





**Charakterisierung von Proteinen mit Lysin-Motiven  
und ihre Rolle in der Peptidoglycanperzeption  
und der angeborenen Immunität  
in *Arabidopsis thaliana***

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Roland Willmann  
aus Friedrichshafen

Tübingen  
2011



Tag der mündlichen Qualifikation:

25.10.2011

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Georg Felix

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin Parniske









# Inhalt

1	Einleitung .....	1
1.1	Grundlagen der Immunität .....	1
1.2	Molekulare Mustererkennung in der angeborenen Immunität .....	2
1.3	Das pflanzliche Immunsystem .....	4
1.4	Die bakterielle Zellhülle .....	7
1.4.1	Die Gram-negative Zellhülle .....	8
1.4.2	Die Gram-positive Zellhülle .....	10
1.4.3	Peptidoglycan .....	10
1.5	Peptidoglycan als MAMP in Pflanze und Tier .....	12
1.6	Das Lysin-Motiv.....	16
1.7	Proteine mit LysM-Domänen in Pflanzen und ihre Funktionen.....	18
1.7.1	Die Chitinperzeption.....	20
1.7.2	Die Perzeption von Nodulationsfaktoren .....	21
1.7.3	LysM-Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	23
1.8	Ziele der Arbeit .....	24
2	Material.....	25
2.1	Chemikalien .....	25
2.2	Medien und Antibiotika .....	26
2.3	Bakterien- und Pilzstämmen.....	27
2.4	Vektoren .....	28
2.5	Pflanzen .....	29
2.5.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Linien .....	29
3	Methoden .....	30
3.1	Pflanzenanzucht.....	30
3.1.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	30
3.1.2	Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i> Pflanzen .....	30
3.2	Anzucht der Mikroorganismen .....	30
3.2.1	Bakterienanzucht.....	30
3.2.2	Anzucht und Sporenernte von <i>Alternaria brassicicola</i> .....	31
3.2.3	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	31

3.3	Aufreinigung von Peptidoglycan (PGN) .....	31
3.3.1	PGN-Aufreinigung aus <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000.....	31
3.3.2	PGN-Aufreinigung aus <i>Staphylococcus aureus</i> .....	32
3.4	Molekularbiologische Methoden.....	32
3.4.1	Transformation von Pflanzen .....	32
3.4.1.1	<i>Agrobacterium</i> vermittelte transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	32
3.4.1.2	<i>Agrobacterium</i> vermittelte stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen ..	32
3.4.2	Transformation von Mikroorganismen.....	33
3.4.2.1	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	33
3.4.2.2	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
3.4.2.3	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
3.4.3	Präparation und Analyse von DNA und RNA .....	34
3.4.3.1	Isolation genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	34
3.4.3.2	Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.4.3.3	RNA Präparation aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
3.4.3.4	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen .....	35
3.4.3.5	Agarosegelelektrophorese.....	35
3.4.3.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen oder aus Agarosegelen .....	35
3.4.3.7	Fällung von Nukleinsäuren .....	35
3.4.3.8	Sequenzierung von DNA .....	36
3.4.4	Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren .....	36
3.4.4.1	Restriktionsendonukleaseverdau .....	36
3.4.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten .....	36
3.4.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	36
3.4.4.4	DNase-Verdau.....	37
3.4.4.5	Reverse Transkription.....	37
3.4.4.6	Transkriptanalyse durch quantitative <i>real time</i> PCR (qPCR).....	37
3.4.4.7	Transkriptomanalyse durch Microarrayanalysen .....	38
3.4.4.8	Genotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> T-DNA Insertionslinien.....	38
3.4.5	Herstellung der verwendeten Konstrukte .....	38
3.4.5.1	Expressionskonstrukte für <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	38
3.4.5.2	Expressionskonstrukte für <i>Escherichia coli</i> .....	39
3.4.5.3	Expressionskonstrukte für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	40
3.4.6	Präparation und Analyse von Proteinen.....	40
3.4.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	40

3.4.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
3.4.6.3	Coomassie-Brillant-Blaufärbung nach SDS-PAGE .....	41
3.4.6.4	Silberfärbung nach SDS-PAGE.....	41
3.4.6.5	Immunoblot .....	41
3.4.6.6	Proteindeglykosylierungsstudien.....	42
3.4.6.7	Bestimmung der MAP-Kinase-Aktivität .....	42
3.4.6.8	Glycokonjugatbindestudien.....	42
3.4.7	Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in <i>Escherichia coli</i> .....	43
3.4.8	Analyse von Proteininteraktionen .....	44
3.4.8.1	Yeast Two-Hybrid System .....	44
3.4.8.2	Far Western .....	44
3.5	Biologische Studien.....	44
3.5.1	Infektion von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 .....	44
3.5.2	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	45
3.5.3	Behandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Keimlingen mit Elicitoren.....	45
3.5.4	Infiltration von Elicitoren in <i>Arabidopsis thaliana</i> Blätter .....	45
3.5.5	Histochemische Detektion von $\beta$ -Glucuronidase in <i>pPR1:GUS</i> transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	45
3.5.6	Hydrolysestudien bakterieller Zellwände .....	46
3.5.7	Mikroskopie.....	46
3.5.7.1	Fluoreszenzmikroskopie .....	46
3.5.7.2	Konfokale <i>Laserscanning</i> -Mikroskopie.....	46
4	Ergebnisse .....	47
4.1	Aufreinigung und Reinheitskontrolle von Peptidoglycan .....	47
4.2	Peptidoglycane induzieren Änderungen im Transkriptom in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
4.3	Die Expression von <i>LYM3</i> wird durch virulente, phytopathogene Bakterien reprimiert.....	54
4.4	Charakterisierung der <i>LYM3</i> und <i>LYM1 Arabidopsis thaliana</i> T-DNA-Insertionslinien .....	56
4.5	Charakterisierung der <i>GFP-LYM3/lym3-1</i> und <i>LYM3/lym3-1 Arabidopsis thaliana</i> Linien ....	58
4.6	<i>LYM3</i> ist in der <i>Arabidopsis thaliana</i> Plasmamembran lokalisiert und glycosyliert .....	60
4.7	<i>LYM3</i> bindet PGN spezifisch .....	62
4.8	<i>LYM3</i> spielt keine Rolle bei der Immunität von <i>Arabidopsis thaliana</i> gegen Pilzinfektionen	69
4.9	<i>LYM3</i> wird für die posttranslationale Aktivierung der <i>Arabidopsis</i> MAP-Kinasen 3 und 6 nach PGN Behandlung benötigt .....	69

4.10	LYM3, LYM1 und CERK1 werden für die Transkriptomadaption in <i>A. thaliana</i> nach PGN Behandlung benötigt .....	70
4.11	Die LYM3/CERK1-abhängige PGN-Perzeption erkennt DAP- und Lys-Typ PGN .....	75
4.12	LYM3 und CERK1 werden für die Resistenz gegen bakterielle Infektionen benötigt .....	76
4.13	Interaktionsstudien.....	79
4.13.1	Interaktionsstudien mit dem <i>Yeast Two-Hybrid System</i> .....	79
4.13.2	Interaktionsstudien mit <i>Far-Western</i> .....	85
4.14	LYM1, LYM2 und LYM3 besitzen keine Hydrolyseaktivität gegenüber bakteriellen Zellwänden .....	86
5	Diskussion .....	88
5.1	LYM3 und CERK1 als Komponenten eines Peptidoglycanrezeptorsystems in <i>A. thaliana</i> .....	88
5.2	Ligandenspezifität des LYM3/CERK1-Perzeptionssystems für Peptidoglycan .....	92
5.3	LysM-Proteine repräsentieren eine zweite Klasse der pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren.....	94
5.4	Sind LYM3 und LYM1 funktionell redundant? .....	96
5.5	Die PGN-Erkennung in Tieren und Pflanzen ist durch konvergente Evolution entstanden ...	97
6	Zusammenfassung .....	100
7	Literatur .....	101
8	Anhang .....	124

## Abbildungen

Abbildung 1.1.	Die bakterielle Zellhülle.....	8
Abbildung 1.2.	DAP- und Lys-Typ-Peptidoglycan.....	11
Abbildung 1.3.	Das Lysin-Motiv. ....	17
Abbildung 1.4.	Modelle der Proteine mit LysM-Domänen in höheren Pflanzen.....	19
Abbildung 1.5.	ClustalW2 Analyse der <i>A. thaliana</i> Proteine mit Lysin-Motiven.....	23
Abbildung 4.1.	Reinheitskontrolle verschiedener Peptidoglycane. ....	48
Abbildung 4.2.	PGNs verschiedenen Ursprungs induzieren die Expression der Abwehrgene <i>FRK1</i> und <i>PR1</i> in <i>A. thaliana</i> . ....	50
Abbildung 4.3.	Behandlung mit <i>Xcc</i> PGN löst eine stressassoziierte Transkriptomreaktion in <i>A. thaliana</i> aus, die sich mit der durch andere MAMPs ausgelösten Reaktion überschneidet. ....	51
Abbildung 4.4.	Die Expression von <i>LYM1</i> , <i>LYM2</i> , <i>LYM3</i> , <i>CERK1</i> und <i>FLS2</i> in <i>Arabidopsis</i> Wildtyppflanzen nach Bakterieninfektion.....	55
Abbildung 4.5.	Charakterisierung der <i>LYM3</i> T-DNA-Insertionslinien. ....	56
Abbildung 4.6.	Charakterisierung der <i>LYM1</i> T-DNA-Insertionslinien. ....	57
Abbildung 4.7.	<i>A. thaliana lym3-1</i> Pflanzen wurden stabil mit einer <i>35S::GFP-LYM3</i> -Kassette transformiert. ....	58
Abbildung 4.8.	<i>A. thaliana lym3-1</i> Pflanzen wurden stabil mit einer <i>pLYM3::LYM3</i> -Kassette transformiert. ....	60
Abbildung 4.9.	<i>LYM3</i> ist an der <i>A. thaliana</i> Plasmamembran lokalisiert.....	61
Abbildung 4.10.	GFP- <i>LYM3</i> Fusionsproteine sind glycosyliert.....	62
Abbildung 4.11.	Vergleichende Bindungsstudien von <i>LYM1</i> , <i>LYM2</i> , <i>LYM3</i> und <i>CERK1</i> mit PGN oder Chitin. ....	63
Abbildung 4.12.	Spezifität der <i>LYM3</i> Interaktion mit PGN. ....	65
Abbildung 4.13.	Kinetik der <i>LYM3</i> PGN Interaktion.....	66
Abbildung 4.14.	Punktmutationen der Lysin-Motive verringern die Affinität von <i>LYM3</i> zu PGN.....	67
Abbildung 4.15.	<i>lym3</i> Pflanzen zeigen keine veränderte Resistenz gegen Infektionen durch <i>Alternaria brassicicola</i> . ....	69
Abbildung 4.16.	<i>A. thaliana lym3</i> Pflanzen zeigen eine verringerte posttranslationale Aktivierung der MPKs. ....	70
Abbildung 4.17.	Die Induktion der <i>FRK1</i> Expression nach PGN-Behandlung ist reduziert in <i>lym3</i> , <i>lym1</i> und <i>cerk1-2</i> Pflanzen. ....	72
Abbildung 4.18.	<i>LYM3</i> , <i>LYM1</i> und <i>CERK1</i> sind für die <i>A. thaliana</i> PGN-Sensitivität notwendig.....	73

Abbildung 4.19. Bestätigung des Microarrayexperiments durch qRT-PCR-Analyse der Expression ausgesuchter Gene.....	74
Abbildung 4.20. LYM3/CERK1 sind für die Erkennung von DAP- und Lys-Typ PGN notwendig.....	76
Abbildung 4.21. LYM3 wird für die Resistenz gegen <i>Pto</i> DC3000 Infektionen benötigt.....	77
Abbildung 4.22. LYM1 wird nicht für eine normale Resistenz gegen <i>Pto</i> DC3000 Infektionen benötigt.....	78
Abbildung 4.23. CERK1 wird für eine normale Resistenz gegen <i>Pto</i> DC3000 Infektionen benötigt. ...	78
Abbildung 4.24. Fusionskonstrukte für <i>Yeast Two-Hybrid</i> Untersuchungen.....	80
Abbildung 4.25. <i>Yeast Two-Hybrid</i> Interaktionsstudie mit LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1.....	82
Abbildung 4.26. <i>Yeast Two-Hybrid</i> Interaktionsstudie mit LYM1, LYM2, LYM3, CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5.....	83
Abbildung 4.27. Interaktionsnetzwerk der <i>A. thaliana</i> LYPs und LYKs.....	84
Abbildung 4.28. Far-Western Interaktionsstudie von LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1.....	86
Abbildung 4.29. LYM1, LYM2 und LYM3 besitzen keine Hydrolyseaktivität gegenüber bakteriellen Zellwänden.....	87

## Tabellen

Tabelle 2.1. Hersteller bzw. Lieferanten der verwendeten Chemikalien.....	25
Tabelle 2.2. Medien.....	26
Tabelle 2.3. Antibiotika.....	26
Tabelle 2.4. Verwendete Bakterienstämme.....	27
Tabelle 2.5. Verwendete Pilzstämme.....	27
Tabelle 2.6. Vektoren.....	28
Tabelle 2.7. Verwendete <i>A. thaliana</i> Pflanzen.....	29
Tabelle 3.1. Ansatz für eine <i>S. cerevisiae</i> Transformation.....	33
Tabelle 3.2. PCR-Standardansatz.....	36
Tabelle 3.3. PCR-Standardprogramm.....	37
Tabelle 3.4. Primer zur Herstellung der <i>E. coli</i> Expressionskonstrukte.....	39
Tabelle 3.5. Primer zur Herstellung der <i>S. cerevisiae</i> Expressionskonstrukte.....	40
Tabelle 4.1. Ausgewählte Gene, deren Expression in <i>A. thaliana</i> durch PGN <i>Xcc</i> induziert wurde.	53
Tabelle 5.1. Peptidoglycanerkennungsproteine.....	98

## 1 Einleitung

### 1.1 Grundlagen der Immunität

Alle Organismen werden mit biotischen Interaktionen in ihrer Umwelt konfrontiert. Während einige dieser Interaktionen für einen Organismus gutartig sein können, sind andere ernsthafte Bedrohungen für die Unversehrtheit oder sogar die Existenz des Organismus.

Einfachste, einzellige Organismen, wie Bakterien, entwickelten bereits enzymatische Systeme, um sich vor Infektionen durch Viren zu schützen (Horvath und Barrangou 2010). Das Prinzip eines Immunsystems begleitet die Entwicklung des Lebens schon sehr lange.

Um Immunität zu erreichen, muss ein Organismus die Fähigkeit besitzen, fremde oder veränderte eigene Strukturen zu erkennen. Dieser Erkennungsprozess kann dabei auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen. Zum einen besitzt ein Organismus nach dem Prinzip der angeborenen Immunität ein Repertoire an präformierten Rezeptoren für die Perzeption bestimmter Strukturen. Diese Rezeptoren stehen unmittelbar zur Verfügung, da sie im Genom des Organismus bereits definiert sind (Cooper, 2008; Dempsey, 2003; Janeway und Medzhitov, 2002).

Zum anderen entwickeln bestimmte Organismen in der adaptiven Immunität durch somatische Hypermutation und Rekombination spezifische Immunmoleküle gegen Antigene. Somit besitzt die adaptive Immunität den Vorteil, durch positive Selektion prinzipiell unendlich viele Strukturen erkennen zu können, während die angeborene Immunität nur eine begrenzte Anzahl an Strukturen erkennt (Cooper, 2008; Dempsey, 2003; Janeway und Medzhitov, 2002).

Das adaptive Immunsystem ist evolutionär jünger und erst ein Merkmal der *Gnathostomata*, die ihre Immunität auf eine Kombination der beiden Prinzipien stützen. In Pflanzen, Pilzen, Insekten und primitiven multizellulären Organismen ist, als das weitaus ältere Prinzip, die angeborene Immunität dominierend (Litman, 2005; Pancer und Cooper, 2006).

Die Unterscheidung von „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ erfolgt in der angeborenen Immunität durch die Erkennung molekularer Muster, die es in dieser Form im eigenen Organismus nicht gibt. Diese Strukturen werden als Pathogen- oder Mikroben-assoziierte molekulare Muster (PAMPs oder MAMPs) bezeichnet. Typischerweise repräsentieren diese MAMPs dabei Muster, die als Signatur mit einer ganzen Klasse von Mikroorganismen assoziiert werden können. Deshalb bieten sie die Möglichkeit einer breiten und ökonomischen Erkennung potentieller Schädlinge. Aufgrund der essentiellen Funktionen, die sie für ihren Ursprungsorganismus erfüllen, unterliegen diese Muster einer gewissen Konservierung. Sie können nicht ohne weiteres durch Mutation eliminiert oder vor der Erkennung maskiert werden (Janeway, 1989; Janeway und Medzhitov, 2002).

Neben MAMPs werden zudem Signale des veränderten Selbst erkannt. Diese Muster entstammen zwar dem eigenen Organismus, kommen jedoch in einer durch pathologische Vorgänge veränderten Form vor. Sie werden als Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) bezeichnet (Janeway, 1989; Rubartelli und Lotze, 2007).

Die spezifische Erkennung der MAMPs und DAMPs erfolgt durch Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) und induziert Abwehrreaktionen.

### **1.2 Molekulare Mustererkennung in der angeborenen Immunität**

Immunreaktionen werden in Pflanzen und Tieren durch eine Vielzahl von MAMPs, wie Lipopolysaccharid (LPS), Glucan- oder Chitinfragmenten aus pilzlichen Zellwänden oder proteinartigen MAMPs ausgelöst (Boller und Felix, 2009; Nürnberger *et al.*, 2004).

Flagellin wird heute besonders in Pflanzen als Archetyp eines MAMPs betrachtet (Boller und Felix, 2009; Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez und Boller, 2002). Es ist das essentielle, konservierte Monomer bakterieller Flagellen und erfüllt die charakteristischen Merkmale eines MAMPs. In Pflanzen und Tieren ist es immunogen aktiv. Dies deutet auf eine frühe evolutionäre Adaption auf Infektionen mit Flagellen tragenden Bakterien hin (Berg und Anderson, 1973; Smith *et al.*, 2003).

In Tieren wird Flagellin durch den PRR TLR5 (Toll-like receptor 5) erkannt (Hayashi *et al.*, 2001). TLRs sind kanonische Rezeptoren der angeborenen Immunität in Tieren. Die Bindestelle der Liganden befindet sich in einer Domäne aus Leucin-reichen Wiederholungen (LRR). Der Rezeptor wird durch eine Transmembrandomäne des Typ 1 in der Membran verankert, auf welche eine intrazelluläre TIR (*Drosophila* Toll and human IL-1 receptor)-Domäne folgt. Mit Hilfe dieser Domäne werden nach der Bindung des Liganden und der damit einhergehenden Rezeptordimerisierung Adapterproteine mit TIR-Domänen, wie z.B. MyD88 rekrutiert, die die Transduktion des Signals vermitteln (Akira und Takeda, 2004). In Mensch und Maus wurden zehn bzw. zwölf TLRs identifiziert, wobei TLR1 bis 9 in beiden Spezies hochkonserviert sind (Kawai und Akira, 2009). TLRs erkennen eine Vielzahl an MAMPs unterschiedlicher Klassen, wie Lipide, Lipoproteine, Proteine, Nukleinsäuren und Zellwandfragmente. So können TLRs eine enorme Bandbreite an Pathogenen abdecken und führen zur Erkennung von Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen (Jin und Lee, 2008). Die Erkennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Verteilung der TLRs in verschiedenen Kompartimenten der Zelle, wie der Plasmamembran, in Endosomen, Lysosomen usw., was dem zellulären Vorkommen der MAMPs entspricht (Akira *et al.*, 2006).

In Pflanzen wird Flagellin durch die plasmamembranständige Rezeptor-ähnliche Kinase (RLK) FLS2 (Flagellin sensing 2) erkannt (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Gómez-Gómez *et al.*, 1999). FLS2 besitzt ebenfalls eine extrazelluläre LRR-Domäne. Im Gegensatz zur TIR-Domäne eines TLRs weist



## Einleitung

FLS2 hingegen eine intrazelluläre Kinasedomäne auf (Gómez-Gómez und Boller, 2000). Auch bei FLS2 findet eine Oligomerisierung im Rahmen des Perzeptionsprozesses statt, allerdings mit einem unterschiedlichen Corezeptor, der RLK BAK1 (BRI1-associated kinase 1), welche zwar auch extrazelluläre LRRs aufweist, Flagellin aber nicht bindet (Chinchilla *et al.*, 2007a; Heese *et al.*, 2007). Durch die Heterooligomerisierung kommen die Kinasedomänen von FLS2 und BAK1 in räumliche Nähe, was die Initiation von Phosphorylierungskaskaden ermöglicht (Schulze *et al.*, 2010). BAK1 erfüllt Aufgaben in verschiedenen Bereichen. Es ist auch Corezeptor von BRI1 (Brassinosteroid-insensitive 1), dem Brassinosteroidrezeptor (Kinoshita *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2001). BRI1 besitzt ebenfalls die typische Architektur einer LRR-RLK. Unabhängig von BRI1 spielt BAK1 eine Schlüsselrolle in der Regulation des stressinduzierten Zelltods. Dies ist wichtig für die Kontrolle der Ausbreitung von Nekrosen in Folge bakterieller oder pilzlicher Infektionen (He *et al.*, 2008; He *et al.*, 2007; Kemmerling *et al.*, 2007). BAK1 ist also ein zentraler Regulator an der Spitze verschiedenster Signalwege (Chinchilla *et al.*, 2009).

Obwohl die Architektur der Rezeptoren sowie die Konzeption der pflanzlichen und tierischen Flagellinperzeption sehr ähnlich sind, weisen die Sequenzen von FLS2 und TLR5 außer den LRR-Domänen keine Gemeinsamkeiten auf. Die beiden Rezeptorsysteme sind unabhängig voneinander durch Koevolution entstanden (Ausubel, 2005; Nürnberger *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2003). Weitere Hinweise für eine Koevolution wurden auch durch die Betrachtung des MAMP-aktiven Flagellinmotivs selbst gewonnen. So wird in *A. thaliana* durch FLS2 ein 22 Aminosäuren umfassender Bereich im N-Terminus des Flagellinproteins erkannt, während TLR5 einen davon unterschiedlichen Bereich aus dem N- und dem C-terminalen Bereich erkennt (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Smith *et al.*, 2003).

In *A. thaliana* umfasst die Gruppe der LRR-RLKs mehr als 200 Mitglieder (Shiu und Bleecker, 2001) und bietet so ein Reservoir für weitere potentielle PRRs. Tatsächlich konnte in *A. thaliana* mit EFR (EF-TU Rezeptor) ein weiterer PRR aus der LRR-RLK Gruppe identifiziert werden. In analoger Weise zu FLS2 erkennt EFR den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu unter Bildung eines Heterodimers mit BAK1 (Zipfel *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007b, Schulze *et al.*, 2010). BAK1 ist also auch an der Perzeption verschiedener MAMPs beteiligt.

Es konnten weitere, unterschiedliche PRR Typen beschrieben werden. EIX2 aus Tomate ist ein rezeptorähnliches Protein, das zwar eine extrazelluläre LRR-Domäne, aber keine intrazelluläre Kinasedomäne besitzt. EIX2 bindet und erkennt die pilzliche Xylanase EIX (Ron und Avni, 2004). Daneben nehmen PRRs ohne LRR-Domäne wichtige Stellungen ein. Das *glucan binding protein* GBP aus *Glycine max* erkennt als extrazelluläre Glucanase Zellwandfragmente aus Oomyceten (Fliegmann *et al.*, 2004). Besondere Bedeutung in Pflanzen besitzen Rezeptoren mit Lysin-Motiven für die Perzeption von Chitin. Auf diese PRRs wird später ausführlicher eingegangen (1.7.1).

Für eine Vielzahl mikrobieller Strukturen, welche als MAMPs beschrieben wurden, konnten komplementäre PRRs noch nicht identifiziert werden. So induziert eine Reihe proteinartiger MAMPs wie bakterielle *cold shock* Proteine, Superoxiddismutase, Harpin, NLPs (necrosis and ethylene-inducing peptide1-like proteins), aber auch Proteine aus Oomyceten, wie eine sekretierte Transglutaminase und Sterol bindende Elicatine typische Verteidigungsreaktionen (Brunner *et al.*, 2002; Felix und Boller, 2003; Kim *et al.*, 2004; Osman *et al.*, 2001; Qutob *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Für eine Reihe von MAMPs, welche keine Proteine sind, wurden bisher keine Rezeptoren beschrieben. Dazu gehören Ergosterol aus Pilzen und das besonders in tierischen Systemen wichtige MAMP LPS (Granado, 1995; Meziane *et al.*, 2005; Silipo *et al.*, 2005; Silipo *et al.*, 2008). Auf die Rolle von Peptidoglycan aus bakteriellen Zellwänden als MAMP wird später im Detail eingegangen (siehe 1.5).

Das Bild der Perzeption von MAMPs in Pflanzen ist noch bei weitem nicht vollständig. Es ist zu erwarten, dass weitere MAMPs und PRRs identifiziert werden.

### **1.3 Das pflanzliche Immunsystem**

Krankheitserreger der Pflanzen umfassen Viroide, Viren, Bakterien, Oomyceten und Pilze. Infektionen werden bereits durch präformierte, physikalische Barrieren erschwert. Die Cuticula bildet eine wachshaltige hydrophobe Oberfläche und beeinträchtigt die Adhäsion und Permeation von Mikroorganismen. Die Zellwand ist durch Lignineinlagerungen eine dichte und rigide Matrix, die die Pflanzenzelle abschirmt. Konstitutiv exprimierte Enzyme und Sekundärmetabolite mit antimikrobiellen Wirkungen stellen einen weiteren Schutz vor mikrobieller Infektion dar (Dixon, 2001; Heath, 2000; Nürnberger *et al.*, 2004; Ride, 1983). Pathogene, welche diese Hürden überwinden, werden mit der induzierbaren Antwort des angeborenen Immunsystems der Pflanze konfrontiert.

Die Abwehr von Pathogenen beruht in einer ersten Instanz auf der Erkennung ihrer MAMPs durch PRRs und der MAMP- (PAMP-) vermittelten Immunität (PTI) (siehe auch 1.2). Erfolgreiche Pathogene entwickelten Effektoren, um die PTI zu unterdrücken. Pflanzen haben dieser Effektor-vermittelten Suszeptibilität (ETS) entgegengewirkt, indem sie spezifische Faktoren entwickelten, um diese Effektoren zu erkennen und so die Effektor-vermittelte Immunität (ETI) zu induzieren. Pflanzen müssen also in einem evolutionären Wettlauf ihre Erkennungsmechanismen an veränderte Strategien der Pathogene anpassen (Felix und Boller, 2003; Jones und Dangl, 2006; Nürnberger und Lipka, 2005).

Die Erkennung von MAMPs im Rahmen der PTI führt zu verschiedenen zellulären Antworten. Innerhalb weniger Minuten lässt sich die Depolarisierung der Cytoplasmamembran beobachten. Dies

## Einleitung

geschieht durch einen massiven Influx an  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  und dem damit verbundenen Efflux von  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und Nitrat (Boller, 1995; Mithöfer *et al.*, 2005; Wendehenne *et al.*, 2002).  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert als *second messenger* in der Zelle calciumabhängige Kinasen (Blume *et al.* 2000; Lecourieux *et al.* 2002). Eine weitere frühe Antwort ist die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Diese können toxisch für angreifende Pathogene sein. Außerdem fügen sie auch zusätzliche Quervernetzungen in die pflanzliche Zellwand ein (Apel und Hirt, 2004). Neben ROS wird auch NO produziert, welches ein gewisses zytotoxisches Potential besitzt. Wichtiger aber ist seine Rolle als Signalmolekül, da es aufgrund seiner geringen Größe diffusibel ist und auch Membranen durchtreten kann (Wilson *et al.*, 2008). Früh nach dem Perzeptionsereignis lassen sich massive Änderungen des Phosphoproteoms beobachten (de la Fuente van Bentem und Hirt, 2007; Peck *et al.*, 2001). Die Aktivierung von MAP-Kinase- (MPK-) Phosphorylierungskaskaden führt schließlich zu einer Aktivierung von stressassoziierten Transkriptionsfaktoren (Asai *et al.*, 2002; Nühse *et al.*, 2000). Damit wird eine Umprogrammierung des Transkriptom initiiert, um das Niveau von direkt oder indirekt verteidigungsrelevanten Genprodukten zu verändern. Induziert wird beispielsweise die Expression von *PR-* (*pathogenesis related*) Genen, welche für Chitinasen, Glucanasen, Proteasen usw. codieren, die ein Pathogen während der Infektion beeinträchtigen können (Uknes *et al.*, 1992). Daneben wird die Expression von Genen induziert, die indirekt in die Immunreaktion eingreifen, wie z.B. Gene der Biosynthese von Callose. Diese wird in die pflanzliche Zellwand eingelagert und verstärkt sie (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Veit *et al.*, 2001). Ebenso wird der Spiegel vieler Phytohormone verändert. So aktiviert die MPK6 durch Phosphorylierung die Biosynthese des Stresshormons Ethylen (Liu und Zhang, 2004).

Um eine erfolgreiche Infektion zu etablieren, werden von Pathogenen Effektoren produziert. Viele Effektoren besitzen Funktionen im Aufbau von Infektionsstrukturen oder in der Aufnahme von Nährstoffen aus dem Wirt. Eine wichtige weitere Rolle von Effektoren besteht aber in der Effektorvermittelten Suszeptibilität (ETS) durch Unterdrückung der PTI (Block *et al.*, 2008; Hann *et al.*, 2010; Jones und Dangl, 2006).

Im Fall pathogener Bakterien werden diese Effektoren typischerweise über Typ-III-Sekretionssysteme in das Cytoplasma der pflanzlichen Wirtszellen transportiert (Block *et al.*, 2008; Lindeberg *et al.*, 2009; Oh *et al.*, 2010). Je nach Effektor kann der Angriff auf die PTI auf verschiedenen Ebenen erfolgen. HopM und AvrE aus *P. syringae* manipulieren beispielsweise den Vesikeltransport der pflanzlichen Wirtszelle. Der Vesikeltransport wird benötigt, um beispielsweise zellwandassoziierte Verteidigungsstrukturen, beispielsweise durch Calloseeinlagerungen, zu etablieren (Nomura *et al.*, 2006). YopJ/AvrRxv-Effektoren hingegen greifen direkt in wichtige Prinzipien der Signaltransduktion ein, indem sie MPK-Kaskaden inhibieren (Mukherjee *et al.*, 2006). Die Beeinträchtigung der PTI kann aber auch auf der Ebene der PRRs stattfinden. Die *P. syringae* Effektoren AvrPto und AvrPtoB greifen

## Einleitung

gezielt die LRR-RLKs FLS2 und BAK1 an. Aufgrund der zentralen Stellung von BAK1 als Komponente der MAMP-, Brassinosteroid- und Zelltodsignalwege bedeutet die Beeinträchtigung seiner Funktion die Modulation zahlreicher zellulärer Vorgänge (Shan *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008; Chinchilla *et al.*, 2009). AvrPtoB besitzt aber auch eine E3-Ligase Aktivität, durch die AvrPtoB den für die Chitinperzeption verantwortlichen Rezeptor CERK1 für den Abbau markiert (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009).

Die Bedrohung durch die Effektor-vermittelte Unterdrückung der PTI führte zur Entwicklung von Mechanismen, um Effektoren direkt oder indirekt zu erkennen. In dieser Effektor-vermittelten Immunität (ETI) erfolgt die Erkennung von Effektoren durch Genprodukte der pflanzlichen Resistenz-(R)-Gene (Jones und Dangl, 2006).

Die meisten R-Proteine besitzen sowohl nucleotidbindende als auch LRR-Domänen (NB-LRR). Aufgrund der cytoplasmatischen Natur der meisten bakteriellen Effektoren, findet auch ihre Erkennung intrazellulär statt (Martin *et al.*, 2003; Meyers *et al.*, 2003).

Die direkte Erkennung eines Effektors kann bei PopP2 beobachtet werden, einem Effektor der bereits erwähnten YopJ/AvrRxv Klasse aus *Ralstonia solanacearum*. Dieser Effektor wird durch eine physische Interaktion mit dem *A. thaliana* R-Protein RRS1-R erkannt (Deslandes *et al.*, 2003). Eine direkte Wechselwirkung des R-Proteins mit dem Effektor findet oft nicht statt. Vielmehr überwacht das R-Protein im Sinne der *Guard*-Theorie den Zustand eines potentiellen Zieles eines Effektors (Dangl und Jones, 2001). Der bakterielle Effektor AvrRpt2 vermittelt den Abbau des *A. thaliana* RIN4 Proteins. Dieser Abbau aktiviert das R-Protein RPS2 und führt zur ETI (Axtell *et al.*, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2003). In der ETI kann eine hypersensitive Antwort (HR) induziert werden, eine schnelle und räumlich begrenzte Form des programmierten Zelltods, welcher das Wachstum und die Ausbreitung der Pathogene eingrenzen soll. Die Mechanismen, die zur HR führen, können unterschiedlich sein. HR, die durch den Effektor AvrRps4 vermittelt wird, ist z.B. von Autophagiekomponenten abhängig, während HR durch den Effektor AvrRpt2 davon nicht abhängt (Hofius *et al.*, 2009).

R-Proteine sind also jeweils hoch spezifisch bezüglich ihrer korrespondierenden Effektoren bzw. ihrer assoziierten Wirtsproteine und vermitteln so eine stammspezifische Wirtsimmunität, die *Gen-für-Gen* erfolgt (Block *et al.*, 2008; Flor, 1971). Die PTI vermittelt dagegen eine breite, speziesspezifische oder speziessübergreifende Erkennung und führt so zu einer Nichtwirtsimmunität, die auch in anfälligen Pflanzen aktiv ist, um eine Ausbreitung der Pathogene wenigstens zu erschweren (Abramovitch *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2008; Jones und Dangl, 2006; Sanabria *et al.*, 2010).

Vergleichende Untersuchungen des Transkriptoms und anderer zellulärer Antworten durch PTI und ETI haben ergeben, dass PTI und ETI durch ein sich überlappendes Netzwerk reguliert werden, in dem

sich beide Phänomene gemeinsamer Signalwege bedienen, diese aber unterschiedlich modulieren (Tsuda und Katagiri, 2010).

Die strikte Kategorisierung der pflanzlichen Immunantwort in PTI und ETI ist konzeptionell. Einige Komponenten der Mikrobeninteraktion mit Pflanzen können nicht klar eingeteilt werden (Thomma und Nürnberger, 2011). LPS, das eigentlich alle Eigenschaften eines MAMPs besitzt, kann in *Medicago truncatula* Immunantworten supprimieren und besitzt so auch Eigenschaften eines Effektors (Meziane *et al.*, 2005; Silipo *et al.*, 2005; 2008; Tellström *et al.*, 2007). Auf der anderen Seite aber unterdrücken Nodulationsfaktoren (Nod-Faktoren) aus Rhizobien in Leguminosen die PTI, induzieren aber in anderen Pflanzen typische, frühe Immunantworten (Chang *et al.*, 2009; Staehelin *et al.*, 1994). Die Rolle von Flagellin als modellhaftem MAMP in *A. thaliana* ist bereits beschrieben worden (siehe 1.2). Flagellin kann aber auch als Virulenzfaktor betrachtet werden, da Bakterien mit mutierten Flagellinvarianten, welche eine reduzierte Motilität besitzen, auch eine geringere Virulenz in Pflanzen zeigen (Naito *et al.*, 2008; Taguchi *et al.*, 2006; Taguchi *et al.*, 2010). Eine solche Ambivalenz lässt sich auch auf Effektoren ausweiten, die einerseits ihre Virulenzfunktion als Effektor erfüllen und als solche durch R-Proteine erkannt werden. Andererseits werden sie auch durch PRRs erkannt und besitzen so wiederum Eigenschaften von MAMPs (Thomma *et al.*, 2011).

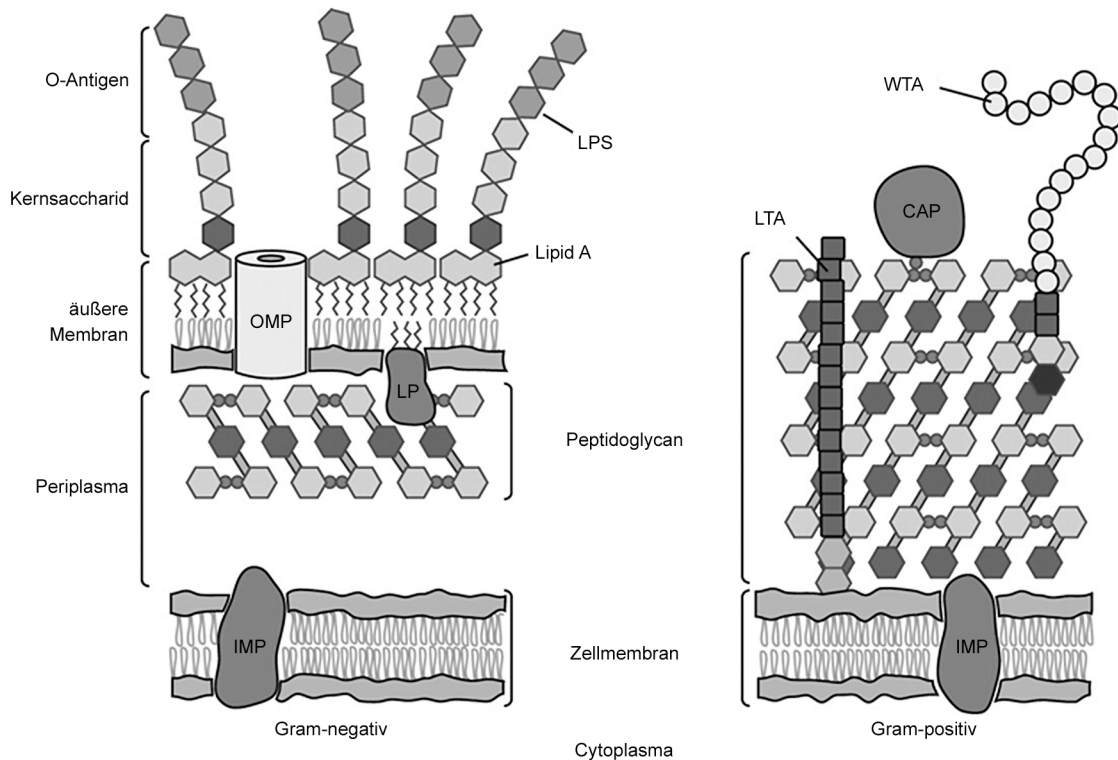
### 1.4 Die bakterielle Zellhülle

Die bakterielle Zellhülle umschließt und schützt das bakterielle Cytoplasma vor dem die Bakterien umgebenden, oft feindlichen Medium. Dabei ist die bakterielle Zellhülle keine undurchdringliche Barriere. Es wird vielmehr die selektive Passage z.B. von Nährstoffen von außen nach innen oder die Passage von Abfallprodukten von innen nach außen vermittelt. Die Zellhülle ermöglicht auch den im Vergleich zu Eukaryonten zellulär einfach strukturierten Bakterien ein Maß an Kompartimentierung, das für die Aufrechterhaltung der Homöostase notwendig ist. So dient das Membransystem der Zellhülle als Oberfläche, an der eine Vielzahl von Reaktionen stattfindet. Das Konzept der Zellhülle beinhaltet eine Mikroumgebung außerhalb der Cytoplasmamembran. Die Zellhülle fungiert darüber hinaus auch als komplexe Schnittstelle, um Interaktionen der Bakterien mit der Umgebung oder anderen Organismen zu ermöglichen (Silhavy *et al.*, 2010; Vollmer *et al.*, 2008).

Strukturelle Unterschiede der bakteriellen Zellhülle ermöglichen die Einteilung nahezu aller Bakterien in zwei Gruppen (Abbildung 1.1). Diese Unterschiede basieren führen zu einem differenziellen Gram-Färbeverhalten der Bakterien (Gram, 1884). Während die Zellhülle der einen Bakteriengruppe durch das Verfahren nach Gram gefärbt werden kann, kann die andere Gruppe diese Färbung nicht bewahren. So entsprechen diese Gruppen den Gram-positiven und den Gram-negativen Bakterien

## Einleitung

(Beveridge, 2001). Auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Gram-positiven und Gram-negativen Zellhülle soll im Folgenden eingegangen werden.



**Abbildung 1.1. Die bakterielle Zellhülle.**

Gegenüberstellung der Zellhülle Gram-negativer (links) und Gram-positiver (rechts) Bakterien (modifiziert aus Silhavy *et al.* 2010). WTA – Wandteichonsäure, LTA – Lipoteichonsäure, IMP – integrales Membranprotein, CAP – kovalent verknüpftes Protein, OMP – Protein der äußeren Membran, LP – Lipoprotein, LPS – Lipopolysaccharid.

### 1.4.1 Die Gram-negative Zellhülle

Die Gram-negativen Zellhülle besteht aus der äußeren Membran, dem Periplasma mit der Zellwand aus Peptidoglycan und der inneren Membran (Abbildung 1.1, links) (Glauert und Thornley, 1969; Mitchell, 1961).

Die äußere Membran ist ein wichtiges Merkmal, welches Gram-negative von Gram-positiven Bakterien unterscheidet. Die äußere Membran setzt sich, wie andere Biomembranen, aus einer Lipiddoppelschicht zusammen. Bemerkenswert ist allerdings, dass es sich nicht um eine klassische Phospholipiddoppelschicht handelt. Phospholipide werden nur im inneren Blatt gefunden. Das äußere Blatt der Membran setzt sich aus Glycolipiden, insbesondere Lipopolysaccharid (LPS), zusammen (Kamio und Nikaido, 1976).

Die äußere Membran besitzt eine wichtige Funktion als Barriere nach außen. Diese Funktion wird durch das LPS geprägt. LPS-Moleküle neutralisieren ihre Ladung durch die Gegenwart von  $Mg^{2+}$ -Ionen und können einander gut binden. Dadurch entsteht ein nicht-fluides Kontinuum, das besonders für

## Einleitung

hydrophobe Moleküle eine Diffusionsschranke bildet (Glauert und Thornley, 1969; Mitchell, 1961; Raetz und Whitfield, 2002).

Neben LPS enthält die äußere Membran auch Proteine. Es können zwei Gruppen von Proteinen unterschieden werden, Lipoproteine und  $\beta$ -Barrel Proteine. Lipoproteine sind durch einen aminoterminalen Cystein mit Lipidresten verknüpft und auf diese Weise in das innere Blatt der Membran eingebettet (Sankaran und Wu, 1994). Das Braunsche Lipoprotein ist weiterhin kovalent über die meso-Diaminopimelinsäure des PGN-Stammpeptids mit dem PGN verknüpft und verbindet so die äußere Membran mit der Zellwand (Braun *et al.*, 1985; Braun und Hantke, 1974).

$\beta$ -Barrel Proteine bilden beispielsweise Porine in der äußeren Membran, welche die passive Diffusion kleiner Moleküle ermöglichen (Cowan *et al.*, 1992). Die äußere Membran enthält nur wenige Enzyme, so z.B. Phospholipasen, Proteasen und Enzyme, welche für Modifikationen von LPS verantwortlich sind (Nikaido, 2003).

Im periplasmatischen Zwischenraum der äußeren und inneren Membran befindet sich die Zellwand aus Peptidoglycan. Das Periplasma bildet ein wichtiges bakterielles Kompartiment. Hier werden für das Bakterium potentiell gefährliche Enzyme, wie RNasen oder alkalische Phosphatasen, gefunden (Silhavy *et al.*, 2010). Es enthält periplasmatische Bindeproteine, die essentielle Rollen in Kohlehydrat- oder Aminosäuretransport oder Chemotaxis spielen. Daneben werden chaperonartige Proteine, die bei der Biogenese der Zellhülle benötigt werden, gefunden (Silhavy *et al.*, 2010).

Die innere Membran ist eine Phospholipiddoppelschicht, die typische Membranproteine enthält, die Teil des Energiestoffwechsels, der Lipidbiosynthese, der Proteinsekretionsmaschinerie und des Transports vieler Substanzen sein können (De Duve und Wattiaux, 1966; Mullineaux *et al.*, 2006).

Verschiedene Strukturen, wie Typ-III-Sekretionssysteme, welche Effektoren in die eukaryontische Wirtszelle des Bakteriums injizieren, Flagellen für die bakterielle Motilität oder auch Effluxpumpen, welche toxische Substanzen aus der Zelle in das umgebende Medium ausscheiden, überbrücken die drei Schichten der Gram-negativen Zellhülle (Koronakis *et al.*, 2000; Macnab, 2003).

### 1.4.2 Die Gram-positive Zellhülle

Die Gram-positive Zellhülle besitzt keine äußere Membran. Da die äußere Membran in Gram-negativen Bakterien indirekt dazu beiträgt, die innere Membran zu stabilisieren, muss dies durch einen vielschichtigen Peptidoglycansacculus kompensiert werden (Silhavy *et al.*, 2010). Die Struktur der Gram-positiven Zellhülle ist besonders an *Staphylococcus aureus* erarbeitet worden (Abbildung 1.1 rechts).

Im Peptidoglycansacculus finden sich Teichonsäuren, anionische Polymere der Zelloberfläche aus sich wiederholenden Glycerinphosphat-, Glycosylphosphat- oder Ribitolphosphateinheiten. Während Wandteichonsäuren über Phosphodiester kovalent an N-Acetylmuraminreste des Peptidoglycans gebunden sind, sind Lipoteichonsäuren über Glycolipide in der Cytoplasmamembran verankert (Morath *et al.*, 2005; Silhavy *et al.*, 2010). Lipoteichon- und Wandteichonsäuren bilden ein Kontinuum an negativer Ladung, wobei die Ladungsdichte durch Modifikationen des Polymerrückgrats der Teichonsäuren z.B. durch Anfügen von Aminosäuren moduliert werden kann. Dies kann die Interaktion mit anderen Organismen beeinflussen und die Sensitivität der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Substanzen beeinflussen (Morath *et al.*, 2005; Silhavy *et al.*, 2010).

Die Zellhülle der Gram-positiven Bakterien enthält eine Vielzahl an Proteinen, die z.B. eine wichtige Rolle in der Interaktion mit anderen Organismen spielen. So tragen bakterielle Oberflächenproteine als Adhäsine zum Anheften der Bakterien an Strukturen ihres Wirts bei, was essentiell für eine erfolgreiche Kolonisation und Infektion ist. Da es keine äußere Membran gibt, die Proteine zurückhalten könnte, sind die Proteine der Gram-positiven Zellhülle oft durch Transmembranhelices oder Lipidanker mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Weitere Proteine binden Teichonsäuren. Andere Proteine sind kovalent, z.B. über die Stammpeptide, an das Peptidoglycan gebunden (Dramsı *et al.*, 2008; Marraffini *et al.*, 2006).

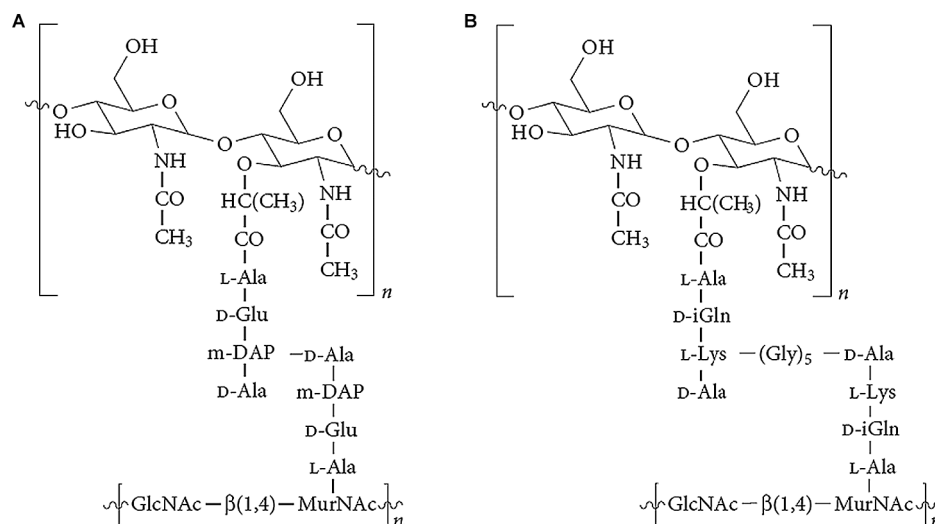
### 1.4.3 Peptidoglycan

Peptidoglycan (PGN) bildet einen wichtigen und essentiellen Teil der bakteriellen Zellwand. Es befindet sich außerhalb der Cytoplasmamembran (Abbildung 1.1). Als starres Exoskelett erhält PGN die Integrität der bakteriellen Zelle, indem es dem zellulären Turgor entgegenwirkt und maßgeblich die Form der Bakterien bestimmt. PGN dient auch als Matrix, mit der andere Komponenten der Zellhülle, wie Proteine oder Teichonsäuren, assoziiert sind. Wird während des Zellwachstums die Biosynthese von PGN inhibiert oder wird PGN spezifisch, beispielsweise durch Lysozym, abgebaut, so ist die Folge die Lyse des Bakteriums.



Fast alle Bakterien besitzen PGN. Nur wenige Bakterien, wie Mycoplasmen, Rickettsien, Planctomyceten, Chlamydien und *Orientia*, besitzen kein PGN. PGN Gram-negativer Bakterien besteht aus nur wenigen, das Gram-positiver aus vielen Schichten, die einen geschlossenen Sacculus um die Zelle bilden (Vollmer und Bertsche, 2008; Vollmer und Seligman, 2010).

Ein lineares Glycanrückgrat mit Quervernetzungen kurzer Peptide bestimmt die grundlegende Struktur des PGN. Die Glycanstränge bestehen aus alternierenden  $\beta(1,4)$ -glycosidisch verknüpften N-Acetylglucosamin- (GlcNAc) und N-Acetylmuraminsäureresten (MurNAc) (Abbildung 1.2 A und B). Die D-Lactoylgruppe jedes MurNAc wird durch ein Stammpeptid substituiert, dessen Zusammensetzung oft  $^1\text{L-Ala-}^2\gamma\text{-D-Glu-}^3\text{Diaminosäure-}^4\text{D-Ala-}^5\text{D-Ala}$  ist. Die Diaminosäure in Position 3 ist oft 2,6-Diaminopimelinsäure (DAP) oder L-Lys. Gram-negative Bakterien besitzen meistens PGN des DAP-Typs, Gram-positive Bakterien dagegen des Lys-Typs. Diese Einteilung ist jedoch keineswegs ausschließlich. *Bacillus subtilis* ist beispielsweise ein Gram-positives Bakterium mit PGN des DAP-Typs. Der letzte D-Ala Rest des Stammpeptids wird nur in naszierendem PGN gefunden. In reifem PGN ist normalerweise die Carboxylgruppe des D-Ala an Position 4 mit der Aminogruppe einer Diaminosäure eines anderen Stammpeptids in Position 3 quervernetzt. In PGN des DAP-Typs findet diese Quervernetzung oft direkt statt, während in PGN des Lys-Typs oft eine Interpeptidbrücke, wie z.B. eine Pentaglycinbrücke in *S. aureus*, vorliegt (Vollmer, 2008; Vollmer *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.2. DAP- und Lys-Typ-Peptidoglycan.**

DAP (meso-Diaminopimelinsäure)-Typ Peptidoglycan (A), wie es vorwiegend in Gram-negativen, und Lys (Lysin)-Typ Peptidoglycan (B), wie es vorwiegend in Gram-positiven Bakterien gefunden wird (modifiziert aus Royet und Dziarski 2007).

Peptidoglycan degradierende Enzyme wurden in Bakterien, Pilzen, Tieren und Pflanzen identifiziert. Diese Enzyme hydrolysieren bestimmte Bindungen des PGN Moleküls. Muramidasen wie z.B. Lysozyme hydrolysieren das Glycanrückgrat, indem sie die glycosidische Bindung zwischen GlcNAc

und MurNAc spalten. Endopeptidasen spalten die Peptidreste. N-Acetylmuramyl-L-alaninamidasen spalten die Bindung zwischen Glycanstrang und dem Stammpeptid. Diese enzymatischen Aktivitäten spielen wichtige Rollen in biologischen Prozessen wie dem Zellwandumsatz, der Zellteilung, der Transformation und der Sporulation. Einige dieser Enzyme wirken bakterizid oder sind Teil der PGN Perzeptionsmaschinerien bestimmter Wirtsorganismen (Royet und Dziarski, 2007).

Obwohl die genannten Strukturmerkmale des PGN im Wesentlichen in allen Bakterien gefunden werden können, gibt es Variationen beim Vergleich des Glycanrückgrats und der Zusammensetzung des Stammpeptids oder der Zusammensetzung sowie der Position der Interpeptidbrücke in verschiedenen Spezies. Aber auch innerhalb einer Spezies können Veränderungen in der Feinstruktur des PGN, abhängig von den Wachstumsbedingungen, wie z.B. der Wachstumsphase, der Zusammensetzung des Mediums, der Gegenwart von Antibiotika usw., beobachtet werden (Vollmer, 2008; Vollmer *et al.*, 2008).

### 1.5 Peptidoglycan als MAMP in Pflanze und Tier

PGN ist essentiell für Bakterien und besitzt eine konservierte Grundstruktur (1.4.3), wodurch es wichtige Prämissen eines MAMPs erfüllt (Dziarski und Gupta, 2005).

PGN löst in *A. thaliana* und anderen Pflanzen die typischen Immunreaktionen eines MAMPs aus. PGN des Lys-Typs aus *S. aureus* wird ebenso wie PGN des DAP-Typs aus *E. coli* und *X. campestris* pv. *campestris* erkannt (Felix und Boller, 2003; Erbs *et al.*, 2008; Gust *et al.*, 2007). Diese PGNs unterscheiden sich im Peptidanteil (1.4.3). Es könnte also jede der beiden PGN-Varianten durch ein unterschiedliches Rezeptorsystem erkannt werden. Ein Rezeptor, dessen Epitop aber in den Glycansträngen liegt, könnte möglicherweise beide PGNs erkennen. Für die letzte These spricht die Beobachtung, dass PGN aus *S. aureus*, dessen quervernetzende Peptidbrücke durch Lysostaphin gespalten wurde, immer noch Immunreaktionen in *A. thaliana* auslöst (Gust *et al.*, 2007). Komplexe Gemische aus Muropeptiden, die aus Verdauung durch die Muramidase Mutanolysin aus PGN freigesetzt wurden, konnten ähnliche Reaktionen auslösen. Die Größe der aktiven PGN-Fragmente konnte jedoch nicht bestimmt werden (Erbs *et al.*, 2008). Die Induktion verschiedener Antworten, wie die Mediumalkalinisierung in pflanzlichen Zellkulturen, erfolgen verspätet nach PGN Behandlung im Vergleich mit anderen MAMPs (Gust *et al.*, 2007). Möglicherweise muss das makromolekulare PGN, bevor es perzipiert werden kann, prozessiert werden. In einer anderen Arbeit wurde in *A. thaliana* die Chitinase CHIA identifiziert, welche hydrolytische Aktivität gegenüber bakteriellen Zellwänden zeigt und einen wichtigen Anteil an der Resistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen besitzt (Grabherr, 2011). Es bleibt zu zeigen, dass PGN Fragmente, welche durch diese Chitinase erzeugt werden, auch tatsächlich immunogene Eigenschaften besitzen.

## Einleitung

In tierischen Systemen sind unterschiedliche PGN-Erkennungsstrategien bekannt. Eine extrazelluläre Erkennung Gram-positiven PGNs erfolgt durch TLR2 (Akira *et al.*, 2006; Müller-Anstett *et al.*, 2010). PGN bindet direkt an TLR2 (Iwaki *et al.*, 2002; Müller-Anstett *et al.*, 2010). Die Bindung des PGN wird durch CD14, ein durch einen Glycosylphosphatidylanker mit der Cytoplasmamembran assoziiertes Corezeptorprotein, vermittelt oder verstärkt (Gupta *et al.*, 1996). Dabei bindet CD14 polymeres PGN. Niedermolekulare PGN-Fragmente, wie Muramyldipetide oder Disacchariddipeptide, binden CD14 nur, wenn sie mit Hilfe größerer Strukturen immobilisiert wurden (Dziarski *et al.*, 1998; Weidemann *et al.*, 1997). In der jüngeren Vergangenheit wurde die Perzeption von PGN durch TLR2 in Frage gestellt. Die aktivierende Wirkung des PGN wurde dabei Verunreinigungen aus Lipoproteinen oder Teichonsäuren zugeschrieben (Travassos *et al.*, 2004; Zähringer *et al.*, 2008). Allerdings konnte gezeigt werden, dass PGN mit TLR2 colokalisiert und TLR2 außerdem für die Erkennung von hoch aufgereinigtem PGN nötig ist (Müller-Anstett *et al.*, 2010).

PGN aus intrazellulären Bakterien oder PGN, welches durch zelluläre Aufnahmemechanismen in die Wirtszelle transportiert wurde, kann durch NOD1 und NOD2 erkannt werden. Sie besitzen eine C-terminale LRR-Domäne und eine N-terminale nucleotidbindende Oligomerisierungsdomäne (NOD) sowie eine bzw. zwei N-terminale Caspaserekrutierungsdomänen (CARD). Damit sind sie strukturell eng mit den pflanzlichen R-Proteinen verwandt (Fritz *et al.*, 2006). NOD1 erkennt Gram-negative und einige spezifische Gram-positive Bakterien durch Perzeption des Dipeptids  $\gamma$ -D-Glu-*meso*-DAP. NOD2 erkennt als Minimalmotiv Muramyldipeptid (MDP), welches in Gram-positivem und Gram-negativem PGN enthalten ist. Dadurch ist NOD2 ein allgemeiner Sensor für PGN, während NOD1 eine Untergruppe erkennt (Chamaillard *et al.*, 2003; Fritz *et al.*, 2006; Girardin *et al.*, 2003). Bei der Perzeption sind NOD1 und NOD2 eng mit der Cytoplasmamembran assoziiert (Barnich *et al.*, 2005). Die PGN-Perzeption durch NOD1 bzw. NOD2 aktiviert eine Anzahl Signalkaskaden, wie z.B. den proinflammatorischen NF- $\kappa$ B-Weg, das Caspase-1-Inflammosom oder Autophagie vermittelnde Wege (Philpott und Girardin, 2010).

In Insekten und Säugetieren wurde eine weitere Klasse von PGN Bindeproteinen beschrieben, die Peptidoglycan Erkennungsproteine (PGRPs). In *Drosophila melanogaster* existieren 13 *PGRP* Gene, die für mindestens 17 PGRPs codieren (Werner *et al.*, 2000). Sie werden in kurze, extrazelluläre PGRP-S und lange PGRP-L eingeteilt, die intrazellulär, membrandurchspannend oder extrazelluläre Proteine sein können. PGRPs in Säugetieren werden analog dazu eingeteilt (Liu *et al.*, 2001). Alle PGRPs besitzen eine C-terminale PGRP-Domäne, die homolog einer Typ 2 Amidase aus Phagen oder Bakterien ist (Kang *et al.*, 1998; Kiselev *et al.*, 1998). Die Länge des N-Terminus variiert stark und seine Sequenz ist spezifisch für unterschiedliche PGRPs (Kang *et al.*, 1998). Die Aktivierung von PGRPs löst unterschiedliche Signalkaskaden aus. PGRP-SA erkennt in *D. melanogaster* Gram-positives PGN und aktiviert den Toll-Pfad (Michel *et al.*, 2001). Das PGN muss vor der Perzeption durch PGRP-SA

aber durch die Glucanase GGBP1 prozessiert werden, wobei Glycanstränge mit freien reduzierenden MurNAc-Enden erzeugt werden (Filipe *et al.*, 2005; Gobert *et al.*, 2003). Der Weg über Toll ähnelt also dem über die TLRs in Säugetieren, allerdings wird Toll hier indirekt durch eine Proteasekaskade aktiviert, welche durch PGRP-SA induziert wird (Royet und Dziarski, 2007). Das Transmembranprotein PGRP-LC bindet Gram-negatives DAP-Typ PGN, was eine Oligomerisierung der PGRP-LCs zur Folge hat. Hierdurch wird das IMD Protein (*immune deficiency*) rekrutiert und dessen *death*-Domäne aktiviert. IMD induziert einen von Toll unabhängigen NF- $\kappa$ B-Weg (Choe *et al.*, 2002; Gottar *et al.*, 2002). Für PGRP-LC konnten drei unterschiedliche Splicingvarianten nachgewiesen werden, die sich in ihren extrazellulären Domänen unterscheiden und verschiedene Bindspezifitäten aufweisen (Leulier *et al.*, 2003; Stenbak *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2003). Toll und IMD lösen humorale Immunantworten aus. Zusätzlich induzieren PGRPs aber auch die Prophenoloxidaseantwort. PGRP-LE bindet PGN und aktiviert daraufhin die Prophenoloxidasekaskade. Pathogene werden von einer Kapsel aus Melanin umhüllt und reaktive Sauerstoffspezies gebildet (Takehana *et al.*, 2002; 2004). PGRP-LC und PGRP-SC1 führen zudem zur Phagozytose Gram-negativer Bakterien (Kocks *et al.*, 2005; Rämetsä *et al.*, 2002).

Einige PGRPs der Insekten benötigen für ihre Funktion enzymatische Aktivität. PGRP-LB ist eine N-Acetylmuramylalaninamidase, die die Amidbindung zwischen L-Ala und MurNAc spaltet. So wird das Stammpeptid des PGN vom Glycanrückgrat entfernt. Der Verdau von PGN mit derartigen Amidasen inaktiviert die Erkennung des polymeren PGN. Dies könnte die komplexe Immunantwort modulieren. Aufgrund des spezifischen Expressionsmusters dieser Amidase wird die Antwort räumlich und zeitlich eingeschränkt (Mellroth *et al.*, 2003). Damit tragen die PGRPs zu einer homöostatischen Balance der Immunantworten auf kommensale und pathogene Bakterien bei (Royet und Dziarski, 2007). PGRP-SB1 hydrolysiert nur PGN aus *Bacillus megaterium* und ist damit bakterizid gegen diese eine Spezies (Mellroth und Steiner, 2006). Das bereits vorgestellte PGRP-SA ist keine Amidase sondern besitzt Carboxypeptidaseaktivität und spaltet so die Bindung zwischen DAP und D-Ala im Stammpeptid des Gram-negativen PGN. Die Bedeutung dieser Aktivität ist unklar (Chang *et al.*, 2004).

PGRPs der Säugetiere wirken meistens bakterizid und fungieren nicht in der Induktion von Immunreaktionen. Auch sie besitzen oft N-Acetylmuramylalaninamidaseaktivität. Diese PGLYRPs sind direkt gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien aktiv (Lu *et al.*, 2006; Tydell *et al.*, 2002). Sie werden selektiv in verschiedenen Geweben exprimiert und haben spezifische bakterizide Eigenschaften (Mathur *et al.*, 2004). Diese Spezifität hat die Abwehr von Pathogenen und die Kontrolle der kommensalen Bakterienpopulationen zur Folge, ohne die letztgenannten zu eliminieren (Royet und Dziarski, 2007).

Das minimale Bindemotiv der PGRPs ist das Muramyltripeptid. Die Erkennung findet spezifisch in einer Bindetasche statt, wobei umgebende Lösungsmittelmoleküle komplett ausgeschlossen werden.

## Einleitung

Die Interaktionen in der Bindetasche werden durch den Peptidrest und das MurNAc vermittelt. Das Muramylpentapeptid wird noch effizienter gebunden als das Tripeptid. Die Unterscheidung zwischen Gram-negativen und Gram-positiven PGN erfolgt durch eine gezielte Erkennung der zusätzlichen Carboxylgruppe der DAP an Position drei des Stammpeptids. Zusätzlich wird die Erkennung der Peptidbrücke, welche zwei Stammpeptide des PGN vernetzt, durch PGRPs mit zwei Bindedomänen oder durch Dimerbildung zweier PGRPs diskutiert (Choe *et al.*, 2005; Choe *et al.*, 2002; Guan *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Mellroth und Steiner, 2006; Swaminathan *et al.*, 2006).

PGN wird also durch unterschiedliche Mechanismen perzipiert. Pathogene stehen deshalb unter einem großen Selektionsdruck, ihr PGN so zu modifizieren, dass es nicht mehr oder weniger effizient erkannt wird. Die essentiellen Funktionen des PGN sind aber eng mit seiner Struktur assoziiert (siehe 1.4.3). Deshalb sind Modifikationen nur in einem engen Bereich möglich, in dem die Erfüllung dieser Funktionen noch gewährleistet ist. Dennoch ist es einigen Pathogenen gelungen, ihr PGN zu maskieren. Durch Deacetylierung des GlcNAc zu Glucosamin entgeht das PGN aus *Listeria monocytogenes* sowohl der Hydrolyse durch Lysozym als auch der Erkennung durch das Wirtsimmunsystem (Bishop *et al.*, 2007; Boneca *et al.*, 2007; Cossart und Toledo-Arana, 2008). Ähnliche Phänomene sind auch von anderen Bakterien bekannt (Davis und Weiser, 2011; Wang *et al.*, 2009).

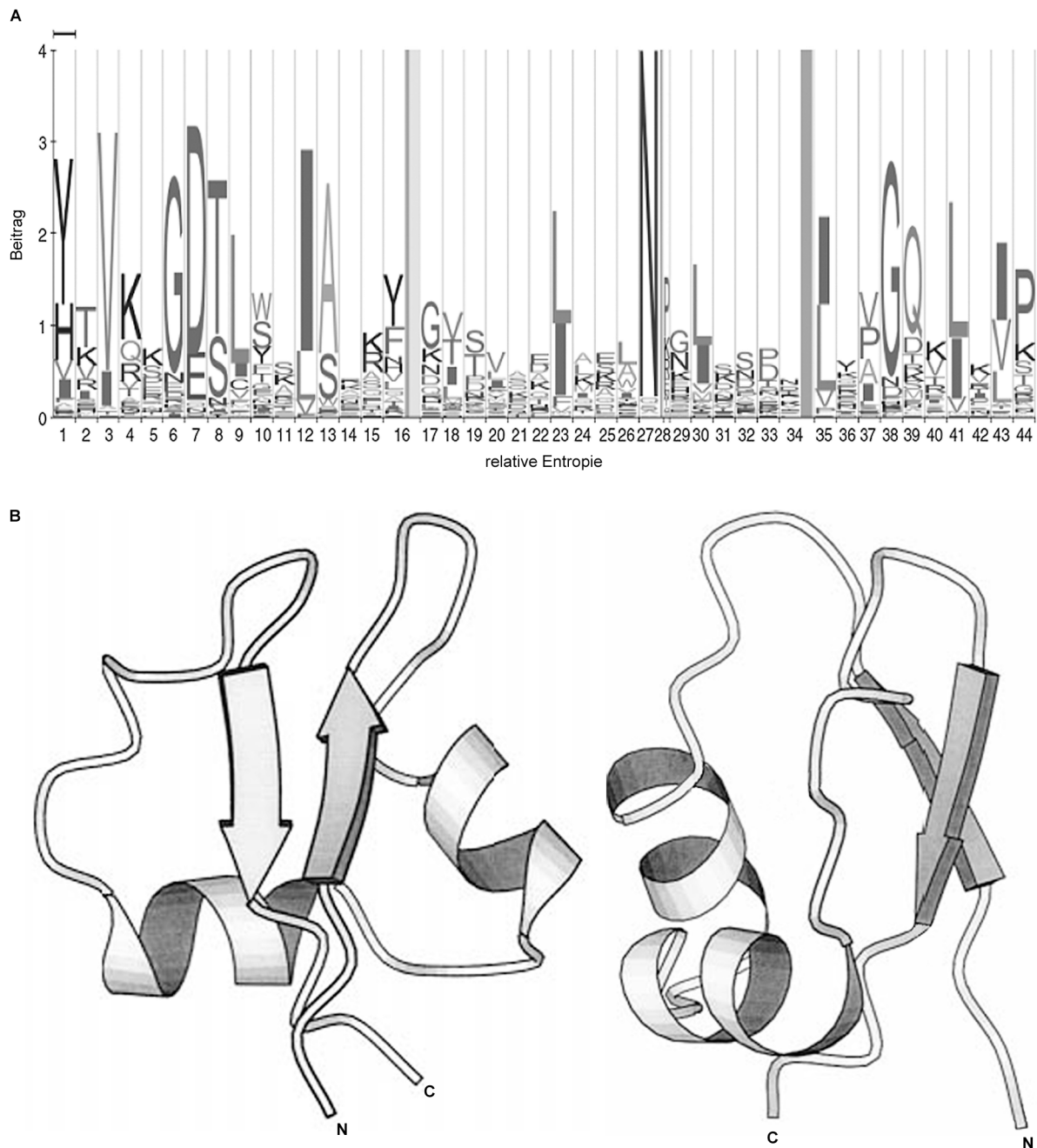
Eine solche Plastizität des PGN und die damit verbundene Verringerung seiner Erkennung ist auch in Pflanzen beobachtet worden. PGN aus *Agrobacterium tumefaciens* zeigt eine deutlich schwächere immunogene Wirkung in *A. thaliana* als PGN aus *Xcc*. Diese PGNs unterscheiden sich in einer Aminosäure des Peptidanteils sowie in einer Acetylgruppe (Erbs *et al.*, 2008).

## 1.6 Das Lysin-Motiv

Das Lysin-Motiv (LysM) wurde erstmals am Beispiel des Lysozyms des *Bacillus* Phagen  $\Phi 29$  beschrieben (Garvey 1986). Mittlerweile wurden durch Sequenzvergleiche mehr als 1500 Proteine mit LysM-Domänen gefunden (Buist *et al.*, 2008). In Bakterien findet sich das Motiv besonders in Enzymen des PGN-Abbaus, in denen es als Anker für die enzymatischen Domänen am PGN dient. Neben bakteriellen Proteinen mit LysM-Domänen sind besonders pflanzliche LysM-Proteine untersucht worden.

Die LysM-Domäne umfasst 42 bis 48 Aminosäuren. Eine Analyse aller bekannten Lysin-Motivsequenzen ergab die in Abbildung 1.3 A gezeigte Konsensussequenz (Desvaux *et al.*, 2006). Besonders stark sind die ersten 16 Aminosäuren konserviert. Etwas weniger gut sind die letzten 10 Aminosäuren des Motivs konserviert. Die zentrale Region des Lysin-Motivs ist mit Ausnahme der Ile/Leu-Reste an den Positionen 23 und 30 und des Asn an Position 27 nur schwach konserviert.

Strukturell beschrieben wurde die LysM-Domäne durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der Mureintransglycosylase MltD aus *E. coli*, durch *in silico* Strukturvorhersagen einer LysM-Domäne des Ascomyceten *Tuber borchii* sowie durch die Kristallstrukturanalysen der LysM-Domäne des ykuD Proteins aus *Bacillus subtilis* (Bateman und Bycroft, 2000; Bielnicki *et al.*, 2006; Percudani, 2005). Das Lysin-Motiv liegt in einer symmetrischen  $\beta\alpha\beta$ -Topologie vor, in der die beiden  $\alpha$ -Helices auf einer Seite eines zweisträngigen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblatts liegen (Abbildung 1.3 B). Die beiden hoch konservierten Gly-Reste (an Position 6 und 38 in Abbildung 1.3 A) bilden enge  $\beta$ -Schleifen. Der stark konservierte Asn-Rest an Position 28 bildet eine  $\beta$ -Schleife am Ende der zweiten Helix der LysM-Domäne. Diese Strukturanalysen ermöglichten durch *homology modelling* die Vorhersage der LysM-Domäne des NFP-Proteins aus der Leguminose *Medicago truncatula*, wobei sich auch hier die  $\beta\alpha\beta$ -Topologie bestätigen ließ (Mulder *et al.*, 2006). LysMs treten oft als Wiederholungen im gleichen Protein auf. Dann sind die Motive oft durch flexible Regionen verbunden (Buist *et al.*, 2008).



**Abbildung 1.3. Das Lysin-Motiv.**

(A) Einige Aminosäurereste des Lysin-Motivs sind konserviert. Grad der Konservierung der Aminosäuren nach Sequenzvergleich von 1668 in pfam annotierten Lysin-Motiven mit Hilfe des Profile Hidden Markov Model (pHMM)-Logoformats (modifiziert aus Desvaux *et al.*, 2006). (B)  $\beta\alpha\beta$ -Struktur des Lysin-Motivs. Die Struktur des Lysin-Motivs aus MltD wurde durch NMR-Studien aufgeklärt und ist in der Aufsicht (links) und von der Seite abgebildet (rechts, beides modifiziert aus Bateman und Bycroft, 2000).

Eine Reihe von Bindestudien weisen darauf hin, dass LysM-Domänen Bindemodule für Liganden mit N-Acetylglucosaminmotiven sind. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die N-Acetylmuramidase AcmA aus *Lactococcus lactis* PGN-Zellwände nichtkovalent bindet und hydrolysiert. Durch Bindestudien mit PGNs unterschiedlicher Aminosäurezusammensetzung der Stammpeptide und unterschiedlichen Arten der Interpeptidvernetzung konnte bestätigt werden,

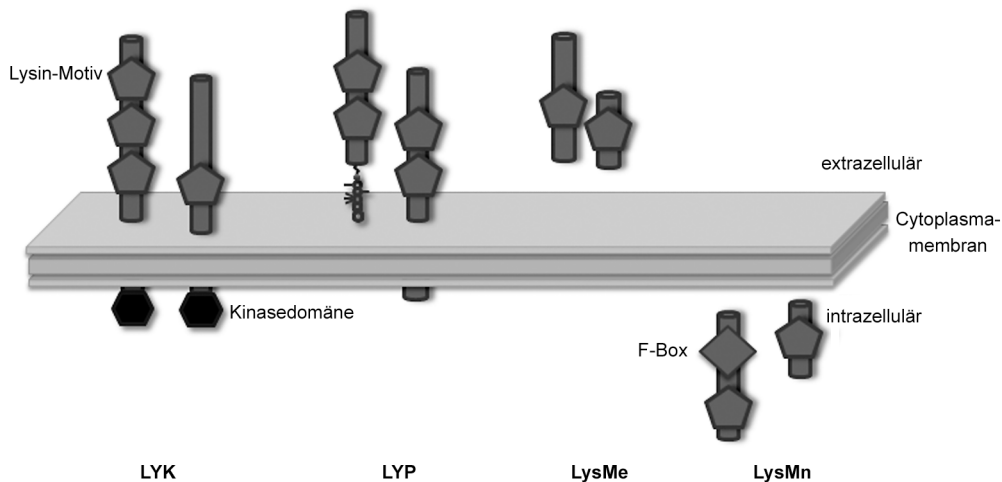
dass LysM-Domänen das Glycanrückgrat des PGN binden (Buist *et al.*, 1997; 1995; Steen *et al.*, 2003). Weitere Hinweise auf die Bindung von N-Acetylglucosamin-haltigen Glycanen, wie z.B. Chitin, ergeben sich aus der Anwesenheit von LysM-Domänen in Chitinasen aus *Volvox carteri* und *Caenorhabditis elegans* (Bateman und Bycroft, 2000). Eine genauere Charakterisierung der Bindung zu Chitooligosacchariden gelang durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der Bindung von zwei N-terminalen LysM-Domänen einer Chitinase aus *Pteris ryukyuensis*. (GlcNAc)<sub>5</sub> konnte von diesen LysM-Domänen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 gebunden werden. (GlcNAc)<sub>3</sub> wurde nur äußerst schwach gebunden (Ohnuma *et al.*, 2008). In Pflanzen konnte die Interaktion von Chitin mit der LysM-RLK CERK1 aus *A. thaliana* und CEBiP aus Reis nachgewiesen werden (Iizasa *et al.*, 2010; Kaku *et al.*, 2006; Petutschnig *et al.*, 2010). Auf diese beiden chitinbindenden Proteine wird später detaillierter eingegangen. *In silico* konnte die potentielle Fähigkeit der LysM-Domäne des *M. truncatula* NFP, das GlcNAc-Rückgrat rhizobieller Nod-Faktoren zu binden, gezeigt werden (Mulder *et al.*, 2006). Mit LysM-Proteinen aus unterschiedlichen Organismen konnte somit gezeigt werden, dass die Substrate, welche LysM-Proteine binden, GlcNAc als gemeinsames Motiv besitzen.

### **1.7 Proteine mit LysM-Domänen in Pflanzen und ihre Funktionen**

Außer in Archeen konnten Proteine mit LysM-Domänen bisher in allen Organismen gefunden werden. Neben den bakteriellen gehören die pflanzlichen zu den am besten charakterisierten LysM-haltigen Proteinen. In Prokaryonten, Pilzen und einfachen Metazoen stehen die LysM-Domänen im Kontext mit vielen unterschiedlichen Domänen. Diese Vielfalt nimmt in Grünalgen und Moosen ab. Bei den Gymnospermen und Angiospermen finden sich nur vier Klassen von Proteinen mit Lysin-Motiven (Abbildung 1.4) (Buist *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).



## Einleitung



**Abbildung 1.4. Modelle der Proteine mit LysM-Domänen in höheren Pflanzen.**

Proteine mit LysM-Domänen können in Pflanzen in vier Gruppen eingeteilt werden: LYK - Rezeptor-ähnliche Kinase (RLKs) mit extrazellulärer LysM-Domäne, LYP - membranverankerte (mittels Glycosylinositolphosphatidylanker oder Transmembrandomäne) Proteine mit extrazellulärer LysM-Domäne, LysMe - sekretierte Proteine, ohne Membranverankerung, LysMn - intrazelluläre Proteine, z.T. mit zusätzlicher F-Box Domäne (Zhang *et al.*, 2009).

Plasmamembranständige, rezeptorähnliche Kinasen (RLKs) mit extrazellulärer LysM-Domäne und intrazellulärer Ser/Thr-Kinasedomäne bilden die Gruppe der **LYKs**. LYKs werden nur in Moosen, Gymnospermen und Angiospermen gefunden. Diese Familie hat durch Genomduplikationen eine besondere Expansion erfahren, sodass in den meisten Pflanzengenomen viele Kopien der *LYK*-Gene vorliegen. Ihre Zahl schwankt zwischen drei *LYK*-Genen in *Zea mays* und 21 in der Leguminose *Glycine max*. Mitglieder dieser Klasse wurden bisher am besten charakterisiert. So repräsentieren die Nodulationsfaktorrezeptoren in Leguminosen und die Chitinrezeptoren in Reis und *A. thaliana* typische LYKs (siehe 1.7.1 und 1.7.2).

**LYPs** sind Proteine mit zwei Lysin-Motiven. Dabei ist das erste Lysin-Motiv in allen LYPs sehr ähnlich, während das zweite einen hohen Grad an Divergenz aufweist. Die Positionen der Lysin-Motive im N-terminalen Bereich der LYPs sind sehr stark konserviert. LYPs sind entweder direkt durch Membranhelices oder indirekt durch Glycosylphosphatidyl (GPI)-Anker in der Cytoplasmamembran verankert. Die Anzahl an Kopien der *LYPs* im Genom variiert nur wenig. CEBiP aus Reis ist das einzige charakterisierte Mitglied dieser Gruppe (siehe 1.7.1).

Die **LysMe** Proteine sind sekretierte Proteine, mit nur einem Lysin-Motiv. Sie sind nicht mit der Cytoplasmamembran assoziiert. Die Genarchitektur der *LysMes* ist sehr einfach und ohne Introns. Die Sequenz ihres Lysin-Motivs ist stark konserviert.

Mitglieder dieser Familien werden sekretiert oder besitzen einen extrazellulären Anteil. Eine weitere Familie Lysin-Motiv-enthaltender Proteine ist rein intrazellulär. Diese **LysMns** besitzen nur ein Lysin-Motiv. Einige LysMns besitzen außerdem eine F-Box Domäne. *LysMns*, die für Proteine mit F-Box

Domäne codieren, treten nur in einer einzelnen Kopie im Genom auf. Die Funktionen von LysMes und LysMns sind bisher unbekannt.

### 1.7.1 Die Chitinperzeption

Chitin, der Hauptbestandteil pilzlicher Zellwände, ist ein Polymer aus  $\beta(1-4)$  verknüpften GlcNAc Einheiten. Mono- und dicotyledone Pflanzen sind in der Lage, Chitin zu erkennen und Verteidigungsreaktionen zu induzieren (Felix *et al.*, 1993; Shibuya, 2001; Zipfel *et al.*, 2006). Die Chitinperzeption ist also eine evolutionär alte und konservierte Form der Verteidigung gegen pilzliche Pathogene in Pflanzen (Hamel und Beaudoin, 2010; Zhang *et al.*, 2007).

In verschiedenen Pflanzen, wie Tomate, Reis, Gerste, Weizen und Sojabohne, konnten hochaffine, mit der Cytoplasmamembran assoziierte Bindestellen für Chitooligosaccharide gefunden werden (Baureithel *et al.*, 1994; Day *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2002; Shibuya *et al.*, 1993). Der erste Chitin-PRR wurde in Reis identifiziert. Das plasmamembranständige Glycoprotein CEBiP (Chitin elicitor binding protein) mit zwei extrazellulären Lysin-Motiven zeigte eine hochaffine Chitinbindung. *CEBiP-knock-down* Pflanzen waren gegenüber Chitin fast insensitiv und wiesen eine deutlich verringerte Produktion von ROS sowie eine drastisch verringerte Transkriptomresponsivität nach Chitinbehandlung auf (Kaku *et al.*, 2006). CEBiP besitzt nur eine kurze intrazelluläre Domäne und kann alleine kein Signal in das Zellinnere transduzieren. In *A. thaliana* wurde schließlich CERK1 und später die homologe RLK OsCERK1 in Reis identifiziert (Miya *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2008). Beide RLKs besitzen eine extrazelluläre LysM-Domäne, welche im Fall von CERK1 aus drei und in OsCERK1 aus einem gut annotierten und zwei möglicherweise degenerierten Lysin-Motiven besteht. Das Fehlen dieser RLKs führte zu drastisch reduzierten Antworten auf die Behandlung mit Chitin. Es wurde deutlich, dass CERK1 und OsCERK1 unverzichtbare Schnittstellen der Chitinperzeption sind. In Reis konnte außerdem gezeigt werden, dass CEBiP und OsCERK1 durch Chitin induzierbar physisch miteinander interagieren und so einen Rezeptorkomplex bilden. CEBiP agiert hier also als Chitinbindeprotein, welches Chitinfragmente rekrutiert und dann im Zusammenspiel mit OsCERK1 ein Perzeptionssignal generiert (Shimizu *et al.*, 2010). Im Unterschied zu Reis besitzt CERK1 in *A. thaliana* selbst die Fähigkeit, spezifisch Chitin zu binden und vereinigt die Eigenschaften eines Bindepoteins und eines Transduktionsrelais in sich selbst (Iizasa *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Es ist aber noch nicht klar, ob nicht auch in *A. thaliana* weitere chitinbindende Proteine für die Chitinperzeption benötigt werden. Die Erkennung von Chitin erfolgt unabhängig von der LRR-RLK BAK1, dem essentiellen Corezeptor der Flagellin oder EF-Tu Perzeption (siehe auch 1.2) (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009; Shan *et al.*, 2008).

### 1.7.2 Die Perzeption von Nodulationsfaktoren

Leguminosen sichern durch Symbiosen mit Rhizobakterien ihre Versorgung mit Stickstoff (Oldroyd *et al.*, 2009; Parniske, 2008). Die Symbiose wird durch die Sekretion rhizobieller Nodulationsfaktoren (Nod-Faktoren), welche durch die Pflanze erkannt werden, vermittelt. Nod-Faktoren besitzen ein Rückgrat aus vier bis fünf  $\beta(1-4)$  verknüpften GlcNAc Einheiten. Diese Chitooligosaccharide sind am terminalen, nicht reduzierenden GlcNAc N-acyliert und besitzen zusätzliche Modifikationen, wie Acetylierungen, Sulfatierungen, Methylierungen, Arabinoylierungen usw. der reduzierenden oder nicht-reduzierenden endständigen GlcNAc-Einheit (Dénarié *et al.*, 1996; Perret *et al.*, 2000). Diese Modifikationen sind entscheidend für die Spezifität der symbiotischen Interaktion (Cullimore *et al.*, 2001).

In *Medicago truncatula* und *Lotus japonicus* wurden in einem genetischen Ansatz Nod-Faktor insensitive Mutanten isoliert. Es handelte sich um Mutationen in Genen, welche für LysM-RLKs codieren (Amor *et al.*, 2003; And, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Madsen *et al.*, 2003, Radutoiu *et al.*, 2003). In beiden Modelleguminosen wurden je zwei LysM-RLKs gefunden, die jeweils beide für die erfolgreiche Nodulation benötigt wurden. Die *M. truncatula* RLKs NFP und LYK3 entsprechen dabei den *L. japonicus* RLKs NFR5 und NFR1. Die genauere Betrachtung der Mutanten führte aber zu unterschiedlichen Modellen der Nod-Faktorperzeption. Die *L. japonicus* RLKs erfüllen demnach entweder ihre Aufgabe in einem einzelnen funktionalen Komplex oder aber sie induzieren unterschiedliche Signalwege, die bereits kurz nach der Perzeption konvergieren (And, 2003). In *M. truncatula* werden auch beide RLKs für eine erfolgreiche Nodulation benötigt, aber sie besitzen unterschiedliche Hierarchien in diesem Prozess. NFP ist für die Induktion früher Antworten, wie Membrandepolarisierung und  $\text{Ca}^{2+}$  Influx, aber auch die Adaption des Transkriptoms und die Ausbildung von Nodulationsprimordien notwendig. LYK3 coreguliert die Transkriptomänderung und ist essentiell für die Krümmung der Wurzelhaare und die erfolgreiche Infektion durch die Rhizobien. NFP fungiert also als Signalrezeptor, während LYK3 einen Eintrittsrezeptor darstellt. Die Aktivität beider RLKs ist dabei von der Struktur der eingesetzten Nod-Faktoren abhängig, wobei LYK3 stringenter Anforderungen an diese stellt und so die Spezifität des Infektionsprozesses steuert (Amor *et al.*, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Smit *et al.*, 2007).

Auch in *Pisum sativum* und *Glycine max* konnten LysM-RLKs als Nod-Faktorrezeptoren identifiziert werden (Indrasumunar und Gresshoff, 2010; Zhukov *et al.*, 2008). Alle diese RLKs ähneln in ihrer Topographie einander und besonders der LysM-RLK CERK1 aus *A. thaliana* und es wird angenommen, dass diese RLKs von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen. Durch Duplikation und Diversifikation erwarben dann einige LysM-RLKs der Leguminosen die Fähigkeit der Nod-

## Einleitung

Faktorperzeption und ermöglichten so die symbiotische Interaktion mit Rhizobien (Zhang *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2006).

Die Fähigkeit Symbiosen mit Rhizobakterien einzugehen ist auf Leguminosen beschränkt. Die einzige Ausnahme bildet *Parasponia*, in der sich unabhängig von den Leguminosen eine auf Nodulation basierende Symbiose mit Rhizobakterien entwickelt hat (Becking, 1979; Trinick, 1973). Auch in diesem System wurde als Nod-Faktorrezeptor eine LysM-RLK identifiziert, die große Ähnlichkeit mit NFP aus *M. truncatula* und NFR5 aus *L. japonicus* besitzt (Op den Camp *et al.*, 2010).

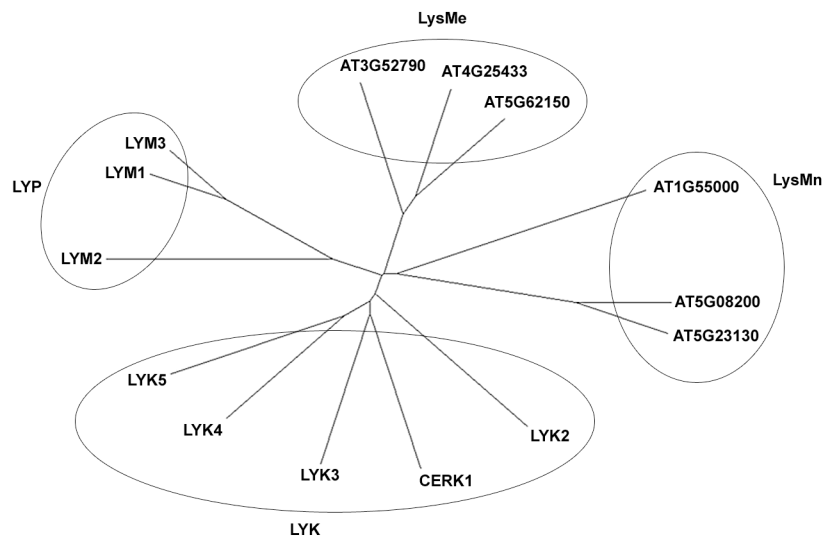
Eine direkte, physische Interaktion der Nod-Faktoren und ihrer Rezeptoren konnte bisher nicht gezeigt werden. *In silico* Modellierung-Ansätze zeigten, dass eine direkte Wechselwirkung der LysM-Domäne von NFP mit Nod-Faktoren denkbar ist und deuten gemeinsam mit den genetischen Daten auf eine solche Interaktion hin (Mulder *et al.*, 2006; Radutoiu *et al.*, 2007).

Die Signaltransduktion der Initiation von Symbiosen zwischen *M. truncatula* und arbuskulären Mykorrhiza überschneidet sich an vielen Punkten (And, 2003; Arrighi *et al.*, 2006; Radutoiu *et al.*, 2007). Die diffusiblen, niedermolekularen „Myc-Faktoren“, welche für die Einleitung der Symbiose durch die Mykorrhiza sekretiert werden, konnten als Lipochitooligosaccharide, welche den Nod-Faktoren sehr ähnlich sind, identifiziert werden. Ergänzend konnte eine Beteiligung von NFP an der Perzeption dieser Faktoren gezeigt werden (Maillet *et al.*, 2011).

LysM-RLKs nehmen also eine prominente Rolle in der Erkennung von Mikroorganismen ein und vermitteln die Abwehr von pilzlichen Pathogenen sowie die Symbiose mit Rhizobien und Mykorrhiza.

### 1.7.3 LysM-Proteine in *Arabidopsis thaliana*

In *A. thaliana* wurden 14 Proteine mit LysM-Domänen identifiziert. Mit Hilfe von *multiple sequence alignment* Untersuchungen lassen sich diese Proteine in die vier bereits beschriebenen Gruppen, die auch strukturelle Eigenschaften der Proteine widerspiegeln, einordnen (Abbildung 1.5, siehe auch 1.7).



**Abbildung 1.5. ClustalW2 Analyse der *A. thaliana* Proteine mit Lysin-Motiven.**

Die Sequenzen der *A. thaliana* Proteine mit Lysin-Motiven wurden mit Hilfe von ClustalW2 verglichen. Es können vier Gruppen gebildet werden: LYKs – RLK mit extrazellulärer LysM-Domäne, LYPs – GPI-verankerte Proteine mit zwei Lysin-Motiven, LysMe – sekretierte Proteine mit einem Lysin-Motiv, LysMn – intrazelluläre Proteine mit einem Lysin-Motiv (siehe auch 1.7).

Die Gruppe der LYKs umfasst fünf RLKs. CERK1 wurde bereits als Chitinrezeptor beschrieben (siehe 1.7.1), die Rollen der anderen LYKs sind unklar. In *A. thaliana* werden je drei membranständige LYPs, drei sekretierte LysMes und drei intrazelluläre LysMns annotiert. At1g55000 besitzt zusätzlich zum Lysin-Motiv noch eine F-Box Domäne.

## 1.8 Ziele der Arbeit

Mikroben-assoziierte molekulare Muster (MAMPs) lösen in Pflanzen Immunreaktionen aus. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist Peptidoglycan (PGN), ein essentieller Bestandteil bakterieller Zellwände. Peptidoglycan aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien induziert typische Immunreaktionen in *Arabidopsis thaliana*. Das Glycanrückgrat des PGN ist für seine immunogenen Eigenschaften bedeutend. Lysin-Motive (LysM) sind bereits als PGN-bindend beschrieben und finden sich in pflanzlichen Chitin- und Nodulationsfaktorrezeptoren wieder.

Um einen PGN-Rezeptor oder PGN-Bindeproteine zu identifizieren, wurden deswegen in dieser Arbeit Proteine mit Lysin-Motiven (LysM) untersucht. Es sollte geprüft werden, ob LysM-Proteine in *A. thaliana* einen Beitrag zur PGN-Perzeption und zur Immunität gegen pathogene Bakterien leisten und die Fähigkeit besitzen, PGN spezifisch zu binden. Zudem sollten Grundlagen zur Aufklärung der Zusammensetzung eines putativen PGN-Rezeptorkomplexes gelegt werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Die Bezugsquellen der in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

**Tabelle 2.1. Hersteller bzw. Lieferanten der verwendeten Chemikalien.**

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
<b>Lösemittel</b>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Taufkirchen), <i>Carl Roth</i> (Karlsruhe), <i>Merck</i> (Darmstadt), <i>Fluka</i> (Buchs, Schweiz), <i>Brenntag Chemiepartner GmbH</i> (Plochingen)
<b>Standardlaborchemikalien</b>	<i>Carl Roth</i> (Karlsruhe), <i>AppliChem</i> (Darmstadt), <i>Sigma-Aldrich</i> (Taufkirchen)
<b>Nukleinsäure modifizierende Enzyme</b>	<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot), <i>New England Biolabs</i> (Beverly, USA), <i>Invitrogen</i> (Carlsbad, USA)
<b>Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)</b>	<i>Fermentas</i> (St. Leon-Rot)
<b>Oligonukleotide</b>	<i>Eurofins MWG Operon</i> (Ebersberg)
<b>Synthetische Komplettmedien (Synthetic Complete, SC)</b>	<i>Formedium</i> (Norwich, UK)
<b>Antibiotika</b>	<i>Carl Roth</i> (Karlsruhe), <i>Duchefa</i> (Haarlem, Niederlande)
<b>Peptidoglycane und bakterielle Zellwandpräparationen</b>	<i>Invivogen</i> (Toulouse, Frankreich), <i>Sigma-Aldrich</i> (Taufkirchen)
<b>Chitin</b>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Taufkirchen)
<b>Chitohexamer</b>	<i>Seikagaku Corporation</i> (Tokyo, Japan)
<b>Antikörper</b>	<i>Sigma-Aldrich</i> (Taufkirchen), <i>New England Biolabs</i> (Beverly, USA), <i>Molecular Probes</i> ( <i>Invitrogen</i> ), <i>Acris Antibodies GmbH</i> (Herford)
<b>Nitrocellulose-Membranen</b>	<i>Amersham</i> ( <i>GE-Healthcare</i> , München)
<b>Protease-/Phosphataseinhibitoren</b>	<i>Roche</i> (Grenzach)

## 2.2 Medien und Antibiotika

Es wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Medien verwendet.

**Tabelle 2.2. Medien.**

Medium	Inhalt
<b>Lysogeny broth, Typ Lennox (LB)</b>	10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Bacto-Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, ggf. 15 g/l Bacto-Agar
<b>Kings Medium B (Kings B)</b>	20 g/l Glycerin, 40 g/l Proteose-Pepton 3, nach dem Autoklavieren 10 ml 10 % (w/v) $K_2HPO_4$ und 10 ml 10 % (w/v) $MgSO_4$ (beides sterilfiltriert) hinzufügen
<b>½ Murashige-Skoog Medium (MS)</b>	2,2 g/l MS-Salze, pH 5,7 (KOH), ggf. 8 g/l Select-Agar
<b>Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD)</b>	20 g/l Bacto-Proteose Pepton, 20 g/l Glucose, 10 g/l Bacto-Hefeextrakt, pH 6 – 6,3, ggf. 20 g/l Bacto-Agar
<b>Complete Supplement Mixture Drop out <math>Leu^-</math>, <math>Trp^-</math> (CSM-LW)<sup>1</sup></b>	1,55 g/l $Leu^-$ , $Trp^-$ (Formedium, DSCK172), 6,9 g/l Yeast-Nitrogen-Base (Formedium, CYN0501), 20 g/l Glucose, pH 6 – 6,3, ggf. 20 g/l Bacto-Agar
<b>Complete Supplement Mixture Drop out <math>Leu^-</math>, <math>Trp^-</math>, Adenin<sup>-</sup> (CSM-AdeLW)<sup>1</sup></b>	1,47 g/l SC Ade <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , $Leu^-$ , $Trp^-$ (Formedium, DSCK272), 76 mg/l Histidin, 6,9 g/l Yeast-Nitrogen-Base (Formedium, CYN0501), 20 g/l Glucose, pH 6 – 6,3, ggf. 20 g/l Bacto-Agar
<b>Complete Supplement Mixture Drop out <math>Leu^-</math>, <math>Trp^-</math>, His<sup>-</sup>, Adenin<sup>-</sup> (CSM-AdeHLW)<sup>1</sup></b>	1,47 g/l SC Ade <sup>-</sup> , His <sup>-</sup> , $Leu^-$ , $Trp^-$ (Formedium, DSCK272), 6,9 g/l Yeast-Nitrogen-Base (Formedium, CYN0501), 20 g/l Glucose, pH 6 – 6,3, ggf. 20 g/l Bacto-Agar

<sup>1</sup>(Kaiser, 1994)

Die Medien wurden gegebenenfalls mit den Antibiotika aus Tabelle 2.3 ergänzt.

**Tabelle 2.3. Antibiotika.**

Antibiotikum	Endkonzentration [ $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ]	Lösemittel
<b>Ampicillin</b>	50	Wasser
<b>Cycloheximid</b>	50	Wasser
<b>Kanamycin</b>	50	Wasser
<b>Rifampicin</b>	50	Methanol
<b>Spectinomycin</b>	50	Wasser
<b>Tetracyclin</b>	25	Ethanol



## 2.3 Bakterien- und Pilzstämmen

Es wurden die in Tabelle 2.4 gezeigten Bakterien- und die in Tabelle 2.5 gezeigten Pilzstämmen verwendet.

**Tabelle 2.4**      **Verwendete Bakterienstämmen.**

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F-( $\phi$ 80dlacZ $\delta$ M15), $\delta$ /lacZYA-argF)U169, endA1,recA1, hsdR17(r K- m+), deoR, thi-1, phoA, supE44, glnV44I-gyrA96, relA1, F-
	BL21AI <sup>1</sup>	F-ompT hsdSb(rb-mb-) gal dcm araB:T7RNAPtetA
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3103::pMMP90	T-DNA <sup>-</sup> , vir <sup>+</sup> Rif <sup>r</sup> , pMMP90 gen <sup>r</sup>
<i>Pseudomonas syringae</i>	pv. <i>tomato</i> DC3000	Rif <sup>r</sup>
	pv. <i>tomato</i> DC3000 hrcC <sup>-</sup>	Rif <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , hrcC <sup>-</sup>
	pv. <i>tomato</i> DC3000 $\Delta$ avrPto/avrPtoB	Rif <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , avrPto <sup>-</sup> , avrPtoB <sup>-</sup>

<sup>1</sup>Invitrogen

**Tabelle 2.5.**      **Verwendete Pilzstämmen.**

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	AH109 <sup>1</sup>	MATa, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1 <sub>UAS</sub> <sup>-</sup> GAL1 <sub>TATA</sub> -HIS3MEL1 GAL2 <sub>UAS</sub> <sup>-</sup> GAL2 <sub>TATA</sub> -ADE2, URA3::MEL1 <sub>UAS</sub> -MEL1 <sub>TATA</sub> -lacZ, MEL1
<i>Alternaria brassicicola</i>	MUCL 2029	

<sup>1</sup>Clontech

## 2.4 Vektoren

Die verwendeten Vektoren sind in Tabelle 2.6 aufgeführt.

**Tabelle 2.6. Vektoren.**

Vektor	Eigenschaften	Verwendung
<b>pCR8/GW/TOPO<sup>1</sup></b>	rrnB T2, rrnB T1, TOPO recognition site 1, TOPO recognition site 2, attL1, attL2, T7 promoter, Spn <sup>r</sup> , pUC origin	T/A-Klonierung von PCR-Produkten
<b>pDEST15<sup>1</sup></b>	pT7, ribosome binding site (RBS), initiation ATG, GST tag, attR1, attR2, Cm <sup>R</sup> , <i>ccdB</i> , tT7, <i>bla</i> , pBR322 origin, ROP ORF	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für N-terminale GST-Fusion
<b>pDEST17<sup>1</sup></b>	pT7, ribosome binding site (RBS), initiation ATG, 6x His tag, attR1, attR2, Cm <sup>R</sup> , <i>ccdB</i> , tT7, <i>bla</i> , pBR322 origin, ROP ORF	<i>E. coli</i> Expressionsvektor für N-terminale His <sub>6</sub> -Fusion
<b>pGADT7<sup>2</sup></b>	pADH1, pT7, tT7&ADH1, pUC origin, 2μ origin, f1 origin, <i>TRP1</i> , Kan <sup>R</sup> , GAL4- BD, c-Myc, MCS	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor für GAL4-AD-Fusion
<b>pGBKT7<sup>2</sup></b>	pADH1, pT7, tT7&ADH1, pUC origin, 2μ origin, f1 origin, <i>LEU2</i> , <i>bla</i> , SV40-NLS, GAL4-AD, HA, MCS	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor für GAL4-BD-Fusion
<b>pGADT7-GW<sup>3</sup></b>	pADH1, pT7, tT7&ADH1, pUC origin, 2μ origin, f1 origin, <i>TRP1</i> , Kan <sup>R</sup> , GAL4-DNA-BD, c-Myc, MCS, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Cm <sup>r</sup>	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor für GAL4-AD-Fusion
<b>pGBKT7-GW<sup>3</sup></b>	pADH1, pT7, tT7&ADH1, pUC origin, 2μ origin, f1 origin, <i>LEU2</i> , <i>bla</i> , SV40-NLS, GAL4-AD, HA, MCS, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Cm <sup>r</sup>	<i>S. cerevisiae</i> Expressionsvektor für GAL4-BD-Fusion
<b>pK7WGF2.0<sup>4</sup></b>	p35S, t35S, eGFP, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Sm/Sp	binärer Expressionsvektor für N-terminale GFP-Fusion in Pflanzen
<b>pK7FWG2.0<sup>4</sup></b>	p35S, t35S, eGFP, attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Sm/Sp	binärer Expressionsvektor für C-terminale GFP-Fusion in Pflanzen
<b>pBGW<sup>4</sup></b>	attR1, attR2, <i>ccdB</i> , Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , Sm/Sp	binärer Expressionsvektor für Pflanzen

<sup>1</sup> Invitrogen

<sup>2</sup> Clontech

<sup>3</sup> Clontech, modifiziert durch Sandra Postel

<sup>4</sup> (Karimi *et al.*, 2002), VIB Ghent

## 2.5 Pflanzen

### 2.5.1 *Arabidopsis thaliana* Linien

Die in dieser Arbeit verwendeten *A. thaliana* Linien sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7. Verwendete *A. thaliana* Pflanzen.**

Bezeichnung	Linie	Gen	Merkmale
<i>lym3-1</i>	SALK_111212 <sup>1</sup>	<i>At1g77630 (LYM3)</i>	T-DNA (SALK) Insertion im 1. Intron kein vollständiges <i>LYM3</i> Transkript
<i>lym3-2</i>	SALK_132566 <sup>1</sup>	<i>At1g77630 (LYM3)</i>	T-DNA (SALK) Insertion im 1. Exon, kein vollständiges <i>LYM3</i> Transkript
<i>lym3-1/p35S:GFP- LYM3</i> <sup>2</sup>	SALK_111212	<i>At1g77630 (LYM3)</i>	<i>lym3-1</i> , mit <i>p35S:GFP-LYM3</i> Kassette (3.4.5.1) transformiert
<i>lym3-1/pLYM3::LYM3</i> <sup>2</sup>	SALK_111212	<i>At1g77630 (LYM3)</i>	<i>lym3-1</i> , mit <i>pLYM3:LYM3</i> Kassette (3.4.5.1) transformiert
<i>cerk1-2</i>	GABI_096F09 <sup>3</sup>	<i>At3g2160 (CERK1)</i>	T-DNA (GABI-Kat) Insertion im 10. Intron, kein vollständiges <i>CERK1</i> Transkript
<i>cerk1-3</i>	FLAG_GX112 <sup>4</sup>	<i>At3g2160 (CERK1)</i>	T-DNA (FLAG INRA) Insertion im 10. Intron, kein vollständiges <i>CERK1</i> Transkript
<i>lym1-1</i>	GABI_419G07 <sup>5</sup>	<i>At1g21880 (LYM1)</i>	T-DNA (GABI-Kat) Insertion im 2. Exon, kein vollständiges <i>LYM1</i> Transkript
<i>lym1-2</i>	sk17791 <sup>6</sup>	<i>At1g21880 (LYM1)</i>	T-DNA (Saskatoon SK) Insertion im 5. Exon, kein vollständiges <i>LYM1</i> Transkript

<sup>1</sup> SALK, Nottingham Arabidopsis Stock Center (NAS), siehe auch Charakterisierungen in 4.4

<sup>2</sup> siehe auch 3.4.5.1 und 4.5

<sup>3</sup> zur Verfügung gestellt von Volker Lipka (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009; Miya *et al.*, 2007)

<sup>4</sup> zur Verfügung gestellt von Volker Lipka (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009)

<sup>5</sup> GABI-Kat durch Nottingham Arabidopsis Stock Center (NAS), siehe auch Charakterisierungen in 4.4

<sup>6</sup> Saskatoon T-DNA Collection (SK), siehe auch Charakterisierungen in 4.4

### **3 Methoden**

#### **3.1 Pflanzenanzucht**

##### **3.1.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

*Arabidopsis* Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen (8h Licht / 16h Dunkelheit) bei ca. 21°C und einer Lichtmenge von 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$  angezogen. Die Aussaat erfolgte entweder auf dampfsterilisierter GS90 Erde (*Gebr. Patzer*), die mit Vermikulit gemischt wurde, oder unter sterilen Bedingungen auf ½ MS-Agar Platten. In allen Fällen wurden die Samen zur Stratifikation für 2 Tage bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach den entsprechenden Lichtbedingungen ausgesetzt.

Für die Anzucht auf ½ MS-Platten wurden oberflächensterilisierte *A. thaliana* Samen verwendet. Die Sterilisation erfolgte über Nacht mit Chlorgas (aus 50 ml NaClO und 1,5 ml 37 % HCl). Samen wurden zur Keimung auf Petrischalen überführt, welche ½ MS-Medium mit 0,8 % (w/v) Agarose enthielten und wurden unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 22°C und 40 – 60 % Luftfeuchtigkeit) angezogen.

##### **3.1.2 Anzucht von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen**

*N. benthamiana*-Pflanzen wurden im Gewächshaus mit 13 h Licht und 11 h Dunkelheit bei ca. 23°C (Lichtmenge: 40 kLux) angezogen. Die Aussaat erfolgte in Mischerde (Einheitserde P, Einheitserde T und Sand, 2:2:1 und 0,1 % Konfidor).

#### **3.2 Anzucht der Mikroorganismen**

##### **3.2.1 Bakterienanzucht**

*E. coli* wurde auf LB-Agar bei 37°C oder in flüssigem LB-Medium bei 37°C und 180 upm über Nacht inkubiert, wenn nicht anders angegeben. Den Medien wurden Antibiotika (2.2) entsprechend der auf den Plasmiden kodierten Resistenzen (2.4) zugefügt.

*A. tumefaciens* wurde auf LB-Agar bei 28°C oder in LB-Medium bei 28°C und 180 upm etwa 48 h inkubiert. Die Selektion auf die genomische Resistenz des verwendeten Stammes erfolgte mit Rifampicin, außerdem wurden den Medien Antibiotika entsprechend der auf den Plasmiden codierten Resistenzen zugefügt.

*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) wurde auf Kings B-Agar, LB-Agar oder flüssigem LB-Medium bei 28°C und 180 upm 1 bis 2 Tage inkubiert. Es wurden Antibiotika entsprechend des verwendeten *Pto* Stammes (0) eingesetzt.

Für die PGN-Aufreinigung wurde *Pto* DC3000 über Nacht bei 28°C in 1 l King's B Medium bis zu einer optischen Dichte von 3,0 bei 600 nm angezogen. Diese Kultur wurde komplett zu 9 l King's B Medium in einem Blattrührfermenter Typ Biostat E (*B. Braun Biotech International GmbH*, Melsungen) überführt. Die Fermentation wurde bei 180 upm, 28°C und einer Begasungsrate von 0,4 vvm (Volumen Luft/Volumen Fermenter) für 16 h durchgeführt.

### **3.2.2 Anzucht und Sporenernte von *Alternaria brassicicola***

Die Anzucht und Sporenernte von *A. brassicicola* erfolgte wie anderswo beschrieben (Kemmerling *et al.*, 2007; Thomma *et al.*, 1999).

### **3.2.3 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae***

Nicht transformierte *S. cerevisiae* wurde auf YPD-Agar bei 30°C oder in YPD-Medium bei 30°C und 180 upm über Nacht angezogen. Nach der Transformation wurde zur Selektion mit den entsprechenden SC-Medien (*Formedium*) bei 30 °C kultiviert (Gietz und Woods, 2002; Kaiser, 1994).

## **3.3 Aufreinigung von Peptidoglycan (PGN)**

### **3.3.1 PGN-Aufreinigung aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000**

*Pto* DC3000 wurde wie 3.2.1 in beschrieben angezogen. Das der PGN Aufreinigung aus *Pto* DC3000 zu Grunde liegende Protokoll ist anderswo beschrieben (Glauner, 1988). Es wurden zusätzliche Verdaus mit DNaseI (10 µg/ml) und RNaseA (50 µg/ml, in 10 mM Tris/HCl, pH 7) für 2 h durchgeführt. Anschließend wurde mit Trypsin (100 µg/ml in 10 mM Tris/HCl pH 7) über Nacht und mit Proteinase K (50 µg/ml, in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 % (w/v) SDS) für 1 h verdaut. Daraufhin wurde das PGN in 8 M LiCl aufgenommen und 1 h inkubiert und anschließend für 2 h in 100 % (v/v) Aceton behandelt. Zwischen den Aufreinigungsschritten wurde das PGN gründlich mit Wasser gewaschen. Die Reinheit des isolierten PGN wurde entsprechend mittels Silberfärbung (3.4.6.4) nach SDS-PAGE (3.4.6.2) überprüft (Ghuysen, Tipper, und Strominger, 1966). Dazu wurden 100 µg PGN aufgetragen.

### **3.3.2 PGN-Aufreinigung aus *Staphylococcus aureus***

PGN aus *S. aureus* wurde wie beschrieben isoliert (Bera *et al.*, 2005; de Jonge *et al.*, 1992).

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 Transformation von Pflanzen**

#### **3.4.1.1 *Agrobacterium* vermittelte transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana***

Eine Übernachtskultur (3.2.1) transformierter Agrobakterien (3.4.2.2) wurde geerntet und die Zellen in 10 mM MgCl<sub>2</sub> bis zu einer optischen Dichte von 1,0 bei 600 nm resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde mit dem gleichen Volumen einer Suspension von Agrobakterien, welche mit dem p19-Konstrukt (Voinnet, Rivas, Mestre, und Baulcombe, 2003) transformiert waren, vereinigt. Nach Zugabe von Acetosyringon (4'-Hydroxy-3,5-dimethoxyacetophenon, 150 µM) wurde 4 h bei RT inkubiert. Die Suspensionen wurden in Blätter 6 Wochen alter *N. benthamiana* Pflanzen infiltriert. Die Pflanzen wurden 3 bis 5 Tage bei RT belassen und der Erfolg der Transformation wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (3.5.7.2) oder Immunoblot (3.4.6.5) kontrolliert.

#### **3.4.1.2 *Agrobacterium* vermittelte stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

Die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte wie beschrieben (Bechtold und Pelletier, 1998; S. J. Clough und Bent, 1998). *A. tumefaciens* Zellen einer Übernachtskultur (3.2.1) wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,8 bei 600 nm in 5 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (v/v) Silvet resuspendiert. Blütenstände der zu transformierenden *A. thaliana* Pflanzen wurden 1 min in die Suspension getaucht und anschließend für 24 h unter einer Glasglocke inkubiert. Danach reiften die Pflanzen im Gewächshaus ab. Mittels Antibiotikaselektion und Genotypisierung (3.4.4.8) wurden Transformanten unter den Pflanzen der T1-Generation identifiziert. Positive Transformanten wurden auf Transkriptebeine durch RT-PCR (3.4.4.5) und im Falle von GFP-Fusionskonstrukten auch auf Proteinebene durch Immunoblot (3.4.6.5) analysiert.

### 3.4.2 Transformation von Mikroorganismen

#### 3.4.2.1 Transformation von *Escherichia coli*

Chemisch kompetente *E. coli* DH5 $\alpha$  oder BL21AI-Zellen wurden wie bereits beschrieben (Inoue, Nojima und Okayama, 1990) hergestellt. Für die Transformation wurden 20  $\mu$ l des Ligationsansatzes (3.4.4.2) oder 1  $\mu$ l gereinigtes Plasmid (3.4.3.2) zu 200  $\mu$ l kompetenten Zellen gegeben. Der Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 90 Sekunden auf 42°C erwärmt. Daraufhin wurden 600  $\mu$ l LB-Medium hinzugefügt und die Zellen bei 37°C und 180 upm 1 h lang inkubiert und auf LB-Agar mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 3.4.2.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

50  $\mu$ l elektrokompente Agrobakterien wurden mit 1  $\mu$ g Plasmid-DNA versetzt, 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit einem Elektroporator 2510 (*Eppendorf*) bei 1500 V elektroporiert. Es wurden je 600  $\mu$ l LB-Medium zugefügt und etwa 2 h bei 28°C und 180 upm inkubiert. Die transformierten Agrobakterien wurden zu je 200  $\mu$ l und 50  $\mu$ l auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 28°C inkubiert.

#### 3.4.2.3 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde nach der Methode von Gietz (Gietz und Woods, 2002) transformiert. 50 ml YPD wurden mit  $2.5 \cdot 10^8$  Zellen ( $10^6$  Zellen/ml ergeben eine optische Dichte von 0,1 bei 600 nm) einer Übernachtskultur (3.2.3) inokuliert und bei 30 °C und 230 upm bis zu einer Dichte von mindestens  $2 \cdot 10^7$  Zellen/ml angezogen. Die Zellen wurden mit sterilem Wasser gewaschen. Pro Transformation wurden  $10^8$  Zellen verwendet. Hierzu wurden die Zellen in 360  $\mu$ l Transformationsmix (siehe Tabelle 3.1) resuspendiert und 40 min bei 42°C inkubiert, anschließend wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen.

**Tabelle 3.1. Ansatz für eine *S. cerevisiae* Transformation.**

Substanz	Volumen [ $\mu$ l]
PEG 3350 50 % (w(v))	240
1M LiAc	36
2 mg/ml ssDNA (5 min gekocht)	50
4 $\mu$ g Plasmid DNA in Wasser	34

Die Zellen wurden in 500  $\mu$ l sterilem Wasser resuspendiert, auf Agar des entsprechenden Selektionsmediums ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert. Hierzu wurden die Zellen in 360  $\mu$ l Transformationsmix (siehe Tabelle 3.1) resuspendiert und 40 min bei 42°C inkubiert, anschließend

wurden die Zellen pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert, auf Agar des entsprechenden Selektionsmediums ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert.

### **3.4.3 Präparation und Analyse von DNA und RNA**

#### **3.4.3.1 Isolation genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

Genomische DNA wurde wie anderswo beschrieben isoliert (Edwards *et al.*, 1991). Ein *A. thaliana* Blatt wurde in 200 µl Edwards-Puffer (0,2 M Tris/HCl; pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; 0,5 % (w/v) SDS) homogenisiert und das Homogenat anschließend bei 13 000 upm 5 min zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde, wie in 3.4.3.7 beschrieben, gefällt und in 50 µl TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

#### **3.4.3.2 Plasmid isolation aus *Escherichia coli***

Plasmid DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits (*Qiagen*) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### **3.4.3.3 RNA Präparation aus *Arabidopsis thaliana***

##### **Präparation aus Blattmaterial**

RNA wurde aus 50–100 mg *A. thaliana* Blattmaterial isoliert, welches in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, mit einem vorgekühlten Pistill gemörsert und anschließend mit 1 ml Trizol (0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat pH 5,0; 5 % Glycerin; 38 % (v/v) Aqua-Phenol) versetzt wurde. Der Ansatz wurde gemischt und nach 10 min Inkubation bei RT 200 µl Chloroform hinzugegeben. Nach gründlichem Mischen und anschließender Phasentrennung wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäure wurde nun mittels Isopropanolfällung (3.4.3.7) gewonnen. Die Reinheit und Konzentration wurde entsprechend 3.4.3.4 geprüft.

##### **Präparation aus Keimlingen**

RNA wurde auch aus *A. thaliana* Keimlingen isoliert. Die Präparation erfolgte im Wesentlichen wie oben für Blattmaterial beschrieben. Es wurde RNA aus 4 Keimlingen im Alter von 8 Tagen isoliert. Zu



den zermörserten Keimlingen wurden allerdings nur 300 µl Trizol und später nur 60 µl Chloroform gegeben.

### 3.4.3.4 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmungen

Nukleinsäurekonzentrationen wurden mit einem Spektralphotometer (Ultraspec 2100 pro, *Amersham*) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm (dsDNA:  $E_{260} = 1 \triangleq 50 \mu\text{g/ml}$ ; RNA:  $E_{260} = 1 \triangleq 40 \mu\text{g/ml}$ ) ermittelt. Außerdem wurde ein NanoDrop 2000 Spektrophotometer (*Thermo Fisher*) verwendet, um DNA bzw. RNA Spektren von 220 nm bis 340 nm aufzunehmen. Diese wurden mit der NanoDrop Software ausgewertet.

### 3.4.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (5 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM Tris/HCl; pH 7,5 und 0,025 % (w/v) Orange G) versetzt. Die Auftrennung erfolgte in Agarosegelen. Die Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer (4 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA pH 8,0) wurde entsprechend der Anwendung gewählt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Feldstärke von 5 V/cm. Als Größenstandard wurde der Marker 1 kb Gene Ruler (*Fermentas*) verwendet. Zur Detektion wurde in die Gele Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml eingegossen. Die Visualisierung selbst erfolgte mittels UV-Transilluminator (Infinity-3026 WL/26 MX, *PeqLab*) und der Software InfinityCapt 14.2 (*PeqLab*).

### 3.4.3.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen oder aus Agarosegelen

DNA-Fragmente aus PCR-Reaktionen oder nach Restriktionsverdau wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*) nach den Angaben des Herstellers aus Agarosegelen aufgereinigt.

### 3.4.3.7 Fällung von Nukleinsäuren

Die Nukleinsäurelösung wurde mit 0,3 M NaAc (pH 5,2) und 1 Volumen 100 % Isopropanol (p.a.) oder 3 Volumen 100 % Ethanol (p.a.) versetzt. Zu RNA Präparationen aus 3.4.3.3 wurde kein NaAc zugegeben. Nach 10 min bei RT wurde bei 14000 upm und 4°C für 15 min zentrifugiert und das Nukleinsäurepellet mit 70 % (v/v) Ethanol (p.a.) gewaschen und an der Luft bei RT getrocknet und anschließend in Wasser oder TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

### 3.4.3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten oder von Plasmid-DNA wurde von *eurofins mwg operon* (Martinsried) und *GATC* (Konstanz) durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Anforderungen des Anbieters aufbereitet. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme EditSeq 5.00 und SeqMan 5.00 (*StarDNA*) sowie der Genome Workbench (*National Center for Biotechnology Information*) analysiert.

### 3.4.4 Enzymatische Manipulation von Nukleinsäuren

#### 3.4.4.1 Restriktionsendonukleaseverdau

Analytische oder präparative DNA Restriktionsendonukleaseverdaus wurden mit Endonukleaseenzymen von *Fermentas* nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 3.4.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase (*Fermentas*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 3.4.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Sofern nicht anders angegeben, wurden PCR-Reaktionen in einem Volumen von insgesamt 20 µl durchgeführt. Der Inhalt eines Ansatzes ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Tabelle 3.2. PCR-Standardansatz.

Substanz	Volumen [µl]
10X Taq-Puffer <sup>1</sup>	2,0
2,5 mM (insgesamt) dNTPs	2,0
10 µM 5'-Primer	1,0
10 µM 3'-Primer	1,0
2 U/µl Taq-Polymerase	0,5
Wasser	12,5
DNA	1,0

<sup>1</sup> 10X Taq-Puffer (160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris/HCl pH 8,8, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Tween 20)

Die Reaktion wurde mit einem DNA Engine PTC-200“-Thermocycler (*MJ Research, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf*) durchgeführt. Als Matrize für die Reaktion diente cDNA (3.4.4.5), Plasmid-DNA (3.4.3.2) oder genomische DNA aus *A. thaliana* (3.4.3.1). Die PCR wurde nach dem in Tabelle 3.3 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3.3. PCR-Standardprogramm.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1) Denaturierung	94	180
2) Denaturierung	94	30
3) Anlagerung der Primer	entsprechend der Primer	30
4) Elongation	72	60 / 1kb der Matrize
5) 30 mal zu 2		
6) finale Elongation	72	600

#### 3.4.4.4 DNase-Verdau

Die isolierte RNA wurde mittels DNase-Verdau von DNA gereinigt. Der Verdau wurde mit DNaseI (*Fermentas*) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 3.4.4.5 Reverse Transkription

Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte mit M-MuLV Reverser Transkriptase (*Fermentas*) nach den Angaben des Herstellers aus 1-2 µg isolierter, DNase behandelte RNA (3.4.3.3). Für semi-quantitative Analysen erfolgten im Anschluss PCR-Reaktionen mit 1 µl cDNA (3.4.4.3). Als Kontrolle wurde ein Fragment der cDNA des konstitutiv exprimierten Elongationsfaktors *EF1α* (*At1g07920/ At1g07920/ At1g07920*) amplifiziert.

#### 3.4.4.6 Transkriptanalyse durch quantitative *real time* PCR (qPCR)

qPCR Amplifikationen und Messungen wurden mit einem iQ5 Multicolour Real Time PCR Detektionssystem (*Bio-Rad*) durchgeführt. Die Amplifikation wurde mit Maxima® SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (*Fermentas*) detektiert. Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte mit der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Die Expressionsniveaus wurden mit Hilfe der  $C_t$  Werte des *EF-1α* Gens normalisiert. Das Vorhandensein eines einzelnen, spezifischen PCR-Produktes wurde durch Schmelzpunktanalyse und Agarosegelelektrophorese (3.4.3.5) überprüft. Die Quantifizierungen wurden aus drei biologischen, mit je zwei technischen Replikaten bestimmt. Die Standardabweichung wurde aus den biologischen Replikaten bestimmt.

### 3.4.4.7 Transkriptomanalyse durch Microarrayanalysen

RNA wurde aus je 2 Arabidopsis Blättern isoliert (3.4.3.3). Es wurden 3 unabhängige Experimente als Replikate angefertigt. Die Microarrayanalysen wurden von Kenichi Tsuda und Fumiaki Katagiri (University of Minnesota, Minneapolis, USA) durchgeführt. Es wurden *NimbleGen* DNA Microarrays (*A. thaliana* Genexpression, 12x135K Array TAIR 9.0, Roche) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Sondensignale wurden über alle Arrays normalisiert. Um die Expressionsniveaus zu errechnen, wurden die normalisierten Sondensignale dem *robust multi-array average* (RMA) Algorithmus (Irizarry *et al.*, 2003) unterzogen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der ImFit Funktion aus dem „Linear Models for Microarray Data“ (limma) Softwarepaket analysiert (Smyth, 2004). Die eBayes Funktion der limma Software wurde verwendet, um p-Werte und die qvalue Funktion um Storey q-Werte (Storey, 2003) zu errechnen.

### 3.4.4.8 Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionslinien

Um den Genotyp potentieller T-DNA Insertionslinien zu überprüfen, wurde je Generation die genomische DNA von 8 Pflanzen isoliert (3.4.3.1) und das Vorhandensein der T-DNA Insertion mittels PCR mit genspezifischen Primern, welche sich 5' und 3' außerhalb der T-DNA Insertion anlagern, sowie mit einem genspezifischen Primer, der sich je nach Insertionsrichtung der T-DNA 5' oder 3' außerhalb der Insertion anlagert, und dem T-DNA spezifischen *Left Border* (Lba) Primer überprüft.

## 3.4.5 Herstellung der verwendeten Konstrukte

### 3.4.5.1 Expressionskonstrukte für *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana benthamiana*

p35S::GFP-LYM3 und p35S::GFP-LYM3ΔGPI

Für das *p35S::GFP-LYM3* und das *p35S::GFP-LYM3ΔGPI* Konstrukt wurde der 35S Promoter mit Hilfe der Primer 35S-f und 35S-r und dem Vektor pK7WGF2.0 (Karimi *et al.*, 2002) als Matrize amplifiziert. Ein 72 bp Fragment mit der Sequenz, welche für das vorhergesagte Signalpeptid von *LYM3* codiert, wurde mit den Primern Lym3-SP-f und Lym3-SP-r von der codierenden *LYM3* Sequenz amplifiziert. Die Sequenz von EGFP wurde mit den Primern EGFP-f und EGFP-r vom Vektor pK7WGF2.0 amplifiziert. Außerdem wurde für das *p35S::GFP-LYM3 Konstrukt* mit den Primern Lym3core-f und Lym3-r ein 1200 bp Fragment von der codierenden Sequenz von *LYM3* amplifiziert. Für das *p35S::GFP-LYM3ΔGPI* Konstrukt wurde mit den Primern Lym3core-f und Lym3dGPI-r ein 1130 bp Fragment amplifiziert. Diese vier Fragmente wurden mittels Fusions-PCR mit den Primern 35S-f und

Lym3-r zusammengesetzt. Dies ergab ein 3017 bp bzw. 2947 bp Fragment mit der Insertion von *EGFP* zwischen der Sequenz des vorhergesagten Signalpeptids von LYM3 und des *LYM3*- bzw. *LYM3ΔGPI*-Moduls. Das *p35S::GFP-LYM3*- bzw. *p35S::GFP-LYM3ΔGPI*-Fragment wurde durch die *TOPO-TA-Clonase*-Reaktion (*Invitrogen*) entsprechend den Angaben des Herstellers in den Vektor pCR8 (*Invitrogen*) sub-kloniert. Mit der *LR Clonase* Reaktion (*Invitrogen*) wurde das Fragment in den binären Vektor pBGW (Karimi *et al.*, 2002) kloniert.

#### pLYM3::LYM3

Für das *pLYM3::LYM3* Konstrukt wurde ein 2520 bp Fragment mit den Primern Lym3comp-f und Lym3comp-r von genomischer *Arabidopsis* (Col-0) DNA als Matrize amplifiziert. Dieses Fragment wurde durch die *TOPO-TA-Clonase*-Reaktion (*Invitrogen*) entsprechend den Angaben des Herstellers in den Vektor pCR8 (*Invitrogen*) sub-kloniert. Mit der *LR Clonase* Reaktion (*Invitrogen*) wurde das Fragment in den binären Vektor pBGW kloniert.

### 3.4.5.2 Expressionskonstrukte für *Escherichia coli*

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine bzw. der GST-Fusionsproteine wurden mit den entsprechenden Primern (siehe Tabelle 3.4) Fragmente von den jeweiligen kodierenden Sequenzen amplifiziert, die dann anschließend durch die *TOPO-TA-Clonase*-Reaktion (*Invitrogen*) entsprechend den Angaben des Herstellers in den Vektor pCR8 (*Invitrogen*) sub-kloniert wurden. Zur Herstellung der His<sub>6</sub>-Fusionskonstrukte wurden die Fragmente dann mit der *LR Clonase* Reaktion (*Invitrogen*) in den *E. coli* BL21AI Expressionsvektor pDEST17 (*Invitrogen*) kloniert. Für die GST-Fusionskonstrukte diente pDEST15 (*Invitrogen*) als Zielvektor.

**Tabelle 3.4. Primer zur Herstellung der *E. coli* Expressionskonstrukte.**

Konstrukt	5' Primer	3' Primer
<i>His<sub>6</sub>-LYM1</i>	Lym1-dSP-f	Lym1-dGPI-r
<i>His<sub>6</sub>-LYM2</i>	Lym2-dSP-f	Lym2-dGPI-r
<i>His<sub>6</sub>-LYM3</i>	Lym3-dSP-f	Lym3-dGPI-r
<i>His<sub>6</sub>-CERK1</i>	CERK1EX-f	CERK1EX-r
<i>GST-CERK1</i>	CERK1EX-f	CERK1EX-r

Für *LYM3* wurde auch das *LYM3mut* Konstrukt mit Mutationen in beiden LysM-Domänen hergestellt. Als Grundlage diente das *LYM3* His<sub>6</sub>-Fusionskonstrukt in pCR8 (s.o.). Von diesem wurden Fragmente mit den Primerpaaren Lym3-dSP und I120A-A121G-r, I120A-A121G-f und N138A-r, Lym3-1f und Lym3-1r, I186A-A187G-f und N201A-r sowie Lym3-2f und Lym3dGPI-r amplifiziert. Diese 5 Fragmente wurden mittels Fusions-PCR mit den Primern LYM3-dSP-f und LYM3-dGPI-r zusammengesetzt. Es ergab sich ein 1130 bp Fragment, welches durch die *TOPO-TA-Clonase*-Reaktion (*Invitrogen*)

entsprechend den Angaben des Herstellers in den Vektor pCR8 (*Invitrogen*) sub-kloniert wurde. Zur Herstellung des His<sub>6</sub>-Fusionskonstrukte wurde dieses *LYM3mut* Fragment dann mit der *LR Clonase* Reaktion (*Invitrogen*) in den *E. coli* BL21AI Expressionsvektor pDEST17 (*Invitrogen*) kloniert.

### 3.4.5.3 Expressionskonstrukte für *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Klonierung der Expressionskonstrukte für Proteininteraktionsstudien mittels *Yeast Two-Hybrid* System wurden für *LYM1*, *LYM2*, *LYM3* und *CERK1* die jeweiligen pCR8 Konstrukte (3.4.5.2) verwendet. Von diesem Vektor wurden die Konstrukte mit der *LR Clonase* Reaktion (*Invitrogen*) in die *S. cerevisiae* Expressionsvektoren pGADT7-GW und pGBKT7-GW (*Clontech*, modifiziert durch S. Postel) kloniert.

Die Konstrukte für *LYK3*, *LYK4* und *LYK5* wurden durch Restriktionsendonukleaseverdau kloniert. Hierzu wurden zunächst Fragmente mit den in Tabelle 3.5 gezeigten Primern, mit deren Hilfe auch die Restriktionsschnittstellen eingefügt wurden, von der jeweiligen kodierenden Sequenz amplifiziert.

**Tabelle 3.5. Primer zur Herstellung der *S. cerevisiae* Expressionskonstrukte.**

Konstrukt	5' Primer	3' Primer
<i>LYK3</i>	Lyk3EX-NdeI-f	Lyk3EX-XmaI-r
<i>LYK4</i>	Lyk4EX-NdeI-f	Lyk4EX-XmaI-r
<i>LYK5</i>	Lyk5EX-NdeI-f	Lyk5EX-XmaI-r

Die Fragmente wurden dann sequenziell mit Restriktionsendonukleasen NdeI und XmaI (*Fermentas*) verdaut und dann in die *S. cerevisiae* Expressionsvektoren pGADT7 und pGBKT7 (*Clontech*) kloniert.

## 3.4.6 Präparation und Analyse von Proteinen

### 3.4.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde nach Bradford (Bradford, 1976) mit Nanoquant-Lösung (*Carl Roth*) nach Angaben des Herstellers bestimmt.

### 3.4.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) wurde die SDS-PAGE nach den Anweisungen von Sambrook (Sambrook, 1998) durchgeführt. Das Acrylamid-Bisacrylamid Gemisch (37,5: 1) wurde als Rotiphorese Gel 30-Lösung (*Carl Roth*) bezogen. In Gelapparaturen der Firma *Bio-Rad* (München) wurden 12 % Trenngele mit 5% Sammelgelen verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der

Proteine erfolgte für 10 min bei 120 V und für weitere 45 bis 60 min bei 200 V. Als Größenstandard wurde der Protein Molecular Weight Marker oder der Prestained Protein Ladder Marker (*Fermentas*) verwendet.

### 3.4.6.3 Coomassie-Brillant-Blaufärbung nach SDS-PAGE

Zur Detektion von Proteinen nach erfolgter SDS-PAGE (3.4.6.2) wurden die Gele mit Coomassie-Brillant-Lösung (0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) 30 min unter Schütteln angefärbt. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs wurde mehrmals mit 5 % (v/v) Essigsäure gewaschen.

### 3.4.6.4 Silberfärbung nach SDS-PAGE

Zur Detektion von Proteinen nach erfolgter SDS-PAGE (3.4.6.2) wurden die Gele einer Silberfärbung unterzogen. Das Gel wurde 1 h in Fixierlösung (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,02 % (v/v) Formaldehyd) bei horizontalem Schütteln (100 upm) und RT inkubiert. Danach wurde dreimal je 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 1 min in Sensibilisierungspuffer (0,2 mg/ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für je 20 s mit Wasser gewaschen und 1 h in Imprägnierpuffer (2 mg/ml  $\text{AgNO}_3$ , 0,03 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Danach wurde zweimal je 20 s mit Wasser gewaschen und etwa 10 min in Entwicklerlösung (60 mg/ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,02 % (v/v) Formaldehyd, 4 mg/ml  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) inkubiert. Anschließend wurde mit Wasser gewaschen und die Entwicklung für 10 min gestoppt (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure).

### 3.4.6.5 Immunoblot

Zur Detektion von Proteinen mit spezifischen Antikörpern wurden diese nach Auftrennung durch SDS-PAGE (3.4.6.2) mittels Elektro-Blot (Apparatur *Bio-Rad*) bei 250 mA für 1 h auf eine Hybond Nitrocellulosemembran (*Amersham*) transferiert. Der Transfer wurde durch Färben der Membran mit Ponceau S Rot-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S Rot, 5 % (v/v) Essigsäure) kontrolliert. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS (20 mM Tris-Cl pH 7,6; 150 mM NaCl) für mindestens 1 h bei RT geblockt. Der primäre Antikörper wurde in der jeweiligen Verdünnung in TBST (20 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) auf die Membran aufgetragen und es wurde bei 4°C über Nacht inkubiert. Der sekundäre Antikörper gekoppelt an alkalische Phosphatase wurde in TBST auf die Membran gegeben und es wurde für 2 h bei RT inkubiert. Die Färbereaktion wurde mit BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-

indolylphosphat) und NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid) (je 250 µg/ml in 150 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM NaCl) durchgeführt.

### 3.4.6.6 Proteindeglykosylierungsstudien

Um Proteine aus *A. thaliana* und *N. benthamiana* auf ihren Glykosylierungsstatus hin zu untersuchen, wurde der Gesamtproteinextrakt aus Blättern der GFP-Fusionsprotein exprimierenden Pflanzen (in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), 1 % (v/v) Nonidet P-40 (Applichem)) gewonnen. Der Extrakt wurde entsprechend des Protokolls für Deglykosylierung unter denaturierenden Bedingungen mit dem Protein Deglycosylation Mix (NEB Biolabs) behandelt, zum Vergleich mit einer unbehandelten Probe des Extraktes über SDS-PAGE (3.4.6.2) aufgetrennt und mittels Immunoblot mit GFP spezifischen Antikörpern analysiert (3.4.6.5). Eine Verringerung der Größe des behandelten Proteins im Vergleich zum unbehandelten Protein deutet auf Glycosylierungen hin.

### 3.4.6.7 Bestimmung der MAP-Kinase-Aktivität

Zwei *Arabidopsis* Blätter wurden nach Elicitierungsexperimenten (3.5.4) in flüssigem Stickstoff eingefroren und in 100 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche)) homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 13 000 upm bei 4°C für 20 min abgetrennt. Der Proteingehalt des Überstandes wurde bestimmt (3.4.6.1) und 10 – 20 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.6.2). Anschließend wurden die posttranslational aktivierten *A. thaliana* MAP Kinasen MPK3 und MPK6 durch Immunoblot mit Hilfe von anti-Phospho-p24/p44 MAP Kinase Antikörpern (Cell Signaling Technology) entsprechend den Angaben des Herstellers als primäre Antikörper detektiert (3.4.6.5).

### 3.4.6.8 Glykokonjugatbindestudien

Glykokonjugatbindestudien wurden grundsätzlich wie anderswo (Biswas *et al.*, 2006) beschrieben durchgeführt. 1 µg Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgereinigtes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein (3.4.7) wurde mit der entsprechend angegebenen Menge an unlöslichem Kohlenhydrat oder Glykokonjugat in 250 µl 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) gemischt und für die angegebene Zeit bei 4°C inkubiert. Das unlösliche Glykokonjugat-Pellet wurde nach Zentrifugation bei 13 000 g bei 4°C für 10 min nach zweimaligem Waschen mit 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) in SDS-Ladepuffer aufgenommen und nach



Auftrennung mittels SDS-Gelelektrophorese und Immunoblot mit His<sub>6</sub> spezifischen Antikörpern analysiert (3.4.6.5). Für Assoziationsstudien wurde 1 µg des aufgereinigten Fusionsproteins mit 50 µg PGN für die angebenen Zeiten bei 4°C inkubiert. Das PGN-Pellet wurde wie oben beschrieben analysiert. Um die Dissoziation zu untersuchen, wurde 1 µg des aufgereinigten Fusionsproteins mit 50 µg PGN für 10 min bei 4°C inkubiert. Das PGN wurde anschließend gewaschen und in 2 ml 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) aufgenommen. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde das PGN abgetrennt und, wie oben beschrieben, analysiert. Für Wettbewerbsstudien wurde 1 µg des aufgereinigtes Fusionsproteins mit 50 µg unlöslichem PGN zusammen mit den angegeben Konzentrationen an löslichem Chitohexamer (*Seikagaku Corporation*) oder Nod-Faktor (LCO-IV(S, C16:2) aus *Sinorhizobium meliloti*, zur Verfügung gestellt von Jean-Jacques Bono (Ohsten Rasmussen *et al.*, 2004) bei 4°C für 10 min inkubiert. Die PGN Pellets wurden auf das Vorhandensein des Fusionsproteins untersucht. Zum Vergleich wurden diese Studien auch ohne lösliche Glykokonjugate durchgeführt. Desweiteren wurden Wettbewerbsstudien mit 100 µg löslichem PGN (aus *E. coli*, *Invivogen*) in Gegenwart von verschiedenen Mengen unlöslichem PGN und 1 µg aufgereinigtem Fusionsprotein durchgeführt. Entsprechende Studien wurden zum Vergleich auch ohne lösliches PGN durchgeführt.

### **3.4.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter Proteine in *Escherichia coli***

Fusionsproteine wurden in *E. coli* BL21AI Zellen (*Invitrogen*) exprimiert. Aus einer Übernachtskultur (3.2.1) wurde eine Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,1 bei 600 nm inokuliert. Die Zellen wurden für 2 h bei 37°C und 180 upm angezogen. Nach der Induktion mit einer Endkonzentration von 0,2 % (w/v) L-Arabinose wurden die Zellen für 2 h bei 28°C und 180 upm inkubiert.

Für die Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen wurden die Zellen in Lysepuffer (TBST, 1 mg/ml Lysozym, 10 µg/ml DNaseI, 10 µg/ml RNaseA, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM PMSF, Complete Protein Inhibitor Cocktail™ (*Roche*)) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Dieses Lysat wurde 3 Sonifikationszyklen (75 %, 10 sec, *Bandelin* UW 2070) unterzogen und 20 min mit 14 000 upm bei 4°C zentrifugiert. Die weitere Aufreinigung erfolgte aus dem löslichen Überstand mit Glutathion Sepharose 4B (*Amersham*) entsprechend den Angaben des Herstellers.

Der Aufschluss und die Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen mit Ni<sup>2+</sup>-NTA (*Qiagen*) erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers.

### 3.4.8 Analyse von Proteininteraktionen

#### 3.4.8.1 Yeast Two-Hybrid System

Mit den nach 3.4.2.3 transformierten *S. cerevisiae* wurden SC-Leu-Trp-Kulturen angeimpft. Für jede verwendete Kombination wurden drei Kulturen angesetzt und über Nacht angezogen (3.2.3). Die drei Kulturen jedes Konstrukte wurden vereinigt und die Zelldichten angeglichen. Die Kulturen wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:100 und 1:1000 zu je 5 µl auf Platten mit SC-Ade-Leu-Trp Medium und Platten mit SC-Leu-Trp aufgetropft. Das Wachstum wurde nach 2 Tagen bei 30°C kontrolliert.

#### 3.4.8.2 Far Western

Lysate von *E. coli* BL21AI Zellen, welche die entsprechenden His<sub>6</sub>-Fusionsproteine exprimierten (3.4.7), wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (3.4.6.2). Anschließend wurden die Proteine mittels Elektro-Blot auf eine Hybond<sup>TM</sup> ECL Nitrocellulosemembran (*Amersham*) übertragen. Die Membran wurde bei RT 2 h in Blockpuffer I (0,05 % (v/v) Tween 20 in TBS) und anschließend 2 h in Blockpuffer II (1 % (w/v) BSA (Fraktion V) in TBS) bei 100 upm inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 min mit TBS gewaschen und in Sondenpuffer (3 % (w/v) BSA (Fraktion V), TBS) 10 min äquilibriert.

Als Sonde wurde aufgereinigtes GST-Fusionsprotein (3.4.7) in 3 ml Sondenpuffer gelöst. Die Membran wurde mit dieser Lösung überschichtet, luftdicht abgedeckt und 2 h bei RT inkubiert.

Anschließend wurde die Membran 4-mal mit TBS für je 10 min gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBST inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit TBST wurde die Detektion mit anti-GST-Peroxidasekonjugat Antikörpern (*Amersham*) in 5% (w/v) Magermilch in TBST durchgeführt und mit ECL Lösung (*Amersham*) entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt und durch Autoradiographie analysiert.

### 3.5 Biologische Studien

#### 3.5.1 Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

4 bis 5 Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen, welche auf Erde unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, wurden mit Bakterien einer Dichte von  $10^4 \text{ ml}^{-1}$  in 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert. Proben wurden zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Hierzu wurden aus insgesamt sechs Blättern pro Linie je 2 Blattscheiben eines Durchmessers von 0,5 cm in 200 µl 10 mM MgCl<sub>2</sub> homogenisiert. Jeweils 10 µl

des Homogenats wurden in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert, 1 bis 2 Tage bei 28°C inkubiert und die koloniebildenden Einheiten (cfu) ausgezählt.

### **3.5.2 Infektion von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit *Alternaria brassicicola***

Es wurden wässrige Suspensionen mit  $5 \cdot 10^5$  Sporen  $\text{ml}^{-1}$  hergestellt. Von dieser Suspension wurden je 6 Tropfen zu je 5  $\mu\text{l}$  auf Blätter 5 bis 6 Wochen alter *Arabidopsis* Pflanzen aufgetragen. Die Pflanzen wurden für den Verlauf der Infektion unter einem geschlossenen Gewächshausdeckel bei 100 % Luftfeuchtigkeit belassen. An den entsprechenden Tagen wurden die Blätter anhand der Infektionssymptome bonitiert (Kemmerling *et al.*, 2007).

### **3.5.3 Behandlung von *Arabidopsis thaliana* Keimlingen mit Elicitoren**

*A. thaliana* Samen wurden 8 Tage auf  $\frac{1}{2}$  MS-Medium angezogen (3.1.1). Anschließend wurden die Keimlinge in 48 Well Mikrotiterplatten mit  $\frac{1}{2}$  MS-Medium mit 1 % (w/v) Saccharose überführt und über Nacht bei RT und 180 upm äquilibriert. Daraufhin wurden die entsprechenden Elicitoren in den angegebenen Konzentrationen zu den Keimlingen gegeben (Miya *et al.*, 2007). Die Keimlinge wurden nach der angegebenen Zeit aus dem  $\frac{1}{2}$  MS-Medium entfernt, auf Papier abgetropft und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **3.5.4 Infiltration von Elicitoren in *Arabidopsis thaliana* Blätter**

Blätter von 4 bis 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen wurden mit einer kanülenlosen 1 ml-Spritze von der Blattunterseite her mit den jeweils angegebenen Elicitoren in den angegebenen Konzentrationen infiltriert. Nach den angegebenen Inkubationszeiten unter Kurztagbedingungen wurden die infiltrierten Blätter geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### **3.5.5 Histochemische Detektion von $\beta$ -Glucuronidase in *pPR1:GUS* transgenen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

Zur histochemischen Detektion der GUS-Aktivität in *pPR1:GUS* transgenen *Arabidopsis* Pflanzen (Shapiro und C. Zhang, 2001) wurden Blätter nach entsprechender Elicitierung in Reaktionsgefäßen mit je 1 ml X-Gluc Puffer (50 mM  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  pH 7,0, 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat (II)  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat (III)  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 10 mM EDTA, pH 8,0, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 0,5 5-

Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure (X-Gluc, *Carl Roth*, Karlsruhe) überschichtet und nach Vakuuminfiltration über Nacht bei 37°C inkubiert. Das Chlorophyll wurde anschließend durch mehrere Waschschriffe mit 70 % (v/v) Ethanol entfernt.

### 3.5.6 Hydrolysestudien bakterieller Zellwände

Zur Untersuchung der Hydrolyseaktivität rekombinanter Proteine gegenüber bakteriellen Zellwandpräparationen, wurden Trübungsstudien, wie beschrieben, durchgeführt (Park, 2002). Dazu wurden 20  $\mu$ g His<sub>6</sub>-Fusionsprotein, welches bis auf die Lysozymbehandlung, wie in 3.4.7 beschrieben, exprimiert und mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgereinigt wurde, in einer Suspension aus 0,02 % (w/v) *Micrococcus luteus* (*Sigma-Adrich*, in 20 mM NaAc, pH 5,2) für die angegebene Dauer bei 37°C und 180 upm inkubiert. Es wurde die Abnahme der optischen Dichte der Suspension bei 570 nm gemessen. Als Kontrollen diente, anstatt des rekombinanten Proteins, Lysat von nicht-induzierten *E. coli* BL21AI Zellen oder 0,5  $\mu$ g Lysozym (aus Hühnereiweiß, *Carl Roth*).

### 3.5.7 Mikroskopie

#### 3.5.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Es wurde ein Fluoreszenzmikroskopie *Nikon Eclipse 80i* verwendet. Die Anregung von GFP erfolgte bei 465 – 495 nm, die Detektion bei 500 nm.

#### 3.5.7.2 Konfokale *Laserscanning*-Mikroskopie

Es wurde ein Mikroskop *Leica Microsystems GmbH* (Wetzlar) Typ TCS SP2 DM-RE7 (SDK) mit der Software LCS Lite Version 2.61 verwendet.

## 4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden *A. thaliana* Proteine mit Lysin-Motiven (LysM) auf eine mögliche Rolle in der Perzeption von Peptidoglycan (PGN) untersucht. Insbesondere wurde ihre Fähigkeit PGN zu binden sowie eine Beteiligung an PGN-Erkennungsprozessen und der damit einhergehenden Integration eines Signals geprüft. LysM-Proteine wurden auch auf eine Beteiligung an der Immunität gegenüber Pilz- und Bakterieninfektionen hin untersucht. In Proteininteraktionsstudien wurden erste Vorstellungen über einen PGN-Rezeptorkomplex aus LysM-Proteinen in *A. thaliana* gewonnen.

### 4.1 Aufreinigung und Reinheitskontrolle von Peptidoglycan

Bisher wurden PGNs aus *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) und *Agrobacterium tumefaciens* als MAMPs in *A. thaliana* beschrieben (Gust *et al.*, 2007; Erbs *et al.*, 2008). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch PGNs aus weiteren Organismen, z.B. aus dem *A. thaliana* Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, auf ihre immunogenen Eigenschaften in *A. thaliana* untersucht.

PGN dient als essentieller Bestandteil der bakteriellen Zellhülle der zellulären Stabilität und fungiert als Matrix, mit der weitere Bestandteile der Zellwand assoziiert sind. PGN Gram-positiven Ursprungs kann kovalent mit Teichonsäuren und Proteinen verknüpft sein. PGN Gram-negativen Ursprungs ist oft mit LPS oder Lipoproteinen verunreinigt (Silhavy *et al.*, 2010). Außerdem können unabhängig des Ursprungs unspezifische Verunreinigungen durch weitere bakterielle Proteine, DNA, RNA oder Kohlenhydratkonjugate vorliegen. Die immunogenen Eigenschaften von PGN wurden vor dem Hintergrund dieser möglichen Kontaminationen sehr kritisch diskutiert (Travassos *et al.*, 2004; Zähringer *et al.*, 2008). Um die immunogenen Eigenschaften des PGN *per se* untersuchen zu können, ist es unerlässlich, das PGN von diesen Verunreinigungen zu befreien.

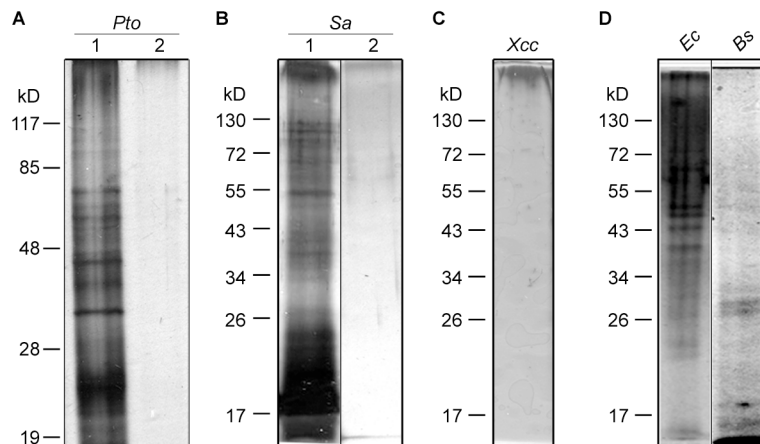
Die Aufreinigung von PGN beruht auf der Unlöslichkeit dieses komplexen, stark vernetzten Makromoleküls. Die Bakterienzellen wurden in kochendem SDS resuspendiert, um die Zellen aufzuschließen und um nichtkovalente Assoziationen, z.B. mit LPS, Lipoteichonsäuren, Lipoproteinen oder weiteren Proteinen zu beseitigen. DNA, RNA und komplexe Kohlenhydrate und kovalent assoziierte Proteine wurden enzymatisch entfernt und ausgewaschen. Im Fall Gram-positiven PGNs wurden Wandteichonsäuren durch Flusssäure beseitigt. Bei Gram-negativem PGN wurden LPS-Rückstände durch LiCl- und Acetonbehandlungen entfernt (Bera *et al.*, 2005; de Jonge *et al.*, 1992).

Für diese Arbeit stand PGN aus *Sa* (Friedrich Götz, Universität Tübingen), *Bacillus subtilis* (*Bs*, *Invivogen*), *Escherichia coli* (*Ec*, *Invivogen*) und *Xcc* (Marie-Anne Newman, Universität Kopenhagen) zur Verfügung. Es wurde auch PGN des Gram-negativen *A. thaliana* Modellpathogens *Pseudomonas*

## Ergebnisse

*syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) isoliert. Bevor diese PGNs auf ihre immunogenen Eigenschaften in *A. thaliana* untersucht wurden, wurde ihre Reinheit geprüft. Dazu wurden je 100 µg PGN in SDS Laufpuffer gekocht und der Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine wurden durch Silberfärbung analysiert.

Es zeigte sich, dass initiale Aufreinigungen von PGN aus *Pto* oder aus *S. aureus* (*Sa*) oft mit Proteinen verunreinigt waren (Abbildung 4.1, A und B jeweils Spur 1). Dies machte weitere Proteasebehandlungen und weiteres Auswaschen in Gegenwart von SDS nötig. Durch dieses Vorgehen konnten diese Verunreinigungen beseitigt werden (Abbildung 4.1, A und B jeweils Spur 2). Das gereinigte PGN aus *Xcc* zeigte keine detektierbaren Kontaminationen aus Proteinen (Abbildung 4.1 C). Die kommerziell erhältlichen PGNs aus *Ec* und *Bs* enthielten hingegen im Fall von *Ec* beträchtliche Verunreinigungen (Abbildung 4.1 D). In den PGNs konnten nach den zusätzlichen Aufreinigungsschritten keine Verunreinigungen durch DNA oder RNA mehr nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.1. Reinheitskontrolle verschiedener Peptidoglycane.**

(A-D) Je 100 µg PGN wurde in SDS-Laufpuffer gekocht und der Überstand durch SDS-PAGE aufgetrennt. Proteine wurden durch Silberfärbung detektiert. Kontrolle von selbst aufgereinigtem PGN aus *Pto* (A) und *S. aureus* (*Sa*, B) nach der initialen Aufreinigung (jeweils Spur 1) und nach weiteren Proteaseverdau- und SDS-Waschschritten (jeweils Spur 2). Kontrolle von aufgereinigtem PGN aus *X. campestris* pv. *campestris* (*Xcc*, C, erhalten von Marie-Anne Newman). Kontrolle kommerziell erhältlicher PGNs (D) aus *E. coli* (*Ec*) und *B. subtilis* (*Bs*, beide *Invivogen*).

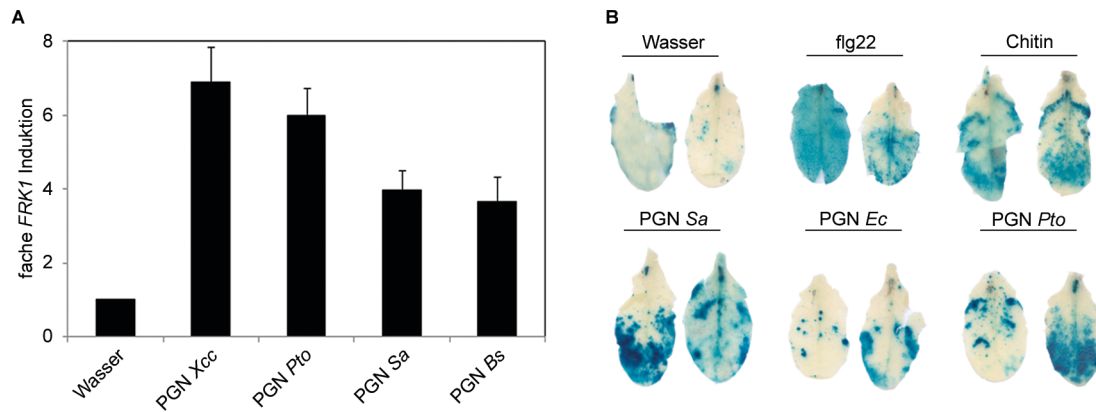
## 4.2 Peptidoglycane induzieren Änderungen im Transkriptom in *Arabidopsis thaliana*

Als typisches MAMP induziert PGN verschiedene Immunantworten in *A. thaliana*. Eine wichtige Antwort nach der Perzeption von PGN ist die massive Umstrukturierung des *A. thaliana* Transkriptoms. Dies konnte für die Behandlung mit PGN aus *Sa* bereits durch Microarrayanalysen gezeigt werden (Gust *et al.*, 2007). Mit PGN aus *Xcc* und *A. tumefaciens* konnte die Transkriptakkumulation ausgewählter Abwehrgene gezeigt werden (Erbs *et al.*, 2008).

In einem ersten Schritt wurden PGNs aus *Xcc*, *Pto*, *Sa* und *Bs* auf ihre Fähigkeit hin untersucht, in *A. thaliana* die Expression des typischen Abwehrgens *FRK1* (*flg22-induced receptor-like kinase 1* (Asai *et al.*, 2002)) zu induzieren. Dazu wurden Wildtypkeimlinge (Col-0) mit je 100 µg/ml PGN behandelt. Nach 6 h wurde die Transkriptakkumulation von *FRK1* im Vergleich zu mit Wasser behandelten Keimlingen mit Hilfe von qRT-PCR mit spezifischen Primern bestimmt. Alle getesteten PGNs zeigten dabei eine Steigerung der *FRK1*-Genexpression im Vergleich zu den Wasserkontrollen.

Weitere Gene, deren Expression typischerweise durch MAMPs induziert wird, sind Gene, die für *pathogenesis related* (PR) Proteine kodieren (Laird *et al.*, 2004; Uknes *et al.*, 1992). Hier wurde untersucht, ob PGN aus *Sa*, *Ec*, und *Pto* die Expression von *PR1* (*pathogenesis-related gene 1*) induzieren können. 100 µg/ml PGN wurde in Blätter *PR1::GUS* transgener *A. thaliana* Pflanzen infiltriert (Shapiro und Zhang 2001). Als Kontrollen wurden auch Wasser und 1 µM flg22 und 100 µg/ml Chitin infiltriert. Die durch ein histochemisches Verfahren ermittelte enzymatische GUS-Aktivität in behandelten *A. thaliana* Blättern diente als Indikator für die Aktivierung des *PR1*-Promotors. Die getesteten PGNs zeigten eine Aktivierung des *PR1*-Promotors, die mit der durch Chitin ausgelösten vergleichbar war (Abbildung 4.2 B).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.2. PGNs verschiedenen Ursprungs induzieren die Expression der Abwehrgene *FRK1* und *PR1* in *A. thaliana*.**

(A) *FRK1* Genexpression wurde in 8 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen 6 h nach Behandlung mit 100 µg/ml PGN aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*), *Staphylococcus aureus* (*Sa*) und *Bacillus subtilis* (*Bs*) mit RT-qPCR mit spezifischen Primern untersucht. Dabei diente *EF1a* Transkript zur Normalisierung. Die entsprechenden Wasserkontrollen wurden auf 1 gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Parallelen mit 10 bis 15 Keimlingen. (B) Blätter 5 Wochen alter *PR1::GUS* transgener *A. thaliana* Pflanzen wurden mit Wasser, 1 µM flg22, 100 µg/ml Chitin oder 100 µg/ml PGN aus *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Escherichia coli* (*Ec*), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) infiltriert und nach 24 h auf GUS-Aktivität untersucht.

*A. thaliana* erkennt also sowohl PGN des Lys-Typs (hier repräsentiert durch *Sa*) als auch des DAP-Typs (hier *Xcc*, *Pst*, *Ec* und *Bs*). Diese PGN-Typen unterscheiden sich besonders in ihren Peptidanteilen (siehe auch 1.4.3). Es wurde bereits gezeigt, dass PGN aus *Sa* einen bedeutenden Teil seiner immunogenen Eigenschaften verliert, wenn Bindungen seines Glycanrückgrats mit Enzymen wie Mutanolysin hydrolysiert wurden. Im Gegensatz hierzu behielt es seine Aktivität, wenn es mit Enzymen, welche Bindungen des Peptidanteils hydrolysieren, behandelt wurde (Gust *et al.*, 2007 und 1.5). Die Erkennung von PGN und damit seine immunogenen Eigenschaften hängen also vom Glycanrückgrat des PGN ab.

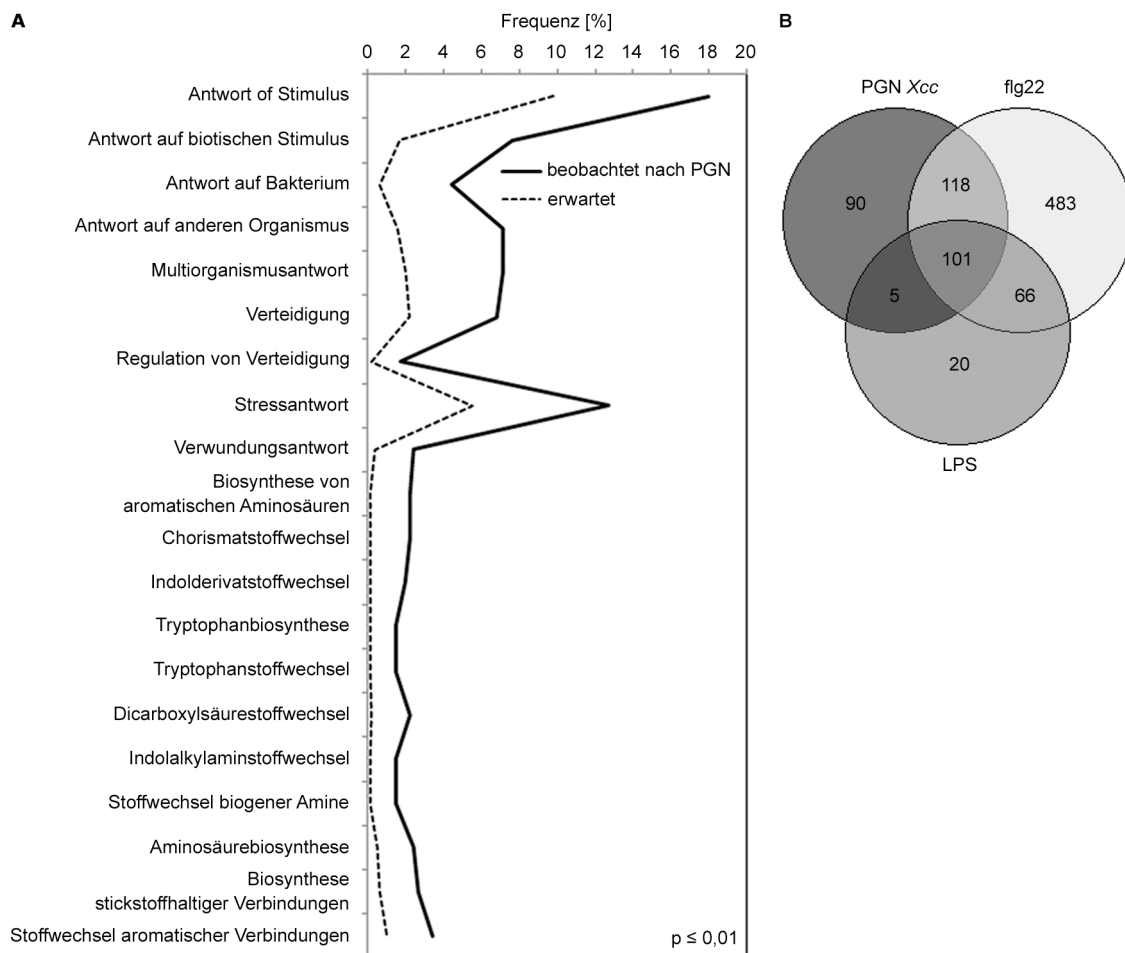
In späteren Experimenten wurde besonders das hochaufgereinigte PGN aus *Xcc* verwendet (siehe auch 4.1). Um zu prüfen, ob PGN aus *Xcc* neben der Expression ausgewählter Markergene auch eine komplexe Umprogrammierung des *A. thaliana* Transkriptom induzieren kann, wurden Microarrayanalysen nach Behandlung von WT (Col-0) Pflanzen mit *Xcc* PGN durchgeführt. Die Daten wurden normalisiert und mit Hilfe von parallel ausgeführten Wasserbehandlungen der Einfluss der PGN-Behandlung auf das Transkriptom bestimmt. Dabei zeigte sich, dass im Vergleich zur Wasserkontrolle 750 Gene in PGN behandelten Pflanzen differentiell exprimiert wurden (Storeys  $q \leq 0,1$ ). Die Expression von 411 dieser Gene war erhöht, die Expression von 339 dieser Gene war reprimiert.

Um die Auswirkungen dieser Transkriptomveränderungen zu verstehen, wurden die Genontologietermine für „biologische Prozesse“ der induzierten Gene untersucht. Dazu wurde die Frequenz der beobachteten Genannotationen mit Hilfe der Plattform Virtualplant 1.0 und dem



## Ergebnisse

Programm Biomaps im vorliegenden Microarrayexperiment mit der Frequenz dieser Termini im *A. thaliana* Genom verglichen (Shasha *et al.*, 2005).



**Abbildung 4.3. Behandlung mit Xcc PGN löst eine stressassoziierte Transkriptomreaktion in *A. thaliana* aus, die sich mit der durch andere MAMPs ausgelösten Reaktion überschneidet.**

(A) Analyse der Genontologietermine. Das Transkriptom von *A. thaliana* Pflanzen 6 h nach Behandlung mit 100 µg/ml Xcc PGN wurde durch eine Microarrayanalyse relativ zu Kontrollbehandlungen mit Wasser untersucht. Die Expression von 411 Genen wurde durch die PGN-Behandlung induziert (Storeys  $q \leq 0,1$ ). Die Frequenz des Auftretens von Genontologietermine für die Funktion „Biologische Prozesse“ dieser Gene (*beobachtet nach PGN*: durchgezogene Linie) wurde mit der Plattform Virtual Plant 1.0 und dem Programm Biomaps mit der Frequenz dieser Genontologietermine im *A. thaliana* Genom (TAIR10, The Arabidopsis Information Resource) verglichen (*erwartet*: gestrichelte Linie). Dabei war  $p \leq 0,01$ . (B) Vergleich der PGN Xcc Behandlung mit flg22 und LPS Behandlungen von *A. thaliana*. Die in ihrer Expression induzierten Gene des vorliegenden Microarrayexperiments wurden mit induzierten Genen aus öffentlich verfügbaren Microarraydatenbanken (AtGenExpress, TAIR) für Behandlungen mit flg22 und LPS verglichen. Um vergleichbare Grundlagen zu verwenden, wurden nur Gene, deren Expression mehr als zweifach induziert war, einbezogen. Dies ergab für PGN Xcc 314, für flg22 768 und für LPS 192 Gene. Die Genpopulationen wurden verglichen und mit Hilfe von GeneVenn ein Venn Diagramm erstellt.

Die Behandlung mit Xcc PGN führte zu einer Überrepräsentation von stressassoziierten Termini, wie z.B. „Antwort auf biotischen Stimulus“ oder „Antwort auf Bakterium“ im Vergleich zum Auftreten dieser Termini im *A. thaliana* Genom (Abbildung 4.3 A, *beobachtet nach PGN* im Vergleich zu *erwartet*). Zudem fiel auf, dass Termini, die mit dem Stoffwechsel aromatischer Aminosäuren,

## Ergebnisse

insbesondere Tryptophan, verknüpft sind, im vorliegenden Experiment überrepräsentiert waren. Dies könnte auf die Expression von Genen der Camalexinbiosynthese, deren Ausgangspunkt Tryptophan ist, hindeuten (Hansen und Halkier 2005). Camalexin wirkt antimikrobiell und ist ein wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Immunität (Kuc, 1995). Nach Behandlung von *A. thaliana* mit PGN aus *S. aureus* konnte bereits eine Induktion der Camalexinbiosynthese gezeigt werden (Gust *et al.*, 2007). Die vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine ähnliche Eigenschaft des *Xcc* PGNs hin. Die tatsächliche Produktion von Camalexin nach Behandlung mit *Xcc* PGN muss noch gezeigt werden.

Darüber hinaus wurde die Expression von Genen der Signalperzeption induziert. Darunter befanden sich Gene, die z.B. für Rezeptor-ähnliche Kinasen, LRR-Kinasen kodieren oder für Proteine der transkriptionellen Regulation, wie z.B. Transkriptionsfaktoren (insbesondere der WRKY-Familie), codieren. Die Transkription typischer Abwehrgene, die beispielsweise für Chitinasen oder Proteaseinhibitoren codieren, wurde auch erhöht. Einige der Gene, deren Expression induziert wurde, sind in Tabelle 4.1 gezeigt.

Die durch *Xcc* PGN ausgelöste Transkriptomantwort in *A. thaliana* wurde mit Antworten, welche durch andere MAMPs ausgelöst wurden, verglichen. Dafür wurden Expressionsdaten der öffentlichen Microarraydatenbanken (AtGenExpress, TAIR) für Behandlungen mit flg22, dem aktiven Peptid aus Flagellin, und LPS verwendet. Um die Vergleichbarkeit der Daten zu erhöhen, wurden sowohl für das hier vorliegende Microarrayexperiment als auch für die beiden externen Experimente nur Gene verwendet, deren Expression mindestens zweifach induziert war. Dies ergab für die Behandlung mit PGN aus *Xcc* 314, mit flg22 768 und mit LPS 192 Gene. Die induzierten Genpopulationen der drei Behandlungen wurden verglichen und mit Hilfe von GeneVenn (Pirooznia *et al.*, 2007) ein Venn-Diagramm erstellt (Abbildung 4.3 B). Dabei wird deutlich, dass bei der Behandlung von *A. thaliana* mit PGN *Xcc* 219 Gene induziert wurden, die auch durch flg22 induziert wurden. Darüber hinaus wurden 106 Gene induziert, die auch durch LPS induziert wurden. 101 Gene wurden von allen drei MAMPs induziert. Dies sind besonders Gene mit Genontologietermini, die mit Stress und biotischen Stimuli assoziiert sind.

Der Vergleich mit Behandlungen durch andere MAMPs macht deutlich, dass PGN *Xcc* eine typische MAMP-vermittelte Transkriptomreaktion in *A. thaliana* hervorruft. Obwohl bestimmte stressassoziierte Gene durch die drei MAMPs *Xcc* PGN, flg22 und LPS induziert werden, besitzt doch jedes MAMP darüber hinaus eine eigene, stimulusspezifische Transkriptomsignatur in *A. thaliana*.

## Ergebnisse

**Tabelle 4.1. Ausgewählte Gene, deren Expression in *A. thaliana* durch PGN *Xcc* induziert wurde.**

Gen (AGI)	Beschreibung	Bezeichnung/Genname	fache Induktion	p-Wert
AT3G46280	Proteinkinase		10,2	0,015
AT2G19190		FRK1	7,3	0,003
AT1G51800			5,2	0,010
AT1G51820			4,2	0,056
AT1G51860			3,4	0,040
AT1G51790			2,7	0,023
AT2G35620	LRR-Kinasen		2,7	0,085
AT1G51850			2,6	0,046
AT5G25930			2,5	0,025
AT1G51890			4,7	0,008
AT1G74360			3,0	0,006
AT5G48540			3,9	0,002
AT4G18250			3,8	0,002
AT3G22060			3,1	0,016
AT4G23190		CRK11	3,6	0,027
AT4G23210		CRK13	2,1	0,015
AT4G21410	RLKs	CRK29	2,6	0,053
AT4G04510		CRK38	2,5	0,013
AT4G23150		CRK7	2,6	0,001
AT5G01550		Lectin	3,2	0,001
AT5G01540		Lectin	2,9	0,025
AT3G16530		Lectin	2,1	0,008
AT1G10585		Basic Loop Helix	2,7	0,011
AT1G18570		MYB51	2,4	0,026
AT2G25000		WKRY60	2,7	0,000
AT2G23320		WRK15	2,3	0,026
AT4G31800		WRKY18	2,9	0,005
AT4G01250		WRKY22	2,5	0,169
AT5G24110	Transkriptionsfaktoren	WRKY30	4,1	0,001
AT1G80840		WRKY40	4,8	0,017
AT4G01720		WRKY47	3,0	0,004
AT4G23810		WRKY53	3,7	0,003
AT2G40740		WRKY55	2,5	0,002
AT1G62300		WRKY6	2,7	0,018
AT5G15130		WRKY72	2,1	0,047
AT3G18770		Autophagie	2,2	0,071
AT2G39200		MLO12	4,2	0,022
AT1G61560		MLO6	2,2	0,007
AT2G37040	Verteidigung	PAL1	2,6	0,001
AT2G14610		PR1	3,5	0,031
AT5G44910		TIR Klasse	2,9	0,078
AT1G57630		TIR Klasse	2,7	0,014
AT2G20142		TIR Klasse	2,2	0,057
AT4G01700			3,8	0,000
AT2G43570	Chitinasen		3,3	0,002
AT2G43620			2,2	0,039
AT1G02360			2,2	0,004
AT2G30750		CYP71A12	3,2	0,001
AT2G30770		CYP71A13	2,8	0,001
AT4G37370	Cytochrome	CYP81D8	2,1	0,115
AT5G57220		CYP81F2	5,4	0,006
AT2G27690		CYP94C1	2,1	0,051
AT3G26830		PAD3	4,0	0,001
AT1G17860			2,7	0,017
AT2G43510			2,6	0,001
AT4G22470	Proteaseinhibitoren		2,5	0,018
AT2G38870			2,3	0,021
AT1G72060			2,2	0,011
AT3G52450		U-box	3,2	0,067
AT2G35930	Proteinabbau	U-box	2,5	0,084
AT2G42360		U-box	2,1	0,020
AT5G53110		U-box	4,2	0,003

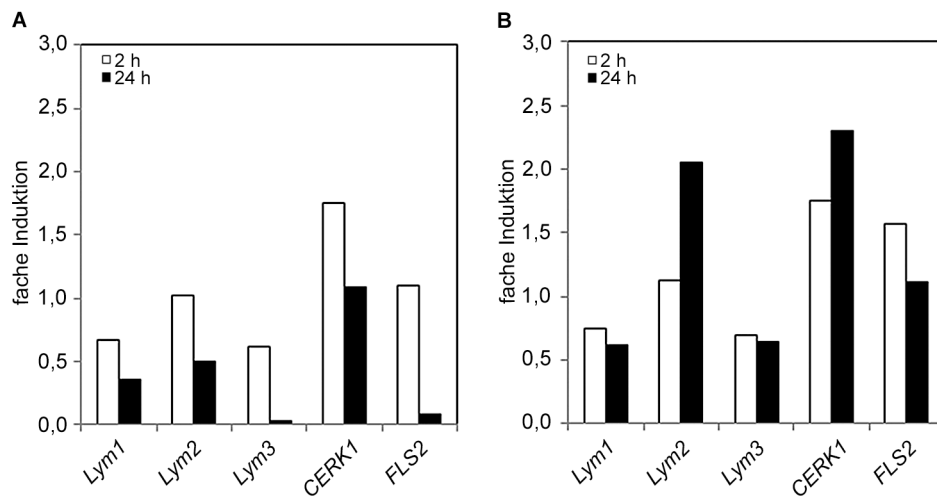
### 4.3 Die Expression von *LYM3* wird durch virulente, phytopathogene Bakterien reprimiert

Die Infektion von *A. thaliana* mit pathogenen Bakterien hat eine Modulation des Transkriptomts zur Folge (Glazebrook *et al.*, 2003; Tao *et al.*, 2003; De Vos *et al.*, 2005). Zum einen ist dies Teil einer durch PTI und ETI induzierten Antwort des pflanzlichen Immunsystems, in der das Transkriptom verändert wird, um die Expression von Genen, deren Genprodukte für die Immunantwort benötigt werden, zu induzieren. Zum anderen sind phytopathogene Bakterien wie *Pto* DC3000 in der Lage, durch Effektor-vermittelte Suszeptibilität das Transkriptom des Wirts zu beeinflussen, um Komponenten der pflanzlichen Immunität zu inaktivieren (Grant *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Der Einfluss bakterieller Infektion auf die relative Expression von *LYM1*, *LYM2*, *LYM3*, *CERK1* und zum Vergleich von *FLS2*, dem für den Flagellinrezeptor kodierenden Gen, wurde mit Hilfe der öffentlich zugänglichen Transkriptomdatenbanken (Microarraydaten des AtGenExpress Projektes) untersucht. Transkriptmengen in *A. thaliana* wurden 2 und 24 h nach Infektion mit dem virulenten Bakterium *Pto* DC3000 und dem Typ-III-Sekretionssystem defizienten, nichtpathogenen *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> in Relation zu Transkriptmengen nach Kontrollbehandlungen untersucht. Nach 2 h wurde durch die Infektion mit beiden *Pto*-Stämmen die Transkription von *LYM1* und *LYM3* schwach reprimiert, die Transkription von *CERK1* wurde induziert (Abbildung 4.4 A und B). 24 h nach der Infektion mit dem virulenten *Pto* DC3000 wurde die relative Transkriptakkumulation von allen drei LYM-Protein codierenden Genen supprimiert (Abbildung 4.4 A). Besonders drastisch war die Suppression der relativen *LYM3* Expression, die nur 3 % der Transkriptmenge der Kontrollbehandlung erreichte. Eine vergleichbare Suppression konnte bei der Expression von *FLS2*, dem für den Flagellinrezeptor *Flagellin Sensitive 2* kodierenden Gen beobachtet werden (Abbildung 4.4 A). Die Infektion mit *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> hingegen zeigte nicht diesen drastisch reprimierenden Effekt auf die relative Transkriptmenge dieser Gene. Die relative Transkriptmenge von *LYM2* und *CERK1* wurde sogar erhöht.

*Pto* DC3000 ist in der Lage, mit Hilfe seines Typ-III-Sekretionssystems Effektoren in das Cytosol seiner pflanzlichen Wirtszellen zu transportieren. Einige dieser Effektoren unterdrücken die MAMP vermittelte Immunität der Pflanze (Grant *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006). Diese Unterdrückung kann auch durch die Repression der Expression von PRRs, wie bei *FLS2*, geschehen (Abbildung 4.4 A). Die unterdrückte Expression von PRRs bedeutet eine schlechtere Erkennung der MAMP-Signatur des angreifenden Pathogens durch *A. thaliana*. *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> hingegen ist nicht in der Lage ein funktionelles Typ-III-Sekretionssystem zu etablieren und kann so keine Effektoren in das Wirtscytosol transportieren (Deng *et al.*, 1998).

## Ergebnisse

Die Beobachtung, dass die Expression von *LYM1*, *2* und insbesondere *LYM3* durch die Infektion mit *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> nicht reprimiert wird, deutet darauf hin, dass die Repression durch *Pto* DC3000 vermutlich durch Effektoren vermittelt wird.



**Abbildung 4.4. Die Expression von *LYM1*, *LYM2*, *LYM3*, *CERK1* und *FLS2* in *Arabidopsis* Wildtyppflanzen nach Bakterieninfektion.**

Microarraydaten der AtGenExpress Initiative wurden mit Hilfe des Digital-Northern Programms auf die Transkriptakkumulationen der Gene *LYM1*, *LYM2* und *LYM3* sowie *CERK1* und *FLS2* 2 und 24 h nach der Bakterieninfiltration untersucht. Die Akkumulationen sind relativ zu Kontrollinfiltrationen mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> dargestellt. A. *thaliana* Wildtyppflanzen wurden mit 10<sup>8</sup> cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (A) oder mit Wildtyppflanzen wurden mit 10<sup>8</sup> cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> (B) infiziert.

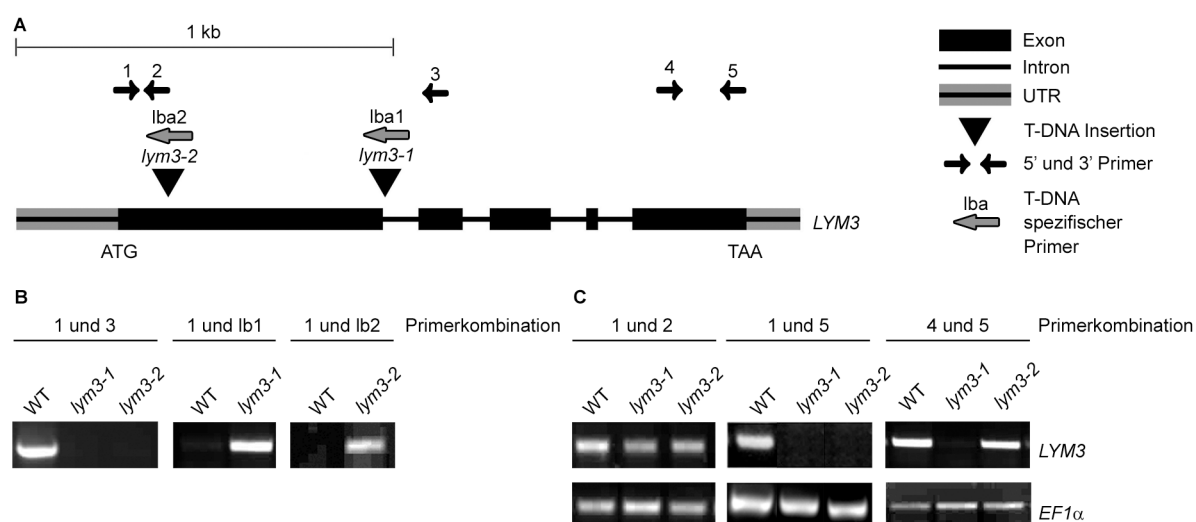
2 h nach der Infektion ähneln sich die Expressionsprofile der untersuchten Gene (Abbildung 4.4 A und B). Zu diesem frühen Zeitpunkt ist *Pto* DC3000 noch nicht in der Lage, das Sekretionssystem zu etablieren und Effektoren und das Cytosol der Wirtszelle zu translozieren (Tang *et al.*, 2006), so dass hier nur schnell einsetzende Effekte zu Geltung kommen können, wie z.B. die Modulation des Transkriptomts durch MAMP-Perzeption und PTI.

Die Expression von *LYM3* wird in einem ähnlichen Maß reprimiert wie die von *FLS2*. Dass die Expression von *LYM3* also möglicherweise ein Ziel bakterieller Effektoren darstellt, ist ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung von *LYM3* an der Immunabwehr gegen phytopathogene Bakterien in *A. thaliana*.

#### 4.4 Charakterisierung der *LYM3* und *LYM1 Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien

Für die folgenden Experimente standen *A. thaliana* T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung.

Zur Untersuchung von *LYM3* wurden zwei T-DNA-Insertionslinien verwendet. Es wurde die homozygote Linie *lym3-1* (SALK\_111212, Nottingham Arabidopsis Stock Centre, NASC) mit einer T-DNA-Insertion im ersten Intron und die homozygote Linie *lym3-2* (SALK\_132566, NASC) mit einer T-DNA-Insertion im ersten Exon charakterisiert (Abbildung 4.5 A und B). Beide Linien besitzen den genetischen Col-0 Hintergrund und wurden mit Pflanzen des gleichen Ökotyps verglichen. Mit *LYM3* spezifischen Primern wurde das Transkript der beiden Linien im Vergleich zu WT-Pflanzen untersucht. Beide Linien besaßen *LYM3*-Resttranskript vor der jeweiligen Insertion. *lym3-2* zeigte im Gegensatz zu *lym3-1* Resttranskript hinter der T-DNA Insertion. In beiden Linien war aber kein vollständiges *LYM3* Transkript nachweisbar (Abbildung 4.5 C).

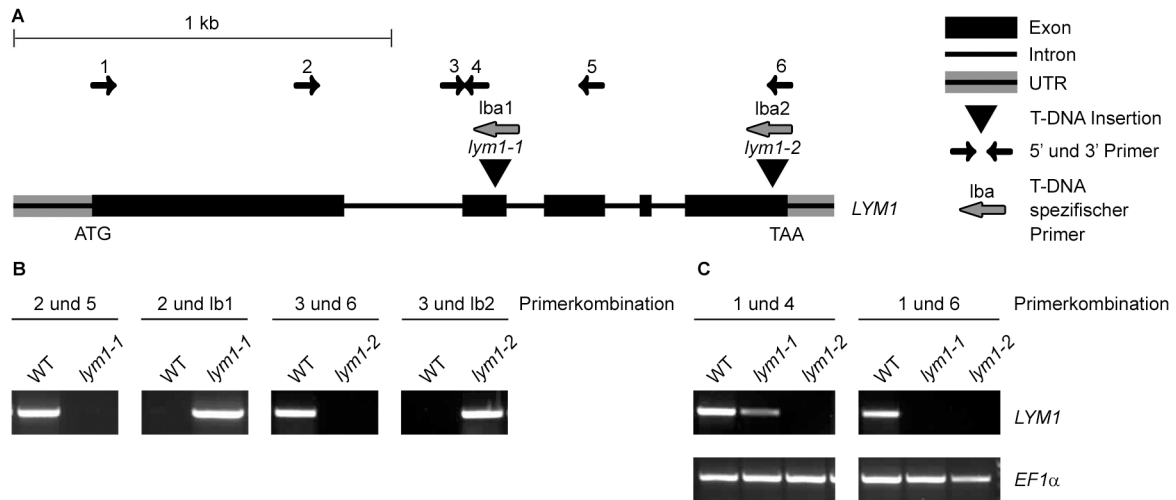


**Abbildung 4.5. Charakterisierung der *LYM3* T-DNA-Insertionslinien.**

(A) Genarchitektur von *LYM3* mit den Positionen der T-DNA-Insertionen *lym3-1*, *lym3-2* und den verwendeten Primern. (B) Genotypisierung. Genomische DNA der entsprechenden Pflanzen wurde für PCRs mit den angegebenen Primerkombinationen verwendet. (C) Transkriptanalyse. Gesamt-RNA wurde aus je zwei Blättern der entsprechenden Pflanzen isoliert und in cDNA revers-transkribiert. Durch PCR mit den angegebenen *LYM3* spezifischen Primerkombinationen wurde die jeweilige Transkriptakkumulation überprüft. Als Kontrolle wurden PCRs mit spezifischen Primern des konstitutiv exprimierten Gens *EF1 $\alpha$*  durchgeführt. (Die verwendeten Primer können im Anhang gefunden werden: 1 – *Lym3-f*, 2 – *Lym3-r5*, 3 – *Lym3-r4*, 4 – *Lym3-100-f*, 5 – *Lym3-r*, *lba1*, *lba2* – SALK-*Lba*)

Für *LYM1* konnten zwei homozygote T-DNA Insertionslinien isoliert werden. *lym1-1* (GABI\_419G07) besitzt eine T-DNA-Insertion im 2. Exon, *lym1-2* (sk17791) besitzt eine T-DNA Insertion im 5. Exon (Abbildung 4.6 A und B).

## Ergebnisse



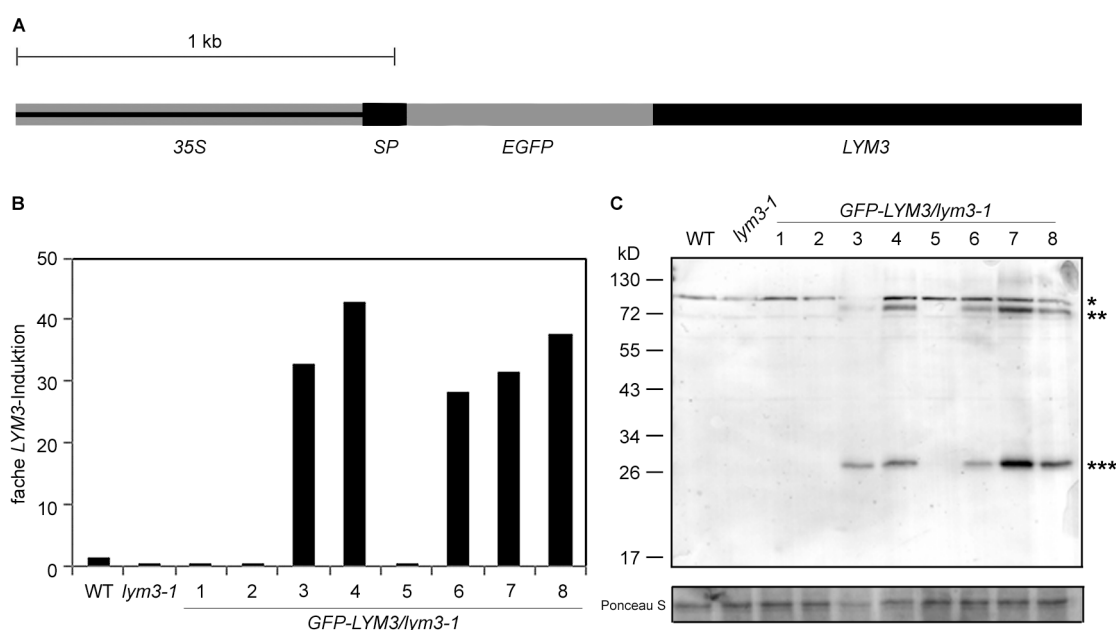
**Abbildung 4.6. Charakterisierung der *LYM1* T-DNA-Insertionslinien.**

(A) Genarchitektur von *LYM1* mit den Positionen der T-DNA-Insertionen *lym1-1*, *lym1-2* und den verwendeten Primern. (B) Genotypisierung. Genomische DNA der entsprechenden Pflanzen wurde für PCRs mit den angegebenen Primerkombinationen verwendet. (C) Transkriptanalyse. RNA wurde aus je zwei Blättern der entsprechenden Pflanzen isoliert und in cDNA revers-transkribiert. Durch PCR mit den angegebenen *LYM1* spezifischen Primerkombinationen wurde die jeweilige Transkriptakkumulation überprüft. Als Kontrolle wurden PCRs mit spezifischen Primern des konstitutiv exprimierten Gens *EF1α* durchgeführt. (Die verwendeten Primer können im Anhang gefunden werden: 1 – *Lym1*-dSP-f, 2 – *Lym1*-f3, 3 – *Lym1*-f2, 4 – *Lym1*-r1, 5 – *Lym1*-r2, 6 – *Lym1*-r, *lba1* – GABI-Lba, *lba2* – SK-Lba)

Beide Linien besitzen den genetischen Col-0 Hintergrund und wurden mit Pflanzen des gleichen Ökotyps verglichen. Mit *LYM1* spezifischen Primern wurde das Transkript der beiden Linien im Vergleich zu WT Pflanzen untersucht. Für *lym1-1*, aber nicht für *lym1-2*, konnte Resttranskript vor der jeweiligen T-DNA Insertion nachgewiesen werden. Sowohl *lym1-1* als auch *lym1-2* wiesen aber kein vollständiges *LYM1* Transkript auf (Abbildung 4.6 C).

#### 4.5 Charakterisierung der *GFP-LYM3/lym3-1* und *LYM3/lym3-1 Arabidopsis thaliana* Linien

In folgenden Experimenten sollte die zelluläre Lokalisation von LYM3 geklärt werden. Außerdem sollte die Möglichkeit, das Fehlen von LYM3 in *A. thaliana lym3-1* T-DNA-Insertionslinien mit *LYM3*-Konstrukten zu komplementieren, untersucht werden. Hierzu wurde eine *35S:EGFP-LYM3*-Kassette stabil in *lym3-1* Pflanzen transformiert. Die kodierende Sequenz von *EGFP* wurde hierzu zwischen die Sequenz, welche für das LYM3-Signalpeptid und die Sequenz, welche für das LYM3-Protein codiert, eingefügt (3.4.5.1). Die Expression dieses Fusionskonstrukts wird durch den konstitutiv aktiven 35S-Promoter reguliert (Abbildung 4.7 A).



**Abbildung 4.7. *A. thaliana lym3-1* Pflanzen wurden stabil mit einer *35S:GFP-LYM3*-Kassette transformiert.** (A) Schema der *35S:GFP-LYM3* Kassette. Der 35S-Promotor wurde mit der für das LYM3-Signalpeptid codierenden Sequenz (SP) fusioniert. Zwischen der SP-Sequenz und der codierenden Sequenz des LYM3-Moduls (LYM3) wurde die codierende Sequenz von *EGFP* eingefügt. (B) Kontrolle der LYM3-Genexpression in WT, *lym3-1* und 8 mit der *35S:GFP-LYM3* Kassette stabil transformierten *lym3-1 A. thaliana* Pflanzen. Durch RT-qPCR mit spezifischen Primern wurde die LYM3-Genexpression überprüft. Dabei diente *EF1a* Transkript zur Normalisierung, LYM3-Genexpression der WT-Pflanzen wurde auf 1 gesetzt. (C) Expression des GFP-LYM3 Fusionsproteins. Proteinextrakte aus WT, *lym3-1* und 8 mit der *35S:GFP-LYM3* Kassette stabil transformierten *lym3-1 A. thaliana* Pflanzen (siehe auch B) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit GFP-spezifischen Antikörpern analysiert (\* unspezifische Bande, \*\* erwartete GFP-LYM3 Bande, \*\*\* GFP-Abbau). Als Ladekontrolle ist die Ponceau S-Färbung der Nitrocellulose-Membran nach Elektrophorese gezeigt.

Die Expression des Fusionskonstrukts in transformierten *lym3-1* Pflanzen wurde durch RT-qPCR mit LYM3-spezifischen Primern überprüft und mit der Expression von LYM3 in WT-Pflanzen verglichen. In einigen der transformierten Pflanzen konnte kein messbares *GFP-LYM3*-Transkript nachgewiesen werden (Abbildung 4.7 B, Pflanzen 1, 2 und 5). In diesen Pflanzen könnte die Fusionskassette in transkriptionell inaktive Regionen des *A. thaliana* Genoms integriert worden sein oder die Transkriptstabilität wurde durch zelluläre RNA-Interferenzmechanismen gestört. In anderen Pflanzen



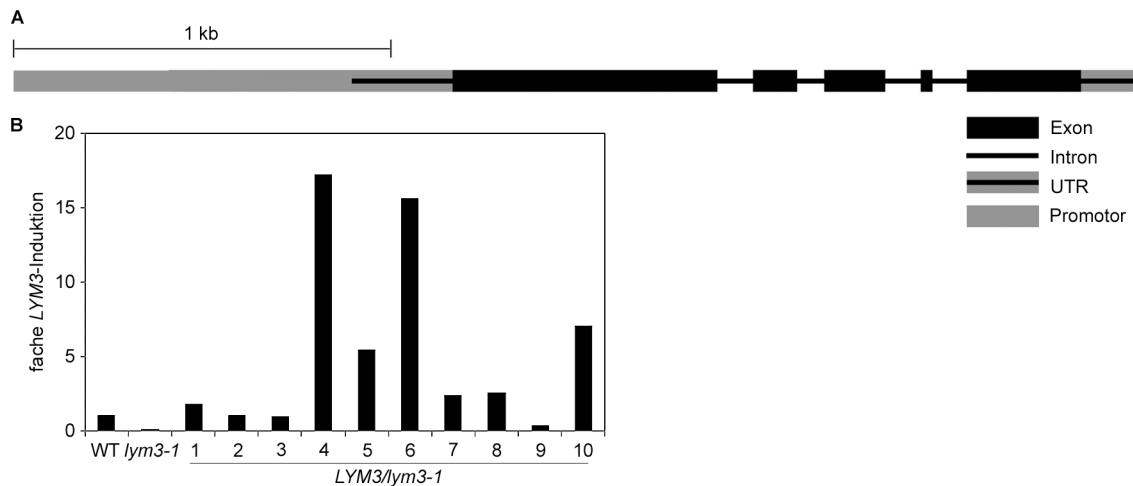
## Ergebnisse

konnte *GFP-LYM3*-Transkript nachgewiesen werden. Das *GFP-LYM3*-Transkriptniveau in diesen Pflanzen war um ein Vielfaches im Vergleich zum WT erhöht (Abbildung 4.7 B, Pflanzen 3, 4, 6, 7 und 8). Die Pflanzen wurden auch auf das Vorhandensein des *GFP-LYM3*-Fusionsproteins untersucht. In den transformierten Pflanzen mit *GFP-LYM3*-Transkript konnte jeweils das *GFP-LYM3* Protein gefunden werden (Abbildung 4.7 B, Pflanzen 3, 4, 6, 7 und 8). In diesen Pflanzen konnte auch ein *GFP*-Abbauprodukt detektiert werden. Für weitere Experimente wurden die Pflanzen 4 und 7 ausgewählt, da sie ein hohes Niveau an *GFP-LYM3*-Transkript und ein deutliches *GFP-LYM3* Proteinsignal zeigten. Diese Pflanzen wurden geselbstet und die Nachkommen auf das Vorhandensein der Fusionskassette überprüft. Nachkommen der zweiten Tochtergeneration wurden für die weiteren Experimente verwendet.

Diese *GFP-LYM3/lym3-1* Pflanzen besitzen also kein endogenes *LYM3*-Transkript mehr. Das *GFP-LYM3* Fusionskonstrukt wird in einem deutlich höheren Maß exprimiert als das endogene *LYM3* in WT Pflanzen. Aufgrund der *GFP*-Fusion stellen diese Pflanzen im Folgenden wertvolle Werkzeuge dar, um das *LYM3* Protein zu detektieren. Es wurde ein vergleichbares Konstrukt mit einer Deletion im 3'-Bereich hergestellt (3.4.5.1, Daten nicht gezeigt). Dieses Konstrukt besitzt nicht mehr die für das C-terminale *LYM3*-Propeptid codierende Sequenz. Das entsprechende *GFP*-Fusionsprotein sollte also nicht mehr mit einem *GPI*-Anker in der Cytoplasmamembran versehen werden können.

Es wurde auch eine Kasette aus einem genomischen DNA-Fragment, welches die gemische *LYM3*-Sequenz inklusive des putativen natürlichen *LYM3*-Promoters enthält (3.4.5.1), stabil in *lym3-1* Pflanzen transformiert (Abbildung 4.8 A). Auch diese Pflanzen wurden auf die Expression von *LYM3* im Vergleich zu WT-Pflanzen untersucht (Abbildung 4.8 B).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.8. A. thaliana lym3-1 Pflanzen wurden stabil mit einer pLYM3:LYM3-Kassette transformiert.**

(A) Schema der pLYM3:LYM3-Kassette. Die genomische LYM3-Sequenz wurde inklusive des putativen LYM3-Promoters verwendet. (B) Kontrolle der LYM3-Genexpression. In WT, lym3-1 und 10 mit der pLYM3:LYM3-Kassette stabil transformierten lym3-1 A. thaliana Pflanzen. Durch RT-qPCR mit spezifischen Primern wurde die LYM3-Genexpression überprüft. Dabei diente EF1a Transkript zur Normalisierung, LYM3-Genexpression der WT-Pflanzen wurde auf 1 gesetzt.

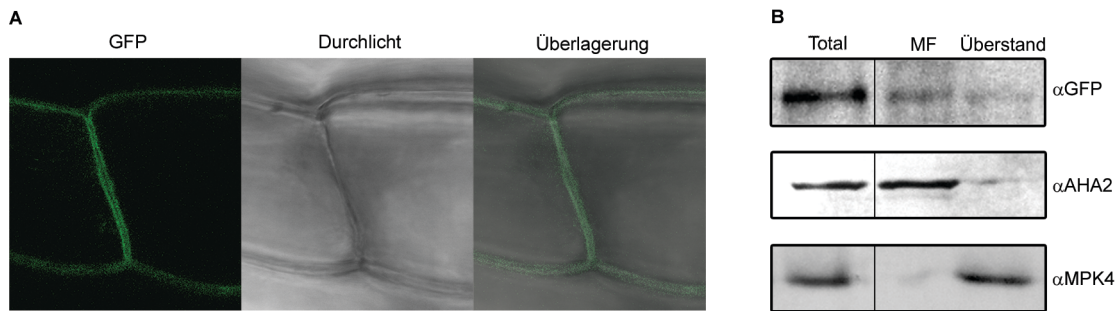
Das LYM3-Expressionsniveau der Pflanzen war sehr unterschiedlich. Gründe für ein höheres LYM3-Transkriptniveau im Vergleich zu WT-Pflanzen könnte die Insertion des LYM3-Konstruktes in transkriptionell hyperaktive Bereiche des A. thaliana Genoms sein. In einigen Pflanzen könnte auch eine Amplifikation durch multiple Insertionen des Konstruktes vorliegen. Es wurde Pflanze 3 ausgewählt, da sie ein mit WT Pflanzen vergleichbares LYM3-Transkriptniveau zeigte (Abbildung 4.8 B). Diese Pflanze wurde geselbstet und die Nachkommen auf das Vorhandensein des LYM3-Konstruktes überprüft. Nachkommen der zweiten Tochtergeneration wurden für die weiteren Experimente verwendet.

### 4.6 LYM3 ist in der Arabidopsis thaliana Plasmamembran lokalisiert und glycosyliert

Für LYM3 wurde ein Signalpeptid und ein Glycosylphosphatidylinositolanker (GPI-Anker) bereits vorhergesagt (Borner *et al.*, 2003; Borner *et al.*, 2002). Für die strukturell mit LYM3 eng verwandten Proteine LYM1 und LYM2 (siehe Abbildung 1.5) wurde die Assoziation mit der Cytoplasmamembran durch GPI-Anker bereits gezeigt (Borner *et al.*, 2003).

Aufgrund der vermuteten Funktion von LYM3 als PGN-Rezeptor- oder Bindeprotein wurde eine Lokalisation in der pflanzlichen Plasmamembran erwartet. Diese Prognose wurde auch durch die Programme SignalP 3.0, (Bendtsen *et al.*, 2004) und big-PI Predictor (Eisenhaber *et al.*, 1999) getroffen.

## Ergebnisse



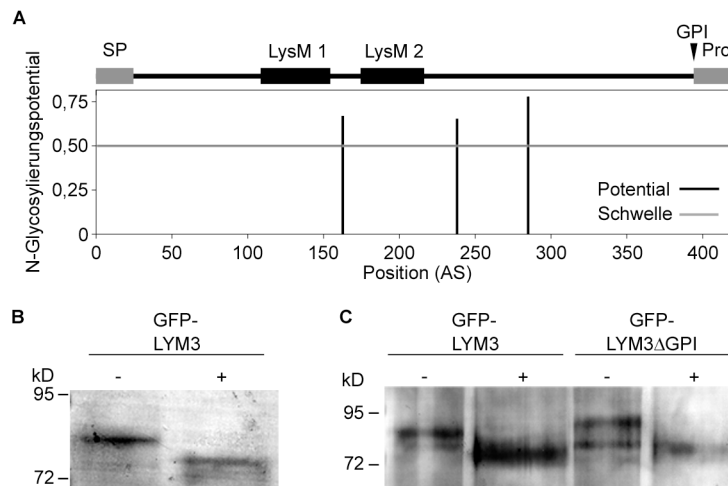
**Abbildung 4.9. LYM3 ist an der *A. thaliana* Plasmamembran lokalisiert.**

Das GFP-LYM3-Fusionsprotein wurde stabil in *A. thaliana lym3-1* Pflanzen exprimiert. (A) Die Lokalisation wurde durch konfokale Laserscanningmikroskopie bestimmt. (B) Das GFP-LYM3-Fusionsprotein kann in mikrosomalen Fraktionen (MF), welche durch differentielle Zentrifugation kompletter Proteinextrakte (Total) gewonnen wurden, durch Immunoblot Analyse mit  $\alpha$ GFP-Antikörpern nachgewiesen werden. Als Kontrolle wurden Immunoblots mit  $\alpha$ AHA2-Antikörpern, spezifisch gegen die membranständige ATPase AHA2, und mit  $\alpha$ MPK4, spezifisch gegen die lösliche MAP Kinase MPK4, durchgeführt. Es wurden jeweils 20  $\mu$ g Protein aufgetragen.

*A. thaliana GFP-LYM3/lym3-1* Pflanzen (siehe 4.5) wurden mit Laserscanningmikroskopie untersucht. Die Pflanzen zeigten eine vorherrschende GFP-Fluoreszenz an der Peripherie der Zellen (Abbildung 4.9 A). In Immunoblot Experimenten mit GFP-spezifischen Antikörpern konnte gezeigt werden, dass das GFP-LYM3-Fusionsprotein in mikrosomalen Fraktionen aus diesen Pflanzen angereichert ist. Als Kontrolle wurden die gleichen Fraktionen auch mit spezifischen  $\alpha$ AHA2-Antikörpern und  $\alpha$ MPK4 analysiert. AHA2 ist eine membranständige ATPase und wurde ebenfalls in der mikrosomalen Fraktion angereichert. Die cytoplasmatische MPK4 hingegen ist löslich und wurde nur im Überstand nachgewiesen (Abbildung 4.9 B). Diese Ergebnisse bestätigen die erwartete Lokalisation von LYM3 an der *A. thaliana* Cytoplasmamembran.

Viele sekretierte Proteine sind glycosyliert (Englund, 1993). Auch die LYM3-Homologe in Reis (CEBiP) und *M. truncatula* sind z.T. stark glycosyliert (Kaku *et al.*, 2006; Fliegmann *et al.*, 2011). Für LYM3 wurden mindestens drei N-Glycosylierungen vorhergesagt (NetNGlyc 1.0, Abbildung 4.10 A). Um das Vorhandensein von Glycosylierungen zu untersuchen, wurden Proteinextrakte von *A. thaliana GFP-LYM3/lym3-1* und von *N. benthamiana* Pflanzen, welche transient mit dem *p35S::GFP-LYM3* oder dem *p35S::GFP-LYM3ΔGPI* Konstrukt transformiert waren, mit einem komplexen Deglycosylierungsenzymgemisch (*NEB Biolabs*), das alle N-gebundene und viele O-gebundene Glycane entfernen kann, behandelt. Behandelte und unbehandelte Proteinextrakte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit GFP spezifischen Antikörpern analysiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.10. GFP-LYM3 Fusionsproteine sind glycosyliert.**

(A) *In-silico*-Vorhersage von N-Glycosylierungen. Die Primärsequenz von LYM3 wurde mit Hilfe des Programms NetNGlyc 1.0 auf mögliche N-Glycosylierungen untersucht. Dabei wurde für das N-Glycosylierungspotential eine Schwelle von 0,50 angenommen. Zum Vergleich ist die Architektur des LYM3-Proteins mit Signalpeptid (SP), den beiden Lysin-Motiven (LysM 1 und 2) sowie der Position des GPI-Ankers und des C-Terminalen Propeptids (Pro) gezeigt. (B und C) LYM3 Proteinextrakte aus *A. thaliana lym3-1* Pflanzen, welche stabil mit dem *p35S::GFP-LYM3* Konstrukt transformiert waren (B) und *N. benthamiana* Pflanzen, welche transient mit dem *p35S::GFP-LYM3* oder dem *p35S::GFP-LYM3ΔGPI* Konstrukt transformiert waren (C) wurden mit einem Deglycosylierungsenzymgemisch (Protein Deglycosylation Mix, *New England BioLabs*) behandelt (+) oder blieben unbehandelt (-). Anschließend wurden die Extrakte durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Immunoblot mit  $\alpha$ GFP Antikörpern analysiert.

Für GFP-LYM3 bzw. GFP-LYM3ΔGPI wurde bei den deglycosylierten Proben eine kleinere Größe als bei den unbehandelten Proben festgestellt (Abbildung 4.10 B und C). Dieser Größenunterschied deutet auf die Entfernung von Glycosylierungen in den behandelten Proben hin.

Bei den nicht deglycosylierten Proben aus *N. benthamiana* fällt sowohl bei GFP-LYM3 wie auch bei GFP-LYM3ΔGPI eine Doppelbande auf. Die untere Bande besitzt dabei die Größe der deglycosylierten Probe. Die eventuell unvollständige Glycosylierung ist möglicherweise auf die Überexpression der Fusionsproteine durch den konstitutiven 35S-Promoter zurückzuführen.

GFP-LYM3 wird also in *A. thaliana* und GFP-LYM3 sowie GFP-LYM3ΔGPI in *N. benthamiana* glycosyliert.

### 4.7 LYM3 bindet PGN spezifisch

Für einige Proteine mit Lysin-Motiven konnten direkte Interaktionen mit Liganden, welche N-Acetylglucosamin (GlcNAc)-Derivate enthalten, gezeigt werden (siehe auch 1.6). In Pflanzen gilt dies für die Interaktion des Reis CEBiP-Proteins und der *A. thaliana* RLK CERK1 mit Chitin (Iizasa *et al.*, 2010; Kaku *et al.*, 2006; Petutschnig *et al.*, 2010). PGN besitzt ein Glycanrückgrat aus alternierenden GlcNAc-MurNAc Einheiten. Da postuliert wird, dass diese Glycanstränge von einem putativen *A.*

## Ergebnisse

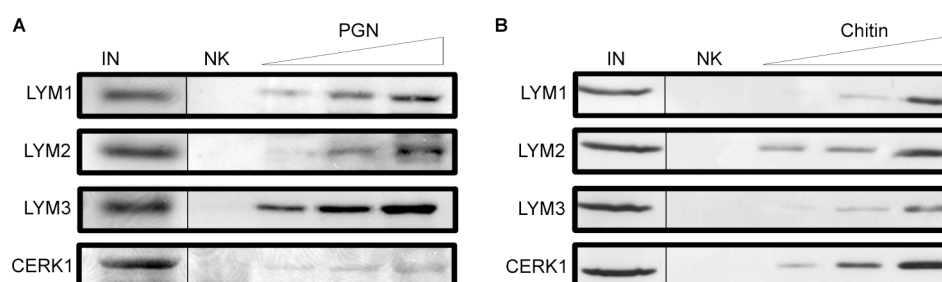
*thaliana* PGN-Rezeptor erkannt werden (Gust *et al.*, 2007 und 1.5), sollte untersucht werden, ob LYM3 und seine Homologen LYM1 und LYM2 sowie CERK1 PGN binden können.

LYM1, LYM2 und LYM3 wurden ohne vorhergesagtes Signalpeptid und ohne das als GPI-Ankersignal vorhergesagte C-terminale Pro-Peptid als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E. coli* rekombinant exprimiert. Außerdem wurde die extrazelluläre Domäne von CERK1, welche die Lysin-Motive enthält, ohne vorhergesagtes Signalpeptid als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein exprimiert. Mit diesen Fusionsproteinen wurden Bindestudien mit verschiedenen Glycokonjugaten durchgeführt.

Zuerst wurde die Fähigkeit der Fusionsproteine verglichen PGN oder Chitin zu binden. Dazu wurde je 1 µg des aufgereinigten Fusionsproteins mit verschiedenen Mengen an unlöslichem Chitin oder PGN inkubiert (je 10, 50 oder 100 µg). Das Chitin bzw. PGN wurde dann durch Zentrifugation abgetrennt, gewaschen und mittels Immunoblot mit His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörpern auf das Vorhandensein des jeweiligen Fusionsproteins untersucht.

Es konnte beobachtet werden, dass LYM3 und LYM1 bereits geringere Mengen PGN binden konnten als LYM2. Dabei war die Bindung von PGN mit LYM3 stärker als mit LYM1. CERK1 konnte PGN nur sehr schwach binden (Abbildung 4.11 A). Chitin konnte von LYM2 und CERK1 bereits in geringen Konzentrationen gebunden werden, während LYM1 und LYM3 erst bei größeren Chitinmengen binden konnten (Abbildung 4.11 B).

LYM3 besaß im Vergleich zu den anderen getesteten LysM-Proteinen also die größte Affinität zu PGN. LYM2 besaß in diesen Experimenten eine größere Affinität zu Chitin. LYM1 besaß verglichen mit LYM2 und LYM3 eine intermediäre Affinität zu PGN und konnte Chitin ähnlich schwach wie LYM3 binden. CERK1 konnte PGN nur schwach binden.



**Abbildung 4.11. Vergleichende Bindungsstudien von LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1 mit PGN oder Chitin.**

LYM1, LYM2, LYM3 und die extrazelluläre Domäne von CERK1 wurden rekombinant in *E. coli* als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine exprimiert. Jeweils 1 µg Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgereinigtes Fusionsprotein wurde für die Bindungsstudien eingesetzt und entweder mit 10, 50 oder 100 µg PGN (A) oder den gleichen Mengen Chitin (B) für 10 min bei 4 °C in einem Gesamtvolumen von 250 µl inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Glycokonjugatpellets durch SDS-PAGE und Immunoblot mit αHis<sub>6</sub>-Antikörpern analysiert. Zum Vergleich wurde auch eingesetzte Menge Protein aufgetragen (IN) als Negativkontrolle (NK) wurde kein unlösliches Substrat eingesetzt.

Die Interaktion von LYM3 und LYM1 mit PGN oder von LYM2 und Chitin findet bemerkenswerter Weise ab einer Konzentration des Liganden von 40 µg/ml statt. Dieser Konzentrationsbereich

## Ergebnisse

entspricht der Peptidoglycan- bzw. Chitinkonzentration in typischen Elicitierungsexperimenten in *A. thaliana* (Erbs *et al.*, 2008; Gust *et al.*, 2007 und Ergebnisse dieser Arbeit). Bei der ersten Charakterisierung von CERK1 wurde angenommen, dass CERK1 selbst kein Chitin binden kann (Miya *et al.*, 2007). Spätere *in vitro* und *in planta* Studien zeigten, dass CERK1 durchaus Chitin bindet (Iizasa *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Auch in Abbildung 4.11 B konnte CERK1 Chitin binden. Eine Bindung zu PGN konnte für CERK1 aber nicht beobachtet werden (Abbildung 4.11 A).

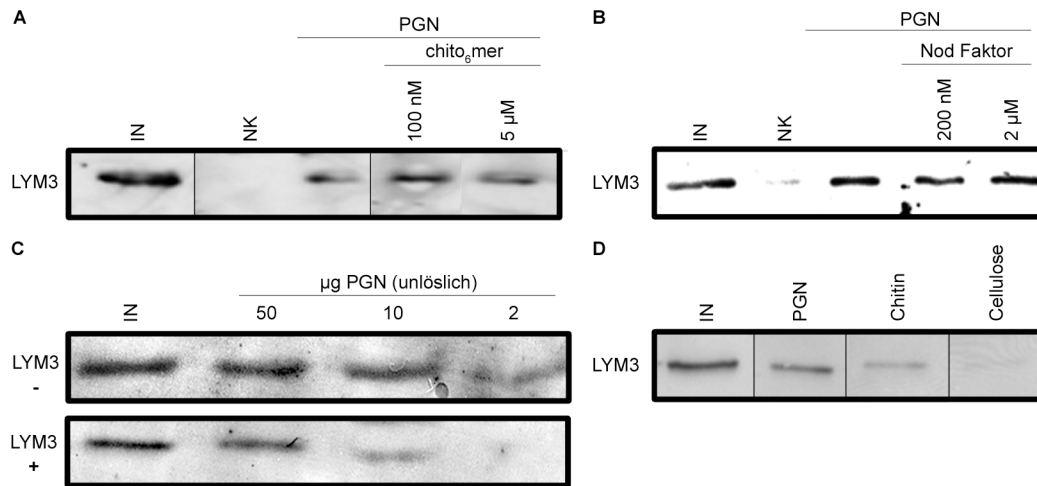
*In vitro* scheint LYM3 also das LYM-Protein mit der stärksten Affinität zu PGN zu sein. Im Folgenden wurde die Spezifität der LYM3-Interaktion mit PGN genauer untersucht.

Zunächst wurde geprüft, ob die Bindung von LYM3 mit PGN durch lösliche Chitooligosaccharide kompetiert werden kann. 1 µg aufgereinigtes His<sub>6</sub>-LYM3 Fusionsprotein wurde mit 50 µg unlöslichem PGN in Gegenwart von 100 nM oder 5 µM Chitohexamer (*Seikagaku Corporation*) inkubiert. Zum Vergleich wurde der Ansatz auch ohne Chitohexamer inkubiert. Das PGN wurde auf die Anwesenheit von LYM3 untersucht. Die Bindung von LYM3 und PGN konnte durch die getesteten Konzentrationen an Chitohexamer nicht verhindert werden. In den Proben, welche mit Chitohexamer zusammen inkubiert worden sind, zeigte sich die gleiche Menge LYM3 wie in den Proben ohne Chitohexamer (Abbildung 4.12 A).

LysM-Proteine in *M. truncatula* und *L. japonicus* sind an der Perzeption von Nod-Faktoren, Lipochitooligosacchariden aus Rhizobien, beteiligt (Radutoiu *et al.*, 2003, siehe auch 1.7.2). *In-silico*-Analysen zufolge ist das LysM-Protein NFP aus *M. truncatula* zumindest theoretisch in der Lage, mit Nod-Faktoren zu interagieren (Mulder *et al.*, 2006). Aufgrund der strukturellen Verwandtschaft des PGN-Rückgrats mit dem der Nod-Faktoren, wurde auch untersucht, ob die LYM3 PGN-Bindung durch Nod-Faktoren kompetiert werden kann. LYM3 wurde mit 50 µg unlöslichem PGN und 200 nM, 2 µM oder ohne Nod-Faktoren (LCO-IV(S, C16:2) aus *Sinorhizobium meliloti* (zur Verfügung gestellt von Jean-Jacques Bono (Rasmussen *et al.*, 2004)) inkubiert und das PGN Pellet auf das Vorhandensein von LYM3 untersucht. Die eingesetzten Konzentrationen an Nod-Faktoren konnten die Bindung von LYM3 und PGN nicht kompetieren und es war kein Unterschied zur Bindungsprobe ohne Nod-Faktoren zu erkennen (Abbildung 4.12 B).

Um zu zeigen, dass die Bindung LYM3 PGN spezifisch ist, wurde nun versucht, diese Bindung durch lösliche PGN-Präparationen (sonifiziertes PGN, *Invivogen*) zu kompetieren. 1 µg aufgereinigtes His<sub>6</sub>-LYM3-Fusionsprotein wurde mit abnehmenden Mengen an unlöslichem PGN (50, 10 und 2 µg) zusammen mit einer konstanten Menge von 100 µg an löslichem PGN inkubiert. Als Kontrolle wurde das Bindeexperiment auch ohne lösliches PGN durchgeführt. Das unlösliche PGN wurde auf die Bindung von LYM3 untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.12. Spezifität der LYM3 Interaktion mit PGN.**

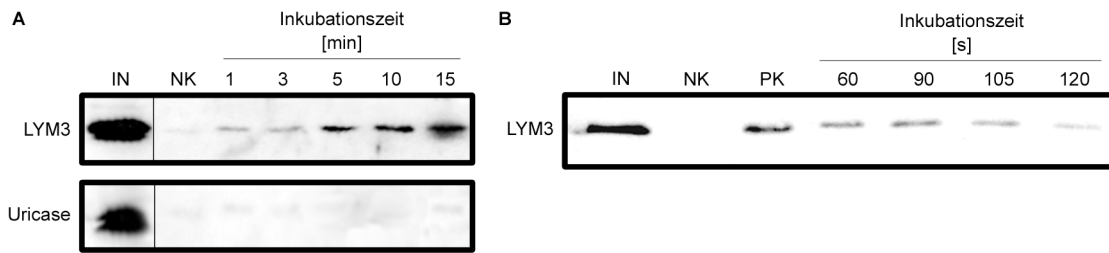
Bindungsstudien mit je 1 µg rekombinantem LYM3 His<sub>6</sub>-Fusionsprotein und 50 µg unlöslichem Glykokonjugat (wenn nicht anders angegeben) mit einer Inkubation von 10 min bei 4 °C. Danach wurde das unlösliche Glykokonjugat mittels SDS-PAGE und Immunoblot mit αHis<sub>6</sub>-Antikörpern analysiert. Zum Vergleich wurde auch die Menge an eingesetztem Fusionsprotein aufgetragen (IN), sowie das Bindungsexperiment ohne unlösliches Substrat als Negativkontrolle durchgeführt (NK). (A und B) LYM3 Fusionsprotein wurde mit unlöslichem PGN in Gegenwart unterschiedlicher Mengen Chitohexamer (A) oder Nod-Faktoren (B) inkubiert. (C) Verschiedene Mengen unlösliches PGN wurden entweder mit LYM3 His<sub>6</sub>-Fusionsprotein allein (-) oder zusammen mit 100 µg sonifiziertem, löslichem PGN inkubiert (+). (D) LYM3 Fusionsprotein wurde mit verschiedenen unlöslichen Glyco-Konjugaten inkubiert.

Dabei konnte beobachtet werden, dass das Signal für das LYM3-Fusionsprotein in der Gegenwart des löslichen PGNs stärker abnahm, als bei der Kontrollinkubation von LYM3 ohne lösliches PGN (Abbildung 4.12 C). Die Interaktion des unlöslichen PGNs mit LYM3 konnte also durch lösliches PGN kompetiert werden.

Auch der direkte Vergleich der Bindung von LYM3 mit PGN, Chitin oder Cellulose zeigt deutlich die Präferenz von rekombinantem LYM3 zu PGN (Abbildung 4.12 D). Dies deutet auf eine ligandenspezifische, kompetitive Interaktion von LYM3 und PGN hin.

Um einen Einblick in die Kinetik der LYM3 PGN Interaktion zu bekommen, wurde die Assoziation und Dissoziation der Bindung untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.13. Kinetik der LYM3 PGN Interaktion.**

(A) In einer Assoziationsstudie wurde 1  $\mu\text{g}$   $\text{Ni}^{2+}$ -NTA aufgereinigtes LYM3 oder Uricase His<sub>6</sub>-Fusionsprotein mit 50  $\mu\text{g}$  PGN für die gegebenen Zeiten bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Glyco-Konjugatpellets durch SDS-PAGE und Immunoblot mit  $\alpha\text{His}_6$ -Antikörpern analysiert. (B) In einer Dissoziationsstudie wurde 1  $\mu\text{g}$  LYM3  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA aufgereinigtes Fusionsprotein 10 min bei 4 °C mit 50  $\mu\text{g}$  inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das PGN-Pellet gewaschen und in einem Überschuß an Puffer resuspendiert und nach den angegebenen Zeiten durch SDS-PAGE und Immunoblot mit  $\alpha\text{His}_6$ -Antikörpern analysiert. Zum Vergleich wurde auch die Menge an eingesetzten Fusionsproteinen aufgetragen (IN) sowie das Bindungsexperiment ohne unlösliches Substrat als Negativkontrolle durchgeführt (NK).

In einer Assoziationsstudie wurde die Menge des an das PGN gebundenen rekombinanten LYM3 nach verschiedenen langen Inkubationszeiten mit unlöslichem PGN bestimmt. Bereits nach 1 min war ein stärkeres Signal als in der Negativkontrolle feststellbar. Nach 5 min war ein deutliches Signal für LYM3 im PGN-Pellet zu beobachten. Dieses Signal verstärkte sich nach weiteren 10 min Inkubation (Abbildung 4.13 A). Um unspezifische Assoziationen des rekombinanten His<sub>6</sub>-Fusionsproteins mit PGN auszuschließen, wurde diese Bindestudie auch mit einer rekombinanten mit His<sub>6</sub> markierten *A. thaliana* Uricase als Kontrolle durchgeführt. Es konnte keine Assoziation dieser Uricase mit PGN beobachtet werden. (Abbildung 4.13 A). Bereits nach 1 min war das LYM3-Fusionsprotein im PGN-Pellet nachweisbar. Die *in vitro* Assoziation von LYM3 und PGN findet dabei in einem vergleichbaren Zeitfenster wie die *in vitro* Interaktion von CERK1 und Chitin statt (Iizasa *et al.*, 2010). Die Assoziation von LYM3 mit PGN tritt innerhalb von Minuten ein.

Um festzustellen, ob die Interaktion reversibel ist, wurde 1  $\mu\text{g}$  aufgereinigtes His<sub>6</sub>-Fusionsprotein mit unlöslichem PGN inkubiert. Für Dissoziationsstudien wurde dieser PGN-LYM3 Komplex in einem Überschuss an Puffer resuspendiert und dann unterschiedlich lang inkubiert und das PGN-Pellet analysiert. Schon 1 min nach Resuspension des Komplexes war das LYM3-Signal schwächer als vor der Resuspension. 2 min nach Resuspension konnte LYM3 nur noch schwach im PGN Pellet nachgewiesen werden (Abbildung 4.13 B). Die *in vitro* Interaktion von LYM3 und PGN ist also reversibel.

In einigen Fällen konnten LysM-Domänen als die tatsächlichen Bindemodule GlcNAc-haltiger Glycanstrukturen identifiziert werden. So konnte in NMR-Studien gezeigt werden, dass die LysM-Domäne einer Chitinase eines Farns Chitinoligomere bindet (Ohnuma *et al.*, 2008) und dass die LysM-Domäne von CERK1 Chitin bindet (Iizasa *et al.* 2010; Petutschnig *et al.*, 2010). Andere Studien stellen die Interaktion von LysM-Domänen mit GlcNAc-Glycanen *in silico* dar (Mulder *et al.*, 2006).

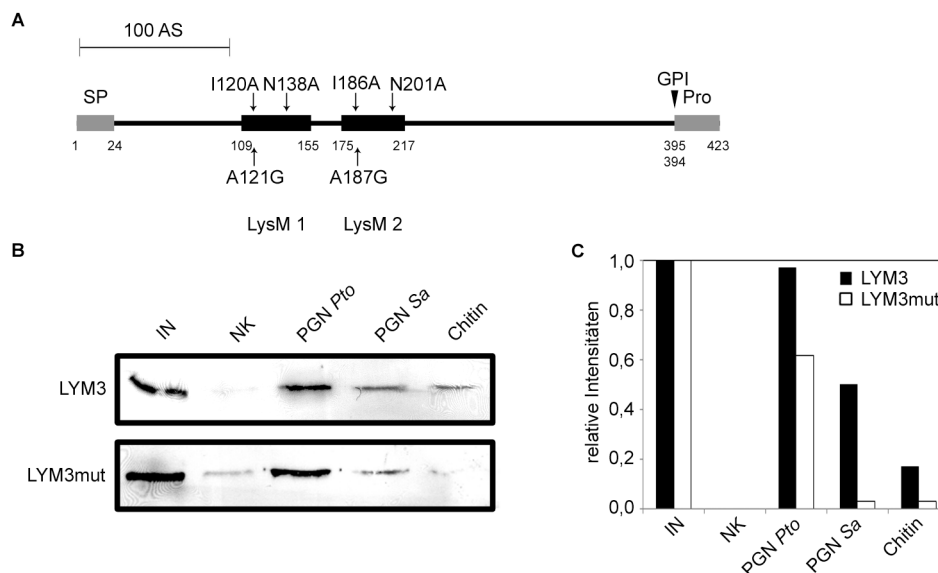


## Ergebnisse

Um zu prüfen, ob in LYM3 die LysM-Domäne für die Bindung von PGN verantwortlich ist, wurden Punktmutationen in beide Lysin-Motive eingefügt. Basierend auf Sequenzvergleichen von Lysin-Motiven verschiedener Proteine aus verschiedener Organismen (1.6 und Buist *et al.*, 2008) und auf den Ergebnissen der NMR-spektroskopischen Untersuchungen von Bindungsereignissen einer isolierten LysM-Domäne einer Chitinase aus *Pteris ryukyuensis* mit Chitooligosacchariden (Ohnuma *et al.*, 2008) wurden in jedem der beiden Lysin-Motive je drei Aminosäuren ausgewählt und mutiert (Abbildung 4.14 A).

LYM3 und das mutierte LYM3 wurden als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Die aufgereinigten Fusionsproteine wurden zu Bindestudien mit 50 µg PGN aus *Pto* DC3000, *Sa* und mit 50 µg Chitin eingesetzt.

Die unlöslichen Substrate wurden durch Immunoblots mit His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörpern auf LYM3 oder LYM3mut untersucht (Abbildung 4.14 B).



**Abbildung 4.14. Punktmutationen der Lysin-Motive verringern die Affinität von LYM3 zu PGN.**

(A) Schema des LYM3 Aufbaus. Gezeigt ist das Signalpeptid (SP), die beiden Lysin-Motive (LysM 1 und 2), die Bindestelle des Glycosylphosphatidylankers (GPI) und das C-terminale Propeptid (Pro). In beide Lysin-Motive wurden die gezeigten Punktmutationen eingefügt (Pfeile). (B) 1 µg Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgereinigtes LYM3 oder LYM3mut His<sub>6</sub>-Fusionsprotein wurde mit 50 µg PGN aus *Pto*, *Sa* oder Chitin 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation wurden die Glyco-Konjugatpellets durch SDS-PAGE und Immunoblot mit αHis<sub>6</sub>-Antikörpern analysiert. Zum Vergleich wurde auch die Menge an eingesetzten Fusionsprotein aufgetragen (IN), sowie das Bindungsexperiment ohne unlösliches Substrat als Negativkontrolle durchgeführt (NK). (C) Die Signalintensitäten des Immunoblots aus (B) wurden mit Hilfe von ImageJ bestimmt. Es wurde jeweils die Signalintensität der korrespondierenden Negativkontrolle abgezogen. Die relativen Intensitäten sind jeweils auf die Intensität des entsprechenden Inputs bezogen.

Um die Bindungsereignisse besser vergleichen zu können, wurden die Signalstärken des Immunoblots mit ImageJ bestimmt, die Signalstärke der korrespondierenden Kontrolle abgezogen und der Wert relativ zu dem Signal des eingesetzten Proteins aufgetragen. Das Signal für LYM3 erreichte bei den PGNs aus *Pto* und *Sa* hohe Intensitäten. Bei Chitin wurde ein geringeres Signal beobachtet. LYM3mut

## Ergebnisse

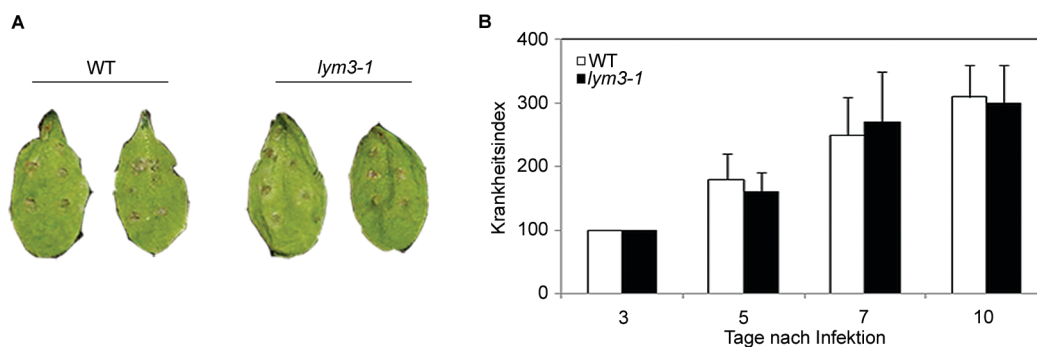
konnte das PGN aus *Pto* schlechter binden. Besonders deutlich wurde die Verringerung des Signals aber bei PGN aus *Sa*, was dem der Negativkontrolle entsprach. Auch das Bindungssignal von Chitin war nicht mehr über der Negativkontrolle (Abbildung 4.14 B und C).

Die Punktmutationen der Lysin-Motive von LYM3 konnten also die Interaktion mit PGN aus *Pto* DC3000 deutlich verringern. Bei PGN aus *Sa* konnte keine Interaktion mehr nachgewiesen werden. Damit scheinen die Lysin-Motive an der Bindung von PGN zumindest beteiligt zu sein.

Zukünftige Experimente mit weiteren Mutationskonstrukten könnten dazu beitragen, einzelne für die Bindung essentielle Aminosäuren zu identifizieren. Deletionen ganzer Lysin-Motive können Einblicke in den Beitrag und die Bedeutung der einzelnen Motive für die Spezifität und Affinität zu PGN liefern. Die hier dargestellten LYM3-Konstrukte sollten in Zukunft auch zur Transformation der *A. thaliana lym3-1* T-DNA-Insertionslinie eingesetzt werden. Die Effekte der dargestellten Mutationen auf die immunogenen Eigenschaften von PGN im Kontext mit den komplementären Bindestudien können wichtige Einblicke in die Funktionsweise der PGN-Bindeproteine liefern.

#### 4.8 LYM3 spielt keine Rolle bei der Immunität von *Arabidopsis thaliana* gegen Pilzinfektionen

LYM3 besitzt in *in vitro* Experimenten eine Präferenz für PGN und bindet Chitin nur schwach (4.7). CEBiP in Reis ist strukturell homolog zu LYM3 und wurde als essentiell für die Chitinperzeption beschrieben (Kaku *et al.*, 2006) und spielt eine Rolle in der Resistenz gegen Infektionen durch Pilze (Kishimoto *et al.*, 2010).



**Abbildung 4.15. *lym3* Pflanzen zeigen keine veränderte Resistenz gegen Infektionen durch *Alternaria brassicicola*.**

5 Wochen alte Wildtyp *A. thaliana* (Col-0) und *lym3-1* Pflanzen wurden mit Tropfen, welche  $10^6$  Sporen/ml *Alternaria brassicicola* enthielten inokuliert. (A) Infektionssymptome von je zwei repräsentativen Blättern wurden 10 Tage nach Infektion festgehalten. (B) Infizierte Blätter wurden 3, 5, 7 und 10 Tage nach der Infektion in Symptomkategorien eingeteilt. Es wurden vergleichbare Ergebnisse in drei unabhängigen Experimenten beobachtet. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte mit Standardabweichungen ( $n \geq 12$ ).

Es sollte deshalb untersucht werden, ob LYM3 in *A. thaliana* zur Resistenz gegen Pilze beiträgt.

*lym3-1 A. thaliana* Pflanzen wurden mit *Alternaria brassicicola* infiziert und die Infektionssymptome über einen Zeitraum von 10 Tagen bonitiert und mit den Symptomen von infizierten WT-Pflanzen verglichen. Es konnte kein Unterschied der Infektionssymptome zwischen *lym3-1* und WT-Pflanzen festgestellt werden (Abbildung 4.15).

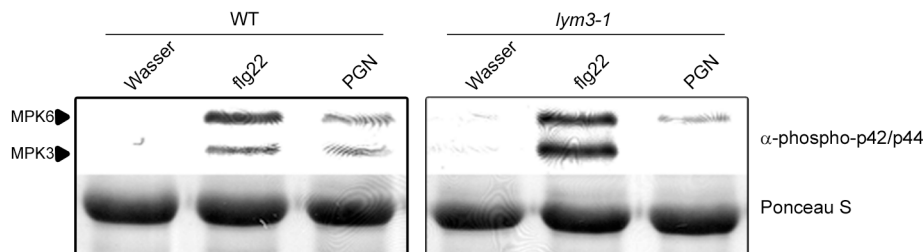
Die Abwesenheit von LYM3 hat also keinen Einfluss auf die Resistenz von *A. thaliana* gegen *A. brassicicola*.

#### 4.9 LYM3 wird für die posttranslationale Aktivierung der *Arabidopsis* MAP-Kinasen 3 und 6 nach PGN Behandlung benötigt

LYM3 bindet PGN spezifisch (4.7). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob LYM3 auch zur Perzeption von PGN in *A. thaliana* beiträgt. Zuerst wurde dazu die posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen (MPKs) betrachtet. Dies ist eine schnelle Reaktion auf die Behandlung mit MAMPs wie PGN (Gust *et al.*, 2007).

## Ergebnisse

Die Aktivierung der MPK3 und MPK6 in WT und *lym3-1* Pflanzen wurde 15 min nach Infiltration von 1  $\mu$ M flg22 und 100  $\mu$ g/ml PGN durch SDS-PAGE von Proteinextrakten dieser Pflanzen untersucht. Durch einen Immunoblot wurden spezifisch die aktivierten MPK3 und MPK6 detektiert.



**Abbildung 4.16. A. thaliana lym3 Pflanzen zeigen eine verringerte posttranslationale Aktivierung der MPKs.** Blätter von 5 Wochen alten *Arabidopsis* Wildtyp (Col-0) und *lym3-1* Pflanzen wurden mit Wasser, 1  $\mu$ M flg22 und 100  $\mu$ g/ml PGN aus *Pto* DC3000 infiltriert. Nach 15 min wurden Proteinextrakte dieser Blätter gewonnen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit phospho-p44/p42 Antikörpern, welche spezifisch für die aktivierte MPK6 und 3 sind, analysiert. Als Ladekontrolle ist die Ponceau-Färbung der Membran nach dem Blot gezeigt.

Die Behandlung mit flg22 führte in WT und *lym3-1* Pflanzen zu vergleichbar aktivierten MPKs. Die Behandlung mit PGN aktivierte in WT Pflanzen die MPK3 und MPK6, während in *lym3-1* Pflanzen nur eine schwächer aktivierte MPK6 nachgewiesen werden konnte. Die MPK3 wurde nicht aktiviert (Abbildung 4.16).

Schnelle, durch MAMPs vermittelte Antworten sind also in *lym3-1* Pflanzen PGN-spezifisch reduziert.

### 4.10 LYM3, LYM1 und CERK1 werden für die Transkriptomadaption in *A. thaliana* nach PGN Behandlung benötigt

Es wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von *A. thaliana* mit PGN zu einer massiven Transkriptomantwort führt (4.2). Es sollte nun untersucht werden, ob Mitglieder der LysM-Proteinfamilie in *A. thaliana* diese Antwort vermitteln. Ein erster Hinweis hierauf wurde durch die Notwendigkeit von LYM3 für die PGN-spezifische Aktivierung von MPKs erhalten (4.9 und Abbildung 4.16). Da LYM3 und das strukturell verwandte LYM1 PGN binden konnten (4.7 und Abbildung 4.11), sollte untersucht werden, ob sie auch einen Anteil an der Transkriptomantwort nach PGN-Behandlung besitzen.

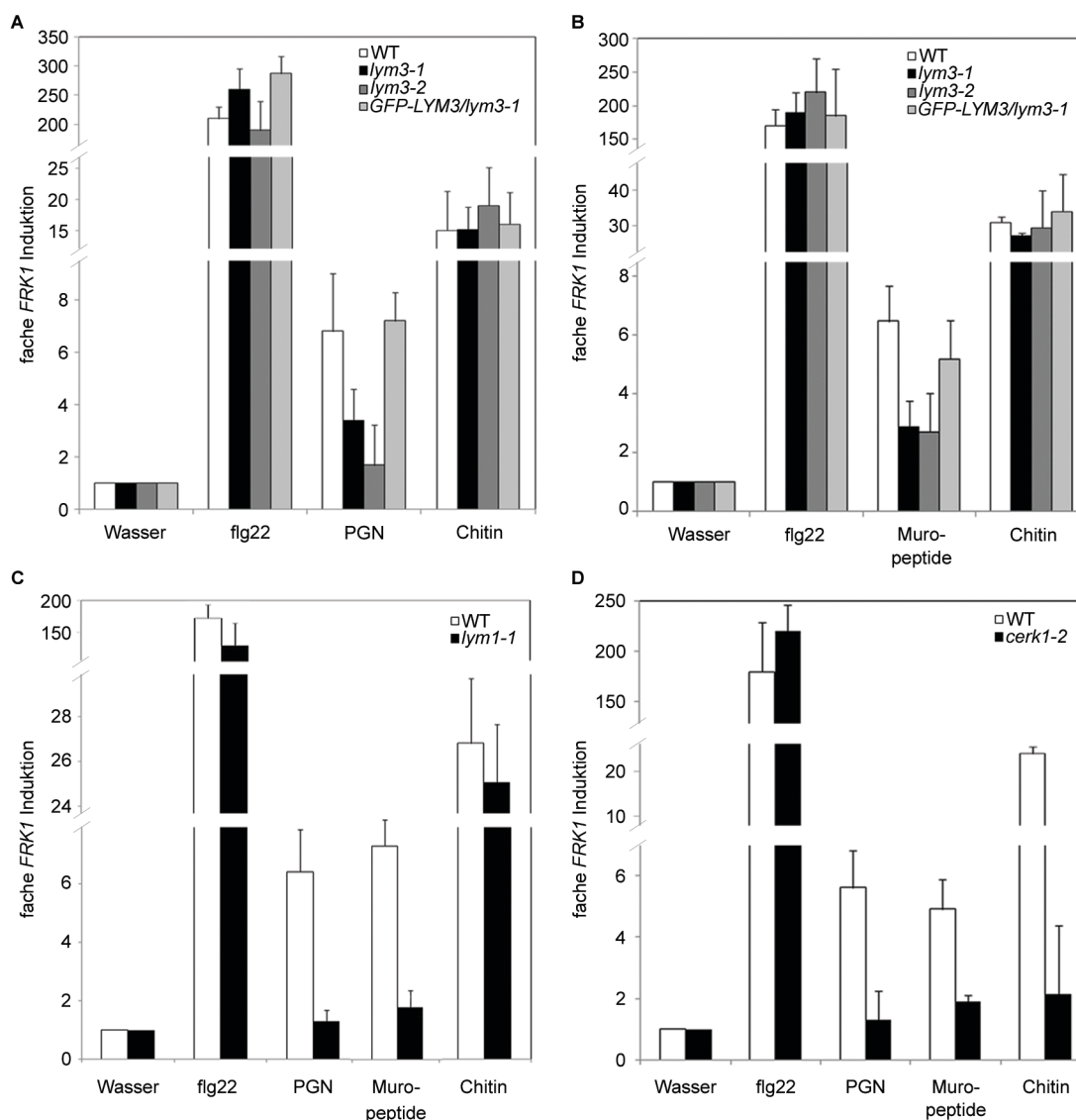
Da LYM3 und LYM1 wahrscheinlich durch GPI-Anker mit der Cytoplasmamembran assoziiert sind, könnten sie Signale nicht in die Zelle transduzieren (siehe 1.7.3 und 4.6). Die LysM-RLK CERK1 wurde bereits als notwendig für die pflanzliche Immunität gegen bakterielle Infektionen beschrieben (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009 und 4.12). CERK1 konnte in *in vitro* Studien zwar kein PGN binden, könnte aber eine Funktion in der Signaltransduktion der PGN-Perzeption besitzen. Deswegen wurde es zusätzlich in diese Untersuchungen eingeschlossen.

## Ergebnisse

In einem ersten Experiment wurde die Transkriptmenge des Abwehrgens FRK1 6 h nach Elicitorbehandlung durch qRT-PCR bestimmt.

*lym3-1*, *lym3-2*, *GFP-LYM3/lym3-1* und *lym1-1* Keimlinge zeigten nach Chitin und flg22 Behandlung *FRK1*-Expressionsniveaus, die denen der WT Keimlinge vergleichbar waren (Abbildung 4.17 A, B und C). Die Induktion der *FRK1*-Transkription in *lym3-1*, *lym3-2* und *lym1-1* Keimlingen nach PGN- oder Muropeptidbehandlung war im Vergleich zu WT Keimlingen deutlich verringert (Abbildung 4.17 A, B und C). Die Muropeptide wurden durch Mutanolysinverdau komplexem PGNs aus *Xcc* erhalten und aufgereinigt (Marie-Anne Newman, Universität Kopenhagen). Durch Transformation der *lym3-1* Pflanzen mit GFP-LYM3 kehrte das *FRK1*-Transkriptniveau nach PGN-Behandlung wieder auf das der WT Pflanzen zurück (Abbildung 4.17 A und B). *cerk1-2*-Keimlinge zeigten nur nach flg22 Behandlung eine mit dem WT vergleichbare *FRK1*-Antwort. Nach Chitin-, PGN- und Muropeptidbehandlung zeigten sie eine deutlich geringere *FRK1* Responsivität als WT Pflanzen. Die verringerte Antwort nach Chitinbehandlung lässt sich mit der Rolle von CERK1 als Chitinrezeptor in *A. thaliana* erklären (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.17.** Die Induktion der *FRK1* Expression nach PGN-Behandlung ist reduziert in *lym3*, *lym1* und *cerk1-2* Pflanzen.

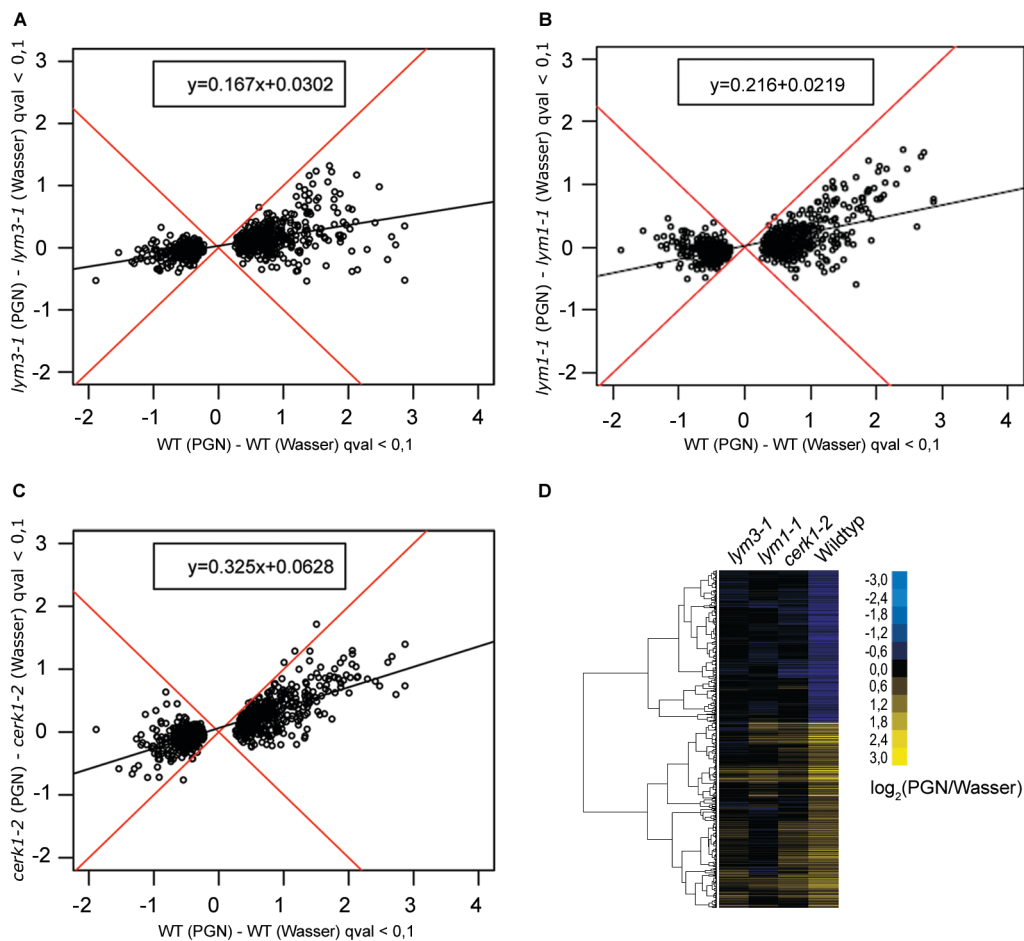
Die Expression von *FRK1* in 8 Tagen alten *A. thaliana* Keimlingen wurde 6 h nach Behandlung mit 1  $\mu$ M flg22, 100  $\mu$ g/ml Chitin und 100  $\mu$ g/ml *Xcc* PGN oder 100  $\mu$ g/ml *Xcc* Muropeptiden durch qRT-PCR bestimmt. Dabei diente *EF1a* Transkript zur Normalisierung, die entsprechenden Wasserkontrollen wurden auf 1 gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Parallelen mit 10 bis 15 Keimlingen. (A und B) Untersuchungen mit WT, *lym3-1*, *lym3-2* und *GFP-LYM3/lym3-1* Keimlingen. (C) Untersuchungen mit WT und *lym1-1* Keimlingen. (D) Untersuchungen mit WT und *cerk1-2* Keimlingen.

Es sollte weiterhin gezeigt werden, inwiefern die verringerte transkriptionelle Antwort nach PGN-Behandlung in *lym3*, *lym1* und *cerk1* Pflanzen ein globales oder ein nur auf *FRK1* bezogener Effekt ist.

Um den Einfluss der Abwesenheit von *LYM3*, *LYM1* und *CERK1* auf das gesamte *A. thaliana* Transkriptom nach PGN Behandlung zu untersuchen, wurden Microarrayexperimente durchgeführt. Dabei wurden Transkriptspiegel von Wildtyppflanzen (Col-0), *lym3-1*-, *lym1-1*- und *cerk1-2*-Pflanzen 6 h nach PGN-Behandlung untersucht, die Rohdaten normalisiert und mit den Daten aus Kontrollbehandlungen verglichen. Dabei zeigte sich, dass 750 Gene in PGN behandelten WT Pflanzen

## Ergebnisse

differenziell exprimiert wurden. In 4.2 wurde die Transkriptomreaktion der WT-Pflanzen bereits genauer untersucht (siehe auch Abbildung 4.3 und Tabelle 4.1).



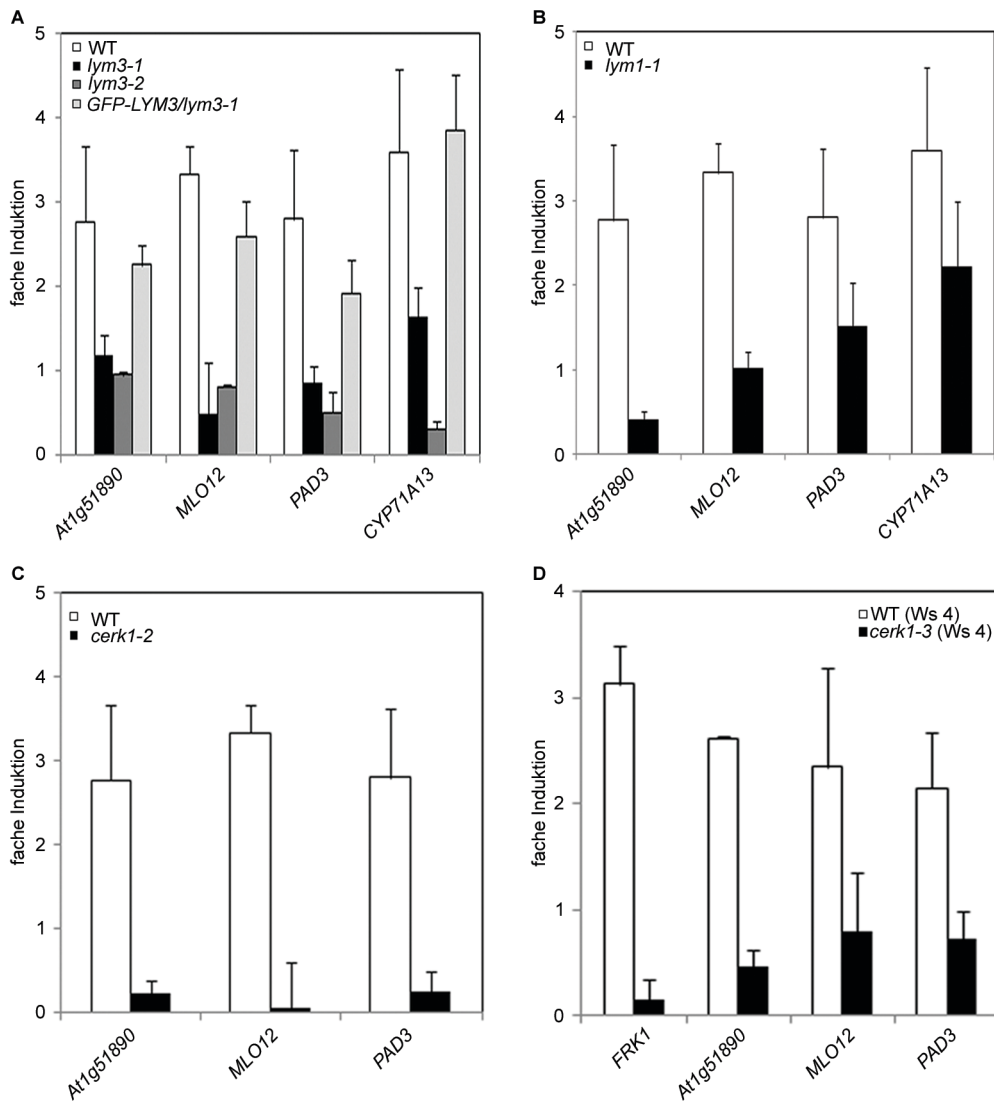
**Abbildung 4.18. LYM3, LYM1 und CERK1 sind für die *A. thaliana* PGN-Sensitivität notwendig.**

Analyse des gesamten *A. thaliana* Transkriptoms nach PGN-Behandlung von WT und *lym3-1* (A), *lym1-1* (B) oder *cerk1-2* (C) Pflanzen. Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden mit Wasser oder 100 µg/ml *Xcc* PGN infiltriert. Nach 6 h wurde RNA isoliert und für Microarrayanalysen eingesetzt. 750 Gene waren im Wildtyp signifikant in ihrer Expression verändert (Storey's  $q < 0,1$ ). Die transformierten  $\log_2$ -Mittelwerte der Unterschiede der Genexpression zwischen PGN- und Wasserbehandlung der gezeigten Linien wurden gegen die entsprechenden Werte des WT's aufgetragen (Datenpunkte auf der aufsteigenden roten Diagonalen würden ein identisches Expressionsniveau in Wildtyp- und der betrachteten T-DNA Insertionslinie widerspiegeln). Sowohl in *lym3-1*, wie auch in *lym1-1* und *cerk1-2* wurde also eine verringerte Responsivität dieser Gene nach PGN-Behandlung beobachtet. (D) Die in WT Pflanzen nach PGN Behandlung differenziell exprimierten Gene wurden nach Eisen (1998) einer Clusteranalyse unterzogen und entsprechend ihrer  $\log_2$  Expressionswerte in eine Heatmap übertragen und ihren Expressionswerten in *lym3-1*, *lym1-1* und *cerk1-2* Pflanzen gegenübergestellt.

Die Responsivität aller 750 differenziell exprimierten Gene war in *lym3-1*, *lym1-1* und *cerk1-2* Pflanzen deutlich reprimiert (Abbildung 4.18 A bis D). Allerdings war die Antwort in keiner der untersuchten T-DNA-Insertionslinien vollständig aufgehoben.

Die Transkriptomuntersuchung wurde durch gezielte Analyse der Expression ausgewählter Gene durch qRT-PCR in einem unabhängigen Experiment bestätigt. Dazu wurden Gene ausgewählt, deren Expression in WT Pflanzen nach PGN-Behandlung in der Transkriptomuntersuchung induziert war (vergleiche Tabelle 4.1).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.19. Bestätigung des Microarrayexperiments durch qRT-PCR-Analyse der Expression ausgesuchter Gene.**

Die Expression verschiedener Gene in 8 Tagen alten *A. thaliana* Keimlingen wurde 6 h nach Behandlung mit 100 µg/ml *Xcc* PGN durch qRT-PCR bestimmt. Dabei diente *EF1a* Transkript zur Normalisierung, die entsprechenden Wasserkontrollen wurden auf 1 gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Parallelen mit 10 bis 15 Keimlingen. Diese Experimente wurden unabhängig von den Microarrayexperimenten durchgeführt. **(A)** Untersuchung der Expressionsniveaus in WT, *lym3-1*, *lym3-2* und *GFP-LYM3/lym3-1* Keimlingen. **(B)** Untersuchung der Expressionsniveaus in WT und *lym1-1* Keimlingen. **(C)** Untersuchung der Expressionsniveaus in WT und *cerk1-2* Keimlingen. **(D)** Untersuchung der Expressionsniveaus in WT (Ws-4) und *cerk1-3* Keimlingen.

6 h nach PGN-Behandlung wurde in Wildtyppflanzen die Expression von *At1g51890*, *MLO12*, *PAD3* und *CYP71A13* induziert. In *lym3-1* und *lym3-2* und *lym1-1* Pflanzen war die Expression dieser Gene deutlich reduziert (Abbildung 4.19 A und B). *GFP-LYM3/lym3-1* Pflanzen zeigten eine ähnliche Expression dieser Gene, wie sie in WT-Pflanzen beobachtet wurde (Abbildung 4.19 A). Neben *cerk1-2*-Pflanzen wurden auch *cerk1-3*-Pflanzen getestet. Dies ist eine unabhängige *cerk1*-T-DNA Insertionslinie im genetischen Ws-4-Hintergrund. Beide *cerk1*-Linien zeigten im Vergleich zu ihrem



korrespondierenden WT eine deutliche reduzierte Expression der ausgewählten Gene nach PGN-Behandlung (Abbildung 4.19 C und D).

Die Transkriptomadaption nach PGN Behandlung in *A. thaliana* findet also abhängig von LYM3, LYM1 und CERK1 statt. Die Abwesenheit dieser Proteine führt zu einer drastischen Verringerung der Sensitivität von *A. thaliana* gegenüber hochaufgereinigtem PGN.

Die Beteiligung von CERK1 an einem Perzeptionsapparat, der auch die PGN-Bindeproteine Proteine LYM1 und LYM3 einschließt, lässt einen Rezeptorkomplex dieser drei Proteine vermuten, in dem LYM1 und LYM3 PGN-Fragmente rekrutieren und CERK1 für die Signaltransduktion verantwortlich ist. LYM1 und LYM3 scheinen dabei teilweise redundant zu agieren, da weder in *lym1*- noch in *lym3*-Pflanzen die Transkriptomantwort nach PGN-Behandlung komplett aufgehoben war (Abbildung 4.18 A und B). Ebenso scheint es neben CERK1 noch eine weitere Komponente zu geben, da auch *cerk1*-Pflanzen noch eine Restsensitivität gegenüber PGN besaßen (Abbildung 4.18 C).

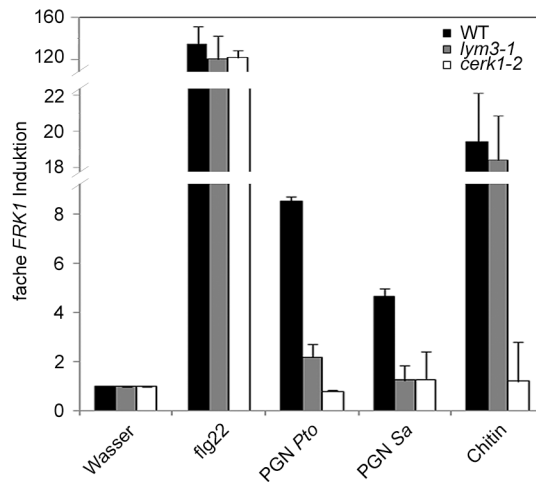
### **4.11 Die LYM3/CERK1-abhängige PGN-Perzeption erkennt DAP- und Lys-Typ PGN**

PGN aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien löst typische Immunreaktionen in *A. thaliana* aus (Gust *et al.*, 2007; Erbs *et al.*, 2008 und Abbildung 4.2). Aus tierischen Systemen sind PGN-Perzeptionssysteme bekannt, die zwischen DAP- und Lys-Typ-PGN unterscheiden (Dziarski und Gupta, 2005 und 1.5). In 4.10 wurde deutlich, dass das LYM3/CERK1-System für die Perzeption von Gram-negativem aus *Xcc* benötigt wird.

Es soll deswegen untersucht werden, ob die Erkennung von Gram-positiven PGN auch abhängig von LYM3 und CERK1 ist. Außerdem wurde PGN aus einem weiteren Gram-negativen Pflanzenpathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto*) in die Studie mit einbezogen.

*A. thaliana lym3-1*- und *cerk1-2*-Keimlinge zeigten 6 h nach Behandlung mit sowohl PGN aus *Pto* wie auch mit PGN aus *S. aureus* eine deutlich verringerte Induktion der Expression von *FRK1* im Vergleich zu WT-Keimlingen. WT- und *lym3-1*-Keimlinge waren responsiv gegenüber Chitin und flg22, während *cerk1-2* nur auf die flg22-Behandlung mit einer Induktion der *FRK1* Expression reagierte (Abbildung 4.20).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.20. LYM3/CERK1 sind für die Erkennung von DAP- und Lys-Typ PGN notwendig.**

8 Tage alte Wildtyp (Col-0), *lym3-1* und *cerk1-2* *A. thaliana* Keimlinge wurden mit 1  $\mu$ M flg22, 100  $\mu$ g/ml *Pto* PGN, 100  $\mu$ g/ml *Sa* PGN und 100  $\mu$ g/ml Chitin behandelt. Nach 6 h wurde die relative Expression von *FRK1* mittels qRT-PCR bestimmt. Dabei diente *EF1a* Transkript zur Normalisierung, die entsprechenden Wasserkontrollen wurden auf 1 gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Parallelen mit 10 bis 15 Keimlingen.

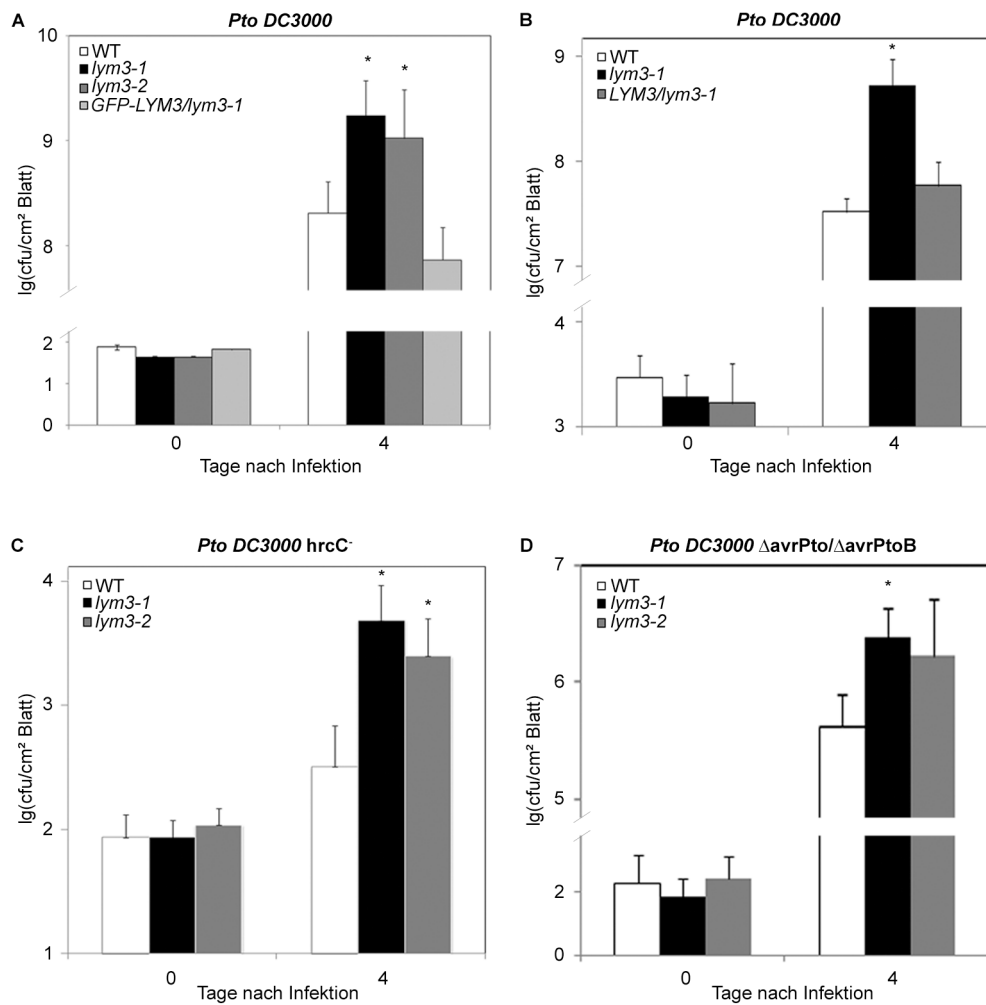
*A. thaliana lym3-1* und *cerk1-2* Pflanzen sind also in der Perzeption von Gram-positiven und Gram-negativen PGN gleichermaßen beeinträchtigt. Das *A. thaliana* PGN Perzeptionssystem differenziert nicht zwischen Gram-negativen (DAP-Typ) und Gram-positiven (Lys-Typ) PGN.

### 4.12 LYM3 und CERK1 werden für die Resistenz gegen bakterielle Infektionen benötigt

Da LYM3 an der Erkennung von bakteriellem PGN beteiligt ist, wurde untersucht, ob LYM3 auch eine Rolle in der Immunität von *A. thaliana* gegen Infektionen mit pathogenen Bakterien spielt.

Hierzu wurden Infektionsstudien mit den T-DNA-Insertionslinien *lym3-1*, *lym3-2* und *GFP-LYM3/lym3-1* Pflanzen durchgeführt. Diese wurden zusammen mit WT *A. thaliana* Pflanzen (Col-0) durch Blattinfiltration mit dem virulenten Bakterium *Pto* DC3000 infiziert. Nach vier Tagen zeigte sich in den *lym3-1* und *lym3-2* Pflanzen ein signifikant erhöhtes Bakterienwachstum im Vergleich zu den Wildtyppflanzen. *GFP-LYM3/lym3-1* Pflanzen wiesen ein mit dem Wildtyp vergleichbares bakterielles Wachstum auf (Abbildung 4.21 A). Das erhöhte bakterielle Wachstum in *lym3-1* Pflanzen konnte außerdem durch Komplementation von *lym3-1* durch ein 2,5 kb umfassendes genomisches *LYM3* Konstrukt auf ein mit dem WT vergleichbares Niveau gesenkt werden (Abbildung 4.21 B). Die erhöhte Anfälligkeit von *lym3-1* und *lym3-2* konnte auch durch Infektionen mit dem nichtvirulenten Stamm *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> und dem hypovirulenten Stamm *Pto* DC3000  $\Delta$ *avrPto/avrPtoB* bestätigt werden (Abbildung 4.21 C und D).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.21. LYM3 wird für die Resistenz gegen *Pto DC3000* Infektionen benötigt.**

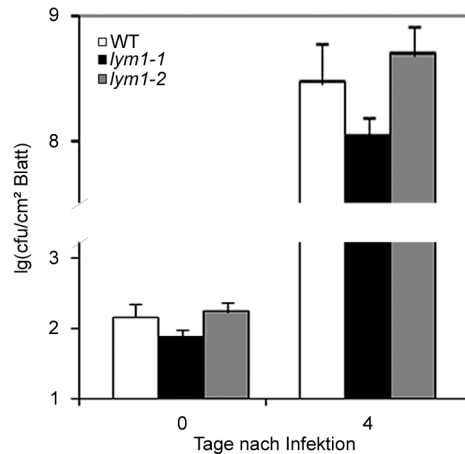
Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden mit  $10^4$  koloniebildenden Einheiten  $\text{ml}^{-1}$  (cfu/ml) verschiedener *Pto DC3000* Stämme infiziert und das Wachstum der Bakterien nach 0 und 4 Tagen bestimmt. **(A)** Wildtyp, *lym3-1*, *lym3-2* und GFP-LYM3/*lym3-1* Pflanzen wurden mit *Pto DC3000* infiziert. **(B)** Wildtyp, *lym3-1* und LYM3/*lym3-1* Pflanzen wurden mit *Pto DC3000* infiziert. **(C)** Wildtyp, *lym3-1* und *lym3-2* Pflanzen wurden mit *Pto DC3000 hrcC* oder **(D)** *Pto DC3000 ΔavrPto/ΔavrPtoB* infiziert. Die statistische Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden WT Proben wurde durch \* gekennzeichnet ( $p \leq 0,05$ , Student t-Test). Es wird jeweils ein repräsentatives Experiment aus mindestens 10 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Das Fehlen von LYM3 führt zu einer erhöhten Anfälligkeit von *A. thaliana* gegen *Pto DC3000*. LYM3 wird also für eine normale Resistenz gegen *Pto DC3000* benötigt.

Da die Abwesenheit von LYM1 bei der Perzeption von PGN einen vergleichbaren Effekt wie die Abwesenheit von LYM3 hatte (4.10, Abbildung 4.17 C und Abbildung 4.18 B), wurde auch untersucht, ob LYM1 einen Beitrag zur Resistenz von *A. thaliana* gegen *Pto DC3000* leistet.

Es wurden die T-DNA-Insertionslinien *lym1-1* und *lym1-2* verwendet, die beide kein vollständiges LYM1-Transkript mehr aufweisen. Das Wachstum von *Pto DC3000* zeigte sich in *lym1-1* und *lym1-2* Pflanzen nicht verändert im Vergleich zu WT Pflanzen (Abbildung 4.22).

## Ergebnisse

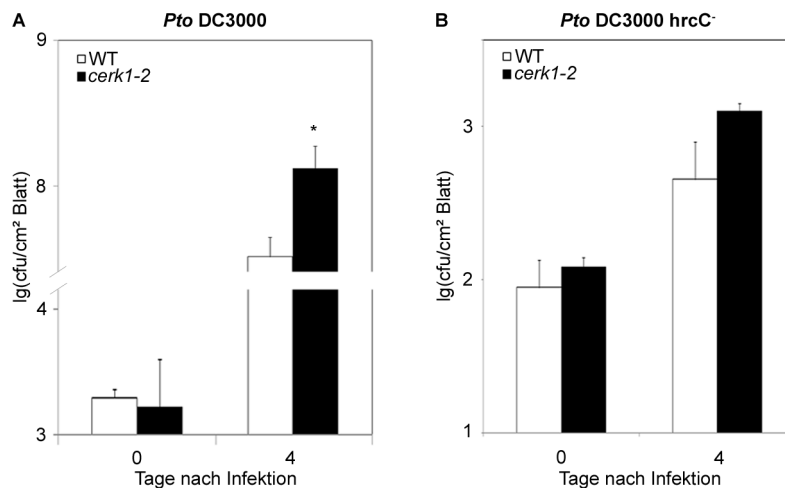


**Abbildung 4.22. LYM1 wird nicht für eine normale Resistenz gegen *Pto* DC3000 Infektionen benötigt.**

Blätter 5 Wochen alter WT, *lym1-1* und *lym1-2* Pflanzen wurden mit  $10^4$  koloniebildenden Einheiten  $\text{ml}^{-1}$  (cfu/ml) *Pto* DC3000 infiziert und das Wachstum der Bakterien nach 0 und 4 Tagen bestimmt.

Eine mögliche funktionelle Redundanz könnte dafür verantwortlich sein, dass in *lym1*-Pflanzen keine veränderte Resistenz gegen bakterielle Infektionen zu beobachten ist (siehe auch 4.10).

Für *cerk1* ist bereits ein bakterieller Wachstumsphänotyp beschrieben worden. *cerk1-2* und *cerk1-3* sind demnach anfälliger für Infektionen durch *Pto* DC3000 und *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> als ihr korrespondierender WT (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009).



**Abbildung 4.23. CERK1 wird für eine normale Resistenz gegen *Pto* DC3000 Infektionen benötigt.**

Blätter 5 Wochen alter WT und *cerk1-2* Pflanzen wurden mit  $10^4$  koloniebildenden Einheiten  $\text{ml}^{-1}$  (cfu/ml) *Pto* DC3000 (A) oder *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> (B) infiziert und das Wachstum der Bakterien nach 0 und 4 Tagen bestimmt. Die statistische Signifikanz im Vergleich zu den entsprechenden WT Proben wurde durch \* gekennzeichnet ( $p \leq 0,05$ , Student t-Test). Es wird jeweils ein repräsentatives Experiment aus mindestens 10 unabhängigen Experimenten gezeigt.

Dies konnte in Infektionsstudien mit *cerk1-2* für die Infektionen durch *Pto* DC3000 und *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> bestätigt werden (Abbildung 4.23 A und B).

Zusammenfassend werden also LYM3 und CERK1 für eine normale Resistenz von *A. thaliana* durch Pto DC3000 benötigt. Die Abwesenheit von LYM1 scheint keinen Einfluss auf die Resistenz zu haben.

### 4.13 Interaktionsstudien

LYM1 und LYM3 sind PGN-Bindeproteine und für die PGN-Perzeption notwendig (4.7, 4.9 und 4.10). LYM3 ist zudem für eine normale Resistenz gegen Pto DC3000 in *A. thaliana* nötig. Aufgrund fehlender Transmembrandomänen ist es aber nicht möglich, dass diese Proteine selbst Signale in den intrazellulären Raum transduzieren. Die membranständige RLK CERK1 ist in der Perzeption von PGN involviert, bindet selbst PGN aber nur sehr schlecht (4.7 und 4.10). Da in Reis gezeigt werden konnte, dass OsCERK1 mit CEBiP eine durch Chitin induzierbare Interaktion eingehen kann (Shimizu *et al.*, 2010) muss auch hier gefragt werden, ob LYM1 und LYM3 mit CERK1 interagieren können.

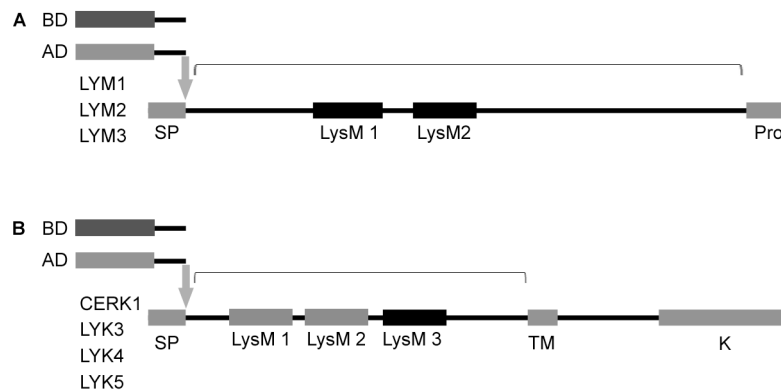
Eine derartige Interaktion würde auf einen Rezeptorkomplex hindeuten, in welchem LYM3 und LYM1 in zu determinierender Stöchiometrie als Bindeproteine PGN bzw. Fragmente, welche aus komplexen PGN hervorgegangen sind, rekrutieren und die Signaltransduktion mit Hilfe von CERK1 stattfindet.

In dieser Arbeit wurde deswegen die Fähigkeit der Proteine LYM1 und LYM3 mit CERK1 zu interagieren untersucht. Um Hinweise auf Spezifitäten oder weitere Partner in möglichen Rezeptorkomplexen zu erhalten, wurde die Studie auf LYM2 und die LysM RLKs LYK3, LYK4 und LYK5 ausgedehnt. Des Weiteren wurde die Fähigkeit von LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1 untersucht, Homooligomere zu bilden.

#### 4.13.1 Interaktionsstudien mit dem *Yeast Two-Hybrid System*

Für Interaktionsstudien mit Hilfe des auf dem *S. cerevisiae* Transkriptionsfaktor GAL4 basierenden *Yeast Two-Hybrid System* wurden Konstrukte zur Expression in *S. cerevisiae* AH109 angefertigt. Diese umfassen die Sequenzen der reifen LYM1-, LYM2- oder LYM3-Proteine, also ohne Signalpeptid und ohne C-terminales Propeptid. Sie wurden als Fusionen entweder der GAL4-DNA-Binde- oder GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert (Abbildung 4.24 A). Außerdem wurden entsprechende Konstrukte der extrazellulären Domänen von CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5 ohne Signalpeptid angefertigt (Abbildung 4.24 B).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.24. Fusionskonstrukte für Yeast Two-Hybrid Untersuchungen.**

Schema der Fusionskonstrukte für *Yeast Two-Hybrid* Studien. LYM1, LYM2, LYM3 (A) und CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5 (B) wurden ohne Signalpeptid (SP) mit der DNA-Bindedomäne (BD) oder der Aktivierungsdomäne (AD) des *S. cerevisiae* GAL4-Transkriptionsfaktor fusioniert (Fusionsstelle markiert mit Pfeil). Die Konstrukte mit LYM1, LYM2 und LYM3 endeten vor dem Propeptid (Pro), die Konstrukte für CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5 endeten vor der Transmembrandomäne (TM, LysM - Lysin-Motiv, K - Kinasedomäne).

In der vorliegenden Studie exprimierten transformierte *S. cerevisiae* AH109 Zellen die entsprechenden zu untersuchenden Kombinationen aus jeweils zwei zu untersuchenden Proteinen. Dabei war das eine mit der GAL4-DNA-Binde- und das andere mit der GAL4-Aktivierungsdomäne fusioniert. Im Falle einer Interaktion der beiden zu untersuchenden Proteine gelangten die GAL4-DNA-Binde- und die Aktivierungsdomäne in räumliche Nähe und rekonstituierten den funktionellen GAL4-Transkriptionsfaktor. Der *S. cerevisiae* AH109 Hintergrund exprimiert keinen endogenen funktionellen GAL4-Transkriptionsfaktor.

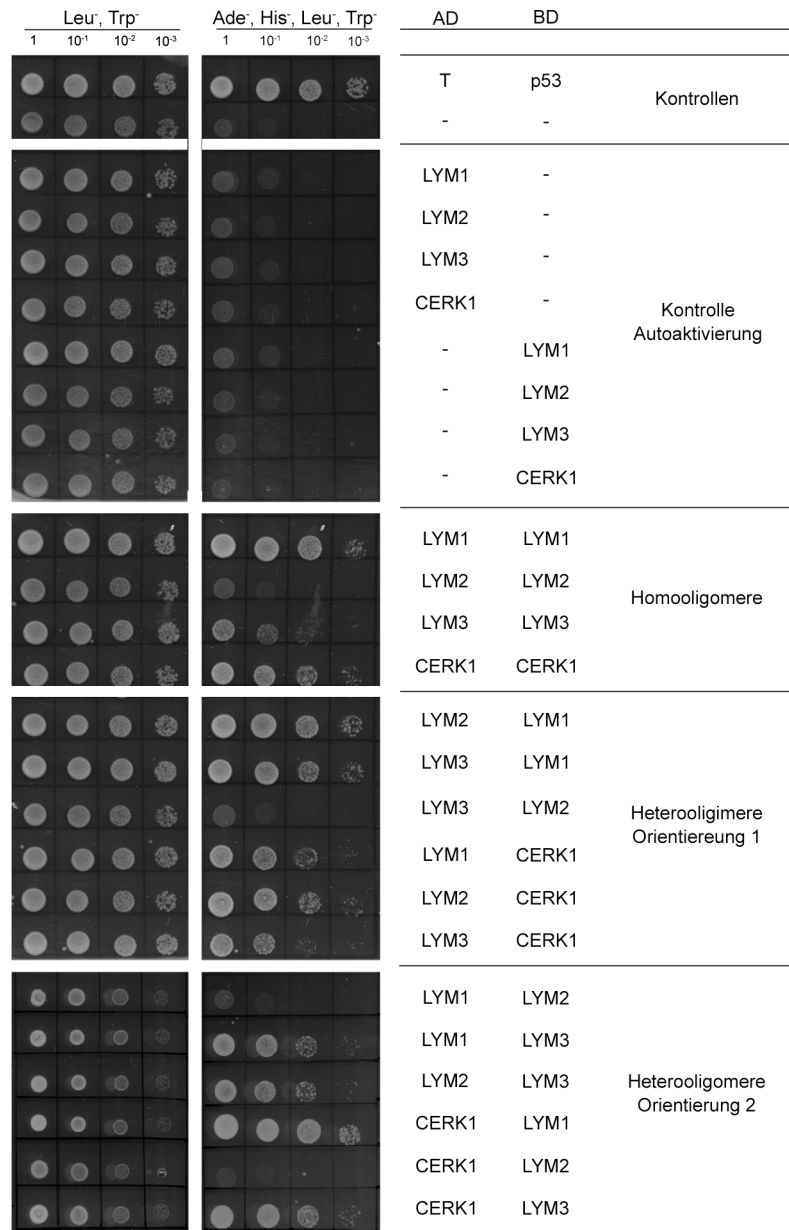
Der rekonstituierte exogene GAL4-Transkriptionsfaktor induziert die Transkription von Reportergenen, welche unter der Kontrolle von GAL4-responsiven Promotern stehen. Die Aktivitäten der Genprodukte dienten als Indikatoren der Interaktion der zu untersuchenden Proteinkombination. Es wurde die Expression der Reportergene *ADE2* und *HIS3* analysiert. Da *S. cerevisiae* AH109 auxotroph bezüglich Adenin und Histidin ist, bedeutet Wachstum von transformierten Hefen auf Adenin und Histidin Mangelmedium die Interaktion der beiden Fusionsproteine. *S. cerevisiae* AH109 ist aufgrund von Mutationen in *LEU2* und *TRP1* auch auxotroph bezüglich Leucin und Tryptophan. Diese Mutationen wurden durch auf den eingesetzten Vektoren vorliegende Gene *LEU2* und *TRP1* komplementiert, um nach der Transformation auf die Anwesenheit der Vektoren selektieren zu können.

Zunächst wurden die zu untersuchenden Konstrukte auf Ihre Fähigkeit zur Autoaktivierung kontrolliert. Dazu wurden *S. cerevisiae* AH109-Zellen jeweils mit dem GAL4-Aktivierungsdomänen- oder DNA-Bindedomänenkonstrukt und dem jeweiligen komplementären, leeren Vektor transformiert. Keines der getesteten Expressionskonstrukte zeigte Autoaktivierung (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.26, jeweils *Kontrolle Autoaktivierung*).

## Ergebnisse

Es wurden nun die Fähigkeiten der rekombinanten LYM1-, LYM2-, LYM3- und CERK1-Proteine untersucht, im heterologen System Homooligomere oder Heterooligomere zu formen. Es konnte gezeigt werden, dass LYM1, LYM3 und CERK1 in der Lage sind, Homooligomere zu bilden (Abbildung 4.25, *Homooligomere*). Die Heterooligomerisierung wurde mit beiden möglichen Kombinationen der jeweils untersuchten Konstrukte durchgeführt, um Artefakte, die durch die Fusion eines bestimmten Konstruktes mit der AD- oder BD-Domäne zu reduzieren. LYM1 und LYM3 konnten in beiden Kombinationen miteinander interagieren. LYM2 konnte aber sowohl mit LYM1 als auch mit LYM3 nur in jeweils einer Kombination interagieren. LYM1 und LYM3 konnten jeweils mit CERK1 in beiden Orientierungen interagieren, während auch hier LYM2 nur in einer Orientierung mit CERK1 interagieren konnte (Abbildung 4.25 *Heterooligomere Orientierung 1 und 2*).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.25. Yeast Two-Hybrid Interaktionsstudie mit LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1.**

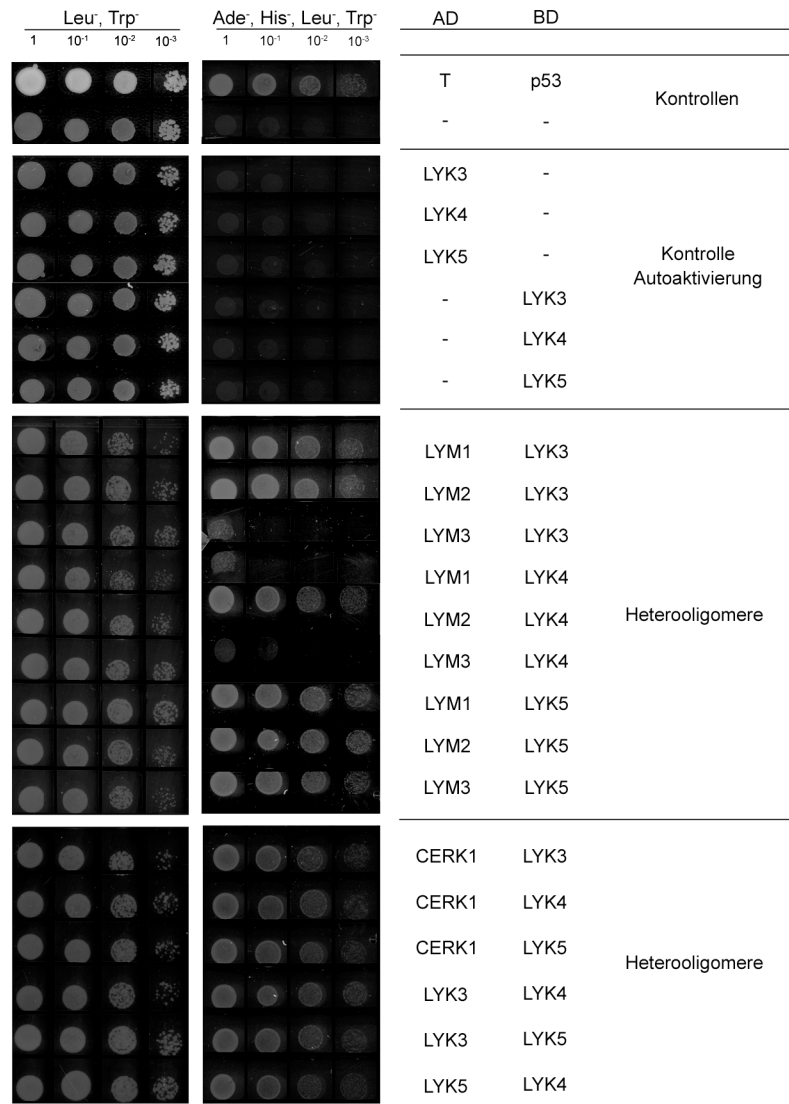
*LYM1*, *2*, *3* und *CERK1* (extrazelluläre Domäne) wurden jeweils als Fusion mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) in pGADT7 oder als Fusion mit der DNA-Bindedomäne (BD) in pGBKT7 in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 transformiert. Kulturen dieser transformierten Hefen wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup> auf CSM-LW (Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>) und auf CSM-AdeHLW (Ade<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>) aufgetropft und das Wachstum der Hefen nach 2 Tagen dokumentiert. Als Positivkontrolle diente das T-Antigen in pGADT7 und p53 in pGBKT7.

Die Bindungsstudie wurde auf die weiteren RLKs mit Lysin-Motiven bis auf LYK2 erweitert. *LYK2* wird nicht in *A. thaliana* Blättern exprimiert und es konnte keine cDNA bezogen werden.

*LYM1* konnte mit *LYK3* und *LYK5* interagieren. *LYM2* interagiert mit *LYK3*, *LYK4* und *LYK5*, während *LYM3* nur mit *LYK5* interagiert. *CERK1* konnte mit *LYK3*, *LYK4* und *LYK5* interagieren (Abbildung 4.26 *Heterooligomere*).



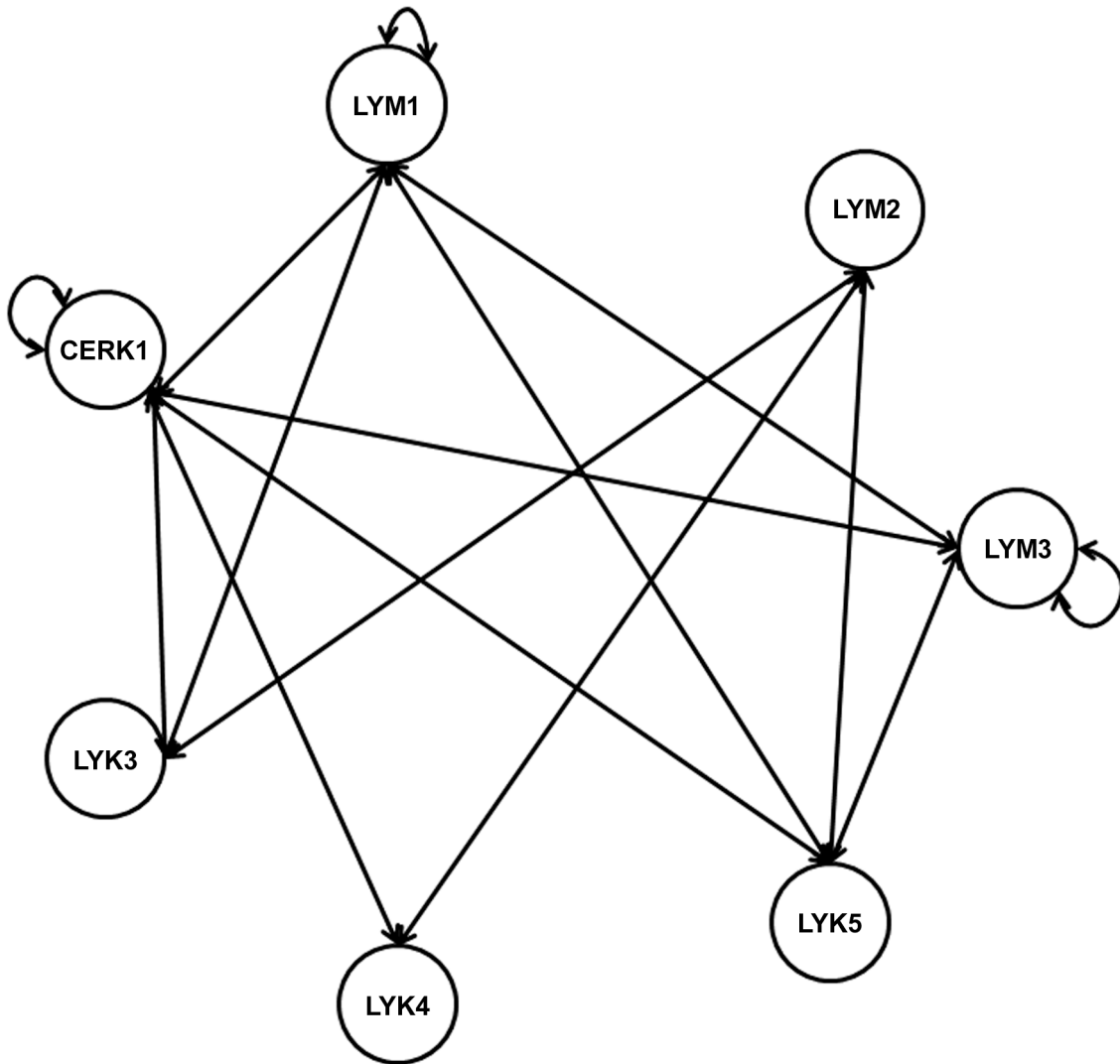
## Ergebnisse



**Abbildung 4.26. Yeast Two-Hybrid Interaktionsstudie mit LYM1, LYM2, LYM3, CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5.**

LYM1, 2, 3 und die extrazellulären Domänen von CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5 wurden jeweils als Fusion mit der GAL4 Aktivierungsdomäne (AD) in pGADT7 oder als Fusion mit der DNA-Bindedomäne (BD) in pGBKT7 in den *S. cerevisiae* Stamm AH109 transformiert. Kulturen dieser transformierten Hefen wurden unverdünnt und in den Verdünnungen 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> und 10<sup>-3</sup> auf CSM-LW (Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>) und auf CSM-AdeHLW (Ade<sup>-</sup>, His<sup>-</sup>, Leu<sup>-</sup>, Trp<sup>-</sup>) aufgetropft und das Wachstum der Hefen nach 2 Tagen dokumentiert. Als Positivkontrolle diente das T-Antigen in pGADT7 und p53 in pGBKT7.

Die Expression aller eingesetzten Konstrukte wurde durch Immunoblot kontrolliert (nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Yeast Two-Hybrid Interaktionsstudien sind zur besseren Übersicht in Abbildung 4.27 zusammengefasst.



**Abbildung 4.27. Interaktionsnetzwerk nach Yeast Two-Hybrid Studien der *A. thaliana* LYPs und LYKs.**

Die Interaktionen nach den Ergebnissen der Yeast Two-Hybrid Studien mit den *A. thaliana* LYPs LYM1, LYM2 und LYM3 sowie den LYKs CERK1, LYK3, LYK4 und LYK5. Die Interaktionen sind als Pfeile dargestellt.

LYM1, LYM3 und CERK1 waren hier also in der Lage, Homooligomere zu bilden. LYM2 konnte dies nicht. LYM2 konnte nur in einer möglichen Kombination mit LYM1, LYM3 und CERK1 interagieren, während die letztgenannten untereinander in beiden Kombinationen interagieren konnten.

Damit besitzen in diesem heterologen System LYM1, LYM3 und CERK1 die Fähigkeit einen Komplex zu bilden. Die Rolle von LYM2 bleibt indifferent und muss weiter untersucht werden.

LYM1, LYM2 und LYM3, sowie CERK1 besitzen im heterologen System auch die Fähigkeit, mit weiteren Vertretern der LysM RLKs zu interagieren. Es muss in weiteren Experimenten geprüft werden, ob diese RLKs in die PGN Perzeptionsmaschinerie integriert sind.

#### 4.13.2 Interaktionsstudien mit *Far-Western*

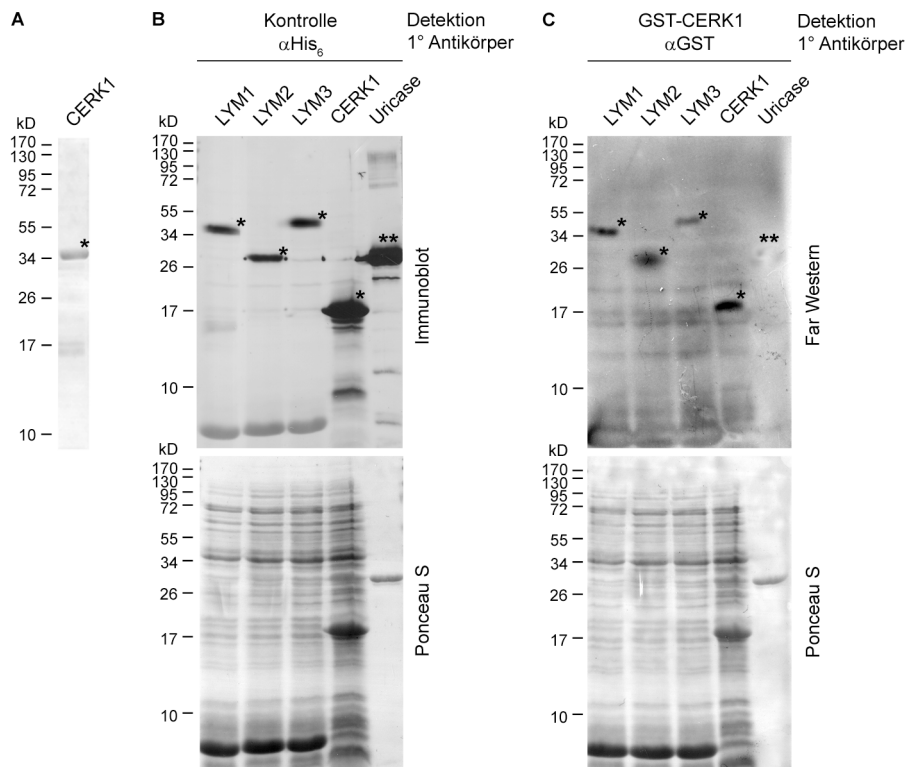
Im Yeast Two-Hybrid System wurde die Fähigkeit rekombinanter LysM-Domänen enthaltender *A. thaliana* Proteine gezeigt, im heterologen Expressionssystem zu interagieren. Dabei wurde beobachtet, dass insbesondere LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1 besonderes Potential besitzen, Homo- und Heterooligomere zu bilden. Um einen möglichen PGN-Rezeptorkomplex aufzuklären, wurde nun ein weiterer experimenteller Ansatz gewählt, um mögliche Unterschiede der Bindungspräferenzen der LysM haltigen Proteine aufzuklären.

Es wurde ein *E. coli* basiertes System gewählt. LYM1, LYM2 und LYM3 wurden ohne Signalpeptid und ohne C-terminales Propeptid als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Die extrazelluläre Domäne von CERK1 wurde sowohl als His<sub>6</sub>- als auch als GST-Fusionsprotein exprimiert. Als Kontrolle wurde auch eine *A. thaliana* Uricase als His<sub>6</sub>-Fusionsprotein exprimiert.

Als Sonde wurde das GST-CERK1-Fusionsprotein aufgereinigt (Abbildung 4.28 A). Lysate der *E. coli* Zellen, welche die genannten His<sub>6</sub>-Fusionsproteine und die His<sub>6</sub>-Uricase exprimierten, wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Elektroblob auf Nitrocellulosemembranen immobilisiert. Eine Membran wurde mit His<sub>6</sub>-spezifischen Antikörpern behandelt, um die gleichmäßige Expression der His<sub>6</sub>-Fusionsproteine zu überprüfen (Abbildung 4.28 B).

Die andere Membran wurde geblockt und die immobilisierten Proteine renaturiert. Anschließend wurde diese Membran mit der GST-CERK1-Sonde aus Abbildung 4.28 A inkubiert. Nachdem die überschüssige Sonde ausgewaschen worden war, wurde mit GST-spezifischen Antikörpern detektiert, um so die Interaktion der GST-CERK1-Sonde mit den immobilisierten Proteinen auf der Membran nachzuweisen. Hierdurch konnten die LYM1-, LYM2-, LYM3- und CERK1-Fusionsproteine, nicht aber die His<sub>6</sub>-Uricase Kontrolle detektiert werden, zudem fanden keine unspezifischen Interaktionen der Sonde mit endogenen *E. coli* Proteinen statt (Abbildung 4.28 C). Die Signalstärken waren hier für die untersuchten Interaktionen vergleichbar (Abbildung 4.28 C). Es konnte also kein Unterschied der Interaktionen festgestellt werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.28. Far-Western Interaktionsstudie von LYM1, LYM2, LYM3 und CERK1.**

(A) Als Sonde wurde GST-CERK1 in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und nach SDS-PAGE durch Immunoblot mit GST-spezifischen Antikörpern analysiert. (B) Lysate von LYM1, LYM2, LYM3, CERK1 (extrazelluläre Domäne) und Uricase als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine exprimierenden *E. coli* BL21AI Zellen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit His<sub>6</sub>spezifischen Antikörpern analysiert. (C) Lysate der in (B) beschriebenen *E. coli* Stämme wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer Nitrocellulosemembran immobilisiert. Nach Renaturierung und Blocken der Membran wurde die GST-CERK1 Sonde aus (A) zugegeben und mit der Membran inkubiert. Nach dem Auswaschen überschüssiger Sonde, wurde GST-CERK1 mit GST-spezifischen Antikörpern detektiert. Als Kontrolle sind auch die Färbungen der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S Rot gezeigt. Spezifische Banden wurden durch (\*) markiert.

Die rekombinanten LYM1, LYM2 und LYM3 Proteine können also unter diesen *in vitro*-Bedingungen spezifisch mit der rekombinanten extrazellulären Domäne von CERK1 interagieren. Außerdem kann diese CERK1 Domäne hier Homooligomere bilden.

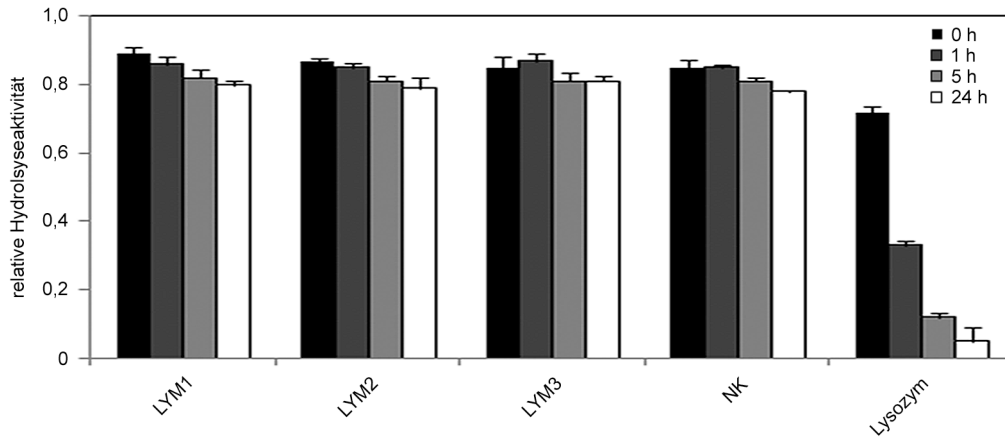
### 4.14 LYM1, LYM2 und LYM3 besitzen keine Hydrolyseaktivität gegenüber bakteriellen Zellwänden

LYM1 und LYM3 sind an der Perzeption von PGN in *A. thaliana* beteiligt. LYM1 besitzt eine mäßige, LYM3 eine deutliche Fähigkeit PGN spezifisch zu binden (Abbildung 4.11 A).

In tierischen Systemen kann die Erkennung von PGN auch mit der Prozessierung desselben einhergehen (Dziarski und Gupta, 2006). Dies legt die Frage nahe, ob LYM1 und LYM3 reine PGN-Bindeproteine sind, welche PGN im Kontext eines möglichen Rezeptorkomplexes rekrutieren, oder aber ob sie selbst in der Lage sind PGN zu prozessieren. Um dies zu untersuchen, wurde die

## Ergebnisse

Hydrolyseaktivität rekombinanter LYM1, 2 und 3 Proteine in Bezug auf bakterielle Zellwandpräparationen hin untersucht. Die rekombinanten Proteine wurden mit Zellwandpräparationen aus *Micrococcus luteus* bis zu 24 h inkubiert. Während Lysozym in dieser Zeit die Trübung der Zellwandsuspension auf weniger als 10 % des Ausgangswertes reduzieren konnte, zeigte keines der rekombinanten LYM Proteine eine Reduktion der Trübung im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildung 4.29).



**Abbildung 4.29. LYM1, LYM2 und LYM3 besitzen keine Hydrolyseaktivität gegenüber bakteriellen Zellwänden.**

LYM1, LYM2 und LYM3 wurden als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine in *E. coli* BL21AI exprimiert und über Ni<sup>2+</sup>-NTA aufgereinigt. Je 20 µg Fusionsprotein wurde zusammen mit 0,02 % (w/v) *Micrococcus luteus* (Sigma-Adrich) in 20 mM NaAc, pH 5,2 bei 37°C für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die Trübung der Suspension wurde mit der Absorption bei 570 nm bestimmt und ist relativ zur Trübung bei Beginn des Experiments angegeben. Als Kontrolle wurde das Experiment auch mit 0,5 µg Lysozym durchgeführt. Das Experiment wurde auch mit dem Lysat nicht induzierter Bakterien als Negativkontrolle (NK) durchgeführt.

LYM1, LYM2 und LYM3 besitzen also keine Hydrolyseaktivität gegenüber bakteriellen Zellwandpräparationen, die vergleichbar ist mit der von Lysozym.

## 5 Diskussion

Die Perzeption von Signalen, ihre Weiterleitung und Umsetzung in eine physiologische Reaktion stellt ein zentrales Prinzip der Biologie dar. Jeder Abschnitt einer solchen Signalkaskade unterliegt sorgfältiger Regulation und kontinuierlicher, evolutionärer Selektion. Die Spezifität der Perzeption determiniert die Integration des Signals und die Induktion einer Stimulus-spezifischen, zellulären Antwort (Jordan *et al.*, 2000). Damit kommt dem Verständnis von Prinzipien der Erkennung eine wichtige Bedeutung zu.

Immunsysteme liefern Paradigmen der Erkennung. Hier müssen eigene Strukturen von pathologisch veränderten oder fremden unterschieden werden. Pflanzen erkennen essentielle, konservierte molekulare Muster aus Mikroorganismen durch Mustererkennungsrezeptoren und induzieren so Immunreaktionen.

Ein molekulares Muster mit immunogener Wirkung in Pflanzen ist bakterielles Peptidoglycan. In tierischen Systemen sind verschiedene PGN-Rezeptoren bekannt, die unterschiedlichen Wirkmechanismen folgen. In Pflanzen war ein solcher Rezeptor bisher nicht beschrieben.

In dieser Arbeit werden Komponenten eines *A. thaliana* Mustererkennungssystems für Peptidoglycan bestehend aus den LysM-Proteinen LYM3 und CERK1 vorgestellt. Dieses liefert einen Beitrag zum Verständnis der Aktivierung der *A. thaliana* Wirtsimmunität gegen bakterielle Infektionen.

### 5.1 LYM3 und CERK1 als Komponenten eines Peptidoglycanrezeptorsystems in *A. thaliana*

Als Kandidaten für Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) der PGN-Erkennung wurden in dieser Arbeit aus folgenden Gründen Proteine mit Lysin-Motiven betrachtet:

(i) Lysin-Motive (LysM) sind Bindemotive für Kohlehydratoligomere aus N-Acetylglucosaminderivaten (siehe 1.6 und 1.7). In Pflanzen besitzen LysM-Domänen eine zentrale Bedeutung in der Erkennung GlcNAc-haltiger Glycane. Beispielsweise binden die LysM-Proteine CEBiP aus Reis bzw. CERK1 aus *A. thaliana* Chitin direkt und führen so zu Chitin-induzierten Immunantworten (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Petuschnig *et al.*, 2010; Iisaza *et al.*, 2010 und 1.7.1). Desweiteren sind LysM-Rezeptoren die Kernkomponenten der Erkennung rhizobieller Nodulationsfaktoren in Leguminosen (Gough und Cullimore, 2011 und 1.7.2). Da PGN ein Rückgrat aus alternierenden Einheiten aus GlcNAc und MurNAc besitzt, lag die Vermutung nahe, dass pflanzliche PGN-Binde- bzw. Rezeptorproteine Lysin-Motive enthalten könnten (siehe auch 1.4.3).

(ii) Typische pflanzliche Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), wie z.B. der Flagellinrezeptor FLS2, der EF-Tu-Rezeptor EFR oder das Rezeptor-ähnliche Protein EIX2 und die Rezeptoren der Chitinperzeption, befinden sich an der Oberfläche der Wirtszelle (Robatzek *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006; Ron und Avni, 2004; Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2010; Boller und Felix, 2009; Dodds und Rathjen, 2010). Die *A. thaliana* Familie der LysM-Proteine weist mit den LYPs (über Glycosylphosphatidylinositolanker oder Transmembrandomänen mit kurzem cytoplasmatischen Anteil mit der Cytoplasmamembran assoziierte Proteine mit extrazellulärer LysM-Domäne) und den LYKs (membranständige Rezeptor-ähnliche Kinasen mit extrazellulärer LysM-Domäne) Mitglieder auf, die die Anforderung an die Lokalisation eines PRRs erfüllen (siehe 1.7 und 1.7.3).

(iii) Die Transkription von Genen, welche für PRRs kodieren, wird nach Infektionen mit virulenten Bakterien häufig reprimiert. Beispielsweise wird die Expression des Flagellinrezeptors *FLS2* nach Infektion von *A. thaliana* mit virulenten Bakterien deutlich supprimiert (Abbildung 4.4 A). Die Expression der LysM-Proteine des LYP-Typs *LYM1*, *LYM2* und besonders von *LYM3* wird ebenfalls durch virulente Bakterien reprimiert (4.3 und Abbildung 4.4). Außerdem wird die LysM-RLK CERK1 durch bakterielle Typ-III-Effektoren für den proteolytischen Abbau markiert (Gimenez-Ibanez *et al.* 2009). Da die Beeinträchtigung eines PRRs einen Vorteil für Pathogene bedeuten würde, ist dies ein weiterer Hinweis auf eine mögliche Beteiligung dieser Proteine an der Immunabwehr gegen phytopathogene Bakterien.

Es wurden die beiden LysM-Proteine *LYM3* und CERK1 identifiziert. Die Abwesenheit von entweder *LYM3* oder CERK1 hat sowohl eine deutliche Verringerung der Abwehrreaktionen, die durch Behandlung mit hochreinem PGN ausgelöst werden (Abbildung 4.17, Abbildung 4.18 und Abbildung 4.19), als auch eine Hypersuszeptibilität gegenüber bakteriellen Infektionen zur Folge (Abbildung 4.21 und Abbildung 4.23).

*LYM3* ist wahrscheinlich mittels Glycosylphosphatidylinositolanker mit der pflanzlichen Cytoplasmamembran assoziiert und fungiert als PGN-Bindeprotein (Abbildung 4.9 und Abbildung 4.11). Die Bindung von PGN erfolgt schnell, ligandenspezifisch und reversibel (Abbildung 4.11 bis Abbildung 4.13). Für die Wechselwirkung von *LYM3* mit PGN ist eine extrazelluläre Domäne aus zwei Lysin-Motiven verantwortlich (Abbildung 4.14).

*LYM3* besitzt keine Transmembrandomäne und ist deswegen *per se* außerstande, ein Signal in das Cytoplasma der Pflanzenzelle zu transduzieren. CERK1 ist eine Rezeptor-ähnliche Kinase und besitzt extrazellulär drei Lysin-Motive (Miya *et al.*, 2007). Im Gegensatz zu *LYM3* bindet CERK1 selbst PGN kaum (Abbildung 4.11). CERK1 könnte aufgrund seiner Topologie also als Relais für die Signaltransduktion bei der PGN-Perzeption fungieren.

Beide Proteine stehen daher in funktionalem Kontext und bilden Komponenten eines Rezeptorsystems. Dieses trägt durch die Perzeption von PGN zur Immunität von *A. thaliana* gegen bakterielle Infektionen bei.

Da CERK1 in *A. thaliana* neben der Funktion als PGN-Sensor auch für die Chitinperzeption von essentieller Bedeutung ist (1.7.1 und Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008), scheint es eine zentrale Rolle in der Erkennung mikrobieller Kohlehydratstrukturen einzunehmen. Dies wirft die Frage der Spezifität der Auslösung von Immunantworten und der Rolle von CERK1 auf. Trotz der Abhängigkeit der Chitin- und PGN-Perzeption von CERK1 stellt das LYM3/CERK1-System ein spezifisches PGN-Erkennungsmodul dar. Während CERK1-defiziente Pflanzen neben einer Insensitivität gegenüber Chitin auch eine Insensitivität gegenüber PGN zeigen, sind LYM3-defiziente Pflanzen ausschließlich gegenüber PGN insensitiv (Abbildung 4.17 A, B und D). Zudem leistet LYM3 keinen Beitrag zur Immunität gegenüber Infektionen durch Pilze (Abbildung 4.15), während dies bei CERK1 der Fall ist (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008).

Mechanistisch ist daher vorstellbar, dass CERK1 in der PGN-Perzeption als Corezeptor fungiert, welcher selbst PGN nicht zu binden vermag (Abbildung 4.11 A), aber für die erfolgreiche Signaltransduktion notwendig ist (Abbildung 4.18 C). In der Chitinperzeption hingegen ist CERK1 in *A. thaliana* durchaus in der Lage, mit Chitin als Ligand direkt zu interagieren (Abbildung 4.11 und 1.7.1, Iizasa *et al.*, 2010; Petuschnig *et al.*, 2010). CERK1 vereint also in *A. thaliana* die Rolle als Corezeptor der PGN-Perzeption und als eigenständiger Mustererkennungsrezeptor (PRR) der Chitinperzeption in sich selbst. Ob CERK1 jeweils als Corezeptor oder als PRR fungiert, wird durch den Stimulus determiniert. Dennoch bleibt die Frage nach molekularen Mechanismen offen, welche die Spezifität der beiden Signale vermitteln. Es ergeben sich verschiedene Möglichkeiten:

(i) Die Signalspezifität könnte durch eine ligandenabhängige Bildung von Rezeptorkomplexen ermöglicht werden. Die Zusammensetzung eines solchen Komplexes könnte dann den jeweiligen Signalweg determinieren. Interaktionsstudien müssen klären, ob weitere Komponenten bei der Perzeption von Signalen durch LYM3/CERK1 oder CERK1 beteiligt sind. Weiterführend müssen stromabwärts gelegene Komponenten, wie z.B. mögliche Adaptoren, welche in Abhängigkeit des Signals rekrutiert werden könnten, untersucht werden.

(ii) Zentrales Element der Signaltransduktion sind Phosphorylierungskaskaden (Lemmon und Schlessinger, 2010; Schlessinger, 2000; Boller und Felix, 2009). Es ist vorstellbar, dass bei der Signaltransduktion durch CERK1 signalspezifische Phosphorylierungen stattfinden, welche dann in unterschiedliche Signalwege münden. Es ist bereits bekannt, dass Chitin die transiente Phosphorylierung von CERK1 induziert, CERK1 die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt und die



Kinaseaktivität von CERK1 für pflanzliche Antworten auf Chitin notwendig ist (Petuschnig *et al.*, 2010). Zukünftige Studien müssen zeigen, ob derartige Phosphorylierungen spezifisch für Induktionen durch Chitin sind, ob sie auch durch PGN induziert werden oder ob sich PGN-spezifische Phosphorylierungsmuster ergeben.

(iii) Zudem ist es möglich, dass keine signalspezifisch unterschiedlichen Transduktionswege ausgelöst werden, sondern vielmehr eine generische Reaktion auf Liganden unterschiedlicher Herkunft. Diese generische Reaktion könnte dann gemeinsam mit Reaktionen auf weitere MAMPs zu einer Immunantwort beitragen. Zukünftige Experimente müssen klären, ob die Reaktionen der Pflanze auf Chitin oder PGN unterschiedlich sind. Erste Hinweise deuten daraufhin, dass die Expression bestimmter Markergenereder pflanzlichen Abwehr, wie *PR1* oder *FRK1*, sowohl durch PGN wie auch Chitin induziert werden kann (Abbildung 4.2 B und Abbildung 4.17). Vergleiche der Transkriptomantworten nach Chitin- und PGN-Behandlung können Aufschluss über die Verwandtschaft der beiden Reaktionen geben. Außerdem müssen weitere Reaktionen, wie z.B. ROS-Produktion, nach PGN- und Chitinbehandlung sowie die Kinetik der Reaktionen verglichen werden. Sollte es sich um eine generische Antwort handeln, sollte die Hypersuszeptibilität LYM3-defizienter Pflanzen gegenüber bakteriellen Infektionen durch Behandlung mit Chitin komplementiert werden können.

Erste Erkenntnisse aus heterologen Systemen deuten darauf hin, dass CERK1 und LYM3 einen physischen Komplex bilden könnten. CERK1 und LYM3 besaßen in Yeast-Two-Hybrid- und Far-Western-Untersuchungen die Fähigkeit, Hetero- und Homooligomere zu bilden (Abbildung 4.25 und Abbildung 4.28). Eine derartige Interaktion von LYM3 und CERK1 könnte in Analogie zum Chitinperzeptionssystem in Reis stehen. Dort erfolgt die Chitinperzeption durch einen physischen Komplex aus der LysM-Rezeptorkinase OsCERK1 und dem Chitinbindeprotein CEBiP, dessen Bildung durch Stimulierung mit Chitin induziert wird (1.7.1 und Kaku *et al.*, 2006; Shimizu *et al.*, 2010). Ob eine physische Interaktion von LYM3 und CERK1 *in planta* vorliegt, muss durch weitere Experimente, wie gerichtete Co-Immunopräzipitationen, gezeigt werden.

Eine Heterokomplexbildung, wie für LYM3/CERK1 angenommen, ist ein klassisches Prinzip der Signalperzeption (Schlessinger, 2000; Schlessinger *et al.*, 1988) und tritt auch in der angeborenen Immunität tierischer Systeme auf (Akira und Takeda, 2004; Botos *et al.*, 2011). So bildet TLR2 bei der Perzeption von Lipoteichonsäuren oder Lipopeptiden Heterodimere mit TLR1 bzw. TLR6 (Kumar *et al.*, 2009; Jin *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2009). Die unterschiedliche Zusammensetzung dieser Rezeptorheteromere ermöglicht die Erkennung verschiedener mikrobieller Komponenten (Takeda *et al.*, 2003; Botos *et al.*, 2011).

In Pflanzen bildet die LRR-RLK BAK1 Heterodimere mit dem Brassinosteroidrezeptor BRI1, dem Flagellinrezeptor FLS2 oder dem EF-Tu-Rezeptor EFR (siehe 4 und Roux *et al.*, 2011; Schulze *et al.*, 2010; Chinchilla *et al.*, 2009; Boller und Felix, 2009). BAK1 spielt also eine zentrale Rolle in der Regulation von LRR-RLKs, indem es mit diesen unterschiedlichen Liganden-bindenden Rezeptoren Stimulus-abhängig heterodimere Komplexe bildet, die für die Aktivierung der jeweiligen Signalwege notwendig sind (Chinchilla *et al.*, 2009). Als Corezeptor interagiert BAK1 selbst jedoch nicht mit den jeweiligen Liganden (Chinchilla *et al.*, 2009).

Die Beteiligung von CERK1 an sowohl der Chitin- wie auch der PGN-Perzeption, stellt es ähnlich wie BAK1 in das Zentrum verschiedener Signalperzeptionssysteme. Im Gegensatz zu BAK1 werden diese Aufgaben vermutlich in unterschiedlicher Weise erfüllt, nämlich entweder als PRR (Chitin) oder als putativer Corezeptor (PGN).

### 5.2 Ligandenspezifität des LYM3/CERK1-Perzeptionssystems für Peptidoglycan

Peptidoglycane können aufgrund ihres strukturellen Aufbaus in zwei Gruppen eingeteilt werden (1.4.3). Zum einen findet man besonders in Gram-negativen Bakterien DAP-Typ-PGN, welches in Position drei seines Stammpeptids meso-Diaminopimelinsäure (DAP) aufweist. Zum anderen besitzen Gram-positive Bakterien oft Lys-Typ-PGN. Hier ist die dritte Aminosäure des Stammpeptids Lysin. Viele Rezeptoren der tierischen, angeborenen Immunität diskriminieren zwischen diesen beiden PGN-Typen. Die unterschiedlichen PGRPs der Insekten sind zumeist spezifisch für Lys- oder DAP-Typ-PGN (1.5, Tabelle 5.1 und Royet und Dziarski, 2007). *A. thaliana* erkennt sowohl PGN des DAP- als auch des Lys-Typs (Abbildung 4.2 und Gust *et al.*, 2007; Erbs *et al.*, 2008). Hieraus ergab sich die Frage, ob *A. thaliana* die beiden PGN-Typen durch unterschiedliche Rezeptoren oder durch ein einzelnes Rezeptorsystem erkennt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Perzeption beider PGN-Arten von LYM3 und CERK1 abhängt: LYM3- sowie CERK1-defiziente Pflanzen waren gleichermaßen insensitiv für Behandlungen mit Peptidoglycanen aus Gram-negativen Bakterien (wie *Xcc* oder *Pto*) und Gram-positiven Bakterien (hier *Sa*) (Abbildung 4.20 und Abbildung 4.17 A, B und D).

Übereinstimmend kann LYM3 direkt beide PGN-Typen in vergleichbaren Größenordnungen binden. So konnten lösliche Fragmente Gram-negativen DAP-Typ-PGNs (aus *E. coli*) die Bindung von LYM3 mit unlöslichem Gram-positivem Lys-Typ-PGN (aus *Sa*) kompetieren (Abbildung 4.12).

*A. thaliana* besitzt also ein PGN-Perzeptionssystem, welches nicht zwischen DAP- und Lys-Typ PGN unterscheidet. Für beide PGN-Typen dient LYM3 als Bindeprotein. CERK1 scheint für beide PGN-Typen als Relais der Signaltransduktion zu dienen.

Monomere Muramyl-dipeptide oder Muraminsäure zeigten in *A. thaliana* keine immunogene Wirkung (Gust *et al.*, 2007). DAP- und Lys-Typ PGN unterscheiden sich durch die Zusammensetzung ihrer Peptidanteile, nicht durch die des Glycanrückgrats (s.o. und 1.4.3). Da zudem die Glycanstränge für die immunogenen Eigenschaften des PGN im Gegensatz zu seinem Peptidanteil entscheidend sind (Gust *et al.*, 2007), ist davon auszugehen, dass das Kohlehydratrückgrat des PGN für die Aktivierung der pflanzlichen Immunantwort relevant ist.

Vom chitinbindenden CEBiP aus Reis ist bekannt, dass zur Interaktion mit Chitooligomeren und zur Immunaktivierung ein Polymerisationsgrad von mindestens sechs GlcNAc-Einheiten notwendig ist (Ito *et al.*, 1997; Okada *et al.*, 2002). Bei der Wechselwirkung von Chitin mit CERK1 aus *A. thaliana* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Affinität von der Länge der GlcNAc-Polymere abhängt und dass länger-kettige Oligomere besser gebunden werden als kürzere (Iizasa *et al.*, 2009; Petuschnig *et al.*, 2010). Es ist daher begründet anzunehmen, dass ein ähnlicher Zusammenhang der Bindung und der physiologischen Aktivität mit dem Grad der Polymerisation der Glycanketten aus PGN auch beim LYM3/CERK1-System vorliegt.

Zukünftige Experimente mit (synthetischen) Oligomeren verschiedener Längen aus GlcNAc-MurNAc-Einheiten (ggf. substituiert mit Peptidanteilen verschiedener Länge) müssen das minimale, immunogene Strukturmotiv des PGN aufklären. Auf diese Weise könnten der notwendige Oligomerisierungsgrad, sowie die Notwendigkeit von Peptidsubstituierungen für die Interaktion von PGN mit LYM3 und die immunogenen Eigenschaften von PGN aufgeklärt werden.

Immunreaktionen werden in *A. thaliana* sowohl durch komplexes, makromolekulares PGN, als auch durch lösliche PGN-Fragmente aktiviert (Gust *et al.*, 2007; Erbs *et al.*, 2008). Lösliches und komplexes PGN werden in der gleichen Größenordnung spezifisch durch LYM3 und CERK1 erkannt (Abbildung 4.17). LYM3 besitzt die Fähigkeit direkt mit unlöslichen und löslichen Fragmenten zu interagieren (lösliche PGN-Fragmente können die Interaktion von LYM3 mit unlöslichem, komplexem PGN kompetieren; Abbildung 4.12).

Es wurde diskutiert, dass komplexes PGN nicht *per se* erkannt wird (Erbs *et al.* 2008). Die unlösliche Natur und Größe des PGN lassen es unwahrscheinlich erscheinen, dass es durch die Matrix der pflanzlichen Zellwand treten und zur Cytoplasmamembran gelangen kann, an der das Perzeptionsereignis stattfindet. Sekretierte *A. thaliana* Enzyme könnten komplexes PGN in lösliche, diffusible Fragmente prozessieren. Diese Fragmente könnten leichter als makromolekulares PGN zu den Rezeptoren der Cytoplasmamembran gelangen. Diese Annahmen werden durch Beschreibungen pflanzlicher Chitinasen gestützt, welche PGN-hydrolytische Eigenschaften besitzen (Bokma *et al.*, 1997; Grabherr, 2011). Nach einer ähnlichen Annahme könnten pflanzliche Chitinasen analog zu tierischen Lysozymen bakterielle Zellwände angreifen und dabei lösliche Liganden erzeugen, welche

dann immunogene Eigenschaften besitzen (Dziarski und Gupta, 2010; Cho *et al.*, 2005). Die Prozessierung des PGNs wäre dabei ein notwendiger Schritt für die Erzeugung aktiver Liganden. Eine solche Situation, in der immunogen inaktive Strukturen spezifisch in immunogene Fragmente umgewandelt werden, ist auch bei der Infektion von Pflanzen durch Pilze bekannt. Pilzliche Endopolygalacturonasen und Endopectatlyasen greifen Pectine der pflanzlichen Zellwand an und erzeugen dabei Oligogalacturonide, die den Pilzen als Kohlehydratquelle dienen (Pagel und Heitfuss, 1990; Côté *et al.*, 1998). Diese Oligogalacturonide stellen zugleich jedoch Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) dar, die zur Auslösung der Wirtsimmunität führen (Low und Merida, 1996; Côté *et al.*, 1998; Bolwell *et al.*, 1999, Boller und Felix, 2009).

Lösliche PGN-Fragmente werden auch durch endogene bakterielle Prozesse des PGN-Recyclings erzeugt und in das umgebende Medium abgegeben (Boothby *et al.*, 1973; Goodell *et al.*, 1978; Goodell und Schwarz, 1985; Mauck *et al.*, 1971; Uehara und Park, 2008). Diese könnten ähnlich wie in tierischen Systemen (Humann und Lenz, 2009) durch das pflanzliche Perzeptionssystem erkannt werden und immunogen stimulierend wirken.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass lösliche PGN-Fragmente in LYM3/CERK1-abhängiger Weise erkannt werden können und für die Ausprägung der pflanzlichen Immunität entscheidend sind.

Ein direkter Zusammenhang zwischen der PGN-Perzeption und einer endogenen oder exogenen PGN-Prozessierung in lösliche Liganden muss noch gezeigt werden. Dabei ist von entscheidender Bedeutung, ob PGN-Fragmente, welche durch pflanzliche PGN-hydrolysierende Enzyme erzeugt werden, immunogene Eigenschaften besitzen. Des Weiteren muss aufgeklärt werden, ob Pflanzen, welche defizient bezüglich PGN-hydrolysierender Chitinasen sind, weiterhin in der Lage sind, komplexes PGN zu erkennen. Mit derartigen Pflanzen ließe sich außerdem, z.B. durch den Vergleich der Antworten auf inaktivierte und lebende Bakterien, aufklären, ob endogene bakterielle PGN-Prozessierungsschritte für die PGN-Perzeption und die Immunstimulation in Pflanzen notwendig sind.

### **5.3 LysM-Proteine repräsentieren eine zweite Klasse der pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren**

Pflanzen scheinen mit den LRR- und den LysM-Rezeptoren zwei bedeutende Klassen von Mustererkennungsrezeptoren zu besitzen. PRR-Rezeptoren sind an der Perzeption mikrobieller Peptidliganden beteiligt. Die LRR-RLKs FLS2 und EFR erkennen spezifisch Peptidfragmente aus bakteriellem Flagellin bzw. aus dem bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Gómez-Gómez *et al.*, 1999, Zipfel *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007). Zudem sind LRR-Proteine ohne funktionelle cytoplasmatische Domäne bekannt, wie z.B. EIX2 aus Tomate, welches eine

pilzliche Xylanase bindet und erkennt (Ron und Avni, 2004). LRR-Proteine als PRRs der pflanzlichen angeborenen Immunität stellen also vorrangig Sensoren bakterieller Peptidstrukturen dar.

LysM-Proteine bilden in Pflanzen eine eigene Klasse der Mustererkennungsrezeptoren. Sie erkennen N-Acetylglucosamin-haltige molekulare Muster. Durch die Beispiele CERK1, OsCERK1 und CEBiP der Chitinperzeption (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Shimizu *et al.*, 2010) und LYM3/CERK1 der Peptidoglycanperzeption wird deutlich, dass LysM-Proteine für die Auslösung von Immunantworten auf GlcNAc-haltige Muster unterschiedlicher mikrobieller Herkunft offensichtlich von genereller Bedeutung sind.

Eine Besonderheit der LysM-Proteine ist, dass sie neben der pflanzlichen Immunität auch die Induktion von Symbiosen vermitteln. In Leguminosen wie *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus* und *Glycine max* vermitteln dienen Komplexe aus LysM-Rezeptorkinasen als Rezeptoren rhizobieller Nodulationsfaktoren (1.7.2 und Gough und Cullimore, 2011; Indrasumunar und Gresshoff, 2010; Zhukov *et al.*, 2008). Die spezifische Erkennung von Nod-Faktoren ist notwendig für die erfolgreiche Etablierung von Symbiosen zwischen Leguminosen und Rhizobien (Gough und Cullimore, 2011). In der nicht zu den Leguminosen gehörenden *Parasponia* hat sich die Perzeption von Nod-Faktoren durch LysM-Proteine unabhängig entwickelt (Becking, 1979; Trinick, 1973; Op den Camp *et al.*, 2010). Ebenso wurde eine Beteiligung von LysM-Proteinen an der Erkennung der mit den Nod-Faktoren strukturell verwandten Myc-Faktoren gezeigt (Maillet *et al.*, 2011). Diese werden zur Einleitung der Symbiose pflanzlicher Wurzeln mit Mykorrhiza Pilzen sekretiert.

LysM-Proteine besitzen also Funktionen als Vermittler mikrobieller Interaktionen mit Pflanzen, die sowohl antagonistischer als auch symbiotischer Natur sein können. Das Lysin-Motiv scheint, im Gegensatz zu Peptid-erkennenden LRRs, biochemisch prädestiniert für die Erkennung von Kohlehydratliganden zu sein.

Es wird angenommen, dass die Funktion der LysM-RLKs als Chitinsensoren evolutionär älter ist, als ihre Funktion als Rezeptoren von Symbiosesignalen. Sequenzvergleiche der LysM-RLKs aus *Medicago truncatula* und *A. thaliana* führten zu einem Modell, in dem sich die LysM-RLKs der Nod-Faktorperzeption und der der Chitinperzeption aus einem gemeinsamen Vorgänger durch Duplikation und Diversifikation entwickelt haben (Zhu *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2010).

Da in *A. thaliana* sowohl die Chitin- als auch die PGN-Perzeption durch CERK1 vermittelt wird, muss in zukünftigen Studien die Frage gestellt werden, ob die PGN- und Chitinperzeption ein gleich altes Phänomen darstellen oder ob sich die PGN-Perzeption aus der Chitinperzeption heraus entwickelt und diese ergänzt hat.

#### 5.4 Sind LYM3 und LYM1 funktionell redundant?

LYM3 ist für eine vollständige Aktivierung der PGN-induzierten pflanzlichen Immunantwort nötig. In LYM3-defizienten Pflanzen ist diese Antwort aber nicht vollständig aufgehoben. In Transkriptomanalysen nach Behandlung LYM3-defizienter Pflanzen mit PGN konnte beobachtet werden, dass die PGN-induzierte Umprogrammierung des Transkriptoms zwar deutlich reduziert ist, eine residuale Antwort findet dennoch statt (siehe Abbildung 4.18 A). Daraus ergibt sich die Frage, ob es einen weiteren Faktor gibt, der die Abwesenheit von LYM3 teilweise kompensieren kann.

LYM3 und LYM1 sind strukturell eng verwandt (siehe Abbildung 1.5). LYM1-defiziente Pflanzen zeigten ebenfalls eine deutlich reduzierte Transkriptomantwort nach PGN-Behandlung (siehe Abbildung 4.18 B). Aber auch hier ist die Antwort nicht vollständig aufgehoben. Die beiden homologen Proteine LYM3 und LYM1 könnten also teilweise funktionell redundant sein. LYM1 besitzt auch die Fähigkeit PGN zu binden (Abbildung 4.11 A) und könnte mechanistisch in ähnlicher Weise wie LYM3 als Bindeprotein an der PGN-Perzeption beteiligt sein.

Trotz der reduzierten Abwehrantworten in LYM3- und LYM1-defizienten Pflanzen, waren nur LYM3-defiziente Pflanzen hypersuszeptibel gegenüber bakteriellen Infektionen (vergleiche Abbildung 4.21 und Abbildung 4.22). Wären LYM3 und LYM1 gleichermaßen an der Perzeption von PGN beteiligt, wäre auch in LYM1-defizienten Pflanzen ein verstärktes bakterielles Wachstum zu erwarten gewesen. Allerdings war die Reduktion der Transkriptomantwort in LYM3-defizienten Pflanzen stärker als in LYM1-defizienten Pflanzen (vergleiche die Steigungen der Ausgleichsgeraden in Abbildung 4.18 A und B). Bei bakteriellen Infektionen könnte die stärkere residuale Immunaktivierung durch LYM3 in LYM1-defizienten Pflanzen ausreichen, um die Abwesenheit von LYM1 zu kompensieren. Im Gegensatz dazu könnte die Antwort auf PGN in LYM3-defizienten Pflanzen so weit reduziert sein, dass sie nicht mehr ausreicht, um das bakterielle Wachstum zu beeinflussen. Die residuale Immunantwort in LYM3-defizienten Pflanzen könnte einen Schwellenwert, der für eine normale Immunität gegenüber bakteriellen Infektionen benötigt wird, unterschreiten.

Das Zusammenwirken von LYM3 und LYM1 muss durch die Untersuchung von *A. thaliana lym1xlym3*-Doppelmutanten weiter aufgeklärt werden. Sollten diese Pflanzen die Sensitivität für PGN vollständig verloren haben, können LYM3 und LYM1 als teilweise redundant angesehen werden. Die Suszeptibilität gegenüber bakteriellen Infektionen dieser Doppelmutanten sollte mit der der Einzelmutanten verglichen werden. Diese Experimente sollten aber auch auf *lym1xlym2xlym3* Pflanzen ausgeweitet werden. LYM2 zeigte zwar nur eine geringe Affinität zu PGN (Abbildung 4.11 A), besitzt aber eine enge strukturelle Verwandtschaft mit LYM3 und LYM1 (Abbildung 1.5).

L YM3 und L YM1 könnten partiell funktionell redundant sein, die Rolle von L YM3 in der PGN-Perzeption scheint aber bedeutender als die von L YM1 zu sein. Diese Überlegung wird zudem durch die größere Affinität von L YM3 zu PGN bestätigt (Abbildung 4.11 A).

Nach einer anderen Erklärung könnte in L YM1-defizienten Pflanzen ein kompensatorischer Faktor induziert werden, welcher in funktionaler Äquivalenz gemeinsam mit L YM3 die Immunität wiederherstellen kann. Ein analoges Prinzip konnte beispielsweise in Tabak beobachtet werden. Tabakpflanzen, welche defizient bezüglich einer  $\beta$ -1,3-Glucanase waren, die zur Immunität gegenüber Pilzinfektionen beiträgt, zeigten spezifisch nach Pilzinfektionen die Produktion eines funktionell äquivalenten Enzyms. Dieses Enzym konnte die Abwesenheit der Glucanaseaktivität als „Ersatz“-Aktivität kompensieren (Beffa und Meins, 1996; Beffa *et al.*, 1993). Deswegen sollte in zukünftigen Experimenten die Zusammensetzung eines funktionalen und putativen physischen PGN-Rezeptorkomplexes nach bakteriellen Infektionen nicht nur in Wildtyppflanzen sondern auch in L YM1- bzw. L YM3-defizienten Pflanzen untersucht werden. Zusätzlich könnten Gene, deren Expression in L YM1-defizienten Pflanzen spezifisch durch PGN oder bakterielle Infektionen induziert wird, als Kandidaten für unbekannte kompensatorische Faktoren angesehen werden.

### **5.5 Die PGN-Erkennung in Tieren und Pflanzen ist durch konvergente Evolution entstanden**

Mit der Beschreibung eines PGN-Perzeptionssystems in Pflanzen wird deutlich, dass PGN in Säugetieren, Insekten und Pflanzen nicht nur Immunreaktionen auslöst, sondern dass alle diese Organismen spezifische PGN-Erkennungssysteme besitzen (Ergebnisse dieser Arbeit, 1.5 und Dziarski und Gupta, 2005). PGN stellt ein bakterielles MAMP dar, dessen Perzeption in eukaryontischen Wirten weiter verbreitet ist, als die der bislang charakterisierten MAMPs Flagellin und LPS, welche z.B. in *Drosophila* nicht erkannt werden (Charroux *et al.*, 2009; Leulier *et al.*, 2003).

LysM-Proteine stellen dabei eine neue Form des PGN-Rezeptors dar. Sie zeigen keine Sequenzverwandtschaft mit den PGN-Rezeptoren der Säugetiere NOD1, NOD2, TLR2 oder mit den Peptidoglycanerkennungsproteinen der PGRPs der Insekten (Tabelle 5.1 und 1.5 sowie Dziarski und Gupta, 2010; Kurata *et al.*, 2010; Müller-Anstett *et al.*, 2010; Royet und Dziarski, 2007; Strober *et al.*, 2006). Dennoch erfüllen sie grundsätzlich ähnliche Funktionen:

(i) Die direkte Interaktion mit PGN als Voraussetzung eines Erkennungsprozesses, der (ii) zur Initiation einer spezifischen Abwehrantwort gegen bakterielle Infektionen führt.

Die konzeptionelle Konvergenz der Mustererkennung erfolgt aber nach unterschiedlichen strukturellen Grundlagen. Das Lysin-Motiv scheint als Modul der PGN-Mustererkennungsrezeptoren

eine spezifische, unabhängige Entwicklung in Pflanzen darzustellen (Ergebnisse dieser Arbeit, 1.7 und Buist *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009).

Ein weiteres Argument für eine konvergente Evolution der PGN-Perzeption ist die unterschiedliche Ligandenspezifität der PGN-Perzeptionssysteme. So besitzen die bisher beschriebenen tierischen PGN-Rezeptoren Anforderungen an die molekularen PGN-Muster, die nicht mit denen von LYM3/CERK1 verglichen werden können. Es werden oft MurNAc-Monomere, welche mit Peptidresten assoziiert sind, wie z.B. Muramyltripeptide durch PGRPs oder das Muramyl-dipeptid, durch NOD2, erkannt (Tabelle 5.1 und die Ergebnisse dieser Arbeit, 1.5 und Dziarski und Gupta, 2010; Kurata *et al.*, 2010; Müller-Anstett *et al.*, 2010; Royet und Dziarski, 2007; Strober *et al.*, 2006, Gust *et al.*, 2007). Das pflanzliche PGN-Perzeptionssystem scheint sich aber auf das Glycanrückgrat des PGN als antigene Determinante zu stützen und differenziert dabei nicht zwischen DAP- oder Lys-Typ-PGN (Abbildung 4.17, Abbildung 4.18, Abbildung 4.20 und Gust *et al.*, 2007; Erbs *et al.*, 2008).

**Tabelle 5.1 Peptidoglycanerkennungsproteine**

Herkunft	Erkennungsprotein	PGN-Bindemodul	erkannte PGN-Struktur	Art des PGN	Funktion
Säugetiere	TLR2 <sup>1</sup>	Leucin-reiche Wiederholungen	polymeres PGN	DAP- und Lys-Typ	Proinflammatorisch, NF-κB-Weg
	NOD1 <sup>2</sup>		L-Ala-D-Glu-m-DAP		
	NOD2 <sup>3</sup>		MurNAc-L-Ala-D-Glu		
	PGLYRP1 <sup>4</sup>	PGRP-PGN-Bindedomäne (ähnlich T7-Lysozym)	Muramyltripeptid	Lys-Typ	antibakteriell
	PGLYRP2 <sup>5</sup>				Amidase, proinflammatorisch
PGLYRP3 <sup>4</sup>	antibakteriell				
PGLYRP4 <sup>4</sup>	antibakteriell				
Insekten	PGRP-SA <sup>6</sup> , -SD <sup>7</sup>	PGRP-PGN-Bindedomäne (ähnlich T7-Lysozym)	Muramyltripeptid	Lys-Typ	Toll-Weg
	PGRP-SA <sup>6</sup>				Toll-Weg, Phagozytose, Carboxypeptidase
	PGRP-S, -LE <sup>8</sup>				Prophenoloxidase
	PGRP-SC1b, -LB <sup>9</sup>				Amidase, Immunmodulator
	PGRP-LC, -LE <sup>10</sup>			DAP-Typ	Immune deficiency Pfad
Pflanzen	LYM3/CERK1	Lysin-Motive	wahrscheinlich (GlcNAc-MurNAc)x Rückgrat	DAP- und Lys-Typ	MAMP-vermittelte Immunität

allgemein: Royet und Dziarski, 2007; Dziarski, 2005; <sup>1</sup>(Yoshimura *et al.*, 1999; Takeuchi *et al.*, 1999; Schwandner *et al.*, 1999; Müller-Anstett *et al.*, 2010), <sup>2</sup>(Girardin *et al.*, 2003; Chamaillard *et al.*, 2003), <sup>3</sup>(Inohara *et al.*, 2003; Girardin *et al.*, 2003), <sup>4</sup>(Lu *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007), <sup>5</sup>(Wang *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; DePauw *et al.*, 1995), <sup>6</sup>(Michel *et al.*, 2001), <sup>7</sup>(Bischoff *et al.*, 2004), <sup>8</sup>(Takehana *et al.*, 2004), <sup>9</sup>(Mellroth *et al.*, 2003), <sup>10</sup>(Choe *et al.*, 2005; Kaneko *et al.*, 2004)



## Diskussion

Bisher galt die Perzeption von Flagellin als Paradigma der Nutzung analoger, regulatorischer Module der angeborenen Immunität in Tieren und Pflanzen in Folge konvergenter Evolution (1.2 und Ausubel, 2005; Nürnberger *et al.*, 2004). Der tierische Toll-like-Rezeptor TLR5 zeigt die konzeptionelle Verwandtschaft zu seinem, nach der Sequenz unverwandten, pflanzlichen Gegenpart, FLS2 (1.2 und Smith *et al.*, 2003; Gómez-Gómez und Boller, 2000; Gómez-Gómez *et al.*, 1999). LYM3/CERK1 erkennt im Vergleich zu den tierischen PGN-Rezeptoren andere Strukturmerkmale des PGN. Dies ist analog zu FLS2 und TLR5, die unterschiedliche Epitope innerhalb des Flagellins erkennen (Gómez-Gómez und Boller, 2000; Smith *et al.*, 2003).

Die PGN-Perzeption scheint also in analoger Weise zur Flagellinperzeption in verschiedenen biologischen Reichen durch konvergente Evolution entstanden zu sein. Dies bestätigt die früher getroffene Vermutung, dass das angeborene Immunsystem in Metazoen und Pflanzen sich zwar konzeptionell ähnelt, strukturell jedoch nicht verwandt ist (Ausubel, 2005; Nürnberger *et al.*, 2004; Zipfel und Felix, 2005).

## 6 Zusammenfassung

Mikroben-assoziierte molekulare Muster (MAMPs) lösen in Pflanzen Immunreaktionen aus. Ein Beispiel hierfür ist Peptidoglycan (PGN), ein essentieller Bestandteil bakterieller Zellwände. Peptidoglycan aus Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien induziert typische Immunreaktionen in *A. thaliana*.

In dieser Arbeit wurden mit LYM3 und CERK1 zwei Proteine mit Lysin-Motiven (LysM) in *A. thaliana* identifiziert, die jeweils beide für die Perzeption von hochaufgereinigtem PGN und die Induktion der *A. thaliana* Wirtsimmunität gegenüber bakteriellen Infektionen notwendig sind. LYM3 ist durch einen Glycosylphosphatidylinositolanker mit der pflanzlichen Cytoplasmamembran assoziiert und besitzt eine extrazelluläre Domäne aus zwei Lysin-Motiven. Mit Hilfe dieser Domäne bindet LYM3 spezifisch und reversibel PGN. CERK1 ist eine membranständige Rezeptor-ähnliche Kinase mit einer extrazellulären Domäne aus drei Lysin-Motiven. CERK1 bindet PGN selbst nicht. LYM3 und CERK1 bilden somit ein Rezeptorsystem zur PGN-Perzeption in *A. thaliana*. LYM3 und CERK1 erkennen gleichermaßen PGN des Lys- und des DAP-Typs. *A. thaliana* besitzt ein Erkennungssystem, welches nicht zwischen Gram-positivem und Gram-negativem PGN unterscheidet.

Lysin-Motive sind bekannte Bindemotive für Kohlehydratoligomere aus N-Acetylglucosaminmonomeren. Die Perzeption von PGN durch LysM-Proteine neben der von pilzlichem Chitin oder rhizobiellen Nodulationsfaktoren bestätigt die Bedeutung dieser Rezeptorklasse für die pflanzliche Erkennung mikrobieller, molekularer Muster mit GlcNAc-haltigem Glycanrückgrat. LysM-Proteine vermitteln sowohl antagonistische wie auch symbiontischen Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroben.

PGN ist als konserviertes, prominentes, bakterielles Oberflächenmolekül von essentieller Bedeutung für die Integrität von Bakterien und existiert in Eukaryonten nicht. Daher ist es prädestiniert als Mikroben-assoziiertes molekulares Muster. Die Erkennung von PGN über die Grenzen der biologischen Reiche hinweg kann als Folge konvergenter Evolution interpretiert werden. PGN stellt somit eines der molekularen Muster dar, deren spezifische Erkennung in multizellulären Eukaryonten sehr weit verbreitet ist und in Wirbeltieren, Insekten und Pflanzen zu finden ist.

## 7 Literatur

- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., Martin, G. B.** (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 7(8), 601-11.
- Akira, S., Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature reviews. Immunology*, 4(7), 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4), 783-801.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E. D., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., et al.** (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *The Plant Journal*, 34(4), 495-506.
- Apel, K., Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual review of plant biology*, 55, 373-99.
- Arrighi, J.-F., Barre, A., Ben Amor, B., Bersoult, A., Soriano, L. C., Mirabella, R., et al.** (2006). The *Medicago truncatula* lysin [corrected] motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes. *Plant physiology*, 142(1), 265-79.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., et al.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, 415(6875), 977-83.
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Molecular Microbiology*, 49(6), 1537-46.
- Barnich, N., Aguirre, J. E., Reinecker, H.-C., Xavier, R., Podolsky, D. K.** (2005). Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- $\kappa$ B activation in muramyl dipeptide recognition. *The Journal of cell biology*, 170(1), 21-6.
- Bateman, A., Bycroft, M.** (2000). The structure of a LysM domain from *E. coli* membrane-bound lytic murein transglycosylase D (MltD). *Journal of Molecular Biology*, 299(4), 1113–1119.
- Baureithel, K., Felix, G., Boller, T.** (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *The Journal of biological chemistry*, 269(27), 17931-8.
- Bechtold, N., Pelletier, G.** (1998). In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in molecular biology*, 82, 259-66.
- Becking, J. H.** (1979). Root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and *Parasponia* (Ulmaceae). *Plant and Soil*, 51(2), 289-296.
- Beffa R. S., Neuhaus J. M., Meins F.** (1993). Physiological compensation in antisense transformants, specific induction of an "ersatz" glucan endo-1,3-beta-glucosidase in plants infected with necrotizing viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 8792-6.

- Beffa R. S., Meins F.** (1996). Pathogenesis-related functions of plant beta-1,3-glucanases investigated by antisense transformation - a review. *Gene*, 179, 97-103.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Heijne, G. von, Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology*, 340(4), 783-95.
- Bera, A., Herbert, S., Jakob, A., Vollmer, W., Götz, Friedrich.** (2005). Why are pathogenic staphylococci so lysozyme resistant? The peptidoglycan O-acetyltransferase OatA is the major determinant for lysozyme resistance of *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology*, 55(3), 778-87.
- Berg, H. C., Anderson, R. A.** (1973). Bacteria swim by rotating their flagellar filaments. *Nature*, 245(5425), 380-2.
- Beveridge, T. J.** (2001). Use of the gram stain in microbiology. *Biotechnic histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 76(3), 111-8.
- Bhalla U. S., Iyengar R.** (1999). Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* (283), 381-7.
- Bielnicki, J., Devedjiev, Y., Derewenda, U., Dauter, Z., Joachimiak, A., Derewenda, Z. S.** (2006). B. subtilis ykuD protein at 2.0 Å resolution: insights into the structure and function of a novel, ubiquitous family of bacterial enzymes. *Proteins*, 62(1), 144-51.
- Bischoff V., Vignal C., Boneca I. G., Michel T., Hoffmann J. A., Royet J.** (2004). Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nature immunology*, 5, 1175-80.
- Bishop, J. L., Boyle, E. C., Finlay, B. B.** (2007). Deception point: peptidoglycan modification as a means of immune evasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), 691-2.
- Biswas, R., Voggu, L., Simon, U. K., Hentschel, P., Thumm, G., Götz, Friedrich.** (2006). Activity of the major staphylococcal autolysin Atl. *FEMS microbiology letters*, 259(2), 260-8.
- Block, A., Li, G., Fu, Z. Q., Alfano, J. R.** (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Current opinion in plant biology*, 11(4), 396-403.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant cell*, 12(8), 1425-40.
- Bokma E., van Koningsveld G. A., Jeronimus-Stratingh M., Beintema J. J.** (1997). Hevamine, a chitinase from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. *FEBS Letters*, 411(2-3), 161-3.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 46(1), 189-214.

- Boller, T., Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, *60*, 379-406.
- Bolwell G. P.** (1999). Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Current opinion in plant biology*, *2*, 287-94.
- Boneca, I. G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.-A., Sousa, S., Lecuit, M., et al.** (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(3), 997-1002.
- Boothby, D., Daneo-Moore, L., Higgins, M. L., Coyette, J., Shockman, G. D.** (1973). Turnover of bacterial cell wall peptidoglycans. *The Journal of biological chemistry*, *248*(6), 2161-9.
- Borner, G. H. H., Lilley, K.S., Stevens, T. J., Dupree, P.** (2003). Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A proteomic and genomic analysis. *Plant physiology*, *132*(2), 568-77.
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Stevens, T. J., Arkin, I. T., Dupree, P.** (2002). Prediction of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in Arabidopsis. A genomic analysis. *Plant Physiology*, *129*(2), 486-99.
- Borner, G. H. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., MacAskill, A., et al.** (2005). Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant physiology*, *137*(1), 104-16.
- Botos I., Segal D. M., Davies D. R.** (2011). The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure*, *19*, 447-59.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*, 248-54.
- Braun, V., Fischer, E., Hantke, K., Heller, K., Roterling, H.** (1985). Functional aspects of gram-negative cell surfaces. *Sub-cellular biochemistry*, *11*, 103-80.
- Braun, V., Hantke, K.** (1974). Biochemistry of bacterial cell envelopes. *Annual review of biochemistry*, *43*, 89-121.
- Brown, D. A., Rose, J. K.** (1992). Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, *68*(3), 533-44.
- Brown, D. A.** (2006). Lipid rafts, detergent-resistant membranes, and raft targeting signals. *Physiology*, *21*, 430-9.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J. J., Geiler, C., Kauppinen, S., et al.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO journal*, *21*(24), 6681-8.

- Buist, G., Karsens, H., Nauta, A., Sinderen, D. van, Venema, G., Kok, J.** (1997). Autolysis of *Lactococcus lactis* caused by induced overproduction of its major autolysin, AcmA. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2722-8.
- Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K. J., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, A. J.** (1995). Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *Journal of bacteriology*, 177(6), 1554-63.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., Kuipers, O. P.** (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Molecular microbiology*, 68(4), 838-47.
- Cao, S., Jiang, L., Song, S., Jing, R., Xu, G.** (2006). AtGRP7 is involved in the regulation of abscisic acid and stress responses in *Arabidopsis*. *Cellular & molecular biology letters*, 11(4), 526-35.
- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., et al.** (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid. *Nature immunology*, 4(7), 702-7.
- Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., Frendo, P.** (2009). Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. *Molecular plant*, 2(3), 370-7.
- Chang, C.-I., Pili-Floury, Sébastien, Hervé, M., Parquet, C., Chelliah, Y., Lemaitre, B., et al.** (2004). A *Drosophila* pattern recognition receptor contains a peptidoglycan docking groove and unusual L,D-carboxypeptidase activity. *PLoS biology*, 2(9), E277.
- Charroux B., Rival T., Narbonne-Reveau K., Royet J.** (2009). Bacterial detection by *Drosophila* peptidoglycan recognition proteins. *Microbes and infection*, 11, 631-6.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., Kemmerling, B.** (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in plant science*, 14(10), 535-41.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., et al.** (2007a). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497-500.
- Cho J. H., Fraser I. P., Fukase K., Kusumoto S., Fujimoto Y., Stahl G. L., Ezekowitz R. A.** (2005). Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood*, 106, 2551-8.
- Choe, K.-M., Lee, H., Anderson, K. V.** (2005). *Drosophila* peptidoglycan recognition protein LC (PGRP-LC) acts as a signal-transducing innate immune receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1122-6.
- Choe, K.-M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, Dan, Anderson, K. V.** (2002). Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5566), 359-62.

- Clough, S. J., Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal*, *16*(6), 735-43.
- Cooper, E. L.** (2008). From Darwin and Metchnikoff to Burnet and beyond. *Contributions to microbiology*, *15*, 1-11.
- Cooper, R. M.** (1983). The mechanism and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. *Biochemical Plant Pathology*, 101-137.
- Cossart, P., Toledo-Arana, A.** (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes and infection* *10*(9), 1041-50.
- Côté F., Ham K. S., Hahn M. G., Bergmann C. W.** (1998). Oligosaccharide elicitors in host-pathogen interactions. Generation, perception, and signal transduction. *Sub-cellular biochemistry*, *29*, 385-432.
- Cowan, S., W., Schirmer, T., Rummel, G., Steiert, M., Ghosh, R., Pauptit, R. A., Jansonius, J. N., Rosenbusch, J. P.** (1992). Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature*, *358*, 727-733.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., Bono, J. J.** (2001). Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends in plant science*, *6*(1), 24-30.
- Dangl, J. L., Jones, J. D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, *411*(6839), 826-33.
- Davis, K. M., Weiser, J. N.** (2011). Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection. *Infection and immunity*, *79*(2), 562-70.
- Day R. B., Okada M., Ito Y., Tsukada K., Zaghouni H., Shibuya N., Stacey G.** (2001). Binding site for chitin oligosaccharides in the soybean plasma membrane. *Plant Physiology*. *126*(3), 1162-73.
- De Duve, C., Wattiaux, R.** (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, *28*, 435-92.
- Dempsey, P. W., Vaidya, S. A., Cheng, G.** (2003). The art of war: Innate and adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences* *60*(12), 2604-21.
- De Pauw P., Neyt C., Vanderwinkel E., Wattiez R., Falmagne P.** (1995). Characterization of human serum N-acetylmuramyl-L-alanine amidase purified by affinity chromatography. *Protein expression and purification*, *6*, 371-8.
- Deng, W., Preston, G., Collmer, A, Chang, C. J., Huang, H. C.** (1998). Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *Journal of bacteriology*, *180*(17), 4523-31.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., et al.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(13), 8024-9.

- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., Hébraud, M.** (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS microbiology letters*, 256(1), 1-15.
- De Vos M., Van Oosten V. R., Van Poecke R. M., Van Pelt J. A., Pozo M. J., Mueller M. J., Buchala AJ, Métraux J. P., Van Loon L. C., Dicke M., Pieterse C. M.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(9), 923-37.
- Di Rubbo S., Irani N. G., Russinova E.** (2011). PP2A Phosphatases, The “On-Off” Regulatory Switches of Brassinosteroid Signaling. *Science signaling*, 4, pe25.
- Dixon, R. A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-7.
- Dramsi, S., Magnet, S., Davison, S., Arthur, M.** (2008). Covalent attachment of proteins to peptidoglycan. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 307-20.
- Dziarski, R, Tapping, R. I., Tobias, P. S.** (1998). Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *The Journal of biological chemistry*, 273(15), 8680-90.
- Dziarski, R., Gupta, D.** (2005). Peptidoglycan recognition in innate immunity. *Journal of endotoxin research*, 11(5), 304-10.
- Dziarski, R., Gupta, D.** (2006). Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cellular microbiology*, 8(7), 1059-69.
- Dénarié, J., Debellé, F., Promé, J. C.** (1996). Rhizobium lipo-chitoooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annual review of biochemistry*, 65, 503-35.
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, 19(6), 1349.
- Eisenhaber, B., Bork, P., Eisenhaber, F.** (1999). Prediction of potential GPI-modification sites in proprotein sequences. *Journal of molecular biology*, 292(3), 741-58.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., et al.** (2008). Peptidoglycan and muropeptides from pathogens Agrobacterium and Xanthomonas elicit plant innate immunity: structure and activity. *Chemistry & biology*, 15(5), 438-48.
- Felix, G, Duran, J. D., Volko, S., Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 18(3), 265-76.
- Felix, Georg, Boller, T.** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *The Journal of biological chemistry*, 278(8), 6201-8.



- Felix, G., Regenass, M., Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal*, 4(2), 307-316.
- Filipe, S. R., Tomasz, A., Ligoxygakis, P.** (2005). Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the *Drosophila* Toll pathway. *EMBO reports*, 6(4), 327-33.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G., Ebel, J.** (2004, January). An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *The Journal of biological chemistry*.
- Fliegmann, J., Uhlenbroich, S., Shinya, T., Martinez, Y., Lefebvre, B., Shibuya, N., Bono, J.-J.** (2011) Biochemical and phylogenetic analysis of CEBiP-like LysM domain-containing extracellular proteins in higher plants. *Plant physiology and biochemistry*, 49(7), 709-20.
- Flor, H. H.** (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Fritz, J. H., Ferrero, R. L., Philpott, D. J., Girardin, S. E.** (2006). Nod-like proteins in immunity, inflammation and disease. *Nature immunology*, 7(12), 1250-7.
- Fu, Z. Q., Guo, M., Jeong, B. R., Tian, F., Elthon, T. E., Cerny, R. L., et al.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature*, 447(7142), 284-8. doi: 10.1038/nature05737.
- de la Fuente van Bentem, S., Hirt, H.** (2007). Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends in plant science*, 12(9), 404-11.
- Ghuysen, J. M., Tipper, D. J., Strominger, J. I.** (1966). Enzymes that degrade bacterial cell walls. *Methods in Enzymology*, 8, 685–699.
- Gietz, R. D., Woods, R. A.** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology*, 350, 87-96.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D. R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J. P.** (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Current biology : CB*, 19(5), 423-9.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Carneiro, L. A. M., Antignac, A., Jéhanno, M., Viala, J., et al.** (2003). Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), 1584-7.
- Glauert, A. M., Thornley, M. J.** (1969). The topography of the bacterial cell wall. *Annual review of microbiology*, 23, 159-98.
- Glauner, B.** (1988). Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry*, 172(2), 451-64.

- Glazebrook , J., Chen, W., Estes, B., Chang, H. S., Nawrath, C., Métraux, J. P., Zhu T Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The plant journal*, 34(2), 217-28.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A. A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M., et al.** (2003). Dual activation of the Drosophila toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science*, 302(5653), 2126-30.
- Goodell, E. W., Fazio, M., Tomasz, A.** (1978). Effect of benzylpenicillin on the synthesis and structure of the cell envelope of Neisseria gonorrhoeae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 13(3), 514-26.
- Goodell, E. W., Schwarz, U.** (1985). Release of cell wall peptides into culture medium by exponentially growing Escherichia coli. *Journal of bacteriology*, 162(1), 391-7.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, Tatiana, Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, Jules A, et al.** (2002). The Drosophila immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 416(6881), 640-4.
- Gough C., Cullimore J.** (2011). Lipo-chitooligosaccharide Signalling in Endosymbiotic Plant-Microbe Interactions. *Molecular plant-microbe interactions , MPMI.*
- Gousset, K., Krishnamoorthy, G., Rao, M., Mayor, S., et al.** (2004). Nanoscale organization of multiple GPI-anchored proteins in living cell membranes. *Cell*, 116(4), 577-89.
- Gram, C.** (1884). Über die isolierte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Fortschritte der Medicin*, 2, 185-189.
- Granado, J., Felix, G., Boller, T.** (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant physiology*, 107(2), 485-490.
- Grant, S. R., Fisher, E. J., Chang, J. H., Mole, B. M., Dangl, J. L.** (2006). Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual review of microbiology*, 60, 425-49.
- Guan, R., Wang, Q., Sundberg, E. J., Mariuzza, R. A.** (2005). Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. *Journal of molecular biology*, 347(4), 683-91.
- Gupta, D., Kirkland, T. N., Viriyakosol, S., Dziarski, R.** (1996). CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 271(38), 23310-6.
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., et al.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry*, 282(44), 32338-48.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell*, 5(6), 1003-11.

- Gómez-Gómez, L., Felix, G., Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal* 18(3), 277-84.
- Gómez-Gómez, L., Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in plant science*, 7(6), 251-6.
- Göhre, V., Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology*, 46, 189-215.
- Grabherr, H.** (2011). Dissertation (*in Vorbereitung*)
- Gürlebeck, D., Thieme, F., Bonas, U.** (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *Journal of plant physiology*, 163(3), 233-55.
- Hamel, L.-P., Beudoin, N.** (2010). Chitooligosaccharide sensing and downstream signaling: contrasted outcomes in pathogenic and beneficial plant-microbe interactions. *Planta*, 232(4), 787-806.
- Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Rathjen, J. P.** (2010). Bacterial virulence effectors and their activities. *Current opinion in plant biology*, 13(4), 388-393.
- Hansen, B. G., Halkier, B. A.** (2005). New insight into the biosynthesis and regulation of indole compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 221(5), 603-6.
- Hartwell L. H., Hopfield J. J., Leibler S., Murray A. W.** (1999). From molecular to modular cell biology. *Nature*, 402, C47-52.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., et al.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 410(6832), 1099-103.
- He, K., Gou, X., Powell, R. A., Yang, H., Yuan, T., Guo, Z., et al.** (2008). Receptor-like protein kinases, BAK1 and BKK1, regulate a light-dependent cell-death control pathway. *Plant signaling & behavior*, 3(10), 813-5.
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, Shigeo, et al.** (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Current biology*, 17(13), 1109-15.
- Heath, M. C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current opinion in plant biology*, 3(4), 315-9.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M. E., He, K., Li, Jia, et al.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 12217-22.

- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D. I., Petersen, N. H. T., Mattsson, O., et al.** (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell*, 137(4), 773-83.
- Horvath, P., Barrangou, R.** (2010). CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), 167-70.
- Humann, J., Lenz, L. L.** (2009). Bacterial Peptidoglycan-Degrading Enzymes and Their Impact on Host Muropeptide Detection. *Journal of Innate Immunity*, 1(2), 88-97.
- Iizasa, E., Mitsutomi, M., Nagano, Y.** (2010). Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. *The Journal of biological chemistry*, 285(5), 2996-3004.
- Indrasumunar, A., Gresshoff, P. M.** (2010). Duplicated nod-factor receptor 5 (NFR5) genes are mutated in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant signaling & behavior*, 5(5).
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., Nuñez, G.** (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *The Journal of biological chemistry* (278), 5509-12.
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96(1), 23-8.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U., et al.** (2003). Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, 4(2), 249-64.
- Ito, Y., Kaku, H., Shibuya, N.** (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant journal* 12(2), 347-56.
- Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Murakami, S., Sano, H., Konishi, M., Akino, T., et al.** (2002). The extracellular toll-like receptor 2 domain directly binds peptidoglycan derived from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of biological chemistry*, 277(27), 24315-20.
- Janeway, C. A.** (1989). Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunology today*, 10(9), 283-6.
- Janeway, C. A.** (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C. A., Medzhitov, R.** (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology*, 20, 197-216.
- Jin M. S., Kim S. E., Heo J. Y., Lee M. E., Kim H. M., Paik S.-G., Lee H., Lee J.-O.** (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell*, 130, 1071-82.

- Jin, M. S., Lee, J.-O.** (2008). Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29(2), 182-91.
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-9.
- de Jonge, B. L., Chang, Y. S., Gage, D., Tomasz, A.** (1992). Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A. *The Journal of biological chemistry*, 267(16), 11248-54.
- Jordan, J. D., Emmanuel M. Landau, E. M., Iyengar, R.** (2000). Signaling Networks: The Origins of Cellular Multitasking. *Cell*, 103, 193-200
- Kaiser, C.** (1994). *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., et al.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(29), 11086-91.
- Kaneko T., Goldman W. E., Mellroth P., Steiner H., Fukase K., Kusumoto S., Harley W., Fox A., Golenbock D., Silverman N.** (2004). Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20, 637-49.
- Kamio, Y., Nikaïdo, H.** (1976). Outer membrane of *Salmonella typhimurium*: Accessibility of phospholipid head groups to phospholipase c and cyanogen bromide activated dextran in the external medium. *Biochemistry*, 15, 2561 – 2570.
- Kang, D., Liu, G., Lundström, A., Gelius, E., Steiner, H.** (1998). A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 10078-82.
- Kang J. Y., Nan X., Jin M. S., Youn S.-J., Ryu Y. H., Mah S., Han S. H., Lee H., Paik S.-G., Lee J.-O.** (2009). Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity*, 31, 873-84.
- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A.** (2002). GATEWAY (TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195.
- Katiyar-Agarwal, S., Morgan, R., Dahlbeck, D., Borsani, O., Villegas, A., Zhu, J.-K., et al.** (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(47), 18002-7.
- Kawai, T., Akira, S.** (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International immunology*, 21(4), 317-37.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G., Bonas, U.** (2007). A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, 318(5850), 648-51.

- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Wieduwild, R., Bonas, U.** (2009). Detailed analysis of the DNA recognition motifs of the *Xanthomonas* type III effectors AvrBs3 and AvrBs3Deltarep16. *The Plant journal*, 59(6), 859-71.
- Keinath, N. F., Kierszniowska, S., Lorek, J., Bourdais, G., Kessler, S. A., Asano, H., et al.** (2010). PAMP-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *The Journal of biological chemistry*, (6), 1-18.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S. A., et al.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Current biology*, 17(13), 1116-22.
- Kim, H. S., Desveaux, D., Singer, A. U., Patel, P., Sondek, J., Dangl, J. L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(18), 6496-501.
- Kim, J. G., Jeon, E., Oh, J., Moon, J. S. Hwang, I.** (2004). Mutational Analysis of *Xanthomonas* Harpin HpaG Identifies a Key Functional Region That Elicits the Hypersensitive Response in Nonhost Plants. *Journal of bacteriology*, 186(18), 6239-6247.
- Kinoshita, T., Caño-Delgado, A., Seto, Hideharu, Hiranuma, S., Fujioka, Shozo, Yoshida, Shigeo, et al.** (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, 433(7022), 167-71.
- Kiselev, S. L., Kustikova, O. S., Korobko, E. V., Prokhortchouk, E. B., Kabishev, A. A., Lukanidin, E. M., et al.** (1998). Molecular cloning and characterization of the mouse tag7 gene encoding a novel cytokine. *The Journal of biological chemistry*, 273(29), 18633-9.
- Kishimoto, K., Kouzai, Y., Kaku, H., Shibuya, N., Minami, E., Nishizawa, Y.** (2010). Perception of the chitin oligosaccharides contributes to disease resistance to blast fungus *Magnaporthe oryzae* in rice. *The Plant Journal*, 64(2), 343-54
- Kocks, C., Cho, J. H., Nehme, N., Ulvila, J., Pearson, A. M., Meister, M., et al.** (2005). Eater, a transmembrane protein mediating phagocytosis of bacterial pathogens in *Drosophila*. *Cell*, 123(2), 335-46.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B., Hughes, C.** (2000). Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature*, 405(6789), 914-9.
- Kuc, J.** (1995). Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annual review of phytopathology*, 33, 275-97.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.
- Laird, J., Armengaud, P., Giuntini, P., Laval, V., Milner, J. J.** (2004). Inappropriate annotation of a key defence marker in *Arabidopsis*: will the real PR-1 please stand up? *Planta*, 219(6), 1089-92.

- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R. Pugin, A.** (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. *Plant Cell* 14,2627–41 .
- Lemmon, M. A., Schlessinger, J.** (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 141(7), 1117-34. 141(7):1117-34.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, Sebastien, Ryu, J.-H., Caroff, M., Lee, W.-J., et al.** (2003). The Drosophila immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nature immunology*, 4(5), 478-84.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., Walker, J. C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell*, 110(2), 213-222.
- Lindeberg, M., Cunnac, S., Collmer, A.** (2009). The evolution of Pseudomonas syringae host specificity and type III effector repertoires. *Molecular plant pathology*, 10(6), 767-75.
- Lingwood, D., Simons, K.** (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, 327(5961), 46-50.
- Litman, G. W., Cannon, J. P., Dishaw, L. J.** (2005). Reconstructing immune phylogeny: new perspectives. *Nature reviews. Immunology*, 5(11), 866-79.
- Liu, C., Xu, Z., Gupta, D, Dziarski, R.** (2001). Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *The Journal of biological chemistry*, 276(37), 34686-94.
- Liu, Y., Zhang, S.** (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant cell*, 16(12), 3386-99..
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup>. *Methods*, 25(4), 402-8.
- Low P. S., Merida J. R.** (1996). The oxidative burst in plant defense, Function and signal transduction. *Physiologia Plantarum*, 96, 533-542.
- Lu, X., Wang, M., Qi, J., Wang, H., Li, X., Gupta, Dipika, et al.** (2006). Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *The Journal of biological chemistry*, 281(9), 5895-907.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, 112(3), 379-89.
- Macnab, R. M.** (2003). How bacteria assemble flagella. *Annual review of microbiology*, 57, 77-100.

- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K.** (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature*, 425, 637-640.
- Maillet, F., Poinot, V., André, O., Puech-Pagès, V., Haouy, A., Gueunier, M., et al.** (2011). Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature*, 469(7328), 58-63.
- Marraffini, L. A., Dedent, A. C., Schneewind, O.** (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiology and molecular biology reviews*, 70(1), 192-221.
- Martin, G. B., Bogdanove, A. J., Sessa, G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology*, 54, 23-61.
- Mathur, P., Murray, B., Crowell, T., Gardner, H., Allaire, N., Hsu, Y.-M., et al.** (2004). Murine peptidoglycan recognition proteins Pglyrplalpha and Pglyrplbeta are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues. *Genomics*, 83(6), 1151-63.
- Mauck, J., Chan, L., Glaser, L.** (1971). Turnover of the cell wall of Gram-positive bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 246(6), 1820-7.
- Mellroth, P., Karlsson, J., Steiner, H.** (2003). A scavenger function for a Drosophila peptidoglycan recognition protein. *The Journal of biological chemistry*, 278(9), 7059-64.
- Mellroth, P., Steiner, H.** (2006). PGRP-SB1: an N-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(4), 994-9.
- Meyers, B. C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., Michelmore, R. W.** (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *The Plant cell*, 15(4), 809-34.
- Meziane, H., Van der Sluis, I., Van Loon, L. C., Höfte, M., Bakker, P. A.** (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular plant pathology*, 6(2), 177-85.
- Michel, T., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., Royet, J.** (2001). Drosophila Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature*, 414(6865), 756-9.
- Mitchell, P.** (1961). Approaches to the analysis of specific membrane transport. *Biological structure and function*, 581-603.
- Mithöfer, A., Ebel, J., Felle, H. H.** (2005). Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Molecular plant-microbe interactions*, 18(9), 983-90.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., et al.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19613-8.



- Mongrand, S., Stanislas, T., Bayer, E. M. F., Lherminier, J., Simon-Plas, F.** (2010). Membrane rafts in plant cells. *Trends in plant science*, 15(12), 656-63.
- Morath, S., Aulock, S. von, Hartung, T.** (2005). Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *Journal of endotoxin research*, 11(6), 348-56.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H. L., Goldsmith, E. J., et al.** (2006). Yersinia YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5777), 1211-4.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J., Imberty, A.** (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology*, 16(9), 801-9.
- Mullineaux, C. W., Nenninger, A., Ray, N., Robinson, C.** (2006). Diffusion of green fluorescent protein in three cell environments in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188(10), 3442-8.
- Müller, P., Müller-Anstett, M., Wagener, J., Gao, Q., Kaesler, S., Schaller, M., et al.** (2010). *Staphylococcus aureus* lipoprotein SitC co-localizes with TLR2 in murine keratinocytes and elicits intracellular TLR2 accumulation. *Infection and immunity*, 78(10), 4243-4250.
- Naito, K., Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T., et al.** (2008). Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(9), 1165-74.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., et al.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-9.
- Nikaido, H.** (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y. H., Pumplin, N., Jones, J., He, S. Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science*, 313(5784), 220-3.
- Nühse, T. S., Peck, S C, Hirt, H, Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), 7521-6.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews*, 198, 249-66.
- Nürnberger, T., Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology*, 6(3), 335-45.
- Oh, H. S., Park, D. H., Collmer, A.** (2010). Components of the *Pseudomonas syringae* type III secretion system can suppress and may elicit plant innate immunity. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(6), 727-39.

- Ohnuma, T., Onaga, S., Murata, K., Taira, T., Katoh, E.** (2008). LysM domains from *Pteris ryukyuensis* chitinase-A: a stability study and characterization of the chitin-binding site. *The Journal of biological chemistry*, 283(8), 5178-87.
- Ohsten Rasmussen, M., Hogg, B., Bono, J.-J., Samain, E., Driguez, H.** (2004). New access to lipochitooligosaccharide nodulation factors. *Organic & biomolecular chemistry*, 2(13), 1908-10.
- Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y., Shibuya, N.** (2002). High-affinity binding proteins for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation with the responsiveness to the elicitor. *Plant & cell physiology*, 43(5), 505-12.
- Oldroyd, G. E. D., Harrison, M. J., Paszkowski, U.** (2009). Reprogramming plant cells for endosymbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 753-4.
- Op den Camp, R., Streng, A., De Mita, S., Cao, Q., Polone, E., Liu, W., et al.** (2010). LysM-Type Mycorrhizal Receptor Recruited for Rhizobium Symbiosis in Nonlegume Parasponia. *Science*, (6019),909-12.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M. L., Panabieres, F., Marais, A., et al.** (2001). Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(9), 2825-34.
- Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., et al.** (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13766-71.
- Pagel, W., Heitfuss, R.** (1990). Enzyme activities in soft rot pathogenesis of potato tubers, Effects of calcium, pH, and degree of pectin esterification on the activities of polygalacturonase and pectate lyase. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 37, 9-25.
- Pancer, Z., Cooper, M. D.** (2006). The evolution of adaptive immunity. *Annual review of immunology*, 24, 497-518.
- Park, S.** (2002). Heterologous expression and characterization of class III chitinases from rice (*Oryza sativa* L.). *Enzyme and Microbial Technology*, 30(6), 697-702.
- Parniske, M.** (2008). Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews. Microbiology*, 6(10), 763-75.
- Peck, S. C., Nühse, T. S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., Boller, T.** (2001). Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *The Plant cell*, 13(6), 1467-75.
- Percudani, R., Montanini, B., Ottonello, S.** (2005). The anti-HIV cyanovirin-N domain is evolutionarily conserved and occurs as a protein module in eukaryotes. *Proteins*, 60(4), 670-8.

- Perret, X., Staehelin, C., Broughton, W. J.** (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(1), 180-201.
- Petutschnig, E. K., Jones, A. M. E., Serazetdinova, L., Lipka, U., Lipka, V.** (2010). The LysM-RLK CERK1 is a major chitin binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, (4), 1-21.
- Philpott, D. J., Girardin, S. E.** (2010). Nod-like receptors: sentinels at host membranes. *Current opinion in immunology*, 22(4), 428-434.
- Pirooznia, M., Nagarajan, V., Deng, Y.** (2007). GeneVenn - A web application for comparing gene lists using Venn diagrams. *Bioinformatics*, 1(10), 420-2.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., K ufner, I., Engelhardt, S., Gust, A. A, et al.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *The Plant cell*, 18(12), 3721-44.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Jurkiewicz, A., Fukai, E., Quistgaard, E. M. H., et al.** (2007). LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range. *The EMBO journal*, 26(17), 3923-35.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gr onlund, M., et al.** (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 425(6958), 585-92.
- Raetz, C. R. H., Whitfield, C.** (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 71, 635-700.
- Ride, J.** (1983). Cell Walls and Other Structural Barriers in Defense. *Biochemical Plant Pathology*, 215–236.
- Ridley B.L, O’Neill M. A., Mohnen D.** (2001). Pectins, structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry*, 57, 929-67.
- Robatzek, S., Chinchilla, D., Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20(5), 537-42.
- Ron, M., Avni, A.** (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Society*, 16, 1604-1615.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F. G., T or, M., de Vries, S., Zipfel, C.** (2011) The *Arabidopsis* Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 Are Required for Innate Immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic Pathogens. *Plant Cell*, [Epub ahead of print].
- Royet, J., Dziarski, R.** (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nature reviews. Microbiology*, 5(4), 264-77.

- Rubartelli, A., Lotze, M. T.** (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology*, 28(10), 429-36.
- Rämet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., Ezekowitz, R. A.** (2002). Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a Drosophila receptor for E. coli. *Nature*, 416(6881), 644-8.
- Römer, P., Strauss, T., Hahn, S., Scholze, H., Morbitzer, R., Grau, J., et al.** (2009). Recognition of AvrBs3-like proteins is mediated by specific binding to promoters of matching pepper Bs3 alleles. *Plant physiology*, 150(4), 1697-712.
- Sanabria, N. M., Huang, J.-chi, Dubery, A.** (2010). Self / nonself perception in plants in innate immunity and defense. *Self(Nonself)*, 1(1), 40-54.
- Sankaran, K., Wu, H. C.** (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *The Journal of biological chemistry*, 269(31), 19701-6.
- Schlessinger, J.** (1988). Signal transduction by allosteric receptor oligomerization. *Trends in biochemical sciences*, 13, 443-7.
- Schlessinger, J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 103(2), 211-25.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A. K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., et al.** (2010). Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of biological chemistry*, 285(13), 9444-51.
- Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M., Kirschning, C. J.** (1999). Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *The Journal of biological chemistry*, 274, 17406-9.
- Shahollari, B., Varma, A., Oelmüller, R.** (2005). Expression of a receptor kinase in Arabidopsis roots is stimulated by the basidiomycete Piriformospora indica and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *Journal of plant physiology*, 162(8), 945-58.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nürnberger, T., et al.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host & Microbe*, 4, 17-27.
- Shapiro, A. D., Zhang, C.** (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in Arabidopsis. *Plant physiology*, 127(3), 1089-101.
- Shasha, D. E., Coruzzi, G. M., Gutie, R. A.** (2005). Systems Biology for the Virtual Plant 1, 138(June), 550-554.
- Shibuya, N.** (2001). Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 59(5), 223-233.

- Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K., Maliarik, M. J.** (1993). Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. *FEBS letters*, 329(1-2), 75-8.
- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., et al.** (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal*, 64(2), 204-214.
- Shiu, S. H., Bleecker, A. B.** (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10763-8.
- Silhavy, T. J., Kahne, D., Walker, S.** (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(5), a000414.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J. M., Erbs, G., Lanzetta, R., et al.** (2005). The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *The Journal of biological chemistry*, 280(39), 33660-8.
- Silipo, A., Sturiale, L., Garozzo, D., Erbs, G., Jensen, T. T., Lanzetta, R., et al.** (2008). The acylation and phosphorylation pattern of lipid A from *Xanthomonas campestris* strongly influence its ability to trigger the innate immune response in Arabidopsis. *Chembiochem*, 9(6), 896-904.
- Simons, K., Gerl, M. J.** (2010). Revitalizing membrane rafts: new tools and insights. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(10), 688-699.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C., et al.** (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant physiology*, 145(1), 183-91.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., et al.** (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology*, 4(12), 1247-53.
- Smyth, G. K.** (2004). Linear Models and Empirical Bayes Methods for Assessing Differential Expression in Microarray Experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology*, 3(1).
- Staehelin, C., Granada, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R. B., Felix, G., et al.** (1994). Perception of Rhizobium nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(6), 2196-200.
- Steen, A., Buist, G., Leenhouts, K. J., Khattabi, M. E., Grijpstra, F., Zomer, A. L., et al.** (2003). Cell wall attachment of a widely distributed peptidoglycan binding domain is hindered by cell wall constituents. *Journal of Biological Chemistry*, 278(26), 23874-81.

- Stenbak, C. R., Ryu, J. H., Leulier, F., Pili-Floury, Sebastien, Parquet, C., Hervé, M., et al.** (2004). Peptidoglycan molecular requirements allowing detection by the *Drosophila* immune deficiency pathway. *Journal of immunology*, 173(12), 7339-48.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M., Fritig, B.** (1993). Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, 75, 687-706.
- Storey, J. D.** (2003). The positive false discovery rate: a Bayesian interpretation and the  $q$ -value. *The Annals of Statistics*, 31(6), 2013-2035.
- Swaminathan, C. P., Brown, P. H., Roychowdhury, A., Wang, Q., Guan, R., Silverman, N., et al.** (2006). Dual strategies for peptidoglycan discrimination by peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(3), 684-9.
- Szurek, B., Rossier, O., Hause, G., Bonas, U.** (2002). Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular microbiology*, 46(1), 13-23.
- Taguchi, F., Takeuchi, K., Katoh, E., Murata, K., Suzuki, T., Marutani, M., et al.** (2006). Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. tabaci. *Cellular microbiology*, 8(6), 923-38.
- Taguchi, F., Yamamoto, M., Ohnishi-Kameyama, M., Iwaki, M., Yoshida, M., Ishii, T., et al.** (2010). Defects in flagellin glycosylation affect the virulence of *Pseudomonas syringae* pv. tabaci 6605. *Microbiology*, 156(1), 72-80.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., et al.** (2002). Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13705-10.
- Takehana, A., Yano, T., Mita, S., Kotani, A., Oshima, Y., Kurata, S.** (2004). Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *The EMBO journal*, 23(23), 4690-700.
- Takeuchi, O., Hoshino, K., Kawai, T., Sanjo, H., Takada, H., Ogawa, T., Takeda, K., Akira, S.** (1999). Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*, 11, 443-51.
- Tang, X., Xiao, Y., Zhou, J. M.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Molecular plant-microbe interaction*, 19(11), 1159-66.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H. S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The plant cell*, 15(2):317-30.

- Tellström, V., Usadel, B., Thimm, O., Stitt, M., Küster, H., Niehaus, K.** (2007). The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant physiology*, *143*(2), 825-37.
- Thomma, B. P., Nelissen, I., Eggermont, K., Broekaert, W. F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant journal*, *19*(2), 163-71.
- Thomma, B. P., Nürnberger, T., Joosten, M. H.** (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The plant cell*, *23*(1), 4-15.
- Travassos, L. H., Girardin, S. E., Philpott, D. J., Blanot, D., Nahori, M.-A., Werts, C., et al.** (2004). Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO reports*, *5*(10), 1000-6.
- Trinick, M. J.** (1973). Symbiosis between *Rhizobium* and the Non-legume, *Trema aspera*. *Nature*, *244*(5416), 459-460.
- Tydell, C. C., Yount, N., Tran, D., Yuan, J., Selsted, M. E.** (2002). Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils. *The Journal of biological chemistry*, *277*(22), 19658-64.
- Uehara, T., Park, J. T.** (2008). Growth of *Escherichia coli*: significance of peptidoglycan degradation during elongation and septation. *Journal of bacteriology*, *190*(11), 3914-22.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., et al.** (1992). Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *4*(6), 645.
- Veit, S., Wörle, J. M., Nürnberger, T., Koch, W., Seitz, H. U.** (2001). A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant physiology*, *127*(3), 832-41.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant journal*, *33*(5), 949-56.
- Vollmer, W.** (2008). Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS microbiology reviews*, *32*(2), 287-306.
- Vollmer, W., Bertsche, U.** (2008). Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, *1778*(9), 1714-34.
- Vollmer, W., Blanot, D., de Pedro, M. A.** (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS microbiology reviews*, *32*(2), 149-67.
- Vollmer, W., Seligman, S. J.** (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends in microbiology*, *18*(2), 59-66.

- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S.-Y., et al.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *The Plant cell*, 20(2), 471-81.
- Wang, G., Olczak, A., Forsberg, L. S., Maier, R. J.** (2009). Oxidative stress-induced peptidoglycan deacetylase in Helicobacter pylori. *The Journal of biological chemistry*, 284(11), 6790-800.
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J. W., Forsyth, A., Mitchell, K., et al.** (2008). A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant physiology*, 147(2), 503-17.
- Wang, X., Li, Xiaoqing, Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, Shigeo, Asami, T., et al.** (2005). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental cell*, 8(6), 855-65.
- Wang Z.-M., Li X., Cocklin R. R., Wang M., Wang M., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Gupta D., Dziarski R.** (2003). Human peptidoglycan recognition protein-L is an N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. *The Journal of biological chemistry*, 278, 49044-52.
- Wang M., Liu L.-H., Wang S., Li X., Lu X., Gupta D., Dziarski R.** (2007). Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides. *Journal of immunology*, 178, 3116-25.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S., Chory, J.** (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, 410(6826), 380-3.
- Weidemann, B., Schletter, J., Dziarski, R., Kusumoto, S., Stelter, F., Rietschel, E. T., et al.** (1997). Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infection and immunity*, 65(3), 858-64.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J.-M., Barbier-Brygoo, H., Pugin, A.** (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *The Plant cell*, 14(8), 1937-51.
- Weng G., Bhalla U. S., Iyengar R.** 1999. Complexity in biological signaling systems. *Science*, 284, 92-6.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., Hultmark, D.** (2000). A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly Drosophila melanogaster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13772-7.
- Werner, T., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H., Hultmark, D.** (2003). Functional diversity of the Drosophila PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *The Journal of biological chemistry*, 278(29), 26319-22.
- Wilson, I. D., Neill, S. J., Hancock, J. T.** (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, cell & environment*, 31(5), 622-31.



- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., *et al.* (2008). Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current biology*, 18(1), 74-80.
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D. (1999). Cutting edge, recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *Journal of immunology* 163, 1-5.
- Zhang, Y., van der Fits, L., Voerman, J. S., Melief, M.-J., Laman, J. D., Wang, M., Wang, H., Wang, M., Li, X., Walls, C. D., Gupta, D., Dziarski, R. (2005). Identification of serum N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase as liver peptidoglycan recognition protein 2. *Biochimica et biophysica acta* 1752, 34-46.
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S., Stacey, G. (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in Arabidopsis. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(9), 963-70.
- Zhang, X.-C., Cannon, S. B., Stacey, G. (2009). Evolutionary genomics of LysM genes in land plants. *BMC evolutionary biology*, 9, 183.
- Zhang, X.-C., Wu, X., Findley, S., Wan, J., Libault, M., Nguyen, H. T., *et al.* (2007). Molecular evolution of lysin motif-type receptor-like kinases in plants. *Plant physiology*, 144(2), 623-36.
- Zhu, H., Riely, B. K., Burns, N. J., Ané, J.-M. (2006). Tracing nonlegume orthologs of legume genes required for nodulation and arbuscular mycorrhizal symbioses. *Genetics*, 172(4), 2491-9.
- Zhukov, V., Radutoiu, S., Madsen, L. H., Rychagova, T., Ovchinnikova, E., Borisov, A., *et al.* (2008). The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, 21(12), 1600-8.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, Thomas, *et al.* (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell*, 125(4), 749-60.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G, *et al.* (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature*, 428, 764-767.
- Zähringer, U., Lindner, B., Inamura, S., Heine, H., Alexander, C. (2008). TLR2 - promiscuous or specific? A critical re-evaluation of a receptor expressing apparent broad specificity. *Immunobiology*, 213(3-4), 205-24.

**8 Anhang**





## Abkürzungen

AD	Aktivierungsdomäne
Avr	Avirulenzfaktor
BD	DNA-Bindedomäne
BSA	Rinderserumalbumin
CEBiP	Chitin elicitor binding protein
CERK1	Chitin elicitor receptor-like kinase 1
cfu	Kolonie-bildende Einheiten
Col-0	Columbia-0, <i>A. thaliana</i> Ökotyp
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
EFR	EF-Tu Rezeptor
elf18	Peptid aus EF-Tu mit der Sequenz SKEKFERTKPHVNVGTIG
ETI	Effektor-vermittelte Immunität
ETS	Effektor-vermittelte Suszeptibilität
flg22	Peptid aus Flagellin mit der Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA
FLS2	Flagellin sensitive 2
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
GPI	Glycosylphosphatidyl
HR	hypersensitive Reaktion
hrc	hypersensitive response and conserved
Hrp	hypersensitive response and pathogenicity
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-reiche Wiederholung
LTA	Lipoteichonsäure
MAMP	Mikroben-assoziiertes molekulares Muster
MPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
NB-LRR	Nucleotidbindestelle und Leucin-reiche Wiederholungen
NOD	Nukletidoligomerisierungsdomäne
Nod-Faktor	Nodulationsfaktor
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PGN	Peptidoglycan
PR	pathogenesis-related
PRR	Mustererkennungsrezeptor
PTI	MAMP- (PAMP-) vermittelte Immunität
<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
pv.	Pathovar
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
R-Gen	Resistenzgen
R-Protein	Resistenzprotein
RLK	Rezeptor-ähnliche Kinase
RT-PCR	reverse Transkription und nachfolgende PCR
<i>Sa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
Ws-4	Wassilewskija-4, <i>A. thaliana</i> Ökotyp
WT	Wildtyp
WTA	Wandteichonsäure
<i>Xcc</i>	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>

## Verwendete Oligonukleotide

### Präparative Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Gen
35S-f	GACTAGAGCCAAGCTGATCT	CaMV 35S Promotor
35S-r	GGTTTTCTGGATTCTTCATTCGACTAGAATAGTAAATTG	CaMV 35S Promotor
Lym3-SP-f	CAATTTACTATTCTAGTCGAATGAAGAATCCAGAAAAACC	At1g77630 (LYM3)
Lym3-SP-r	TCCTCGCCCTTGCTCACCATTGCAGTCGCCATTGATGCTA	At1g77630 (LYM3)
EGFP-f	TAGCATCAATGGCGACTGCAATGGTGAGCAAGGGCGAGGA	EGFP
EGFP-r	CAAGGCTCTATTGTGGATTTCTGTACAGCTCGTCCATG	EGFP
Lym3-core-f	GCATGGACGAGCTGTACAAGAAATCCACAATAGAGCCTTG	At1g77630 (LYM3)
Lym3-r	TTAGAAAACAAAAAGCAAG	At1g77630 (LYM3)
Lym3dGPI-r	GAAGCTATAGAAATACTTCCG	At1g77630 (LYM3)
Lym3comp-f	TGCAATCACCGTCGCAATTGGAG	At1g77630 (LYM3)
Lym3comp-r	TTAGAAAACAA AAAGCAAGA A	At1g77630 (LYM3)
Lym1-dSP-f	TCAACAATCGAGCCTTGCTC	At21880 (LYM1)
Lym1-dGPI-r	GCTACCGCTGGACCATTAG	At21880 (LYM1)
Lym2-dSP-f	ATGACCGGAAACTTCAACTG	At2g17120 (LYM2)
Lym2-dGPI-r	ACCAGCAGAATCTGGACAAG	At2g17120 (LYM2)
Lym3-dSP-f	AAATCCACAATAGAGCCTTG	At1g77630 (LYM3)
CERK1EX-f	AAGTGCAGGACTAGCTGTCC	At3g21630 (CERK1)
CERK1EX-r	GAATGGTGAAATGCACCAT	At3g21630 (CERK1)
Lyk3EX-NdeI-f	AATTCATATGCCAATGAATTGCTCTGACAC	At1g51940 (LYK3)
Lyk3EX-XmaI-r	AATCCCAGGATAAAGGAGATCACCAGCTG	At1g51940 (LYK3)
Lyk4EX-NdeI-f	AATTCATATGCAACAGCCTTATGTGCGAAT	At2g23770 (LYK4)
Lyk4EX-XmaI-r	AATCCCAGGTGTTTTCTTCTCGATTTCC	At2g23770 (LYK4)
Lyk5EX-NdeI-f	AATTCATATGCAGCAACCGTACGTCAACAA	At2g33580 (LYK5)
Lyk5EX-XmaI-r	AATCCCAGGTTTTGTGAGAAGAAGAAGATC	At2g33580 (LYK5)
I120A-121G-r	CCGTAAACAGAGTCACCACCGATCCTAGTGTGTCAGAAG	At1g77630 (LYM3)
Lym3-1f	AGCAGATTCAGGTCGCGCTTCAGAGACTGACCTTTCGGT	At1g77630 (LYM3)
Lym3-1r	GTCGAGAATCTCTTCCGCCTCCAGCCATAGTGTGCGATTC	At1g77630 (LYM3)
I186A-A187G-f	GGCGAAAGAGATTCTCGAC	At1g77630 (LYM3)
N201A-r	AGCCACGTTTGTAAATCAG	At1g77630 (LYM3)
Lym3-2f	CTGATTTAACAAACGTGGCTGCTATGGGAGCTCCTGATAT	At1g77630 (LYM3)

## qPCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Gen
FRK1-f	AGCGGTCAGATTTCAACAGT	At2g19190 (FRK1)
FRK1-r	AAGACTATAAACATCACTCT	At2g19190 (FRK1)
CYP71-f	GTGCTTCGGTTGCATCCTTCTC	At2g30770 (CYP71A13)
CYP71-r	CGCCCAAGCATTGATTATCACCTC	At2g30770 (CYP71A13)
MLO12-f	ACGGTGGTTGTCGGTATAAGCC	At2g39200 (MLO12)
MLO12-r	AGGGCAGCCAAAGATATGAGTCC	At2g39200 (MLO12)
PAD3-f	CTTTAAGCTCGTGGTCAAGGAGAC	At3g26830 (PAD3)
PAD3-r	TGGGAGCAAGAGTGGAGTTGTTG	At3g26830 (PAD3)
AT1G51890-f	CTAGCTGGCAAGGAGATCCATGTG	At1g51890
AT1G51890-r	TGGTACCACTCAAATTGCTTCCAC	At1g51890
LYM3q-f	ACTTCGCAGCAGAGTAGCTC	At1g77630 (LYM3)
LYM3q-r	AGCGGTGCTAATTGTTGCGG	At1g77630 (LYM3)

## Primer für Genotypisierungen und Überprüfungen von Transkripten

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Gen
Lym3-f	ATGAAGAATCCAGAAAAACC	At1g77630 (LYM3)
Lym3-r5	GTGACTTTGAGGTCGGTGTA	At1g77630 (LYM3)
Lym3-r4	ACCGGAGCTACTCTGCTGCGA	At1g77630 (LYM3)
Lym3-100-f	ACTTCGCAGCAGAGTAGCTC	At1g77630 (LYM3)
Lym3-r	TTAGAAAACAAAAAGCAAG	At1g77630 (LYM3)
Lym1-f3	TTGATACATTGGTCGGAATC	At21880 (LYM1)
Lym1-f2	TTACCTTCTCTCAGCTTGTG	At21880 (LYM1)
Lym1-r1	ATCTGGGGAACCTTGAAGC	At21880 (LYM1)
Lym1-r2	TAGTGCCGTTGGCTATACCG	At21880 (LYM1)
Lym1-r	TCAAGATGACAAAGCAAGGG	At21880 (LYM1)
GABI-Lba	CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC	
SALK-Lba	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	
SK-Lba	ATACGACGGATCGTAATTTGTCG	





## **Vielen Dank!**

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger und Frau Dr. Andrea Gust für das zur Verfügung stellen dieses Themas, sowie für die Diskussionsbereitschaft, die Betreuung, die Anregungen, die gute Infrastruktur, die Förderung und für das in mich gesetzte Vertrauen bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger, Herrn Prof. Dr. Georg Felix, Herrn Prof. Dr. Martin Parniske und Herrn Prof. Dr. Andreas Peschel möchte ich mich für die Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Friedrich Götz (Universität Tübingen) für die freundliche Bereitstellung von Peptidoglycan aus *S. aureus* und bei seinen Mitarbeitern Herrn Mulugeta Nega und Herrn Martin Schlag für die Einführung in die Isolation von Peptidoglycan.

Bei Frau Dr. Julie Cullimore und Herrn Dr. Jean-Jaques Bono (CNRS/INRA Toulouse), in deren Labor ich im Rahmen des Marie Curie Programms „Nodperception“ arbeiten durfte, bedanke ich mich für die Ermöglichung meines Aufenthaltes in Toulouse und die Betreuung. Frau Dr. Sandra Uhlenbroich und Frau Dr. Judith Fliegmann danke ich für die kollegiale Unterstützung und Hilfe in und außerhalb des Labors in Toulouse. Herrn Dr. Frédéric Lopez (INSERM, Toulouse) danke ich für die freundliche Hilfe bei den Biacoremessungen in seinem Labor.

Herrn David Nittner (Katholische Universität Leuven) danke ich für die Einführung in die qPCR.

Ich bedanke mich bei Andreas Kulik (Prof. Dr. Hans-Peter Fiedler, Universität Tübingen) für die zuverlässige Durchführung vieler Pseudomonasfermentationen.

Ich danke allen Kollegen des ZMBP, besonders Frau Heini Grabherr, Frau Dagmar Kolb, Herrn Dr. Stefan Engelhardt, Frau Dr. Anita Brock, Frau Dr. Heike Lenz, Herrn Dr. Yoshitake Desaki, Herrn Weiguo Zhang und Frau Eva Haller für die gute Zusammenarbeit und Atmosphäre in N1.

Frau Brigitte Keller, Frau Liane Schön und Frau Dr. Regina Grupp danke ich für ihre Hilfe bei administrativen Fragen.

Ich danke dem Team der Gärtnerei des ZMBP Tübingen.

Ich danke Frau Inge Russ-Müller und Herrn Peter Müller für die Durchsicht dieser Arbeit.

Meiner Frau Maud danke ich für ihre Unterstützung.

Ich danke dem Sonderforschungsbereich 766 (Deutsche Forschungsgemeinschaft) für die Finanzierung dieser Arbeit und für die Etablierung des universitätsweiten Netzwerkes, welches die Arbeit an diesem Projekt vereinfacht hat.

## **meine akademischen Lehrer**

Bardele, Bayer, Bisswanger, Bohley, Bono, Braun, Cullimore, Duszenko, Dodt, Echner, Gauglitz, Gust, Häfelinger, Hamprecht, Hiltunen, Jäger, Kastaniotis, Maier, Ninnenmann, Nürnberger, Oberhammer, Pommer, Pospiech, Probst, Pujol, Reutter, Ruddock, Schott, Schwarz, Steinbrück, Süßmuth, Takano, Voelter, Weser, Wohleben

## Lebenslauf

**Roland Willmann**

---

Geburtsdatum 16. Juni 1981  
in Friedrichshafen

Familienstand verheiratet

### Promotion

---

seit Juni 2007 Promotion „Charakterisierung von Proteinen mit Lysin-Motiven und ihre Rolle in der Peptidoglycanperzeption und der angeborenen Immunität in *Arabidopsis thaliana*“ am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen bei Prof. Dr. Thorsten Nürnberger.

### Studium

---

April 2007 Diplom in Biochemie

September 2006 bis April 2007 Diplomarbeit „Untersuchungen zur Regulation der Protein-Phosphatase PP2C5 (At2g40180) in *Arabidopsis thaliana*“ am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Universität Tübingen bei Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

September 2004 bis Mai 2005 Studium am Institut für Biochemie, Universität Oulu, Finnland

2003 bis 2006 Hauptstudium Biochemie mit den Nebenfächern Organische Chemie und Mikrobiologie, Eberhard Karls Universität Tübingen

März 2003 Vordiplom

Oktober 2001 bis Grundstudium Biochemie, Eberhard Karls Universität

März 2003 Tübingen

### Schule

---

1991 bis 2000 Immanuel-Kant-Gymnasium in Leinfelden-Echterdingen,  
Abitur

1989 bis 1991 Ludwig-Uhland-Schule in Leinfelden-Echterdingen

1987 bis 1989 Karl-Heiß-Schule in Landshut



