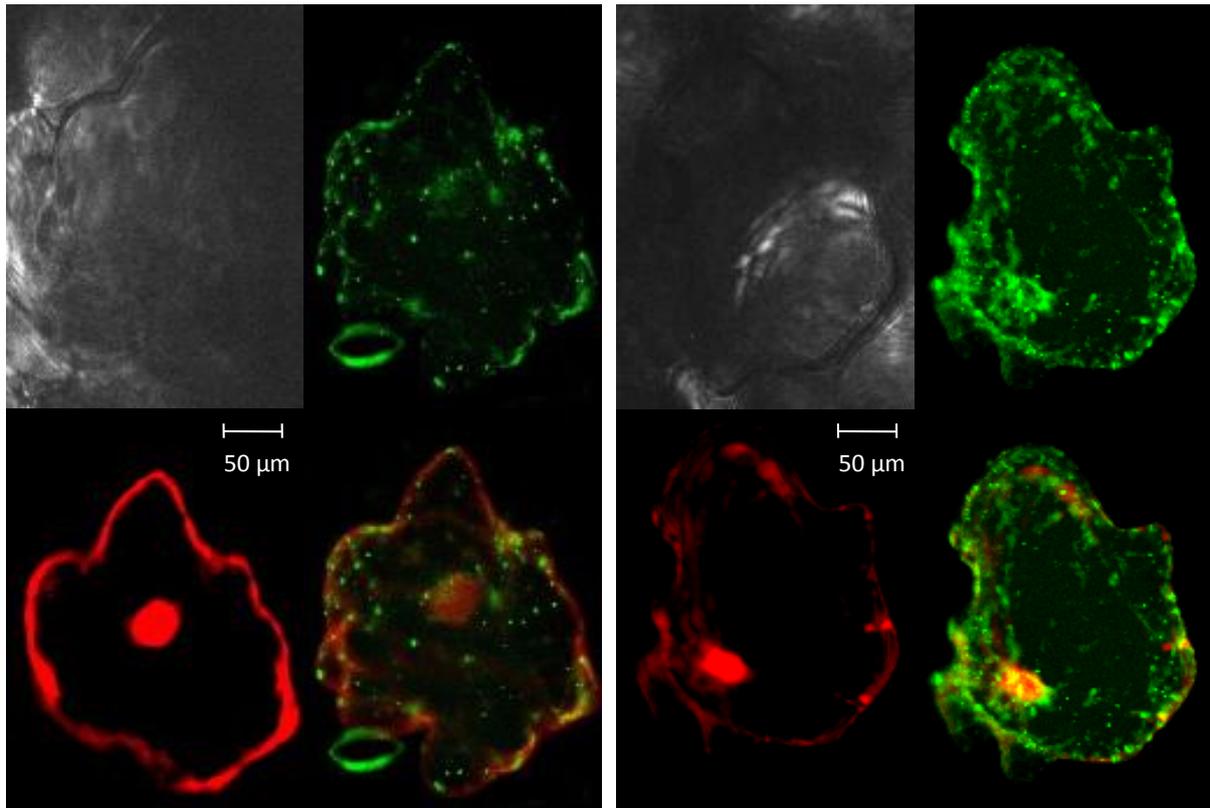


Abbildung 4.3 Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzsignale von LTPIV.4-GFP (grün) und mCherry (rot) einer Epidermiszelle in 3 Wochen alten, mittels Genkanone transient transformierten *Arabidopsis thaliana* Blättern (Blattunterseite). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH) gemacht.

Der Vergleich beider in Abbildung 4.3 dargestellten Zellen zeigt keine Co-Lokalisation der GFP-Fluoreszenz von LTPIV.4-GFP mit der roten Fluoreszenz des mCherry Proteins. Das rote Fluoreszenzsignal ist deutlich im Zellkern und im Zytoplasma zu erkennen. Wird dieses mit dem GFP Signal überlagert, ergibt sich ein starkes GFP Signal um den Zellkern herum, was auf eine Lokalisation im ER schließen lässt. Weiterhin sind konzentrierte Bereiche der GFP Fluoreszenz im Zytoplasma und an der inneren Seite der Plasmamembran zu erkennen. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass LTPIV.4, wie auch andere LTPs, durch sein N-terminales Signalpeptid in das ER transportiert werden könnte. Von dort könnte es durch das Golgi-Netzwerk an die Plasmamembran gelangen und dort in den apoplastischen Raum sekretiert werden.

#### 4.2.2 Gewebespezifische Lokalisation

Um die gewebespezifische Aktivität der *LTPIV.4* Expression zu bestimmen, wurde ein histochemischer GUS-Nachweis durchgeführt. Dabei wurde die Sequenz von -558 bp bis 1 bp vor der *LtpIV.4* kodierenden Gensequenz (Anhang IV) mit der GUS-kodierenden DNA-Sequenz gekoppelt und mittels Agrobakterien in *Arabidopsis thaliana* Col-0 Pflanzen transformiert. Anhand dieser homozygoten, transgenen Nachkommen konnte die gewebespezifische Promotoraktivität detektiert werden.

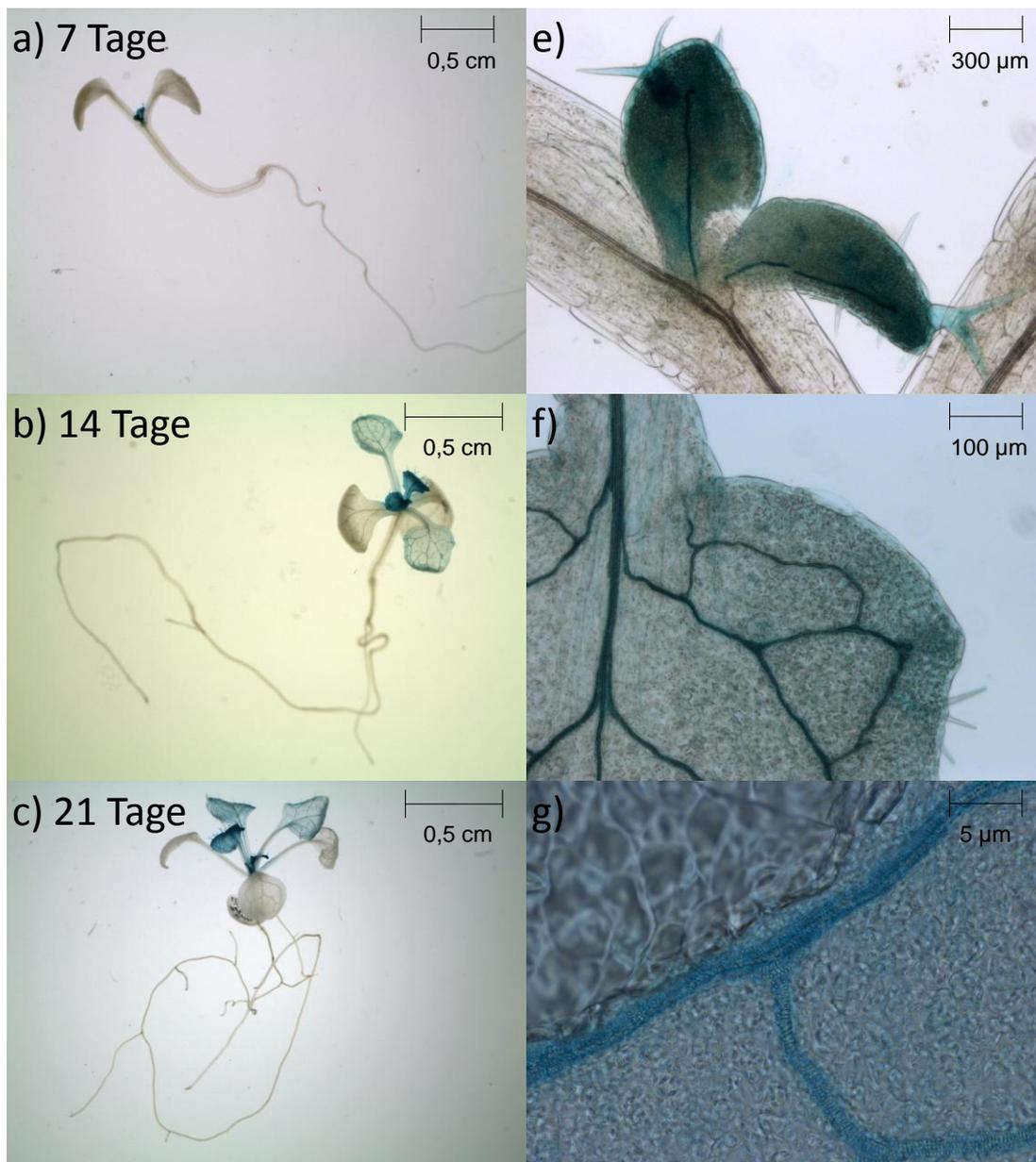


Abbildung 4.4 Dargestellt ist die GUS-Expression (blau) in 1 (a), 2 (b) bzw. 3 (c) Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. e)-f) zeigt die mikroskopische Vergrößerung GUS-exprimierender Blätter und eine Lokalisation in unmittelbarer Nähe des Leitgewebes.

In Abbildung 4.4 a)-c) sind transgene *Arabidopsis thaliana* Keimlinge dargestellt, welche homozygot auf die T-DNA Insertion des *nativerPromotor::LTPIV.4-GUS* Konstrukts sind. Die *LtpIV.4* Promotoraktivität ist dabei jeweils in den jüngeren Blättern aktiv (erkennbar an der Blaufärbung des Gewebes in Abbildung 4.4), während die Aktivität mit zunehmendem Alter der Blätter stark abnimmt, bis diese letztendlich nicht mehr detektierbar ist. Unter 40 facher Vergrößerung der Blätter 3 und 4 aus a) wird in Grafik d) eine starke Promotoraktivität vor allem in unmittelbarer Nähe des Leitgewebes, also dem Xylem und Phloem, deutlich. In den Grafiken f) und g) wird diese These durch eine 60 fache Vergrößerung nochmals bestätigt. Die Blaufärbung weist auch hier auf eine Lokalisation in der Nähe des Leitgewebes, möglicherweise in den Begleitzellen des Phloems, hin.

### 4.3 Selektion einer homozygoten T-DNA Insertions Mutante von LTPIV.4

Um die Aufklärung der spezifischen Funktion eines Proteins zu präzisieren, werden meist transgene Pflanzen herangezogen, welche einen Defekt im entsprechenden, kodierenden Gen haben. Im Zuge dieser Arbeit wurden für LTPIV.4 zwei SALK-T-DNA-Linien (SALK\_074488, SALK\_109557) bezogen und auf ihre Insertion hin überprüft. Hierfür wurden die *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben kultiviert und mittels PCR auf die T-DNA Insertion getestet. Zur späteren phänotypischen und funktionellen Charakterisierung wurden nur homozygote Mutanten der SALK\_074488 T-DNA Insertionslinie herangezogen.

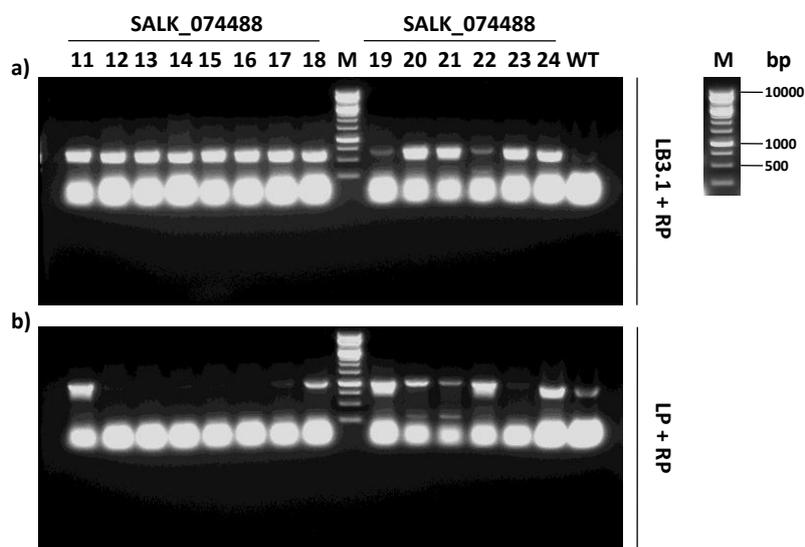


Abbildung 4.5 Gelbild des PCR-Ergebnisses eines T-DNA-Screenings. Neben der Kontrolle (WT-DNA) wurden 14 SALK\_074488 Nachkommen auf deren Homozygotie hin überprüft. a) LB3.1 + RP-Primerpaar zum Nachweis der T-DNA Insertion. b) LP + RP-Primerpaar zum Nachweis des WT-Gens. M: Marker; WT: Wildtyp; 11-24: Nachkommen der SALK\_074488; LP: linker Primer; LB3.1: left-border Primer; RP: rechter Primer.

Abbildung 4.5 zeigt die Überprüfung der *Arabidopsis* SALK\_074488 Linie mit deren spezifischen Primerpaaren (Kapitel 3.2.1). Eine Bande, wie sie im WT bei ca. 1099 bp erwartet wird, ist neben der tatsächlichen WT-Probe auch in den SALK\_074488 Pflanzenproben 11, 17-22, 24 deutlich erkennbar. Für die T-DNA Insertion wird eine Bande bei ca. 600 bis 900 bp erwartet. Während in allen SALK\_074488 Nachkommen eine Bande bei dieser Höhe detektierbar ist, findet sich diese bei der WT Linie nicht. Aufgrund der Primerspezifität lässt sich somit abschließend festhalten, dass die Pflanzen 11, 17-22 und 24 heterozygot und die Linien 12-16 und 23 homozygot für die Insertion sind. Aus den anhand dieser Methodik selektierten positiv homozygoten Linien 12-16 und 23 wurden Samen gewonnen und Nachkommen herangezogen. Diese wurden erneut mit den entsprechenden Primern auf Homozygotie überprüft. Für die weiteren Experimente wurden ausschließlich homozygote Samen der Linie 16 verwendet. Die T-DNA Insertionsmutante wird im weiteren Verlauf als *ltpIV.4* benannt.

#### 4.4 Expressionsanalyse der *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Mutanten

Vor der Durchführung weiterer Versuche wurde der erwünschte Phänotyp der erzeugten Mutanten *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 im Vergleich zum WT nochmals anhand des basalen Expressionsmusters überprüft. Dabei erfolgte die Quantifizierung der Genexpression immer relativ zu *Aktin 2/8*, einem Gen welches im Spross konstitutiv exprimiert wird.

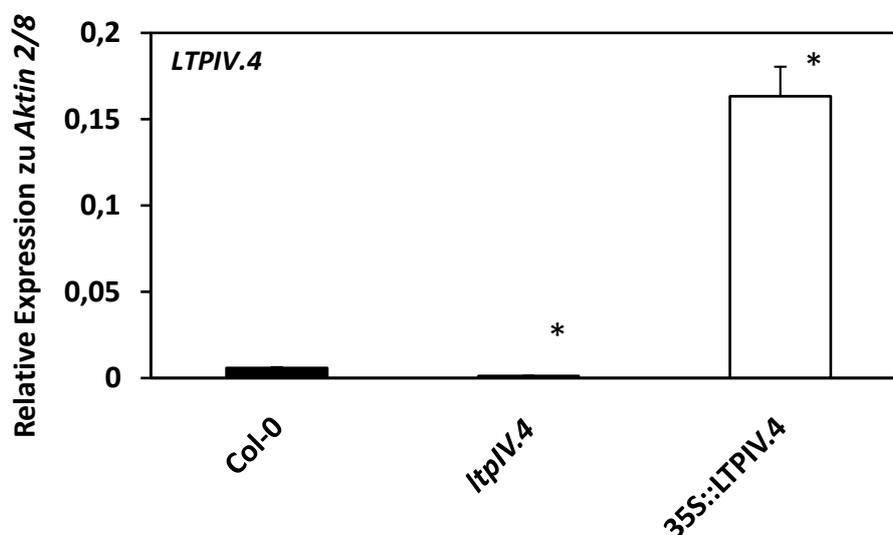


Abbildung 4.6 Relative Expression von *LTPIV.4* zu *Aktin 2/8* im *Arabidopsis thaliana* WT und den *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Mutanten (MW + SE, n = 4; \* p < 0,05, Student's t-test)

Die relative Genexpression von *LTPIV.4* zu *Aktin 2/8* beträgt basal in *Arabidopsis* WT Pflanzen 0,005. Wie in Abbildung 4.6 dargestellt, ist die relative Genexpression in der 35S::*LTPIV.4* Mutante 28 fach höher als die Expression im WT. Im Gegensatz dazu zeigt *ltpIV.4* gegenüber dem WT eine 5 fache Reduktion der Transkriptlevel. Demnach zeigt sich in 35S::*LTPIV.4* Pflanzen die erwartete Überexpression, ebenso wie eine reduzierte Expression in *ltpIV.4*. Die durch vorangegangene Prozesse erzeugten Mutanten und deren Nachkommen konnten daher für weitere Experimente herangezogen werden.

#### **4.5 Analyse der Immunantwort in *Arabidopsis Col-0*, *ltpIV.4* und 35S::*LTPIV.4* Pflanzen nach der Infektion mit verschiedenen Pathogenen**

Aus der Zielsetzung dieser Arbeit resultiert die zentrale Fragestellung, ob die mittels basaler Expressionsanalyse nachgewiesenen, unterschiedlichen *LTPIV.4* Transkriptlevel auch zu einem differentiellen Phänotyp nach Infektion mit Pathogenen führen. Dazu wurden die zwei erzeugten transgenen Pflanzenlinien, als auch der WT (*Col-0*) mit verschiedenen Pathogenen infiziert.

##### **4.5.1 Infektion von WT, *ltpIV.4* und 35S::*LTPIV.4* Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola***

Zunächst wurde die Reaktion der differentiellen *Arabidopsis* Phänotypen auf die Infektion mit virulenten (*vir*) *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) Bakterien betrachtet. Dazu wurden die Blattober- und -unterseiten 4-5 Wochen alter Rosettenblätter der Pflanzen gleichmäßig mit einer Bakteriensuspension ( $1 \times 10^8$  Kolonie bildende Einheiten pro ml) besprüht. Die Ernte der Blätter erfolgte nach 3 und 48 Stunden. Die Besiedlungsdichte der Bakterien in den Pflanzen wurde in „colony forming units“ (cfu) pro  $\text{cm}^2$  Blattfläche bestimmt. Um die Bakterienzahl zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe der geernteten Blattsuspension erstellt und nach zwei Tagen ausgewertet. Die erste Ernte nach 3 stündiger Inkubationszeit erfolgte mit der Intention auszuschließen, dass die untersuchten Pflanzen möglicherweise bereits vor der Bakterienbehandlung mit Pseudomonaden infiziert oder geprimt waren. Zudem konnte so festgestellt werden, wie effizient die Bakterien aufgenommen wurden und ob es Unterschiede zwischen den Genotypen gab.

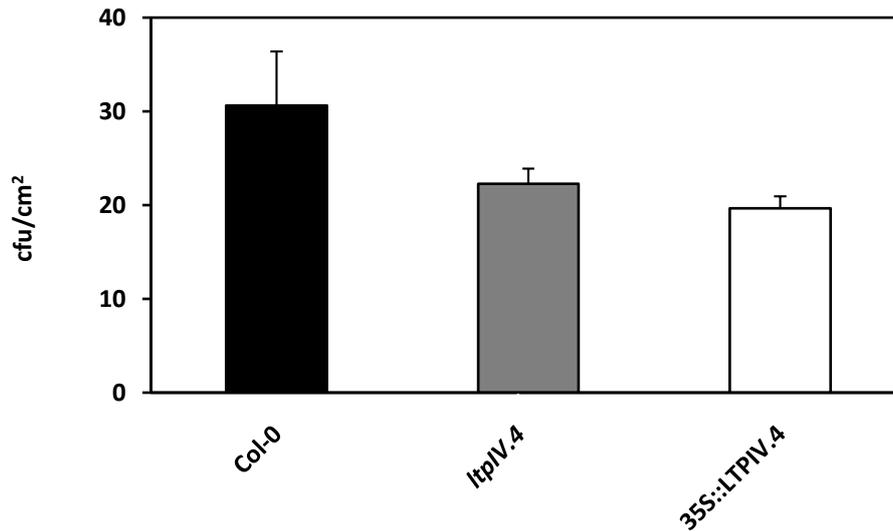


Abbildung 4.7 Besiedlungsdichte in cfu („colony forming units“) pro cm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WT's und der Mutanten *ltpIV.4* und *35S::LTPIV.4*. Die Blattrosetten wurden mit vir *Psm* (OD = 0,1) besprüht und nach 3 Stunden die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8)

Die Blattproben in Abbildung 4.7 zeigen nach 3 Stunden beim Vergleich des WT's mit *ltpIV.4* und *35S::LTPIV.4* keinen Unterschied in der Besiedelungsdichte. Die verwendeten Versuchspflanzen waren demnach vorher nicht gestresst oder mit anderen Pathogenen infiziert und konnten für den 48 Stunden Wert herangezogen werden.

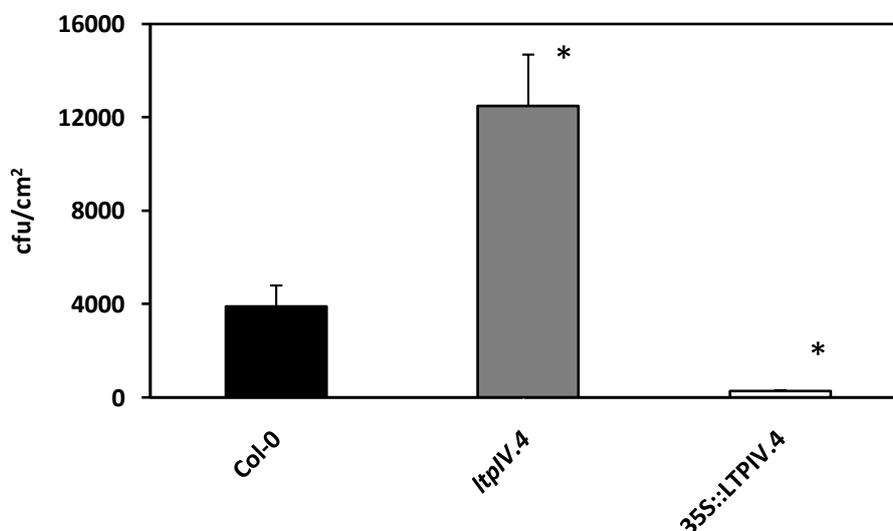


Abbildung 4.8 Besiedlungsdichte in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WT's und der Mutanten *ltpIV.4* und *35S::LTPIV.4*. Die Blattrosetten wurden mit vir *Psm* (OD = 0,1) besprüht und nach 48 Stunden die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8, \* p < 0,05, Student's t-test)

Im Vergleich zum WT ist die Bakterienzahl 48 Stunden nach Infektion in *ItpIV.4* um das 3,2 fache signifikant erhöht, während diese in 35S::LTPIV.4 eine signifikante Erniedrigung um das 14,1 fache aufweist. In der Relation zur Knockout Mutante ist die Bakterienzahl der konstitutiv exprimierenden Mutante somit um das 45,3 fache niedriger. Diese Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass *ItpIV.4* suszeptibler gegenüber der lokalen Infektion mit vir *Psm* Bakterien ist. Im Gegensatz dazu zeigt die 35S::LTPIV.4 Mutante eine erhöhte Resistenz. Weiterhin weist auch eine zweite T-DNA Insertionslinie (SALK\_109557) einen suszeptibleren Phänotyp nach *Pseudomonas*-Behandlung auf (Anhang VI).

#### 4.5.2 Infektion von WT und *ItpIV.4* Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Mittels Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit vir *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) sollte weiter aufgezeigt werden, ob es möglich ist, ähnliche Effekte wie in Kapitel 4.5.1 durch ein anderes Pathovar generieren zu können. Zu diesem Zwecke wurden, wie in Kapitel 3.1.6.2 beschrieben, Rosettenblätter von ca. 4-5 Wochen alten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit der entsprechenden *Pseudomonas*-Suspension ( $1 \times 10^8$  Kolonie bildende Einheiten pro ml) besprüht. Im Gegensatz zum vorangegangenen Versuch wurden jedoch nur der WT und die *ItpIV.4* Mutanten infiziert. Die Ernte der Blätter erfolgte auch hier nach 3 stündiger Inkubationszeit als Kontrolle sowie 48 Stunden nach der Infektion. Die Besiedlungsdichte der Bakterien wurde in den Pflanzen in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche bestimmt. Um die Bakterienzahl zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe der geernteten Blattsuspension erstellt und nach zwei Tagen ausgewertet.

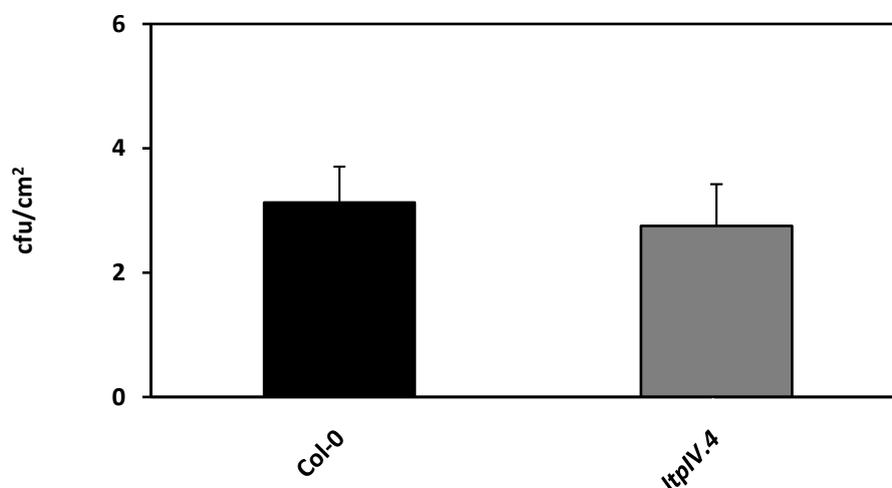


Abbildung 4.9 Besiedlungsdichte in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WTs und der *ItpIV.4* Mutante. Die Blattrosetten wurden mit vir *Pst* (OD = 0,1) besprüht und nach 3 Stunden die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8)

Drei Stunden nach der Infektion zeigen die Blattproben des WTs im Vergleich mit der *ltpIV.4* Mutante keine Unterschiede in der Besiedlungsdichte (Abbildung 4.9). Auch in diesem Versuch finden sich daher keine Hinweise auf im Vorfeld vorhandene Stressoren oder Pathogene an bzw. in den Versuchspflanzen.

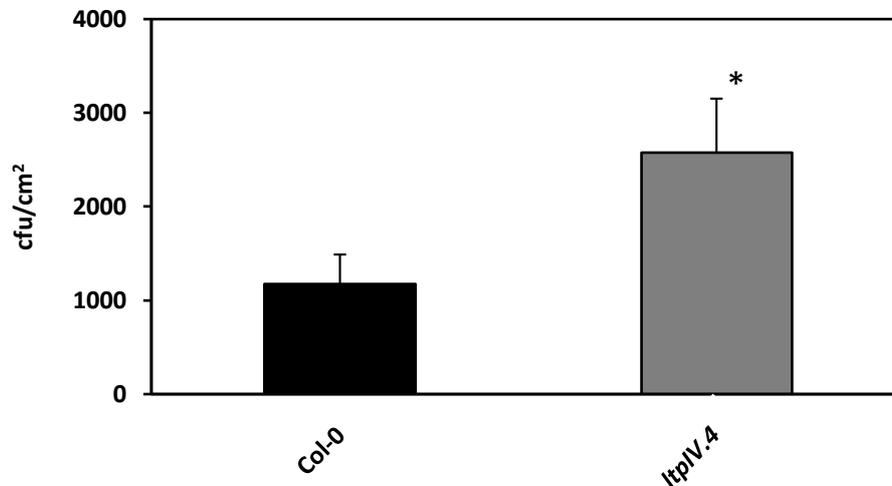


Abbildung 4.10 Besiedlungsdichte in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WTs und der *ltpIV.4* Mutante. Die Blattrosetten wurden mit vir *Pst* (OD = 0,1) besprüht und nach 48 Stunden die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8, \* p < 0,05, Student's t-test)

Abbildung 4.10 zeigt die ausgezählten Bakterienkolonien 48 Stunden nach der Sprühinfektion mit vir *Pst*. Die in der *ltpIV.4* Mutante gewachsene Bakterienzahl ist im Vergleich zum WT signifikant um das 1,9 fache höher. Auch anhand dieses Versuchs konnte eine erhöhte Anfälligkeit der *ltpIV.4* Mutante gegenüber vir *Pst* bestätigt werden.

#### 4.5.3 Infektion von WT und *ltpIV.4* Pflanzen mit *Sclerotinia sclerotiorum*

Um sich der Funktion von LTPIV.4 in der pflanzlichen Pathogenabwehr und damit verbundenen Signalwegen weiter anzunähern, wurde auch eine Infektion mit einem nekrotrophen Pathogen durchgeführt. Dazu wurden 4-5 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Rosettenblätter, wie in Kapitel 3.1.6.3 beschrieben mit dem nekrotrophen Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* infiziert. Nach 2 Tagen Inkubationszeit wurden die Läsionsgrößen auf den Blättern mit einer Schieblehre ausgemessen.

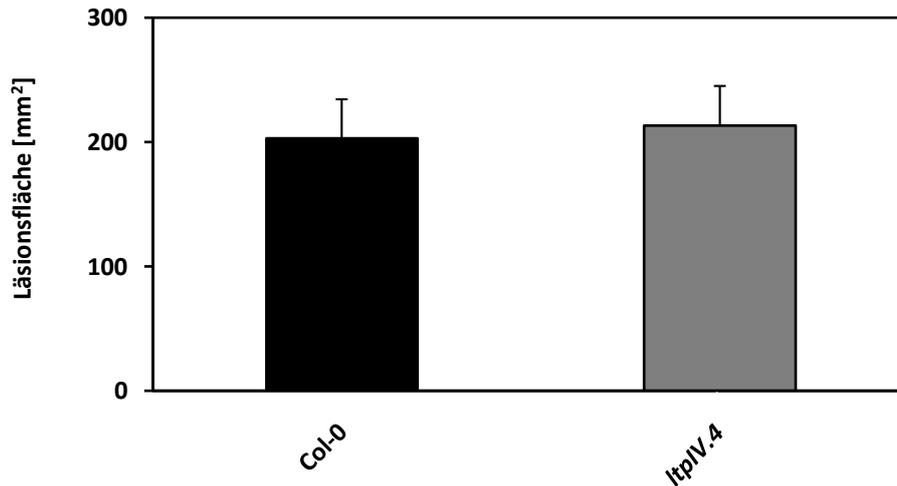


Abbildung 4.11 Läsionsfläche in mm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WT und der *ltpIV.4* Mutante. Auf die Blätter wurden Hyphen besiedelte Agarblöcke von *Sclerotinia sclerotiorum* gesetzt und nach 48 Stunden die Läsionsflächen ermittelt. (MW + SE, n = 12)

Abbildung 4.11 zeigt den Vergleich der gemessenen Läsionsflächen des Pilzes auf WT und *ltpIV.4* Pflanzen, welche keine signifikanten Unterschiede aufweisen. Auch nach dreimaliger Reproduktion des Versuchs konnten keine nennenswerten Unterschiede der Läsionsgrößen festgestellt werden. LTPIV.4 scheint daher bei der pflanzlichen Immunabwehr gegen *Sclerotinia sclerotiorum* keine wesentliche Rolle zu spielen.

#### 4.6 Analyse der Phytohormonlevel von WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir *Psm*

Wie bereits mehrfach nachgewiesen werden konnte, induzieren vir *Psm* Bakterien während der Infiltration von *Arabidopsis thaliana* den Salicylsäuresignalweg (Dong, 1998). Weiterhin gilt die wichtige Funktion von SA für die Ausbildung der lokalen Bakterienabwehr als unbestritten (Dong, 1998). Nachdem in den vorherigen Experimenten dieser Arbeit unterschiedliche Phänotypen nach der Infektion mit vir *Psm* nachgewiesen werden konnten, soll im Weiteren untersucht werden, in welchem Signaltransduktionsweg LTPIV.4 fungiert und inwieweit dies für die Ausbildung der differentiellen Resistenzen verantwortlich ist.

Dazu wurden die Rosettenblätter von 4 Wochen alten *Arabidopsis* WT Pflanzen, *ItpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Mutanten mit vir *Psm* (OD = 0,1) besprüht und die Phytohormongehalte an SA, JA, JA-Ile, OPDA, dnOPDA und ABA zum Zeitpunkt 0 und nach 3, 6, 12, 24 bzw. 48 Stunden analysiert (Kapitel 3.4.1).

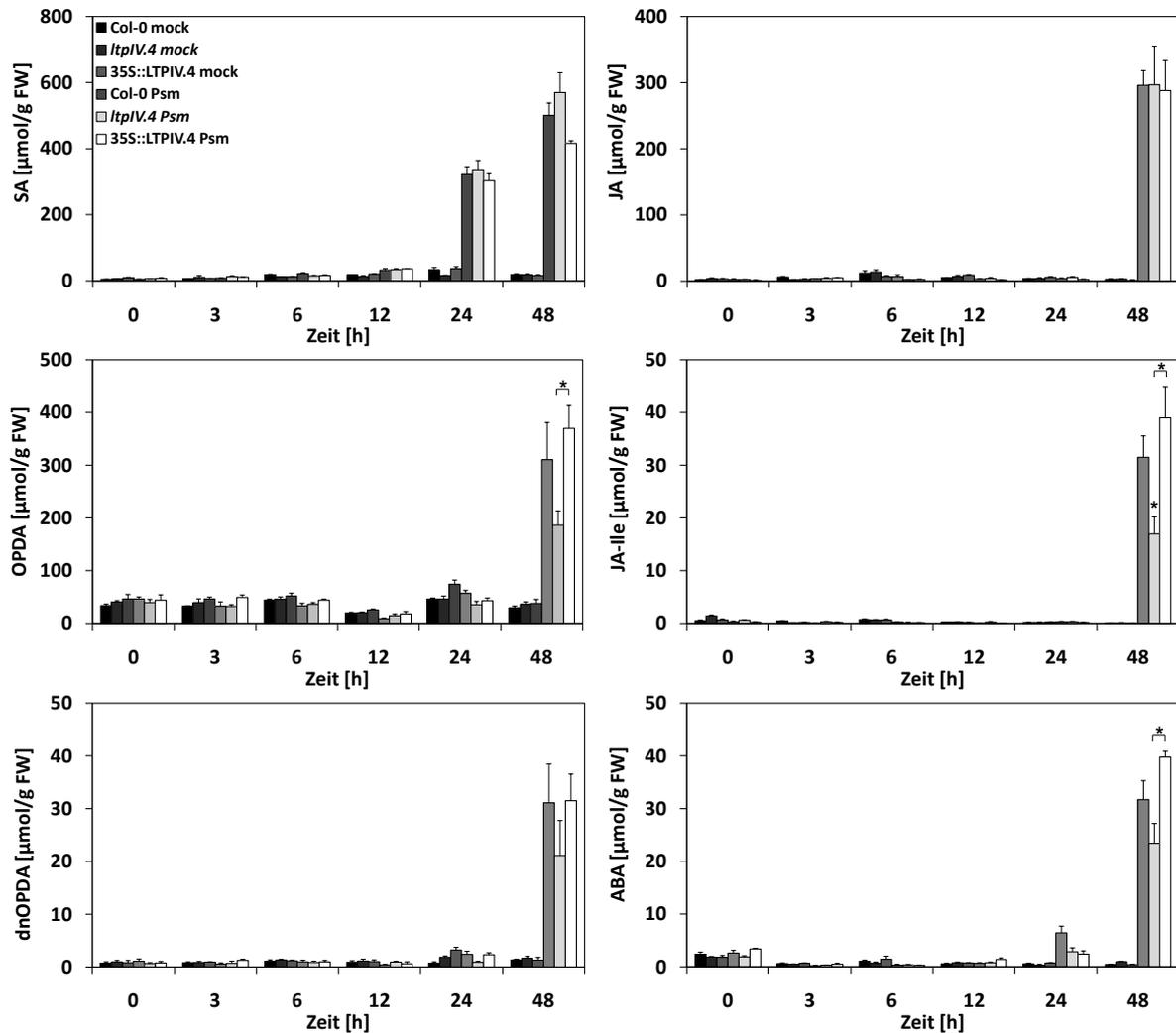


Abbildung 4.12 Phytohormon-Analyse in *Arabidopsis* Blättern von WT, *ItpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Mutanten nach Pseudomonadeninfektion (OD = 0,1) Die Gehalte an OPDA, dnOPDA, JA, JA-Ile, SA und ABA wurden 0, 3, 6, 12, 24, 48 Stunden nach Bakterieninfektion analysiert (MW + SE, n = 4; \* p < 0,05, Student's t-test)

Besonders auffällig in Abbildung 4.12 ist der prägnante Anstieg (300 µmol/g FW) von SA 24 Stunden nach der Sprühinfektion. Dem entgegen ist ein deutlicher Anstieg aller anderen Phytohormone erst nach 48 Stunden detektierbar. Beim Vergleich des WT mit den transgenen Linien ergibt sich für die Gehalte an SA kein signifikanter Unterschied. Die Level erreichen in allen drei Phänotypen nach 24 Stunden Werte von ca. 300 µmol/g FW und nach 48 Stunden von 420 bis 570 µmol/g FW. Auch für JA zeigen sich beim Vergleich der drei Phänotypen keine unterschiedlichen Hormongehalte, auch

48 Stunden nach der Infektion betragen die Werte fast 300  $\mu\text{mol/g}$  FW. Ein deutlicher Unterschied wird beim Vergleich der OPDA, dnOPDA, JA-Ile und ABA-Gehalte 48 Stunden nach Infektion ersichtlich. Hierbei besitzt die *ltpIV.4* Mutante um 1/3 niedrigere Hormonspiegel als der WT oder die 35S::LTPIV.4 Mutante. Ein signifikanter Unterschied zeigt sich dabei sowohl bei den OPDA-Gehalten, als auch bei den ABA-Gehalten zwischen der *ltpIV.4* und der 35S::LTPIV.4 Mutante. Bei JA-Ile ist der Gehaltsunterschied sowohl zwischen WT und *ltpIV.4* signifikant, wie auch zwischen *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4. Die vorangegangene Analyse der Phytohormonspiegel nach der Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit Pseudomonaden zeigt vor allem in der Induktion von SA einige interessante Aspekte. So konnte eine frühere Induktion von SA (nach 24 Stunden) im Vergleich zu den anderen Phytohormonen (erst nach 48 Stunden) detektiert werden. Dabei zeigen sich keine Unterschiede in den SA-Gehalten zwischen den verschiedenen Phänotypen. Es ist somit davon auszugehen, dass die Funktion von LTPIV.4 im SA-Signalweg nach der Induktion von SA einzuordnen ist.

#### **4.7 Expressionsmuster von *LTPIV.4* und verschiedener Markergene in WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir *Psm***

Für eine genauere zeitliche Einordnung von LTPIV.4 und dessen Auswirkung in/auf abwehrassoziierte Signalwege wurden zusätzlich in WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen die Genexpression von *LTPIV.4* und bekannter Markergene nach der Infektion mit vir *Psm* betrachtet.

##### **4.7.1 Relative Genexpression von *LTPIV.4***

Wie in den vorangegangenen Versuchsreihen wurden Rosettenblätter der zwei erzeugten Mutanten sowie des WTs durch Besprühen infiziert. Für diesen Versuch wurde vir *Psm* Bakterien verwendet. Nach Inkubationszeiten von 0, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden wurden die Blätter geerntet und mittel qRT-PCR die relative Expression von *LTPIV.4* in Bezug auf *Aktin 2/8* bestimmt.

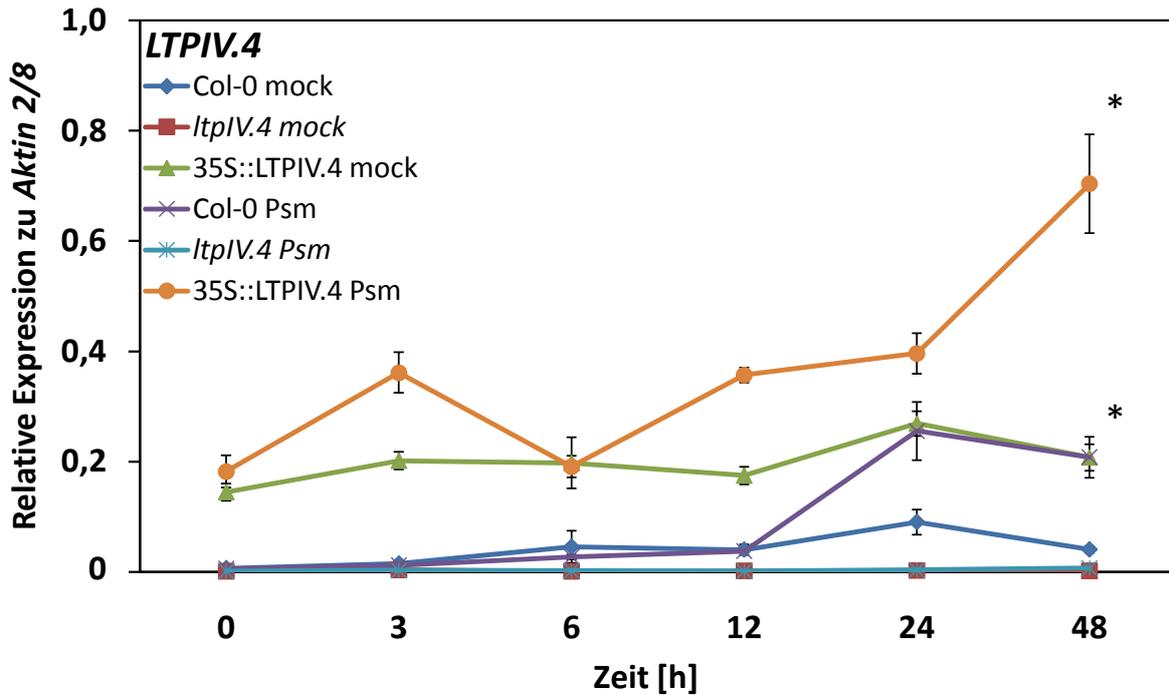


Abbildung 4.13 *LTPIV.4* Expression in Arabidopsis WT, *ltpIV.4* und 35S::*LTPIV.4* Pflanzen nach der Sprühinfektion mit vir *Psm* (OD = 0,1). Die relative Genexpression zu *Aktin 2/8* wurde 0, 3, 6, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion mittels qRT-PCR analysiert. (MW  $\pm$  SE, n = 4; \* p < 0,05, Student's t-test)

Die relative Genexpression von *LTPIV.4* im WT steigt, wie in Abbildung 4.13 dargestellt, zwischen 12 und 24 Stunden nach Infektion um das 2,83 fache an und bleibt auch nach 48 Stunden auf einem konstanten Level von 0,2. Dem hingegen zeigt die *ltpIV.4* Mutante auch nach der Induktion durch die Infektion mit *Pseudomonas* keine erhöhten Transskriptlevel im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Die 35S::*LTPIV.4* Mutante besitzt relativ zu *Aktin 2/8* basale Expressionslevel von ca. 0,2. Ein Anstieg der Transkriptlevel nach der Pathogeninfektion zeigt sich auch hier zwischen 12 und 24 Stunden um das 2 fache auf 0,4 und ebenso einen weiteren starken Anstieg nach 48 stündiger Inkubationszeit um das 2 fache auf 0,7. Die *LTPIV.4* Genexpression im WT erreicht durch die Infektion lediglich ein relatives Transkriptlevel, welches bei der 35S::*LTPIV.4* Mutante bereits basal vorliegt (ca. 0,2) und im Zuge einer Infektion nochmals um das 2,5 fache erhöht wird. Damit unterscheiden sich die Transkriptlevel beider transgenen Linien 24 bzw. 48 Stunden nach Infektion signifikant zum WT. Anhand dieses Versuchs konnte im WT eine Induktion der *LTPIV.4* Genexpression angeregt werden, welche in den konstitutiv exprimierenden Pflanzen noch signifikanter deutlich ist. In der *ltpIV.4* Mutante hingegen konnte keine entsprechende Induktion festgestellt werden. Dies bestätigt erneut, dass es sich hierbei um einen funktionellen Knockout handelt. Die vermutete tragende Rolle von *LTPIV.4* insbesondere in der Abwehr von biotrophen Pathogenen wird anhand dieser Ergebnisse weiter untermauert.

#### 4.7.2 Relative Genexpression verschiedener Markergene

Um weiter zu Überprüfen, ob *LTPIV.4* eine Funktion in einem abwehrassozierten Signaltransduktionsweg hat, wurde die Expression von Markergenen für die SA- und JA-spezifischen Phytohormonsignalwege analysiert. Für den SA-Signalweg wurde die spezifische Markergenexpression von *PR1*, *SID2* und *CBP60g* und für den JA-Signalweg von *PDF1.2*, *VSP2* und *LOX2* betrachtet. Für die Expressionsanalyse dieser Gene wurde dieselbe cDNA und Methodik wie in Kapitel 4.7.1 verwendet.

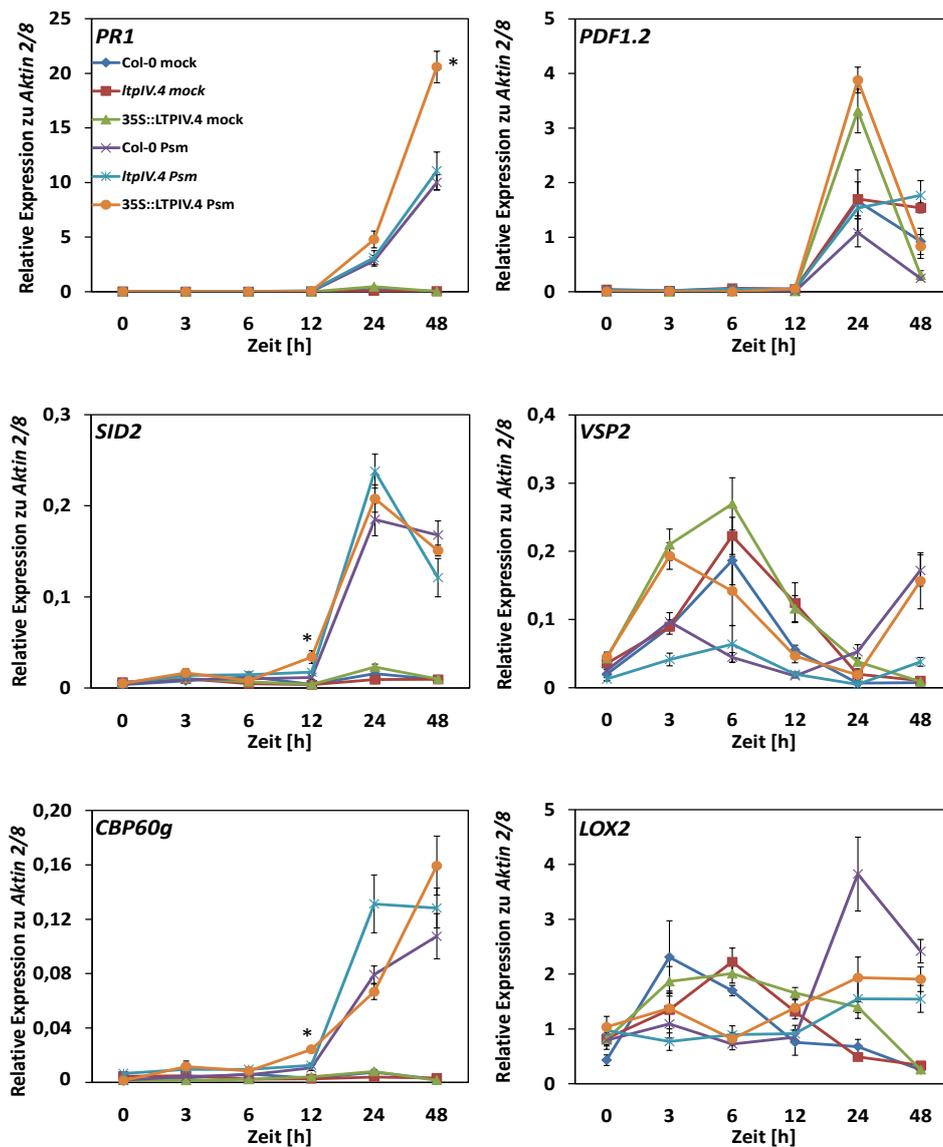


Abbildung 4.14 *PR1*, *SID2*, *CBP60g*, *PDF1.2*, *VSP2*, *LOX2* Expression in *Arabidopsis* WT, *ltpiv.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir *Psm*. Die relative Genexpression zu Aktin 2/8 wurde 0, 3, 6, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion mittels qRT-PCR analysiert. Auf einen signifikanten Unterschied getestet wurden vor allem die Transkriptlevel von *PR1*, *SID2* und *CBP60g* in der 35S::LTPIV.4 Mutante im Vergleich zu den WT- bzw. *ltpiv.4* Mutantenleveln nach der Pseudomonasinfektion (MW  $\pm$  SE, n = 4; \* p < 0,05, Student's t-test)

Die JA-spezifischen Markergene *LOX2* und *VSP2* in Abbildung 4.14 zeigen über den ganzen analysierten Zeitraum keine eindeutige, behandlungsspezifische Genexpressionsunterschiede. Einzig nach 48 Stunden ist bei *VSP2* ein Unterschied zwischen der *ltpIV.4* Mutante und den beiden anderen Phänotypen ersichtlich. Der Überexprimierer und der WT zeigen hierbei eine 4-fach erhöhte relative Expression im Gegensatz zur Knockout Mutante. Bei *PDF1.2* ist ein deutlicher Anstieg der relativen Genexpression 12 Stunden nach Infektion zu erkennen. Dabei weisen die entsprechenden Phänotypen, sowohl die mit Puffer als auch mit Bakterien behandelten, denselben Verlauf auf. Wobei die stärkste Induktion in der 35S::LTPIV.4 Mutante nach 24 Stunden ersichtlich ist. Wie in Abbildung 4.14 zu erkennen ist, ergibt sich für alle SA-Markergene nach 12-stündiger Inkubationszeit eine deutliche Expressionsinduktion. Im Gegensatz zur Überexpressionsmutante weisen die beiden anderen Phänotypen 12 Stunden nach der Infektion eine signifikant geringere Genexpression von *CBP60g* und *SID2* auf. Die Induktion von *PR1* verläuft bei allen Phänotypen innerhalb der ersten 24 Stunden identisch. Nach diesem Zeitpunkt zeigt die 35S::LTPIV.4 Mutante einen wesentlich stärkeren Anstieg und ein signifikant 2-fach höheres Level an Transkript im Vergleich zu den beiden anderen Phänotypen, welche weiterhin einen gleichen, weniger steilen Verlauf aufweisen. Aus der Analyse der Datensätze dieses Versuchs kann geschlossen werden, dass LTPIV.4 eine Funktion im SA-induzierten Signalweg einnimmt. Innerhalb des Signalwegs sitzt diese Funktion auf derselben Höhe oder auch unterhalb von PR1.

Um auch eine mögliche Funktion von LTPIV.4 bei der primären Immunreaktion gegen Pseudomonaden zu überprüfen, wurden weitere Markergenexpressionen untersucht. Hierfür wurden *WRKY22* (*WRKY TRANSCRIPTION FACTOR 22*) als Markergen für die MTI, *OXI1* (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE 1*) für den oxidativen Stress, *MYB51* (*MYB DOMAIN PROTEIN 51*) für die Glucosinolatbiosynthese, sowie *SAG13* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 13*) für den programmierten Zelltod herangezogen. Zu diesem Zwecke wurde dieselbe cDNA und Methodik wie in Kapitel 4.7.1 für die Expressionsanalysen verwendet.

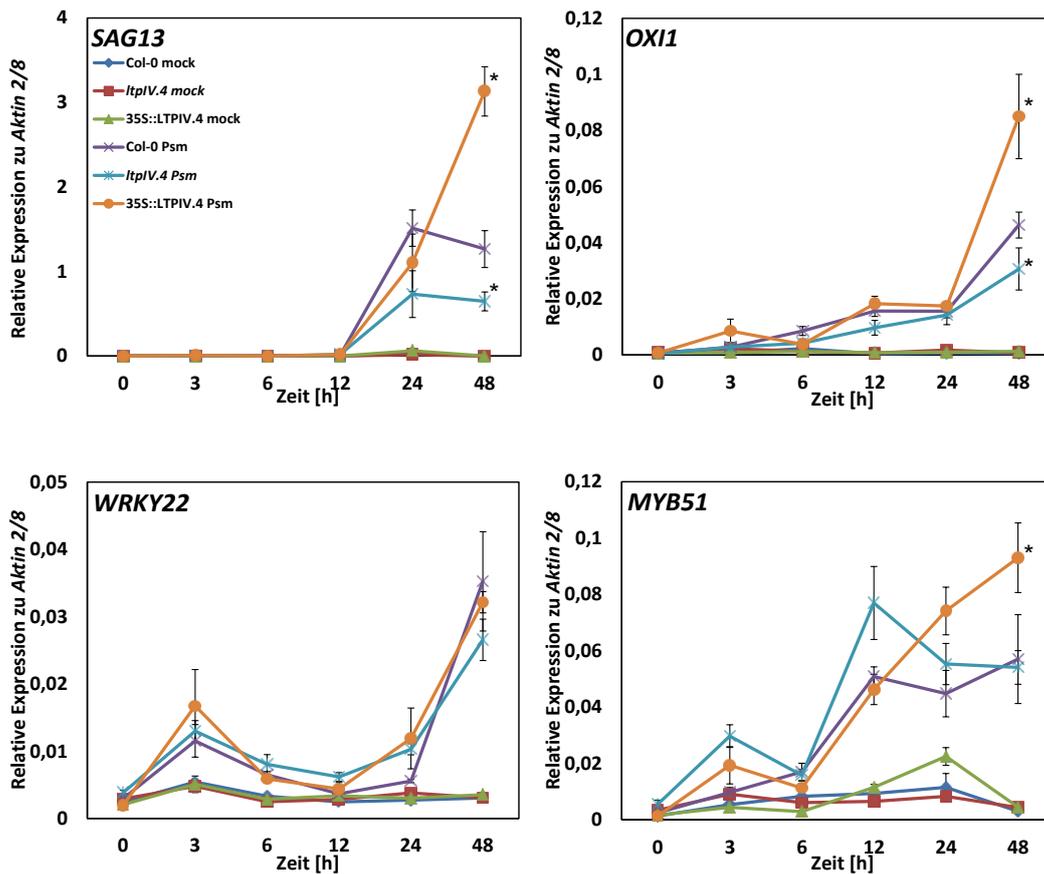


Abbildung 4.15 *SAG13*, *WRKY22*, *OX11*, *MYB51* Expression in Arabidopsis WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir *Psm*. Die relative Genexpression zu *Aktin 2/8* wurde 0, 3, 6, 12, 24, 48 Stunden nach der Infektion mittels qRT-PCR analysiert. Auf einen signifikanten Unterschied getestet wurden die Transkriptlevel der 35S::LTPIV.4 Mutante im Vergleich zu den Wildtyp- bzw. den *ltpIV.4* Mutantenleveln nach der Pseudomonasinfektion (MW  $\pm$  SE, n = 4; \* p < 0,05, Student's t-test)

Nachfolgend werden die wichtigsten Erkenntnisse aus Abbildung 4.15 zusammengefasst. Alle vier untersuchten Markergene zeigen nach der Infektion mit vir *Psm* eine Induktion. *WRKY22* weist dabei in allen drei Phänotypen weitgehend den gleichen Verlauf auf. Bei *MYB51* ist nach 48 Stunden ein Unterschied der Genexpression zwischen der 35S::LTPIV.4 Mutante und der *ltpIV.4* Mutante ersichtlich. Dabei ist die Genexpression in der Überexpressionsmutante signifikant höher als in der Knockout Linie. *SAG13* und *OX11* zeigen jeweils eine starke Induktion, welche bei *SAG13* bereits nach 12, bei *OX11* erst nach 24 Stunden einsetzt. Bei beiden Genen zeigt dabei der Überexprimierer im Vergleich zum WT 48 Stunden nach der Infektion eine signifikante Erhöhung der jeweiligen Genexpression (*SAG13* 2,6 fach, *OX11* 1,8 fach), währenddessen die Knockout Linie im Gegensatz zum WT jeweils eine signifikante Reduktion (*SAG13* 2 fach, *OX11* 1,5 fach) aufweist. Die analysierten Markergendaten weisen darauf hin, dass LTPIV.4 einen möglichen positiven bzw. verstärkten Effekt

auf die Ausbildung des PCD, sowie auf die Regulation des oxidativen Stresses nach der Pathogeninfektion hat.

#### 4.8 Analyse der systemischen Immunantwort in *Arabidopsis* WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit vir *Psm*

Wie in Kapitel 4.5 dargestellt, ist LTPIV.4 notwendig für die Ausbildung der lokalen Resistenz gegen *Pseudomonas*. Im Folgenden soll näher untersucht werden, ob LTPIV.4 auch in die Ausbildung oder Weiterleitung eines systemischen Signals zur Induktion einer entsprechenden systemischen Resistenz oder eines Primings involviert ist.

Hierfür wurden 4-5 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Rosettenblätter mit avr *Psm* Bakterien vorbehandelt. Es wurden je 3 Rosettenblätter mit einer Bakterienkultur (OD = 0,02) oder als Kontrolle mit dem Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>) infiltriert. 48 Stunden nach der Vorbehandlung erfolgte die Hauptbehandlung mittels Sprühinfektion mit vir *Psm* Bakterien (OD = 0,1) (Kapitel 3.1.6.2). Nach 2 tägiger Inkubationszeit wurden die Blattscheiben geerntet und die Besiedlungsdichte der Bakterien in den Pflanzen in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche bestimmt. Um die Bakterienzahl zu ermitteln, wurde eine Verdünnungsreihe der geernteten Blattsuspension erstellt, die Auswertung erfolgte nach zwei Tagen.

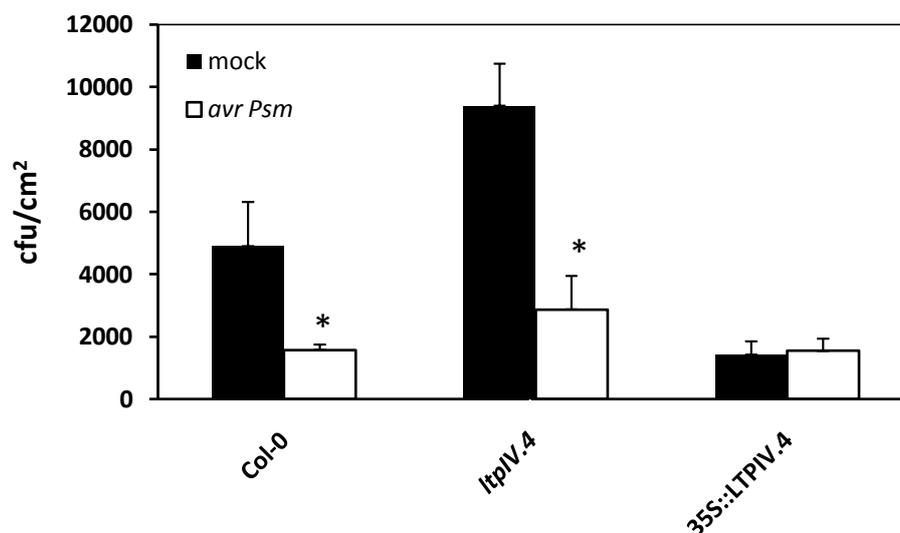


Abbildung 4.16 Besiedlungsdichte in cfu („colony forming units“) pro cm<sup>2</sup> Blattfläche systemisch behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WT und der Mutanten *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4. Die Vorbehandlung von 3 Blättern erfolgte durch Infiltration mit avr *Psm* (OD = 0,02) oder 10 mM MgCl<sub>2</sub> (mock) 48 Stunden vor der Hauptbehandlung der restlichen Blattrosette mit vir *Psm* (OD = 0,1). 48 Stunden nach der Hauptbehandlung wurde die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8, \* p < 0,05, Student`s t-test)

Die mit Puffer vorbehandelten Pflanzen zeigen, wie auch in Kapitel 4.5.1 dargestellt, die gleichen Tendenzen zur Induktion einer lokalen Resistenz gegenüber *vir Psm*. Während im Vergleich zum WT die Knockout Linie eine 2 fache Erhöhung der gewachsenen Bakterienzahl aufweist, zeigt die 35S::LTPIV.4 Linie eine 3,4 fache Erniedrigung. Im Verhältnis zur Überexpressionsmutante ist die Bakterienzahl des Knockouts um das 6,6 fache erhöht. Wird der Fokus auf den Vergleich zwischen den mit Puffer bzw. Bakterien vorbehandelten Blättern der einzelnen Phänotypen gelegt, ergeben sich aus Abbildung 4.16 weitere interessante Aspekte. Der WT zeigt eine signifikante, 3,1 fache Erniedrigung der gezählten Bakterienkolonien bei den mit Bakterien vorbehandelten Pflanzen im Gegensatz zur Kontrollgruppe. Mit der Bakterienvorbehandlung konnte demnach eine systemische Resistenz induziert werden. Dies gilt gleichermaßen auch für die *ltpIV.4* Mutante, welche mit einer 3,2 fachen Erniedrigung der Besiedlung ebenfalls eine systemisch induzierte Resistenz ausgebildet hat. LTPIV.4 ist somit nicht an der Ausbildung der systemischen Resistenz nach *Pseudomonas*infektion beteiligt. Im Gegensatz dazu zeigt die 35S::LTPIV.4 *Mutante* keinen Unterschied in der Besiedlungsdichte zwischen bakteriell oder Puffer vorgebehandelten Blättern. Die Überexpressionsmutante scheint sich demnach konstant in einem Zustand zu befinden, welcher einer systemischen Resistenz gleicht.

#### **4.9 Analyse der *LTPIV.4* Expression im systemischen Gewebe in *Arabidopsis* WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Pflanzen nach der Infektion mit *avr Psm***

Da die bisherigen Ergebnisse darauf hinweisen, dass LTPIV.4 nicht zur Ausbildung der SAR nötig ist, soll nachfolgend der Frage nachgegangen werden, ob die *LTPIV.4* Genexpression möglicherweise durch das systemische Signal im distalen Gewebe induziert wird. Hierfür wurden 4-5 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Rosettenblätter für die Induktion eines systemischen Signals mit *avr Psm* Bakterien behandelt. Wie in Kapitel 3.1.6.2 wurden auch hier 3 Rosettenblätter, entweder mit einer Bakterienkultur (OD = 0,02) oder als Kontrolle mit einem Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>), infiltriert. Eine weitere Behandlung erfolgte an dieser Stelle nicht. Die nicht infiltrierten, systemischen Blätter wurden zu den Zeitpunkten 0, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Infektion geerntet und mittels qRT-PCR die relative Genexpression von *LTPIV.4* und *PR1* ermittelt.

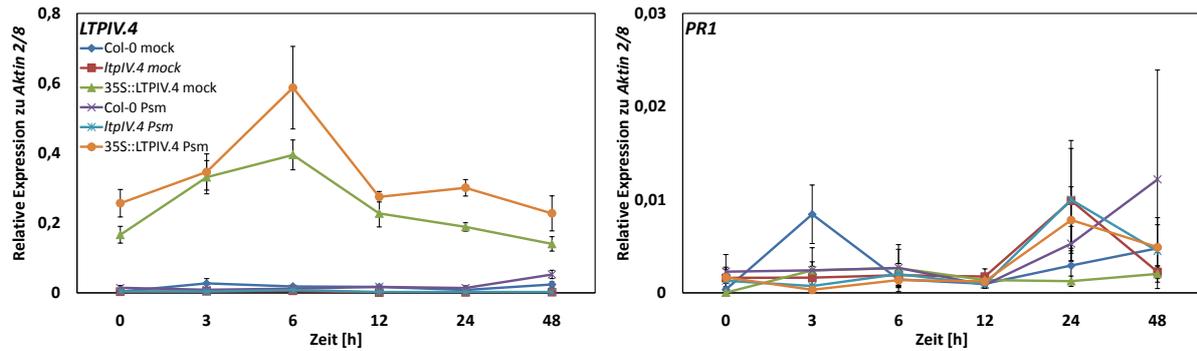


Abbildung 4.17 *LTPIV.4* und *PR1* Expression in systemischen *Arabidopsis* WT, *ltpIV.4* und 35S::LTPIV.4 Blättern. Die Vorbehandlung von 3 Blättern erfolgte durch Infiltration mit avr *Psm* (OD = 0,02). Die relative Genexpression zu *Actin 2/8* wurde 0, 3, 6, 12, 24, 48 Stunden nach der Hauptbehandlung mittels qRT-PCR analysiert. (MW  $\pm$  SE, n = 4)

Abbildung 4.17 zeigt die relative Genexpression von *LTPIV.4* und *PR1* nach der Behandlung mit avr *Psm* Bakterien oder einer Kontrollbehandlung im WT und den beiden transgenen *LTPIV.4*-Linien im Zeitverlauf. In beiden Proben des WTs und der *ltpIV.4* Linie zeigt sich innerhalb des Betrachtungszeitraums nur ein basales Level an *LTPIV.4* Transkripten. Eine Induktion ist nach 48 Stunden im mit Bakterien behandelten WT (2-fach) zu sehen. Dem hingegen weist die 35S::LTPIV.4 Mutante einen 3 fachen Anstieg der Genexpression 6 Stunden nach der Infiltration auf, welcher nach 12 Stunden wieder auf das basale Level abfällt. Jedoch ist auch das Transkriptlevel der mit Puffer behandelten 35S::LTPIV.4 Linie nach 6 Stunden ungefähr 1,8 fach erhöht. Die Induktion der *PR1* Genexpression im nicht behandelten, systemischen Gewebe ist in den verschiedenen Pflanzenphänotypen zu allen Zeitpunkten sehr gering. Ein Induktionsunterschied (8-fach/4-fach) zeigt sich nur zwischen den WT Proben 48/3 Stunden nach der Behandlung. Demnach ergibt sich eine mögliche Induktion von *LTPIV.4* im systemischen Gewebe nach der lokalen Infektion mit avirulenten Pseudomonaden. Jedoch wurde dieser Versuch bisher nur einmal durchgeführt.

## 4.10 *In vitro* Test potentieller Substrate von LTPIV.4

Neben der funktionellen Einordnung von LTPIV.4 in pflanzliche Signaltransduktionsmechanismen sollen zur näheren Charakterisierung des LTPs mögliche Interaktionspartner identifiziert werden. Vorangegangene Studien konnten bereits anhand verschiedenster biochemischer Methoden mögliche LTP bindende Substrate *in vitro* identifizieren (Douliez et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde zu diesem Zwecke der sogenannte Fat Western Blot, mit dem es möglich ist, die Interaktion von membrangebundenen Lipiden mit Proteinen zu detektieren, herangezogen.

### 4.10.1 Heterologe Expression von LTPIV.4-/DIR1-GFP Fusionsproteinen in *Escherichia coli* BL21star Bakterien

Um die für den Fat Western Blot benötigte, ausreichende Menge nativen Proteins zu generieren wurde ein GFP-Fusionsprotein von LTPIV.4 (LTPIV.4-/DIR1-GFP Sequenz aus pGWB5 Expressionsvektor transferiert in den pET28b Vektor) in *Escherichia coli* BL21star™(DE3) Bakterien heterolog exprimiert (Kapitel 3.3.1). Als Kontrolle für eine LTPIV.4 spezifische Bindung im Fat Western Blot wurde zusätzlich ein weiteres LTP (DIR1)-GFP Fusionsprotein, sowie GFP alleine erzeugt. Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in *E.coli* BL21star™(DE3) Bakterien für 48 Stunden bei 15 °C. Danach wurden die Proteine, wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, aufgereinigt und anschließend bis zur Verwendung für den Fat Western Blot bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

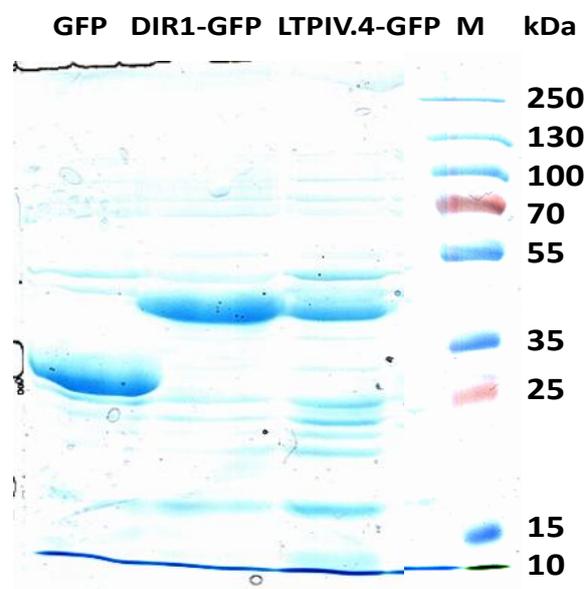


Abbildung 4.18 Coomassie Färbung einer SDS-Gelaufreinigung der aus *E.coli* BL21star™(DE3) Bakterien aufgereinigten Proteinlösungen von LTPIV.4-GFP, DIR1-GFP und GFP. Aufgetragen wurden jeweils 0,75 mg/ml Proteinlösung. (M: Marker)

Abbildung 4.18 zeigt die Auftrennung der heterolog exprimierten Proteine im SDS-Gel nach Coomassie Färbung. Zum besseren Vergleich der Proteinmengen wurden GFP, DIR1-GFP und LTPIV.4-GFP in einer Konzentration von jeweils 0,75 mg/ml aufgetragen. Die Fusionsproteine zeigen dabei an Hand ihres Laufverhaltens eine Größe von etwas über 35 kDa. Die theoretische Masse von DIR1-GFP und LTPIV.4-GFP beträgt 36 bzw. 35 kDa, was sehr gut mit der im Gel gezeigten Proteingröße zusammenpasst. Die stärkste Bande in der Reihe der GFP-Lösung ist bei ungefähr 25 kDa zu sehen. Die theoretische Masse beträgt 26,9 kDa. Nachdem diese sehr gut mit dem Laufverhalten der stärksten Bande im SDS-Gel übereinstimmt, konnte diese Bande als GFP identifiziert werden. Ein weiterer Aspekt, der für eine funktionelle Expression von GFP und den Fusionsproteinen spricht, ist die grüne Fluoreszenz der Proteinlösungen nach der Extraktion und Aufreinigung (nicht gezeigt). Neben den Fusionsproteinen und GFP sind aber noch weitere Proteine nach der Aufreinigung mit der Coomassie Färbung ersichtlich. Deshalb wurde ein Western Blot der Fusionsproteinlösungen gemacht, um auszuschließen, dass es Interaktionen des im Fat Blot verwendeten Antikörpers mit weiteren Proteinen gibt.

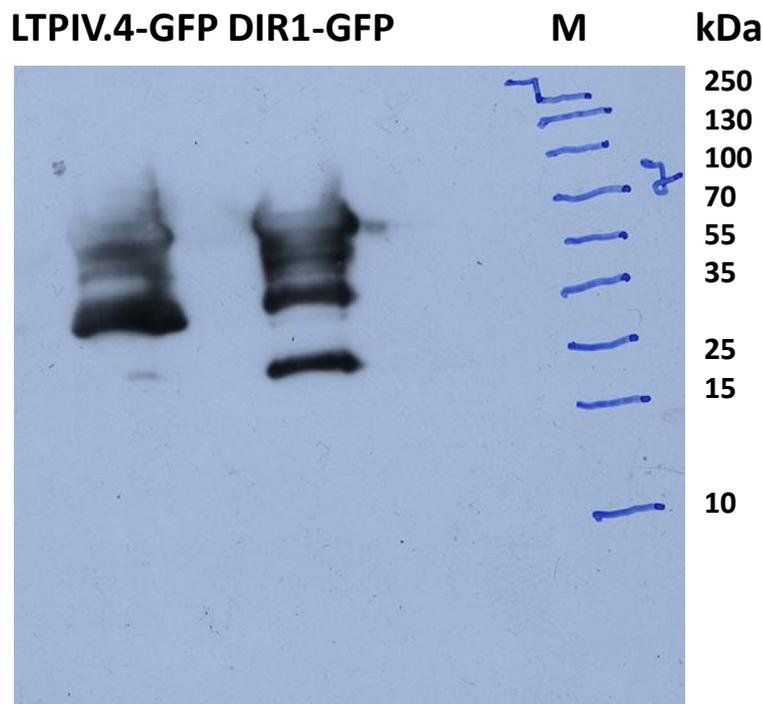


Abbildung 4.19 Western Blot einer SDS-Gelaufreinigung der aus *E.coli* *Bl21star*<sup>™</sup>(DE3) Bakterien aufgereinigten Proteinlösungen von LTPIV.4-GFP und DIR1-GFP. Aufgetragen wurden jeweils 0,75 mg/ml Proteinlösung. (M: Marker)

Nachdem die Proteine im SDS-Gel, sowie im Western Blot (Abbildung 4.19) die erwarteten Höhen und eine Antikörperspezifität aufwiesen, konnten diese für die *in vitro* Interaktionsstudien eingesetzt werden.

#### 4.10.2 Fat Western Blot Analysen

Die anschließende Analyse der spezifischen Lipid Protein Interaktion von LTPIV.4 mit unterschiedlichen Lipiden erfolgte mittels Fat Western Blot. Dabei wurden die untersuchten Lipide auf einer PVDF Membran fixiert und diese mit der Fusionsproteinlösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem GFP bindenden Antikörper und einen primären Antikörper bindenden sekundären mit Peroxidase gekoppelten Antikörper. Für die Interaktionsdetektion wurde bei allen Versuchen Cholesterol als positiv und Stigmasterol als negativ Kontrolle aufgetragen, nachdem in Voruntersuchungen gezeigt wurde, dass auch GFP alleine mit Cholesterol, jedoch nicht mit Stigmasterol, interagiert.

##### 4.10.2.1 Analyse der Affinität von LTPIV.4 mit freien, gesättigten Fettsäuren

Zuerst wurde die Affinität von LTPIV.4 hinsichtlich der Kettenlänge von freien gesättigten Fettsäuren überprüft. Dabei wurden die Fettsäuren in zwei unterschiedlichen Mengen (5 bzw. 50 nmol) auf die PVDF Membran gespottet und mit den Fusionsproteinen oder GFP inkubiert.

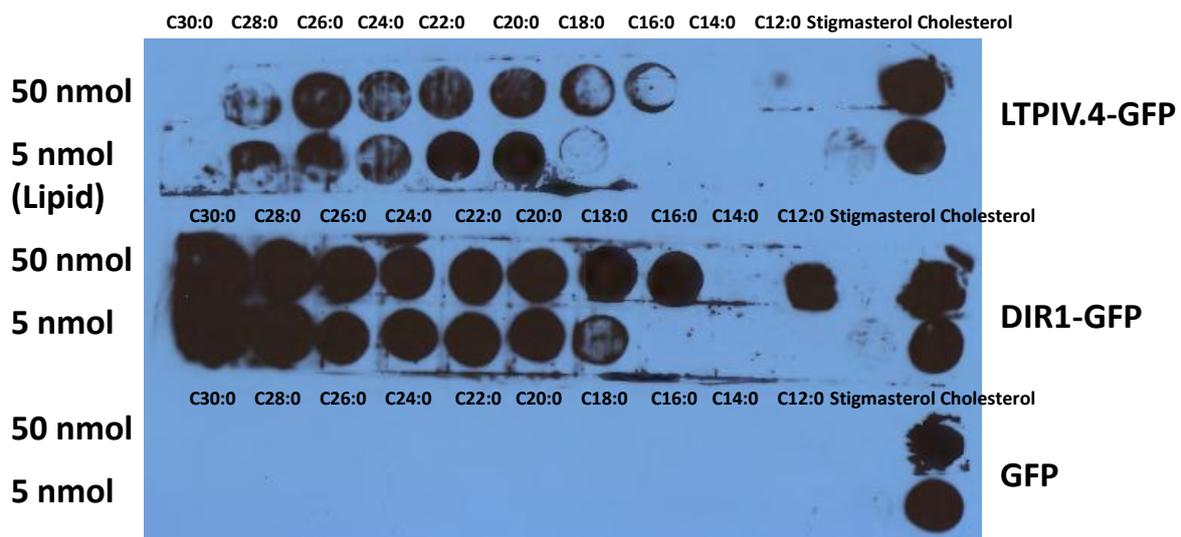


Abbildung 4.20 Fat Western Blot Analyse von unterschiedlichen Fettsäurekettenlängen. Aufgetragen wurden 5 bzw. 50 nmol von C12:0 bis C30:0 Fettsäuren. Die Membranen wurden für 1 Stunde mit einer LTPIV.4-GFP-, DIR1-GFP- oder GFP-Proteinlösung inkubiert und anschließend deren Interaktionen detektiert.

In Abbildung 4.20 sind die detektierten Lumineszenzen der Membranen zu erkennen, welche mit LTPIV.4-GFP, DIR1-GFP oder GFP inkubiert wurden. Neben den Kontrollen wurden hierbei auch freie

gesättigte Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 12 bis 30 C-Atomen aufgetragen. Dabei zeigen alle Proteine eine Interaktion mit der Positivkontrolle Cholesterol, sowohl bei einer Konzentration von 5 als auch 50 nmol. DIR1-GFP zeigt außerdem bei Lipidmengen von 50 nmol eine Affinität zu Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 bis 30 C-Atomen. Bei Lipidmengen von 5 nmol wird eine Affinität erst ab einer Kettenlänge von 18 C-Atomen detektiert. Die in Abbildung 4.20 gezeigte Interaktion mit einer Kettenlänge von 12 C-Atomen bei einer Lipidmenge von 50 nmol konnte in darauffolgenden Wiederholungen nicht mehr dargestellt werden und wird deshalb als nichtig erachtet. Im Gegensatz zu DIR1-GFP verhält sich LTPIV.4-GFP bei Lipidmengen von 50 nmol wesentlich spezifischer. Erst ab einer Kettenlänge von 18 C-Atomen wird eine deutliche Interaktion sichtbar, welche bei einer Länge von 26-28 C-Atomen endet. Dies wird auch bei der 10 fachen Verdünnung der Lipidmenge nochmals bestätigt. Aus diesen Ergebnissen lässt sich ableiten, dass LTPIV.4 eine erhöhte Affinität für freie Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 bis 28 C-Atomen aufweist.

#### **4.10.2.2 Abhängigkeit der Signaldetektion von der Lipidmenge und -konzentration für die LTPIV.4-Lipid-Interaktion**

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Interaktionsuntersuchungen ist die Abhängigkeit der Signalstärke der Lumineszenzdetektion von der eingesetzten Lipidmenge und der Lipidkonzentration innerhalb eines Spots. Um dies zu untersuchen, wurden Verdünnungsreihen (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 nmol) von Cholesterol, einem Phosphatidylglycerol mit zwei C 18:0 Fettsäureketten (PG-18:0-18:0) und einer Phosphatidsäure mit zwei C 17:0 Fettsäureketten (PA-17:0-17:0) erstellt. Zusätzlich wurde eine Verdünnungsreihe von PA-17:0-17:0 versetzt mit Laurinsäure (interagiert nicht mit den Fusionsproteinen) erstellt, bei der die Verdünnungen jeweils eine Lipidgesamtkonzentration von 5 nmol aufwiesen. Drei gleiche Membranen mit diesen Verdünnungsreihen wurden, wie in Kapitel 3.3.6 beschrieben, jeweils mit den beiden Fusionsproteinen (LTPIV.4-GFP, DIR1-GFP) und GFP inkubiert und deren Lumineszenzsignal detektiert.

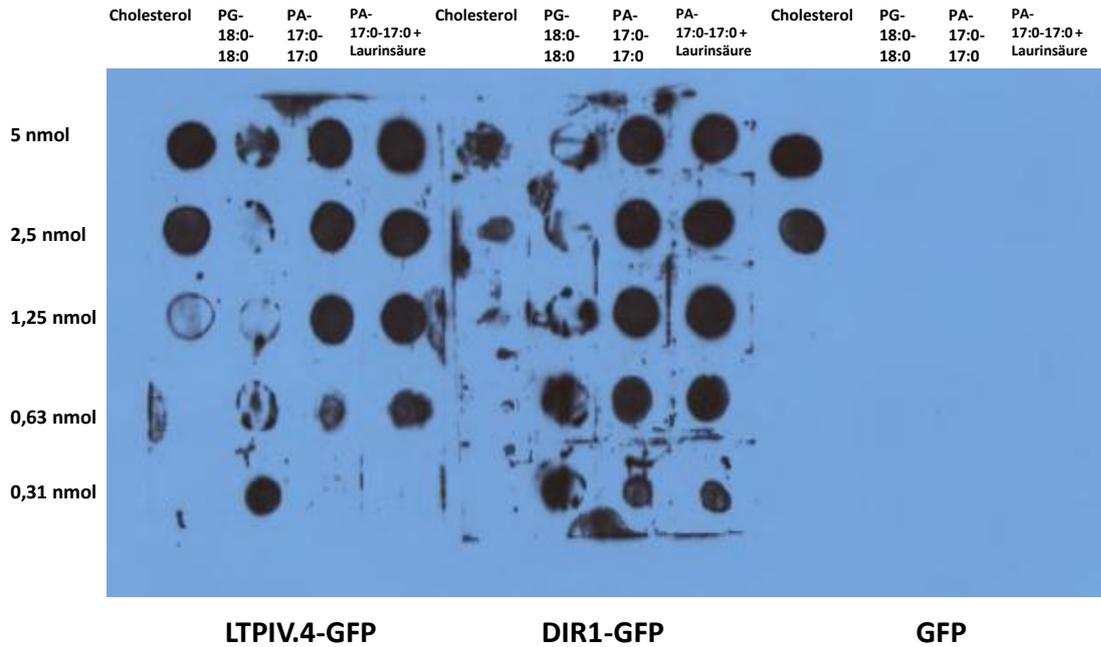


Abbildung 4.21 Fat Western Blot Analyse von unterschiedlichen Lipidkonzentrationen. Aufgetragen wurden Verdünnungsreihen (5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 nmol) von Cholesterol, einem Phosphatidylglycerol mit zwei C 18:0 Fettsäureketten (PG-18:0-18:0) und einer Phosphatidsäure mit zwei C 17:0 Fettsäureketten (PA-17:0-17:0) alleine und mit Laurinsäure gemischt (interagiert nicht mit den Fusionsproteinen). Die Membranen inkubierten für 1 Stunde mit einer LTPIV.4-GFP-, DIR1-GFP- oder GFP-Proteinlösung.

Die mit LTPIV.4-GFP, DIR1-GFP oder GFP inkubierten Membranen in Abbildung 4.21 zeigen alle bis zu einer Lipidmenge von 2,5 nmol für Cholesterol ein deutliches Lumineszenzsignal. Die mit GFP inkubierte Membran weist kein weiteres detektierbares Signal auf. LTPIV.4-GFP und DIR1-GFP interagieren ebenfalls mit allen Verdünnungen von PG-18:0-18:0. Innerhalb dieser Verdünnungsreihen unterscheidet sich die Größe der Spots nicht. Der Vergleich zwischen den Verdünnungsreihen von PA-17:0-17:0 ohne und mit zugesetzter Laurinsäure zeigt sowohl bei DIR1-GFP als auch bei LTPIV.4-GFP weder deutliche Unterschiede in der Spotgröße noch in der Detektierbarkeit der verschiedenen PA-Verdünnungen. Obwohl anhand dieser Ergebnisse deutlich wird, dass das Lipid-Volumen Verhältnis nicht zu einem Detektionsverlust oder einer Signalverschlechterung führt, eignet sich der Fat Western Blot nicht zur exakten Quantifizierung der Interaktionsstärke, da die Spots sich in Größe und Stärke nicht maßgeblich unterscheiden.

#### 4.10.2.3 Analyse der Interaktion von LTPIV.4-GFP mit verschiedenen pflanzlichen Lipiden

Pflanzliche LTPs sind nicht nur in der Lage einfache Fettsäuren, sondern auch komplexere Lipide, wie beispielsweise Phosphatidylcholine, zu binden und zu transportieren (Lascombe et al., 2008). Für diese Arbeit wurde deshalb im Weiteren eine Vielzahl an unterschiedlichen Lipiden mittels Fat Western Blot auf ihre Interaktion mit LTPIV.4-GFP, DIR1-GFP und GFP untersucht.

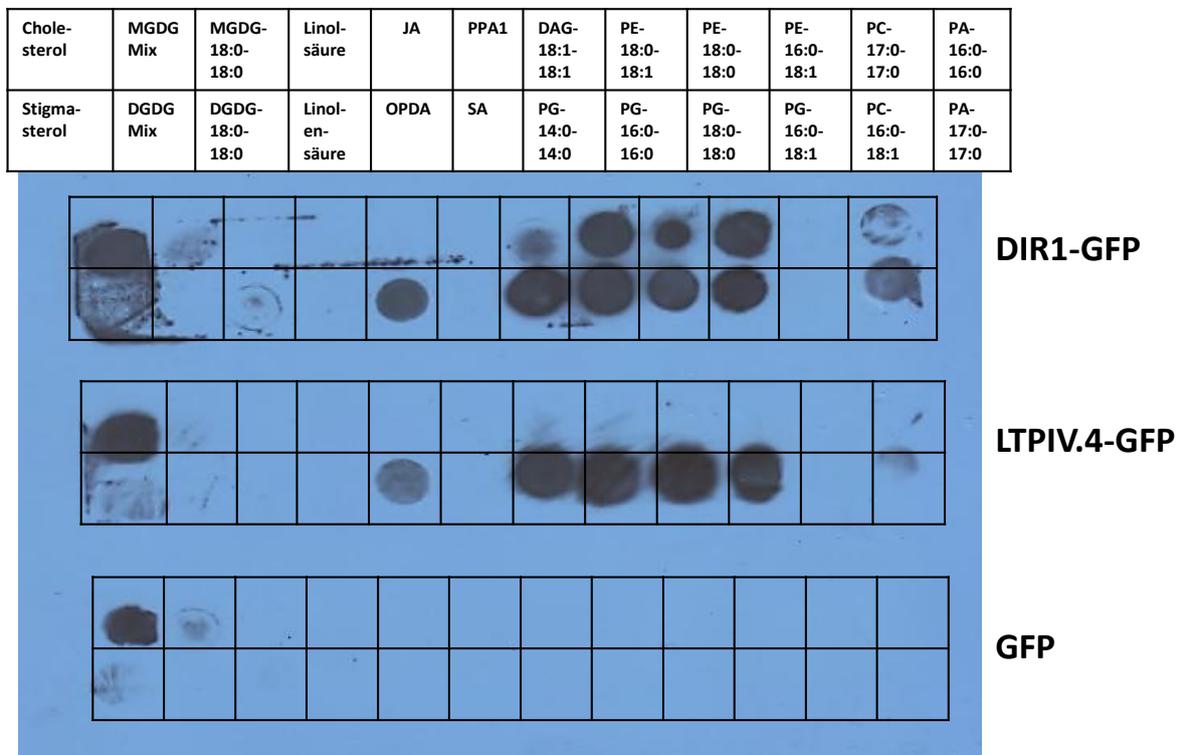


Abbildung 4.22 Fat Western Blot Analyse unterschiedlicher Lipide. Aufgetragen wurden jeweils 5 nmol an Cholesterol, Stigmasterol, MGDG-Mix aus Weizen, DGDG-Mix aus Weizen, Monogalactosyldiacylglycerol-18:0-18:0 (MGDG-18:0-18:0), Digalactosyldiacylglycerol-18:0-18:0 (DGDG-18:0-18:0), Linolsäure, Linolensäure, JA, OPDA, Phytosteran A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>), SA, Diacylglycerol-18:1-18:1 (DAG-18:1-18:1), verschiedenen Phosphatidylethanolaminen (PE-18:0-18:1, PE-18:0-18:0, PE-16:0-18:1), Phosphatidylglycerinen (PG-14:0-14:0, PG-16:0-16:0, PG-18:0-18:0, PG-16:0-18:1), Phosphatidylcholin-18:1-16:0 (PC-18:1-16:0), PC-17:0-17:0, Phosphatidsäure-16:0-16:0 (PA-16:0-16:0) und PA-17:0-17:0. Die Membranen inkubierten für 1 Stunde mit einer LTPIV.4-GFP-, DIR1-GFP- oder GFP-Proteinlösung.

Abbildung 4.22 zeigt exemplarisch drei gleiche Membranen, die jeweils mit identischen Lipiden gespotet und anschließend entweder mit LTPIV.4-GFP, Dir1-GFP oder GFP inkubiert wurden. Auch hier zeigt GFP ausschließlich eine Interaktion mit Cholesterol. DIR1-GFP und LTPIV.4-GFP interagieren nicht mit den Lipiden Stigmasterol, Monogalactosyldiacylglycerol-18:0-18:0 (MGDG-18:0-18:0), Digalactosyldiacylglycerol-18:0-18:0 (DGDG-18:0-18:0), JA, SA, Diacylglycerol-18:1-18:1 (DAG-18:1-18:1), Phytosteran A<sub>1</sub> (PPA<sub>1</sub>), Linolsäure, Linolensäure, Phosphatidylcholin-18:1-16:0 (PC-18:1-16:0)

und PC-17:0-17:0. DIR1-GFP zeigt eine Affinität zu OPDA, einigen Phosphatidylethanolaminen (PE-18:0-18:1, PE-18:0-18:0, PE-16:0-18:1), PGs (PG-14:0-14:0, PG-16:0-16:0, PG-18:0-18:0, PG-16:0-18:1), PAs (PA-16:0-16:0, PA-17:0-17:0), einem MGDG-Mix und einem DGDG-Mix aus Weizen. Noch spezifischer agiert LTPIV.4, welches die gleiche Affinität wie DIR1 aufweist, jedoch keine Interaktion mit Phosphatidylethanolaminen zeigt. Diese Resultate zeigen sowohl eine Lipidspezifität der beiden LTPs hervorgerufen durch die Länge der Fettsäureketten als auch eine Spezifität anhand der unterschiedlichen Lipidkopfgruppen. Beispielsweise ist LTPIV.4 in der Lage mit dem PG-18:1-16:0 zu interagieren, während es keine Interaktion mit dem PE-18:1-16:0 eingeht. In Tabelle 4.1 werden die getesteten Lipide sowie deren Interaktionsstatus mit GFP, DIR1-GFP und LTPIV.4-GFP nochmals zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 4.1 Übersicht der getesteten Lipidsubstrate von GFP, DIR1-GFP und LTPIV.4-GFP. Es wurde eine reproduzierbare Lipid-Protein Affinität bei einer Lipidkonzentration von 5 nmol gefunden (Grün); Es konnte keine Lipid-Protein Affinität detektiert werden (Rot).

Lipidbezeichnung	GFP	DIR1-GFP	LTPIV.4-GFP	Reproduktion
Cholesterol	Grün	Grün	Grün	11x
Stigmasterol	Rot	Rot	Rot	10x
Laurinsäure (C12:0)	Rot	Rot	Rot	6x
Myristinsäure (C14:0)	Rot	Rot	Rot	4x
Palmitinsäure (C16:0)	Rot	Rot	Rot	4x
Stearinsäure (C18:0)	Rot	Grün	Grün	4x
Arachinsäure (C20:0)	Rot	Grün	Grün	3x
Behensäure (C22:0)	Rot	Grün	Grün	3x
Lignocerinsäure (C24:0)	Rot	Grün	Grün	3x
Cerotinsäure (C26:0)	Rot	Grün	Grün	3x
Montansäure (C28:0)	Rot	Grün	Grün	3x
Melissinsäure (C30:0)	Rot	Grün	Rot	3x
Linolsäure (C18:2)	Rot	Grün	Grün	2x
Linolensäure (C18:3)	Rot	Rot	Rot	3x
Phosphatidylcholin-17:0-17:0	Rot	Rot	Rot	3x
Phosphatidylcholin-18:1-16:0	Rot	Rot	Rot	3x
Lysophosphatidylcholin-17:0	Rot	Rot	Rot	3x
Lysophosphatidylcholin-18:0	Rot	Grün	Rot	2x
Lysophosphatidylcholin-Mix	Rot	Rot	Rot	3x
Phosphatidsäure-16:0-16:0	Rot	Grün	Grün	3x
Phosphatidsäure-17:0-17:0	Rot	Grün	Grün	3x
Phosphatidsäure-17:0-17:0 + Laurinsäure (C12:0)	Rot	Grün	Grün	2x
Phosphatidylethanolamin-14:0-14:0	Rot	Grün	Rot	3x
Phosphatidylethanolamin-17:0-17:0	Rot	Rot	Rot	3x
Phosphatidylethanolamin-18:0-18:0	Rot	Grün	Rot	3x
Phosphatidylethanolamin-18:1-16:0	Rot	Grün	Rot	3x

Phosphatidylethanolamin-18:1-18:0				3x
Phosphatidylglycerol-14:0-14:0				3x
Phosphatidylglycerol-16:0-16:0				3x
Phosphatidylglycerol-18:0-18:0				3x
Phosphatidylglycerol-18:1-16:0				3x
Phosphatidylinositol-18:1-18:1				3x
Phosphatidylserin-17:0-17:0				3x
Triacylglycerid-18:1-18:1-18:1				3x
Phytosphingosin (t18:0)				3x
Sphinganin (d18:0)				3x
N-decanoyl-D-erythro-Sphingosin (d18:1/C10:0)				2x
N-nervonoyl-D-erythro-Sphingosin (15Z) (d18:1/C24:1)				2x
N-lignoceroyl-D-erythro-Sphinganin (d18:0/C24:0)				2x
Diacylglycerol-18:1-18:1				1x
Phytoprostan A <sub>1</sub>				1x
Jasmonsäure				4x
OPDA				4x
Salicylsäure				1x
MGDG-18:0-18:0				3x
MGDG-Mix aus Weizen				3x
DGDG-18:0-18:0				3x
DGDG-Mix aus Weizen				3x
Glycerol-3-phosphat				3x
Azelainsäure				3x
Dodecandisäure				2x

#### 4.11 Ungerichtete Metabolomanalyse der *ltpIV.4*, 35S::LTPIV.4 Mutanten und des *Arabidopsis* WTs

Wie die vorherigen Ergebnisse zeigen, kann der Knockout oder die konstitutive Expression eines Gens zu unterschiedlichen Phänotypen führen. Ob genau diese Mutationen für LTPIV.4 zu einem basalen Unterschied im gesamten Metabolom führen, wurde anhand eines ungerichteten Metabolomscreens analysiert. Die einfache Extraktion für die Probenaufbereitung und die Trennung mittels UPLC-TOF-MS erlaubte eine Detektion von ca. 2000 unterschiedlichen Metaboliten. Für die Analyse wurden 3-4 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* WT, *ltpIV.4*, sowie 35S::LTPIV.4 Pflanzen verwendet. Die Aufarbeitung und die Messung wurden wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben durchgeführt. Die erhaltenen Daten wurden per Multivariantenanalyse prozessiert, um mögliche

metabolomische Unterschiede zwischen den einzelnen Phänotypen ausmachen zu können. In vier unabhängigen Analysen wurden aus ca. 2000 Metaboliten dreizehn Metabolite gefunden, welche einen signifikanten Unterschied zwischen der *ltpIV.4* Mutante und dem WT/der 35S::LTPIV.4 Mutante aufweisen (Abbildung 4.23). Im Anschluss erfolgte ein Vergleich zwischen der gemessenen und der theoretischen Masse der Metabolite, um die mögliche atomare Zusammensetzung herauszufinden. Einige Metabolite konnten durch diese Vorgehensweise und dem darauffolgendem Abgleich mit verschiedenen Datenbanken identifiziert werden.

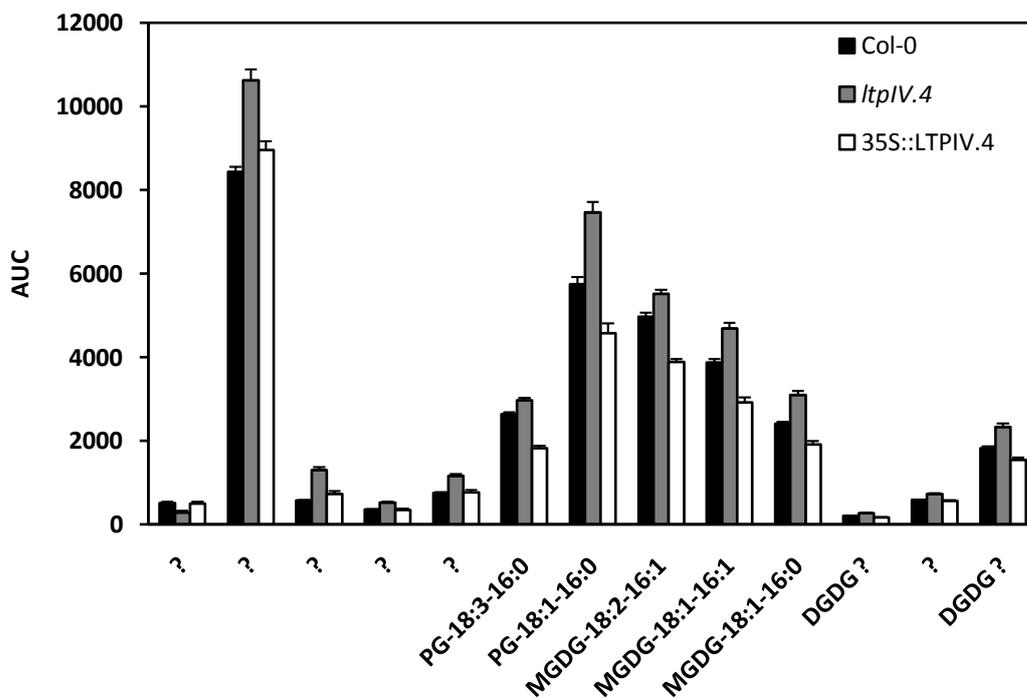


Abbildung 4.23 Analyse der Flächenverhältnisse der 13 identifizierten Metaboliten aus dem ungerichteten Metabolomscreen. Dabei zeigen alle Metabolite einen signifikanten Unterschied zwischen der *ltpIV.4* Mutante im Vergleich zum WT/der 35S::LTPIV.4 Mutante. Sicher identifiziert wurden neben zwei möglichen DGDGs drei MGDGs (MGDG-18:2-16:1, MGDG 18:1-16:1, MGDG 18:1-16:0) und zwei PGs (PG 18:3-16:0, PG 18:1-16:0) (AUC: area under the curve; MW + SE, n = 8)

In Abbildung 4.23 sind die 13 Metabolite mit dem größten Flächenunterschied zwischen der Knockout Mutante und den beiden anderen Phänotypen dargestellt. Von diesen konnten fünf genauer als PG-18:3-16:0, PG-18:1-16:0, MGDG-18:2-16:1, MGDG-18:1-16:1 und MGDG-18:1-16:0 identifiziert werden. Zwei Metabolite stellen vermutlich DGDG Spezies dar, jedoch ist die Fettsäurezusammensetzung nicht völlig eindeutig. Sechs Metabolite konnten auch mittels Datenbankabgleichs nicht identifiziert werden. Da sowohl verschiedene PGs, wie auch der MGDG

bzw. DGDG Mix aus Weizen in den vorherigen Studien eine Affinität zu LTPIV.4 gezeigt haben, ist es möglich, dass die identifizierten Spezies potentielle Interaktionspartner von LTPIV.4 sind und durch das Fehlen des LTPs in der Pflanze akkumulieren oder deren Transport verlangsamt stattfindet.

#### 4.12 Subzelluläre Lokalisation von AZI1

Ähnlich wie bei LTPIV.4 ist die Lokalisation von AZI1 in Pflanzen weitgehend unerforscht. Jüngst konnten Yu et al. dessen subzelluläre Lokalisation in Tabakpflanzen im ER und in den Plasmodesmata ausmachen (Yu et al., 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die subzelluläre Lokalisation von AZI1 in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden.

Zur genaueren Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AZI1 wurden, wie auch bei LTPIV.4, 3 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen verwendet. Die transiente Transformation der *Arabidopsis* Blätter, wie in Kapitel 3.3.11 näher beschrieben, erfolgte mit einem 35S::AZI1-GFP Expressionsvektor (pGWB5). Als Markerprotein für die Lokalisation im Zytoplasma und im Zellkern wurde auch hier das Fluoreszenzprotein mCherry (rote Fluoreszenz) benutzt. Die darauffolgende Detektion der Proteinexpression erfolgte mittels konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops nach 24 Stunden Inkubationszeit.

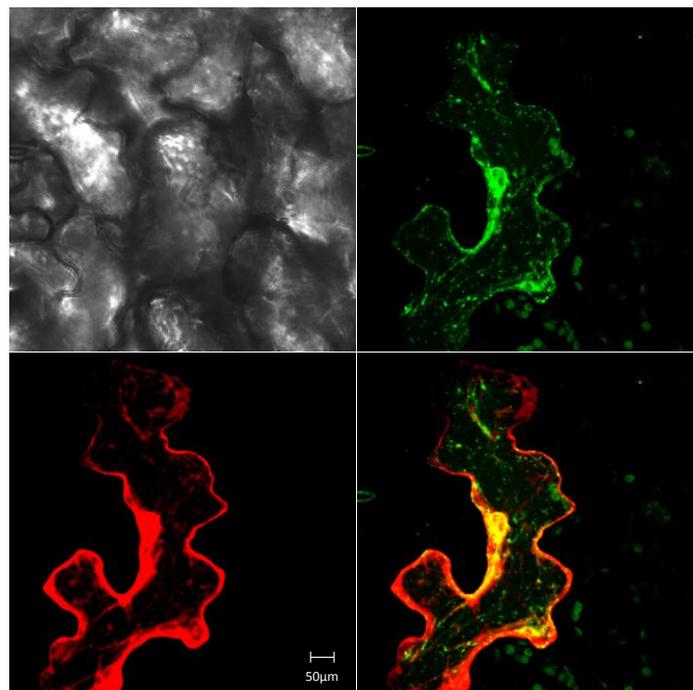


Abbildung 4.24 Durchlichtaufnahme und Fluoreszenzsignale von AZI1-GFP (grün) und mCherry (rot) einer Epidermiszelle in 3 Wochen alten, mittels Genkanone transient transformierten *Arabidopsis thaliana* Blättern (Blattunterseite). Die Aufnahmen wurden mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH) gemacht.

Der Vergleich der beiden Zellen aus Abbildung 4.24 zeigt eine Co-Lokalisation der GFP-Fluoreszenz von AZI1-GFP mit der roten-Fluoreszenz des mCherry Proteins. Das rote Fluoreszenzsignal ist deutlich im Zellkern und im Zytoplasma zu erkennen. Auch bei AZI1-GFP zeigt sich bei der Überlagerung der Fluoreszenzsignale eine ER-Lokalisation für AZI1 um den Zellkern herum. Weiterhin sind auch hier konzentrierte Bereiche der GFP Fluoreszenz im Zytoplasma und an der inneren Seite der Plasmamembran zu erkennen.

### 4.13 Analyse der Phytohormonspiegel in *Arabidopsis* WT und *azi1-1*

Nachdem die Genexpression von *AZI1* sehr stark durch die Verwundung des pflanzlichen Gewebes induziert wird, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Phytohormongehalte in *Arabidopsis thaliana* basal, als auch unter Verwundung im WT und der *azi1-1* Mutante näher betrachtet.

#### 4.13.1 Analyse der basalen Phytohormonspiegel

Zur Analyse der basalen Phytohormonspiegel wurden 4 Wochen alte Blattrosetten verwendet. Da die basalen Level an JA, SA, JA-Ile und OPDA in *Arabidopsis* generell sehr niedrig sind, wurde hierfür 200 mg gemörsertes Pflanzenmaterial eingesetzt (Kapitel 3.4.1).

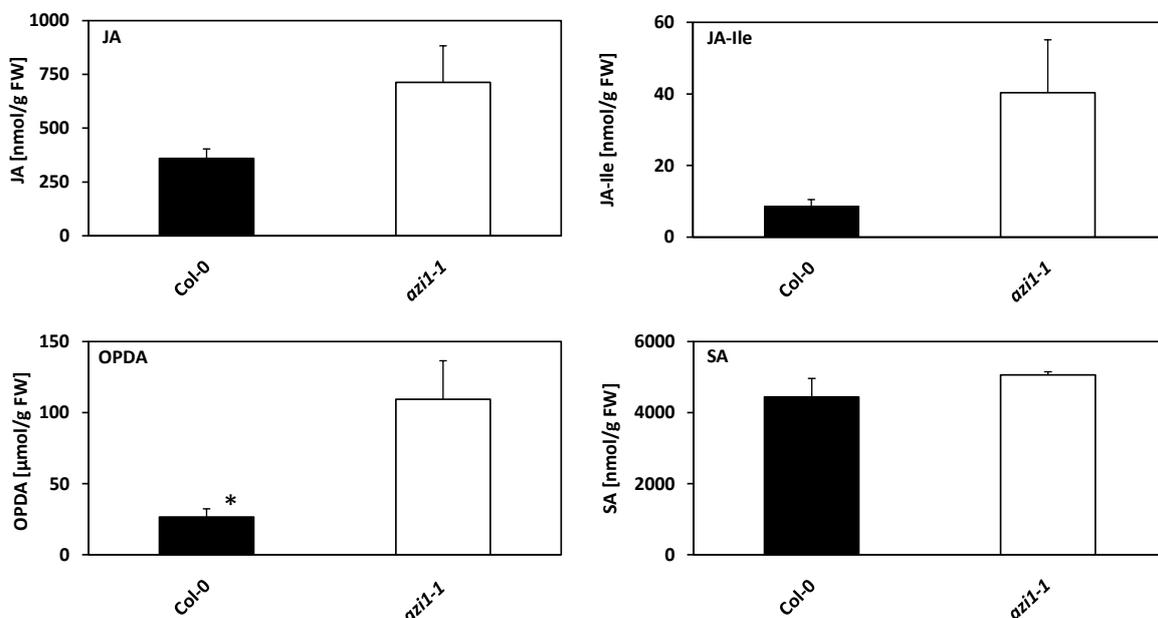


Abbildung 4.25 Phytohormonanalyse in *Arabidopsis* Blättern vom WT und der *azi1-1* Mutante. Analysiert wurden die basalen Gehalte an OPDA, JA, JA-Ile und SA (MW + SE, n = 5; \* p < 0,05, Student's t-test)

Die SA Level in Abbildung 4.25 zeigen sowohl im WT als auch in der *azi1-1* Mutante ca. 5000 nmol/g FW. Im Gegensatz dazu weist die *azi1-1* Mutante im Vergleich zum WT eine höhere Konzentration an Jasmonaten und OPDA auf. Die JA Level betragen im WT 360 nmol/g FW und in der Knockout Mutante 712 nmol/g FW. Auch das eigentlich funktionelle Hormon JA-Ile weist in der *azi1-1* Mutante einen fast 5 fach erhöhten Spiegel auf (WT 9 nmol/g FW; *azi1-1* 40 nmol/g FW). Die *azi1-1* Mutante zeigt auch bei der Vorstufe von JA in der JA-Biosynthese OPDA im Vergleich zum WT einen signifikant erhöhten Oxylipingehalt (WT 27  $\mu$ mol/g FW; *azi1-1* 109  $\mu$ mol/g FW).

#### 4.13.2 Analyse der Oxylipinspiegel nach Verwundung

Im einem weiteren Versuch wurden die Oxylipinspiegel in 4 Wochen alten *Arabidopsis* WT und *azi1-1* Pflanzen nach Verwundung verglichen, um eine mögliche Auswirkung des Genknockouts hinsichtlich der Aktivierung des verwundungsassoziierten JA-Signalwegs zu untersuchen.

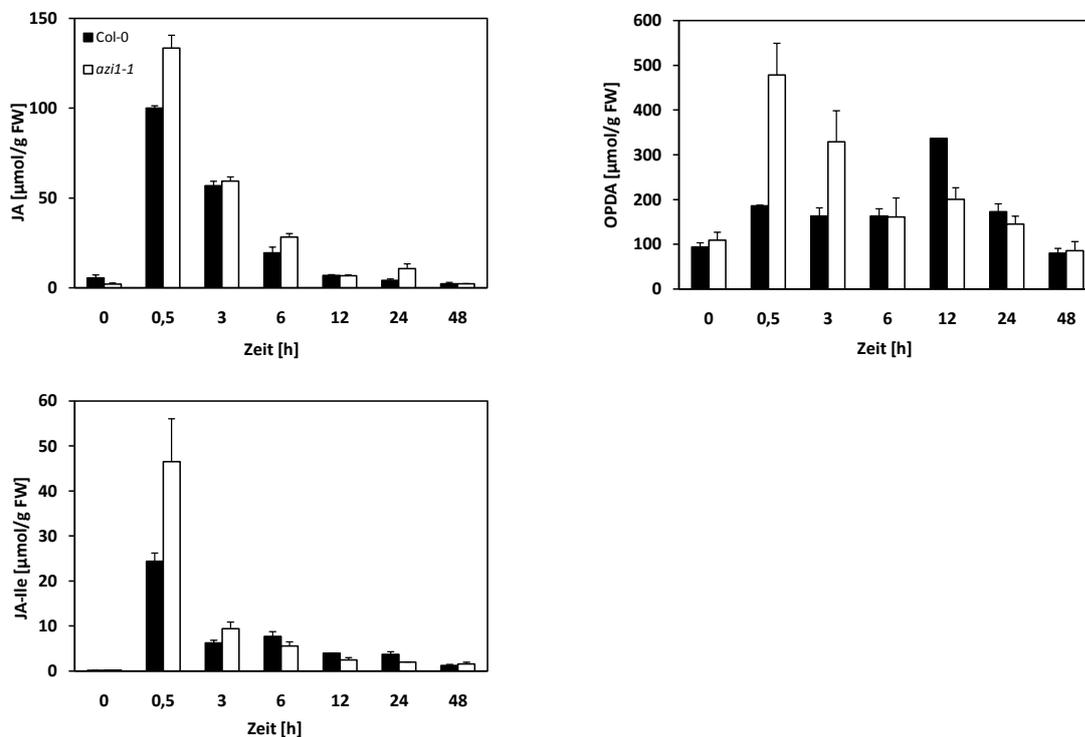


Abbildung 4.26 Jasmonat-Analyse in *Arabidopsis* Blättern von WT und *azi1-1* Mutanten nach Verwundung. Die Gehalte von OPDA, JA und JA-Ile wurden 0, 0,5, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Verwundung analysiert (MW + SE, n = 3)

Tendenziell zeigt sich bei allen Jasmonaten nach 30 Minuten ein maximaler Anstieg der Oxylipingehalte. Zu diesem Zeitpunkt sind die Lipidgehalte in der *azi1-1* Mutante im Gegensatz zum

WT alle um das 1,5 bis 2 fache erhöht. Die JA- und JA-Ile-Gehalte in beiden Phänotypen fallen bereits nach drei Stunden wieder stark ab und erreichen nach 48 Stunden basale Ausgangswerte. Zwischen 3 bis 24 Stunden nach der Verwundung zeigt OPDA im WT relativ konstante Werte, während dies in der *azi1-1* Mutante erst nach 6 Stunden zu beobachten ist. Bei beiden Phänotypen fallen die Gehalte an OPDA nach 48 Stunden wieder auf das basale Level zurück. Anhand dieses Versuchs wird deutlich, dass der Knockout von *Azi1* zu anfänglich erhöhten Gehalten aller drei untersuchten Oxylipine führt, welche sich im späteren Verlauf der Verwundungsreaktion jedoch wieder den Werten des WT annähern.

#### 4.13.3 Analyse der Dicarbonsäurelevel in *Arabidopsis thaliana* WT und *azi1-1* nach Verwundung

Da nach bisherigen Forschungsergebnissen die *AZ11* Genexpression direkt durch Azelainsäure (AzA) ebenso wie durch Verwundung induziert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein möglicher Zusammenhang zwischen Verwundung und AzA näher untersucht (Jung et al., 2009; Heß, 2011). Dazu wurde die Messung der Gehalte von AzA und einer weiteren kurzkettigen Dicarbonsäure, der Pimelinsäure (PIM), in verwundetem Blattgewebe von *Arabidopsis* WT und *azi1-1* Pflanzen verglichen. Wie in Kapitel 3.1.6.1 beschrieben wurden zu diesem Zwecke 5 Rosettenblätter mit einer Pinzette verwundet, zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet und die Dicarbonsäuregehalte mittels UPLC-MS-MS analysiert.

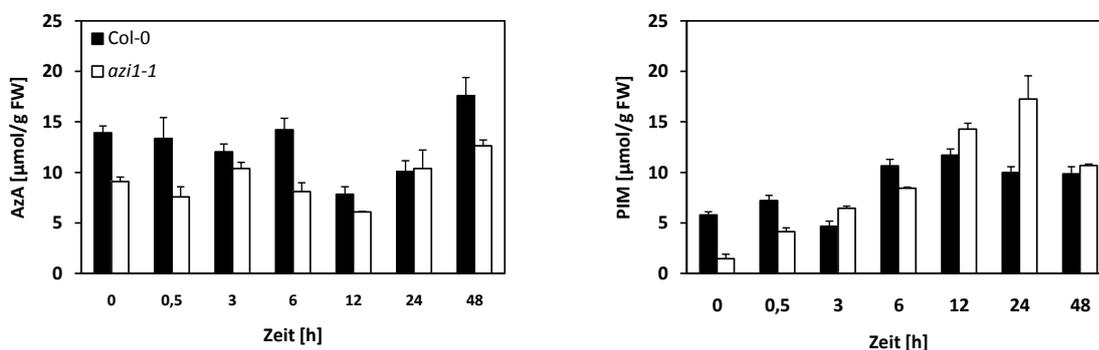


Abbildung 4.27 Dicarbonsäure-Analyse in *Arabidopsis* Blättern von WT und *azi1-1* nach Verwundung. Die Gehalte von Azelainsäure (AzA) und Pimelinsäure (PIM) wurden 0, 0,5, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach Verwundung analysiert (MW + SE, n = 3)

Abbildung 4.27 zeigt die gemessenen AzA bzw. PIM Gehalte 0, 0,5, 3, 6, 12, 24 und 48 Stunden nach der Verwundung. AzA weist dabei in beiden Phänotypen keine ersichtliche Induktion durch die

Verwundung auf. Bei PIM ist vor allem ein Anstieg in der *azi1-1* Mutante zu erkennen. Bis 24 Stunden nach Verwundung erhöhen sich die PIM Gehalte in *azi1-1* um das 6 fache des basalen Wertes. Auch im WT zeigt PIM einen 2 fachen Anstieg jedoch verändern sich die Gehalte zwischen 6 und 48 Stunden nach Verwundung nicht mehr signifikant. Demnach besitzt AzA keine verwundungsrelevante Funktion. Die gesteigerten PIM-Gehalte, vor allem in der *azi1-1* Mutante, deuten jedoch auf eine relevante Rolle von PIM in der Verwundungsreaktion von *Arabidopsis* hin.

#### 4.14 Infektion von *Arabidopsis thaliana* WT und *azi1-1* Pflanzen mit *Sclerotinia sclerotiorum*

Dem aktuellen Stand der Forschung zufolge besitzt AZI1 eine spezifische Funktion in pflanzlichen Abwehrmechanismen (Chassot et al., 2007; Jung et al., 2009). Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese unter Zuhilfenahme eines nekrotrophen Ascomycets näher erforscht. Dazu wurden 4-5 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* WT und *azi1-1* Pflanzen mit *Sclerotinia sclerotiorum* infiziert. Der Pilz wurde wie in Kapitel 3.1.6.3 beschrieben auf die Rosettenblätter gelegt, die Messungen entstandener Läsionsgrößen erfolgte nach 2 und 3 Tagen.

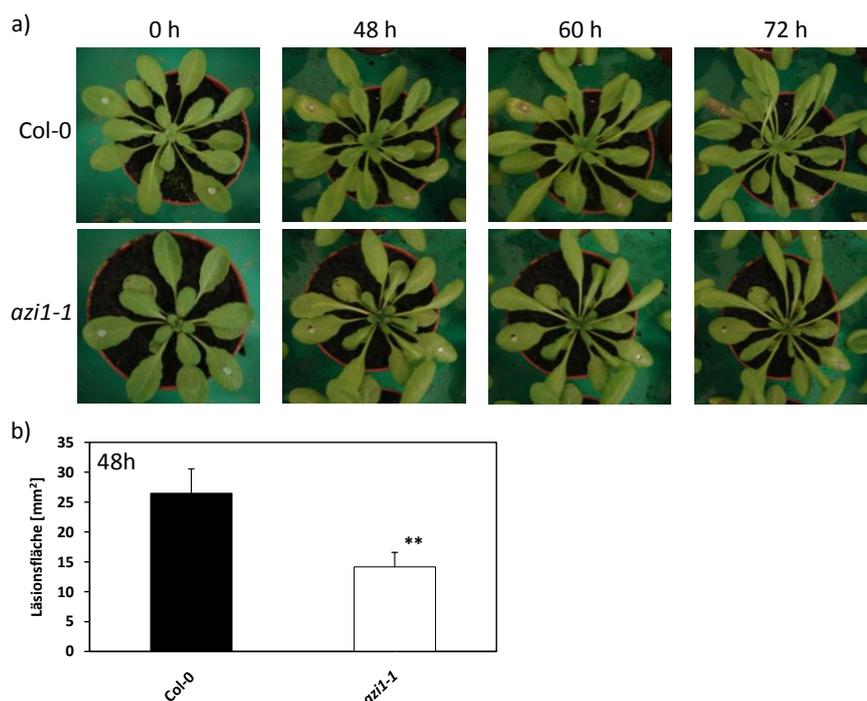


Abbildung 4.28 a) Zeitlicher Verlauf der Infektion von *Arabidopsis thaliana* WT und *azi1-1* Pflanzen mit *Sclerotinia sclerotiorum*. b) Läsionsfläche in mm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WT und der *azi1-1* Mutante. Auf die Blätter wurden Hyphen besiedelte Agarblöcke von *Sclerotinia sclerotiorum* gesetzt und nach 48 Stunden die Läsionsflächen ermittelt. (MW + SE, n = 12, \*\* p < 0,01, Student's t-test)

Abbildung 4.28 a) zeigt den zeitlichen Verlauf der pilzbedingten Läsionen beider Pflanzenphänotypen mit *Sclerotinia*. Bereits nach 2 Tagen sind die Läsionsgrößen, die der Pilz auf den WT Pflanzen hervorgerufen hat, wesentlich größer als auf der *azi1-1* Mutante. Nach 3 Tagen wird der Infektionsunterschied noch deutlicher. In Abbildung 4.28 b) sind die gemessenen Läsionsgrößen 2 Tage nach der Infektion dargestellt. Im Vergleich mit *azi1-1* zeigt der WT doppelt so große Läsionsgrößen. Der Knockout von *Azi1* wirkt sich auf die Pflanzen Resistenz steigernd gegen die Infektion und den Infektionsverlauf von *Sclerotinia* aus.

#### 4.15 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Sclerotinia sclerotiorum* – *azi1-1* Resistenz aufgrund eines systemischen Signals?

Da bei den vorherigen Versuchen immer mehrere Rosettenblätter mit Pilzhyphenblöcken infiziert wurden, sollte im Folgenden ausgeschlossen werden, dass die erhöhte Resistenz der *azi1-1* Mutanten durch ein systemisches Signal erfolgt. Hierfür wurden genauso wie in Kapitel 4.14 Agarblöcke mit Pilzhyphen auf *Arabidopsis thaliana* Rosettenblätter gelegt. Jedoch wurden zum Vergleich auch Pflanzen mit nur einem Block infiziert und darauffolgend die erhaltenen Läsionsgrößen detektiert.

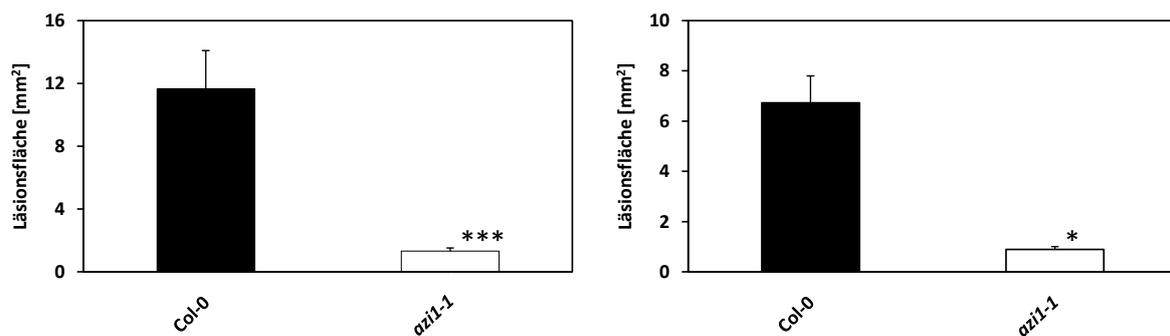


Abbildung 4.29 Läsionsfläche in mm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WTs und der *azi1-1* Mutante. Auf die Blätter wurden Hyphen besiedelte Agarblöcke von *Sclerotinia sclerotiorum* gesetzt und nach 48 Stunden die Läsionsflächen ermittelt. a) zeigt die gemessenen Läsionsflächen von WT und *azi1-1* Pflanzen infiziert mit zwei Agarblöcken. b) zeigt die gemessenen Läsionsflächen von WT und *azi1-1* Pflanzen infiziert mit nur einem Agarblock. (MW + SE, n = 12, \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,005 Student's t-test)

Dabei zeigt sich, dass auch nach der Infektion eines einzelnen Blattes einer Pflanze sich die erhöhte Resistenz in *azi1-1* ausbildet. In beiden Fällen weist die *azi1-1* Mutante signifikant reduzierte Läsionsgrößen im Gegensatz zum WT auf. Die gesteigerte Resistenz der Knockout Linie ergibt sich also nicht aus der Induktion dieser durch ein induziertes systemisches Signal.

## 5 Diskussion

### 5.1 Gewebespezifische Expression und intrazelluläre Lokalisation von LTPIV.4 und AZI1 in *Arabidopsis thaliana*

Alle LTPs besitzen eine 7-49 Aminosäuren lange Signalsequenz am N-terminalen Ende, welche den primären Transport in das ER initiiert (Arondel et al., 2000). Auch der weitere Transport ausgehend vom ER über das Golgi-Netzwerk in den extrazellulären Raum konnte für einige LTPs belegt werden (Kader, 1996). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die intrazelluläre Lokalisation von AZI1 und LTPIV.4 in *Arabidopsis thaliana* im ER bestätigt werden (Abbildung 4.3, 4.24). Dies spiegelt sich auch in weiteren Erkenntnissen über die Lokalisation von DIR1 und AZI1 in transient transformierten *Nicotiana tabaccum* Blättern, wo dieselbe intrazelluläre, sowie an den Plasmodesmata konzentrierte Lokalisation aufgezeigt werden konnte, wieder (Champigny et al., 2011; Yu et al., 2013). Möglicherweise transportiert LTPIV.4 cytoplasmatisch Lipide oder Lipid ähnliche Stoffe in der Zelle oder auch über die Plasmodesmata zwischen mehreren Zellen. Eine apoplastische Funktion ist jedoch auch nicht auszuschließen.

Die gewebespezifische Expression von LTPs in *Arabidopsis thaliana* ist bisher kaum untersucht. Die weitreichendste Untersuchung dazu wurde von Chae et al 2010 durchgeführt, bei der diese zeigen konnten, dass einige LTPs, die zur Unterklasse der SCA (stigma/style cysteine-rich adhesin) ähnlichen LTPs gehören, in den unterschiedlichsten Geweben und Bedingungen exprimiert werden (Chae et al., 2010). Dabei wurden Promoterabschnitte von 1,4 bis 2,1 kb für die verschiedenen LTPs eingesetzt. Im Gegensatz dazu, zeigt DIR1 eine unspezifische Promoteraktivität (Promotersequenzlänge 1266 bp) in allen lebenden pflanzlichen Geweben (Champigny et al., 2011). In dieser Arbeit konnte die spezifische Expression von LTPIV.4 vor allem in jungen sich entwickelnden Blättern am Leitgewebe bzw. in den Begleitzellen des Phloems detektiert werden. Dies könnte auf eine spezifische Funktion von LTPIV.4 möglicherweise bei der Beladung des Phloems oder dem Transport eines spezifischen Signalstoffes zum Phloem hinweisen. Auch ein Transport von LTPIV.4 im Leitgewebe ist denkbar. Jedoch konnte dies in *Arabidopsis* Phloemsexudatsanalysen nicht nachgewiesen werden (Guelette et al., 2012). Auszuschließen ist die Transportfunktion von LTPIV.4 im Leitgewebe dennoch nicht, da nur Proteine identifiziert wurden, die eine Masse von 180 bis 13 kDa besitzen und LTPIV.4 noch kleiner ist. Weiterhin wird die Detektion kleiner Proteine, wie LTPs, mittel MALDI-TOF-MS durch die geringe Fragmentierung während des tryptischen Verdaus erschwert.

## 5.2 LTPIV.4 in der *Pseudomonas* Resistenzreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass LTPIV.4 für die Ausbildung der lokalen Resistenz gegen zwei unterschiedliche *Pseudomonas syringae* Stämme notwendig ist und die Überexpression von LTPIV.4 zu einer gesteigerten Pathogenresistenz (*Pseudomonas*) führt (Abbildung 4.8, 4.10). Daraus kann für LTPIV.4 auf eine spezifische Funktion in der Abwehr gegen biotrophe Pathogene, wie *Pseudomonas*, geschlossen werden. Diese Erkenntnisse decken sich mit Untersuchungen eines weiteren LTPs (LTP2) aus Gerste, welches durch konstitutive Expression zu einer erhöhten Resistenz gegen *Pseudomonas* in Tabak und *Arabidopsis* führt (Molina and Garcia-Olmedo, 1997). Für weitere LTPs, wie AZI1 oder DIR1, konnte eine Funktion in der pflanzlichen Immunantwort in *Arabidopsis* gezeigt werden, jedoch sind diese nicht an der Ausbildung der lokalen Resistenz beteiligt (Maldonado et al., 2002; Jung et al., 2009; Zoeller et al., 2012). Trotz der im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Funktion von LTPIV.4 in der lokalen Resistenz muss eine allgemeine Rolle aller LTPs in der lokalen Immunantwort in *Arabidopsis thaliana* ausgeschlossen werden.

## 5.3 LTPIV.4 und AZI1 in der Abwehrreaktion gegen *Sclerotinia sclerotiorum*

Ein natürlicher Pflanzenbefall ist nicht nur durch biotrophe, sondern auch durch nekrotrophe Pathogene, welche sich im Gegensatz zu den Biotrophen in den Pflanzenzellen parasitär von abgestorbenen Zellkompartimenten ernähren und somit den Wirt abtöten, möglich. Ein solch nekrotropher Pilz ist beispielsweise *Sclerotinia sclerotiorum*. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für LTPIV.4 kein Einfluss auf den Befall von *Arabidopsis thaliana* mit *Sclerotinia* festgestellt werden (Abbildung 4.11). Im Vergleich dazu zeigt AZI1, welches keine Funktion in der lokalen Resistenz gegen biotrophe Pathogene hat, einen stark fördernden Effekt auf die *Sclerotinia* Ausbreitung, welcher nicht durch ein systemisches Signaling erzeugt wird (Abbildung 4.28, Abbildung 4.29). AZI1 besitzt demnach einen Einfluss auf das Pilzwachstum von *Sclerotinia sclerotiorum*. Es existieren weitere Hinweise auf eine Funktion von AZI1 in der spezifischen Abwehr von nekrotrophen Pathogenen. Chassot et al. konnten diesbezüglich konträr zu den in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass die konstitutive Expression von AZI1 eine erhöhte Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegen den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* induziert (Chassot et al., 2007). Jedoch wurde von Chassot et al. weder die Genexpression der AZI1 konstitutiv exprimierenden Pflanzenlinien getestet, weshalb sich ein möglicher Silencingeffekt nicht ausschließen lässt, noch wurden für die durchgeführten Versuche *azi1-1* Knockoutpflanzen verwendet. Die in dieser Publikation getesteten Linien waren leider

abhanden gekommen und konnten deshalb nicht für die Resistenzversuche mit *Sclerotinia* herangezogen werden. Das einige LTPs wichtig für die Lipidzusammensetzung der Kutikula sind, hat sich auch durch Versuche mit LTPG1 in *Arabidopsis* bestätigt (Lee et al., 2009). Die verminderte Genexpression von LTPG1 führt aufgrund der unterschiedlichen Kutikulazusammensetzung zu einer erhöhten Suzeptibilität gegen den nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* (Lee et al., 2009). Möglicherweise ist AZI1 auch an der Ausbildung der Kutikula beteiligt und der Knockout bzw. die konstitutive Expression führt zu strukturellen Veränderungen der Kutikula und damit einhergehend zu einer Änderung der Angriffsfläche für die Pilze. Die unterschiedliche Reaktion der AZI1 Mutanten gegen die verschiedenen Pilze könnte auf keine direkte Funktion in der Pilzabwehr hinweisen, sondern eher auf eine durch strukturelle Änderungen hervorgerufenen Effekt, welcher die Pilzansiedelung oder das Eindringen erleichtert bzw. erschwert. Ein solcher Effekt konnte schon bei der Anhaftung von *Blumeria graminis* auf Gerste durch die Veränderung der kutikulären Schicht beobachtet werden (Zabka et al., 2008).

#### **5.4 Die AZI1 Funktion in der *Arabidopsis* Verwundung**

Neben der Verwundung durch herbivore Schädlinge, wie beispielsweise Insekten, löst auch die mechanische Verwundung in Pflanzen einen Verwundungsreiz aus. An der daraus resultierenden Verwundungsstelle besteht ein erhöhtes Risiko eines bakteriellen oder fungalen Pathogenbefalls. In der durch den Verwundungsreiz induzierten Wundantwort in Pflanzen spielen vor allem, wie auch bei dem Befall mit nekrotrophen Pathogenen, Jasmonate eine wichtige Rolle (Leon et al., 2001). Vorangegangene Studien zeigten einen endogenen Anstieg an Jasmonaten nach Verwundung sowie die Regulation verschiedener verwundungsassoziierter Gene durch die Applikation von Methyljasmonat (MeJA) (Farmer and Ryan, 1990; Mason and Mullet, 1990; Creelman et al., 1992). Die Verwundung der Pflanze führt über einen Jasmonatanstieg zu unterschiedlichen Strategien, die zum Schutz vor Stressoren dienen. Beispielsweise wird die Biosynthese von unterschiedlichen Sekundärmetaboliten, wie Proteinase-Inhibitoren oder Glukosinolaten, induziert oder auch Abwehrstoffe, wie Defensine oder Thionine, gebildet (Farmer and Ryan, 1990; Bohlmann et al., 1998; Wasternack and Hause, 2000; Pauwels et al., 2009). Die fundamentale Rolle von Jasmonaten in der pflanzlichen Verwundungsantwort bestätigt sich auch durch die empfindlichere Reaktion auf einen Befall durch herbivore Pathogene von Pflanzen mit Defekten in der JA-Biosynthese oder Signaltransduktion im Gegensatz zu intakten Pflanzen (Leon et al., 2001; Wang et al., 2008). Während *AZI1* nach Verwundung eine sehr starke Induktion zeigt, ist *LTPIV.4* nur wenig beeinflusst (Heß, 2011). Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Jasmonatspiegel von JA, JA-Ile und OPDA in der

*azi1-1* Mutante zeigen erhöhte Basallevel, sowie nach Verwundung anfänglich erhöhte Oxylipingehalte (Abbildung 4.25, Abbildung 4.26). AZI1 ist demnach ein möglicher negativ Regulator der basalen Jasmonatgehalte in *Arabidopsis thaliana* Blättern. Nachdem die Verwundungsreaktion und die damit verbundene JA-Akkumulation auftritt, wird zusätzlich *AZI1* exprimiert (ca. 6 h nach Verwundung), um möglicherweise die Jasmonat *de novo* Synthese zu stoppen und die Hormongehalte wieder auf basale Gehalte herunter zu regulieren. Dabei könnte AZI1 möglicherweise den Transport von OPDA zu den Peroxisomen stoppen und somit die JA-Biosynthese anhalten oder es könnte nach der Verwundung Kutikular- oder Membranbruchstücke (DAMPs) binden und dadurch Signalkaskaden auslösen, welche antagonistisch auf die JA Biosynthese wirken könnten. Ein bekannter Regulator für die *AZI1* Genexpression ist die Dicarbonsäure AzA, welche an der Ausbildung der SAR in *Arabidopsis* beteiligt ist, jedoch ist die direkte Induktion von *AZI1* durch AzA umstritten (Jung et al., 2009; Zoeller et al., 2012; Yu et al., 2013). Diese Arbeit konnte zeigen, dass der Knockout von AZI1 keinen Einfluss auf die AzA und PIM Gehalte nach Verwundung besitzt, da sich die Dicarbonsäurelevel in der *azi1-1* Mutante im Vergleich zum Wildtyp kaum ändern. Jedoch sind die PIM-Gehalte in der *azi1-1* Mutante durch die Verwundung leicht erhöht (Abbildung 4.27). PIM ist ein Vorläufermolekül im Biosyntheseweg von Biotin (Zoeller et al., 2012). Dieses Vitamin ist involviert in viele metabolische Prozesse (Lin and Cronan, 2011). Weiterhin hat die Mutation eines essentiellen Enzyms für die Biotin Biosynthese neben einer starken ROS Akkumulation auch einen spontanen SA/NPR1-unabhängigen PCD Phänotyp gezeigt (Li et al., 2012). Nachdem während der Verwundung sowohl ROS akkumulieren, als auch Zelltod ausgelöst wird, ist es möglich, dass die Steigerung der PIM-Level auf eine mögliche regulatorische Funktion von Biotin bei der Verwundungsantwort hindeutet. Dies ist bis jetzt jedoch nicht genauer untersucht.

## 5.5 LTPIV.4 in der Hormon-induzierten und primären Immunantwort

Da für LTPIV.4 im Gegensatz zu AZI1 eine Funktion in der lokalen Immunantwort gegen vir *Psm* belegt werden konnte, wurde ausschließlich LTPIV.4 für weiterführende Analysen herangezogen. Frühere Untersuchungen zeigen, dass gegen Pseudomonaden die Gen für Gen Resistenz sehr effektiv ist (Glazebrook, 2005). Beispielsweise weist die *avrRpm1-RPM1* Interaktion von *avr Psm* Bakterien eine vielfache Reduktion der relativen Bakterienzahl in infizierten Blättern im Gegensatz zu dem virulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 auf (Glazebrook, 2005). Eine weitere wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Eindämmung des Bakterienwachstums in *Arabidopsis* spielt der SA-abhängige Signalweg (Pieterse et al., 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit analysierten Phytohormongehalte in *Arabidopsis thaliana* nach der Infektion mit *Pseudomonas syringae* zeigen

eine von LTPIV.4 unabhängige Akkumulation von SA nach der Infektion (Abbildung 4.12). Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen verbunden mit den Beobachtungen von Heß 2010 den Rückschluss zu, dass nicht nur die Genexpression von *LTPIV.4* durch SA induziert wird, sondern auch das LTPIV.4 keinen regulatorischen Einfluss auf die erhaltenen SA-Gehalte hat. Die SA-abhängige Funktion von LTPIV.4 muss somit nach der Pathogen-induzierten Akkumulation von SA erfolgen. Weiterhin wird das Wachstum von *Pseudomonas* in Pflanzen schon durch die exogene Applikation von SA oder SA-Analoga gehemmt (Cao et al., 1994; Lawton et al., 1996). Der Effekt (Abbildung 4.12), dass in der *ltpIV.4* Mutante 48 Stunden nach der Infektion die Gehalte an OPDA, dnOPDA und JA-Ile im Vergleich zu den beiden anderen Phänotypen niedriger, die JA-Gehalte aber gleich sind, weisen möglicherweise auf eine späte regulatorische Funktion von LTPIV.4 im JA-Biosyntheseweg nach *Pseudomonas*infektion hin. Dieselbe Akkumulation von Jasmonaten (JA, OPDA) konnte schon in einer weiteren Studie mit avirulenten *Psm* Bakterien in Kartoffel festgestellt werden (Landgraf et al., 2002). Dem hingegen zeigt die Aktivierung des SA-Signalwegs in *Arabidopsis thaliana* durch virulente *Pst* eine Unterdrückung des JA-Signalwegs und führt weiterhin zu einer lokal erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Alternaria brassicicola* (Spoel et al., 2007). Diese Studie zeigt weiterhin, dass avirulente *Pseudomonas* den JA-Signalweg nicht unterdrücken, sondern eine Akkumulation von JA hervorrufen. Die These von Spoel et al., dass die JA Akkumulation nur aufgrund der Induktion des PCD durch die avirulenten Bakterien hervorgerufen wird, um das Wachstum von vom PCD profitierenden nekrotrophen Pathogenen zu inhibieren, konnte weder durch die in dieser Arbeit gefundenen Beobachtungen mit LTPIV.4, noch durch eine Studie in Kartoffel bestärkt werden (Landgraf et al., 2002; Spoel et al., 2007). Möglicherweise ist die unterschiedliche Hormonakkumulation alleine durch die verschiedenen Pathovaren hervorgerufen oder im Falle von LTPIV.4 könnte diese LTP einen späten regulatorischen Effekt auf den JA-Signalweg ausüben.

Durch die *Pseudomonas*infektion und dem damit einhergehenden schnellen Anstieg der SA-Hormongehalte erfolgt über die Interaktion von NPR1 mit verschiedenen TGA-Transkriptionsfaktoren die Aktivierung SA-responsiver Gene, wie beispielsweise *Pr1* (Pieterse et al., 2009). Die untersuchten SA-Markergene (Abbildung 4.14) zeigen alle eine Induktion 24 Stunden nach der Infektion mit *Pseudomonas*. Die Expressionen von *CBP60g* und *SID2* zeigen keine deutlichen Unterschiede zwischen den verschiedenen LTPIV.4 Phänotypen. *Sid2* kodiert für eine Isochorismat-Synthase, welche in der SA-Biosynthese die Reaktion von Isochorismat zu Chorismat katalysiert und notwendig ist für die SA Akkumulation nach Bakterieninfektion (Wildermuth et al., 2001). *Cbp60g* kodiert für ein durch MAMPs stark induziertes Calmodulin (CaM) Bindeprotein (Wang et al., 2009). *cbp60g* Pflanzen weisen weiterhin eine verringerte *SID2* Induktion und SA Akkumulation auf (Wang et al., 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen den Rückschluss zu, dass LTPIV.4 nicht in

der Biosynthese von SA involviert ist und darauf auch nicht als positiv Regulator wirkt. Der größte Unterschied wird bei der *PR1* Expression ersichtlich. Die konstitutive Expression von *LTPIV.4* führt zu einer wesentlich stärkeren *PR1* Expression 48 Stunden nach der Infektion im Vergleich zu den beiden anderen Phänotypen. Dies geht einher mit der verminderten Besiedlungsdichte in diesen Pflanzen. Die vermehrte Menge an *LTPIV.4* Transskript wirkt hierbei als positiv Regulator von *PR1* und führt zu einer stärkeren Induktion der *PR1* Expression. *LTPIV.4* lässt sich hierbei genauso wie *PR1* als SA-responsives Gen einordnen, welches entweder direkt von SA oder durch den weiteren NPR1/TGA-Signalweg induziert wird. Die *LTPIV.4* Genexpression könnte dabei direkt durch einen TGA-Transkriptionsfaktor ausgelöst werden oder es bleibt weiter denkbar, dass *LTPIV.4* durch weitere über den SA-Signalweg regulierte, NPR1 unabhängige Proteine induziert wird.

Um eine Funktion von *LTPIV.4* in Bezug auf den JA-Signalweg nach *Pseudomonas*infektion auszuschließen, wurden in dieser Arbeit (Abbildung 4.14) auch JA-responsive Gene, wie *VSP2*, *PDF1.2* sowie ein Biosynthesegen (*LOX2*) analysiert. Die erhaltenen Daten spiegeln den schon gezeigten, gleichen Phänotyp des antagonistischen Verhaltens zwischen der *PR1* und der *LOX2*, *PDF1.2* und *VSP2* Genexpression nach *Pseudomonas*infektion wieder (Spoel et al., 2003). Daraus resultiert, dass *LTPIV.4* weder für die JA-Biosynthese, noch den JA-abhängigen Signalweg einen Einfluss nach der Infektion mit biotrophen Pathogenen besitzt.

Da die konstitutive Expression von *LTPIV.4* zu einer deutlich erhöhten Resistenz gegen vir *Pseudomonas* geführt hat, war es weiterhin interessant, ob dieses LTP neben der Funktion im SA-induzierten Signalweg auch noch in weiteren Pathogen-assoziierten Mechanismen eine Rolle spielt. Dabei konnte eine Funktion in oder für die Induktion der MTI ausgeschlossen werden. *Wrky22* als Markergen für die MTI zeigt im gesamten Verlauf keinen Unterschied zwischen den einzelnen *LTPIV.4* Phänotypen und somit auch keine Abhängigkeit der MTI in Bezug auf *LTPIV.4* (Abbildung 4.15). Die Genexpressionsdaten von *Sag13* als Markergen für die Formierung des PCD und *Oxi1* für die Akkumulation von ROS zeigen für *LTPIV.4* einen möglichen positiven bzw. verstärkten Effekt auf die Ausbildung von ROS verbunden mit deren Erkennung durch OXI1 und auf die Initiation des PCD. Die dadurch stärker induzierten Abwehrreaktionen führen zu einer verstärkten Hemmung der Bakterienvermehrung und -ausbreitung. Der „oxidative burst“ ist ein sehr schneller Signalweg in der primären Abwehrreaktion, bei dem reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie  $H_2O_2$ , HO,  $^1O$  und  $O_2^-$ , gebildet werden, die vermutlich vorwiegend über Lipidperoxidation direkt Zelltod auslösen (Mur et al., 2008). Die Akkumulation von ROS führt in infizierten Pflanzengewebe zu einer Induktion der *OXI1* Genexpression in *Arabidopsis thaliana* über den AtrbohD NADPH-Oxidase Mechanismus (Petersen et al., 2009). Noch dazu spielt OXI1 sowohl bei der basalen Resistenz als auch bei der ETI gegen *Pseudomonas syringae* eine Rolle (Petersen et al., 2009). Diese Reaktion ist eines der

bekanntesten Merkmale der Pathogenabwehr bei dem die transiente inter- und intrazelluläre Bildung von ROS auch mit der Ausbildung des PCD assoziiert ist (Petersen et al., 2009). Unklar ist dabei, ob ROS bei der Initiation und/oder der Transduktion des PCD beteiligt ist (Baker and Orlandi, 1995; Heath, 2000; Mur et al., 2008). Nicht nur die Infektion mit avirulenten Pathogenen kann Zelltod auslösen, auch virulente Pathogene nutzen den PCD für ihre Vermehrung und Ausbreitung in der Wirtspflanze (Mur et al., 2008; Torres, 2010). Ein charakteristischer Unterschied zeigt sich jedoch im zeitlichen Verlauf der verschiedenen Formen des Zelltods (Berger et al., 2007). Während avirulente Pathogene einen schnellen Zelltod auslösen und damit eine Eindämmung der Ausbreitung einhergeht, zeigen Virulente eine verzögerte, dafür aber eine aggressivere Form des PCD (Peer, 2010).

## 5.6 LTPIV.4 in der systemischen Resistenz

Auch in der systemischen Resistenz von *Arabidopsis thaliana* konnte schon eine LTP-Funktion detektiert werden. Für DIR1 konnte beispielsweise gezeigt werden, dass nach einem funktionellem Knockout keine Ausbildung eines systemischen Signals für die Induktion der SAR mehr ersichtlich ist (Maldonado et al., 2002). Jedoch wurde kein Unterschied in der lokalen Pathogenresistenz festgestellt (Maldonado et al., 2002). Im Gegensatz dazu besitzt das in dieser Arbeit untersuchte LTPIV.4 keine funktionelle Rolle in der Ausbildung der systemischen Resistenz nach der Infektion mit Pseudomonaden (Abbildung 4.16). Die 35S::LTPIV.4 Linie zeigt keinen Unterschied in ihrer geringen Besiedlungsdichte zwischen bakteriell oder Puffer vorgebehandelten Blättern. Die Überexpressionsmutante scheint sich demnach konstant in einem Zustand zu befinden, welcher einer systemischen Resistenz gleicht. Noch dazu ergibt der funktionelle Knockout (Abbildung 4.16) keinen Defekt in der Ausbildung einer systemisch induzierten Resistenz nach Psm Behandlung. Nachdem ein lokaler Pflanzenbefall zur Ausbildung des systemischen Signals führt, erfolgt durch dieses im distalen Gewebe eine koordinierte Aktivierung einer Reihe von PR-Genen (Durrant and Dong, 2004). Viele dieser PR-Gene kodieren für Proteine mit antimikrobieller Aktivität (van Loon et al., 2006). Einige Studien sowie Microarray Daten zeigen, dass die *PR1* Expression durch Bakterienbehandlung in nicht-infiziertem Blattgewebe stark induziert wird (Gruner et al., 2013; Song et al., 2004). Eine solch starke Induktion von *PR1* konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden (Abbildung 4.17). Jedoch kommt es zu einer Erhöhung der Transskriptlevel in distalen WT-Blättern nach Behandlung mit avirulenten Psm Bakterien. In dieser Arbeit ergibt sich auch durch die SAR eine Induktion der *LTPIV.4* Genexpression in systemischen Blättern des WT und der 35S::LTPIV.4 Mutante (Abbildung 4.17). Die jedoch niedrigen *PR1* und *LTPIV.4* Transskriptlevel in diesem Versuch sind

möglicherweise durch eine schlechte Bakterienvitalität begründet. Eine Funktion von LTPIV.4 innerhalb des Primings von systemisch induzierten Gewebe in *Arabidopsis thaliana* ist durch die erhaltenen Ergebnisse denkbar, jedoch ist eine valide Aussage nicht möglich, da dieser Versuch bisher nur einmal durchgeführt wurde.

## 5.7 LTPIV.4 Substratcharakterisierung

Wie bereits erwähnt, ergeben sich aus den Unterschieden innerhalb der Aminosäuresequenzen der Bindungstaschen von LTPs auch Substratspezifitätsunterschiede (Kapitel 1.1.1). Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Substratspezifität von LTPIV.4 mittels Fat Western Blot ermittelt werden. Der Fat Western Blot eignet sich jedoch nicht zur exakten Quantifizierung der Interaktionsstärke, da die Spots sich in Größe und Stärke nicht maßgeblich unterscheiden (Abbildung 4.20). Jedoch zeigt diese Methode ohne Signalverlust bei niedrigerer Lipidkonzentration ein gleichbleibendes Lumineszenzsignal. Vorhergehende Studien mit anderen Methoden konnten eine Korrelation zwischen der Kettenlänge der freien Fettsäuren und der Affinität der LTP-Substratbindung nachweisen. Für ein LTP (nsLTP1) aus Weizen wurde beispielsweise gezeigt, dass mit zunehmender Kettenlänge (C12-C16) die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) kleiner wird ( $>1$  mM - 0,3 mM) (Douliez et al., 2000). Auch Lascombe et al. konnten im Jahre 2008 schon für DIR1 dieselbe Korrelation anhand von Lysophosphatidylcholinen der Kettenlängen C14-C18 nachweisen (Lascombe et al., 2008). Diese Arbeit zeigt, dass die Bindungsaffinität von DIR1 mit freien Fettsäuren ein noch größeres Spektrum aufweist, als bisher vermutet (Abbildung 4.19). DIR1 zeigt eine Interaktion mit gesättigten Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16-30 C-Atomen, ob auch noch langkettigere Fettsäuren gebunden werden wurde nicht getestet. Im Gegensatz dazu zeigt LTPIV.4 eine erhöhte Affinität für freie Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 18 bis 28 C-Atomen. LTPIV.4 ist damit spezifischer als DIR1 bei der Bindung freier gesättigter Fettsäuren. Jedoch bestehen pflanzliche Lipide nicht nur aus deren Acylketten, sondern auch aus den verschiedenen Kopfgruppen und darüber hinaus haben die meisten Lipide mehr als eine Acylkette. Deshalb ist es notwendig zur exakten Definition der Substratspezifität unterschiedliche Lipide zu untersuchen. Derzeit sind einige weitere Lipide bekannt die in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen bzw. nach dem Pathogenbefall akkumulieren und deshalb auch als mögliche Signalstoffe dienen. Die gewonnenen Daten der *in vitro* Bindestudien zeigen das LTPIV.4 potentiell in der Lage ist verschiedene Lipide mit einer Rolle in der pflanzlichen Reaktion nach Pathogenbefall zu binden, beispielsweise PAs (Tabelle 4.1, Abbildung 4.23). Nicht nur das zwei Type III Effektor Proteine (avrRpm, avrRpt2) aus *Pseudomonas syringae* oder ein Effektor (Avr4) aus *Cladosporium fulvum* eine PA Antwort in der Wirtspflanze auslösen, PAs akkumulieren in Tomaten

Zellkulturen auch auf die Stimulation durch verschiedene PAMPs wie Flagellin oder Xylanase (van der Luit et al., 2000; de Jong et al., 2004; Andersson et al., 2006). Weiterhin führt die direkte Applikation von PAs in Blätter zu einer Induktion von Pathogenabwehr-assoziierten Genen und PCD (Park et al., 2004; Andersson et al., 2006). Unklar dabei ist wie PAs aufgenommen werden und in welcher Membran oder Zelle deren Zielorte sind oder sie weiter metabolisiert werden (Testerink and Munnik, 2011). Dem hingegen zeigen getestete, an der SAR beteiligte Metabolite (G3P, SA, AzA) keine Affinität zu LTPIV.4. Pipecolinsäure und Dehydroabiental wurden dabei nicht getestet da sie strukturell der SA/einem Sterol sehr ähnlich sind und deshalb vermutet wird, dass diese nicht gebunden werden.

Aus den gewonnenen Daten des ungerichteten Metabolomscreenings ist es möglich potentielle Interaktionspartner von LTPIV.4 zu identifizieren, da durch das Fehlen des LTPs sich Unterschiede in der Lipidmenge ergeben. Auch zeigen sich Übereinstimmungen mit Daten aus den *in vitro* Bindestudien (PGs, MGDG, DGDG). Möglicherweise findet in der Knockout Mutante ein verlangsamter Transport dieser Lipide statt und daraufhin akkumulieren sie. Jedoch kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob diese identifizierten Lipide *in vivo* Substrate von LTPIV.4 sind.

In dieser Arbeit konnte eine mögliche Beteiligung von LTPIV.4 an der Regulation des PCD gezeigt werden. Weiterhin ist LTPIV.4 in der Lage *in vitro* zwei getestete, verschiedene PAs zu binden, daher wäre es möglich, dass LTPIV.4 PAs nach Pathogeninfektion auch *in vivo* transportiert und dadurch der Signalweg für die Induktion des PCD verstärkt wird. Desweiteren interagiert LTPIV.4 auch mit einer Lösung verschiedener MGDGs und DGDGs extrahiert aus Weizen und verschiedenen PGs. Für diese Lipidklassen konnten Zöller et al. 2012 nach einer Infektion mit avr *Pst* eine Akkumulation von mehrfachungesättigten MGDGs, DGDGs und PGs zeigen (Zoeller et al., 2012). Dabei ist noch ungewiss, ob der Anstieg der Lipidgehalte in infizierten Blättern auf einer *de novo* Synthese oder einen Lipid-Katabolismus zurückzuführen ist (Zoeller et al., 2012). Durch diese Erkenntnisse wird die Annahme LTPIV.4 könnte *in vivo* durch eine Bakterieninfektion hervorgerufene mehrfachungesättigte Lipide transportieren und im weiteren davon abhängige Signaltransduktionswege induzieren, welche zu einer erhöhten Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen führt, zusätzlich bestärkt.

## 5.8 Modell für die Funktion von LTPIV.4 in der pflanzlichen Immunabwehr

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten, sowie Erkenntnissen aus der aktuellen Literatur kann folgendes Modell über die Funktion von LTPIV.4 aufgestellt werden.

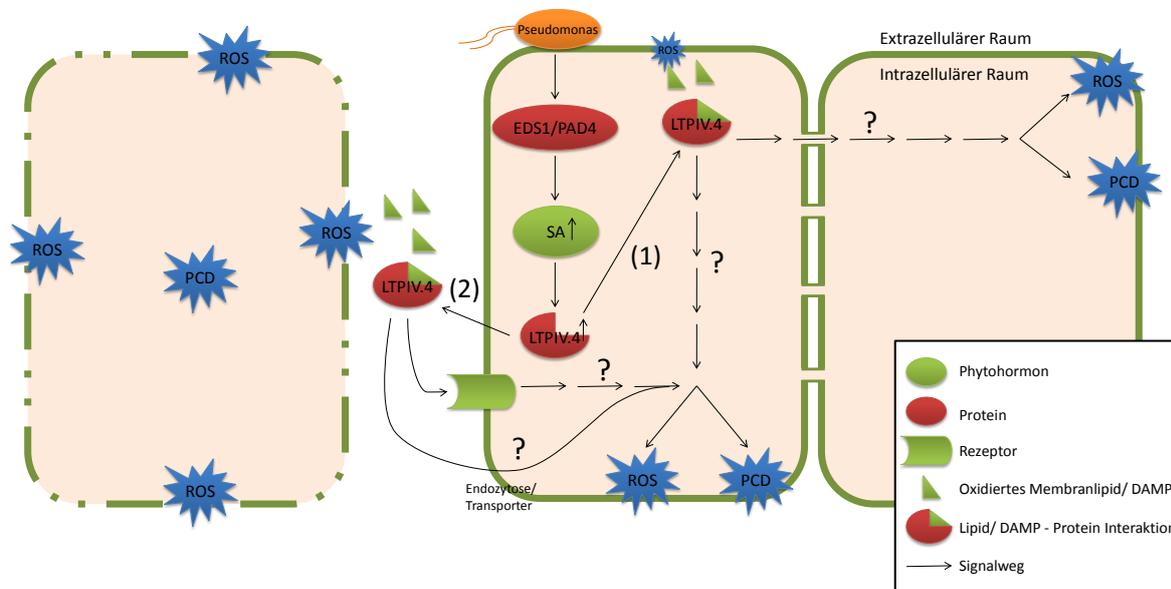


Abbildung 5.1 Modell der Funktion von LTPIV.4 in der pflanzlichen Immunabwehr. Die Infektion mit *Pseudomonas* induziert über die Proteininteraktion von EDS1 und PAD4 eine Salicylsäureakkumulation, welche im Weiteren zu einer gesteigerten LTPIV.4 Expression führt. Anschließend erfolgt die Translokation von LTPIV.4 über das ER in das Zytoplasma (1). Dort interagiert LTPIV.4 mit durch ROS gebildeten, oxidierten Lipiden oder DAMPs aus der Plasmamembran und löst durch die Interaktion in der infizierten Zelle oder in intakten Nachbarzellen durch eine weitere Signaltransduktionskaskade den programmierten Zelltod (PCD) sowie eine erhöhte ROS Bildung aus. Wie sich aus den *in vitro* gewonnenen Daten gezeigt hat, wären mögliche Lipid-Interaktionspartner PAs oder OPDA. Ein weiteres mögliches Szenario (2) wäre der Transport von LTPIV.4 in den extrazellulären Raum. Dort könnte das LTP spezifisch mit oxidierten Lipiden oder DAMPs von abgestorbenen Nachbarzellen interagieren, diese einem Rezeptor präsentieren und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade mit Initiierung des PCD sowie erhöhter ROS-Bildung auslösen. Neben der Rezeptorpräsentation wäre auch eine direkte Aufnahme der Lipid-Proteininteraktionspartner durch Endozytose oder durch einen noch unbekanntem Transporter und die anschließende Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade denkbar.

Abbildung 5.1 zeigt ein Modell zur näheren Erläuterung der Funktion von LTPIV.4 in der pflanzlichen Abwehrreaktion von *Arabidopsis thaliana*. Ausgehend von einer lokalen Infektion mit Bakterien wird eine spezifische Signalkaskade ausgelöst. Dabei fungiert EDS1 alleine als Trigger für die ETI, währenddessen die Interaktion mit PAD4 für die Ausbildung der basalen Resistenz benötigt wird (Bhattacharjee et al., 2011; Rietz et al., 2011). Bereits 2006 konnten Bartsch et al. eine Abhängigkeit der LTPIV.4 Genexpression von EDS1 und PAD4 zeigen (Bartsch et al., 2006), was die aus dieser Arbeit

resultierende Annahme, dass LTPIV.4 eine Rolle in der basalen Immunantwort in *Arabidopsis* besitzt, bestärkt. Weiterhin führt die Interaktion von EDS1 und PAD4 zu einer Akkumulation von SA und damit verbunden zur Verstärkung einer basalen Resistenz (Feys et al., 2001). Diese Arbeit konnte zeigen, dass LTPIV.4 für die Biosynthese von SA nicht benötigt wird und ebenfalls keinen Einfluss auf die Akkumulation von SA im infizierten Gewebe hat (Abbildung 4.12). Jedoch wird die Genexpression von *LTPIV.4* durch die exogene Applikation von SA stark induziert (Heß, 2011), auch das SA-abhängige Gen *Pr1* weist in der 35S::LTPIV.4 Mutante nach *Pseudomonas*-Behandlung erhöhte Transkriptlevel auf, was auf eine funktionelle Einordnung *upstream* von PR1 hindeutet. Daraus ergibt sich für LTPIV.4 eine Funktion im SA-abhängigen Signalweg nach Pathogeninfektion. Microarray Daten weisen zudem auf eine NPR1 unabhängige Induktion von *LTPIV.4* hin, da sich die Expressionslevel von *LTPIV.4* zwischen dem Col-0 WT und der *npr1* Mutante 24 Stunden nach Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326, was ungefähr dem 48 Stundenwert nach Besprühen entsprechen sollte, nicht signifikant unterscheiden (Wang et al., 2008). Möglicherweise erfolgt aber eine spätere Regulation der LTPIV.4 Proteinlevel durch NPR1. Eine exakte Einordnung in den molekularen Reaktionsweg ist mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen noch nicht vollendet. Für weitere Forschungsansätze sollten verschiedene Biosynthese- oder Signalwegs-defiziente Mutanten, wie beispielsweise *npr1* oder *rbohD* Pflanzen, herangezogen und die Genexpression von LTPIV.4 nach Pathogeninfektion in diesen Mutanten analysiert werden. Die konstitutive Expression von LTPIV.4 führt zu einem verstärkenden Effekt auf die Genexpression spezifischer Markergene für den oxidativen Stress und den PCD in *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 4.15). Die durch Bakterien induzierte SA-Akkumulation und die damit einhergehende HR-Ausbildung (Heath, 2000) werden möglicherweise durch LTPIV.4 verknüpft. Dies ist durch die noch nicht endgültig geklärte subzelluläre Lokalisation von LTPIV.4 (intra- oder extrazellulär) möglich, was den Ausgangspunkt für die folgenden Szenarien bildet.

### 5.8.1 Intrazelluläre Funktion von LTPIV.4

Ausgehend von der zellulären Proteinakkumulation im ER und einer möglichen Konzentration an den Plasmodesmata ergibt sich die Möglichkeit einer symplastischen Transportfunktion von LTPIV.4. Für DIR1, einem nahen Verwandten von LTPIV.4, wurde von Chanda et al. dieselbe These aufgestellt, nachdem auch hier eine Lokalisation an den Plasmodesmata festgestellt wurde (Chanda et al., 2011). Für einige Lipide konnte bereits eine Funktion in der pflanzlichen Abwehrreaktion und der Induktion von PCD nachgewiesen werden, zum Beispiel induziert die Applikation von PA die HR sowie spezifische Abwehrgene in *Arabidopsis* Blättern (Andersson et al., 2006; Kachroo and Kachroo, 2009).

Anhand dessen kann die Hypothese aufgestellt werden, dass LTPIV.4 im Symplasten während der Bakterieninfektion spezifische Lipide binden und transportieren könnte. Hierbei könnte es sich beispielsweise um nach Erkennung von PAMPs durch erhöhte ROS-Spiegel gebildete, oxidierte Lipide, wie beispielsweise PAs, oder auch um DAMPs handeln. Anschließend könnte diese Interaktion zu einer intrazellulären Signalkaskade führen, durch die weitere Faktoren für einen verstärkten PCD und eine verstärkte ROS-Akkumulation gebildet werden. Im Weiteren wird diese These durch die gewonnenen *in vitro* Interaktionsdaten von LTPIV.4 mit potentiellen Signallipiden wie PAs oder OPDA gestützt. Wie von Zoeller et al. gezeigt wurde, werden oxidierte Lipide, wie beispielsweise AzA, nach der Bakterieninfektion verstärkt gebildet und führen so zu einer oxidativen Membranschädigung und Zelltod (Zoeller et al., 2012). Auch für PAs konnte bereits gezeigt werden, dass diese in *Arabidopsis* Blättern durch die Aktivierung eines Rho-gekoppelten-kleinen-G-Proteins und damit eines GTPase-vermittelten Signalwegs für die Bildung von ROS Zelltod auslösen können (Park et al., 2004). Neben der Präsentation der oxidierten Lipide oder DAMPs könnte jedoch auch ein symplastischer Transport dieser durch LTPIV.4 zu den Nachbarzellen erfolgen und dort ROS bildende bzw. PCD induzierende Mechanismen auslösen, um eine verstärkte Bakterienreduktion zu bewirken.

### 5.8.2 Extrazelluläre Funktion von LTPIV.4

Ein zweites Szenario ergibt aus einer möglichen apoplastischen Lokalisation von LTPIV.4. Aufgrund der Signalsequenz wird LTPIV.4 im ER gebildet. Weiterhin weist das in *Arabidopsis* exprimierte LTPIV.4 Fusionsprotein eine ER Lokalisation auf (Abb. 4.3). Da LTPIV.4 kein ER-Retentionssignal besitzt, ist eine apoplastische Lokalisation wahrscheinlich. Für eine genauere Aussage, ob LTPIV.4 tatsächlich in den apoplastischen Raum geschleust wird, wäre es nötig entweder aus dem Apoplasten Proteinextrakte zu gewinnen und diese auf das Vorhandensein des LTPs hin mittels Western Blot zu untersuchen, oder LTPIV.4 an ein Fluorophor zu koppeln, welcher im apoplastischen Raum detektiert werden kann. Weiterhin sollte auch die Lokalisation *in vivo* nach Pathogenerkennung verfolgt werden, um eine signalabhängige Translokation zu untersuchen. Basierend auf der Annahme einer apoplastischen Lokalisation könnte LTPIV.4 DAMPs oder auch oxidierte Lipide aus bereits abgestorbenen Nachbarzellen erkennen, binden und diese Bruchstücke, ähnlich wie Elicitoren, Rezeptoren präsentieren, die in noch intakten Zellmembranen sitzen. Beispielsweise erfolgt nach der Erkennung eines apoplastischen Sphingolipid-Elicitors durch einen bisher unbekanntem Rezeptor die Ausbildung einer Pathogenresistenz in Reis (Suharsono et al., 2002). Ein weiterer Elicitor, der eine HR induziert sowie an der Pathogenabwehr in Tabak beteiligt ist, ist Cryptogein (Ricci et al., 1989). Durch die Bindung dieses Elicitors an einen spezifischen Membranrezeptor erfolgt eine aktive Stimulierung

der Clathrin-Endozytose an der Plasmamembran von Tabakzellen und darauf folgend die Bildung von ROS (Leborgne-Castel et al., 2008). Auch LTP1 aus Weizen interagiert als Antagonist von Cryptogein mit dessen Rezeptor, löst jedoch keine Signalkaskade sowie Endozytose aus (Buhot et al., 2001; Leborgne-Castel et al., 2008). Analog zu diesen Ergebnissen könnte LTPIV.4 apoplastisch mit Liganden interagieren, diese einem Rezeptor präsentieren und dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade auslösen, die zur Induktion des PCD und der vermehrten Bildung von ROS in der Zelle führt. Die gesteigerte HR in diesem Gewebe führt dann wiederum zu einer verstärkten Eindämmung der Bakterienausbreitung, was sich in den in dieser Arbeit beobachteten niedrigeren Besiedelungsdichten von *Pseudomonas* in 35S::LTPIV.4 Pflanzen niederschlagen kann. Blein et al. schlagen ein ähnliches Modell für die Bindung von durch fungale Kutinasen gebildeten Kutinmonomeren durch LTPs im Apoplasten und anschließende Präsentation an membranständige Rezeptoren vor (Blein et al., 2002). Die dadurch aktivierten Rezeptoren lösen im Weiteren eine intrazelluläre Signalkaskade für die Pathogenabwehr aus. Dadurch werden weitere LTPs als auch andere Abwehr-assoziierte Proteine, welche das Pilzwachstum unterdrücken, gebildet (Blein et al., 2002). Um die in diesem Modell vorgeschlagene apoplastische Funktion von LTPIV.4 und direkte Abhängigkeit des PCD von LTPIV.4 in *Arabidopsis* nachzuweisen, wären weitere Experimente nötig, etwa durch die Messung des Zelltods in infizierten Geweben von LTPIV.4 Mutantpflanzen. Dies erlaubt zusätzlich mit den Genexpressionsdaten nach der Infektion mit *Pseudomonas* eine deutlichere Einordnung der LTPIV.4 Funktion in Bezug auf den PCD. Dazu sollte der PCD durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmt werden. Um ebenfalls eine Aussage über die Ausbreitung des PCD geben zu können, sollten zudem auch Blätter angefärbt und tote Zellen mikroskopisch detektiert werden. Wird angenommen, dass LTPIV.4 die Ausbreitung von *Pseudomonas* im Gewebe einschränkt, ließe sich dies mit der Messung der Läsionsgrößen infizierter 35S::LTPIV.4 Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nach der Infektion mit avr *Psm* bestimmen. Eine weitere Möglichkeit, um die apoplastische Funktion von LTPIV.4 zu untermauern, wäre eine Ko-Infiltration von heterolog exprimiertem LTPIV.4 mit *Pseudomonas* oder verschiedenen Lipiden in Wildtyppflanzen um eine Induktion des PCD oder von ROS zu detektieren.

## 5.9 Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Lipid Transfer Protein LTP<sub>IV.4</sub> die Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegen biotrophe *Pseudomonas syringae* Bakterien erhöht. Im Hinblick auf die Aufklärung des zugrundeliegenden Mechanismus konnten bereits wichtige Daten gewonnen werden, dabei besitzt LTP<sub>IV.4</sub> eine SA-abhängige Rolle als Auslöser oder Verstärker der Markergenexpression für den PCD und ROS nach dem Pathogenbefall. Aus den Erkenntnissen dieser Arbeit über die Funktion von LTP<sub>IV.4</sub> in der Immunreaktion können weitere wichtige Fragestellungen abgeleitet werden. Ein erster wichtiger Punkt wäre die Aufklärung einer möglichen apoplastischen, neben der in dieser Arbeit detektierten cytoplasmatischen, Lokalisation, da dadurch das funktionelle Modell weiter spezifiziert werden könnte. Dies könnte einerseits auf das Vorhandensein von LTP<sub>IV.4</sub> in apoplastischen Proteinextrakten mittels Western Blot überprüft werden, andererseits auch mit der Kopplung von LTP<sub>IV.4</sub> an ein Fluorophor, welches im apoplastischen Raum detektiert werden kann. Noch dazu müssen für die genauere Einordnung von LTP<sub>IV.4</sub> in den molekularen Reaktionsweg Signalwegs-defiziente Mutanten auf die Genexpression von LTP<sub>IV.4</sub> nach Pathogeninfektion analysiert werden. Ein weiterer wichtiger Punkt der sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ableitet, ist der direkte Nachweis der funktionellen Abhängigkeit des PCD und der ROS Bildung/Verstärkung von LTP<sub>IV.4</sub> nach *Pseudomonas*infektion. Hierfür wäre es notwendig den zeitlichen Verlauf der LTP<sub>IV.4</sub> Expression und die Proteinlokalisierung im Blatt nach Pathogenbefall zu untersuchen. In diesem Zuge wäre auch zu untersuchen, ob LTP<sub>IV.4</sub> einen direkt hemmenden Effekt auf das Bakterienwachstum ausübt, beispielsweise durch *in vitro* Wachstumstests mit *Pseudomonas*. Für die Identifikation von LTP<sub>IV.4</sub> *in vivo* Substraten wären *pull down* Experimente sinnvoll. Aufgereinigte LTP<sub>IV.4</sub>-Proteinextrakte aus 35S::LTP<sub>IV.4</sub> Pflanzen könnten mit und ohne Stresstimulus massenspektrometrisch verglichen und somit das Spektrum an möglichen Substraten detektiert, identifiziert und eingegrenzt werden.

Durch die Untersuchungen von AZI1 konnte neben der Identifikation der Lokalisation in *Arabidopsis* auch aufgedeckt werden, dass *azi1-1* Pflanzen resistenter als der Wildtyp gegen den *Sclerotinia sclerotiorum* Befall sind. Zukünftig wäre es darauf aufbauend einerseits interessant 35S::AZI1 Überexpressionslinien hinsichtlich ihres Phänotyps nach *Sclerotinia* Befall zu charakterisieren, andererseits auch die Genexpression von spezifischen Markergenen zu betrachten und damit die dahinterliegenden Reaktionsmechanismen zu identifizieren. Ein weiterer interessanter Aspekt in diesem Zusammenhang ist die Aufklärung der Kutikulazusammensetzung bzw. der kutikulären Struktur in der *azi1-1* Mutante, da AZI1 möglicherweise an dem Transport von Kutikulamonomeren oder dem strukturellen Aufbau der Kutin- und Suberinschicht beteiligt ist (Chassot et al., 2007). Das

Fehlen dieses Proteins könnte zu einer strukturellen Veränderung der Kutikula führen, was sich in Folge auch auf die Barriereneigenschaft gegen das Eindringen von Pathogenen positiv auswirken könnte. Für die weitere funktionelle Einordnung von AZI1 bezüglich der Funktion in der pflanzlichen Verteidigungsreaktion wären auch die Betrachtung einer AZI1 Überexpressionslinie sowie die Expression verschiedener Markergene von großem Interesse.

Die vorliegende Arbeit konnte einen wichtigen Beitrag für die Einordnung von zwei LTPs in die pflanzliche, stressinduzierte Abwehrreaktion leisten. AZI1 und besonders LTPIV.4 stellen dabei wichtige Ansatzpunkte für die Erforschung von stressinduzierten Transport- und Signalmechanismen in *Arabidopsis* dar und werden zukünftig zum besseren Verständnis des Zusammenspiels verschiedener Abwehrprozesse beitragen.

## Zusammenfassung

Die Multigenfamilie der Lipid Transfer Proteine (LTP) stellt eine Gruppe von kleinen Proteinen dar, welche in allen höheren Landpflanzen vorkommen. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* werden 92 Proteine zur Klasse der LTPs gezählt. Die Benennung der Proteinfamilie basiert auf dem beobachteten *in vitro* Transfer von Lipiden zwischen zwei Membranen. Alle LTPs weisen ein konserviertes, 8 Cysteine beinhaltendes Motiv und eine hydrophobe Tasche auf, welche für die Bindung hydrophober Moleküle verantwortlich ist. Aufgrund ihrer Signalsequenz werden LTPs über den sekretorischen Weg in den extrazellulären Raum geschleust. Für einige pflanzliche LTPs konnte eine derartige Sekretion bereits nachgewiesen werden. Für andere LTPs wird eine Funktion in der Kutinbildung, der Embryogenese oder der pflanzlichen Immunantwort gegen Phytopathogene postuliert. Letzteres wurde für DIR1 (DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1) und AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1) nachgewiesen, während von LTPIV.4 (At4g55450) nur bekannt ist, dass die Expression spezifisch in Antwort auf Pathogene induziert ist.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Funktion von LTPIV.4 und AZI1 in Bezug auf die pflanzliche Pathogenantwort in *Arabidopsis thaliana* untersucht. Anhand von GFP-Fusionsproteinen konnte für LTPIV.4 und AZI1 eine Endoplasmatische Retikulum-Lokalisierung detektiert werden. Auch eine gewebespezifische Promotoraktivität von LTPIV.4 an den Leitgeweben und in jungen sich entwickelnden Blättern konnte identifiziert werden. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass LTPIV.4 möglicherweise an der Signaltransduktion am/im Leitgewebe mitverantwortlich ist.

Im Fokus dieser Arbeit stand die spezifische Einordnung von LTPIV.4 in der Ausbildung der lokalen bzw. systemischen Immunantwort von *Arabidopsis thaliana*. Anhand einer Infektion von Wildtyppflanzen und LTPIV.4 Mutanten mit zwei verschiedenen *Pseudomonas*-stämmen konnte eine LTPIV.4-abhängige Steigerung der pflanzlichen Resistenz gegen die biotrophen Bakterien nachgewiesen werden. In der Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Sclerotinia* hingegen zeigte sich keine LTPIV.4 Abhängigkeit. Da die Hormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) in der Ausbildung der pflanzlichen Abwehr gegen verschiedene Pathogene wichtig sind, wurden die Hormonlevel von SA und JA in *ltpIV.4*, *35S::LTPIV.4* sowie in Wildtyppflanzen analysiert. Die untersuchten Phytohormongehalte zeigten eine LTPIV.4 unabhängige, schnelle Akkumulation von SA nach der Infektion mit virulenten (*vir*) *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) und eine spätere Erhöhung der JA-Gehalte. Es konnte somit kein regulatorischer Effekt von LTPIV.4 auf die SA- sowie die JA-Gehalte detektiert werden. Die Expression von *SAG13* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 13*)

und *OX11* (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE 1*), welche eine Funktion im programmierten Zelltod (PCD) haben beziehungsweise durch oxidativen Stress induziert werden, war hingegen erhöht in konstitutiv *LTPIV.4* exprimierenden Pflanzen, verglichen mit dem Wildtyp von *LTPIV.4*. Als ein weiterer Ansatzpunkt für die funktionelle Charakterisierung von *LTPIV.4* wurde die *in vitro* Identifizierung möglicher Substrate mittels Lipid-Protein-Interaktionsanalysen, sowie einer unspezifischen Metabolomanalyse herangezogen. Bei den Interaktionsanalysen konnten Phosphatidsäuren (PA), Phosphatidylglycerine (PG), Monogalactosyldiacylglycerole (MGDG) und auch Digalactosyldiacylglycerole (DGDG) als Interaktionspartner von *LTPIV.4* identifiziert werden. Die Metabolomanalyse zeigte einen quantitativen Unterschied zwischen Wildtyp/35S::*LTPIV.4* und *ltpIV.4* bei einigen MGDG, DGDG und PG Spezies. Aus den in dieser Arbeit gewonnenen Daten lässt sich somit schließen, dass *LTPIV.4* nach Pathogen/Schaden-assoziierte molekulare Muster- (PAMP/DAMP-) Erkennung, z.B. von *Psm*, SA-abhängig vermehrt gebildet wird. Da die konstitutive Expression von *LTPIV.4* sowohl zu erhöhter *OX11* und *SAG13* Expression als auch zu erhöhter Resistenz gegenüber *Psm* führt, lässt sich ein Modell aufstellen, in dem *LTPIV.4* als positiver Regulator des PCD die Pathogenresistenz von *Arabidopsis* erhöht. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unbekannt. Die Bindung von PAs, PGs, MGDGs und DGDGs an *LTPIV.4* *in vitro* könnte darauf hindeuten, dass auch *in vivo* hydrophobe Moleküle gebunden und möglicherweise transportiert werden und dies ein Teil der Pathogenantwort ist. Es wäre z.B. denkbar, dass eine mögliche Translokation von *LTPIV.4* über das ER in das Zytoplasma oder den apoplastischen Raum erfolgt. Dort interagiert *LTPIV.4* mit durch ROS gebildeten, oxidierten Lipiden oder DAMPs und löst entweder symplastisch durch eine Interaktion in der infizierten Zelle oder in intakten Nachbarzellen durch eine weitere Signaltransduktionskaskade den PCD sowie eine erhöhte ROS Bildung aus, oder das LTP interagiert spezifisch mit oxidierten Lipiden oder DAMPs von abgestorbenen Nachbarzellen, und löst eine intrazelluläre Signalkaskade mit Initiierung des PCD sowie erhöhter ROS-Bildung aus.

*AZI1* wurde als zweites LTP in dieser Arbeit einbezogen. Ausgehend von der Beobachtung, dass die konstitutive Expression von *AZI1* die Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogene *Botrytis cinerea* erhöht, sollte in der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht werden, ob *AZI1* eine Rolle in der Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* spielt. Die *azi1-1* Mutante zeigte hierbei jedoch eine erhöhte Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum*. Da bisher keine Unterschiede in der Genexpression von spezifischen Markergenen in WT und *azi1-1* Pflanzen nach Sklerotiniainfektion festgestellt werden konnte und es auch für LTPs bekannt ist, dass sie eine Rolle in der Kutikulasynthese spielen, wäre eine Hypothese, dass die unterschiedlichen Infektionsphänotypen mit *Sclerotinia* und *Botrytis* auf eine strukturelle Veränderung der Kutikulabeschaffenheit zurückzuführen sind. Weiterhin konnte für *AZI1* eine mögliche Rolle in der

Verwundungsantwort detektiert werden, da sowohl die *AZI1* Genexpression, als auch die erhaltenen basal signifikant erhöhten 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA)-Gehalte auf eine negativ regulatorische Rolle von *AZI1* in der Verwundungs-abhängigen JA-Signaltransduktion hindeuten.

## Summary

Lipid transfer proteins (LTP) are small and abundant proteins in higher plants. They were named for their ability to reversibly bind and transport different lipids between membranes *in vitro*. All LTPs possess an eight cysteine motif backbone which forms four disulfide bonds and stabilizes a hydrophobic cavity that comprises the lipid binding site. Because of their N-terminal signal sequence LTPs are synthesized into the endoplasmatic reticulum and could enter the secretory pathway into the apoplast. For some LTPs a specific function in cutin formation, embryogenesis or plant defense reactions against phytopathogens has been described. DIR1 (DEFECTIVE IN INDUCED RESISTANCE 1) and AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1) have already been characterized with respect to their function in plant pathogen defense, specifically, in response to *Pseudomonas syringae* and during systemic acquired resistance (SAR). LTPIV.4 (At5g55450) expression is specifically upregulated after contact with pathogens, but has not been studied in detail.

For this reason LTPIV.4, and for comparison, AZI1, were analyzed in this work to better understand their role in the pathogen response and further functions in *Arabidopsis thaliana*. Using LTPIV.4 and AZI1 GFP-fusion proteins a subcellular localization in the endoplasmatic reticulum could be detected. High *LtpIV.4* promotor activity was identified close to the vascular tissue and in young developing leaves.

The main focus of this work was to characterize the role of LTPIV.4 during local and systemic pathogen defence processes in *Arabidopsis thaliana*. Pathogen tests with *Arabidopsis thaliana* wild type and LTPIV.4 transgenic plants revealed a LTPIV.4 dependent increased resistance against biotrophic pathogens. Resistance against *Sclerotinia sclerotiorum*, a necrotrophic fungal pathogen, was not altered. Due to the known function of salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA) in plant defense signaling, the levels of these phytohormones in *LtpIV.4*, 35S::LTPIV.4 and *Arabidopsis* wild type plants were analyzed. No LTPIV.4 dependency on SA or JA accumulation was visible during plant infection with *Pseudomonas syringae*. Due to these results and gene expression data, LTPIV.4 is involved in SA-dependent signaling but not in SA biosynthesis. Gene expression analysis of specific programmed cell death (PCD) and oxidative stress marker genes *SAG13* (*SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 13*) and *OXI1* (*OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE 1*) could demonstrate a dependency of these stress related plant reactions on LTPIV.4 during the response to *Pseudomonas syringae*. To identify possible *in vivo* interaction partners of LTPIV.4, *in vitro* lipid-protein-interaction analysis and an untargeted metabolomics screen were performed. In the interaction analysis phosphatidic acids (PA), phosphatidylglycerols (PG), monogalactosyldiacylglycerols (MGDG) and digalactosyldiacylglycerols

(DGDG) could be identified as possible LTPIV.4 ligands. In the metabolomic screen several MGDG, DGDG and PG species showed quantitative differences between wild type, 35S::LTPIV.4 and *ltpIV.4* plants.

This work showed an SA-dependent induction of *LTPIV.4* gene expression after pathogen/damage-associated molecular pattern (PAMP/DAMP) recognition, as detected for virulent (*vir*) *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*). As constitutive expression of *LTPIV.4* leads to increased *OXI1* and *SAG13* expression as well as higher resistance against *Psm*, a model is suggested in which LTPIV.4 is a positive regulator of PCD and thereby increases resistance of *Arabidopsis* against biotrophic pathogens. The underlying molecular mechanisms remain to be identified. Binding of PAs, PGs, MGDGs and DGDGs *in vitro* is a hint of possible binding and transport of such hydrophobic molecules as a part of pathogen defense *in vivo*. LTPIV.4 may be translocated from the endoplasmic reticulum into the cytoplasm. There it could interact with oxidized membrane lipids or DAMPs. Either it triggers an intracellular signal cascades in the infected cell or in neighbor cells for a higher PCD and ROS production. Another hypothesis is that LTPIV.4 is translocated in the apoplastic space where it can interact with oxidized lipids or DAMPs of defective neighbor cells and thereby induces ROS production and PCD.

AZI1, a second LTP which is involved in priming of plant defense reactions, was investigated. As the constitutive expression of *AZI1* leads to increased resistance against *Botrytis cinerea*, the function of AZI1 in the resistance against another necrotrophic pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* was tested in this work. The *azi1-1* transgenic plant showed an increased resistance against *Sclerotinia* infection. For this infection no differences in specific marker gene expression were detected between wild type and *azi1-1*. Furthermore a possible role of AZI1 in wound induced signaling could be detected, as data from previous gene expression experiments demonstrate. *AZI1* gene expression data as well as significantly increased 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA) levels suggest a negative regulatory role of AZI1 in wound-induced JA signaling.

## Literaturverzeichnis

- Andersson MX, Kourtchenko O, Dangl JL, Mackey D, Ellerstrom M (2006) Phospholipase-dependent signalling during the AvrRpm1- and AvrRpt2-induced disease resistance responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 47: 947-959
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55: 539-552
- Arondel VV, Vergnolle C, Cantrel C, Kader J (2000) Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 157: 1-12
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-983
- Asero R, Mistrello G, Roncarolo D, de Vries SC, Gautier MF, Ciurana LF, Verbeek E, Mohammadi T, Knul-Brettlova V, Akkerdaas JH, Bulder I, Aalberse RC, van Ree R (2000) Lipid transfer protein: A pan-allergen in plant-derived foods that is highly resistant to pepsin digestion. *International Archives of Allergy and Immunology* 122: 20-32
- Baker CJ, Orlandi EW (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 299-321
- Bartsch M, Gobbato E, Bednarek P, Debey S, Schultze JL, Bautor J, Parker JE (2006) Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7. *The Plant cell* 18: 1038-1051
- Berger S, Benediktyova Z, Matous K, Bonfig K, Mueller MJ, Nedbal L, Roitsch T (2007) Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *J Exp Bot* 58: 797-806
- Bhattacharjee S, Halane MK, Kim SH, Gassmann W (2011) Pathogen effectors target *Arabidopsis* EDS1 and alter its interactions with immune regulators. *Science* 334: 1405-1408
- Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M (2002) From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* 7: 293-296
- Bohlmann H, Vignutelli A, Hilpert B, Miersch O, Wasternack C, Apel K (1998) Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Lett* 437: 281-286
- Boutrot F, Chantret N, Gautier MF (2008) Genome-wide analysis of the rice and *Arabidopsis* non-specific lipid transfer protein (nsLtp) gene families and identification of wheat nsLtp genes by EST data mining. *BMC Genomics* 9: 86

- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Buhot N, Douliez JP, Jacquemard A, Marion D, Tran V, Maume BF, Milat ML, Ponchet M, Mikes V, Kader JC, Blein JP (2001) A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS Lett* 509: 27-30
- Cameron KD, Teece MA, Smart LB (2006) Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol* 140: 176-183
- Cammue BP, Thevissen K, Hendriks M, Eggermont K, Goderis IJ, Proost P, Van Damme J, Osborn RW, Guerbet F, Kader JC, et al. (1995) A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiol* 109: 445-455
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X (1994) Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592
- Carvalho AD, Gomes VM (2007) Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - A concise review. *Peptides* 28: 1144-1153
- Carvalho AD, Teodoro CED, Da Cunha M, Okorokova-Facanha AL, Okorokov LA, Fernandes KVS, Gomes VM (2004) Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiologia Plantarum* 122: 328-336
- Carvalho AO, Machado OLT, Da Cunha M, Santos IS, Gomes VM (2001) Antimicrobial peptides and immunolocalization of a LTP in *Vigna unguiculata* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 137-146
- Castagnaro A, Garcia-Olmedo F (1994) A fatty-acid-binding protein from wheat kernels. *FEBS Lett* 349: 117-119
- Castro MS, Gerhardt IR, Orru S, Pucci P, Bloch C, Jr. (2003) Purification and characterization of a small (7.3 kDa) putative lipid transfer protein from maize seeds. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 794: 109-114
- Cavatorta V, Sforza S, Aquino G, Galaverna G, Dossena A, Pastorello EA, Marchelli R (2010) In vitro gastrointestinal digestion of the major peach allergen Pru p 3, a lipid transfer protein: molecular characterization of the products and assessment of their IgE binding abilities. *Mol Nutr Food Res* 54: 1452-1457
- Chae K, Gonong BJ, Kim SC, Kieslich CA, Morikis D, Balasubramanian S, Lord EM (2010) A multifaceted study of stigma/style cysteine-rich adhesin (SCA)-like Arabidopsis lipid transfer proteins (LTPs) suggests diversified roles for these LTPs in plant growth and reproduction. *J Exp Bot* 61: 4277-4290
- Champigny MJ, Isaacs M, Carella P, Faubert J, Fobert PR, Cameron RK (2013) Long distance movement of DIR1 and investigation of the role of DIR1-like during systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Front Plant Sci* 4: 230

- Champigny MJ, Shearer H, Mohammad A, Haines K, Neumann M, Thilmony R, He SY, Fobert P, Dengler N, Cameron RK (2011) Localization of DIR1 at the tissue, cellular and subcellular levels during Systemic Acquired Resistance in Arabidopsis using DIR1:GUS and DIR1:EGFP reporters. *Bmc Plant Biology* 11
- Chanda B, Xia Y, Mandal MK, Yu K, Sekine KT, Gao QM, Selote D, Hu Y, Stromberg A, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2011) Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat Genet* 43: 421-427
- Charvolin D, Douliez JP, Marion D, Cohen-Addad C, Pebay-Peyroula E (1999) The crystal structure of a wheat nonspecific lipid transfer protein (ns-LTP1) complexed with two molecules of phospholipid at 2.1 Å resolution. *Eur J Biochem* 264: 562-568
- Chassot C, Nawrath C, Metraux JP (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J* 49: 972-980
- Chaturvedi R, Krothapalli K, Makandar R, Nandi A, Sparks AA, Roth MR, Welti R, Shah J (2008) Plastid omega 3-fatty acid desaturase-dependent accumulation of a systemic acquired resistance inducing activity in petiole exudates of Arabidopsis thaliana is independent of jasmonic acid. *Plant Journal* 54: 106-117
- Chaturvedi R, Venables B, Petros RA, Nalam V, Li M, Wang X, Takemoto LJ, Shah J (2012) An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 71: 161-172
- Chester KS (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. *The Quarterly Review of Biology* Vol. 8: 275-324
- Chevenet F, Brun C, Banuls AL, Jacq B, Christen R (2006) TreeDyn: towards dynamic graphics and annotations for analyses of trees. *BMC Bioinformatics* 7: 439
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803-814
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* 16: 735-743
- Collado IG, Sanchez AJ, Hanson JR (2007) Fungal terpene metabolites: biosynthetic relationships and the control of the phytopathogenic fungus Botrytis cinerea. *Nat Prod Rep* 24: 674-686
- Connerth M, Tatsuta T, Haag M, Klecker T, Westermann B, Langer T (2012) Intramitochondrial Transport of Phosphatidic Acid in Yeast by a Lipid Transfer Protein. *Science* 338: 815-818
- Conrath U (2011) Molecular aspects of defence priming. *Trends Plant Sci* 16: 524-531
- Coutos-Thevenot P, Jouenne T, Maes O, Guerbette F, Grosbois M, Le Caer JP, Boulay M, Deloire A, Kader JC, Guern J (1993) Four 9-kDa proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. *Eur J Biochem* 217: 885-889

- Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE (1992) Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 4938-4941
- Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Dangl JL, McDowell JM (2006) Two modes of pathogen recognition by plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 8575-8576
- Dani V, Simon WJ, Duranti M, Croy RRD (2005) Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics* 5: 737-745
- de Jong CF, Laxalt AM, Bargmann BO, de Wit PJ, Joosten MH, Munnik T (2004) Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *Plant J* 39: 1-12
- Dereeper A, Audic S, Claverie JM, Blanc G (2010) BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evol Biol* 10: 8
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res* 36: W465-469
- De Vos M, Van Oosten VR, Van Poecke RMP, Van Pelt JA, Pozo MJ, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Van Loon LC, Dicke M, Pieterse CMJ (2005) Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 923-937
- Diaz-Perales A, Garcia-Casado G, Sanchez-Monge R, Garcia-Selles FJ, Barber D, Salcedo G (2002) cDNA cloning and heterologous expression of the major allergens from peach and apple belonging to the lipid-transfer protein family. *Clin Exp Allergy* 32: 87-92
- Diz MS, Carvalho AO, Ribeiro SF, Da Cunha M, Beltramini L, Rodrigues R, Nascimento VV, Machado OL, Gomes VM (2011) Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel alpha-amylase inhibitory properties. *Physiol Plant* 142: 233-246
- Djordjevic MA, Oakes M, Li DX, Hwang CH, Hocart CH, Gresshoff PM (2007) The glycine max xylem sap and apoplast proteome. *J Proteome Res* 6: 3771-3779
- Dong X (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current opinion in plant biology* 1: 316-323
- Dong X (2004) NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* 7: 547-552
- Doulliez JP, Jegou S, Pato C, Molle D, Tran V, Marion D (2001) Binding of two mono-acylated lipid monomers by the barley lipid transfer protein, LTP1, as viewed by fluorescence, isothermal titration calorimetry and molecular modelling. *Eur J Biochem* 268: 384-388

- Douliez JP, Michon T, Marion D (2000) Steady-state tyrosine fluorescence to study the lipid-binding properties of a wheat non-specific lipid-transfer protein (nsLTP1). *Biochim Biophys Acta* 1467: 65-72
- Douliez JP, Pato C, Rabesona H, Molle D, Marion D (2001) Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *Eur J Biochem* 268: 1400-1403
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology* 42: 185-209
- Edgar RC (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res* 32: 1792-1797
- Edstam MM, Viitanen L, Salminen TA, Edqvist J (2011) Evolutionary History of the Non-Specific Lipid Transfer Proteins. *Molecular Plant* 4: 947-964
- Farmer EE, Ryan CA (1990) Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 7713-7716
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* 18: 265-276
- Felix G, Regenass M, Boller T (1993) Specific Perception of Subnanomolar Concentrations of Chitin Fragments by Tomato Cells - Induction of Extracellular Alkalinization, Changes in Protein-Phosphorylation, and Establishment of a Refractory State. *Plant Journal* 4: 307-316
- Feys BJ, Moisan LJ, Newman MA, Parker JE (2001) Direct interaction between the Arabidopsis disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J* 20: 5400-5411
- Flor HH (1956) The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust. *Advances in Genetics Incorporating Molecular Genetic Medicine* 8: 29-54
- Gadermaier G, Egger M, Girbl T, Eler A, Harrer A, Vejvar E, Liso M, Richter K, Zuidmeer L, Mari A, Ferreira F (2011) Molecular characterization of Api g 2, a novel allergenic member of the lipid-transfer protein 1 family from celery stalks. *Mol Nutr Food Res* 55: 568-577
- Gincel E, Simorre JP, Caille A, Marion D, Ptak M, Vovelle F (1994) Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional 1H-NMR data. A new folding for lipid carriers. *Eur J Biochem* 226: 413-422
- Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227
- Gomez-Gomez L, Bauer Z, Boller T (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* 13: 1155-1163

- Grebner W, Stingl NE, Oenel A, Mueller MJ, Berger S (2013) Lipoxygenase6-dependent oxylipin synthesis in roots is required for abiotic and biotic stress resistance of Arabidopsis. *Plant Physiol* 161: 2159-2170
- Gruner K, Griebel T, Navarova H, Attaran E, Zeier J (2013) Reprogramming of plants during systemic acquired resistance. *Front Plant Sci* 4: 252
- Guedes MEM, Richmond S, Kuc J (1980) Induced Systemic Resistance to Anthracnose in Cucumber as Influenced by the Location of the Inducer Inoculation with *Colletotrichum-Lagenarium* and the Onset of Flowering and Fruiting. *Physiological Plant Pathology* 17: 229-233
- Guelette BS, Benning UF, Hoffmann-Benning S (2012) Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 63: 3603-3616
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52: 696-704
- Guo X, Stotz HU (2007) Defense against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* is dependent on jasmonic acid, salicylic acid, and ethylene signaling. *Mol Plant Microbe Interact* 20: 1384-1395
- Guo M, Tian F, Wamboldt Y, Alfano JR (2009) The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 22: 1069-1080
- Gust AA, Biswas R, Lenz HD, Rauhut T, Ranf S, Kemmerling B, Gotz F, Glawischnig E, Lee J, Felix G, Nürnberger T (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282: 32338-32348
- Han GW, Lee JY, Song HK, Chang C, Min K, Moon J, Shin DH, Kopka ML, Sawaya MR, Yuan HS, Kim TD, Choe J, Lim D, Moon HJ, Suh SW (2001) Structural basis of non-specific lipid binding in maize lipid-transfer protein complexes revealed by high-resolution X-ray crystallography. *J Mol Biol* 308: 263-278
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* 2: 19
- He P, Shan L, Lin NC, Martin GB, Kemmerling B, Nurnberger T, Sheen J (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125: 563-575
- Heath MC (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* 44: 321-334
- Heß K (2011) Charakterisierung des Expressionsmusters der Lipid-Transfer-Proteine AZ11, DIR1 und LTPIV.4 im Rahmen der pflanzlichen Antwort auf abiotischen und biotischen Stress. Diplomarbeit. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg

- Hiruma K, Fukunaga S, Bednarek P, Pislewska-Bednarek M, Watanabe S, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y (2013) Glutathione and tryptophan metabolism are required for Arabidopsis immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 9589-9594
- Hollenbach B, Schreiber L, Hartung W, Dietz KJ (1997) Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* 203: 9-19
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747
- Hwang KY, Kim KK, Min K, Eom SH, Yu YG, Kim S, Sweet RM, Suh SW (1993) Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of probable amylase/protease inhibitor-B from rice seeds. *J Mol Biol* 229: 255-257
- Jamir Y, Guo M, Oh HS, Petnicki-Ocwieja T, Chen S, Tang X, Dickman MB, Collmer A, Alfano JR (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* 37: 554-565
- Jang CS, Lee HJ, Chang SJ, Seo YW (2004) Expression and promoter analysis of the TaLTP1 gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* Volume 167: Pages 995–1001
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Jenns AE, Kuc J (1979) Graft Transmission of Systemic Resistance of Cucumber to Anthracnose Induced by *Colletotrichum-Lagenarium* and Tobacco Necrosis Virus. *Phytopathology* 69: 753-756
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jung HW, Kim KD, Hwang BK (2005) Identification of pathogen-responsive regions in the promoter of a pepper lipid transfer protein gene (CALTPI) and the enhanced resistance of the CALTPI transgenic Arabidopsis against pathogen and environmental stresses. *Planta* 221: 361-373
- Jung HW, Kim W, Hwang BK (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell Environ* 26: 915-928
- Jung HW, Lim CW, Hwang BK (2006) Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (CALTPIII) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Science* 170: 258-266
- Jung HW, Tschapinski TJ, Wang L, Glazebrook J, Greenberg JT (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science* 324: 89-91

- Kachroo A, Kachroo P (2009) Fatty Acid-Derived Signals in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 47: 153-176
- Kader JC (1975) Proteins and the intracellular exchange of lipids. I. Stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochim Biophys Acta* 380: 31-44
- Kader JC (1996) Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 627-654
- Kader JC (1997) Lipid-transfer proteins: A puzzling family of plant proteins. *Trends in Plant Science* 2: 66-70
- Kiefer IW, Slusarenko AJ (2003) The pattern of systemic acquired resistance induction within the *Arabidopsis* rosette in relation to the pattern of translocation. *Plant Physiol* 132: 840-847
- King EO, Ward MK, Raney DE (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* 44: 301-307
- Koncz C, Schell J (1986) The promotor of T<sub>L</sub>-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet.* 204: 383-396
- Koo AJ, Gao X, Jones AD, Howe GA (2009) A rapid wound signal activates the systemic synthesis of bioactive jasmonates in *Arabidopsis*. *Plant J* 59: 974-986
- Koornneef A, Leon-Reyes A, Ritsema T, Verhage A, Den Otter FC, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2008) Kinetics of salicylate-mediated suppression of jasmonate signaling reveal a role for redox modulation. *Plant Physiology* 147: 1358-1368
- Kunkel BN, Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current opinion in plant biology* 5: 325-331
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* 16: 3496-3507
- Kuppannan K, Albers DR, Schafer BW, Dielman D, Young SA (2011) Quantification and characterization of maize lipid transfer protein, a food allergen, by liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection. *Anal Chem* 83: 516-524
- Kusumawati L, Imin N, Djordjevic MA (2008) Characterization of the secretome of suspension cultures of *Medicago* species reveals proteins important for defense and development. *J Proteome Res* 7: 4508-4520
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Landgraf P, Feussner I, Hunger A, Scheel D, Rosahl S (2002) Systemic accumulation of 12-oxo-phytodienoic acid in SAR-induced potato plants. *European Journal of Plant Pathology* 108: 279-283

- Lascombe MB, Bakan B, Buhot N, Marion D, Blein JP, Larue V, Lamb C, Prange T (2008) The structure of "defective in induced resistance" protein of *Arabidopsis thaliana*, DIR1, reveals a new type of lipid transfer protein. *Protein Science* 17: 1522-1530
- Lauer I, Dueringer N, Pokoj S, Rehm S, Zoccatelli G, Reese G, Miguel-Moncin MS, Cistero-Bahima A, Enrique E, Lidholm J, Vieths S, Scheurer S (2009) The non-specific lipid transfer protein, Ara h 9, is an important allergen in peanut. *Clin Exp Allergy* 39: 1427-1437
- Lawton KA, Friedrich L, Hunt M, Weymann K, Delaney T, Kessmann H, Staub T, Ryals J (1996) Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J* 10: 71-82
- Leborgne-Castel N, Lherminier J, Der C, Fromentin J, Houot V, Simon-Plas F (2008) The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* 146: 1255-1266
- Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW (1998) Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J Mol Biol* 276: 437-448
- Lee SB, Go YS, Bae HJ, Park JH, Cho SH, Cho HJ, Lee DS, Park OK, Hwang I, Suh MC (2009) Disruption of glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein gene altered cuticular lipid composition, increased plastoglobules, and enhanced susceptibility to infection by the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Plant Physiol* 150: 42-54
- Leon J, Rojo E, Sanchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52: 1-9
- Li J, Brader G, Helenius E, Kariola T, Palva ET (2012) Biotin deficiency causes spontaneous cell death and activation of defense signaling. *Plant J* 70: 315-326
- Lin KF, Liu YN, Hsu ST, Samuel D, Cheng CS, Bonvin AM, Lyu PC (2005) Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry* 44: 5703-5712
- Lin S, Cronan JE (2011) Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Mol Biosyst* 7: 1811-1821
- Lindorff-Larsen K, Winther JR (2001) Surprisingly high stability of barley lipid transfer protein, LTP1, towards denaturant, heat and proteases. *FEBS Lett* 488: 145-148
- Liu PP, von Dahl CC, Park SW, Klessig DF (2011) Interconnection between methyl salicylate and lipid-based long-distance signaling during the development of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* and tobacco. *Plant Physiol* 155: 1762-1768
- Liu YJ, Samuel D, Lin CH, Lyu PC (2002) Purification and characterization of a novel 7-kDa non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *Biochem Biophys Res Commun* 294: 535-540
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods* 25: 402-408

- Maldonado AM, Doerner P, Dixon RA, Lamb CJ, Cameron RK (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* 419: 399-403
- Mandal MK, Chanda B, Xia Y, Yu K, Sekine KT, Gao QM, Selote D, Kachroo A, Kachroo P (2011) Glycerol-3-phosphate and systemic immunity. *Plant Signal Behav* 6: 1871-1874
- Mason HS, Mullet JE (1990) Expression of two soybean vegetative storage protein genes during development and in response to water deficit, wounding, and jasmonic acid. *Plant Cell* 2: 569-579
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci Signal* 2: ra45
- Mishina TE, Zeier J (2007) Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *Plant J* 50: 500-513
- Molina A, Garcia-Olmedo F (1997) Enhanced tolerance to bacterial pathogens caused by the transgenic expression of barley lipid transfer protein LTP2. *Plant J* 12: 669-675
- Molina A, Segura A, Garcia-Olmedo F (1993) Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Lett* 316: 119-122
- Moreau P, Bessoule JJ, Mongrand S, Testet E, Vincent P, Cassagne C (1998) Lipid trafficking in plant cells. *Prog Lipid Res* 37: 371-391
- Mou Z, Fan W, Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350
- Mundy J, Rogers JC (1986) Selective Expression of a Probable Amylase Protease Inhibitor in Barley Aleurone Cells - Comparison to the Barley Amylase Subtilisin Inhibitor. *Planta* 169: 51-63
- Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C (2006) The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiology* 140: 249-262
- Mur LAJ, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59: 501-520
- Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* 104: 34-41

- Navarova H, Bernsdorff F, Doring AC, Zeier J (2012) Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24: 5123-5141
- Newman MA, Daniels MJ, Dow JM (1995) Lipopolysaccharide from *Xanthomonas campestris* induces defense-related gene expression in *Brassica campestris*. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 778-780
- Newman MA, Sundelin T, Nielsen JT, Erbs G (2013) MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *Front Plant Sci* 4: 139
- Ng TB, Cheung RCF, Wong JH, Ye XJ (2012) Lipid-transfer proteins. *Biopolymers* 98: 268-279
- Nishida I, Yamada M (1985) Semisynthesis of a spin-labeled monogalactosyldiacylglycerol and its application to the assay for galactolipid-transfer activity in spinach leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes Volume 813: Pages 298–306*
- Nomura K, Debroy S, Lee YH, Pumplun N, Jones J, He SY (2006) A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* 313: 220-223
- Nürnberg T, Brunner F, Kemmerling B, Piater L (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249-266
- Pagnussat L, Burbach C, Baluska F, de la Canal L (2012) An extracellular lipid transfer protein is relocalized intracellularly during seed germination. *J Exp Bot* 63: 6555-6563
- Pagnussat LA, Lombardo C, Regente M, Pinedo M, Martin M, de la Canal L (2009) Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol* 166: 797-806
- Papadopoulou K, Melton RE, Leggett M, Daniels MJ, Osbourn AE (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12923-12928
- Park J, Gu Y, Lee Y, Yang Z, Lee Y (2004) Phosphatidic acid induces leaf cell death in *Arabidopsis* by activating the Rho-related small G protein GTPase-mediated pathway of reactive oxygen species generation. *Plant Physiol* 134: 129-136
- Park SW, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF (2007) Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* 318: 113-116
- Park SY, Jauh GY, Mollet JC, Eckard KJ, Nothnagel EA, Walling LL, Lord EM (2000) A lipid transfer-like protein is necessary for lily pollen tube adhesion to an in vitro stylar matrix. *Plant Cell* 12: 151-164
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Giuffrida MG, Ortolani C, Fortunato D, Trambaioli C, Scibola E, Calamari AM, Robino AM, Conti A (2001) Characterization of the major allergen of plum as a lipid transfer protein. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 756: 95-103

- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Fortunato D, Giuffrida MG, Perono Garoffo L, Calamari AM, Brenna O, Conti A (2003) Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *J Allergy Clin Immunol* 111: 350-359
- Pastorello EA, Farioli L, Pravettoni V, Ortolani C, Ispano M, Monza M, Baroglio C, Scibola E, Ansaloni R, Incorvaia C, Conti A (1999) The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 103: 520-526
- Pastorello EA, Pompei C, Pravettoni V, Farioli L, Calamari AM, Scibilia J, Robino AM, Conti A, Iametti S, Fortunato D, Bonomi S, Ortolani C (2003) Lipid-transfer protein is the major maize allergen maintaining IgE-binding activity after cooking at 100 degrees C, as demonstrated in anaphylactic patients and patients with positive double-blind, placebo-controlled food challenge results. *J Allergy Clin Immunol* 112: 775-783
- Pauwels L, Inze D, Goossens A (2009) Jasmonate-inducible gene: What does it mean? *Trends Plant Sci* 14: 87-91
- Pebay-Peyroula E, Cohen-Addad C, Lehmann MS, Marion D (1992) Crystallographic data for the 9000 dalton wheat non-specific phospholipid transfer protein. *J Mol Biol* 226: 563-564
- Peer M (2010) Sphingolipide – Analytik, Biosynthese und Funktion in der *Arabidopsis thaliana* Pathogenantwort. Dissertation. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- Pelese-Siebenbourg F, Caelles C, Kader JC, Delseny M, Puigdomenech P (1994) A pair of genes coding for lipid-transfer proteins in *Sorghum vulgare*. *Gene* 148: 305-308
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Mettraux JP, Broekaert WF (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 2103-2113
- Petersen LN, Ingle RA, Knight MR, Denby KJ (2009) OXI1 protein kinase is required for plant immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 60: 3727-3735
- Pieterse CM, Dicke M (2007) Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. *Trends Plant Sci* 12: 564-569
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* 5: 308-316
- Pieterse CM, Van Loon LC (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current opinion in plant biology* 7: 456-464
- Poelman EH, van Loon JJ, Dicke M (2008) Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends Plant Sci* 13: 534-541
- Pyee J, Yu H, Kolattukudy PE (1994) Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Arch Biochem Biophys* 311: 460-468

- Ramazzina I, Amato S, Passera E, Sforza S, Mistrello G, Berni R, Folli C (2012) Isoform identification, recombinant production and characterization of the allergen lipid transfer protein 1 from pear (Pyr c 3). *Gene* 491: 173-181
- Reymond P, Farmer EE (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* 1: 404-411
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernellet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* 183: 555-563
- Rietz S, Stamm A, Malonek S, Wagner S, Becker D, Medina-Escobar N, Vlot AC, Feys BJ, Niefind K, Parker JE (2011) Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in *Arabidopsis* immunity. *New Phytol* 191: 107-119
- Ross FA (1966) Systemic effects of local lesion formation. In *Viruses of Plants* (Beemster, A.B. and Dijkstra, J., eds). Amsterdam North-Holland 127-150
- Roy-Barman S, Sautter C, Chattoo BB (2006) Expression of the lipid transfer protein Ace-AMP1 in transgenic wheat enhances antifungal activity and defense responses. *Transgenic Res* 15: 435-446
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Samuel D, Liu YJ, Cheng CS, Lyu PC (2002) Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem* 277: 35267-35273
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, Demar M, Vingron M, Scholkopf B, Weigel D, Lohmann JU (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet* 37: 501-506
- Shah J, Zeier J (2013) Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Frontiers in plant science* 4: 30
- Shin DH, Lee JY, Hwang KY, Kim KK, Suh SW (1995) High-resolution crystal structure of the non-specific lipid-transfer protein from maize seedlings. *Structure* 3: 189-199
- Sodano P, Caille A, Sy D, de Person G, Marion D, Ptak M (1997) <sup>1</sup>H NMR and fluorescence studies of the complexation of DMPG by wheat non-specific lipid transfer protein. Global fold of the complex. *FEBS Lett* 416: 130-134
- Song JT, Lu H, McDowell JM, Greenberg JT (2004) A key role for ALD1 in activation of local and systemic defenses in *Arabidopsis*. *Plant J* 40: 200-212
- Spoel SH, Johnson JS, Dong X (2007) Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 18842-18847

- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Mettraux JP, Brown R, Kazan K, Van Loon LC, Dong XN, Pieterse CMJ (2003) NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15: 760-770
- Sterk P, Booij H, Schellekens GA, Van Kammen A, De Vries SC (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell* 3: 907-921
- Stevenson JM, Perera IY, Boss WF (1998) A phosphatidylinositol 4-kinase pleckstrin homology domain that binds phosphatidylinositol 4-monophosphate. *J Biol Chem* 273: 22761-22767
- Stout MJ, Thaler JS, Thomma BP (2006) Plant-mediated interactions between pathogenic microorganisms and herbivorous arthropods. *Annu Rev Entomol* 51: 663-689
- Suharsono U, Fujisawa Y, Kawasaki T, Iwasaki Y, Satoh H, Shimamoto K (2002) The heterotrimeric G protein alpha subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 13307-13312
- Tai SP, Kaplan S (1985) Phospholipid transfer proteins in microorganisms. *Chem Phys Lipids* 38: 41-50
- Tassin-Moindrot S, Caille A, Douliez JP, Marion D, Vovelle F (2000) The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. Solution structure of a complex with prostaglandin B2. *Eur J Biochem* 267: 1117-1124
- Testerink C, Munnik T (2011) Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J Exp Bot* 62: 2349-2361
- Thoma S, Hecht U, Kippers A, Botella J, De Vries S, Somerville C (1994) Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall-localized lipid transfer protein from Arabidopsis. *Plant Physiol* 105: 35-45
- Thoma S, Kaneko Y, Somerville C (1993) A non-specific lipid transfer protein from Arabidopsis is a cell wall protein. *Plant J* 3: 427-436
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP (2001) The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Curr Opin Immunol* 13: 63-68
- Torres MA (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant* 138: 414-429
- Tsuboi S, Osafune T, Tsugeki R, Nishimura M, Yamada M (1992) Nonspecific lipid transfer protein in castor bean cotyledon cells: subcellular localization and a possible role in lipid metabolism. *J Biochem* 111: 500-508
- Tsuda K, Sato M, Glazebrook J, Cohen JD, Katagiri F (2008) Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* 53: 763-775
- Tuzun S, Kuc J (1985) Movement of a Factor in Tobacco Infected with Peronospora-Tabacina Adam Which Systemically Protects against Blue Mold. *Physiological Plant Pathology* 26: 321-330
- Van der Biezen EA, Jones JD (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23: 454-456

- van der Luit AH, Piatti T, van Doorn A, Musgrave A, Felix G, Boller T, Munnik T (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant Physiol* 123: 1507-1516
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162
- Vassilopoulou E, Rigby N, Moreno FJ, Zuidmeer L, Akkerdaas J, Tassios I, Papadopoulos NG, Saxoni-Papageorgiou P, van Ree R, Mills C (2006) Effect of in vitro gastric and duodenal digestion on the allergenicity of grape lipid transfer protein. *J Allergy Clin Immunol* 118: 473-480
- Walters D, Heil M (2007) Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71: 3-17
- Wang L, Mitra RM, Hasselmann KD, Sato M, Lenarz-Wyatt L, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J (2008) The genetic network controlling the Arabidopsis transcriptional response to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*: roles of major regulators and the phytotoxin coronatine. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1408-1420
- Wang L, Tsuda K, Sato M, Cohen JD, Katagiri F, Glazebrook J (2009) Arabidopsis CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. *PLoS pathogens* 5: e1000301
- Wang NJ, Lee CC, Cheng CS, Lo WC, Yang YF, Chen MN, Lyu PC (2012) Construction and analysis of a plant non-specific lipid transfer protein database (nsLTPDB). *Bmc Genomics* 13
- Wang Z, Cao G, Wang X, Miao J, Liu X, Chen Z, Qu LJ, Gu H (2008) Identification and characterization of COI1-dependent transcription factor genes involved in JA-mediated response to wounding in Arabidopsis plants. *Plant Cell Rep* 27: 125-135
- Wasternack C, Hause B (2000) Jasmonate - Signale zur Stressabwehr und Entwicklung in Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* 30: 312-319
- Watt SA, Tellstrom V, Patschkowski T, Niehaus K (2006) Identification of the bacterial superoxide dismutase (SodM) as plant-inducible elicitor of an oxidative burst reaction in tobacco cell suspension cultures. *Journal of Biotechnology* 126: 78-86
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565
- Winter D, Vinegar B, Nahal H, Ammar R, Wilson GV, Provart NJ (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PLoS One* 2: e718
- Wirtz KW (1991) Phospholipid transfer proteins: from lipid monolayers to cells. *Klin Wochenschr* 69: 105-111
- Wu G, Robertson AJ, Liu X, Zheng P, Wilen RW, Nesbitt NT, Gusta LV (2004) A lipid transfer protein gene BG-14 is differentially regulated by abiotic stress, ABA, anisomycin, and sphingosine in bromegrass (*Bromus inermis*). *J Plant Physiol* 161: 449-458

- Xu ZY, Zhang X, Schlappi M, Xu ZQ (2011) Cold-inducible expression of AZI1 and its function in improvement of freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Plant Physiology* 168: 1576-1587
- Yamada M (1992) Lipid Transfer Proteins in Plants and Microorganisms. *Plant and Cell Physiology* 33: 1-6
- Yu K, Soares JM, Mandal MK, Wang C, Chanda B, Gifford AN, Fowler JS, Navarre D, Kachroo A, Kachroo P (2013) A Feedback Regulatory Loop between G3P and Lipid Transfer Proteins DIR1 and AZI1 Mediates Azelaic-Acid-Induced Systemic Immunity. *Cell Rep* 3: 1266-1278
- Yubero-Serrano EM, Moyano E, Medina-Escobar N, Munoz-Blanco J, Caballero JL (2003) Identification of a strawberry gene encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, wounding and cold stress. *J Exp Bot* 54: 1865-1877
- Zabka V, Stangl M, Bringmann G, Vogg G, Riederer M, Hildebrandt U (2008) Host surface properties affect prepenetration processes in the barley powdery mildew fungus. *New Phytol* 177: 251-263
- Zachowski A, Guerbette F, Grosbois M, Jolliot-Croquin A, Kader JC (1998) Characterisation of acyl binding by a plant lipid-transfer protein. *Eur J Biochem* 257: 443-448
- Zhang C, Li L, Xu Z (2012) [Subcellular localization and resistance to *Botrytis cinerea* of a new type lipid transfer protein AtDhyPRP1 from *Arabidopsis thaliana*]. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 28: 602-612
- Zipfel C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* 20: 10-16
- Zoeller M, Stingl N, Krischke M, Fekete A, Waller F, Berger S, Mueller MJ (2012) Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol* 160: 365-378

## Anhang

### Anhang I Phylogenetischer Stammbaum der Arabidopsis nsLTP Genfamilie (Boutrot et al. 2008)

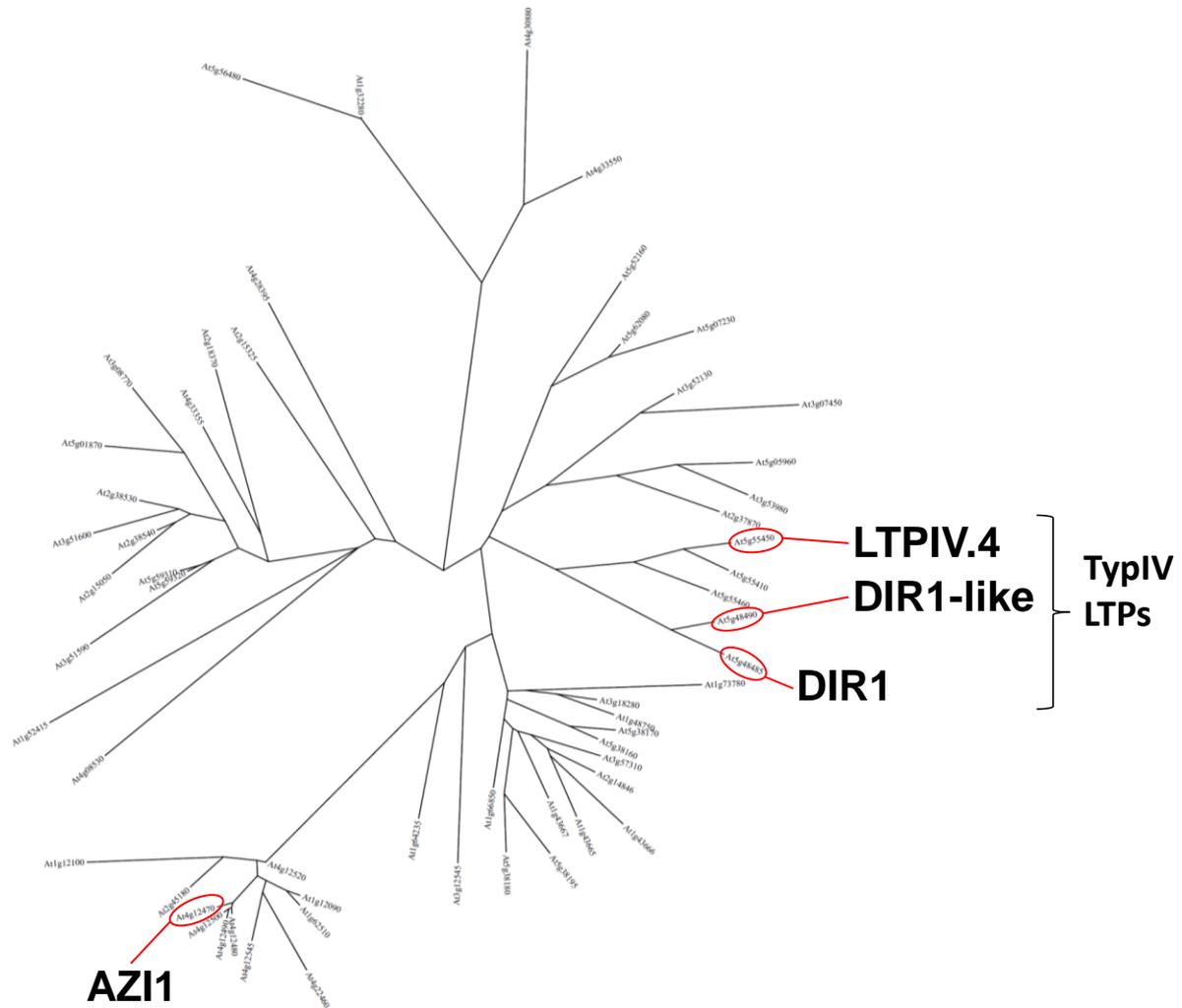


Abbildung I.1 Phylogenetischer Stammbaum der Arabidopsis nsLTP Genfamilie nach Boutrot et al. 2008 (Boutrot et al., 2008). Besonders hervorgehoben sind die in 1.3 angesprochenen, mit der Pathogenabwehr assoziierten LTPs (AZI1, DIR1, DIR1-like und LTPIV.4). Die Daten wurden mit der „One Click“ Methode prozessiert ([http://www.phylogeny.fr/version2\\_cgi/simple\\_phylogeny.cgi](http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/simple_phylogeny.cgi)). Dabei erfolgte das Alignment der Aminosäuresequenzen mit MUSCLE und die Erzeugung des phylogenetischen Stammbaums mit PhyML und TreeDyn (Anisimova et al., 2006; Chevenet et al., 2006; Dereeper et al., 2008; Dereeper et al., 2010; Edgar, 2004; Guindon et al., 2003).

**Anhang II** Position der T-DNA Insertionen in der genomischen Sequenz von LTPIV.4 (At5g55450) und AZI1 (At4g12470)

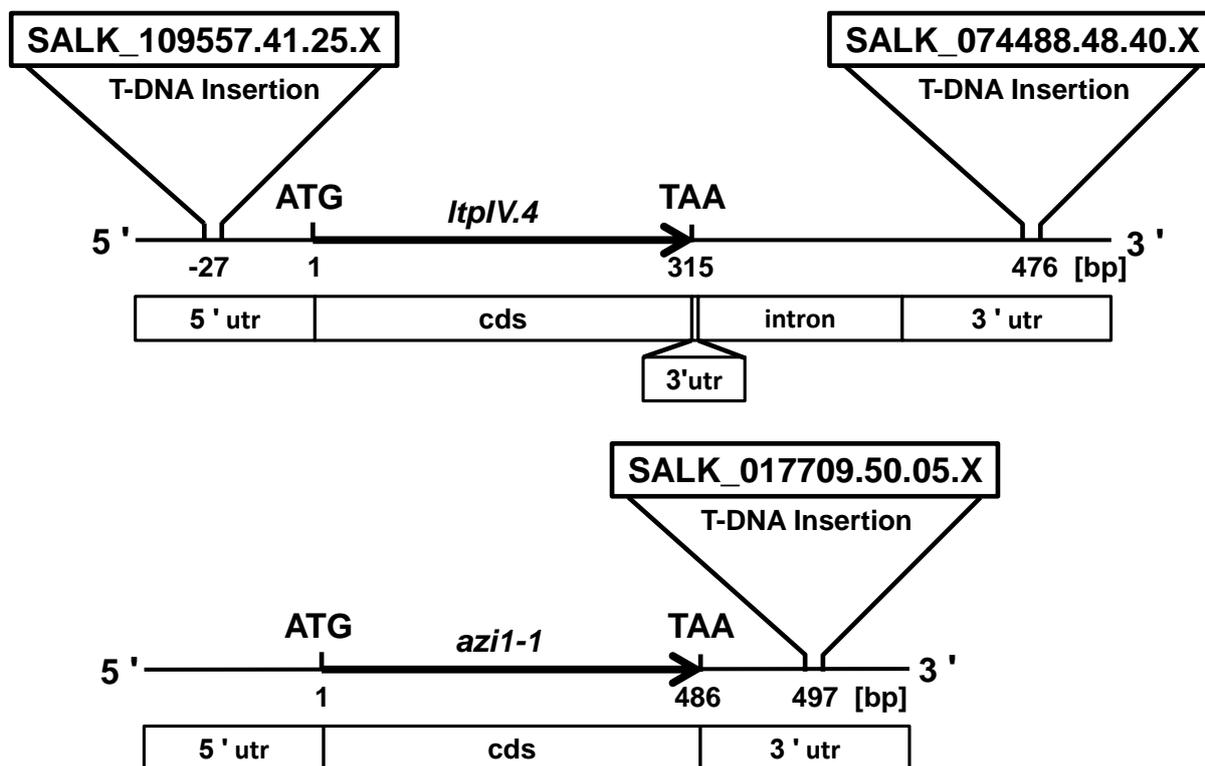
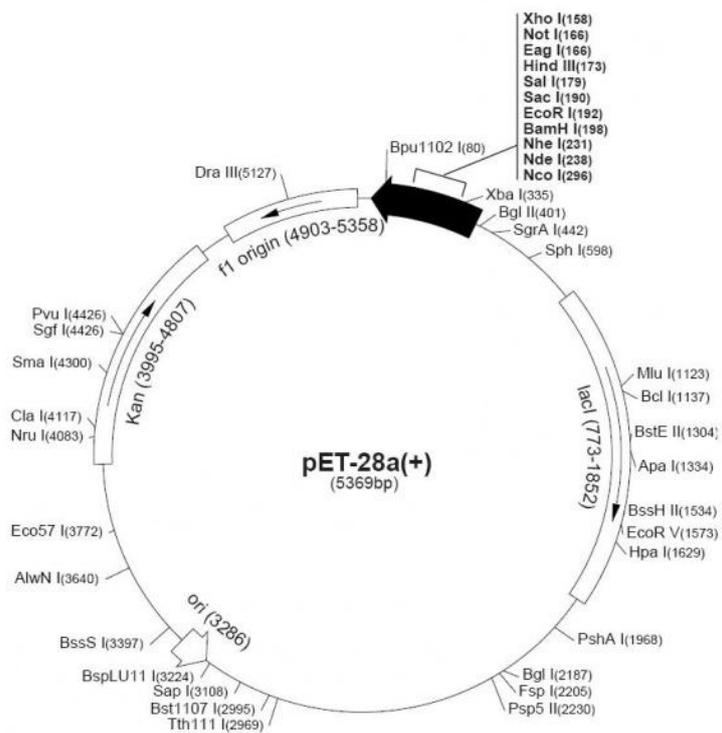


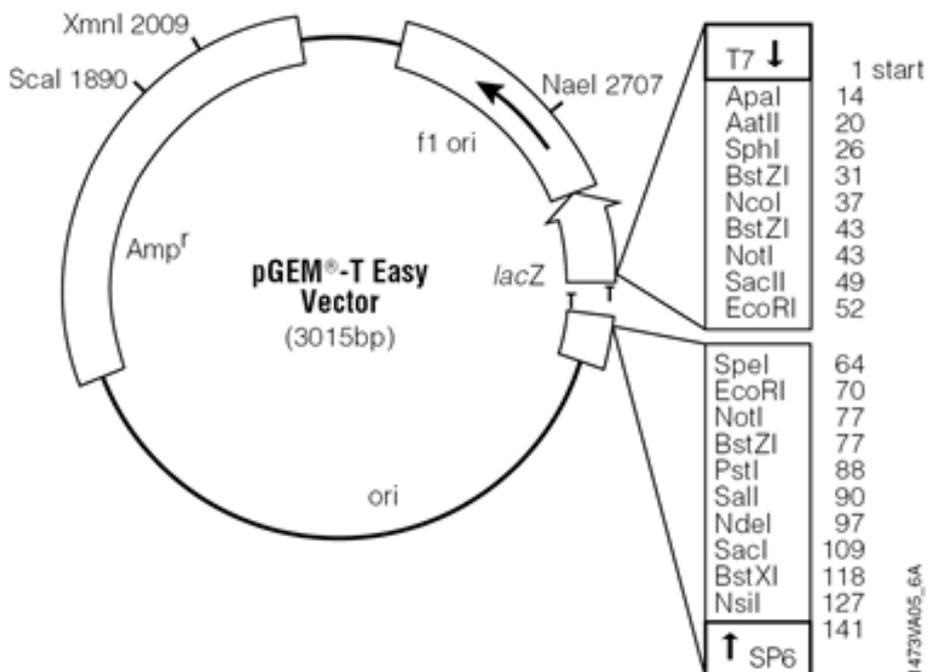
Abbildung II.1 Position der T-DNA Insertionen in der genomischen Sequenz von LTPIV.4 und AZI1; utr: nicht translaterter Bereich; cds: kodierende Sequenz; bp: Basenpaare

Anhang III Vektorkarten der verschiedenen Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren

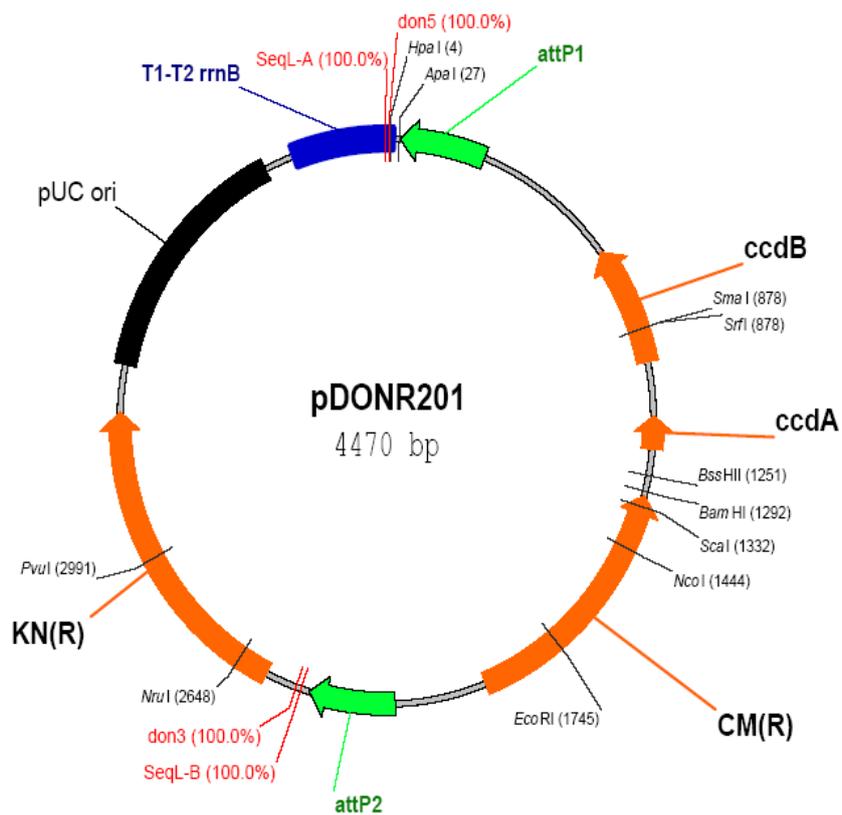
pET28b



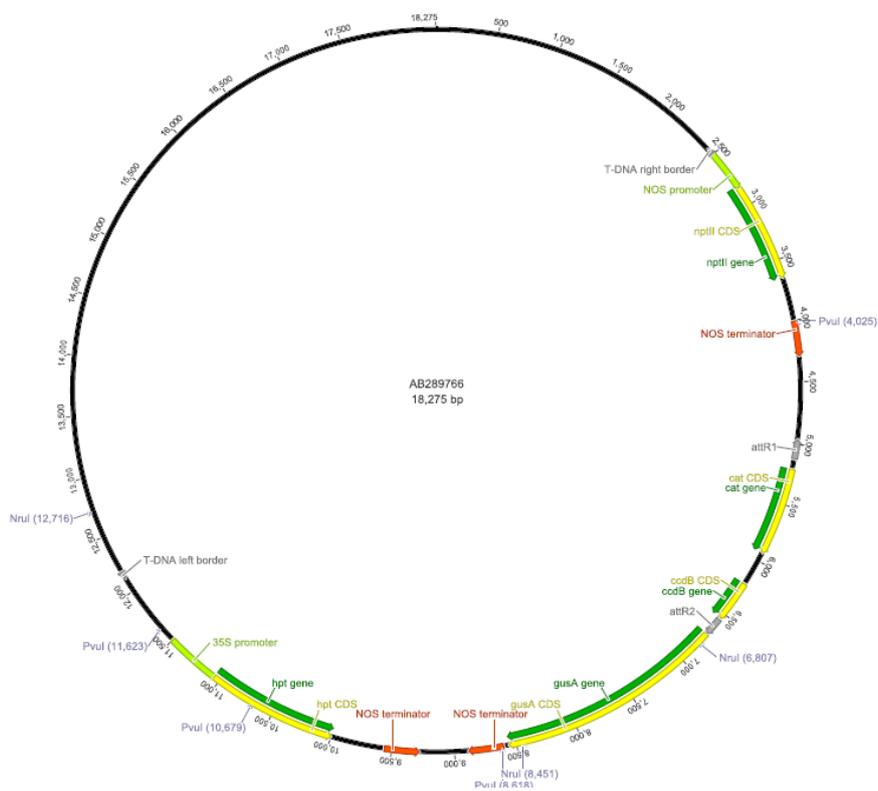
pGEM T easy



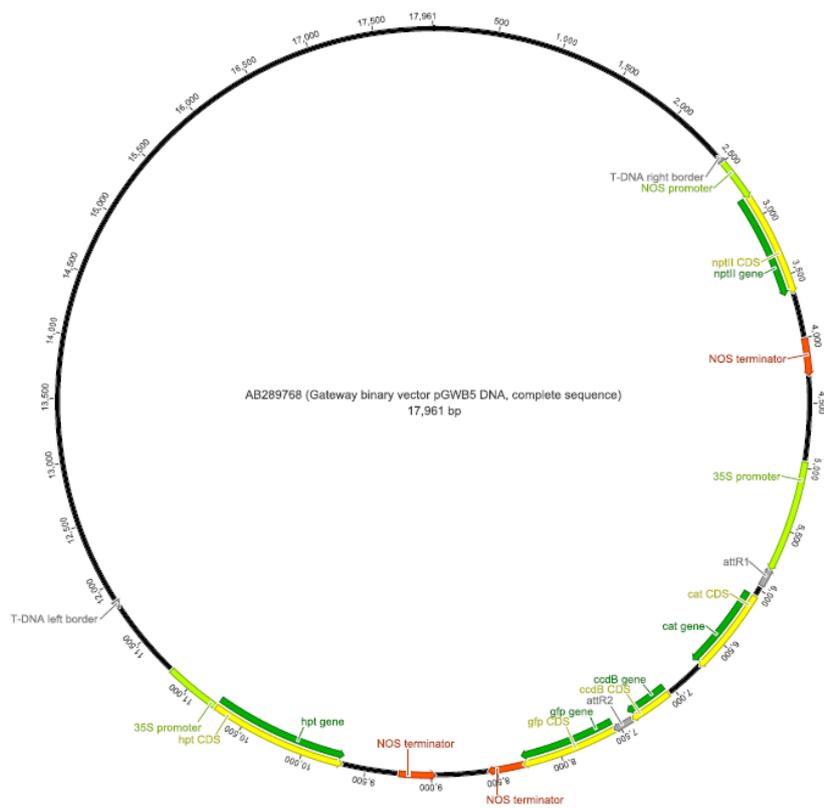
pDONR™201



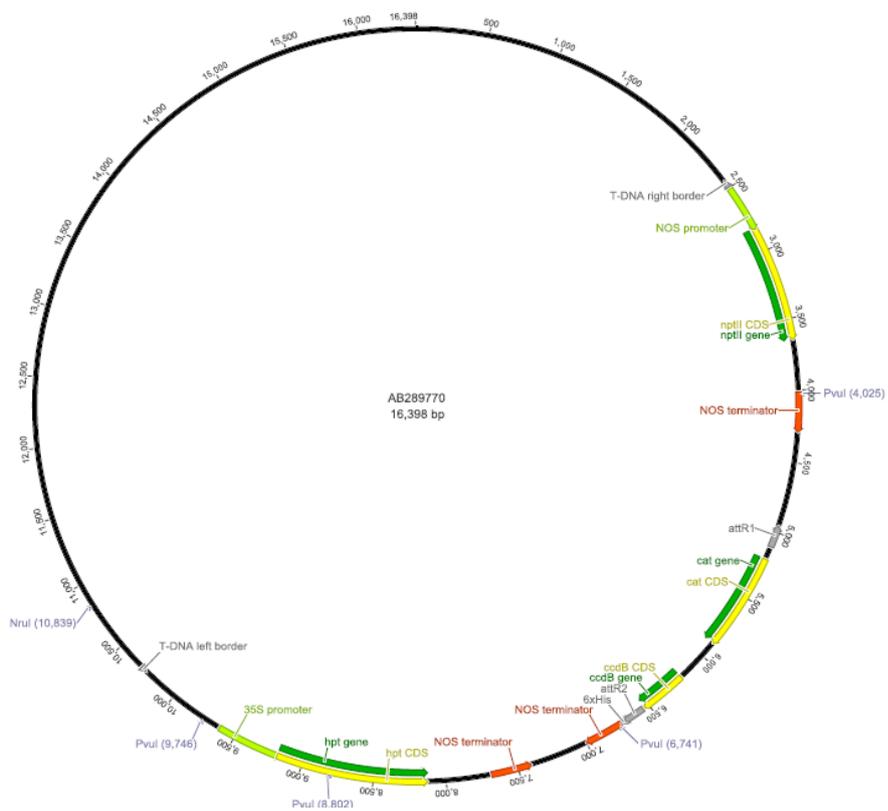
pGWB3



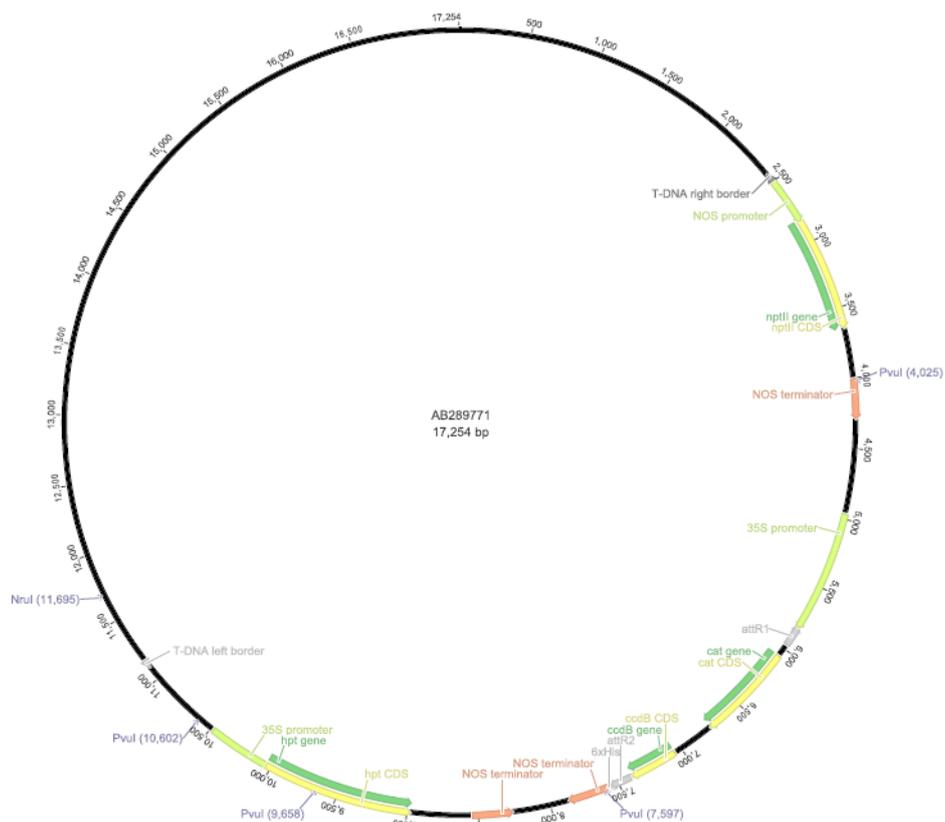
pGWB5



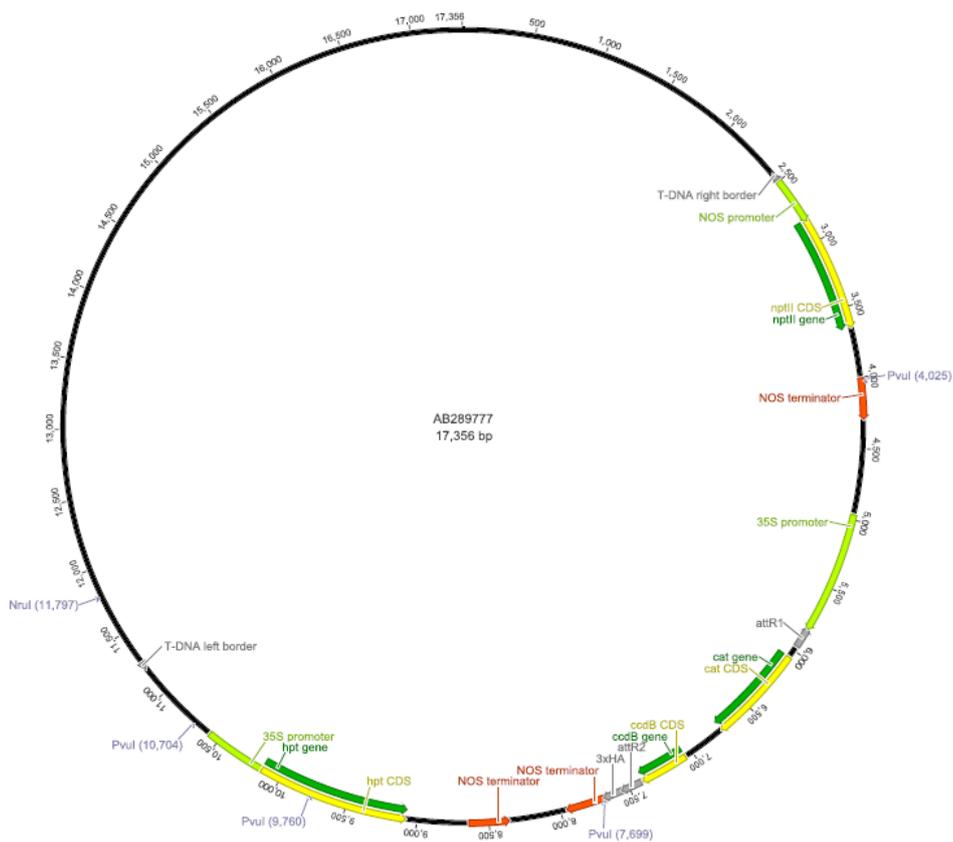
pGWB7



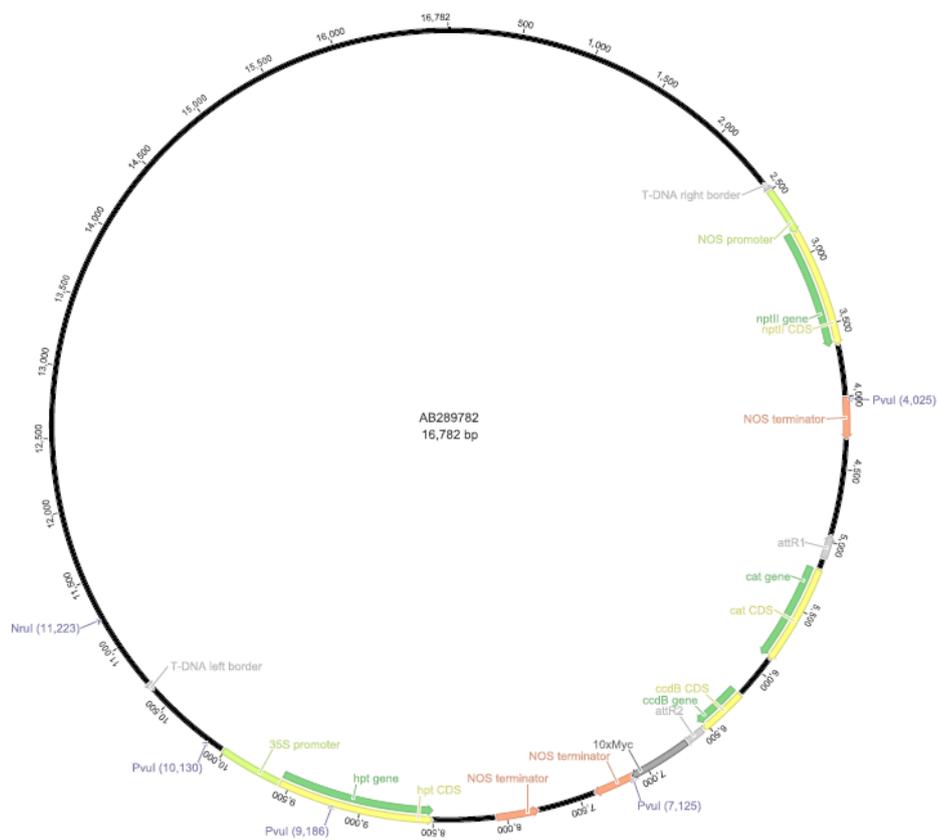
pGWB8



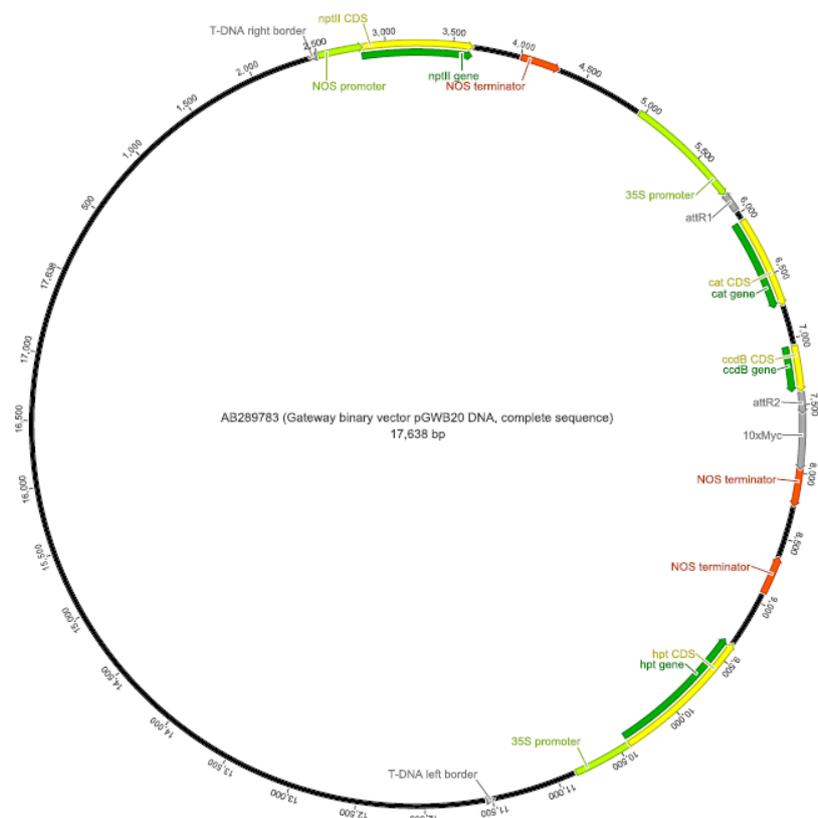
pGWB14



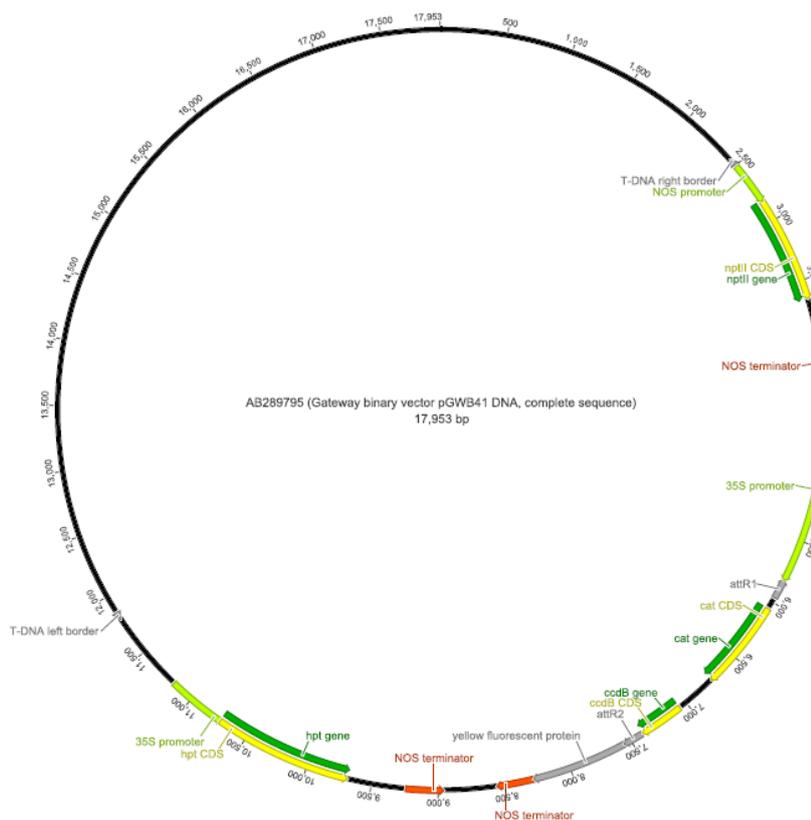
pGWB19



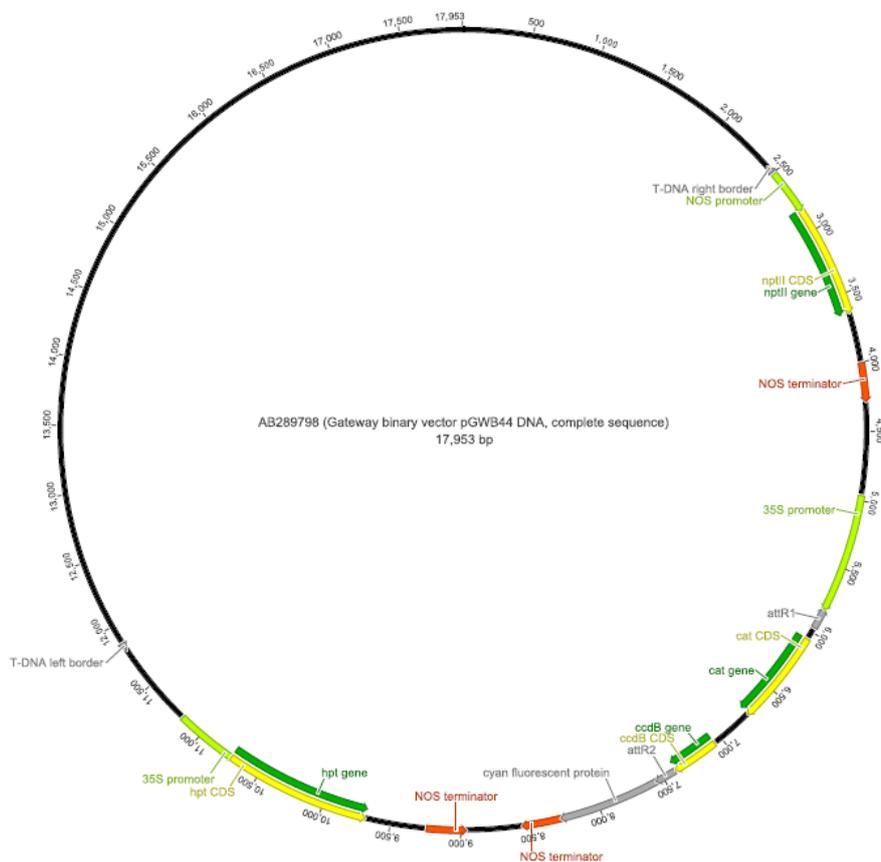
pGWB20



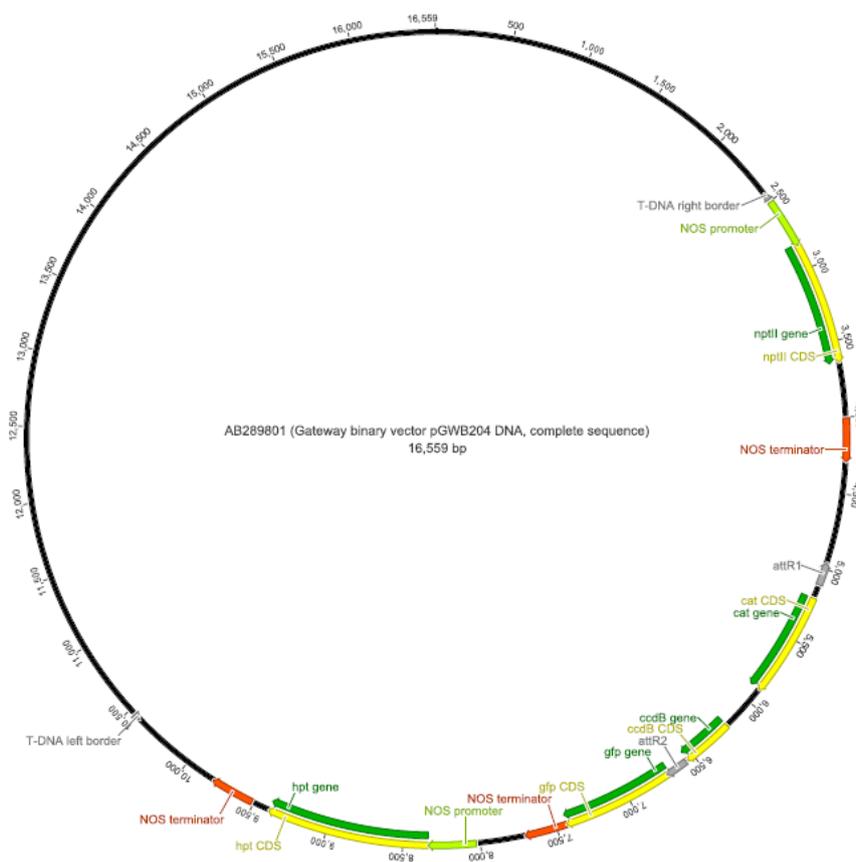
pGWB41



pGWB44



## pGWB204

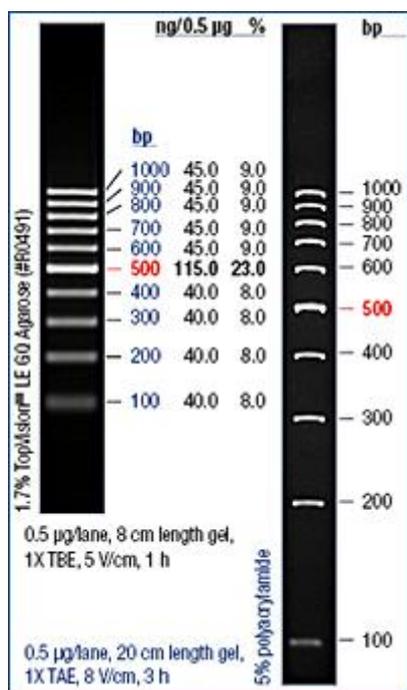


**Anhang IV** LTPIV.4 Promotersequenz für die histochemischen GUS-Färbung. Die Sequenz erfolgt von -558 bp bis -1 vor dem Startkodon der kodierenden Sequenz von LTPIV.4

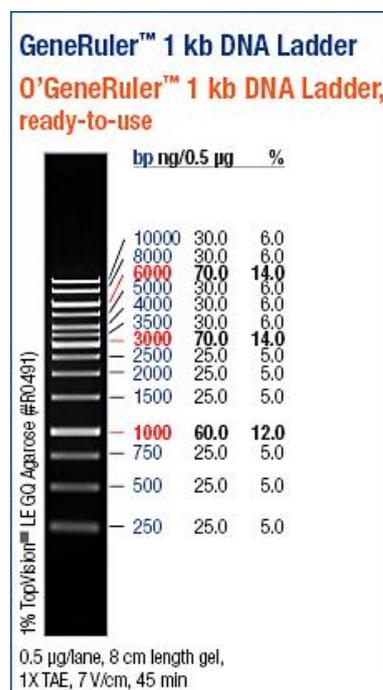
```
CCTGTGCTTTTGTGTCTAATATTGTTCTTTTCTGGATCCTTGTACTTGTTAGGGTTAGGGTTTGGGTTTGGGTTT
GTGTGTGATTTGAAGATTTGAATTTAATAATTTATTTATGAACGTTATTATGTATGCCACAAGGCCTGGAATAAT
CCAGAGGTGCTTCTTAAGTTCCAACGACTCATAAATTCCTTAGATCGTTTCATTTTCAATGACTTGTTCTTACGTG
ACAAGAAGACAGTCTCTTGATATTCTTACACAGAAAACACTACACGACTTGACAAGGACAAAACAAGATAAAAACG
ACCAAAGCCATTAGTCACGCAAAGGAACAAGCTCTGTAATTTACCAACTGGAGACTAAAAGTCTACCACATT
TGTCTGTTTGTACAATTTAACTCAAAGACGACCGACTTGGCTAAAAATACCCGTGAGTCTACCTTGTACTAGC
TCTCACTTCTCATTAATCTTTCTTGATAATAAGCTCATTACATGTAAGAGTTTTCACATATCACAACAGAGTTGA
GTGAGAAAGAATAAGGGATTAGAAAAAGAGAGA
```

Anhang V DNA-/Proteinmarker

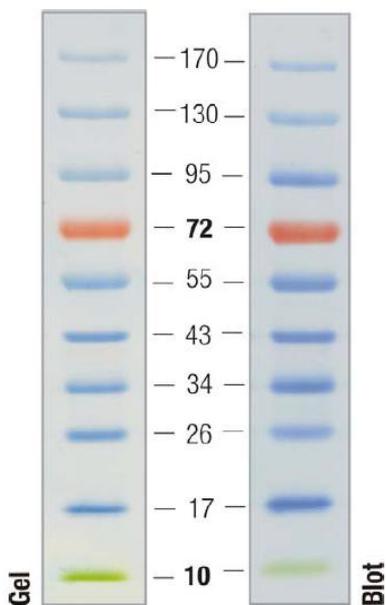
GeneRuler™-100bp DNA Ladder



GeneRuler™-100bp DNA Ladder



PageRuler™ Prestained Protein Ladder



**Anhang VI** Infektion von WT, SALK\_074488 und SALK\_109557 Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* und Primersequenzen für die Selektion von homozygoten SALK\_109557 T-DNA Insertionsmutanten

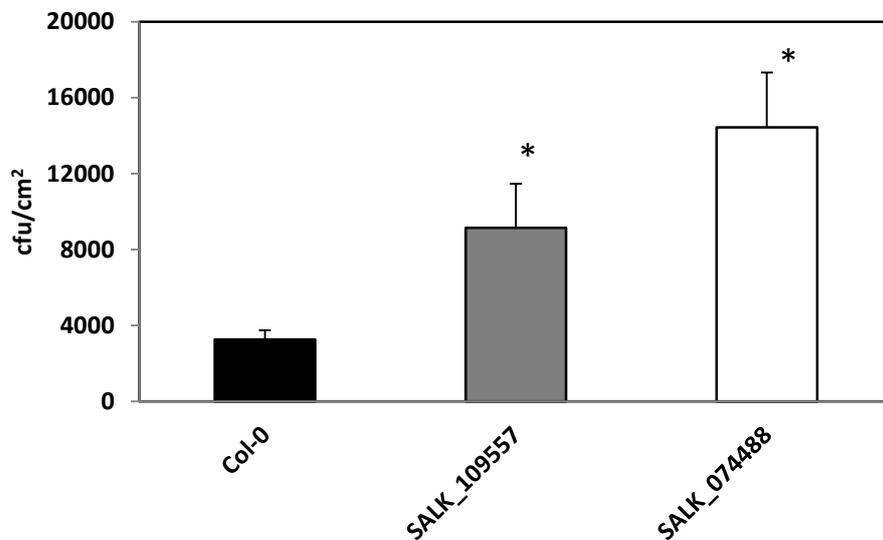


Abbildung VI.1 Besiedlungsdichte in cfu pro cm<sup>2</sup> Blattfläche lokal behandelter *Arabidopsis thaliana* Blätter des WTs, der T-DNA Insertionslinien SALK\_074488 (*ltpIV.4*) und SALK\_109557. Die Blattrosetten wurden mit vir *Pst* (OD = 0,1) besprüht und nach 48 Stunden die Bakterienzahl in den behandelten Blättern ermittelt. (MW + SE, n = 8, \* p < 0,05, Student's t-test)

Tabelle VI.1 Bezeichnungen und Sequenzen der verwendeten Primer

Bezeichnung	Primersequenz 5`-> 3`
Salk_109557 forward	GGTTCTTTGCACGGAAGATAC
Salk_109557 reverse	TAGGGTTAGGGTTTGGGTTTG

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich auf dem Weg zu der vorliegenden Arbeit vielseitig unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt besonders PD Dr. Frank Waller für die Betreuung meiner Arbeit und die vielen hilfreichen Anregungen und Diskussionen auch über die Dissertation hinaus. Vielen Dank für das sehr interessante Thema und auch für die Hilfe bei der Erstellung der Fachpublikation.

Weiterhin möchte ich mich bei PD Dr. Dirk Becker für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ebenso gilt mein Dank Prof. Dr. Martin J. Müller, dass ich diese Arbeit an seinem Lehrstuhl im Rahmen des GK1342 anfertigen konnte. Besonders die Möglichkeit regelmäßig an Seminaren und interessanten Vorträgen teilnehmen zu können hat meiner Arbeit immer wieder neue Anreize gegeben.

Ein besonderer Dank geht auch an alle aktiven und ehemaligen Kollegen des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie. Danke für eure Unterstützung und stete Hilfsbereitschaft. Da ich bestimmt irgendjemanden vergessen würde, bedanke ich mich einfach nochmals herzlich bei euch allen.

Ein großer Dank geht auch an alle Diplomanden und Bachelor-Studenten sowie an die unzähligen HiWis und Praktikanten, die durch viel Fleiß und Einsatz stark zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz herzlich möchte ich auch meinen Freunden und meiner ganzen Familie danken.

Vielen Dank Euch allen!

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch zu keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich erkläre, dass ich bisher keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Kürnach, 10.12.2013

---

Michael Bieber