

**Funktionelle Bedeutung unterschiedlicher NPR-Proteine
für die Salicylsäure-abhängige Genexpression im Rahmen
der systemisch aktivierten Resistenz in *Arabidopsis thaliana*
und *Nicotiana tabacum***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Genetik (240), Fachgebiet Allgemeine Virologie (240b)

Vorgelegt von

Evelyn Maria Anna Hedwig Konopka

aus Paderborn

2018

Dekan:	Prof. Dr. Uwe Beifuß
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Artur J. P. Pfitzner
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Andreas Schaller
3. berichtende Person:	Prof. Dr. Waltraud Schulze

Eingereicht am:	18. Juli 2018
Mündliche Prüfung am:	29. Oktober 2018

Die vorliegende Arbeit wurde am 11. Oktober 2018 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Die systemisch aktivierte Resistenz (SAR) und ihre Hauptkomponenten	7
1.1.1	NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENS 1 (NPR1)	9
1.1.2	<i>as-1</i> Elemente	12
1.1.3	bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren.....	13
1.1.4	NIMIN-Proteine	16
1.2	Modelle der Salicylsäurewahrnehmung während der SAR	20
1.2.1	Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Fu <i>et al.</i> (2012).....	20
1.2.2	Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Wu <i>et al.</i> (2012).....	22
1.2.3	Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Maier <i>et al.</i> (2011).....	24
1.2.4	Kritischer Vergleich der Modelle und Zielsetzung der Arbeit	26
2	Material.....	29
2.1	Enzyme und Chemikalien	29
2.2	Biologische Materialien	29
2.2.1	Pflanzen	29
2.2.2	Bakterienstamm.....	29
2.2.3	Hefestamm.....	30
2.2.4	Virenstamm	30
2.2.5	DNA-Größenstandard.....	30
2.2.6	Protein-Molekulargewichtsstandard	30
2.3	Kits.....	31
2.3.1	Plasmid-Präparation	31
2.3.2	DNA-Elution aus Agarosegelen	31
2.3.3	RNA-Isolation aus Pflanzengewebe	31
2.4	Vektoren.....	31
2.4.1	pBluescript II KS (+)/ T-Vektor	31
2.4.2	pGBT9.....	32
2.4.3	pGAD424	32
2.4.4	pBridge/pBD	32
2.5	Synthetische Oligonukleotide	33
2.6	Antiseren	36
2.6.1	Detektion von Tabak NPR1	36
2.6.2	Detektion von Arabidopsis NPR1	36
2.6.3	Detektion von Tabak PR1.....	36
2.6.4	Anti-Kaninchen-Serum.....	36
3	Methoden	37
3.1	Molekularbiologische Standardmethoden und Nukleinsäuretechniken	37
3.1.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	37
3.1.2	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -DH5 α -Zellen.....	37
3.1.3	Transformation von <i>E. coli</i>	38
3.1.4	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	39

3.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
3.1.6	Sequenzspezifische Restriktion von DNA	40
3.1.7	Auftrennung von DNA-Fragmenten (Gelelektrophorese)	40
3.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	40
3.1.9	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	41
3.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten.....	41
3.1.11	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	41
3.1.12	DNA-Sequenzierung.....	43
3.1.13	Herstellung von Stammkulturen (Glycerinkulturen)	43
3.1.14	Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	43
3.1.15	RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial	44
3.2	Proteinbiochemische Methoden	46
3.2.1	Proteinextraktion aus Hefezellen	46
3.2.2	Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	46
3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	47
3.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	47
3.2.5	Western-Transfer	48
3.2.6	Immundetektion von Proteinen.....	49
3.2.7	Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen.....	49
3.3	Experimente mit <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
3.3.1	Hefemedien.....	50
3.3.2	Kultivierung von Hefezellen.....	50
3.3.3	Herstellung kompetenter Hefezellen (HF7c)	51
3.3.4	Transformation von Hefezellen	51
3.3.5	Das Hefe-Zwei-Hybridsystem zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen	52
3.3.6	Das Hefe-Drei-Hybridsystem zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen	52
3.3.7	Das Hefe-Ein-Hybridsystem zur Charakterisierung von DNA-Protein-Interaktionen.....	52
3.3.8	Bestimmung von IC ₅₀ und EC ₅₀ Werten	53
3.3.9	Quantitativer Test der Interaktionen	53
3.4	Experimente mit Pflanzen	54
3.4.1	Anzucht und Kultur	54
3.4.2	Virus-Inokulation von <i>N. tabacum</i>	55
3.4.3	Induktion des <i>GUS</i> -Reportergens und der endogenen Gen-Expression durch äußere Stimuli	56
3.4.4	Nachweis der induzierten Reportergenaktivität durch GUS-Enzymaktivität	56
3.4.5	Vorselektion der mit CRISPR/Cas9 erzeugten transgenen Linien.....	57
4	Ergebnisse	58
4.1	Charakterisierung von Tabak NPR-Proteinen in Hefe	58
4.1.1	Dimerisierung von Tabak NPR-Proteinen	60
4.1.2	Mutanten von Tabak NPR1	63
4.1.3	Mutanten von Tabak NPR3	71
4.2	Charakterisierung von Arabidopsis NPR-Proteinen in Hefe	74
4.2.1	Charakterisierung von Arabidopsis NPR1	75
4.2.2	Charakterisierung von Arabidopsis NPR2	79

4.2.3	Charakterisierung von Arabidopsis NPR3.....	83
4.2.4	Charakterisierung von Arabidopsis NPR4.....	85
4.2.5	Zusammenspiel von Arabidopsis NPR-Proteinen, NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren in Hefe.....	87
4.2.6	Dimerisierung von Arabidopsis NPR-Proteinen.....	91
4.3	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR-Proteine in Hefe.....	96
4.3.1	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR1.....	98
4.3.2	Einfluss von Salicylsäure auf Arabidopsis NPR2.....	102
4.3.3	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR3.....	104
4.3.4	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR4.....	107
4.3.5	Interaktion zwischen der xExRV-Domäne und der NIMIN-Bindedomäne unterschiedlicher Arabidopsis NPR-Proteine.....	111
4.4	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR-Proteine.....	115
4.4.1	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR1.....	117
4.4.2	Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR3.....	122
4.4.3	Interaktion zwischen der LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von Tabak NPR1 und NPR3	124
4.5	Nachweis von NPR1-Proteinen in Hefe, Arabidopsis und Tabak.....	126
4.5.1	Nachweis von Arabidopsis und Tabak NPR1-Proteinen in Hefe.....	126
4.5.2	Nachweis von Arabidopsis NPR1.....	128
4.5.3	Nachweis von Tabak NPR1.....	129
4.6	Erzeugung von Mutanten in den <i>NPR1</i> - und <i>NPR3</i> -Genen von <i>N. tabacum</i>	133
4.6.1	Erzeugung von Mutanten im <i>NPR1</i> -Gen des Elters <i>N. tomentosiformis</i> (Linien 90H).....	135
4.6.2	Erzeugung von Mutanten der <i>NPR1</i> -Gene der Eltern <i>N. sylvestris</i> und <i>N. tomentosiformis</i> (Linien 111H).....	141
4.6.3	Erzeugung von Mutanten der <i>NPR3</i> -Gene der Eltern <i>N. sylvestris</i> und <i>N. tomentosiformis</i> (Linien 113H).....	152
4.6.4	Erzeugung von Mutanten der <i>NPR1</i> - und <i>NPR3</i> -Gene der Eltern <i>N. sylvestris</i> und <i>N. tomentosiformis</i> (Linien 118H).....	166
5	Diskussion	174
5.1	Dimerisierung von NPR1 und NPR1-ähnlichen Proteinen in Hefe.....	174
5.2	Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von NPR1 und seinen Paralogen in Hefe.....	177
5.3	Die Induktorspezifität der NPR-Proteine von Tabak und Arabidopsis.....	183
5.4	Charakterisierung von <i>npr1</i> und <i>npr3</i> Mutanten in <i>Nicotiana tabacum</i>	186
5.5	Übernimmt NPR3 die Funktion des positiven Regulators der SAR in Tabak?.....	191
	Zusammenfassung.....	194
	Summary.....	196
	Literaturverzeichnis.....	198
	Abkürzungsverzeichnis.....	218
	Anhang	221
	Wissenschaftliche Beiträge.....	256

1 Einleitung

Pflanzen haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Strategien zur Anpassung an verschiedene Umweltparameter und zur Abwehr von Fraßfeinden und mikrobiellen Pathogenen entwickelt. Dies ist aufgrund ihrer sessilen Lebensform und des Fehlens eines klassischen Immunsystems zum Überleben von besonderer Bedeutung. Durch Sukkulenz beispielsweise ist es für Pflanzen temporär arider Gebiete möglich, auch während des periodischen Wassermangels aktiv zu bleiben (Eggli&Nyffeler, 2009). In salinen Gebieten sind ebenfalls zahlreiche Pflanzen zu finden. Die Entwicklung verschiedener Mechanismen wie die Ausscheidung, Kompartimentierung oder Translokation von Salz und die Angleichung der zellulären Osmose, ermöglicht es Pflanzen, hohen Salzstress zu tolerieren und entsprechende Gebiete zu besiedeln (Gilbert *et al.*, 2002; Sairam *et al.*, 2002; Yeo, 1998). Als physikalische Barriere zur Abwehr von Fraßfeinden und Pathogenen bilden Pflanzen spezifische morphologische Strukturen aus. Blätter werden zäher und härter, die Kutikula bildet eine Wachsschicht aus, Zellwände werden durch Verholzung oder Verkorkung verdickt und Trichome, Stacheln und Dornen werden ausgebildet (Agrawal *et al.*, 2009; Hanley *et al.*, 2007; He *et al.*, 2011; Sharma *et al.*, 2009). Durch die Bildung und Sekretion sekundärer Metabolite mit toxischer Wirkung wie Terpenoide, Alkaloide, Anthocyane und Phenole, welche tödlich oder entwicklungsretardierend auf Herbivoren wirken, wird eine Art chemische Barriere zum Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen aufgebaut. Ferner können Pflanzen natürliche Feinde ihrer Fraßfeinde durch verschiedene Methoden anlocken, um sich ihrer eigenen Fraßfeinde zu entledigen (Arimura *et al.*, 2009; Usha Rani *et al.*, 2010; War *et al.*, 2011a; 2011b).

Werden die konstitutiven Barrieren dennoch überwunden, verfügt die Pflanze über weitere Mechanismen zum Schutz und zur Abwehr. Pflanzen besitzen zwar kein Immunsystem wie es bei Tieren bekannt ist, haben dafür aber eigene Mechanismen entwickelt, um eindringende pathogene Mikroorganismen gezielt bekämpfen zu können. Mikroorganismen weisen pathogenassoziierte molekulare Muster auf, sogenannte *pathogen-associated-molecular-patterns* (PAMPs). Diese PAMPs werden von pflanzeigenen Rezeptoren, den *pattern-recognition-receptors* (PRRs) erkannt, welche sich in der Plasmamembran befinden (Boller&Felix, 2009; Boller&He, 2009). Die PRRs lassen sich in zwei Gruppen unterteilen, den *receptor-like-kinases* (RLKs) und den *receptor-like-proteins* (RLPs). RLKs gliedern sich in eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Kinasedomäne. RLPs fehlen zwar die intrazellulären Kinasedomänen, sie verfügen aber ebenso über die extrazellulären Domänen und die Transmembrandomänen (Boutrot&Zipfel, 2017; Couto&Zipfel, 2016). Als Ligand-bindende Ektodomänen wurden bislang *leucin-rich-repeats* (LRRs), Lysin-Motive (LysMs), Lectin-ähnliche Motive und *epidermal-growth-factor* (EGF)-ähnliche Domänen beschrieben (Saijo *et al.*, 2018).

Durch das Erkennen der PAMPs wird eine Immunantwort in der Pflanze ausgelöst, die unter dem Begriff *PAMP-triggered-immunity* (PTI) bekannt ist (Jones&Dangl, 2006; Tsuda *et al.*, 2009). Die Kombination aus konstitutiven Barrieren und der PTI wird als basale Resistenz bezeichnet (De Wit, 2007; Sanabria *et al.*, 2008). PAMPs sind Epitope, welche innerhalb der Mikroorganismen konserviert und essentiell für das Überleben und die Fitness der Mikroorganismen sind (Block *et al.*, 2008). Dazu gehört unter anderem flg22, welches aus einem Abschnitt von 22 Aminosäuren des N-Terminus des bakteriellen Flagellins besteht. Flagellin ist Bestandteil des bakteriellen Flagellums und somit bei begeißelten Bakterien zu finden. flg22 wird durch die Rezeptorkinase Flagellin-Insektiv-2 (FLS2) erkannt, welche zusammen mit der Brassinosteroidrezeptor-assoziierten Rezeptorkinase BAK1 die Immunantwort aktiviert (Chinchilla *et al.*, 2006, 2007; Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Zipfel *et al.*, 2004). *fls2* Mutanten in *Arabidopsis thaliana* weisen eine erhöhte Anfälligkeit für den virulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 auf, was die Wichtigkeit der PAMP-Erkennung bei der Einschränkung virulenter Pathogene unterstreicht (Zipfel *et al.*, 2004). Die Kristallstruktur der flg22 gebundenen Ektodomänen von FLS2 und BAK1 deutet daraufhin, dass BAK1 als Co-Rezeptor agiert (Sun *et al.*, 2013). Die Aktivierung von BAK1 erfolgt durch die Ligand-vermittelte Assoziation von FLS2 und BAK1. Daraufhin erfolgt die Phosphorylierung der cytoplasmatischen Rezeptorkinase Botrytis-induzierte Kinase1 (BIK1), welche NADPH-Oxidase D aktiviert und so die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) verursacht (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Schwessinger *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Neben flg22 gibt es noch zahlreiche weitere PAMPs wie Epitope des bakteriellen Elongationsfaktors Tu (elf18 und elf26), Peptidoglykane (PGN, Komponenten der bakteriellen Zellwand) oder auch Chitin (Hauptkomponente der Pilzzellwand) (Boller&Felix, 2009). PGNs werden durch Rezeptoren mit Lysin-Motiv-Domänen wahrgenommen. In *Arabidopsis* nehmen Lysin-Domänen-Protein1 (LYM1) und Lysin-Domänen-Protein3 (LYM3) PGN wahr und agieren vermutlich in einem Komplex mit Chitin-Elicitor-Rezeptor-Kinase1 (CERK1) zusammen und leiten das Signal weiter (Willmann *et al.*, 2011). CERK1 spielt auch bei der Erkennung von Chitin eine Rolle. Durch die direkte Bindung von CERK1 an Chitin wird die *chitin-triggered-immunity* ausgelöst (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Iizasa *et al.*, 2010; Petutschnig *et al.*, 2010).

Da es sich bei PAMPs um konservierte Strukturen handelt, welche sowohl bei pathogenen als auch nicht-pathogenen Mikroorganismen vorkommen, muss gleichzeitig auch die Wahrnehmung von *damage-associated-molecular-patterns* (DAMPs) betrachtet werden. DAMPs sind endogene Signale des zellulären Verfalls und repräsentieren die Charakteristika einer Infektion (Fontana&Vance, 2011; Blander&Sander, 2012). Das *high-mobility-group-box-protein* (HMGB) beispielsweise wird mit Chromatin im Zellkern in Verbindung gebracht und befindet sich in nicht-gestressten Zellen im Cytosol. Extrazellulär jedoch wirkt HMGB immunogen. In *Arabidopsis* wird HMGB3 in Folge von Gewebeverletzungen durch eine Infektion mit *Botrytis cinerea* freigesetzt und induziert so eine PTI-ähnliche Immunantwort und die Resistenz gegen Pilze (Choi *et al.*, 2016; Choi&Klessig, 2016; Lotze&Tracey, 2005). Auch extrazelluläres ATP ist in der Lage, Immunantworten auszulösen. In

Arabidopsis wird ATP in Folge von Verwundung, eines Herbivoren- oder Pathogenangriffs freigesetzt. Die Erkennung erfolgt dabei über Lektin-ähnliche Rezeptorkinase *does-not-respond-to-nucleotides1* (DORN1)/ *lectin-receptor-kinase-clade-1.9* (LecRK1.9) und induziert eine PTI-ähnliche Abwehr (Choi *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2016; Ralevic&Burnstock, 1998; Tanaka *et al.*, 2014). Weitere DAMPS sind unter anderem Oligogalakturonide, Fragmente der pflanzlichen Zellwand, welche durch Hydrolyse durch Herbivoren oder Pilzinfektionen entstehen, und verschiedene endogene Peptide, welche während eines Pathogenangriffs in den Extrazellularraum freigesetzt werden und immunogen wirken (Bartels&Boller, 2015; Bergey *et al.*, 1999; De Lorenzo *et al.*, 2001; Ferrari *et al.*, 2013; Yamaguchi&Huffaker, 2011).

Durch die Wahrnehmung der PAMPs/DAMPs werden zügig frühe Abwehrantworten aktiviert (Abb. 1): Ionen-Kanäle werden geöffnet, der intrazelluläre Ca^{2+} -Spiegel steigt an, ROS werden gebildet und freigesetzt. Die ausgelöste Kaskade aktiviert auch die *mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) sowie die Transkription von Abwehrgenen. Im Fall von flg22 sind an der Aktivierung der Abwehrgene die Transkriptionsfaktoren WRKY22/29 und WRKY25/33 beteiligt (Boller&Felix, 2009; Chinchilla *et al.*, 2007; Gomez-Gomez&Boller, 2000; Jeworutzki *et al.*, 2010; Nicaise *et al.*, 2009). Eine Analyse des Transkriptoms von *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit PAMPs zeigte eine immense transkriptionelle Antwort. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit flg22 konnte unter Verwendung eines Genom-Gen-Chip von Arabidopsis eine Hoch- bzw. Runterregulierung von mehr als 1000 Genen registriert werden (Zipfel *et al.*, 2004). Die dabei ausgelöste transkriptionelle Antwort ist zwischen verschiedenen PAMPs im frühen Stadium relativ ähnlich. Im weiteren Verlauf wird durch Differenzierung der transkriptionellen Antwort gewährleistet, dass die Immunantwort adäquat zum jeweiligen Pathogen ist (Gust *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Zipfel *et al.*, 2006). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass im Zuge der Erkennung von verschiedenen PAMPs die Pflanzenhormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen, welche im Zusammenhang mit der pflanzlichen Immunantwort stehen, hochreguliert werden. flg22 beispielsweise löst die Salicylsäureproduktion aus. In Mutanten mit defekter Salicylsäuresynthese wird PTI partiell gehemmt und die Expression eines Teils der PAMP-regulierten Gene ebenfalls beeinflusst (Mishina&Zeier, 2007; Tsuda *et al.*, 2008a; Tsuda *et al.*, 2008b). flg22 und PGN können das Markerprotein *pathogenesis-related-genes1* (PR1) der Pflanzenimmunantwort *systemic acquired resistance* (SAR) induzieren, welches durch Salicylsäure reguliert wird. PAMPs von Pilzen wie Chitin sind dazu nicht in der Lage (Gust *et al.*, 2007; Tsuda *et al.*, 2008b). Bakterielle PAMPs können durch die Aktivierung von *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6* (ACS6), einem Ethylen-Biosynthesenzym, die Produktion von Ethylen induzieren (Liu *et al.*, 2004). In Kartoffeln konnte des Weiteren die Induktion von Jasmonsäureproduktion nach Behandlung mit PAMPs nachgewiesen werden (Halim *et al.*, 2009).

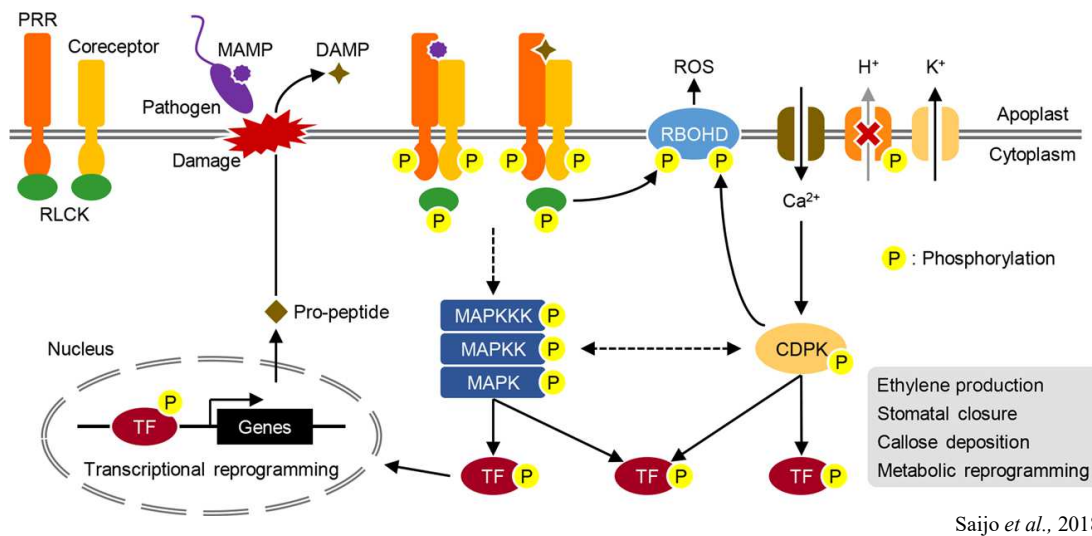


Abb. 1 Eine Übersicht der PTI. Die Wahrnehmung von PAMPs (MAMPs) und DAMPs durch PRRs erfolgt durch dynamische Assoziation/Dissoziation mit Co-Rezeptoren und cytoplasmatischen Rezeptorkinasen (RLCKs) und Transphosphorylierung innerhalb der PRR-Komplexe, um die darauffolgende Signalkaskade zu initiieren. PRR-Signale werden durch Phosphorylierungskaskaden übertragen. Diese betreffen MAPKs und Calcium-abhängige Proteinkinasen (CDPKs) und ihre Ziele. Dazu zählen die NADPH-Oxidase (RBOHD), Plasmamembran-(PM)-ständige H⁺-ATPase und Transkriptionsfaktoren (TFs) während der PTI.

Die PTI ist ein äußerst effektiver Schutzmechanismus der Pflanze, welcher den größten Teil der eindringenden, mikrobiellen Pathogene erfolgreich abwehren kann. Um dennoch Pflanzen besiedeln und die sehr wirksame Abwehrreaktion PTI überwinden zu können, entwickelten einige Pathogene ihre Strategien weiter. Dafür entwickelten sie spezielle Effektorproteine. Diese Effektorproteine werden in die Pflanzenzellen eingeschleust und unterdrücken die PTI, sodass es zur sogenannten *effector-triggered-susceptibility* ETS kommt (Cunnac et al., 2009; Block et al., 2008; Gohre et al., 2008). Die Einschleusung der Effektorproteine erfolgt bei bakteriellen Pathogenen über das Typ III Sekretionssystem (Block et al., 2008; Casper-Lindley et al., 2002; Szurek et al., 2002). Um die ETS zu vermeiden, haben Pflanzen Rezeptoren zur Erkennung der pathogenen Effektorproteine entwickelt. Die Rezeptorproteine sind in der Lage, spezifisch Effektorproteine zu erkennen und ebenso wie PRRs bei der Erkennung von PAMPs/DAMPs eine entsprechende Immunantwort der Pflanze auszulösen.

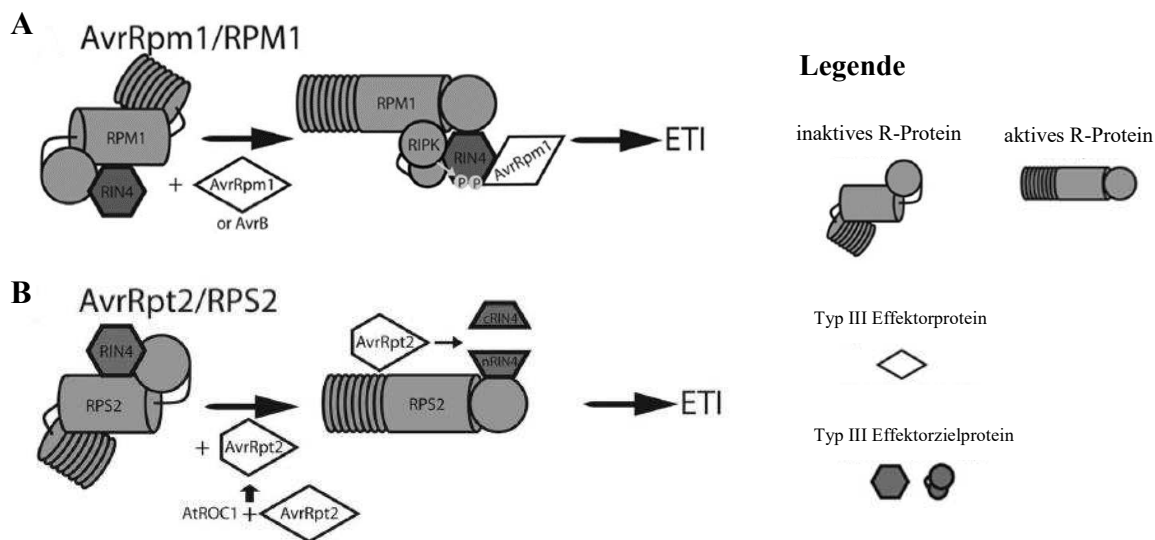
Die polymorphen intrazellulären Rezeptoren werden von *Resistenz* (R)-Genen kodiert. Durch Erkennung der Effektorproteine durch R-Proteine wird die *effector-triggered-immunity* ETI initiiert (Jones&Dangl 2006; Tsuda&Katagiri, 2010). Die Signalkaskade, welche durch ETI ausgelöst wird, führt oft zur hypersensitiven Reaktion (HR) und zum programmierten Zelltod (*programmed cell death*, PCD), um lokal dem Pathogenangriff entgegenzuwirken und die Ausbreitung der Pathogene eindämmen zu können (Coll et al., 2011). Allerdings existieren bereits einige Pathogene, welche mit ihren Effektorproteinen auf die ETI störend wirken (Rosebrock et al., 2007). Die meisten R-Proteine der Pflanzen gehören zur Familie der *nucleotide-binding site leucine-rich-repeat* NBS-LRR-Proteine, welche auch unter dem Namen NLR bekannt sind. Diese Familie besteht in Pflanzen aus zwei Gruppen. Die CC-NBS-LRR-Proteine besitzen eine N-terminale *coiled-coil*-Domäne, während die TIR-NBS-

LRR-Proteine über eine N-terminale Toll-Interleukin-1-Rezeptor-Domäne verfügen (Bonardi *et al.*, 2012; Dangl&Jones, 2001). Die LRR-Domäne der Rezeptoren ist einigen Studien zur Folge an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt (Feys&Parker, 2000). Die *nucleotide-binding* (NB)-Domäne wird hingegen teilweise mit der Bindung von ATP und der Hydrolyse von ATP in Verbindung gebracht (Tameling *et al.*, 2002). Durch die Bindung von ADP an die NB-Domäne ist der Rezeptor im inaktiven Zustand. Die Bindung von ATP versetzt den Rezeptor in einen aktiven Zustand. Durch räumliches Zusammenspiel der LRR-Domäne und der N-terminalen TIR- beziehungsweise CC-Domäne wird die NB-Domäne daran gehindert, das inaktive ADP gegen ATP auszutauschen. Im Zuge der Effektorprotein-Erkennung erfolgt eine Konformationsänderung. Der Austausch von ADP zu ATP an der NB-Domäne kann erfolgen. Das Rezeptorprotein ist aktiv und die ETI kann initiiert werden (Griebel *et al.*, 2014; Takken&Goverse, 2012). Anhand der sogenannten *guard*-Hypothese nach Dangl&Jones (2001) kann erklärt werden, wie es möglich ist, dass die relativ geringe Anzahl von NBS-LRR-Proteinen eine so große Vielzahl unterschiedlicher Pathogene erkennen kann. Die Erkennung der Effektorproteine verläuft dabei vorwiegend indirekt. Das R-Protein überwacht, ob ein Effektorprotein mit einem zellulären Protein in Interaktion tritt. Diese Interaktion verursacht ein Signal, welches vom R-Protein wahrgenommen wird und so zu dessen Aktivierung führt (Nishimura&Dangl, 2010). Der *guard*-Hypothese liegt die Gen-für-Gen-Hypothese nach Flor (1971) zugrunde. Demnach besitzt die Pflanze ein Resistenzgen *R*, zu welchem ein passendes Avirulenzgen *Avr* des Pathogens existiert (Baker *et al.*, 1997). Das Avirulenzprodukt wird vom pflanzlichen Rezeptor erkannt, die HR wird ausgelöst und die Pflanze ist gegenüber diesem Pathogen geschützt. In diesem Fall handelt es sich um eine inkompatible Wirts-Pathogeninteraktion mit einem avirulenten Pathogen. Wird das eindringende Pathogen nicht erkannt und kommt es damit zur systemischen Ausbreitung des Pathogens innerhalb der Wirtspflanze, handelt es sich um eine kompatible Interaktion und das Pathogen ist virulent. Die Modelle nach Flor und Dangl&Jones vereinen dabei die direkte und indirekte Interaktion von Effektorprotein und Rezeptor.

Ein Beispiel für eine direkte Rezeptor-Effektorprotein-Interaktion ist die Rostpilzkrankheit bei Flachs. Für den Rostpilz *Melampsora lini* konnten einige Effektorgene identifiziert werden. *AvrL567*, *AvrM*, *AvrP123* und *AvrP4* kodieren für kleine, sekretorische Proteine. Diese Effektorproteine werden von TIR-NB-LRR R-Proteinen innerhalb der Pflanzenzelle erkannt (Cantanzariti *et al.*, 2006; Dodds *et al.*, 2004; 2006; Wang *et al.*, 2007). *AvrM* wird während der Infektion in die Wirtszelle eingeschleust und interagiert direkt mit dem Resistenzprotein M von Flachs *Linum usitatissimum* und löst so die ETI aus (Cantanzariti *et al.*, 2010; Rafiqi *et al.*, 2010). Die Aminosäuren 123 bis 153 im N-terminalen Teil des Proteins sind für die Internalisierung in die Pflanzenzelle notwendig. Die C-terminale *coiled-coil*-Domäne, besonders die Aminosäuren 225 bis 343, vermitteln die Bindung von *AvrM* an das Resistenzprotein M. Es konnte gezeigt werden, dass für die *AvrM*:M Interaktion multiple Kontaktpunkte benötigt werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es für Flachs *AvrM* möglich ist, in Abwesenheit des Pathogens *M. lini* in die Wirtszelle zu gelangen. Der genaue Mechanismus ist noch

nicht vollständig geklärt. Es ist jedoch klar, dass für die pathogen-unabhängige Internalisierung in Pflanzenzellen ein konservierter, hydrophober Oberflächenabschnitt bei AvrM benötigt wird (Cantanzariti *et al.*, 2010; Rafiqi *et al.*, 2010; Ve *et al.*, 2013).

In Arabidopsis gibt es ein *resistance-to-P.syringae* *pv. maculicola*1 (RPM1)-interagierendes Protein4 (RIN4), welches als negativer Regulator der PTI identifiziert wurde. RIN4 interagiert mit den R-Proteinen RPM1 und *resistant-to-P.syringae*2 (RPS2) (Kim *et al.*, 2005; Mackey *et al.*, 2002, 2003; Axtell&Staskawicz, 2003). RIN4 ist das Zielprotein der Effektorproteine AvrRpm1, AvrRpt2 und AvrB von *P. syringae* (Mackey *et al.*, 2002, 2003; Axtell&Staskawicz, 2003). Die Effektorproteine AvrRpm1 und AvrB werden indirekt von RPM1 erkannt. Durch die Phosphorylierung von RIN4 in Folge einer Infektion mit Bakterien, welche *AvrRpm1* und *AvrB* exprimieren, wird das R-Protein RPM1 aktiviert und die ETI ausgelöst (Mackey *et al.*, 2002). Die Erkennung des Avirulenzproteins AvrRpt2 erfolgt über das R-Protein RPS2 ebenfalls indirekt. Nach der Einschleusung in die Pflanzenzelle wird AvrRpt2 vom wirtseigenen Cyclophilin aktiviert (Coaker *et al.*, 2005, 2006). Die so aktivierte Cysteinprotease schneidet wirtseigene Proteine, unter anderem auch RIN4. Durch den Abbau von RIN4 wird das R-Protein RPS2 aktiviert und somit auch die ETI (Mackey *et al.*, 2003; Axtell&Staskawicz, 2003; Abb. 2).



modifiziert nach Hurley *et al.*, 2014

Abb. 2 Aktivierung von NLR RPM1 und RPS2 durch RIN4. NLR-Proteine überwachen, ob Effektorproteine mit zellulären Proteinen in Interaktion treten. Durch Detektion einer solchen Interaktion kommt es zur Konformationsänderung des NLR-Proteins und zur Initiierung der ETI. (A) NLR RPM1 überwacht das zelluläre Protein RIN4. Die Interaktion zwischen RIN4 und Effektorprotein AvrRpm1 oder AvrB verursacht die Phosphorylierung von RIN4 durch die zelluläre Kinase RIPK (*receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1*) und aktiviert RPM1. (B) RIN4 wird ebenso von NLR RPS2 überwacht. Das Effektorprotein AvrRpt2 wird durch das zelluläre Cyclophilin AtROC1 (*regulator of cullins1*) aktiviert, verursacht die Spaltung von RIN4 und aktiviert so RPS2.

Die transkriptionellen Änderungen während der ETI überlappen sich im Wesentlichen mit den Änderungen während der PTI (Navarro *et al.*, 2004; Tao *et al.*, 2003). Auch die weiteren Merkmale der ETI entsprechen qualitativ den Merkmalen der PTI. Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wird initiiert und es kommt zur Freisetzung der ROS in der Zelle. Die zelluläre Ca^{2+} -Konzentration

erhöht sich, MAPK-Kaskaden werden aktiviert und Phytohormone werden produziert (Tsuda&Katagiri, 2010). Allerdings ist die durch ETI ausgelöste Immunantwort stärker und von längerer Dauer als die der PTI (Gao *et al.*, 2013; Tsuda&Katagiri, 2010; Tsuda *et al.*, 2013). Durch die lokalen Immunantworten wird die lang anhaltende Immunität der Pflanze, die systemisch aktivierte Resistenz (SAR), induziert. Durch die SAR wird auch uninfiziertes Gewebe der Pflanzen gegen nachfolgende Infektionen geschützt (Fu&Dong, 2013).

1.1 Die systemisch aktivierte Resistenz (SAR) und ihre Hauptkomponenten

ETI wird oft mit der lokalen Auslösung des programmierten Zelltodes in Form einer hypersensitiven Reaktion (HR) in Verbindung gebracht (Caplan *et al.*, 2008). Frank Ross beschrieb 1961 die Beobachtung einer aktivierten Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) von Tabak gegen *Tabak-Mosaik-Virus (TMV)*. Bei Verwendung von Tabakpflanzen mit dem Resistenzgen *N* gegen *TMV* zeigte sich, dass das Gewebe in unmittelbarer Umgebung von nekrotischen Läsionen, welche durch *TMV* ausgelöst wurden, im hohen Maße gegen *TMV* und *Tabak-Nekrose-Virus (TNV)* resistent war. Weiterhin wurde beobachtet, dass auch systemisches Gewebe dieser Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *TMV* zeigte und diese Resistenz auch von anderen Necroviren ausgelöst werden kann. Durch die Induktion von Salicylsäure im lokalen wie auch im systemischen Pflanzengewebe wird die SAR eingeleitet (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990). Die SAR vermittelt eine Breitbandresistenz gegen verschiedene Bakterien, Pilze, Oomyceten und Viren. Diese Resistenz ist nicht nur breitgefächert, sondern schützt über einen langen Zeitraum von Wochen bis zu Monaten hinweg vor Infektionen (Kuc, 1987). Das Einsetzen der SAR wird einerseits mit einer gewaltigen transkriptionellen Reprogrammierung assoziiert (Dong, 2004; Pieterse&Van Loon, 2004). Andererseits mit der systemischen Expression von *pathogenesis-related (PR)*-Genen in uninfizierten, distalen Pflanzenteilen, welche die Pflanze vor sekundären Infektionen schützt (Durrant&Dong, 2004). Die PR-Proteine wurden erstmals 1970 nach ihrer Entdeckung in Tabak während der ETI gegen *TMV* beschrieben (Van Loon&Van Kammen, 1970). Bislang konnten die PR-Proteine in 17 Klassen unterteilt werden (Van Loon&Van Strien, 1999). Den PR-Proteinen wird allgemein eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben (Niderman *et al.*, 1995). Einigen Tabak PR-Proteinen konnten enzymatische Eigenschaften zugeordnet werden. PR2-Proteine zeigen beispielsweise eine β -1,3-Glucanaseaktivität (Kauffmann *et al.*, 1987) und PR3-Proteine weisen Chitinaseaktivitäten auf (Legrand *et al.*, 1987). PR1-Proteine zeigen *in vitro* eine antimikrobielle Wirkung (Niderman *et al.*, 1995). Die Klasse der PR1-Proteine in Tabak unterteilt sich in drei saure PR1-Proteine (PR1a, PR1b und PR1c) und ein basisches PR1-Protein. Die Expression der *PR1*-Gene wird durch Salicylsäure induziert (Ward *et al.*, 1991). Auch in *Arabidopsis* wird *PR1* neben *PR2* und *PR3* durch Salicylsäure induziert (Uknes *et al.*, 1992). Die Expression von *PR1*-Genen erfolgt Salicylsäure-induziert und steht im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung der SAR. Aufgrund dieser beiden Merkmale wird *PR1* als Markergen bei der Analyse der SAR verwendet.

Durch verschiedene Versuche wurde deutlich, dass Salicylsäure das notwendige Signal für die Etablierung der SAR ist. Sowohl *ics1* (*isochorismate synthase1*) Mutanten, welche einen Defekt in der Biosynthese von Salicylsäure aufweisen als auch Pflanzen, welche das bakterielle Gen *nahG* überexprimieren, waren nicht mehr in der Lage, die SAR einzuleiten (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993; Wildermuth *et al.*, 2001). *nahG* kodiert für eine Salicylsäurehydroxylase des Bakteriums *Pseudomonas putida*. Das Flavoprotein katalysiert die Konvertierung von Salicylsäure zu Brenzkatechin (1,2-Dihydroxybenzol) (Yamamoto *et al.*, 1965). Die Akkumulation freier Salicylsäure wird verhindert und Brenzkatechin zeigt keine induktive Wirkung, sodass die Etablierung der SAR unterbunden wird. Allerdings konnte die SAR durch exogene Salicylsäure-Gaben weiterhin induziert werden (Gaffney *et al.*, 1993; Friedrich *et al.*, 1995). Die Induktion der SAR kann nicht nur durch die exogene Gabe von Salicylsäure ausgelöst werden, sondern auch durch eine exogene Gabe der synthetischen Analoga 2,6-Dichlorisonicotinsäure (INA) und Benzothiadiazol-S-Methyl-Ester (BTH) (Lawton *et al.*, 1996; Vernooij *et al.*, 1995). Durch ein Pfropfungsexperiment mit einem Wurzelstock von *nahG*-Pflanzen und wildtypischen Propfreisen konnte demonstriert werden, dass Salicylsäure für die Etablierung der SAR nur im systemischen Pflanzengewebe benötigt wird. Nach Infektion des Wurzelstocks mit *TMV* konnte zwar lokal keine Salicylsäureakkumulation nachgewiesen werden, aber dennoch kam es in den wildtypischen Pfropfreisen zur *PR1*-Expression (Vernooij *et al.*, 1994). Salicylsäure ist zwar die Signalsubstanz, welche für die Etablierung der SAR in distalem Gewebe benötigt wird, jedoch übernimmt sie nicht die Weiterleitung des Signals von lokalem Gewebe zum systemischen Gewebe. Lokal-induzierte Nekrosen führen zur Bildung eines mobilen vaskulären Faktors, welcher in distalem Gewebe Salicylsäure benötigt, um die systemische Resistenz zu etablieren (Vernooij *et al.*, 1994). Ein avirulentes Pathogen löst nicht nur eine lokale Abwehrreaktion und die Produktion von Salicylsäure in der Pflanze aus, sondern induziert auch die Produktion verschiedener weiterer Signalsubstanzen wie Methyl-Salicylsäure (MeSA), Azelainsäure, Glycerol-3-Phosphat (G3P) und Pipecolinsäure (Chanda *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2009; Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990; Návarová *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2007). In Tabak wurde für MeSA die Funktion des mobilen Signals für die Induktion der SAR im systemischen Gewebe postuliert. Dabei soll lokal synthetisierte Salicylsäure mittels einer Salicylsäure-Methyltransferase in MeSA konvertiert werden, so in systemisches Gewebe gelangen und dort wieder durch SABP2 (*salicylic-acid-binding-protein2*) in Salicylsäure konvertiert werden (Park *et al.*, 2007). Die weiteren Substanzen werden ebenfalls mit der Etablierung der SAR in Verbindung gebracht. Azelainsäure und G3P bilden einen parallel benötigten Signalweg zur Induktion der SAR aus. Azelainsäure fördert im Fall einer Infektion nicht nur die Salicylsäureproduktion und die Expression Salicylsäure-abhängiger Gene, sondern induziert auch die Expression von G3P-Biosynthese-Genen (Jung *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2013). Die Akkumulation von G3P erfolgt vor der Akkumulation von Salicylsäure in infiziertem Gewebe. Mutanten mit defekter G3P-Synthese waren in der Ausbildung der SAR beeinträchtigt (Chanda *et al.*, 2011). Auch die Pipecolinsäure scheint in direktem Zusammenhang mit der Induktion der SAR zu stehen. Mutanten mit defekter Pipecolinsäure-Biosynthese waren nicht

mehr in der Lage, die SAR einzuleiten und zeigten eine beträchtliche Reduktion der Akkumulation von Salicylsäure in systemischem Gewebe (Ding *et al.*, 2016; Návarová *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2004a). Diese Fakten legen dabei die Vermutung nahe, dass es sich eventuell bei Pipecolinsäure um ein solches mobiles Signal handeln könnte.

Neben der SAR gibt es noch eine zweite Form der induzierten Resistenz. Die induzierte systemische Resistenz (ISR) wird durch Rhizobakterien ausgelöst (Van Loon, 1998) und kommt bei verschiedenen Pflanzenarten wie Gurken, Nelken und Arabidopsis vor (Pieterse *et al.*, 1996; Wei *et al.*, 1991; Van Peer *et al.*, 1991). Anders als die SAR ist die ISR von Ethylen und Jasmonsäure abhängig und wird nicht mit der Expression von *PR*-Genen in Verbindung gebracht (Pieterse *et al.*, 1998). Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen übernehmen wichtige regulatorische Rollen im Signalnetzwerk der pflanzlichen Abwehr (Pieterse *et al.*, 2012; Robert-Seilanianantz *et al.*, 2011). Salicylsäure übernimmt die Induktion der Abwehr gegen biotrophe Pathogene, wohingegen Jasmonsäure und Ethylen überwiegend für die Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und Herbivoren benötigt werden (Bari&Jones, 2009; Glazebrook *et al.*, 2005; Spoel *et al.*, 2007). Die Signalwege wirken dabei nicht unabhängig voneinander, sondern beeinflussen sich unter anderem auch antagonistisch. Eine gesteigerte Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene korreliert beispielsweise mit einer erhöhten Anfälligkeit der Pflanze gegenüber biotrophen Pathogenen und umgekehrt (Grant&Lamb, 2006). Das Zusammenspiel der Signalwege der Abwehr gegen verschiedene Arten von Pathogenen ermöglicht es der Pflanze, sich effektiv mit geringem Energieaufwand zu schützen und zu wehren.

1.1.1 NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS RELATED GENS 1 (NPR1)

Unabhängige Arbeitsgruppen entdeckten Mutanten in Arabidopsis, welche nicht mehr in der Lage waren, auf SAR-induzierende Reize zu reagieren. Mit Hilfe einer chimären Reportergenkonstruktion gelang es Cao und Mitarbeitern (1994), eine dieser Mutanten zu identifizieren. Die Reportergenkonstruktion bestand aus der kodierenden Region des β -Glucuronidasegens (*GUS*) unter der Kontrolle des Promotors des *PR*-Gens β -1,3-Glucanase (*BGL2*) (Dong *et al.*, 1991). Die Mutante war nicht mehr in der Lage, die Salicylsäure-, INA- und pathogen-responsive Reportergenkonstruktion zu aktivieren. *npr1* (*nonexpresser of PR genes*) wurde als einzelne rezessive Mutation identifiziert. *npr1* Mutanten waren in Folge einer Pathogeninfektion oder Behandlung durch Salicylsäure oder INA nicht mehr fähig, SAR zu etablieren oder *PR*-Gene zu exprimieren. In unabhängigen Untersuchungen wurden allelische Mutanten zu *npr1* entdeckt, welche ebenfalls phänotypisch eine Insensitivität gegenüber der chemischen und biologischen Induktion der SAR und Resistenz, sowie eine deutliche Reduktion der *PR*-Genexpression zeigten (Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). Die *nim1* (*non inducible immunity1*) Mutante konnte im Rahmen einer Analyse von mutagenisierten Arabidopsispflanzen identifiziert werden. Die Mutante war nicht mehr in der Lage, eine INA-induzierte Resistenz gegen *Peronospora parasitica* auszubilden. Ebenfalls konnte bei dieser Pflanze weder durch

INA noch durch Salicylsäure die Expression der SAR-Gene *PR1*, *PR2* und *PR5* induziert werden (Delaney *et al.*, 1995). Die allelische Mutante *sail* (*salicylic acid insensitive1*) wurde mit Hilfe der Reportergenkonstruktion *PR1a:tms2* in mutagenbehandelten Arabidopsis identifiziert. *tms2* (*tumor morphology shooty*) kodiert für eine Amidohydrolase von *Agrobacterium tumefaciens*. Dieses Enzym konvertiert biologisch inaktives α -Naphthalinacetamid (α -NAM) in biologisch aktives Auxin α -Naphthalinessigsäure (α -NAA) (Thomashow *et al.*, 1984). *tms2* steht unter der Kontrolle des Salicylsäure-induzierbaren Promotors von Tabak *PR1a*. Durch Induktion des Promotors und der damit verbundenen Expression von *tms2* wird α -NAA gebildet. Ein erhöhter Spiegel des Auxins wirkt jedoch toxisch auf Keimlinge und reduziert signifikant das Wurzelwachstum (Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995). Die Selektion fand auf MS-Platten versetzt mit α -NAA und Salicylsäure statt. Mutante Pflanzen, welche nicht in Anwesenheit von Salicylsäure das Reportergen exprimieren, wiesen im Vergleich zum Wildtyp ein normales Wurzelwachstum auf. Die so selektionierte Mutante *sail* war zusätzlich zu der Reportergenkonstruktion nicht in der Lage, die Expression von endogenen *PR1*, *PR2* und *PR5* in Anwesenheit von Salicylsäure, INA und BTH zu induzieren (Shah *et al.*, 1997). Auch die Mutanten *eds5* (*enhanced susceptibility5*) und *eds53* (*enhanced susceptibility53*) sind allelisch zu *npr1*. Die Arabidopsismutanten wurden von der Arbeitsgruppe um Glazebrook (1996) aufgrund ihrer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* identifiziert. Obwohl diese Mutanten nicht entsprechend auf Salicylsäure reagierten, waren sie dennoch in der Lage, normal Salicylsäure zu akkumulieren. Daraus wurde geschlossen, dass NPR1/NIM1/SAI1 eine wichtige Komponente der Regulation der SAR-Signaltransduktion ist und dabei unterhalb der Salicylsäureakkumulation, aber oberhalb der SAR-Geninduktion und Resistenz agiert (Delaney *et al.*, 1995).

Der Phänotyp der mutanten Pflanzen gab Grund zur Vermutung, dass es sich dabei um einen positiven Regulator der Salicylsäure-Signaltransduktion handelt. Die Charakterisierung des *NPR1/NIM1* Gens zeigte, dass es für ein 593 Aminosäure großes Protein mit einem Molekulargewicht von 66 kDa kodiert. Dieses Protein verfügt über vier zentral gelegene Ankyrinwiederholungen (Cao *et al.*, 1997) und eine N-terminale BTB/POZ-Domäne (*broad complex tramtrack bric-à-brac/pox virus and zinc finger*; Aravind und Koonin, 1999). Beide Domänen sind in Protein-Protein-Interaktionen involviert (Bork *et al.*, 1993; Bardwell&Treisman, 1994). Eine unterbrochene Konsensussequenz der Ankyrinwiederholungen wirkt sich dabei negativ auf die Funktionsfähigkeit von NPR1 aus (Cao *et al.*, 1997). Die Transformation eines intakten *NPR1*-Gens führt zur Komplementierung der *npr1* Mutante und so zur Wiederherstellung der Fähigkeit zur SAR-Induktion mit verbundener *PR*-Genexpression und Resistenz (Cao *et al.*, 1997). Die konstitutive Expression von NPR1 wird durch Salicylsäure-, INA-Behandlung oder Pathogeninfektion gesteigert (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Durch Überexpression von NPR1 wird die Resistenz gegen Pilz- oder Bakterieninfektionen erhöht. Dabei erfolgt eine stärkere, aber nicht schnellere Induktion der *PR*-Gene (Cao *et al.*, 1998). Allerdings muss die Aktivierung von NPR1 durch Induktion erfolgen, damit die Expression der *PR*-Gene induziert werden kann (Cao *et al.*, 1997). NPR1 verfügt über ein Zellkernlokalisierungssignal (*nuclear*

localization sequence, NLS) im C-Terminus im Bereich von Aminosäure 541 bis 554 (Kinkema *et al.*, 2000). Die Arbeitsgruppe um Xinnian Dong postuliert, dass NPR1 im uninduzierten Zustand als Oligomer im Cytoplasma vorliegt, welches durch intermolekulare Disulfidbindungen zusammengehalten wird. Durch Induktion der SAR ändert sich der zelluläre Redoxzustand und es erfolgt die Reduktion von NPR1 in seine monomerische Form. Diese Reaktion wird durch Thioredoxine (TRXs) katalysiert (Tada *et al.*, 2008). Die monomerische Form von NPR1 wird in den Zellkern transportiert, akkumuliert dort und aktiviert die *PR*-Genexpression (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). Die Monomerisierung von NPR1 ist dabei wichtig für die Induktion der *PR*-Gene. Eine Hemmung der Reduktion von NPR1 verhindert die Expression von *PR*-Genen. Bei der Oligomerisierung spielen Cys^{82/216} eine Rolle, da ihre Mutagenese eine konstitutive Monomerisierung und Zellkernlokalisierung zur Folge hat (Mou *et al.*, 2003). Die S-Nitrosylierung von Cys¹⁵⁶ des NPR1 durch S-Nitrosoglutathion (GSNO) erleichtert dabei die Oligomerisierung. Die Mutation dieses Cysteins führt ebenso zur Hemmung der NPR1-vermittelten Resistenz (Tada *et al.*, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des C-terminalen Cys⁵⁸⁹ für den Import in den Zellkern und die Etablierung der SAR benötigt wird. Die Phosphorylierung erfolgt über die *sucrose-non-fermenting* 1 (SNF1) -related kinase 2.8 (SNRK2.8; Lee *et al.*, 2015). In uninduzierten Pflanzen wird monomeres NPR1 im Zellkern kontinuierlich durch das 26S Proteasom degradiert. Der Abbau von NPR1 findet aber auch während der SAR statt und ist wichtig für die Etablierung der SAR und die Expression der Zielgene von NPR1. Durch die Phosphorylierung der Serine^{11/15} von NPR1 im Zellkern kommt es zur Cullin3-vermittelten Degradierung (Spoel *et al.*, 2009). Für die Degradierung von NPR1 wird die Sumoylierung des Proteins durch SUMO3 (*small ubiquitin-like modifier 3*) benötigt. Die Modifikation durch SUMO3 wird dabei durch die Phosphorylierung der Serine^{55/59} von NPR1 reguliert. Eine Phosphorylierung dieser Serine inhibiert die Interaktion zwischen SUMO3 und NPR1. Die Interaktion von SUMO3 mit NPR1 ist aber für die Phosphorylierung von Serin^{11/15} notwendig, durch die wiederum der Abbau von monomeren NPR1 im Zellkern gewährleistet wird. Posttranslationale Modifikationen von NPR1 erlauben eine dynamische, aber dennoch streng regulierte Kontrolle der Immunantwort (Saleh *et al.*, 2015).

Zusätzlich zum positiven Regulator NPR1 der SAR konnte auch ein mutmaßlich negativer Regulator identifiziert werden. In der *npr1-1* Mutante (H334Y; Glazebrook *et al.*, 1996) konnte eine rezessive Mutation *sn1l* identifiziert werden, welche die Fähigkeit zur Etablierung der SAR in dieser Mutante wiederherstellt. *SN1l* (*suppressor of npr1-1 inducible1*) kodiert für ein Leucin-reiches Protein, welches vorzugsweise im Zellkern lokalisiert ist (Li *et al.*, 1999). *SN1l* verhindert die basale Expression von *PR*-Genen in Abwesenheit biologischer oder chemischer Induktion (Mosher *et al.*, 2006).

Das Genom von *Arabidopsis thaliana* enthält neben *NPR1* noch fünf weitere *NPR1*-ähnliche Gene. Anders als für *NPR1* ist über die Paraloge noch wenig bekannt. Aus phylogenetischer Sicht ist *NPR2* *NPR1* am ähnlichsten. *NPR3* und *NPR4* sind untereinander recht ähnlich und weisen auf Proteinebene

eine vergleichbare Domänenstruktur wie NPR1 und NPR2 auf. *NPR5* und *NPR6* sind auch als *BOP2* (*blade-on-petiole2*) und *BOP1* (*blade-on-petiole1*) bekannt und sind entferntere Paraloge von NPR1. Diese beiden Proteine werden mit der Entwicklung der Pflanze in Zusammenhang gebracht (Khan *et al.*, 2013). Die phylogenetische Analyse von NPR-ähnlichen Proteinen unterstützt die Annahme, dass die drei Gruppen NPR1/NPR2, NPR3/NPR4 und BOP1/BOP2 mit jeweils zwei sehr ähnlichen Gen-Paaren durch Gen-Duplikation im Laufe der Evolution entstanden sind (Shi *et al.*, 2013).

NPR1 homologe Gene sind in allen höheren Pflanzen vertreten. In Reis (*Oryza sativa* L.) sind fünf *NPR1*-ähnliche Gene bekannt. Neben *OsNPR1* (*NH1*, *NPR1* *homologue 1*; Chern *et al.*, 2005) und *OsNPR2* (*NH2*; Chern *et al.*, 2005) enthält das Reis-Genom noch *OsNPR3*, *OsNPR4* und *OsNPR5*. Eine phylogenetische Analyse deutet darauf hin, dass *OsNPR1* *AtNPR1* am ähnlichsten ist (Yuan *et al.*, 2007). Die Überexpression von *NH1* führt zu einer verstärkten Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Dabei kann es allerdings zur spontanen Aktivierung von Abwehrgenen kommen. Im Gegensatz zu Arabidopsis, denn dort erfolgt die Aktivierung der Abwehrgene erst nach Induktion (Chern *et al.*, 2005a). In Tabak sind dagegen nur drei *NPR1*-ähnliche Gene bekannt. Ebenso wie Arabidopsis *NPR1* werden Tabak *NPR1* und *NIM1-like* konstitutiv exprimiert. Auch die Domänenstruktur der Proteine ist vergleichbar mit *AtNPR1*. Tabak *NPR1* und *NIM1-like* verfügen ebenfalls über eine N-terminale BTB/POZ-Domäne und eine zentral lokalisierte Ankyrin-Domäne (Maier *et al.*, 2011). Das Genom von Tabak enthält zusätzlich noch ein Gen für *NPR5*, welches für ein BOP-Protein kodiert (Wu *et al.*, 2012).

1.1.2 *as-1* Elemente

Im Verlauf der SAR wird die Expression von *PR*-Genen induziert. Dabei werden verschiedene *PR*-Proteine je nach Pathogenart oder Stress induziert (Carr&Klessig, 1989). *PR*-Proteine weisen verschiedene Wirkungen und biologische Funktionen auf. *PR1* besitzt eine antimykotische Wirkung, während weitere *PR*-Gene beispielsweise für β -1,3-Glucanasen, Chitinasen oder Defensine kodieren (Antoniw *et al.*, 1980; Melchers *et al.*, 1994; Métraux *et al.*, 1988; Terras *et al.*, 1995; Van Loon, 1982). Die Expression von *PR*-Genen korreliert mit dem Resistenzstatus der Pflanze (Carr *et al.*, 1985). Durch exogene Gaben von Salicylsäure kann die *PR*-Genexpression effektiv induziert werden, ebenso wie eine erhöhte Resistenz gegenüber verschiedenen Viren und Pilzen (Hooft van Huijsduijnen *et al.*, 1986; Ye *et al.*, 1989; White *et al.*, 1987; White, 1979). Malamy und Mitarbeiter (1990) konnten zeigen, dass nach einer *TMV*-Infektion parallel zur *PR1*-Induktion der Salicylsäuregehalt *TMV*-resistenter Pflanzen ansteigt und die *PR*-Gene transkriptionell durch Salicylsäure reguliert werden.

Innerhalb des 35S-RNA-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus konnte ein Salicylsäure-sensitives Element identifiziert werden. Dieses *cis*-aktive Element ist für die Salicylsäure-Induzierbarkeit des Promotors verantwortlich. Das *cis*-Element beinhaltet eine Tandemwiederholung des TGACG-Elements und wird als *as-1* (*activation sequence 1*) bezeichnet (Lam *et al.*, 1989; Qin *et al.*, 1994).

Durch funktionelle Analysen des *PR1a*-Promotors in Tabak konnte eine Region (-691 Bp bis -553 Bp) identifiziert werden, welche die Expression des *GUS*-Reportergens in Gegenwart von Salicylsäure vermittelt. Diese Region enthält zwei TGACG-Elemente in umgekehrter Orientierung mit einem Abstand von sechs Basenpaaren, welche an das *as-I*-Element erinnern und aus diesem Grund im Folgenden als *as-I*-ähnliche Elemente bezeichnet werden. Mutationen im *as-I*-ähnlichen Element des *PR1a*-Promotors reduzieren die *GUS*-Reportergenaktivität deutlich. Die *PR1a*-Expression wird durch das *as-I*-ähnliche Element innerhalb des *PR1a*-Promotors reguliert (Grüner&Pfitzner, 1994; Strompen *et al.*, 1998). Mittels funktioneller Analyse des Arabidopsis *PR1*-Promotors wurden im Bereich zwischen -698 Bp und -621 Bp regulatorische Elemente identifiziert, welche für die Induktion durch INA benötigt werden. Unter anderem wurden zwei negativ regulatorische Elemente *linker scan4* (*LS4*; -666 Bp bis -675 Bp) und *linker scan5* (*LS5*; -664 Bp bis -661 Bp), sowie ein positives regulatorisches Element *linker scan7* (*LS7*; -645 Bp bis -640 Bp) gefunden. *LS5* und *LS7* enthalten jeweils ein *asI*-ähnliches Element mit der Sequenz ACGTCA, welche komplementär zu der eigentlichen TGACG-Sequenz ist. Das positiv regulatorische Element *LS7* ist in die INA- und Salicylsäure-Empfindlichkeit involviert und wird für die Induktion der *PR1*-Genexpression benötigt (Lebel *et al.*, 1998). Durch die enthaltenen *cis*-aktiven Elemente innerhalb der *PR1*-Promotoren ist Salicylsäure in der Lage, die Expression dieser Gene zu regulieren. Die Regulation der Transkription unter Kontrolle der *cis*-Elemente findet durch die spezifische Bindung von Transkriptionsfaktoren statt (Singh *et al.*, 2002). *In vitro* konnte beispielsweise die Bindung des bZIP-TGA-Transkriptionsfaktors TGA1a an das *as-I*-ähnliche Element des *PR1a*-Promotors nachgewiesen werden (Strompen *et al.*, 1998). Für Arabidopsis TGA2 konnte gezeigt werden, dass es im *PR1*-Promotor von Arabidopsis sowohl an *LS7* als auch an *LS5* binden kann (Després *et al.*, 2000). Dies bedeutet, dass TGA-Transkriptionsfaktoren an der *PR1*-Induktion im Rahmen der SAR beteiligt sind.

1.1.3 bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren

Aufgrund der Tatsache, dass NPR1 zwar über zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen verfügt, aber keine DNA-Bindedomäne aufweist, wurde vermutet, dass NPR1 die Regulation der Salicylsäure-vermittelten Genexpression durch Assoziation mit weiteren Proteinen koordiniert. Der Nachweis der direkten Interaktion von NPR1 mit Mitgliedern der bZIP-TGA-Transkriptionsfaktorfamilie in Hefe konnte eine direkte Verbindung zwischen NPR1 und der Regulation der *PR1*-Genexpression herstellen (Després *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000).

Transkriptionsfaktoren mit einer bZIP-Domäne sind in Pflanzen ubiquitär. Die *basic leucine zipper* (bZIP)-Domäne umfasst 40 bis 80 Aminosäuren und enthält zwei wichtige Motive. Die basische Region (b) gewährleistet die spezifische Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Ziel-DNA. Das Leucin-Zipper-Motiv (ZIP) ist für die Dimerisierung von Bedeutung (Katagiri *et al.*, 1992; Shen *et al.*, 2016; Wingender *et al.*, 2001). Die Dimerisierung ist Voraussetzung für die Bindung der bZIP-

Transkriptionsfaktoren an die DNA. Das Leucin-Zipper-Motiv besteht aus mindestens vier Leucinen, welche durch sieben Aminosäuren voneinander getrennt sind. Die bZIP-Domäne nimmt eine α -helikale Konformation an. Die Dimerisierung erfolgt durch die hydrophobe Verbindung der Seitenketten der Leucine, wobei eine *coiled-coil* Struktur entsteht und die beiden basischen Regionen nebeneinanderstellt, welche nun an DNA binden können (Ellenberger *et al.*, 1992; Landschulz *et al.*, 1988; Vinson, 1989). bZIP-Transkriptionsfaktoren sind an der Regulation einer Vielzahl wesentlicher Prozesse in der Pflanze beteiligt. Als Beispiel seien hier die Differenzierung von Gewebe, Energiestoffwechsel und Pathogen-Abwehr genannt. In *Arabidopsis* sind 77 solcher Transkriptionsfaktoren mit einer maßgeblichen Rolle im pflanzlichen Lebenszyklus bekannt (Vincentz *et al.*, 2003; Wei *et al.*, 2012). Die Transkriptionsfaktoren wurden aufgrund von Sequenzähnlichkeiten der basischen Regionen in zehn Gruppen unterteilt. bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren bilden dabei Gruppe D und sind sowohl an der Abwehr von Pathogenen als auch an der Entwicklung der Pflanze beteiligt (Alves *et al.*, 2013; Jakoby *et al.*, 2002; Wei *et al.*, 2012). Die Bindung von bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren erfolgt an TGACG-Sequenzwiederholungen von *as-1* und *as-1*-ähnlichen Elementen, wie sie beispielsweise im *PR1*-Promotor zu finden und essentiell für die Salicylsäure-induzierte *PR1*-Genexpression sind (Lebel *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 2003; Strompen *et al.*, 1998).

In *Arabidopsis* besteht die TGA-Transkriptionsfaktorfamilie aus zehn Mitgliedern (Jakoby *et al.*, 2002). Aufgrund von Sequenzhomologien sind die TGA-Transkriptionsfaktoren wiederum in fünf Gruppen unterteilt. AtTGA1 (Schindler *et al.*, 1992) und AtTGA4 (Zhang *et al.*, 1993) bilden Gruppe I. AtTGA2 (Kawata *et al.*, 1992), AtTGA5 (Zhang *et al.*, 1993) und AtTGA6 (Xiang *et al.*, 1997) gehören zur Gruppe II. Gruppe III besteht aus AtTGA3 (Miao *et al.*, 1994) und AtTGA7 (Després *et al.*, 2000). Zur Gruppe IV gehören AtTGA9 und AtTGA10 (Murmur *et al.*, 2010). PERIANTHIA (PAN) ist in keiner der aufgeführten Gruppen eingliedert und bildet alleine Gruppe V (Chuang *et al.*, 1999). PAN und die Mitglieder der Gruppe IV sind für die Entwicklung der Pflanze von Bedeutung, während die Mitglieder der Gruppen I bis III in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen. Die TGA-Transkriptionsfaktoren der Gruppen II und III können konstitutiv in Hefe und *in planta* mit NPR1 interagieren, wohingegen TGA1 und TGA4 in Hefe nicht mit NPR1 in Interaktion treten können (Després *et al.*, 2000; Fan&Dong, 2002; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000). Allerdings konnte diese Interaktion für die Mitglieder der Gruppe I in Salicylsäure-behandelten Blättern nachgewiesen werden. AtTGA1 und AtTGA4 besitzen zwei Cysteine an den Positionen 260 und 266, welche Disulfidbrücken ausbilden und nur in Gruppe I der TGA-Transkriptionsfaktoren zu finden sind. Durch Salicylsäure werden die Disulfidbrücken reduziert und eine Interaktion mit NPR1 ist möglich (Després *et al.*, 2003). Die gezielte Mutation von Cys^{260/266} ermöglicht eine Interaktion zwischen AtNPR1 und AtTGA1 und AtTGA4 auch in Hefen und unbehandelten Blättern (Després *et al.*, 2003). Anhand einer Tripelmutante *tga2-ltga5-ltga6-1* der TGA-Transkriptionsfaktoren der Gruppe II konnte diesen eine redundante Funktion in der positiven Regulation der SAR sowie die Regulation der Salicylsäuretoleranz ähnlich NPR1 zugeordnet werden. Es konnte gezeigt werden, dass bei der Tripelmutante die *PR1*-Induktion durch INA sowie die

Ausbildung der SAR unterdrückt wird. Weiterhin zeigte die Tripelmutante eine ähnlich erhöhte Sensitivität gegenüber der Phytotoxizität von Salicylsäure wie die *npr1-1* Mutante (Cao *et al.*, 1997). Die Keimlinge waren weiß und verblieben im Keimblattstadium. Im Gegensatz dazu verhielten sich die Mutanten *tga6-1* und *tga2-1tga5-1* unauffällig und ähnlich dem Wildtyp (Zhang *et al.*, 2003).

Mit AtNPR1 als Köderprotein konnten in Hefe auch TGA-Transkriptionsfaktoren aus Reis identifiziert werden. Die Transkriptionsfaktoren rTGA2.1, rTGA2.2 und rTGA2.3 weisen dabei eine Identität von 75%, 76% und 78% zu AtTGA2 auf. Die Bindung von Arabidopsis NPR1 an rTGA2.1 konnte auch *in vitro* nachgewiesen werden (Chern *et al.*, 2001). rTGA2.2 interagiert aber auch in Hefe mit dem Reis NPR1-Homolog NH1 stark (Chern *et al.*, 2005a) und bindet an den Promotor des *RCH10* (*rice chitinase 10*) Gens. Dieses Gen kodiert für eine basische Chitinase und wird durch Pilzzellwand-Elicitoren induziert. rTGA2.2 ist auch in der Lage, *in vitro* an ein 32 Bp langes Oligonukleotid zu binden, welches der Sequenz des Arabidopsis *PR1* Promotors von Position -656 bis -625 entspricht und *LS7* enthält. Dieses Oligonukleotid beinhaltet die TGACG-Sequenz, welche für die Salicylsäure-Responsivität benötigt wird (Chern *et al.*, 2001).

In Tabak sind bislang sechs Vertreter der bZIP-TGA-Transkriptionsfaktorfamilie bekannt. NtTGA1a wurde 1989 von der Arbeitsgruppe um Katagiri entdeckt und beschrieben. Es weist dieselbe Bindspezifität für das TGACG-Motiv des *as-1*-Elements wie Faktor ASF-1 (*as-1-binding factor1*) auf. Wenig später wurde ein NtTGA1a-ähnlicher TGA-Faktor PG13 beschrieben (Fromm *et al.* 1991). Auch dieser ist in der Lage, *as-1* zu binden. Beide TGA-Faktoren werden überwiegend in Wurzelgewebe und eher moderat in Blattgewebe exprimiert. TGA1a und PG13 gehören der Klasse I der bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren an. Aufgrund ihrer hohen Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu Arabidopsis Klasse II TGA-Transkriptionsfaktoren wurden NtTGA2.1 und NtTGA2.2 der Klasse II zugeordnet. Diese beiden TGA-Faktoren sind ebenfalls wie NtTGA1a und PG13 in der Lage, an *as-1* zu binden. Anders als NtTGA1a werden NtTGA2.1 und NtTGA2.2 überwiegend in Blättern exprimiert, wobei die Expression von NtTGA2.2 wesentlich geringer ist. Nur NtTGA1a wird bevorzugt in Wurzelgewebe exprimiert (Niggeweg *et al.*, 2000). Ein weiteres Mitglied der bZIP-TGA-Transkriptionsfaktorfamilie ist NtTGA10. Es ist hinsichtlich der Aminosäuresequenz am ähnlichsten zu AtbZIP65 und wurde, um die Tabak-Klassifikation der von Arabidopsis anzupassen, Klasse IV zugeordnet. NtTGA10 bindet ebenso wie die im Vorfeld beschriebenen NtTGA-Transkriptionsfaktoren an das *as-1* Element. Die Expression von NtTGA10 findet, so wie die Expression von NtTGA1a, in Wurzelgewebe statt. Allerdings beschränkt sie sich in diesem Fall exklusiv auf diesen Bereich. Es konnte keine Expression in Blättern, Stängeln oder Blüten nachgewiesen werden (Schiermeyer *et al.*, 2003). Ferner gibt es noch ein relativ neues Mitglied der TGA-Transkriptionsfamilie in Tabak, welches Gruppe III zugeordnet wird. NtTGA7 wird nicht in jungen Blättern exprimiert. Die mRNA kann erst in älterem Blattgewebe nachgewiesen werden. In jüngeren Pflanzen wird NtTGA7 überwiegend in Blattstielen, Stängel und Wurzeln exprimiert (Stos-Zweifel *et al.*, 2018). In Hefe weisen NtTGA1a, NtTGA2.1, NtTGA7 und

NtTGA10 ein Transaktivierungspotential auf, wenn diese an die GAL4-DNA-Bindedomäne fusioniert werden. Bei NtTGA2.2 ist eine Transaktivierungsaktivität jedoch kaum messbar. NtTGA2.1, NtTGA2.2 und NtTGA7 sind des Weiteren in der Lage, in Hefe sowohl mit Arabidopsis NPR1 als auch mit Tabak NPR1 zu interagieren. NtTGA1a und NtTGA10 besitzen diese Fähigkeit nicht (Niggeweg *et al.*, 2000; Schiermeyer *et al.*, 2003; Stos-Zweifel *et al.*, 2018).

1.1.4 NIMIN-Proteine

Die NIMIN (*NIM1-interacting*) -Proteine bilden eine weitere Protein-Familie, die mit NPR1 in Interaktion treten kann. Die Identifizierung dieser bis dahin unbekannten Proteinfamilie erfolgte mittels des Hefe-Zwei-Hybridsystems. NIMIN1, NIMIN2 und NIMIN3 aus *Arabidopsis thaliana* sind relativ kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 13 kDa und 15 kDa. Bei Sequenzabgleichen mit der Datenbank konnte NIMIN1b als weiteres Mitglied dieser Proteinfamilie identifiziert werden. Die Ähnlichkeit zu NIMIN1 liegt dabei bei 64% und die Identität bei 44%. NIMIN1b weist ebenfalls die Eigenschaft der NPR1-Interaktion auf (Weigel *et al.*, 2001).

Die Expression von *NIMIN1* und *NIMIN2* wird durch Salicylsäure induziert. Die Akkumulation von *NIMIN1*- und *NIMIN2*-Transkripten erfolgt moderat transient in behandelten Pflanzen, bevor die Akkumulation von *PR1* sein Maximum erreicht. Die Expression von *NIMIN2* scheint anders als die von *NIMIN1* und *PR1* nur teilweise von NPR1 abhängig zu sein. *NIMIN2* ist ein frühes Salicylsäure-responsives Gen, während *NIMIN1* erst deutlich später induziert wird. Die Expression von *NIMIN1* wird allerdings bereits vor dem Beginn der Akkumulation von *PR1* wieder eingestellt (Hermann *et al.*, 2013; Weigel *et al.*, 2001). Anders als die Induktion von *PR1*-Promotoren beruht die Induktion der Arabidopsis *NIMIN1* und *NIMIN2* Promotoren auf Salicylsäure, aber nicht auf Zelltodsignalen (Glocova *et al.*, 2005). Die Salicylsäure-Sensitivität ist auf zwei *cis*-aktive TGACG-Motive innerhalb des *NIMIN1*-Promotors zurückzuführen. Durch Mutation eines dieser Motive wird die Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Fonseca *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu *NIMIN1* und *NIMIN2* wird *NIMIN3* konstitutiv in geringem Maß exprimiert und dabei weder von Salicylsäure und BTH noch durch Auslösen von HR beeinflusst. Des Weiteren ist die Expression von *NIMIN3* unabhängig von einem intakten NPR1 (Hermann *et al.*, 2013).

NIMIN1, NIMIN1b und NIMIN2 können über die zentrale DXFFK-Domäne mit der C-terminalen Region von NPR1 interagieren (Weigel *et al.*, 2001). Die Bindung an NPR1 wird in Hefe durch Anwesenheit von Salicylsäure signifikant reduziert (Maier *et al.*, 2011). Die Bindedomäne für NIMIN1/2-Proteine wurde in Arabidopsis NPR1 im C-Terminus zwischen Aminosäure 493 und 512 kartiert (Maier *et al.*, 2011). Die Phenylalanine an Position 507/508 innerhalb dieser Domäne sind dabei essentiell für die Bindung der NIMIN-Proteine. Die Mutante AtNPR1 F507/508S kann NIMIN1 und NIMIN2 nicht mehr binden (Hermann *et al.*, 2013). Die Phenylalanine in der DXFFK-Domäne sind

innerhalb der NIMIN-Proteine konserviert und spielen bei der Interaktion mit NPR1 eine entscheidende Rolle. In Hefe und *in planta* konnte gezeigt werden, dass der Austausch dieser Phenylalanine zu Serinen (F49/50S) die Bindung von NIMIN1 an NPR1 vollständig unterbindet (Weigel *et al.*, 2005). Diese Domäne ist zwischen den Mitgliedern der NIMIN-Proteinfamilie verschiedener Pflanzenspezies konserviert (Zwicker *et al.*, 2007). Eine Ausnahme hingegen bildet NIMIN3. NIMIN3 verfügt nicht über eine DXFFK-Domäne und interagiert auch nicht mit dem C-Terminus von NPR1, sondern mit einer geringeren Affinität über den N-Terminus von NPR1 (Weigel *et al.*, 2001). Die Bindung von NIMIN3 an NPR1 in Hefe wird durch Salicylsäure nicht beeinflusst (Maier *et al.*, 2011). Trotz der unterschiedlichen Bindestellen von NIMIN1/NIMIN1b/NIMIN2 und NIMIN3 ist eine simultane Bindung der NIMIN-Proteine an NPR1 nicht möglich. NIMIN1, NIMIN1b und NIMIN2 konkurrieren möglicherweise um die Bindestelle, während die Bindung von NIMIN3 an NPR1 die Bindestelle für die weiteren NIMIN-Proteine unzugänglich macht (Hermann *et al.*, 2013).

Die transiente Überexpression der *NIMIN*-Gene unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors in transgenen *Nicotiana benthamiana* Pflanzen mit der Reporterengenkonstruktion *-1533PRIa_{pro}:GUS* zeigte unterschiedliche Effekte auf die Aktivität der Reporterengenkonstruktion der transgenen Pflanzen. Die Überexpression von *NIMIN1* und *NIMIN3* wirkte sich reprimierend auf die Salicylsäure-vermittelte Aktivität des *PRIa*-Promotors aus. Die Repression war bei *NIMIN3* im Vergleich zu *NIMIN1* schwächer ausgeprägt. Die Überexpression von *NIMIN2* hingegen zeigte eine solche reprimierende Wirkung nicht. Durch die Überexpression von *NIMIN1* und *NIMIN3* wird nicht nur die Aktivität der Reporterengenkonstruktion reprimiert, sondern auch die endogene *PRI*-Genexpression in *N. benthamiana*. Auch hier konnte keine reprimierende Wirkung für die Überexpression von *NIMIN2* beobachtet werden (Hermann *et al.*, 2013). Mittels transgener *NIMIN1*-Überexpressions-Linien in *Arabidopsis thaliana* konnte gezeigt werden, dass sich die Überexpression von *NIMIN1* neben der Repression der Salicylsäure-vermittelten *PRI*-Geninduktion auch negativ auf die endogene *NIMIN1*-Expression auswirkt und die Pflanzen sowohl in der SAR als auch in der *R*-Gen-vermittelten Resistenz beeinträchtigt sind. Diese negativen Effekte hängen möglicherweise direkt mit der Bindung von NIMIN1 an NPR1 zusammen. Die Überexpression der *NIMIN1*-Mutante F49/50S, welche nicht mehr an NPR1 binden kann, beeinträchtigt die Pflanze in dieser Hinsicht nicht und verhält sich dem Wildtyp entsprechend. Die Analyse von *nimin1*-Nullmutanten, welche durch T-DNA-Insertion oder *double-stranded RNA interference* (dsRNAi) in *Arabidopsis* generiert wurden, zeigten hingegen eine verstärkte *PRI*-Induktion nach Salicylsäure-Behandlung, allerdings ohne einhergehende erhöhte Resistenz im Vergleich zum Wildtyp. NIMIN1 wirkt als negativer Regulator der *PRI*-Genexpression und kontrolliert die eigene Expression und die *PRI*-Expression durch direkte Interaktion mit NPR1 (Weigel *et al.*, 2005).

In Hefe interagieren NIMIN-Proteine nicht direkt mit TGA2 und TGA6. Allerdings können sie zusammen mit NPR1 im Hefe-Drei-Hybrid-System ternäre Komplexe ausbilden (Weigel *et al.*, 2001). Dabei ist der ternäre Komplex aus NPR1, TGA2 oder TGA6 und NIMIN1 entsprechend der

Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN1 Salicylsäure-sensitiv, wohingegen der ternäre Komplex unter Beteiligung von NIMIN2 in Anwesenheit von Salicylsäure stabil bleibt (Hermann *et al.*, 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass *in vivo* eine Interaktion von NPR1 mit den DNA-gebundenen TGA-Transkriptionsfaktoren 2 und 6 in Anwesenheit von NIMIN1 möglich ist und so auch eine Assemblierung des ternären Komplexes auf dem *PR1*-Promotor in Betracht kommt (Weigel *et al.*, 2005). Am C-Terminus der Arabidopsis NIMIN-Proteine befindet sich ein LXL-Motiv. Dieses Motiv erfüllt den Konsensus eines EAR-Motivs (*ethylene-responsive element binding factor (ERF)-associated amphiphilic repression motif*). Dieses Motiv kommt in Transkriptionsrepressoren vor, welche nicht direkt an DNA binden, jedoch durch Interaktion mit dem EAR-Motiv Transkriptionsaktivatoren inaktivieren können (Ohta *et al.*, 2001). Des Weiteren verfügen NIMIN-Proteine über ein Zellkernlokalisierungssignal. Zusammen mit der Tatsache, dass NIMIN1 gemeinsam mit NPR1 und TGA-Transkriptionsfaktoren *in vivo* an ein *PR1*-Promotorelement binden kann, bekräftigt das die Annahme, dass es sich bei NIMIN-Proteinen um direkte Transkriptionsrepressoren handelt (Weigel *et al.*, 2001; 2005).

NIMIN-Proteine sind im gesamten Reich der höheren Pflanzen verbreitet. Auch in monokotylen Pflanzenspezies wie in Reis konnten NIMIN-ähnliche Proteine identifiziert werden. In Reis sind mittlerweile vier NIMIN-Homologe bekannt. Neben NRR (*negative regulator of resistance*) gibt es noch RH1, RH2 und RH3 (*NRR repressor homologues*) (Chern *et al.*, 2005b; 2012). NRR ist in der Lage, sowohl mit Arabidopsis NPR1 als auch mit Reis NH1 zu interagieren. Es konnte gezeigt werden, dass diese Interaktionen über zwei verschiedene Domänen von NRR vermittelt werden. Die Arabidopsis NPR1-Bindung erfolgt über eine Sequenz von 25 Aminosäuren, welche sich von Aminosäure 28 bis 52 erstreckt. Diese Sequenz weist nur eine beschränkte Ähnlichkeit zu den NPR1-Bindedomänen von NtNIMIN2a und AtNIMIN2 auf. Im Anschluss an die NPR1-Bindedomäne befindet sich die NH1-Bindedomäne, welche sich über 24 Aminosäuren von Aminosäure 53 bis 76 erstreckt (Chern *et al.*, 2005b). Die Überexpression von *NRR* geht ebenfalls wie die Überexpression von *AtNIMIN1* mit der Repression der Induktion von Abwehrgenen und der Vermehrung von Pathogenen einher und betrifft die basale Resistenz (Chern *et al.*, 2005b). In Arabidopsis führte die Expression von *NRR* zur Unterdrückung der *PR1*-Geninduktion durch verschiedene SAR-Induktoren und der Pathogenresistenz (Chern *et al.*, 2008). NRR enthält ebenso wie die Arabidopsis NIMIN-Proteine ein EAR-Motiv im C-Terminus und ist im Zellkern lokalisiert, was ebenfalls auf eine direkte Suppression der Abwehr-Gene hinweist (Chern *et al.*, 2005b).

Ebenso konnten in Tabak NIMIN-ähnliche Proteine identifiziert und charakterisiert werden. Anhand eines Sequenzvergleichs konnte zwischen dem bis dato unbekannten Genprodukt *G8-1* und Arabidopsis NIMIN2 eine Ähnlichkeit festgestellt werden. *G8-1* wurde von Horvath und Mitarbeitern (1998) als ein Salicylsäure-induzierbares Gen in Tabak identifiziert, welches bereits bei geringen Konzentrationen von Salicylsäure exprimiert wird. Die Ähnlichkeit beider Proteine liegt bei 53% und die Identität bei 43%.

Die Sequenz von G8-1 enthält neben einer DXFFK-ähnlichen Domäne, welche wichtig für die Interaktion mit NPR1 ist, auch ein potientes Zellkernlokalisierungssignal (Weigel *et al.*, 2001). Im C-Terminus befindet sich ferner ebenfalls ein EAR-Motiv. Neben G8-1, welches nun NtNIMIN2a genannt wird, wurden noch NIMIN2b und NIMIN2c als weitere Mitglieder der NIMIN-Proteinfamilie in Tabak identifiziert. Diese drei Proteine sind strukturell miteinander verwandt, beinhalten dieselben Domänen/Motive und sind AtNIMIN2 am ähnlichsten (Zwicker *et al.*, 2007). Ferner konnten später noch zwei weitere NIMIN-Proteine gefunden werden. NIMIN-like1 (BP) und NIMIN-like2 (FS) enthalten ebenfalls alle charakteristischen Domänen der NIMIN-Proteine. Anders als die zuvor beschriebenen Tabak NIMIN-Proteine enthält NIMIN-like1 ein zusätzliches EDF-Motiv (Masroor, 2013). Das EDF-Motiv wurde zuerst für Reis NRR beschrieben. Die Aminosäureabfolge WRPxFx[W/M]EDF ist in der NH1-Bindedomäne lokalisiert. Innerhalb der Sequenzen von Arabidopsis NIMIN1, NIMIN1b und NIMIN3 konnte ebenfalls eine sehr ähnliche Sequenz zum EDF-Motiv aus acht Aminosäuren (P A/S FQPEDF) identifiziert werden. Arabidopsis NIMIN2 sowie die NIMIN2-ähnlichen Proteine aus Tabak verfügen nicht über ein solches Motiv (Chern *et al.*, 2012; Masroor, 2013; Weigel *et al.*, 2001). Die Funktion dieses Motivs ist bislang noch nicht vollständig erarbeitet, aber aufgrund von verschiedenen Analysen wird eine Rolle des Motivs bei der Bindung von Arabidopsis NIMIN3 an AtNPR1 und ein Zusammenhang mit der Repression des Salicylsäure-induzierbaren *PR1a*-Promotors in Tabak vermutet (Masroor, 2013).

In Hefe interagieren die NIMIN2-Proteine von Tabak sowohl mit Tabak NPR1 als auch mit Arabidopsis NPR1 (Zwicker *et al.*, 2007). Neben Tabak NPR1 ist auch Tabak NIM1-like in der Lage, sowohl mit NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen aus Arabidopsis als auch mit NIMIN2-Proteinen aus Tabak zu interagieren, bindet aber ebenso wie NtNPR1 nicht an AtNIMIN3 (Maier *et al.*, 2011; Zwicker *et al.*, 2007). Ebenfalls können NIMIN-like1 und NIMIN-like2 mit Tabak NPR1 und NIM1-like interagieren (Masroor, 2013). Die Bindung von NIMIN-Proteinen an Tabak NPR-Proteine wird durch die Anwesenheit von Salicylsäure nahezu vollständig unterdrückt. Die Bindedomäne für NIMIN-Proteine wurde in Tabak NPR1 zwischen Aminosäure 491 und 510 kartiert. Auch für Tabak NPR1 konnte gezeigt werden, dass die Phenylalanine an Position 505/506 essentiell für die Bindung von NIMIN2-Proteinen an NPR1 sind. Die Mutation F505/506S unterbindet diese Interaktion, wirkt sich aber nicht auf die Bindung zwischen NtNPR1 und NtTGA7 aus (Maier *et al.*, 2011).

Die Expression der *NIMIN2*-Gene wird in jungen Blättern unbehandelter Tabakpflanzen nicht induziert und kann auch nach H₂O- oder Scheinbehandlung nicht beobachtet werden. In älteren Blättern unbehandelter Pflanzen konnten hingegen *NIMIN2*-Transkripte nachgewiesen werden, welche mit der Akkumulation von PR1a einhergehen (Grüner&Pfitzner, 1994; Zwicker *et al.*, 2007). Allerdings konnte beispielsweise für die Promotoren von *AtNIMIN1* und *AtNIMIN2* in transgenen Tabakpflanzen eine schwache Aktivität nachgewiesen werden (Glocova *et al.*, 2005), sodass dies auch auf die *NIMIN2*-Promotoren in Tabak zutreffen könnte. In jungen Blättern wird die Expression von *NIMIN2*-Genen wie

die *PR1*-Expression durch Salicylsäure oder Auslösen der HR induziert (Zwicker *et al.*, 2007). Die Expression von *NIMIN2* in Tabak findet im frühen Stadium der SAR vor der Induktion der *PR1*-Expression statt. Eine Überexpression von *NIMIN2a* führt zu einer Verzögerung der *PR1*-Akkumulation in der frühen SAR, wohingegen eine Reduzierung des mRNA-Spiegels von *NIMIN2* zu einer verstärkten *PR1*-Akkumulation führt (Zwicker *et al.*, 2007). Allerdings konnte auch hier ebenso wie bei dem Ausschalten von *NIMIN1* in Arabidopsis und *NRR* in Reis keine erhöhte Resistenz gegen Bakterien und Pilze nachgewiesen werden (Chern *et al.*, 2005a; Weigel *et al.*, 2005).

1.2 Modelle der Salicylsäurewahrnehmung während der SAR

NPR1 ist bereits seit geraumer Zeit als zentrales Regulatorprotein der SAR und der *PR1*-Geninduktion bekannt und wird von Salicylsäure reguliert (Cao *et al.*, 1997; Ryals *et al.*, 1997). Dennoch konnte bislang der Mechanismus der Salicylsäurewahrnehmung und der damit verbundenen Induktion der *PR1*-Genexpression nicht eindeutig entschlüsselt werden. Im Laufe der Zeit haben sich verschiedene Hypothesen zur Wahrnehmung des Salicylsäurespiegels während der SAR entwickelt. Es gibt drei Modelle, welche im folgenden Abschnitt erläutert werden.

1.2.1 Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Fu *et al.* (2012)

Die systemisch aktivierte Resistenz wird über den Salicylsäurespiegel der Pflanze gesteuert. Das zentrale Regulatorprotein NPR1 zeigt aber unter verschiedenen Bedingungen keine bedeutende Bindung von Salicylsäure. Trotzdem reguliert Salicylsäure die Verfügbarkeit von NPR1 und trägt unter anderem so einen Teil zur Aufrechterhaltung der pflanzlichen Abwehr bei. Für die systemisch aktivierte Resistenz ist eine Kombination aus Akkumulation und Abbau von NPR1 notwendig (Spoel *et al.*, 2009). Für die Aufrechterhaltung der Homöostase von NPR1 müssen also noch weitere Faktoren existieren, um die Änderung des umgebenden Salicylsäurespiegels wahrnehmen zu können.

Durch die Hemmung des Abbaus von NPR1 sowie in der Cullin3-Mutante *cul3acul3b* verstärkt sich durch die Akkumulation von NPR1 die basale Abwehr der Pflanze, die SAR wird jedoch nicht mehr induziert. Für die Induktion wird nämlich die anschließende Cullin3-vermittelte Degradierung von NPR1 benötigt. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich die Doppelmutante *npr3npr4* in dieser Hinsicht entsprechend der Cullin3-Mutante verhält (Spoel *et al.*, 2009). Fu und Mitarbeiter (2012) konnten zeigen, dass die Akkumulation von NPR1 in *npr3* und *npr4* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp höher ist und schneller unter Salicylsäure-Einfluss ansteigt. Der Transkriptspiegel von *NPR1* steigt dabei nicht an, sodass die verstärkte Akkumulation von NPR1 post-transkriptional gesteuert werden muss. In einem *in vitro* Abbau-Experiment konnte gezeigt werden, dass rekombinantes GST-NPR1 in Pflanzenextrakten wildtypischer Arabidopsis innerhalb von 15 Minuten teilweise abgebaut wurde. Dieser Abbau konnte bei Extrakten von *npr3npr4* Mutanten nicht beobachtet werden. Allerdings konnte durch Zugabe von gereinigtem, rekombinanten NPR3 und NPR4 die defekte Degradierung von

NPR1 wiederhergestellt werden. Arabidopsis NPR3 und NPR4 scheinen eine Rolle beim Abbau von NPR1 zu spielen. Ebenso wie AtNPR1 besitzen beide Proteine im N-terminalen Bereich eine BTB/POZ-Domäne, welche charakteristisch für Cullin3-Substratadapterproteine ist. In einem *in vitro pull-down* Experiment wurde die Interaktion zwischen Cullin3a und AtNPR3 und AtNPR4 nachgewiesen. Weiterhin konnte durch Co-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass die Bindung von Cullin3a an AtNPR1 die Anwesenheit von AtNPR3 und AtNPR4 benötigt. Die Bindung von AtNPR1, sowohl an Arabidopsis NPR3 als auch an Arabidopsis NPR4, wurde *in vitro* durch ein *pull-down* Experiment und *in vivo* in Hefe nachgewiesen. Hierbei wurde beobachtet, dass diese Interaktionen Salicylsäure-sensitiv sind. Weiterhin wurde gezeigt, dass Arabidopsis NPR3 und NPR4 Salicylsäurerezeptoren sind. Sie binden Salicylsäure mit unterschiedlichen Affinitäten. AtNPR3 weist dabei die geringere Affinität auf. AtNPR3 und AtNPR4 reagieren hinsichtlich der Bindung an AtNPR1 unterschiedlich auf Salicylsäure. Die Anwesenheit von Salicylsäure verstärkt die Interaktion von AtNPR1 mit AtNPR3 deutlich, wohingegen die Bindung von AtNPR1 an AtNPR4 durch Salicylsäure gestört wird (Fu *et al.*, 2012).

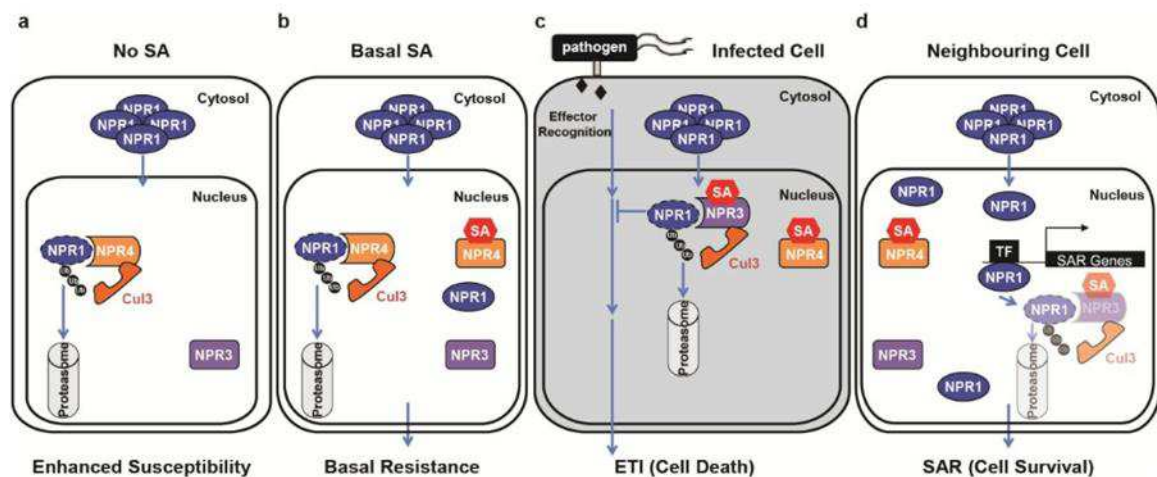
Fu *et al.*, 2012

Abb. 3 Schematische Darstellung des Modells der Salicylsäurewahrnehmung nach Fu *et al.* (2012). (A) In Pflanzen mit fehlerhafter Salicylsäurebiosynthese wird NPR1 durch Cullin3-NPR4-vermittelte-Degradierung durch das Proteasom abgebaut. Dieser Umstand führt zu einer verstärkten Pathogenanfälligkeit. (B) In wildtypischen Pflanzen wird durch den basalen endogenen Salicylsäurespiegel die Bindung von Cullin3-NPR4 an NPR1 reduziert, sodass eine ausreichende Menge von NPR1 akkumulieren kann und die basale Resistenz gewährleistet ist. (C) und (D) Der endogene Salicylsäurespiegel der Pflanze steigt im Fall einer Infektion sowohl im lokalen als auch im systemischen Gewebe an. (C) Innerhalb der Läsion ist der Salicylsäurespiegel am höchsten und führt zu einer Cullin3-NPR3-vermittelten Degradierung von NPR1, um PCD und die Ausbildung der Resistenz zu erlauben. (D) In den benachbarten Pflanzenzellen ist der Salicylsäurespiegel niedriger und begrenzt die Interaktion zwischen NPR1 und NPR3, sodass NPR1 akkumulieren kann, um PCD zu hemmen und SAR zu etablieren. [Ub – Ubiquitin; TF – Transkriptionsfaktor]

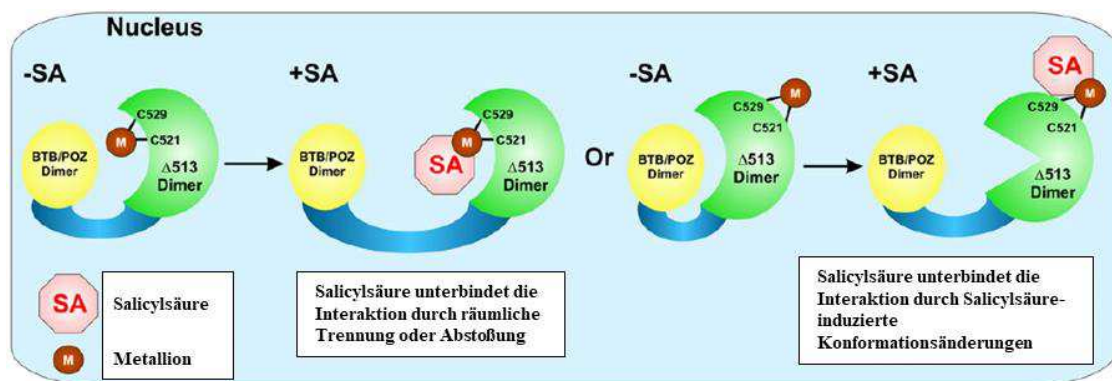
Arabidopsis NPR3 und NPR4 sollen demnach die Feinregulation der Homöostase von NPR1 in Abhängigkeit des Salicylsäurespiegels innerhalb der Pflanze gewährleisten. Ein Komplex aus AtNPR1-AtNPR4-Cullin3 stellt dabei die Degradierung von NPR1 bei einem niedrigen Spiegel von endogener Salicylsäure in der Pflanze sicher und vermeidet so eine unnötige Aktivierung der Resistenz. Durch Pathogeninfektion steigt der Salicylsäurespiegel in der Pflanze an und es bildet sich ein Komplex aus AtNPR1-AtNPR3-Cullin3. NPR1 wird abgebaut und die hypersensitive Antwort sowie ETI erfolgen. In den benachbarten Zellen ist die Konzentration der Salicylsäure geringer. AtNPR3 bindet nicht mehr an

AtNPR1. Dennoch ist der Spiegel der Salicylsäure hoch genug, damit auch AtNPR4 nicht an AtNPR1 binden kann. AtNPR1 ist so in der Lage, zu akkumulieren, damit die systemisch aktivierte Resistenz induziert werden kann (Fu *et al.*, 2012; Fu&Dong, 2013, Abb. 3).

1.2.2 Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Wu *et al.* (2012)

Im Gegensatz zu Studien wie von Fu *et al.*, (2012) ist Wu und Mitarbeitern der Nachweis gelungen, dass Salicylsäure und NPR1 *in vitro* binden können. Über eine Gleichgewichtsdialyse konnte eine Dissoziationskonstante K_d von 140 nM berechnet werden. Außerdem zeigte sich, dass die C-terminale Transaktivierungsdomäne $\Delta 513$ (Aminosäure 513 bis 593; K_d 149 nM) direkt mit Salicylsäure interagiert und beispielsweise nicht die N-terminale BTB/POZ-Domäne (Aminosäure 1 bis 190; K_d 597 μ M). Der K_d -Wert ist dabei vergleichbar mit dem K_d -Wert anderer Pflanzenhormonrezeptor-Ligand-Interaktionen und passt zum endogenen Salicylsäurespiegel von Arabidopsis. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass inaktive strukturelle Analoga der Salicylsäure wie Brenzkatechin, Methyl-Salicylsäure oder 4-Hydroxysalicylsäure, welche *in vivo* die *PR1*-Expression nicht induzieren können (Attaran *et al.*, 2009; Bi *et al.*, 1995; Conrath *et al.*, 1995; Delaney *et al.*, 1994), *in vitro* auch nicht an NPR1 binden können. Im Gegensatz dazu können aktive strukturelle Analoga wie chlorierte Derivate der Salicylsäure oder BTH, welche *in vivo* *PR1*-Geniduktoren sind (Conrath *et al.*, 1995; Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996), auch *in vitro* direkt an NPR1 mit gleicher oder sogar höherer Affinität wie Salicylsäure binden. Durch die niedrige Dissoziationskonstante, die Sättigungsfähigkeit durch Salicylsäure und die chemische Spezifität der NPR1-Salicylsäure-Interaktion erfüllt Arabidopsis NPR1 die Kennzeichen eines Rezeptors. Bereits in vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Cysteine^{521/529} im C-Terminus von NPR1 für die Aktivierung der *PR1*-Genexpression durch Salicylsäure *in vivo* benötigt werden (Rochon *et al.*, 2006). Wu und Mitarbeiter konnten fortführend zeigen, dass Cys^{521/529} für die Bindung von NPR1 und Salicylsäure essentiell sind. Diese Bindung benötigt das Übergangsmetall Kupfer, welches über Cys^{521/529} an NPR1 bindet. Durch Mutation der beiden Cysteine wird die Bindung von Kupferionen an NPR1 unterbunden und somit auch die Bindung von Salicylsäure. Durch die Bindung von Salicylsäure wird die Konformation von NPR1 geändert. Diese Konformationsänderung kann durch Entzug der Kupferionen durch Einsatz von EDTA oder Mutation von Cys^{521/529} inhibiert werden. Mou und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass NPR1 in unbehandelten Gewebe als Oligomer vorliegt, welches durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinen zusammengehalten wird. Durch die Akkumulation von Salicylsäure werden reduzierende Bedingungen in der Zelle geschaffen, welche zur Reduktion der Disulfidbrücken führen. In dieser Studie konnte allerdings gezeigt werden, dass nicht die reduzierenden Bedingungen, sondern die direkte Bindung der Salicylsäure an Cys^{521/529} zur Disassemblierung der Oligomere führt.

Im Gegensatz zum Vollängen NPR1 konnte für die C-terminale Transaktivierungsdomäne $\Delta 513$ *in vivo* eine Transkriptionsaktivierung in Abwesenheit von Salicylsäure nachgewiesen werden (Rochon *et al.*, 2006), was auf eine autoinhibitorische Domäne innerhalb von NPR1 hindeutete. Für BTB/POZ-Domänen beispielsweise sind autoinhibitorische Funktionen bekannt (Bardwell&Treisman, 1994; Espinás *et al.*, 1999; Katsani *et al.*, 1999). Es konnte zwischen der BTB/POZ-Domäne und $\Delta 513$ eine Interaktion nachgewiesen werden, welche durch Salicylsäure unterbrochen wird. Die BTB/POZ-Domäne kann dabei die Transkriptionsaktivierung von $\Delta 513$ in Abwesenheit von Salicylsäure unterdrücken, ohne dabei selbst als autonomer Transkriptionsrepressor zu agieren. Die BTB/POZ-Domäne scheint die C-terminale Transaktivierungsdomäne so zu verdecken, dass deren Funktion unterdrückt wird. In Arabidopsis wird nach dem Modell von Wu und Mitarbeitern Salicylsäure direkt von dem Rezeptor NPR1 gebunden. Das führt zur Konformationsänderung und zur Disassemblierung der Oligomere. Die Interaktion der autoinhibitorischen BTB/POZ-Domäne und der C-terminalen Transaktivierungsdomäne ($\Delta 513$) wird dabei durch räumliche Trennung oder Konformationsänderung von Salicylsäure unterbunden (Abb. 4). Die Transaktivierungsdomäne wird freigelegt, was die Voraussetzung zur *PR1*-Genaktivierung ist.



modifiziert nach Wu *et al.*, 2012

Abb. 4 Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Wu *et al.* (2012). NPR1 ist der Rezeptor für Salicylsäure und bindet über ein Kupferion, welches mit den Cysteinen 521 und 529 interagiert, Salicylsäure. Die Reaktion darauf ist die Freilegung der C-terminalen Transaktivierungsdomäne von der autoinhibitorischen BTB/POZ-Domäne.

Neben Wu *et al.* (2012) konnten noch weitere Arbeitsgruppen nachweisen, dass es sich bei NPR1 um ein Salicylsäure-bindendes Protein handelt. Manohar und Mitarbeiter (2014) demonstrierten die Bindefähigkeit von Salicylsäure an NPR1 in drei unterschiedlichen Versuchen. Unter anderem konnten sie durch Größenausschlusschromatographie zeigen, dass NPR1 mit relativ hoher Affinität und einem K_d -Wert von 191 nM Salicylsäure bindet. Dieser K_d -Wert ist relativ nah an dem ermittelten K_d -Wert von Wu *et al.* (2012) mit 140 nM. Im Zuge der Etablierung eines Testsystems für potentielle Chemikalien zum Schutz von Kulturpflanzen konnte mittels eines *thermal shift assays* für die C-terminale Transaktivierungsdomäne $\Delta 513$ von NPR1 erneut gezeigt werden, dass diese in der Lage ist, Salicylsäure zu binden (Kuai *et al.*, 2017). Aufgrund dieser Sachlage sollte davon ausgegangen werden, dass NPR1 selbstständig Salicylsäure binden und wahrnehmen kann.

1.2.3 Modell der Salicylsäurewahrnehmung nach Maier *et al.* (2011)

In diesem Modell wird der Transkriptionskomplex aus TGA-Transkriptionsfaktoren und NPR1 über die Interaktion mit NIMIN-Proteinen reguliert. Wesentlicher Bestandteil des Modells ist die entscheidende Rolle des C-Terminus von NPR1 bei der Wahrnehmung von Salicylsäure. Ryals *et al.* (1997) charakterisierten eine *npr1*-Mutante in *Arabidopsis thaliana*, welche gegenüber dem Wildtyp in der Resistenz gegen *Peronospora parasitica* stark beeinträchtigt und ebenso die chemische Induktion von *PR1*-Genen stark reduziert war. Durch eine Punktmutation erfolgt bei der *nim1-4* Mutante an Position 432 ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin. Die Wichtigkeit des Arginins im konservierten LENRV-Motiv im C-Terminus wurde durch Maier *et al.* (2011) deutlich herausgestellt. In Hefe führte der Aminosäureaustausch in Arabidopsis NPR1 (R432K) sowie in Tabak NPR1 (R431K) jeweils zur Aufhebung des dissoziierenden Effekts der Salicylsäure auf die Bindung von NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen an den C-Terminus von NPR1. Weiterhin konnte dadurch für Tabak NPR1 als GAL4-BD-Fusion der Verlust der Transkriptionsaktivität in Hefe festgestellt werden. Durch diesen Aminosäureaustausch wurde aber weder die Akkumulation des Proteins beeinträchtigt noch wirkte sich diese Mutation negativ auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen an NPR1 aus.

Aufgrund dieser Studien kristallisierte sich die bedeutende Rolle der LENRV-Domäne und der NIMIN-Bindedomäne im C-terminalen Bereich des NPR1-Proteins für die Signaltransduktion des Pflanzenhormons Salicylsäure heraus. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Folge der Salicylsäure-Wahrnehmung eine strukturelle Umwandlung im C-Terminus von NPR1 erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass beide C-terminalen Domänen von Tabak NPR1, LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne, eine Salicylsäure-induzierbare Affinität zueinander besitzen und so einen funktionellen C-Terminus mit Transaktivierungsaktivität bilden können (D. Neeley & U.M. Pfitzner, persönliche Mitteilung). Möglicherweise übernimmt die Rekonfiguration des C-Terminus dieselbe Funktion wie in dem Modell nach Wu *et al.* (2012) die Trennung der autoinhibitorischen BTB/POZ-Domäne von der C-terminalen Transaktivierungsdomäne. In Hefe scheint Salicylsäure hauptsächlich den C-Terminus von NPR1 zu beeinflussen. Das zeigt nicht nur die unterdrückte Bindung von NIMIN1 und NIMIN2, sondern auch die C-terminale Konformationsänderung des Proteins in Tabak. Die Bindung von Interaktionspartnern im zentralen Bereich oder im N-Terminus von NPR1 werden hingegen nicht signifikant durch Salicylsäure beeinflusst (Maier *et al.*, 2011). Auch die Ergebnisse der Struktur-Funktions-Analyse von NPR1 durch Canet und Mitarbeiter (2010) liefert Fakten, welche die tragende Rolle des C-Terminus von NPR1 bei der Wahrnehmung von Salicylsäure unterstützen. Von mutagenbehandelten Arabidopsispflanzen wurden Individuen selektioniert, welche nach BTH-Behandlung nicht mehr die charakteristischen Wachstumsdefizite aufwiesen und deutlich größer waren. Innerhalb von *NPR1* dieser Pflanzen konnten verschiedene Mutationen identifiziert werden. Auffällig ist die Verteilung der Mutationen innerhalb von NPR1. Neben wenigen Mutationen in der BTB/POZ-

und Ankyrin-Domäne häufen sich die identifizierten Mutationen im C-terminalen Teil von NPR1. Einige dieser Mutationen wurden bis zu drei Mal gefunden. 68% der identifizierten Mutationen befinden sich im Bereich von Aminosäure 428 bis 515 (Abb. 5). Innerhalb dieses Bereichs befindet sich nicht nur das LENRV-Motiv (Aminosäure 429 bis 433), sondern auch die von Aminosäure 493 bis 512 kartierte NIMIN1/2-Bindedomäne (Maier *et al.*, 2011). Die NIMIN1/2-Bindedomäne wiederum befindet sich in der als Repressordomäne beschriebenen Region von Aminosäure 463 bis 513 (Rochon *et al.*, 2006). Es konnte also nicht nur eindeutig gezeigt werden, dass NPR1 in der Lage ist, Salicylsäure wahrzunehmen, sondern auch der verantwortliche Bereich der Wahrnehmung von Salicylsäure in NPR1 ermittelt werden.

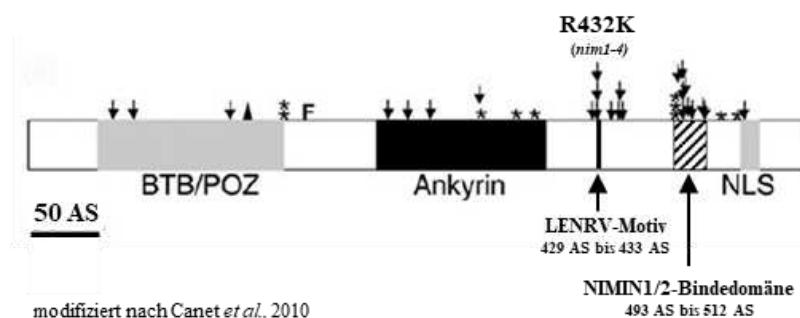


Abb. 5 Verteilung der identifizierten Mutationen in Arabidopsis NPR1 nach Mutagenbehandlung (Canet *et al.*, 2010). Punktmutationen sind durch Pfeile und Leserahmenverschiebungen durch ein F gekennzeichnet. Sterne kennzeichnen ein Stoppkodon und das Dreieck steht für eine interne Deletion.

Auf Grundlage dieser Fakten wurde ein Modell entwickelt, wie die Wahrnehmung von Salicylsäure und die Weiterleitung des Signals bis zur Induktion der Expression von *PRI*-Genen während der SAR erfolgen könnte. Das Modell ist prinzipiell auf beide Modellpflanzen Tabak und Arabidopsis anwendbar und basiert auf der negativ-regulatorischen Funktion der NIMIN-Proteine und der direkten Bindung von Salicylsäure an NPR1. Im Folgenden soll das Modell am Beispiel von Arabidopsis NPR1 erläutert werden (Hermann *et al.*, 2013). Die Expression von *NIMIN3* erfolgt konstitutiv in Arabidopsis. Durch die Bindung von NIMIN3 an den N-Terminus von NPR1 wird der Transkriptionskomplex aus NPR1 und TGA-Transkriptionsfaktoren inaktiviert. In Folge einer Pathogeninfektion steigt der endogene Salicylsäurespiegel der Pflanze an und es erfolgt die Induktion von *NIMIN2*. Durch die Bindung von NIMIN2 an den C-Terminus von NPR1 wird NIMIN3 verdrängt. Es konnte gezeigt werden, dass eine simultane Bindung der Proteine an NPR1 nicht erfolgen kann. Dadurch wird möglicherweise im Verlauf des Anstiegs des Salicylsäurespiegels die Aktivierung früher Salicylsäure- und NPR1-abhängiger Gene wie *NIMIN1* ermöglicht. NIMIN2 wird dann durch die Bindung von NIMIN1 an den C-Terminus von NPR1 verdrängt und ersetzt. Sobald ein gewisser Schwellenwert der Salicylsäurekonzentration überschritten wird, erfolgt die Dissoziation der NIMIN1-NPR1-Interaktion. Der Transkriptionskomplex ist nun aktiv und die Expression von *PRI* beginnt. Die Feinregulation der Induktion der *PRI*-Expression durch Salicylsäure erfolgt durch die negativ-regulatorische Interaktionskaskade der NIMIN-Proteine an NPR1. Die Dissoziation der NIMIN1-NPR1-Interaktion muss allerdings durch direkte Bindung von Salicylsäure erfolgen (Abb. 6).

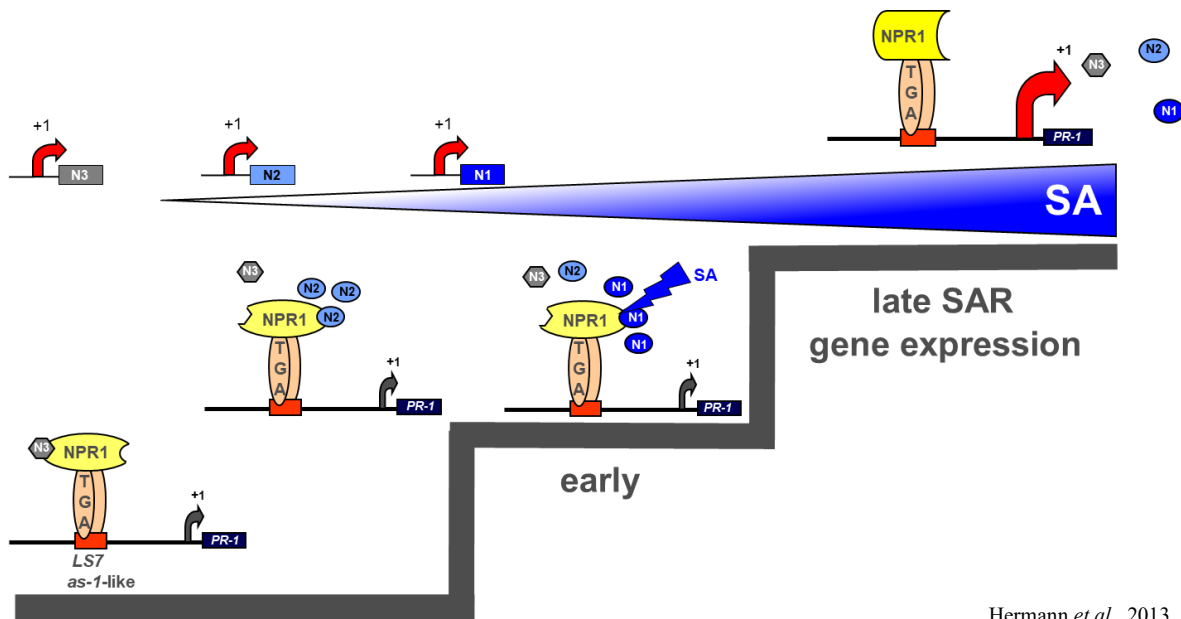
Hermann *et al.*, 2013

Abb. 6 Salicylsäurewahrnehmung und Kontrolle der *PR1*-Geninduktion durch die Bildung verschiedener NIMIN-NPR1-TGA-Komplexe auf dem *PR1*-Promotor im Verlauf der SAR. In diesem Modell wird angenommen, dass die Wahrnehmung des Salicylsäurespiegels in erkrankten Pflanzen durch die verschiedenen NIMIN-NPR1-Komplexe erfolgt und die Aktivierung der *PR*-Gene an einem bestimmten Schwellenwert der Salicylsäurekonzentration ermöglicht. In diesem Szenario wird das Abwehren *PR1* im späten Verlauf der SAR durch die direkte Wirkung von Salicylsäure auf den regulatorischen Komplex aus NIMIN1 und NPR1 induziert (Hermann *et al.*, 2013).

1.2.4 Kritischer Vergleich der Modelle und Zielsetzung der Arbeit

Die Modelle nach Fu *et al.* (2012) und Wu *et al.* (2012) werfen viele bislang noch nicht beantwortete Fragen auf. Der beschriebene Mechanismus der Salicylsäurewahrnehmung und die dadurch verbundene Induktion der *PR1*-Genexpression dieser Modelle ist spezifisch für Arabidopsis. Die Hauptmerkmale der Modelle sind nicht konserviert, sodass sich die Modelle nicht auf weitere Pflanzenspezies ohne Weiteres übertragen lassen.

Die Aktivität und der Abbau von NPR1 wird durch postrtranslationale Modifizierungen reguliert. Diese Modifizierungen wie Phosphorylierungen, Sumoylierungen und S-Nitrosylierungen sind hochkomplex und beeinflussen sich zum Teil in ihrer Funktion gegenseitig. NPR3 und NPR4 nehmen nach Fu *et al.* (2012) eine bedeutende Rolle in der Feinregulierung der Homöostase von NPR1 und der Wahrnehmung von Salicylsäure ein. Es wird erwähnt, dass NPR3 und NPR4 in der Lage sind, Homo- und Heterodimere zu bilden und dadurch einer Art Selbstregulation unterliegen. Dennoch stellt sich hier die Frage, ob diese wichtigen Akteure der Regulation der Abwehr ebenfalls zusätzlich einer Regulierung durch solche komplexe Modifizierungen unterliegen wie NPR1.

NPR1 ist laut Fu *et al.* (2012) nicht selbst in der Lage, Salicylsäure zu binden und als Rezeptor das Signal der Salicylsäure weiterzuleiten. Das Signalmolekül Salicylsäure wird durch die Paralogen NPR3 und NPR4 durch direkte Bindung wahrgenommen und zeigt sich in der Salicylsäure-abhängigen Regulation der Verfügbarkeit von NPR1. NPR3 und NPR4 binden mit unterschiedlichen Affinitäten

Salicylsäure, um die Aufrechterhaltung der Homöostase von NPR1 zu gewährleisten. Allerdings ist bislang nicht bekannt, wo und vor allem wie Salicylsäure an diese Proteine bindet und was diese Bindung bewirkt. NPR3 und NPR4 fungieren als Adapterproteine für Cullin3, welches den proteasomalen Abbau von NPR1 vermittelt. NPR3 und NPR4 sowie NPR1 verfügen über eine sehr ähnliche Domänenstruktur. Ebenso wie NPR3 und NPR4 besitzt auch NPR1 eine N-terminale BTB/POZ-Domäne, welche charakteristisch für Cullin3-Substratadapterproteine ist. Trotzdem kann Cullin3 nicht direkt an NPR1 binden und ist für die Bindung auf die Vermittlung von NPR3 und NPR4 angewiesen. Es ist nicht bekannt, wie NPR3 beziehungsweise NPR4 an NPR1 binden können und aus welchem Grund Cullin3 zwar an NPR3 beziehungsweise NPR4 direkt binden kann, aber trotz vorhandener BTB/POZ-Domäne nicht mit NPR1 direkt in Interaktion treten kann.

Das Modell nach Fu *et al.* (2012) kann aufgrund von Besonderheiten im Arabidopsiskontext nicht als allgemein gültiger Mechanismus angesehen werden. In Arabidopsis gibt es sechs Mitglieder der NPR-Proteinfamilie, welche sich in drei Gruppen unterteilen und vermutlich durch Genduplikation entstanden sind. NPR1/2 und NPR3/4 werden mit der Salicylsäure-abhängigen Genexpression in Verbindung gebracht, während BOP1/2 überwiegend in der Entwicklung der Pflanze involviert zu sein scheinen. Tabak beispielsweise verfügt lediglich über drei Mitglieder der NPR-Proteinfamilie. Neben NPR1 gibt es noch NIM1-like (NPR3) und NPR5 (BOP1). Es stellt sich hier also die Frage, welche Funktion Tabak NPR3 in diesem Kontext nach dem Modell von Fu *et al.* (2012) einnimmt und welches Protein die entsprechend andere Funktion ausübt, welche zur Aufrechterhaltung der Homöostase von NPR1 benötigt wird. Außerdem drängt sich die Frage auf, aus welchem Grund keine Mutanten in AtNPR3 und AtNPR4 in den zahlreichen Untersuchungen identifiziert wurden. Arabidopsis NPR3 und NPR4 sollen für die Wahrnehmung des endogenen Salicylsäurespiegels der Pflanze verantwortlich sein. Dennoch wurden ausschließlich Mutationen innerhalb von NPR1 bei Salicylsäure-insensitiven Pflanzen identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass das Signal der Salicylsäure über einen anderen Weg weitergeleitet wird als von Fu und Mitarbeitern angenommen und direkt mit der Induktion der *PR1*-Genexpression zusammenhängt und nicht indirekt durch NPR3 und NPR4 wahrgenommen wird.

Im Modell nach Wu *et al.* (2012) sowie in weiteren Studien konnte allerdings im Gegensatz zu Fu *et al.* (2012) mehrmals in unabhängigen Experimenten basierend auf unterschiedlichen Methoden gezeigt werden, dass Arabidopsis NPR1 direkt Salicylsäure binden kann. Diese Tatsache stellt das Modell nach Fu *et al.* (2012) in Frage. Es wird postuliert, dass NPR1 mit Hilfe eines Kupferions Salicylsäure binden kann. Dieses Kupferion bindet an Cys^{521/529} im C-Terminus von NPR1. Durch die Bindung von Salicylsäure wird eine Konformationsänderung von NPR1 bewirkt, welche in der Induktion der Expression von *PR1*-Genen resultiert. Die für die Bindung verantwortlichen Cysteine sind jedoch in den NPR1-Proteinen anderer Pflanzenspezies wie Tabak, Tomate oder *Brassica napus* nicht konserviert. Auch innerhalb von AtNPR3 und AtNPR4 sind diese Cysteine nicht konserviert, obwohl Fu *et al.* (2012)

auch hier nachweisen konnte, dass es sich um Salicylsäurerezeptoren handelt. So muss in diesem Fall ein anderer Mechanismus der Bindung von Salicylsäure zugrunde liegen.

Auffällig ist, dass bereits identifizierte Mutationen in NPR1 nicht die von Fu *et al.* (2012) und Wu *et al.* (2012) als essentiell betrachteten Aminosäuren für die Funktionalität von NPR1 betreffen. Allerdings sind beispielsweise die Mutationen, welche in der Studie von Canet und Mitarbeitern (2010) identifiziert wurden auch innerhalb der Paralogen von Arabidopsis NPR1 konserviert. Die Rolle der NIMIN-Proteine wurde in den Modellen nach Fu *et al.* (2012) und Wu *et al.* (2012) völlig außer Acht gelassen, obwohl es genügend Daten der Beteiligung von NIMIN-Proteinen an der Salicylsäure-abhängigen Induktion der *PR1*-Genexpression und der Etablierung der SAR gibt. NIMIN-Proteine kommen in allen höheren Pflanzen vor. Die NIMIN1/2-Bindedomäne im C-Terminus von AtNPR1 sowie das LENRV-Motiv sind in allen NPR-Proteinen mit Ausnahme der BOP-Proteine konserviert und kommen ebenfalls in allen höheren Pflanzen vor. NIMIN1/2-Proteine binden an NPR1 in der Nähe der Stelle, wo nachgewiesener Weise auch Salicylsäure agiert. Somit sind NIMIN-Proteine gut geeignete Kandidaten für Regulatoren der NPR1- und Salicylsäure-abhängigen Genexpression im Rahmen der SAR.

Der Mechanismus der Salicylsäurewahrnehmung und der Signaltransduktion basierend auf dem Modell nach Maier *et al.* (2011) wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht. Besonderes Augenmerk lag auf den NPR1-Homologen und Paralogen aus Arabidopsis und Tabak. Hier sollten die biochemischen Eigenschaften sowie die Fähigkeit der Salicylsäurewahrnehmung näher charakterisiert werden. Fortführend sollte die Funktion von Tabak *NPR1* und *NPR3 in planta* mit Hilfe von durch CRISPR/Cas9 generierten Mutanten genauer beschrieben und die möglichen Auswirkungen auf die *PR1*-Geninduktion untersucht werden.

2 Material

2.1 Enzyme und Chemikalien

Die verwendeten Standardchemikalien wurden von den Firmen Duchefa (Haarlem, NL), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die Restriktionsenzyme sowie DNA-modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach) und Thermo Fisher Scientific (St. Leon-Rot) hergestellt. Abweichende Bezugsquellen sind gesondert im Text aufgeführt.

2.2 Biologische Materialien

2.2.1 Pflanzen

Arabidopsis thaliana L. var. Columbia (Col-0)

Herkunft: Prof. Dr. X. Dong und Prof. Dr. Jane Glazebrook

-1533PR-1a_{Pro}:GUS Nicotiana benthamiana

Herkunft: transgene Linie erzeugt von Prof. Dr. Artur J. P. Pfitzner

Nicotiana tabacum L. var. Samsun NN

Herkunft: Tobacco Institute, North Carolina, USA

Prof. Dr. K.-W. Mundry, Universität Stuttgart

PR1a_{Pro}:GUS Nicotiana tabacum L. var. Samsun NN (Linie 138)

Herkunft: transgene Linie erzeugt von Dr. Ursula M. Pfitzner

2.2.2 Bakterienstamm

Escherichia coli DH5a (Hanahan, 1983)

Genotyp: F' ϕ 80d*lacZ* Δ *M15* Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, mk+) *phoA supE44* λ - *thi-1, recA1, gyrA96 relA1*

2.2.3 Hefestamm

Saccharomyces cerevisiae **HF7c** (Bartel *et al.*, 1993)

Genotyp: MATa, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4-542*, *gal80-538*, *LYS2::GAL1-HIS3*, *URA3::(GAL4 17-mers)3-CYC1-lacZ*

Der Hefestamm HF7c verfügt über die Reportergene *HIS3* und *lacZ*.

2.2.4 Virenstamm

Tabak-Mosaik-Virus (TMV) „common strain“

Herkunft: American Type Culture Collection, USA

2.2.5 DNA-Größenstandard

Für die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten nach Auftrennung über ein Agarosegel wurden je nach Bedarf zwei verschiedene Arten von DNA-Größenstandards eingesetzt:

GeneRuler™ 1 kbp DNA Ladder (Fermentas SM0313)

10000 Bp | 8000 Bp | **6000 Bp** | 5000 Bp | 4000 Bp | 3500 Bp | **3000 Bp** | 2500 Bp | 2000 Bp | 1500 Bp | **1000 Bp** | 750 Bp | 500 Bp | 250 Bp

GeneRuler 100 Bp DNA Ladder (Thermo Scientific SM0241)

1000 Bp | 900 Bp | 800 Bp | 700 Bp | 600 Bp | **500 Bp** | 400 Bp | 300 Bp | 200 Bp | 100 Bp

2.2.6 Protein-Molekulargewichtsstandard

Für die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteine, welche über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend einer Immunodetektion unterzogen wurden, wurde als Protein-Molekulargewichtsstandard der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Referenzproteine, welche mit einem roten Farbstoff gekoppelt sind, sind fett hervorgehoben:

250 kDa | 130 kDa | 100 kDa | **70 kDa** | 55 kDa | 35 kDa | **25 kDa** | 15 kDa | 10 kDa

2.3 Kits

2.3.1 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-DNA-Präparation für den Einsatz zur Sequenzierung wurde mit Hilfe des GeneJET™ Plasmid MiniPrep Kits der Firma Fermentas (#K0503) und des NucleoSpin®Plasmid Kits von Macherey-Nagel (REF 740588.250) durchgeführt.

2.3.2 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Elution von DNA aus Agarosegelen wurde das Silica Bead DNA Gel Extraction Kit der Firma Thermo Scientific (#K0513) verwendet.

2.3.3 RNA-Isolation aus Pflanzengewebe

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe wurde das innuPREP Plant RNA Kit der Firma analyticjena (845-KS-2060050) verwendet.

2.4 Vektoren

2.4.1 pBluescript II KS (+)/ T-Vektor

pBluescript II KS(+) der Firma Stratagene (La Jolla, USA) ist ein 2958 Bp großer Plasmidvektor. Der Vektor verfügt über eine Polylinkerregion, welche innerhalb der codierenden Region eines β -Galaktosidase-Gens (*lacZ*) lokalisiert ist. Die α -Komplementation der β -Galaktosidase beispielsweise in *E. coli* DH5 α ermöglicht eine Blau/Weiß-Selektion rekombinanter Klone. Ferner verfügt der Plasmidvektor über eine Ampicillinresistenz (Amp^R).

Der Vektor wurde für die Klonierung von PCR-Produkten von Dr. Bernhard Roth modifiziert. Der Plasmidvektor wurde über *EcoRV* aus der Polylinkerregion linearisiert und anschließend mit terminaler Desoxynucleotidyl-Transferase (TDT) in Anwesenheit von 2',3'-Dideoxythymidin-5'-O-triphosphat (ddTTP) behandelt. Dies diente dazu, Desoxythymidine an die 3'-OH-Enden des glatt geschnittenen DNA-Doppelstranges zu hängen. Viele *Thermus aquaticus* (*Taq*)-Polymerasen tendieren dazu, ein zusätzliches Adenosin an die 3'-OH-Enden amplifizierter DNA-Doppelstränge zu fügen. Die angefügten Adenosine können mit den überhängenden Thyminen des Vektors hybridisieren. Der modifizierte Vektor (T-Vektor) ist so bestens für die Klonierung von PCR-Produkten geeignet.

2.4.2 pGBT9

Der Vektor pGBT9 (Bartel *et al.*, 1993) findet Anwendung bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionsstudien im Hefe-Zwei-Hybridsystem. Der Vektor besitzt eine Größe von 5,4 kBp und kann sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren. Die enthaltene Ampicillinresistenz erlaubt die Selektion in Bakterien, wohingegen das *TRP1*-Gen die Selektion von Hefen auf Minimalmedium erlaubt. Die Polylinkerregion befindet sich am 3'-Ende des offenen Leserahmens der GAL4-Bindedomäne (BD). Der GAL4-Bindedomäne ist ein *ADHI*-Promotor vorgeschaltet. Zur erfolgreichen Expression des Fusionsprodukts aus GAL4-Bindedomäne und dem gewünschten Gen ist es notwendig, dass die Klonierung im korrekten Leserahmen erfolgt.

2.4.3 pGAD424

Der Vektor pGAD424 (Bartel *et al.*, 1993) findet Anwendung bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionsstudien im Hefe-Zwei- und Hefe-Drei-Hybridsystem. Der Vektor besitzt eine Größe von 6,6 kBp und kann sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren. Die enthaltene Ampicillinresistenz erlaubt die Selektion in Bakterien, wohingegen durch das *LEU2*-Gen die Selektion von Hefen auf Minimalmedium möglich ist. Die Polylinkerregion befindet sich am 3'-Ende des offenen Leserahmens der GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne (AD). Der GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne ist ein *ADHI*-Promotor vorgeschaltet. Zur erfolgreichen Expression des Fusionsprodukts aus GAL4-Transkriptionsaktivierungsdomäne und dem gewünschten Gen ist es notwendig, dass die Klonierung im korrekten Leserahmen erfolgt.

2.4.4 pBridge/pBD

Der Vektor pBridge (Tirode *et al.*, 1997) findet Anwendung bei der Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen im Hefe-Drei-Hybridsystem bei Anwesenheit eines dritten Interaktionspartners. Der Vektor besitzt eine Größe von 6,5 kBp und kann sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* autonom replizieren. Die enthaltene Ampicillinresistenz erlaubt die Selektion in Bakterien, wohingegen das *TRP1*-Gen die Selektion von Hefen auf Minimalmedium erlaubt. Die Polylinkerregion befindet sich am 3'-Ende des offenen Leserahmens der GAL4-Bindedomäne (BD). Der GAL4-Bindedomäne ist ein *ADHI*-Promotor vorgeschaltet. Zur erfolgreichen Expression des Fusionsprodukts aus GAL4-Bindedomäne und dem gewünschten Gen, ist es notwendig, dass die Klonierung im korrekten Leserahmen erfolgt. Durch eine zusätzliche Expressionskassette ist es mit dem pBridge-Vektor möglich ein zweites Gen zu exprimieren. Diese Expressionskassette wird durch den *MET25*-Promotor (*MET25_{pro}*) kontrolliert. In Gegenwart von Methionin wird der Promotor reprimiert und die Expression des Gens dieser Expressionskassette unterdrückt. In Abwesenheit von Methionin

hingegen wird der Promotor und die Expression des Gens induziert. Der pBD-Vektor ist eine leicht modifizierte Form von pBridge (Weigel, 2000). Mit diesem Vektor ist es möglich, das Gen unter der Kontrolle von *MET25_{Pro}* als Fusion mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) und einem humanen Influenza Hämagglutinin (HA)-Epitop zu exprimieren. Diese Modifikationen erlauben die Sicherstellung des Transports des Proteins in den Zellkern sowie die Detektion des Proteins mittels eines Antikörpers gegen HA-Epitop.

2.5 Synthetische Oligonukleotide

Alle verwendeten synthetischen Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen (Darmstadt) bezogen.

Primer für die Klonierung von *A. thaliana* NPR1 H80Y

npr1 forward: 5'-ACG GAT CCCCAT GGA CAC CAC CAT TGA TGG -3'

AtNPR1-M6: 5'-GCG TCG ACT AAT TCA GGG ATC TTG -3'

AtNPR1 H80Y fwd: 5'-GAA GTT TCT TTC TAC CGG TGC GTT TTG TCA GCG AGA AGC
TCT TTC TTC AAG AGC GCT T -3'

AtNPR1 H80Y rev: 5'-CTG ACA AAA CGC ACC GGT AGA AAG AAA CTT C -3'

Primer für die Klonierung von *A. thaliana* NPR2

AtNPR2-3: 5'-AAG GAT CCA GAT GCC TTC TCT GAA AGG CGG ATT ATG C-3'

AtNPR2-4: 5'-AAG GAT CCA GAT GCA TCA CAT TGG TGA AAA GCG G-3'

AtNPR2-5: 5'-AAG TCG ACT TAC TCG AGA TCA GGC TCG AGA CTA GAA GC-3'

AtNPR2-6: 5'-AAG TCG ACT TAC TCG AGA TCC CCG TTC CCG TAA GGT CG-3'

AtNPR2-7: 5'-TCG GTT TTC ATA ATA GAG CAA CCT CAT CCT C-3'

AtNPR2-8: 5'-GAG GAT GAG GTT GCT CTA TTA TGA AAA CCG AGT TGC ACT TGC TCG
ACT TCT CTT TCC AG-3'

AtNPR2-9: 5'-GCA TTT GAG TAG ACT AAG AGC ACT TTG TAA AAC CGT GGA ACT GGG
GAA ACG CTA CTT CAA ACG-3'

AtNPR2-10: 5'-GGT TTT ACA AAG TGC TCT TAG TCT ACT CAA ATG-3'

AtNPR2-11: 5'-GCG AGT TTA CAG CTT CTA GGGTCCC TCG AGC CTG ATC ATC ACA TTG
GTG AAA AGC GG-3'

AtNPR2-12: 5'-GAT CAG GCT CGA GAC TAG AAG CTG TAA ACT CGC-3'

Primer für die Klonierung von *A. thaliana* NPR4 (373/455) K418R R419K LERKV

AtNPR4-5: 5'-TTG GAT CCA TAT GGA ACC TGA TAA ATA CCG C -3'

AtNPR4-6: 5'-AAG TCG ACT TAC TCG AGT GAT GGA GGT GGA GTT AG -3'

AtNPR4-15 neu: 5'-GAG GTT GTT ATA CTT AGA AAG GAA AGT GGG ACT TGC TCA G -3'

AtNPR4-16: 5'-CTG AGC AAG TCC CAC TTT CCT TTC TAA GTA TAA CAA CCT C -3'

Primer für die Klonierung von *A. thaliana* TGA3

AtTGA3-1: 5'-CCG GAT CCA TAT GGA GAT GAT GAG CTC TTC-3'

AtTGA3-2: 5'-AAG GAT CCA GTG TGT TCT CGT GGA CGA GC-3'

Primer für die Klonierung von *A. thaliana* TGA7

AtTGA7-1: 5'-AAG GAT CCA TAT GAT GAG TTC TTC TTC TTC TCC AAC-3'

AtTGA7-2: 5'-AAG GAT CCA GTT GGT TCT TGT GGA CGA GC-3'

Primer für die Klonierung von *N. tabacum* NPR1 H81Y

NgNPR1-1: 5'-CCG GAT CCA TAT GGA TAA TAG TAG GAC TGC G -3'

NgNPR1-32: 5'-TTG GAT CCC AAA ACC TCA ACC AGG AAT GCC -3'

NgNPR1 H81Y fwd: 5'-GAA ATT CCG GTG TAC CGG TGC ATT TTG TCG GCG AGG AGT
CCG TTC TTT AAG AAT TTG -3'

NgNPR1 H81Y rev: 5'-CGA CAA AAT GCA CCG GTA CAC CGG AAT TTC -3'

Primer für die Klonierung von *N. tabacum* NPR3 INS c.433_443insATC TTG TCA GAT TCC

NtNIML-14: 5'-AAG GAT CCA TAT GGC TTG TTC TGC TGA ACC -3'

NtNIML-15: 5'-GCA AGG GAT CCA CAG GTA G -3'

NtNIML-16: 5'-ATC TTG TCA GAT TCC GTA TGG ACA CTA TAT GTG -3'

NtNIML-17: 5'-GGA ATC TGA CAA GAT CCT CCG GAG GGA AAT G -3'

Primer für die Klonierung von *N. tabacum* TGA2.2

NtTGA2.2-1: 5'-AAG GAT CCA TAT GGC TGA TAT CAG TCC TAG TAC ATC AAC A-3'

NtTGA2.2-2: 5'-AAG GAT CCT TAT TCC CGG GGG CGA GCA AGC CAG AGA GAG CT-3'

Primer für die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* von *N. tabacum*

5NsNPR1-550: 5'-ATG GAT AAT AGT AGG ACT GCG-3'

3NsNPR1-550: 5'-GAA ACT TGT CGA CCA ATT CAG-3'

Primer für die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* von *N. tabacum*

NtNIML-14: 5'-AAG GAT CCA TAT GGC TTG TTCTGC TGA ACC-3'

3NtNIM1like-554: 5'-GAA AAA GTG ATA CTA GCT CTG-3'

Primer für die Transkriptanalyse der Linien 111H in *N. tabacum*

NtNPR1-17: 5'-GTC GGC GAG GAG TCC GTT CTT-3'

NtNPR1-3: 5'- TTC CAA GTA GGT GTC TCT GAA AC-3'

2.6 Antiseren

2.6.1 Detektion von Tabak NPR1

Die Detektion von Tabak NPR1 erfolgte über das polyklonale Antiserum α -GST-cT-NtNPR1, welches in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde. Das Serum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit in *E. coli* exprimierten und über Glutathionsepharose aufgereinigtes GST-NtNPR1(386/588) gewonnen.

2.6.2 Detektion von Arabidopsis NPR1

Die Detektion von Arabidopsis NPR1 erfolgte über das polyklonale Antiserum α -6xHis-AtNPR1, welches in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt wurde. Das Serum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit in *E. coli* exprimierten und über Ni-NTA aufgereinigtem 6xHis-AtNPR1 gewonnen.

2.6.3 Detektion von Tabak PR1

Die Detektion von Tabak PR1 erfolgte über das polyklonale Antiserum α -PR1a, welches in einer Verdünnung von 1:200 beziehungsweise 1:500 eingesetzt wurde. Das Serum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit gereinigtem PR1a-Protein aus Tabak gewonnen.

2.6.4 Anti-Kaninchen-Serum

Protein-gebundene Antikörper wurden durch den sekundären Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Antikörper (Rockland, USA) nachgewiesen. Dieser Antikörper ist an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt und wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Standardmethoden und Nukleinsäuretechniken

Die molekularbiologischen Standardmethoden wurden nach Sambrook und Mitarbeitern (1989) durchgeführt. Die Enzymreaktionen und Kits wurden nach Angaben der Hersteller verwendet. Abweichungen wurden im Text vermerkt. Die pH-Werte verwendeter Lösungen wurden mit Salzsäure, Essigsäure, Natriumhydroxid oder Kaliumhydroxid eingestellt.

3.1.1 Anzucht von *E. coli*

LB-Medium [1 l]		Antibiotikakonzentrationen	
10 g	Pepton	50 µg/ml	Ampicilin
5 g	Hefeextrakt		
10 g	NaCl	Blau-Weiß-Selektionszusätze	
ad 1 l dH ₂ O		10 µg/ml	Isopropylthiogalactosid (IPTG)
pH 7,5 (NaOH)		40 µg/ml	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) in Dimethylformamid

Für LB-Agarplatten wurden 15 g/l Agar vor dem Autoklavieren dem LB-Medium hinzugefügt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium mit den entsprechenden Antibiotika bei 37°C und 250 UpM über Nacht. Die Anzucht auf LB-Festmedium mit den entsprechenden Antibiotika beziehungsweise zusätzlich X-Gal und IPTG erfolgte im Inkubator bei 37°C über Nacht.

3.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-DH5α-Zellen

Tfb I		Tfb II	
30 mM	KOAc	10 mM	Na-MOPS pH7
50 mM	MnCl ₂	75 mM	CaCl ₂
100 mM	KCl	10 mM	KCl
10 mM	CaCl ₂	15 %	Glycerin
15 %	Glycerin	autoklavieren	
sterilfiltrieren			

Aus einer Gefrierkultur wurden *E. coli*-DH5α-Zellen frisch über Nacht auf einer LB-Agarplatte bei 37°C kultiviert. Eine Einzelkolonie wurde anschließend in 5 ml LB-Medium mit 10 mM MgSO₄ für zwei Stunden bei 37°C und 250 UpM angezogen und zum Animpfen von 100 ml LB-Medium versetzt mit 10 mM MgSO₄ verwendet. Diese wurde für weitere zwei bis drei Stunden bei 37°C und 250 UpM

inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen für zehn Minuten bei 6000 rpm und 4°C geerntet. Die nachfolgend beschriebenen Schritte zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-DH5α-Zellen wurden ausnahmslos unter sterilen Bedingungen mit vorgekühlten Lösungen und Materialien durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in zweimal 40 ml TfbI resuspendiert. Die Suspension wurde für fünf Minuten auf Eis inkubiert und anschließend wurde der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde wieder verworfen und die Zellen in insgesamt 8 ml TfbII resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden zu je 200 µl aliquotiert, in flüssigem N₂ schockgefroren und bei – 70°C bis zur Verwendung gelagert.

3.1.3 Transformation von *E. coli*

10 µl Ligationsansatz wurden 100 µl auf Eis aufgetauter kompetenter DH5α-Zellen hinzugefügt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz einem Hitzeschock bei 42°C im Wasserbad für 30 Sekunden unterzogen und anschließend für weitere zwei Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 900 µl warmen LB-Flüssigmediums wurden die Zellen für eine Stunde bei 37°C und 250 UpM inkubiert. 50 µl des Transformationsansatzes wurden nach der Inkubation auf eine Selektiv-LB-Agarplatte ausplattiert. Die restliche Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgekippt und die Zellen im verbleibenden Restüberstand resuspendiert und auf eine weitere Selektiv-LB-Agarplatte ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Inkubator bei 37°C kultiviert.

3.1.3.1 Blau/Weiß-Selektion von *E. coli* DH5α

Die Blau/Weiß-Selektion findet Anwendung bei der Verwendung von pBluescript oder darauf basierenden Vektoren wie der T-Vektor bei der Transformation von kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen. Der Polylinker dieser Vektoren befindet sich im Bereich des enthaltenen *lacZ*-Gens, welches für das N-terminale α-Fragment einer IPTG-induzierbaren β-Galaktosidase kodiert. Dieses Fragment komplementiert ein durch das Genom von *E. coli* DH5α kodiertes C-terminales α-Fragment der β-Galaktosidase. Die komplementierte β-Galaktosidase ist dann in der Lage, den Indikator 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal), welcher in den hierfür verwendeten LB-Agarplatten enthalten ist, in einem blauen Farbstoff umzusetzen. Die entsprechende Kolonie ist blau gefärbt und die Klonierung ist negativ. Durch die erfolgreiche Integration des gewünschten DNA-Fragments in den Polylinker des Vektors, wird das α-Peptid des *lacZ*-Gens unterbrochen und nicht mehr vollständig exprimiert. Die β-Galaktosidase kann nicht komplementiert werden und ist nicht funktionsfähig. Der Indikator wird nicht umgesetzt, die Kolonie bleibt weiß und die Klonierung ist positiv.

3.1.4 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Lösung I	Lösung II	Lösung III
50 mM Glukose	0,2 M NaOH	3 M Natriumacetat, pH 4,8
25 mM Tris/HCl pH 8,0	1 % SDS	mit Essigsäure eingestellt
10 mM EDTA pH 8,0		
autoklavieren		1x TE
100 µg/ml RNase A		10 mM Tris/HCl pH 8,0
		1 mM EDTA pH 8,0

Von einer 5 ml Übernachtskultur des zu untersuchenden Bakterienklons wurden 1,5 ml in ein Reaktionsgefäß überführt und für drei Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zelniederschlag in 100 µl Lösung I resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II hinzugefügt und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wurde wieder durch Invertieren gemischt. Die dabei ausgefallenen Proteine und die genomische DNA wurden bei einem 10-minütigen Zentrifugationsschritt pelletiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß mit 1 ml kaltem Ethanol (96 %, *p.a.*) überführt und durch Invertieren gemischt. Die Fällung der DNA erfolgte für mindestens 30 Minuten bei – 20°C. Im Anschluss erfolgte ein weiterer 10-minütiger Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde verworfen und der DNA-Niederschlag in 100 µl 1x TE resuspendiert. 50 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 200 µl kalter Ethanol (96 %, *p.a.*) wurden hinzugefügt und durch Invertieren gemischt. Die Fällung der DNA erfolgte für 30 Minuten bei – 20°C. Danach erfolgte ein dreiminütiger Zentrifugationsschritt, der Überstand wurde verworfen und der DNA-Niederschlag mit kaltem Ethanol (70 %, *p.a.*) gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für drei Minuten wurde der Überstand verworfen. Die DNA wurde für 10 Minuten vakuumgetrocknet und dann in 50 µl 1x TE aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren wurde diese 1:10 mit dH₂O auf ein Volumen von 50 µl verdünnt. Die Messung erfolgte in einer Eppendorf Uvette® über ein Photometer (Ultrospec 2100 pro Spectrophotometer; Amersham Biosciences). Als Referenzwert wurden 50 µl dH₂O verwendet. Mit folgender Formel wurde die Konzentration der Nukleinsäuren anschließend bestimmt:

$$\text{Konzentration} = [(\text{Absorption } \lambda 260 \text{ nm}) - (\text{Absorption } \lambda 320 \text{ nm})] \times F \times V^{-1}$$

$$F [\mu\text{g/ml}] = 50 \text{ für DNA; } 40 \text{ für RNA} \quad \lambda 320 \text{ nm} = \text{Hintergrundwellenlänge} \quad V = \text{Verdünnung } 1:10$$

3.1.6 Sequenzspezifische Restriktion von DNA

Plasmid-DNA oder PCR-Produkte wurden mittels Restriktionsendonukleasen nach Angaben der jeweiligen Hersteller unter Verwendung der empfohlenen Puffer verdaut. 0,2 bis 2 µg DNA wurden in einem Endvolumen von 20 µl mit jeweils 5-10 Enzymeinheiten bei der erforderlichen Temperatur für mindestens zwei Stunden inkubiert. Wurde die restringierte DNA im nächsten Schritt nicht in einer Gelelektrophorese eingesetzt, war eine Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen erforderlich. Die Inaktivierung erfolgte dabei nach Angaben des Herstellers.

3.1.7 Auftrennung von DNA-Fragmenten (Gelelektrophorese)

<u>50x TAE-Puffer</u>		<u>5x Ladepuffer</u>	
242 g	Tris	50 %	Glycerin
100 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	1 mM	EDTA
57,1 ml	Essigsäure (100 %)	0,25 %	Bromphenolblau
ad 1 l dH ₂ O		0,25 %	Xylencyanol

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte über eine Gelelektrophorese. Dafür wurde ein 1 bis 2%-iges Agarosegel verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde eingewogen, mit 1x TAE-Puffer versetzt und aufgeköcht. Sobald die Agarosegellösung auf ungefähr 55°C abgekühlt war, wurden 10 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt. Anschließend wurde die Agarosegellösung in einen Gelschlitten gegossen und der Probenkamm eingefügt. Nach dem Festwerden des Agarosegels wurde der Gelträger in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 1x TAE-Puffer gefüllt, sodass das Gel vollständig bedeckt war. Der Probenkamm wurde vorsichtig entfernt, ohne die Probentaschen zu beschädigen. Die Proben für die Elektrophorese wurden 1:5 mit dem 5x Ladepuffer versetzt und in die entsprechenden Probekammern pipettiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 80 bis 120 Volt. Zur Abschätzung der jeweiligen Fragmentgrößen wurde zusätzlich ein passender DNA-Größenstandard mit aufgetragen. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte im Anschluss an die Elektrophorese unter UV-Licht.

3.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten spezifischer Größe zu Klonierungszwecken wurden abgeschlossene Restriktions- oder PCR-Ansätze einer Gelelektrophorese unterzogen. Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Angaben des Herstellers des Kits Silica Bead DNA Gel Extraction der Firma Thermo Scientific (#K0513).

3.1.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Zur Vermeidung einer Religation von Plasmid-DNA, welche mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert wurde, wurden die terminalen 5'-Phosphatgruppen mittels der *calf intestine alkaline phosphatase* (CIAP) hydrolysiert. Die linearisierte Plasmid-DNA wurde dafür vor der Gelelektrophorese mit CIAP nach Herstellerangaben versetzt und 15 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4-Ligase. Dieses Enzym katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen dem 5'-Phosphat- und dem 3'-Hydroxylende in doppelsträngigen DNA-Molekülen. Für eine Ligation wurde ein fünffacher Überschuss an Insert gegenüber dem Vektor eingesetzt.

Ligationsansatz [20 µl]

x µl	Insert
y µl	Vektor
2 µl	10x T4-Ligasepuffer
1 µl	T4-Ligase
z µl	dH ₂ O

Der Ligationsansatz wurde anschließend entweder über Nacht bei 4 °C inkubiert oder mindestens für eine Stunde bei RT. Nach der Inkubation konnte der Ansatz direkt bei einer Transformation mit kompetenten *E. coli* DH5α-Zellen verwendet werden.

3.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Ansatz [20 µl]

2 µl	10x Puffer
2 µl	MgCl ₂ (25 mM)
1 µl	dNTPs (2 mM)
1 µl	Primer 5' (10 mM)
1 µl	Primer 3' (10 mM)
0,2 µl	Taq-Polymerase
11,8 µl	dH ₂ O
1 µl	DNA

PCR-Standardprogramm

1 Min.	94 °C	Denaturierung	10 Zyklen
30 Sek.	94 °C	Denaturierung	
30 Sek.	60 °C	Annealing	
90 Sek.	72 °C	Elongation	
30 Sek.	94 °C	Denaturierung	20 Zyklen
30 Sek.	60°C	Annealing	
90 Sek	72 °C	Elongation	
+ 10 Sek./Zyklus			
7 Min.	72 °C	finale Elongation	
∞	8 °C	Ende	

Die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgte über die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz mit dH₂O statt DNA verwendet. Falls vorhanden, wurde stets eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Reaktion fand im Thermocycler der Firma Eppendorf statt und wurde mit dem Standardprogramm durchgeführt. Die Amplifikate wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und bei Bedarf aus dem Gel eluiert.

3.1.11.1 *Colony Screen* via PCR

Der *Colony Screen* wurde dafür verwendet, Bakterien auf eine erfolgreiche Transformation zu testen und das gewünschte eingebrachte Transgen per PCR nachzuweisen. Diese Methode wurde verwendet, wenn sehr viele Bakterienkolonien geprüft werden mussten. Dafür wurde in einem 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß 10 µl dH₂O vorgelegt. Mit einer sterilen Pipettenspitze wurden Einzelkolonien der zu untersuchenden Transformation gepickt. Durch leichtes Abstreichen der Pipettenspitze auf einer neuen Selektivagarplatte wurden Tochterklonien der gepickten Kolonien überimpft und zur späteren Rückverfolgung nummeriert. Die verbleibenden Bakterienzellen an der Pipettenspitze wurden im jeweiligen Reaktionsgefäß mit dem vorgelegten H₂O resuspendiert. Die Selektivagarplatte mit den Tochterklonien wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die resuspendierten Bakterienzellen im Reaktionsgefäß wurden zunächst im Thermocycler aufgeschlossen. Dafür wurde folgendes Programm verwendet:

Aufschluss von Bakterienzellen

5 Minuten	96 °C
90 Sekunden	50 °C
90 Sekunden	96 °C
1 Minute	45 °C
1 Minute	96 °C
1 Minute	40 °C
∞	8 °C

Die aufgeschlossenen Bakterienzellen wurden anschließend als Matrize in einem Standard-PCR-Ansatz eingesetzt. Die verwendete Primerkombination wurde passend zum jeweils eingebrachten Transgen gewählt. Die PCR-Produkte wurden via Gelelektrophorese anschließend aufgetrennt und analysiert. Beim Vorhandensein der gewünschten Banden konnten die jeweiligen positiven Bakterienkolonien von der nummerierten Selektivagarplatte in selektivem Flüssigmedium frisch angezogen werden.

3.1.11.2 *In vitro* Mutagenese via PCR

Bei der *in vitro* Mutagenese mittels PCR wird eine Mutation gezielt über einen nicht vollständig passenden Primer in beliebige DNA-Sequenzen eingebracht, welche später zu Klonierungszwecken verwendet werden können (Ho *et al.*, 1989). Hier wurde die *in vitro* Mutagenese mittels PCR dazu verwendet, Punktmutationen in bestimmte Gensequenzen einzubringen, um die Rolle verschiedener Aminosäuren und Domänen von Proteinen zu charakterisieren. Des Weiteren wurde über diese Methode eine Insertion mehrerer Nukleotide in eine Gensequenz eingebracht. Die Mutationen wurden unter Verwendung der *overlap-extension* PCR-Methode in die entsprechenden Sequenzen eingebracht. Für diese Methode wurden jeweils vier Primer benötigt. Von den vier Primern flankieren zwei die Sequenz, während die gewünschte Mutation in die beiden weiteren Primer integriert ist. Für die gezielte Mutagenese wurden insgesamt drei Standard-PCRs durchgeführt. In der ersten und zweiten PCR wurde die Mutation in die Teilfragmente der Sequenz eingebracht und befand sich im überlappenden Teil der Fragmente. In der dritten PCR wurden die Teilfragmente über die flankierenden Primer miteinander verbunden.

3.1.12 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde über die Kits GeneJET™ Plasmid MiniPrep der Firma Fermentas (#K0503) und NucleoSpin®Plasmid von Macherey-Nagel (REF 740588.250) aufgereinigte Plasmid-DNA verwendet. Es wurden davon 1,5 µg DNA für die Sequenzierung an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) gesendet.

3.1.13 Herstellung von Stammkulturen (Glycerinkulturen)

Zur Lagerung von Bakterienkulturen über einen längeren Zeitraum wurden Glycerin-Stammkulturen angelegt. Dafür wurden 200 µl einer frisch angezogenen Bakterienübernachtskultur mit 800 µl sterilem Glycerin in einem sterilen Reaktionsgefäß mit Schraubverschluss gemischt und bei -70°C gelagert.

3.1.14 Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

DNA-Extraktionspuffer		Lysepuffer	
0,35 M	Sorbitol	0,2 M	Tris
0,1 M	Tris	50 mM	EDTA
5 mM	EDTA	2 M	NaCl
pH 7,5		2 %	Hexadecyltrimethylammoniumbromid

Sarkosyl-Lösung		Mikropräp-Puffer (frisch angesetzt, RT)	
5 %	Natrium-N-Laurosylosarcosine	2,5 Volumenteile	DNA-Extraktionspuffer
		2,5 Volumenteile	Lysepuffer
		1 Volumenteil	Sarkosyl-Lösung
		0,3–0,5 g pro 100 ml Puffer NaHSO ₃ bzw. Na ₂ S ₂ O ₅	

Die Extraktion genomischer DNA aus Pflanzen erfolgte nach Fulton *et al.* (1995). Für die Extraktion wurde 100 mg frisches Pflanzenmaterial mit 200 µl frisch angesetztem Mikropräp-Puffer in einem 1,5ml Reaktionsgefäß versetzt und mit einem Plastikpistill zerrieben. Anschließend wurden nochmals 550µl Mikropräp-Puffer hinzugefügt und vorsichtig mit dem bereits homogenisierten Pflanzenmaterial vermischt. Die Suspension wurde dann ungefähr 60 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden 800 µl Chloroform/Iso-Amylalkohol (1:24) der Suspension hinzugefügt und vorsichtig durch Invertieren des geschlossenen Reaktionsgefäßes gemischt und bei 10000 UpM für fünf Minuten zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde danach in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5 ml eiskaltem Isopropanol gemischt. Sobald die DNA ausfiel, wurde für maximal fünf Minuten abermals bei 10000 UpM zentrifugiert. Das Isopropanol wurde verworfen und der DNA-Niederschlag mit 70 % Ethanol gewaschen. Dafür wurde nochmals fünf Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert und das Ethanol anschließend verworfen. Der DNA-Niederschlag wurde eine Stunde lang luftgetrocknet, bevor dieser bei 65°C für 15 Minuten im Wasserbad in 50 µl 1x TE gelöst wurde. Anschließend erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt für zehn Minuten bei 10000 UpM. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und enthielt die genomische DNA. Für eine molekulare Analyse per PCR wurde 1 µl unverdünnte genomische DNA verwendet.

3.1.15 RNA-Isolation aus Pflanzenmaterial

Die Isolation von RNA aus Pflanzenmaterial erfolgte nach Angaben der Hersteller mit dem Kit innuPREP Plant RNA der Firma analyticjena (845-KS-2060050). Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA erfolgte über eine 1:50 Verdünnung am Photometer. Als Referenz wurden 50µl DEPC versetztes H₂O verwendet.

3.1.15.1 RNA-Minigel

10x Minigel-Puffer		5x Ladepuffer	
0,4 M	Tris	50 %	Glycerin
50 mM	Natriumacetat	5 x	RNA-Minigel-Puffer
10 mM	EDTA		Bromphenolblau
ad DEPC-dH ₂ O			
pH 7,8 mit Essigsäure			

RNA-Minigele wurden für die Qualitätsbestimmung der isolierten RNA zusätzlich zu der Konzentrationsbestimmung verwendet. Dabei wurde für ein Volumen von 50 ml für ein 1.5% Agarosegel die benötigte Menge Agarose in 1x Minigel-Puffer eingewogen und mit 50 µl DEPC versetzt. Das Gemisch wurde für 15 Minuten unter dem Abzug bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde das Gemisch in der Mikrowelle zum Kochen gebracht. Nach dem Abkühlen wurde EtBr (10µg/ml) hinzugefügt und in einen speziellen Gelschlitten für RNA-Gele gegossen. Das 1.5% RNA-Minigel wurde zeitnah verwendet und ist nicht für längere Aufbewahrung vorgesehen. Die Gelkammer wurde mit 1x Minigel-Puffer gefüllt, sodass das Minigel vollständig bedeckt war. Für die Gelelektrophorese wurden jeweils 1,5 µg RNA mit der entsprechenden Menge 5x Ladpuffer versetzt verwendet. Die Auftrennung der RNA erfolgte bei 90 V.

3.1.15.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkriptionsreaktion wurden 50 ng/µl RNA eingesetzt. Eine DNase-Behandlung war in diesem Fall nicht notwendig, da laut Herstellerangaben des zur Isolation der RNA aus Pflanzenmaterial verwendeten Kits die RNA bereits frei von DNA vorliegt. Pro Probe wurde je ein Ansatz mit und ohne reverse Transkriptase zur Kontrolle verwendet, um zu zeigen, dass mögliche Amplifikate in der anschließenden PCR tatsächlich ihren Ursprung in der synthetisierten cDNA haben. Die reverse Transkription wurde unter Verwendung des Thermocyclers durchgeführt.

RT-PCR-Reaktionsansatz [20 µl] mit RT-PCR-Programm

50 ng/µl	RNA
1 µl	Primer 3'
x µl	DEPC-H ₂ O

5 Minuten, 70 °C; anschließend auf Eis

2 µl	10x Puffer für reverse Transkriptase
2 µl	2 mM dNTPs
0,5 µl	RNase Inhibitor Murine (40 U/µl)

5 Minuten, 25 °C

1 µl	M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)
------	---

10 Minuten, 25 °C

60 Minuten, 42 °C

10 Minuten, 70 °C, anschließend auf Eis

Zum Nachweis des Transkripts wurden 3 µl cDNA in eine Standard-PCR mit den entsprechenden Primern eingesetzt. Die Lagerung der restlichen cDNA erfolgte bei – 20°C.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinextraktion aus Hefezellen

Eine Einzelkolonie aus einer vorangegangenen Transformation wurde in einer 5 ml Flüssigkultur in Minimalmedium angezogen. Das gesamte Volumen dieser Übernachtskultur wurde für fünf Minuten bei 4°C und 3000xg pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und der Zellschlag in 1 ml kaltem H₂O gewaschen. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 3000xg für fünf Minuten. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellen in flüssigem N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 70°C. Vor der Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Zellen in 100 µl 1x SDS-Ladepuffer (mit DTT) resuspendiert und für fünf Minuten bei 100°C im Heizblock gekocht. Im Anschluss wurde die Probe für fünf Minuten bei maximaler Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugiert. 20 µl des Überstandes konnte dann auf das SDS-Gel aufgetragen werden. Der Rest wurde bei – 20°C gelagert.

3.2.2 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial

<u>1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0</u>		<u>GUS-Lysepuffer</u>	
57,5 ml	1 M Di-Natriumhydrogenphosphat	50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7
42,3 ml	1 M Natrium-di-hydrogenphosphat	10 mM	EDTA
		0,1 %	Triton-X 100
		0,1 %	Laurylsarkosin
		10 mM	β-Mercaptoethanol

Für die Proteinextraktion aus Tabakpflanzen wurden zwei Blattscheiben mit einem Korkbohrer (Ø14mm) ausgestanzt, mit 150 µl GUS-Lysepuffer versetzt und mit einem Plastikpistill in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß homogenisiert. Bei einer Proteinextraktion aus Arabidopsis wurde von den Pflanzen zuerst Blattmaterial geerntet, in einem Mörser zusammen mit flüssigem N₂ zu Pulver verarbeitet und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden 500 µl GUS-Lysepuffer hinzugefügt, das Pulver darin bei RT auftauen gelassen und dann für 20 Minuten bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Suspension wurde anschließend bei 4°C und 15000xg für zehn Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte für einen GUS-Enzymtest oder eine Immunodetektion verwendet werden. Die Lagerung erfolgte bei – 70°C.

3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Extrakten erfolgte über die Methode nach Bradford (1976). Dafür wurden 2 µl des entsprechenden Proteinextrakts in einem Reaktionsgefäß mit 798 µl H₂O und 200 µl Roti-Quant Lösung (Roth) gemischt. Für die Referenzprobe wurde statt des Proteinextraktes H₂O verwendet. Die Ansätze wurden für fünf Minuten bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Der Proteingehalt konnte anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \frac{\text{OD}_{595} \times 15,7}{2}$$

3.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Lösung I [100 ml]		Lösung II 10% [100 ml]		Lösung II 15% [100 ml]			
18,3 g	Tris	20 g	Acrylamid	30 g	Acrylamid		
115 µl	TEMED	0,5 g	Bisacryamid	0,75 g	Bisacryamid		
pH 8,9 (HCl)		0,2 g	SDS	0,2 g	SDS		
ad dH ₂ O		ad dH ₂ O		ad dH ₂ O			
Lösung III [100 ml]		Lösung IV [100 ml]		Lösung V [100 ml]			
0,6 g	Ammoniumpersulfat	6,1 g	Tris	12 g	Acrylamid		
ad dH ₂ O		230 µl	TEMED	0,3 g	Bisacrylamid		
		pH 6,8 (HCl)		0,4 g	SDS		
		ad dH ₂ O		ad dH ₂ O			
Trenngel		Sammelgel		10x Elektrodenpuffer		5x Probenpuffer	
1 Teil	Lsg I	1 Teil	Lsg IV	30 g	Tris	0,313 M	Tris/HCl pH 8
2 Teile	Lsg II	1 Teil	Lsg V	144 g	Glycin	10 %	SDS
1 Teil	Lsg III	1 Teil	dH ₂ O	10 g	SDS	50 %	Glycerin
		1 Teil	Lsg III	ad 1 l dH ₂ O		0,05 %	Bromphenolblau

Die Auftrennung von Proteinen wurde mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Über eine Immunodetektion erfolgte der spezifische Nachweis der aufgetrennten Proteine. Anhand eines zusätzlich aufgetragenen Größenstandards konnte das relative Molekulargewicht der Proteine ermittelt werden. Ein Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel. Das Trenngel macht etwa zwei Drittel des gesamten Gels aus. Das Trenngel wurde zuerst in eine Apparatur aus Glasplatte und Aluminiumoxidplatte getrennt durch zwei Abstandshalter gegossen und mit H₂O überschichtet, um eine gerade Abschlusskante des Gels zu erhalten. Sobald das Trenngel vollständig auspolymerisiert war, wurde das H₂O mit einem Filterpapier entfernt. Der

Probenkamm wurde in die Gießapparatur eingefügt und das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen. Nach Auspolymerisierung des gesamten Gels wurde dies in die Proteingelektrophoreseapparatur (Mighty Small II SE250/SE260, Höfer Scientific Instruments, San Francisco) eingespannt. Die Apparatur wurde mit 1x Elektrodenpuffer gefüllt und das Gel vollständig überdeckt. Für die Aufbereitung von Proteinproben aus Pflanzenmaterial wurden 20 µl Extrakt 4µl 5x Probenpuffer und 1 µl 2 mM DTT hinzugefügt, gemischt und fünf Minuten bei 100°C im Heizblock denaturiert, kurz abzentrifugiert und anschließend in die Probentaschen des Gels aufgetragen. Die Vorgehensweise für Hefeextrakte ist in 3.2.1 beschrieben. Der zusätzlich aufgetragene Größenstandard diente der Ermittlung des relativen Molekulargewichts der aufgetrennten Proteine. Die Elektrophorese fand bei 120 V statt. Nach Beenden der Elektrophorese wurde das Gel für einen Western-Transfer mit anschließender Immunodetektion verwendet.

3.2.5 Western-Transfer

Im Anschluss an die geleelektrophoretische Auftrennung wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (porablot NCP; Macherey-Nagel, Düren). Für den Proteintransfer wurde das Sammelgel vom Trenngel vollständig entfernt. Das Trenngel wurde in eine Transferkassette (peQLab, Erlangen) nach folgendem Schema eingefügt:

Aufbau Transferkassette	Western- Transferpuffer	
Lochplatte (Minuspol)	5,45 g	Tris
Schwammtuch	25,9 g	Glycin
Zwei Lagen Whatman 3 M Chromatographiepapier	1620 ml	dH ₂ O
Trenngel	180 ml	Methanol
Nitrocellulosemembran		
Zwei Lagen Whatman 3 M Chromatographiepapier		
Schwammtuch		
Lochplatte (Pluspol)		

Vor dem Zusammenbau der Transferkassette wurden die Schwammtücher, das Whatman 3 M Chromatographiepapier und die Nitrocellulosemembran in Western-Transferpuffer eingeweicht. Beim Zusammenbau der Transferkassette wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Komponenten keine Luftblasen befinden, die den Transfer der Proteine behindern könnten. Die Transferkassette wurde anschließend mit Klemmen zusammengesteckt, in eine Elektrotransferapparatur (MiniTank™ Elektrobloetter Modell VEP-2, peQLab, Erlangen) eingesetzt, welche mit Western-Transferpuffer befüllt wurde, sodass die Transferkassette vollständig bedeckt war. Die Proteine wurden für zwei Stunden bei 50 V im Kühlraum von dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

3.2.6 Immundetektion von Proteinen

<u>TBS</u>		<u>TTBS [1 l]</u>		<u>Blockierungslösung</u>	
20 mM	Tris/HCl pH 7,5	1 l	TBS	5 %	Magermilch in TTBS
500 mM	NaCl	0,5 ml	Tween 20		

<u>Lösung A</u>		<u>Lösung B [10 ml]</u>		<u>Detektionslösung</u>	
0,1 M	Tris/HCl pH 8,6	11 mg	p-Hydroxycoumarinsäure	2 ml	Lösung A
250mg/l	Luminol		in Dimethylsulfoxid	0,6 µl	H ₂ O ₂
				200 µl	Lösung B

Im Anschluss an den Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran, wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für mindestens zwei Stunden in Blockierungslösung bei 4°C unter ständigen Schütteln inkubiert. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C mit 50 ml primärer Antikörperlösung hybridisiert. Anschließend wurde die Membran drei Mal für zehn Minuten mit TTBS bei RT gewaschen und dann in 25 ml sekundärer Antikörperlösung für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die primäre sowie die sekundäre Antikörperlösung wurde dabei mit Blockierungslösung angesetzt. Danach erfolgte ein erneuter Waschdurchgang von drei Mal zehn Minuten mit TTBS bei RT und im Anschluss einmal zehn Minuten mit TBS. Aufgrund der Kopplung des sekundären Antikörpers an Meerrettich-Peroxidase (HRP), konnte der Protein-Antikörper-Komplex durch die Peroxidaseaktivität mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen werden. Für die Chemilumineszenzreaktion wurde die Membran mit Detektionsreagenz überschichtet und für zwei Minuten darin inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Detektionsreagenz entfernt und die Membran zwischen zwei Klarsichtfolien gelegt. Die Membran wurde so in eine Expositionskassette überführt und ein Röntgenfilm (Fuji Super RX, Fuji, Düsseldorf) wurde aufgelegt. Die Expositionsdauer variierte je nach Stärke des Signals. Anschließend wurde der Film entwickelt.

3.2.7 Ponceau S-Färbung von Nitrocellulosemembranen

Die Nitrocellulosemembran wurde nach erfolgreicher Immunodetektion in dem roten Azofarbstoff Ponceau S inkubiert. Die 0,1%-ige Färbelösung wurde mit 5%-iger Essigsäure angesetzt. Die angefärbten Proteine auf der Membran dienten als Ladekontrolle. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Färbelösung entfernt und die Reste des Farbstoffes durch mehrmaliges Schwenken in H₂O abgewaschen. Die gefärbte Membran konnte dann zur Dokumentation eingescannt werden.

3.3 Experimente mit *Saccharomyces cerevisiae*

3.3.1 Hefemedien

<u>SD-Medium [200ml]:</u>	<u>YPAD-Medium [1 l]</u>
0,425 g Hefegrundmedium	20 g Pepton
1,25 g Ammoniumsulfat	5 g Hefeextrakt
ad 200 ml dH ₂ O	40 mg Adenin-Hemisulfat
pH 5,8 (KOH)	ad 950 ml dH ₂ O
<u>autoklavieren</u>	<u>pH 5,8 (KOH)</u>
	autoklavieren
	50 ml 40 % Glukose (steril)

Vor Gebrauch des SD-Mediums wurden die jeweils benötigten gelösten und 100-fach konzentrierten Aminosäuren mit dH₂O 1:10 verdünnt und auf ein Gesamtvolumen von 25 ml gebracht. Nun wurden 25 ml sterile 20%-ige Glucose hinzugefügt. Anschließend wurden die 50 ml 10x Drop-In-Lösung den 200 ml SD-Medium hinzugefügt und gut gemischt. Für Agarplatten wurden dem SD-Medium bei einem Volumen von 200 ml vor dem Autoklavieren 3,75 g Agar hinzugefügt. Für YPAD-Agarplatten wurden dem Flüssigmedium bei einem Volumen von 100 ml vor dem Autoklavieren 1,5 g Agar hinzugefügt

<u>Komponenten der Drop-In-Lösung [100x]:</u>	
Adenin-Hemiulfat	100 mg/ 50 ml
L-Histidinmonohydrochlorid (Monohydrat)	100 mg/ 50 ml
L-Leucin	500 mg/ 50 ml
L-Lysindihydrochlorid oder	180 mg/ 50 ml
L-Lysinmonohydrochlorid	150 mg/ 50 ml
L-Methionin	100 mg/ 50 ml
L-Tryptophan	100 mg/ 50 ml
Uracil	100 mg/ 50 ml
<u>mit dH₂O ansetzen</u>	
sterilfiltrieren	

3.3.2 Kultivierung von Hefezellen

Hefezellen wurden bei 30°C kultiviert. Flüssigkulturen wurden dabei zusätzlich bei 250 UpM geschüttelt. Der verwendete Hefestamm HF7c ist für bestimmte essentielle Stoffwechselkomponenten auxotroph. Der Hefestamm kann auf Minimalmedium ohne Adenin, Histidin, Lysin, Leucin, Tryptophan und Uracil nicht wachsen. Analog zur Selektion auf Antibiotikaresistenz in *E. coli* können Hefezellen auf eingebrachte Fremdgene durch Komplementation der Auxotrophie durch entsprechende Plasmide selektioniert werden.

3.3.3 Herstellung kompetenter Hefezellen (HF7c)

Lösung A:

10 mM	Bicine, pH 8,35 (KOH)
1 M	Sorbitol
3 %	Ethylenglycol (v/v)

autoklavieren

Eine 5 ml Übernachtskultur von HF7c wurde in YPAD-Medium angezogen. Die Kultur wurde bei 3000xg abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in ca. 500 µl Restüberstand vorsichtig resuspendiert. Mit der Zellsuspension wurde anschließend 100 ml YPAD-Medium inokuliert und bei 30°C kultiviert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3000xg geerntet und in 20 ml Lösung A gewaschen. Anschließend wurden die Zellen abermals bei 3000xg abzentrifugiert und in 4 ml Lösung A resuspendiert. Die kompetenten Hefezellen wurden in 100 µl Aliquots langsam in einem Styroporbehälter bei – 20°C eingefroren und dann bei – 70°C gelagert.

3.3.4 Transformation von Hefezellen

Lösung B:

200 mM	Bicine, pH 8,35 (KOH)
40 %	Polyethylenglycol 1000 (w/v)

autoklavieren

Lösung C:

10 mM	Bicine, pH 8,35 (KOH)
150 mM	NaCl

autoklavieren

Die benötigten Mediumplatten wurden unter der Sterilbank für ungefähr eine Stunde getrocknet. Die benötigte Plasmid-DNA sowie die Träger-DNA (Lachssperma-DNA; 10 mg/ml in TE) wurden bei RT aufgetaut. Die Träger-DNA wurde vor Gebrauch für 5 Minuten auf 100°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Die kompetenten Hefezellen wurden aus dem -70°C-Schrank direkt auf Eis überführt. 5 µl der Träger-DNA wurden direkt an die Wand des Reaktionsgefäßes pipettiert. In den Tropfen Träger-DNA wurden 3-6 µl (je nach Konzentration) der entsprechenden Plasmid-DNA pipettiert. Anschließend wurde der Ansatz für 3 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde 1 ml Lösung B hinzugefügt und das Reaktionsgefäß invertiert, um die Hefezellen zu resuspendieren. Im Anschluss wurde der Ansatz eine Stunde bei 30°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 20 Sekunden zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Hefezellen wurden vorsichtig in 800 µl Lösung C durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Es erfolgte abermals für 20 Sekunden ein Zentrifugationsschritt und der Überstand wurde wieder verworfen. Die Hefezellen wurden in 100 µl Lösung C vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden anschließend auf den Selektiv-Agar-Platten ausplattiert. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und für drei oder vier Tage bei 30°C inkubiert.

3.3.5 Das Hefe-Zwei-Hybridsystem zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine *in vivo* Methode zur Identifikation und Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen. In dieser Arbeit fand das MATCHMAKER Zweihybridsystem von Clonrech (Heidelberg) Anwendung. Dieses System beruht auf dem Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 und dem *lacZ*-Reportergen unter Kontrolle eines GAL4-regulierbaren Promotors, welches im Genom des Hefestamms HF7c enthalten ist. Die funktionellen Domänen von GAL4 werden von zwei verschiedenen Plasmid-Vektoren kodiert. Die DNA-Bindedomäne (GAL4BD) ist im pGBT9-Vektor enthalten und die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4AD) im pGAD424-Vektor. Die die cDNA-Sequenzen, die für die zu untersuchenden Proteine kodieren, sind an die jeweiligen Domänen fusioniert. Beide Plasmide werden in den Hefestamm HF7c transformiert. Bei einer Interaktion der Proteine werden die funktionellen Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander gebracht, der Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und das Reportergen wird aktiviert. Dies erlaubt die quantitative Messung der Interaktion anhand der β -Galaktosidase-Aktivität.

3.3.6 Das Hefe-Drei-Hybridsystem zur Charakterisierung von Protein-Protein-Interaktionen

Das Hefe-Zwei-Hybridsystem bildet die Basis des Hefe-Drei-Hybridsystems. In diesem System wird zusätzlich zu den Fusionsproteinen mit DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors über eine weitere Expressionskassette im DNA-Bindedomänen-Vektor ein drittes Gen exprimiert (Tirode *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde dafür der pBD-Vektor eingesetzt. Hier steht die Expression des zusätzlichen Gens unter der Kontrolle des *MET25*-Promotors. Dieser Promotor wird durch Methionin reguliert. In Anwesenheit von Methionin wird die Expression reprimiert und in Abwesenheit von Methionin im Hefe-Medium induziert. Binden die GAL4BD- und GAL4AD-Fusionsproteine gleichzeitig an das zusätzlich vorhandene Protein, werden die funktionellen Domänen des GAL4-Transkriptionsfaktors in räumliche Nähe zueinander gebracht. Der Transkriptionsfaktor wird rekonstituiert und das *lacZ*-Reportergen des Hefestamms HF7c wird exprimiert.

3.3.7 Das Hefe-Ein-Hybridsystem zur Charakterisierung von DNA-Protein-Interaktionen

Mit dem Hefe-Ein-Hybridsystem konnte die Transkriptionsaktivität von Proteinen untersucht werden. Der Hefestamm HF7c enthält in seinem Genom die UAS (*upstream activating sequence*) des *GAL4*-Gens, welche an das Reportergen *lacZ* fusioniert ist. Die GAL4-DNA-Bindedomäne ist im pGBT9-Vektor enthalten und die cDNA-Sequenz, welche für das zu untersuchende Protein

kodiert, wird im korrekten Leserahmen eingebracht und bildet mit der GAL4BD ein Fusionsprodukt. Das Protein kann nun über die GAL4BD an die UAS-Sequenz binden. Sofern das Protein Transkriptionsaktivität aufweist, wird die Expression des Reportergens initiiert.

3.3.8 Bestimmung von IC_{50} und EC_{50} Werten

Der IC_{50} -Wert gibt die halbmaximale inhibitorische Konzentration einer Substanz an, während der EC_{50} -Wert die mittlere effektive Konzentration einer Substanz angibt. In dieser Arbeit wurden die Werte für ausgewählte Protein-Protein-Interaktionen in Hefe bestimmt, um die Wirkung bestimmter Substanzen auf eine Interaktion direkt miteinander vergleichen zu können. Dafür wurde die Stärke der Protein-Protein-Interaktionen in Abhängigkeit ausgewählter Konzentrationen der Substanzen in Miller Einheiten bestimmt und daraus die IC_{50} und EC_{50} Werte berechnet. Für die Berechnung wurde zuerst der Gesamtmittelwert über alle Mittelwerte der Miller Einheiten der ausgewählten Substanzkonzentrationen berechnet. Anschließend wurden die flankierenden Mittelwerte der Miller Einheiten für den berechneten Gesamtmittelwert bestimmt. Der dekadische Logarithmus der eingesetzten Substanzkonzentrationen der flankierenden Mittelwerte wurde ebenfalls berechnet. Nach der Methode der kleinsten Quadrate konnte anhand dieser Werte der dekadische Logarithmus der einzusetzenden Substanzkonzentration für den berechneten Gesamtmittelwert ermittelt werden. Durch Potenzieren des dekadischen Logarithmus wurde die einzusetzende Substanzkonzentration berechnet und somit der IC_{50} - beziehungsweise EC_{50} -Wert. Salicylsäure und Benzoessäure wurden vor Verwendung in dH_2O gelöst. Für 3,5-Dichloranthanilsäure wurde aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration von 0,5% DMSO im Hefe-Medium nicht überschritten wird. Die verwendeten Konzentrationen der Substanzen wurden entsprechend der Sensitivität der zu untersuchenden Protein-Protein-Interaktion gegenüber der Substanz angepasst und sind im Detail dem Anhang zu entnehmen.

3.3.9 Quantitativer Test der Interaktionen

Z-Puffer		oNPG-Substrat-Lösung	
60 mM	Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O (steril)	4 mg/ml	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
40 mM	NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O (steril)		in Z-Puffer
10 mM	KCl (steril)		
1 mM	MgSO ₄ (steril)		
pH 7,0		Lagerung – 20 °C; lichtgeschützt	
Für Z-Puffer/ β-Mercaptoethanol (MSH)			
135 µl/ 50 ml MSH hinzufügen			

Das *lacZ*-Reportergen wurde für die Quantifizierung der Interaktionen mittels der drei zuvor aufgeführten Hefesysteme verwendet. Die Aktivität der β -Galaktosidase ist dabei proportional zur Affinität der Interaktionspartner. Als Substrat für die β -Galaktosidase diente die Verbindung o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid (oNPG).

Für jede Transformation wurden drei unabhängige Kolonien über Nacht in 5 ml Selektivmedium bei 30°C angezogen. Als Negativkontrolle wurden 5 ml des verwendeten Selektivmediums mitgeführt, welches nicht inokuliert wurde. Von jeder Übernachtskultur wurde jeweils 1 ml in zwei Reaktionsgefäße überführt. Davor wurden die Kulturen durch Pipettieren durchgemischt. Direkt im Anschluss wurde abermals 1 ml der Übernachtskultur in eine Küvette überführt und die OD₆₀₀ wurde am Photometer gegen den Negativwert gemessen. Die OD₆₀₀ sollte dabei zwischen 1,0 und 1,5 liegen. Die Zellen in den Reaktionsgefäßen wurden durch 3 Minuten Zentrifugation geerntet. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 100 μ l Z-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 min in flüssigem N₂ eingefroren und dann bei 37°C im Wasserbad für 80 Sekunden aufgetaut. Dieser Vorgang wurde noch zwei weitere Male wiederholt, um die Zellen aufzuschließen. Nun wurden 750 μ l Z-Puffer mit Mercaptoethanol (MSH) hinzugefügt und anschließend 150 μ l der oNPG-Substratlösung. Durch Invertieren der Reaktionsgefäße wurde die Enzymreaktion gestartet. Die Reaktionsgefäße wurden bei 30°C im Schüttler inkubiert bis sich eine Gelbfärbung zeigte. Je nach Enzymaktivität konnte die Zeitspanne zwischen einigen Minuten und bis zu drei Stunden variieren. Die Reaktion wurde mit 400 μ l 1 M Na₂CO₃ abgestoppt. Die Ansätze wurden für 3 min zentrifugiert und der Überstand wurde in Küvetten überführt. Die OD₄₂₀ wurde nun gegen den Negativwert gemessen. Dabei sollte der Wert der OD₄₂₀ 1,5 nicht überschreiten, da andernfalls die Proben verdünnt werden müssen. Die Miller Einheiten konnten anschließend aus den Messwerten mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Miller Einheiten} = \frac{1000 \times OD_{420}}{t \times V \times OD_{600}}$$

t – Inkubationszeit [min] V – Volumen der Zellsuspension [1 ml]

3.4 Experimente mit Pflanzen

3.4.1 Anzucht und Kultur

Die Anzucht von nicht transgenen Pflanzen fand im Gewächshaus statt, mit mindestens 16 Stunden natürlicher oder künstlicher Belichtung pro Tag und Temperaturen zwischen 22°C und 28°C. Die Samen wurden auf feuchter Einheitserde in Pikierschalen ausgesät und zur Keimung ans Licht gestellt. Sobald die Pflanzen groß genug waren, wurden diese in Einzeltöpfe mit gedämpfter Erde umgetopft.

3.4.1.1 Anzucht auf MS-Medium

Durch eine eingebrachte Antibiotikumresistenz ist es möglich, eine Vorselektion transgener Samen durchzuführen. Bevor Samen auf MS-Medium-Agarplatten ausgesät wurden, wurden diese sterilisiert.

MS-Medium [500 ml]

1,15 g MS-Salze (Murashige&Skoog)

5,0 g Saccharose (1%)

4 g Phyto-Agar (0,8%)

ad 500 ml dH₂O

pH 5,7 (KOH oder NaOH)

autoklavieren

400 µg/ml Kanamycin

60 µg/ml Hygromycin

Die Samen wurden dafür in ein steriles Reaktionsgefäß gefüllt. Zu den Samen wurde etwa 1 ml 70 % technisches Ethanol hinzugefügt. Nach einer Einwirkzeit von 30 Sekunden wurde dieser wieder vorsichtig abgenommen und verworfen. Nun wurden die Samen in 5 % Natrium-Dichlorisocyanurat Dihydrat inkubiert. Während der Einwirkzeit von 20 Minuten wurden die Samen immer wieder leicht geschüttelt, invertiert und kurz abzentrifugiert, damit alle Samen möglichst gleichmäßig mit Natrium-Dichlorisocyanurat Dihydrat benetzt wurden. Natrium-Dichlorisocyanurat Dihydrat wirkt sterilisierend. Anschließend wurden die Samen drei Mal mit sterilem H₂O gewaschen. Dann wurden sie auf den MS-Medium-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum bei transgenen Pflanzen oder ohne Antibiotikum bei nicht transgenen Pflanzen, verteilt und circa 4 Wochen unter Standardbedingungen im Lichtschrank inkubiert bis die Keimlinge groß genug waren, um auf Erde pikiert zu werden. Sollte der Effekt von Salicylsäure auf die Keimung untersucht werden, so wurde dem MS-Medium zusätzlich die gewünschte Konzentration steriler Salicylsäure zugesetzt.

3.4.2 Virus-Inokulation von *N. tabacum*

TMV ist mechanisch übertragbar und kann über verletzte Epidermiszellen in die Tabakpflanze eindringen. Für die Virus-Inokulation wurde eine kleine Menge Graphitschleifstaub (Carborund) auf das zu infizierende Blatt aufgebracht und 50 µl einer *TMV*-Suspension (1:50 in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) in Tröpfchen auf das Blatt verteilt hinzu pipettiert. Die Virus-Suspension wurde anschließend vorsichtig mit dem Finger in das Blatt eingerieben. Durch das Carborund wird die Blattepidermis verletzt und ermöglicht das Eindringen des Virus in die Zelle.

3.4.3 Induktion des *GUS*-Reportergens und der endogenen Gen-Expression durch äußere Stimuli

Für die Induktion des *GUS*-Reportergens oder der endogenen Gen-Expression wurden Blattscheiben mit einem Korkbohrer (Ø 14 mm) aus den entsprechenden Tabakpflanzen ausgestochen und in Petrischalen auf verschiedenen Substanzen inkubiert. Als Negativkontrolle wurden Blattscheiben auf dH₂O inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von drei bis vier Tagen wurden die Blattscheiben auf Fließpapier getrocknet und eine Proteinextraktion durchgeführt.

Für Induktion der endogenen Gen-Expression in *A. thaliana* wurden die Pflanzen mit 1 mM Salicylsäure, 0,3 mM BTH in Form von Bion oder mit H₂O ausgiebig besprüht. Das Blattmaterial wurde dann nach 14 Stunden beziehungsweise 20 Stunden geerntet und eine Proteinextraktion durchgeführt.

3.4.4 Nachweis der induzierten Reporterogenaktivität durch *GUS*-Enzymaktivität

<u>1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0</u>		<u>GUS-Lysepuffer</u>	
57,5 ml	1 M Di-Natriumhydrogenphosphat	50 mM	Na-Phosphatpuffer pH 7
42,3 ml	1 M Natrium-di-hydrogenphosphat	10 mM	EDTA
		0,1 %	Triton-X 100
		0,1 %	Laurylsarkosin
		10 mM	β-Mercaptoethanol
<u>10 mM MUG-Lösung</u>			
0,35 g	4-Methylumbelliferylglucuronid in 100 ml GUS-Lysepuffer		
<u>MU Stammlösung</u>			
100 µM	4-Methylumbelliferon in 96 % Ethanol		
Lagerung: dunkel bei – 20°C			

Für den Nachweis der induzierten Reporterogenaktivität des *GUS*-Reportergens wurde zuerst eine Proteinextraktion aus dem entsprechenden Blattmaterial durchgeführt. Anschließend wurden 20 µl des Proteinextrakts mit 70 µl GUS-Lysepuffer und 10 µl 10 mM MUG (4-Methylumbelliferylglucuronid) in einem Reaktionsgefäß gemischt und bei 37°C inkubiert. Die durch die Induktion exprimierte β-Glucuronidase setzt das Substrat MUG um. Es entsteht dabei das Produkt MU (4-Methylumbelliferon), welches durch UV-Anregung fluoresziert. Als Referenz diente ein Ansatz mit 90 µl GUS-Lysepuffer und 10 µl 10 mM MUG. Die Enzymaktivität wurde bei einer ersten Abschätzung der Fluoreszenzintensität nach 30 Minuten unter UV-Licht bewertet. Zu einem geeigneten Zeitpunkt wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 µl 0,2 M Na₂CO₃ abgestoppt. Die abgestoppten Ansätze konnten anschließend bei 4°C gelagert werden. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensität erfolgte am Fluorimeter. MU wird durch UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365 nm maximal angeregt

und emittiert blaues Licht der Wellenlänge 455 nm. Die Detektion des emittierten blauen Lichts erfolgte mittels Fluorimeter quantitativ. Für die Berechnung der GUS-Enzymaktivität wurde eine Eichgerade im Bereich von 0 bis 5000 pMol MU erstellt.

Die Reaktionsansätze wurden vor der Messung im Fluorimeter mit der Eichgerade unter UV-Licht abgeglichen und bei Bedarf mit 0,2 M Na₂CO₃ verdünnt. Etwaige Verdünnungsfaktoren wurden bei der Berechnung berücksichtigt. Jeweils 250 µl der Proben und der Eichgerade wurden dann in eine schwarze, 96-Loch Flachboden-Mikrotiterplatte (Costar, Bodenheim) pipettiert. Dabei wurde die Eichgerade in die oberste Reihe pipettiert und die Proben auf die verbleibenden freien Plätze verteilt. Die Messung fand im Spectra Fluor (Tecan, Crailsheim*) statt. Die Eichgerade wurde aus den Eichmesswerte ermittelt und ermöglichte die Berechnung des Eichgeradenfaktors. Über die Messwerte des Fluorimeters konnten mit Hilfe der Eichgeraden, der Inkubationszeit des GUS-Enzymaktivitätstest sowie der Proteinkonzentration, der jeweilig verwendeten Proteinextrakte nach Bradford, die GUS-Enzymaktivität [pMol MU/µg Protein x h] berechnet werden.

(*) Messparameter: Excitationsfilter: 360 nm, Emissionsfilter: 455 nm, Schüttelzeit: 0 s, Schüttelmodus: Aus, Gainmode: Manual, Gain: 60, Blitzanzahl: 3, Integrationsstart: 0 µs, Integrationszeit: 40 µs, Plattentyp: CO96K_T, Inkubationszeit: 0 s, Temperatur: --

3.4.5 Vorselektion der mit CRISPR/Cas9 erzeugten transgenen Linien

Die Vorselektion der mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems erzeugten transgenen Linien in *N. tabacum* erfolgte im S1-Gewächshaus unter Standard-Wachstumsbedingungen. Es wurden 1000 Samen (75 mg) der zu untersuchenden Linien auf eine Fläche von 28 cm x 23,5 cm feuchter Anzuchterde ausgebracht. Als Kontrolllinien wurden je nach Transformationshintergrund entweder Samen der transgenen Linie 138 verwendet oder Samen von *N. tabacum* cv. Samsun NN verwendet. Nach ungefähr zwei Wochen, sobald die Keimblätter der Keimlinge vollständig ausgebildet waren aber die Keimlinge so klein wie möglich waren, wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Die Keimlinge wurden über einen Zeitraum von vier Wochen zweimal pro Woche gleichmäßig mit 0,3 mM BTH in Form von Bion besprüht. Bion ist ein kommerziell erhältlicher Pflanzenaktivator mit dem Wirkstoff BTH. 0,144g/l Bion entsprechen 0,3 mM BTH. Als Positivkontrolle wurden Keimlinge der Kontrolllinie ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen. Als Negativkontrolle wurde ein separater Ansatz mit Keimlingen der Kontrolllinie mit H₂O behandelt. Im Anschluss an die Bion-Behandlung wurden die größten Pflanzen ausgetopft und für weitere Analysen verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Tabak NPR-Proteinen in Hefe

Für *Nicotiana tabacum* sind bisher zwei Gene bekannt, die Ähnlichkeiten zu Arabidopsis NPR1 aufweisen. Ein weiteres Gen dieser Genfamilie in Tabak ist homolog zu den *BALDE-ON-PETIOLE*-Genen *BOP1* und *BOP2* in Arabidopsis. Tabak *BOP2* kodiert für ein Protein mit hoher Homologie zu AtBOP2. Die Identität der Proteine liegt bei 77% (Wu *et al.*, 2012). Dieses Gen ist in Tabak auch als *NtNPR5* bekannt. Die Beteiligung der *BOP*-Gene an der Salicylsäure-vermittelten *PR1*- und *SAR*-Induktion ist bislang wenig untersucht. Aus diesem Grund werden *BOP*-Gene in der vorliegenden Arbeit nicht betrachtet.

Eines der beiden *NPR1*-ähnlichen Gene in Tabak weist eine höhere Homologie zu Arabidopsis *NPR1* auf als das andere. Dieses Gen wurde entsprechend *NtNPR1* genannt und genauer charakterisiert (Liu *et al.*, 2002; Zwicker *et al.*, 2007). *NtNPR1* und *AtNPR1* kodieren für Proteine mit 588 bzw. 593 Aminosäuren. Die Identität der Proteine liegt bei 52% und die Ähnlichkeit zwischen 68% und 72%. Die Domänenstruktur beider Proteine ist ebenfalls sehr ähnlich. Arabidopsis *NPR1* wie auch Tabak *NPR1* besitzen nahe dem N-Terminus eine BTB/POZ-Domäne und im zentralen Bereich des Proteins eine Ankyrin-Domäne. Der C-terminale Bereich beider Proteine setzt sich aus einem LENRV-Motiv und einer NIMIN-Bindedomäne zusammen. Das LENRV-Motiv steht im engen Zusammenhang mit der Wahrnehmung von Salicylsäure. NIMIN1- und NIMIN2-Proteine interagieren mit dem C-Terminus sowohl von *AtNPR1* als auch von *NtNPR1*. Diese Bindung wird durch Anwesenheit von Salicylsäure inhibiert (Maier *et al.*, 2011). TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren differentiell mit Tabak *NPR1*. Diese Interaktion ist weitgehend insensitive gegenüber Salicylsäure. *NtTGA2.1* und *NtTGA2.2* binden an eine Region von Aminosäure 1 bis 465, während *NtTGA7* mit diesem Teilstück nur marginal interagieren kann. Tabak *TGA7* bindet präferentiell an den C-Terminus von *NtNPR1*. Die Interaktion erfolgt über einen Bereich zwischen Aminosäure 386 bis 525. *NtTGA7* ist bislang der einzig bekannte TGA-Transkriptionsfaktor, welcher spezifisch an den C-Terminus von *NPR1* bindet (Stos-Zweifel *et al.*, 2018). Zudem weist Tabak *NPR1* in Hefen eine Transaktivierungsaktivität auf. In Fusion mit der GAL4-Bindedomäne des Volllängenproteins von *NtNPR1* ist eine schwache, konstitutive Aktivierung des Reportergens messbar. Diese Aktivierung kann durch die Anwesenheit von Salicylsäure gesteigert werden. Die Deletionsmutanten *NtNPR1*(1/228) und *NtNPR1*(1/315) zeigen auch eine moderate bzw. sehr starke Transaktivierungsaktivität in Hefen, allerdings ist diese durch Salicylsäure nicht beeinflussbar. Der C-terminale Teil von *NtNPR1* von Aminosäure 386 bis 588 hingegen weist eine schwache Transaktivierung auf, welche durch Salicylsäure verstärkt wird (Maier *et al.*, 2011). Anders als in Tabak ist bei *AtNPR1* keine Transaktivierungsaktivität in Hefe messbar. Lediglich bei der Deletionsmutante *AtNPR1*(1/177) konnte eine Transaktivierungsaktivität im geringen Maße gemessen

werden (Zhang *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2011). Dafür konnte *in planta* im C-terminalen Teil von AtNPR1 eine Salicylsäure-induzierbare Transaktivierung nachgewiesen werden (Rochon *et al.*, 2006).

N. tabacum besitzt noch ein weiteres Gen mit Ähnlichkeiten zu Arabidopsis NPR1. Allerdings ist die Homologie nicht so hoch wie bei dem als *NtNPR1* identifizierten Gen. Dieses Gen wurde in *N. tabacum* als *NIM1-like1* identifiziert (Lawton *et al.*, 2004; GenBank AY640382). In der vorliegenden Arbeit wird das Gen als *NtNPR3* bezeichnet. Diese Bezeichnung beruht auf der hohen Homologie zu Arabidopsis NPR3. *AtNPR3* und *NtNPR3* kodieren für Proteine mit 586 beziehungsweise 588 Aminosäuren. Die Identität dieser Proteine liegt bei 58% und die Ähnlichkeit bei 74%. Die Struktur der Proteine ist ebenfalls sehr ähnlich und vergleichbar mit den NPR1-Proteinen. Nahe des N-Terminus befindet sich auch hier eine BTB/POZ-Domäne, ebenso wie im zentralen Bereich des Proteins eine Ankyrin-Domäne. Der C-Terminus von *NtNPR3* ist entsprechend der NPR1-Proteine und *AtNPR3* aufgebaut. Er beinhaltet das LENRV-Motiv, wobei es sich im Fall von *AtNPR3* um ein LEKRV-Motiv handelt. Weiterhin beinhaltet der C-Terminus die NIMIN-Bindedomäne. NIMIN1- und NIMIN2-Proteine können an *NtNPR3* binden. Diese Bindung wird durch Salicylsäure negativ beeinflusst (Maier *et al.*, 2011). Ferner ist *NtNPR3* in der Lage, mit *NtTGA2.1*, *NtTGA2.2* und *NtTGA7* zu interagieren. Anders als bei Tabak NPR1 weist diese Interaktion eine moderate Salicylsäure-Sensitivität auf (D.Neeley&U.M.Pfitzner, persönliche Mitteilung). Im Gegensatz zu *NtNPR1* zeigen *NtNPR3* und *AtNPR3* in Hefen keine Transaktivierungsaktivität (Maier *et al.*, 2011).

Im folgenden Abschnitt erfolgt eine weitere vergleichende Charakterisierung der NPR-Proteine aus Tabak. Es wurden die biochemischen Eigenschaften im Hefesystem untersucht, um diese mit Arabidopsis NPR-Proteinen vergleichen zu können. Die verwendeten mutanten Tabak NPR-Gene wurden entweder durch Deletion und *in vitro* Mutagenese hergestellt oder lagen bereits in den entsprechenden Hefektoren pGAD424, pGBT9 oder pBD vor. Abbildung 7 gibt eine Übersicht über die verwendeten Teilkonstruktionen. Anhand dieser Konstruktionen sollte im heterologen Hefesystem die Aktivität einzelner Domänen in beiden Tabak NPR-Proteinen untersucht werden. Dabei wurde das Hefe-Zwei-Hybridsystem (Y2H) und das Hefe-Drei-Hybrid-System (Y3H) basierend auf dem GAL4-aktivierbaren *lacZ*-Reporter gen verwendet (3.3.5; 3.3.6). Der für das Hefe-Drei-Hybrid-System verwendete pBD-Vektor ist in der Lage, zwei Gene unter Kontrolle zweier Promotoren zu exprimieren. Dabei wird die Sequenz in der ersten Expressionskassette an die GAL4BD-Sequenz fusioniert. Die Sequenz des zweiten zu exprimierenden Gens steht unter der Kontrolle des *Met25*-Promotors (*Met25_{pro}*). Dieser Promotor wird durch Anwesenheit von Methionin im Hefe-Medium reprimiert. Ohne Zugabe von Methionin zum Hefe-Medium wird die Expression des Gens gewährleistet. Der Einfluss des zusätzlichen Proteins kann nun auf die Interaktion der GAL4BD- bzw. GAL4AD-Fusionsproteine analysiert werden. Die entsprechenden Plasmide für den Hefe-Zwei- bzw Hefe-Drei-Hybridtest wurden in HF7c-Hefezellen co-transformiert. Als Negativkontrolle wurden dafür die jeweils leeren Hefektoren verwendet. Die Analyse der Interaktionen wurde mittels eines quantitativen *lacZ*-

Reporter-Gen-Tests durchgeführt. Zur Untersuchung des Einflusses von Salicylsäure auf diverse Interaktionen wurden die Hefekolonien zusätzlich in mit Salicylsäure-versetztem SD-Medium angezogen. Die Standardkonzentration betrug 0,3 mM.

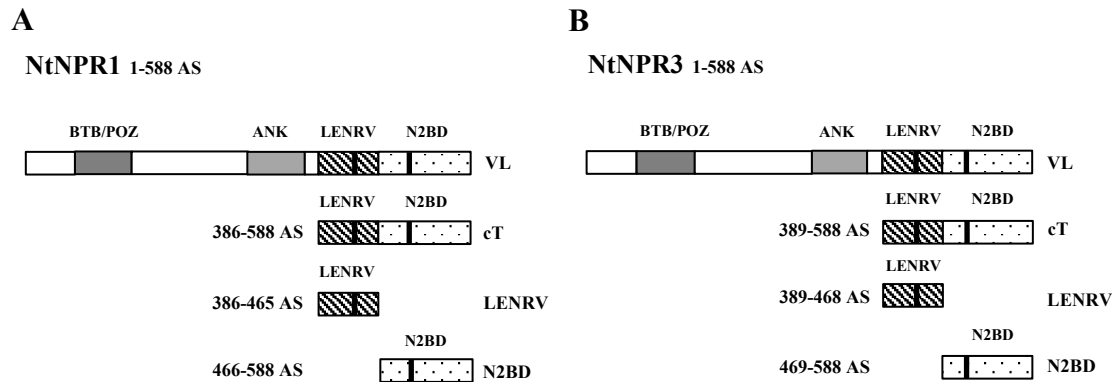


Abb. 7 Schematische Darstellung der verwendeten Teilstücke von Tabak NPR1 und NPR3. (A) NtNPR1. (B) NtNPR3. Der Balken in der LENRV-Domäne stellt das LENRV-Motiv dar. Der Balken in der NIMIN2-Bindedomäne stellt den Bereich der NIMIN-Bindestelle dar. VL, Volllänge; cT, C-Terminus; LENRV, LENRV-Domäne; N2BD, NIMIN2-Bindedomäne.

4.1.1 Dimerisierung von Tabak NPR-Proteinen

Laut X. Dong und Mitarbeitern spielt die Bildung von Heterodimeren der NPR-Proteine eine wichtige Rolle bei der Salicylsäure-Wahrnehmung in Arabidopsis. Dabei soll über die Dimerisierung von AtNPR1 mit AtNPR3 beziehungsweise AtNPR4 Salicylsäure-abhängig die Verfügbarkeit von AtNPR1 reguliert werden (Fu *et al.*, 2012). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob Tabak NPR-Proteine Dimere bilden können. Tabak NPR1 ist im heterologen Hefesystem in der Lage, sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit NtNPR3 zu bilden. Im Vergleich zur Heterodimerisierung mit NtNPR3 weist die Homodimerisierung von NtNPR1 eine relativ starke *lacZ*-Reporter-Genaktivität auf. Dabei ist die Homodimerisierung insensitiv gegenüber Salicylsäure, wohingegen die Heterodimerisierung mit NtNPR3 durchaus eine moderate Sensitivität aufweist. Die Dimerisierung erfolgt möglicherweise über die N-terminale BTB/POZ-Domäne (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde der Einfluss dritter Interaktionspartner, wie TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteine, auf das Dimerisierungsverhalten von NtNPR1 und NtNPR3 in Hefe untersucht.

4.1.1.1 Einfluss von TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen auf die Dimerisierung von Tabak NPR-Proteinen

Für die Untersuchung des Einflusses von TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen auf die Dimerisierung der Tabak NPR-Proteine wurde neben den Wildtypvarianten von NPR1 und NPR3 auch die Deletionsmutante NtNPR1Δ2 (1/228) verwendet (Abb. 8A). Diese Deletionsmutante enthält als

bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomäne lediglich die BTB/POZ-Domäne und erstreckt sich von Aminosäure 1 bis 228. In Abbildung 8B ist zu sehen, dass die BTB/POZ-Domäne für die Dimerisierung ausreicht. Die Homodimerisierung des Vollständigen NtNPR1 wird durch die Anwesenheit von NtTGA7 deutlich inhibiert (Abb. 8C und D). Die Anwesenheit von Salicylsäure hat keinen Effekt auf die Interaktion (Abb. 8C). Durch Repression des *Met25*-Promoters durch Methionin im SD-Medium wird die Expression von NtTGA7 reprimiert und der negative Effekt auf die Dimerisierung aufgehoben. Ferner wird deutlich, dass die Homodimerisierung von NtNPR1 unter Beteiligung der Deletionsmutante deutlich schwächer ist als in der reinen Wildtypsituation (Abb. 8D). Die Anwesenheit von NtTGA2.2 zeigt ähnliche Auswirkungen auf die Dimerisierung wie NtTGA7, obwohl NtTGA7 und NtTGA2.2 an unterschiedliche Stellen von NPR1 binden.

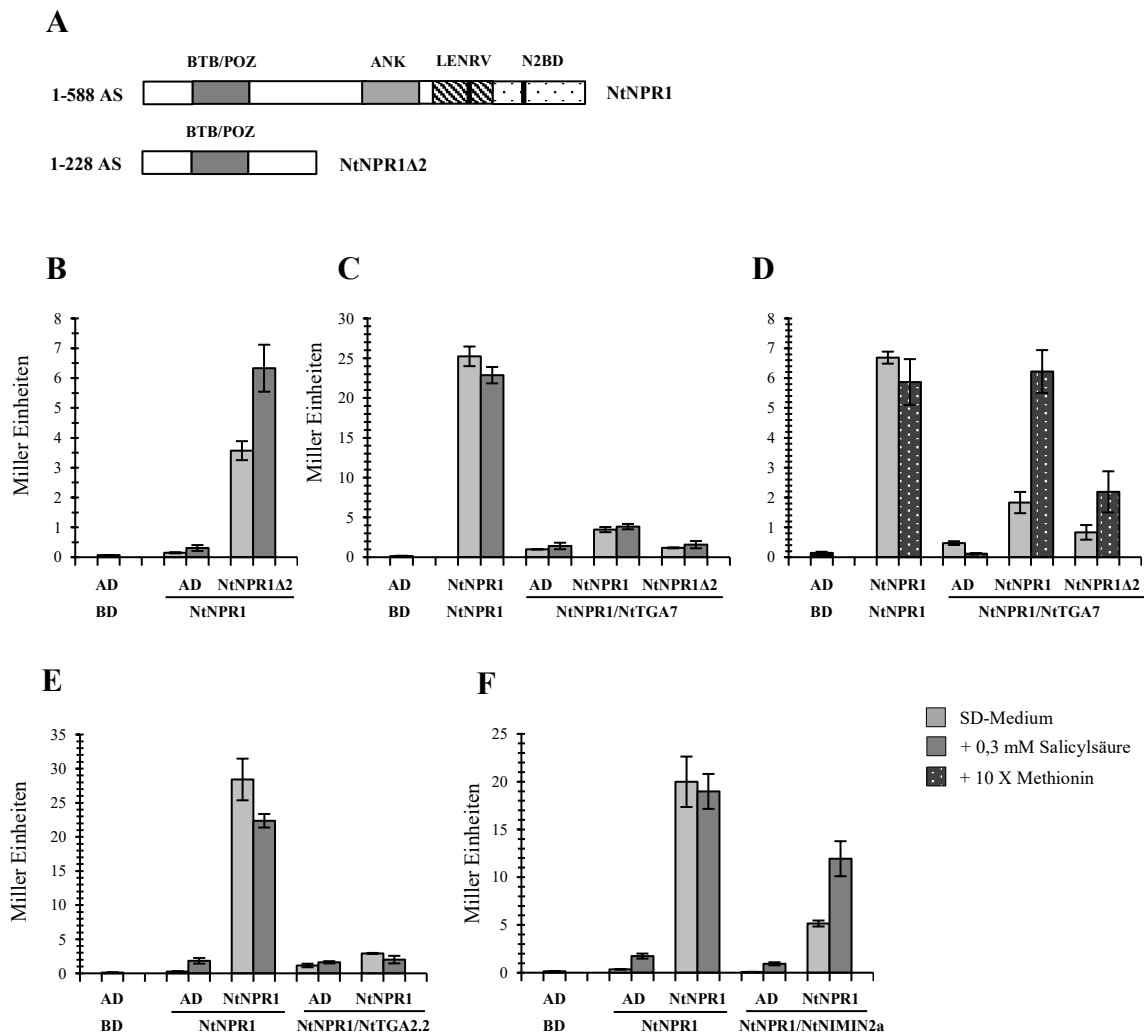


Abb. 8 Homodimerisierung von Tabak NPR1 in Hefe in Gegenwart von TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen. (A) Schematische Darstellung der Deletionsmutante NtNPR1Δ2. (B) Interaktion von NtNPR1 mit NtNPR1Δ2 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe (Y2H). (C) Einfluss von NtTGA7 auf die Dimerisierung von NtNPR1 und NtNPR1Δ2 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtTGA7*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25*_{Pro}. (D) Einfluss von NtTGA7 auf die Dimerisierung von NtNPR1 und NtNPR1Δ2 in An- und Abwesenheit von Methionin in Hefe (Y3H). *NtTGA7*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25*_{Pro}. (E) Einfluss von NtTGA2.2 auf die Dimerisierung von NtNPR1 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtTGA2.2*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25*_{Pro}. (F) Einfluss von NtNIMIN2a auf die Dimerisierung von NtNPR1 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtNIMIN2a*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25*_{Pro}.

Die Dimerisierung wird ebenfalls nahezu vollständig unterbunden und dieser Effekt ist Salicylsäure-insensitiv (Abb. 8E). Für die Dimerisierung wird die BTB/POZ-Domäne benötigt und die Interaktion von NtTGA2.2 erfordert sowohl die BTB/POZ-Domäne als auch die Ankyrin-Domäne von NtNPR1 (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Der negative Einfluss des TGA-Faktors auf die Dimerisierung könnte von einer Konkurrenz um einen überlappenden Interaktionsbereich herrühren, sodass beide Interaktionen nicht simultan erfolgen können. Aufgrund des stark negativen Effekts von TGA-Transkriptionsfaktoren auf die Dimerisierung scheint die Interaktion von NtNPR1 mit den TGA-Transkriptionsfaktoren gegenüber der Dimerisierung bevorzugt zu sein. NtNIMIN2a beeinflusst die Homodimerisierung von NtNPR1 genauso wie die TGA-Transkriptionsfaktoren negativ. Dieser negative Effekt ist ebenso wie die Bindung von NIMIN-Proteinen an NPR1 gegenüber Salicylsäure sensitiv. Durch Zugabe von Salicylsäure kann der negative Effekt durch die Anwesenheit von NtNIMIN2a zwar nicht vollständig aufgehoben werden, es ist aber dennoch eine deutliche Verstärkung der Protein-Protein-Interaktion messbar (Abb. 8F).

Ähnliche Effekte dritter Interaktionspartner konnten auch auf die Heterodimerisierung von Tabak NPR1 und NPR3 festgestellt werden. Die Dimerisierung von NtNPR1 mit NtNPR3 wird gleichermaßen durch TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteine beeinflusst. Die Anwesenheit von NtTGA7 und NtTGA2.2 wirkt sich negativ auf die Dimer-Bildung aus und unterbindet diese nahe zu vollständig. Dieser Effekt wird durch Salicylsäure nicht beeinflusst. NtNIMIN2a wirkt ebenfalls störend auf die Protein-Protein-Interaktion zwischen NtNPR1 und NtNPR3. Dieser Einfluss ist allerdings durch die Zugabe von Salicylsäure in einem gewissen Maße umkehrbar (Abb. 9). Im Hefe-Drei-Hybridsystem konnte gezeigt werden, dass sowohl TGA-Transkriptionsfaktoren als auch NIMIN-Proteine in der Lage sind, die Dimerisierung negativ zu beeinflussen.

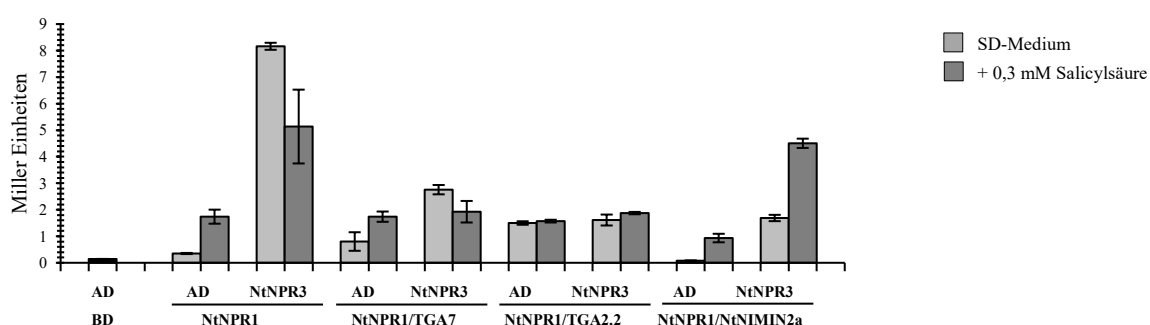


Abb. 9 Heterodimerisierung von Tabak NPR1 und NPR3 in Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen in Hefe. Einfluss von NtTGA7, NtTGA2.2 oder NtNIMIN2a auf die Dimerisierung von NtNPR1 und NtNPR3 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtTGA7*-, *NtTGA2.2*- und *NtNIMIN2a*-Expression stehen unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*.

4.1.2 Mutanten von Tabak NPR1

Für die weitere Charakterisierung von Tabak NPR1 wurden verschiedene Mutanten durch Deletion oder *in vitro* Mutagenese generiert. NPR1-Proteine mit einzelnen Aminosäureaustauschen basieren auf *NPR1*-Allelen, welche in Arabidopsis-Pflanzen mit blockiertem SAR-Signalweg identifiziert wurden (Ryals *et al.*, 1997; Canet *et al.*, 2010). Für weitere Charakterisierungszwecke wurden die Aminosäureaustausche in den Tabakkontext eingeführt.

4.1.2.1 NtNPR1Δ1 (466/525)

Die Deletionsmutante NtNPR1Δ1 erstreckt sich von Aminosäure 1 bis 525. Die NIMIN-Bindedomäne ist durch die Deletion der 63 C-terminalen Aminosäuren nicht betroffen. Diese Deletionsmutante wurde für die Analyse der Bindungsfähigkeit verschiedener TGA-Transkriptionsfaktoren generiert. Für den C-Terminus von Tabak NPR1 konnte hinsichtlich dieser Deletion bereits im Vorfeld gezeigt werden, dass sowohl die Deletion mit vollständigem C-Terminus NtNPR1cT(386/588) als auch die Deletion mit den fehlenden 63 Aminosäuren NtNPR1Δ1cT(386/525) in Hefe eine Salicylsäure-abhängige Transkriptionsaktivität aufweisen und in der Lage sind, unabhängig von Salicylsäure NtTGA7 zu binden (Stos-Zweifel *et al.*, 2018). Weiterhin interagieren NtTGA1a, NtTGA2.1, NtTGA2.2 und NtTGA10 in Anwesenheit von Salicylsäure schwach mit der Deletionsmutante NtNPR1cT(386/588), während diese TGA-Transkriptionsfaktoren nicht mehr an NtNPR1Δ1cT(386/525) binden können.

Im nachfolgenden Versuch wurde die Deletion im Kontext der NIMIN-Bindedomänen-Deletionsmutante NtNPR1Δ1(466/525) untersucht (Abb.10A). Mittels eines Hefe-Drei-Hybrid-Versuchs sollte geprüft werden, ob TGA-Transkriptionsfaktoren an die assoziierten C-terminalen Domänen LENRV(386/465) und NIMIN-BindedomäneΔ1(466/525) von NtNPR1 binden können. Zuvor wurde bereits für die NIMIN-Bindedomäne mit vollständigem C-Terminus NtNPR1(466/588) gezeigt, dass alle zur Verfügung stehenden TGA-Transkriptionsfaktoren in diesem System eine erhöhte Reportergenaktivität aufweisen (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung).

Abbildung 10 zeigt, dass die C-terminalen Domänen LENRV(386/465) und NIMIN-Bindedomäne Δ1(466/525) in Anwesenheit von Salicylsäure trotz der fehlenden 63 Aminosäuren in Hefe assoziieren. Entsprechend dem deletierten C-Terminus NtNPR1Δ1cT(386/525) sind diese assoziierten C-terminalen Domänen allerdings nur noch in der Lage, mit NtTGA7 zu interagieren. Die Reportergenaktivität der Interaktionen mit NtTGA1a, NtTGA2.1, NtTGA2.2 und NtTGA10 erhebt sich nicht über die Transkriptionsaktivität beider assoziierten C-terminalen Domänen (Abb.10B). Trotz der fehlenden 63 Aminosäuren am Ende des C-Terminus von NPR1, bleibt dieser weitgehend funktionell. Wesentliche Interaktionen, wie die Assoziation der C-terminalen Domänen und die Bindung von NtTGA7 sind weiterhin gewährleistet.

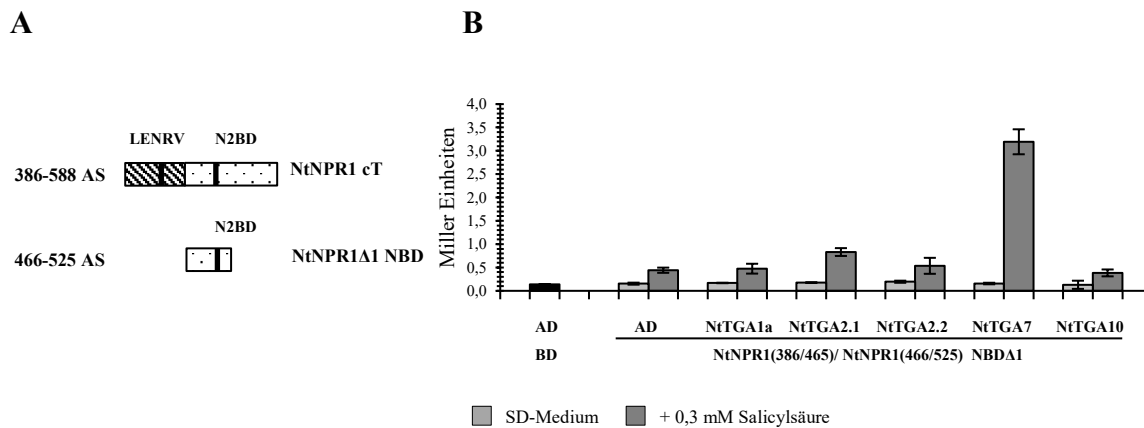


Abb.10 Assoziation von Tabak NPR1(386/465) und NPR1Δ1(466/525) und die Bindung von Tabak TGA-Transkriptionsfaktoren in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR1Δ1(466/525). (B) Interaktion von NtNPR1Δ1(466/525) mit NtNPR1(386/465) und TGA-Transkriptionsfaktoren in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtNPR1Δ1(466/525)*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*.

4.1.2.2 NtNPR1 R431F

Der C-Terminus von NPR1 spielt eine wesentliche Rolle in der Wahrnehmung von Salicylsäure. In *Arabidopsis thaliana* wurde mehrmals unabhängig voneinander eine *npr1* Mutante identifiziert, welche nicht mehr auf die Behandlung mit den Salicylsäureanalogen BTH und INA ansprach und einen Defekt im SAR-Signalweg aufwies. Die *nim1-4* Mutante trägt an der Position 432 im C-Terminus von NPR1 einen Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin (Ryals *et al.*, 1997; Canet *et al.*, 2010). Das Arginin an der Position 432 im LENRV-Motiv ist dabei essentiell für die Wahrnehmung von Salicylsäure. Durch die Mutation R432K verliert NPR1 sämtliche Salicylsäure-abhängigen Eigenschaften. Dies gilt nicht nur für *Arabidopsis* NPR1, sondern ebenso für Tabak NPR1. Allerdings wird bei *Arabidopsis* NPR1 R432K und Tabak NPR1 R431K weder die Akkumulation des Proteins noch die Interaktionsfähigkeit mit TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen in Hefe beeinträchtigt (Maier *et al.*, 2011; D.Neeley&U.M.Pfzner, persönliche Mitteilung). Bei der NtNPR1 R431F Mutante handelt es sich um eine Variation der NtNPR1 R431K Mutante. Hierbei wurde das Arginin statt mit einem Lysin mit einem Phenylalanin getauscht. Im Weiteren sollte geprüft werden, ob sich die Variation NtNPR1 R431F entsprechend der *nim1-4* Mutante in Tabak verhält.

Durch die Mutation R431F verliert der C-Terminus von NtNPR1(386/588) (Abb. 11A) sowohl seine basale als auch seine Salicylsäure-induzierte Transkriptionsaktivität (Abb. 11B). Die Fähigkeit des C-Terminus, TGA-Transkriptionsfaktor NtTGA7 zu binden, wird durch diesen Aminosäureaustausch ebenfalls unterbunden (Abb. 11C). Die Bindung von NtNIMIN2a an den C-Terminus von Tabak NPR1 wird nicht beeinträchtigt, jedoch ist diese Interaktion nicht mehr Salicylsäure-sensitiv (Abb. 11D). Des Weiteren verlieren die C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne durch den Austausch des Arginins zu Phenylalanin an der Position 431 ihre Salicylsäure-induzierbare Affinität

zueinander, interagieren aber dennoch geringfügig spontan miteinander (Abb. 11E). Der C-Terminus und die LENRV-Domäne von NtNPR1 R431F verhalten sich im Hefe-Zwei-Hybridsystem sehr ähnlich wie der C-Terminus und die LENRV-Domäne von NtNPR1 R431K (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Beide Deletionen verlieren durch die Mutation ihre Salicylsäure-abhängigen Eigenschaften. Ferner ist der C-Terminus nicht mehr in der Lage, NtTGA7 zu binden.

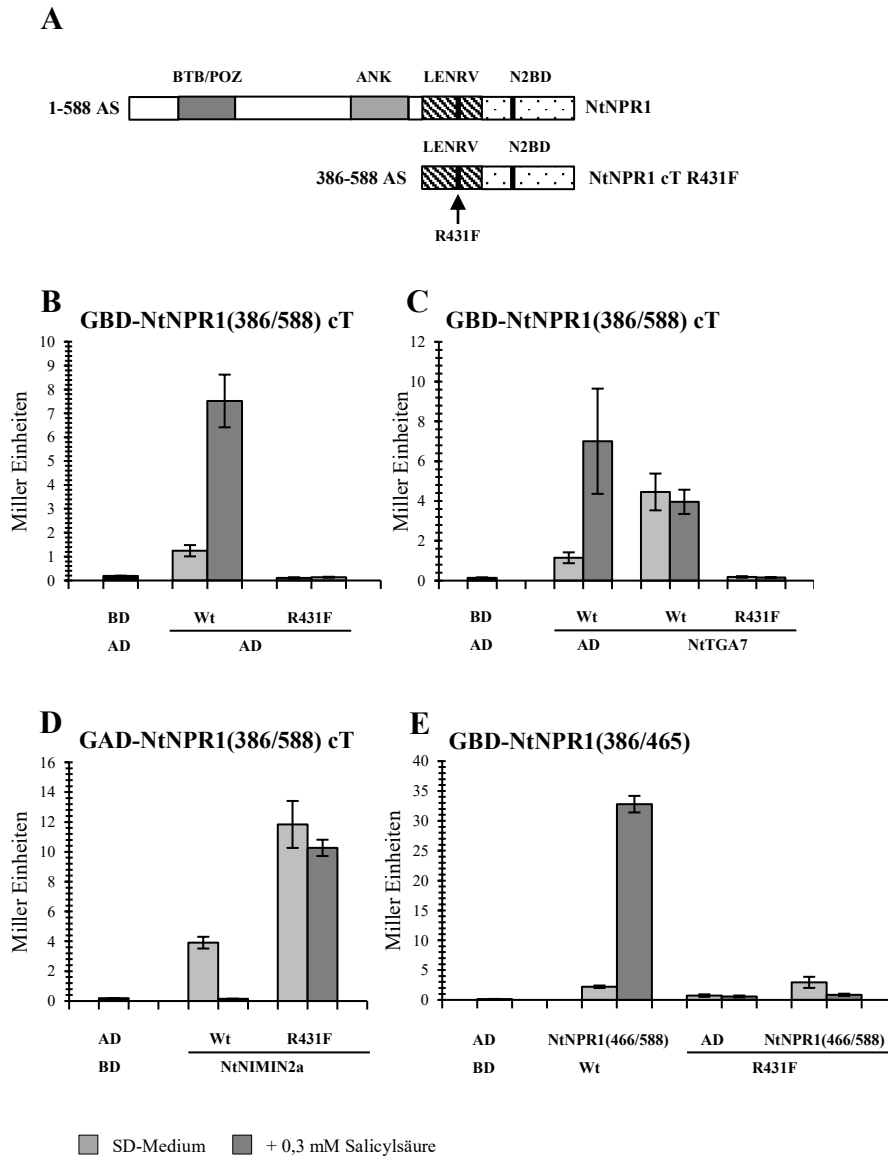


Abb. 11 Einfluss von R431F in Tabak NPR1 auf die Interaktion mit NtNIMIN2a und NtTGA7 und die Salicylsäure-induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen LENRV und NIMIN-Bindedomäne in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR1 R431F (386/588). (B) Transkriptionsaktivität von GAL4BD-NtNPR1(386/588) und GAL4BD-NtNPR1(386/588) R431F in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe (Y2H). (C) Interaktion von NtNPR1(386/588) und NtNPR1(386/588) R431F mit NtTGA7 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe (Y2H). (D) Interaktion von NtNPR1(386/588) und NtNPR1(386/588) R431F mit NtNIMIN2a in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe (Y2H). (E) Interaktion von NtNPR1(386/465) und NtNPR1(386/465) R431F mit NtNPR1(466/588) in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe (Y2H).

4.1.2.3 NtNPR1 R491K

Im Zuge der Analyse von Arabidopsispflanzen nach Behandlung mit einem Mutagen wurden mehrere Pflanzen identifiziert, welche ein verstärktes Wachstum nach Behandlung mit BTH aufwiesen. Innerhalb dieser verschiedenen Pflanzen konnte unter anderem auch eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin an Position 493 im NPR1-Protein identifiziert werden (Canet *et al.*, 2010). Die NIMIN-Bindedomäne wurde für Arabidopsis NPR1 im Bereich von Aminosäure 496 bis 512 kartiert. Das betroffene Arginin liegt unmittelbar vor dieser Domäne und ist bei NPR1-Proteinen verschiedener Pflanzenspezies konserviert. In Tabak NPR1 befindet sich das Arginin an Position 491 und ist ebenfalls nahe der NIMIN-Bindedomäne lokalisiert, welche in Tabak im Bereich zwischen Aminosäure 494 bis 510 kartiert wurde (Maier *et al.*, 2011). Aufgrund des konservierten Vorkommens innerhalb verschiedener Pflanzenspezies, der Nähe des Arginins zur NIMIN-Bindedomäne und der Insensitivität gegenüber BTH wurde diese Mutante im Tabakkontext im Hinblick auf ihre Interaktionsfähigkeit sowie Salicylsäure-Sensitivität weiter charakterisiert.

Bereits im Vorfeld konnte gezeigt werden, dass diese Mutation auf die Salicylsäure-induzierte Assoziation der beiden C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne keinen Einfluss hat. Die Assoziation findet weiterhin unter Einfluss von Salicylsäure statt. Ebenso verhält sich die C-terminale Deletionsmutante NtNPR1(386/588) R491K in Hinsicht auf die Transkriptionsaktivität und der Bindung von NtNIMIN2a ähnlich dem Wildtyp. Das heißt NtNPR1(386/588) R491K weist ein wildtyp-ähnliches Transaktivierungspotential auf und bindet auch NtNIMIN2a ähnlich dem Wildtyp. Die Bindung von NtNIMIN2a ist ebenfalls weiterhin Salicylsäure-sensitiv (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung).

Zusätzlich zu den bereits durchgeführten Versuchen wurde im Hefe-Drei-Hybrid-Experiment geprüft, ob TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteine an die assoziierten C-terminalen Domänen binden können. Wie in der Wildtyp-Situation können die C-terminalen Domänen trotz der Mutation R491K (Abb. 12A) durch NtNIMIN1-like in Abwesenheit von Salicylsäure assoziieren (Abb. 12B). Die C-terminalen Domänen können weiterhin einen funktionellen C-Terminus bilden. In Anwesenheit der TGA-Transkriptionsfaktoren ist eine Salicylsäure-induzierbare Verstärkung der Reportergenaktivität messbar. Die assoziierten Domänen sind im gleichen Maße wie das wildtypische Pendant in Anwesenheit von Salicylsäure in der Lage, sowohl den TGA-Transkriptionsfaktor NtTGA2.1 als auch NtTGA7 zu binden (Abb. 12C). Weder durch die zuvor durchgeführten Analysen noch durch das Hefe-Drei-Hybrid-Experiment konnten in Hefe wesentliche Unterschiede zwischen dem wildtypischen Tabak NPR1 und der Mutante NtNPR1 R491K in Hinsicht auf die biochemischen Eigenschaften festgestellt werden. Obwohl diese Mutante aufgrund ihrer Insensitivität gegenüber dem Salicylsäure-Analogen BTH *in planta* identifiziert wurde, kann in Hefen kein Effekt auf die Salicylsäure-Sensitivität von Tabak

NPR1 festgestellt werden. Die Mutante verhielt sich in allen durchgeführten Tests unauffällig und ähnlich dem wildtypischen Tabak NPR1-Protein.

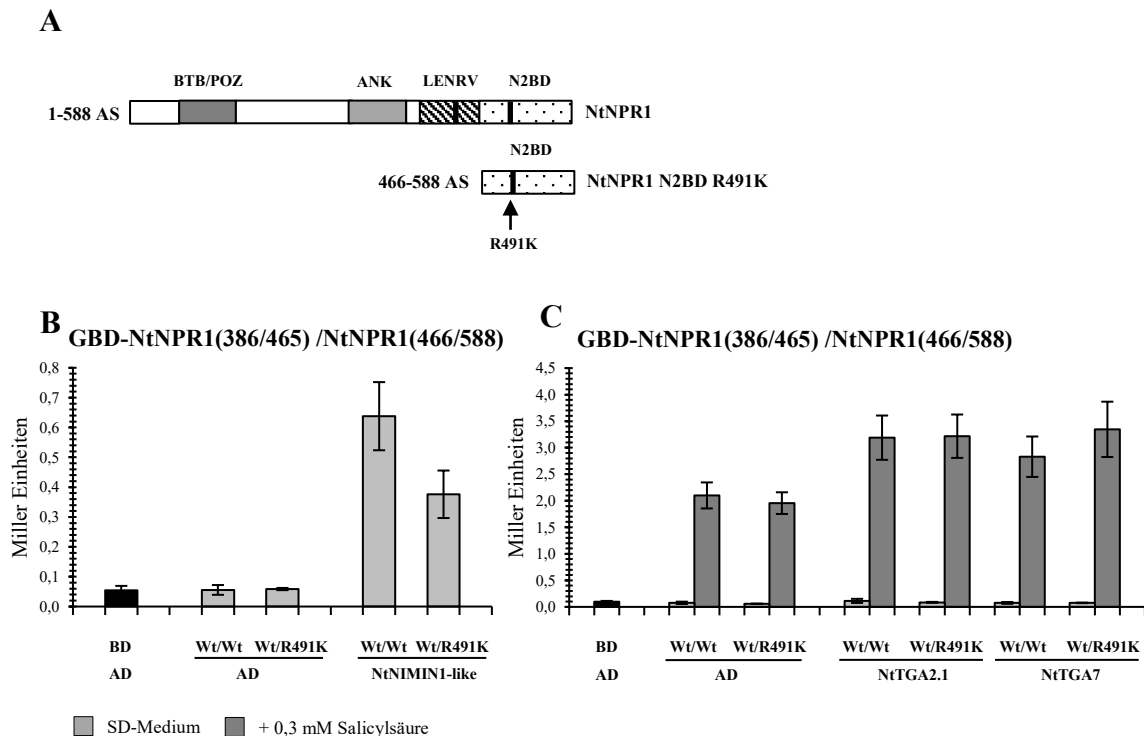


Abb. 12 Einfluss von R491K in Tabak NPR1 auf die Assoziation der C-terminalen Subdomänen LENRV und NIMIN-Bindedomäne im Zusammenhang mit NtNIMIN1-like, NtTGA2.1 und NtTGA7 in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR1 R491K (466/588). (B) Interaktion von NtNPR1(466/588) und NtNPR (466/588) R491K mit NtNPR1(386/465) und NtNIMIN1-like ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). (C) Interaktion von NtNPR1(466/588) und NtNPR1(466/588) R491K mit NtNPR1(386/465) und TGA-Transkriptionsfaktoren in An- und Abwesenheit von Salicylsäure in Hefe und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium (Y3H). *NtNPR1(466/588)*- und *NtNPR1(466/588)R491K*-Expression stehen unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*.

4.1.2.4 NtNPR1 H81Y

Die Wahrnehmung von Salicylsäure wird stark mit dem C-Terminus von NPR1 assoziiert. Interessanterweise konnte durch Analyse mutagen behandelter Arabidopsis Pflanzen von Canet und Mitarbeitern (2010) eine Mutante für NPR1 identifiziert werden, welche im N-Terminus einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Tyrosin aufweist. Diese Mutante wies ebenfalls ein verstärktes Wachstum nach BTH-Applikation auf. Der Aminosäureaustausch ist an Position 80 innerhalb der BTB/POZ-Domäne von Arabidopsis NPR1 lokalisiert. In Tabak NPR1 ist diese Domäne für die Dimerisierung wichtig und zusammen mit der Ankyrin-Domäne für die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren von Bedeutung (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Zur Analyse ihrer Eigenschaften wurde diese Mutation in den Tabakkontext eingeführt. Hier befindet sich der Aminosäureaustausch von Histidin zu Tyrosin an Position 81 (Abb. 13A).

Die Expression von NtNPR1 H81Y als GAL4BD-Fusion konnte in Hefezellen immunologisch mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 nachgewiesen werden. Das Fusionsprodukt weist ein Molekulargewicht

von 81 kDa auf (Abb. 13B). Aufgrund des Aminosäureaustausches in der BTB/POZ-Domäne verändern sich die biochemischen Eigenschaften von Tabak NPR1 in Hefe deutlich. Durch die Mutation ist Tabak NPR1 nicht mehr in der Lage, mit NIMIN-Proteinen zu interagieren, weder mit NtNIMIN1-like noch mit NtNIMIN2a (Abb. 13C). Dieses Ergebnis ist überraschend, da die Bindedomäne für NIMIN-Proteine im C-Terminus kartiert wurde (Maier *et al.*, 2011). Weiterhin wurde deutlich, dass die Interaktion zwischen NtNPR1 H81Y und NtTGA2.2 stark reduziert, jedoch nicht vollständig unterbunden wird. Die Fähigkeit, mit NtTGA7Δ(107/363) zu interagieren wird aufgrund dieser Mutation ebenfalls reduziert (Abb. 13D). Allerdings wird diese Interaktion nicht so drastisch beeinträchtigt wie im Fall von NtTGA2.2. Dieser Umstand ist vermutlich auf die exklusive Eigenschaft von NtTGA7 zurückzuführen, mit dem C-Terminus von NtNPR1 interagieren zu können (Stos-Zweifel *et al.*, 2018).

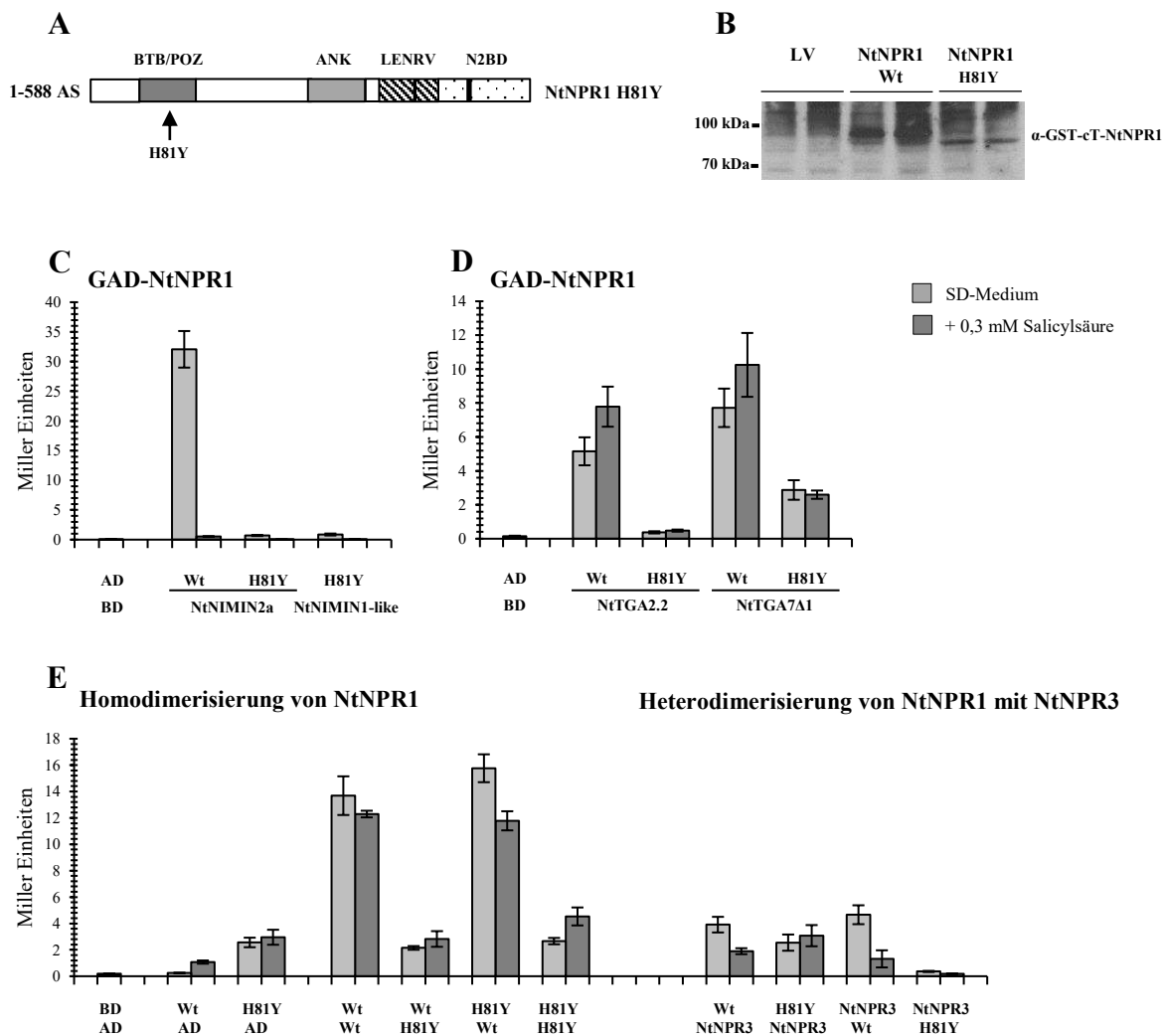


Abb. 13 Auswirkung von H81Y in Tabak NPR1 auf die Interaktionsfähigkeit in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR1 H81Y. (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-NtNPR1 (81 kDa) und GAL4-BD-NtNPR1 H81Y (81 kDa) mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (C) Test auf Interaktion zwischen NtNPR1 bzw. NtNPR1 H81Y und NIMIN-Proteinen. (D) Interaktion von NtNPR1 und NtNPR1 H81Y mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (E) Interaktion von NtNPR1, NtNPR1 H81Y und NtNPR3 mit NtNPR1, NtNPR1 H81Y und NtNPR3. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Die Transkriptionsaktivität von NtNPR1 H81Y ist im Gegensatz zum Wildtyp deutlich stärker, erfolgt spontan und ist gegenüber Salicylsäure insensitiv. Die Eigenschaft, Dimere zu bilden wurde durch die Mutation in der BTB/POZ-Domäne sehr stark reduziert. Überraschenderweise wurde dieser Effekt nur beobachtet, sobald sich NtNPR1 H81Y im pGAD424-Vektor befand. Diese Beobachtung trifft sowohl für die Homodimerisierung als auch für die Heterodimerisierung mit NtNPR3 zu (Abb. 13E).

4.1.2.5 NtNPR1 P341S

Zusätzlich zu der Mutante in der BTB/POZ-Domäne von Arabidopsis NPR1 konnte anhand der Analyse von mutagenbehandelten Arabidopsispflanzen eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin im zentralen Bereich von NPR1 identifiziert werden. Auch in diesem Fall reagierten die betreffenden Pflanzen nicht mit Wachstumsreduktion auf die Behandlung mit dem Salicylsäure-Analogon BTH. Der Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin befindet sich an der Position 342 innerhalb der Ankyrin-Domäne von NPR1 (Canet *et al.*, 2010). Die Ankyrin-Domäne von NPR1 wird in Arabidopsis in Zusammenhang mit der TGA-Transkriptionsfaktor-Interaktion gebracht (Zhang *et al.*, 1999). In Tabak spielt sie zusammen mit der N-terminalen BTB/POZ-Domäne ebenfalls eine Rolle bei der Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren (D.Neeley&U.M.Pfzner, persönliche Mitteilung). Das ausgetauschte Prolin befindet sich im Tabak NPR1 an Stelle 341. Zur Untersuchung der Wirkung dieser NPR1-Mutante in Tabak wurde diese in den Tabakkontext eingeführt (Abb. 14A).

Die Expression von NtNPR1 P341S als GAL4BD-Fusion konnte in Hefezellen immunologisch mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 nachgewiesen werden. Das Fusionsprodukt weist ein Molekulargewicht von 81 kDa auf (Abb. 14B). Durch den Aminosäureaustausch ist NtNPR1 P341S im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage, NIMIN-Proteine zu binden. Weder NtNIMIN1-like noch NtNIMIN2a interagieren mit der Mutante (Abb. 14C). Zuerst scheint dieses Ergebnis überraschend, da die NIMIN-Bindedomäne im C-Terminus von NPR1 kartiert wurde (Maier *et al.*, 2011) und sich die Mutation in der Ankyrin-Domäne im zentralen Bereich des Proteins befindet. Allerdings ist es durchaus möglich, dass durch den Austausch des Prolins zu Serin die biochemischen Eigenschaften sowie die Konformation des Proteins drastisch verändert werden. Prolin hat einen starken Einfluss auf die Sekundärstruktur von Proteinen. Aufgrund der Unfähigkeit, Wasserstoffbrücken ausbilden zu können und der zyklischen Struktur, werden helikale Strukturen unterbrochen und die Konfiguration des Proteins wird starr. Serin wirkt sich wiederum völlig anders auf die Sekundärstruktur aus. Deshalb ist es möglich, dass dieser Aminosäureaustausch besonders schwerwiegende Folgen hat. Weiterhin hebt sich die Transkriptionsaktivität von NtNPR1 P341S kaum noch vom allgemeinen Hintergrund des Messsystems ab. Auch die Interaktionsfähigkeit mit TGA-Transkriptionsfaktoren ist erheblich eingeschränkt. Dennoch ist eine schwache Reportergenaktivität über die geringe Transkriptionsaktivität hinaus bei den verwendeten TGA-Transkriptionsfaktoren NtTGA2.1, NtTGA2.2 und NtTGA7 messbar

(Abb. 14D). Die Ausbildung von Dimeren ist dennoch weiterhin möglich, wenn auch deutlich eingeschränkt. Die Voraussetzung ist jedoch, dass es sich bei einem der Interaktionspartner der Homodimerisierung um ein wildtypisches NPR1-Protein handelt. Die Heterodimerisierung mit NtNPR3 ist ebenfalls noch möglich, allerdings ist auch diese im Vergleich zur Wildtyp-Situation deutlich reduziert (Abb. 14E).

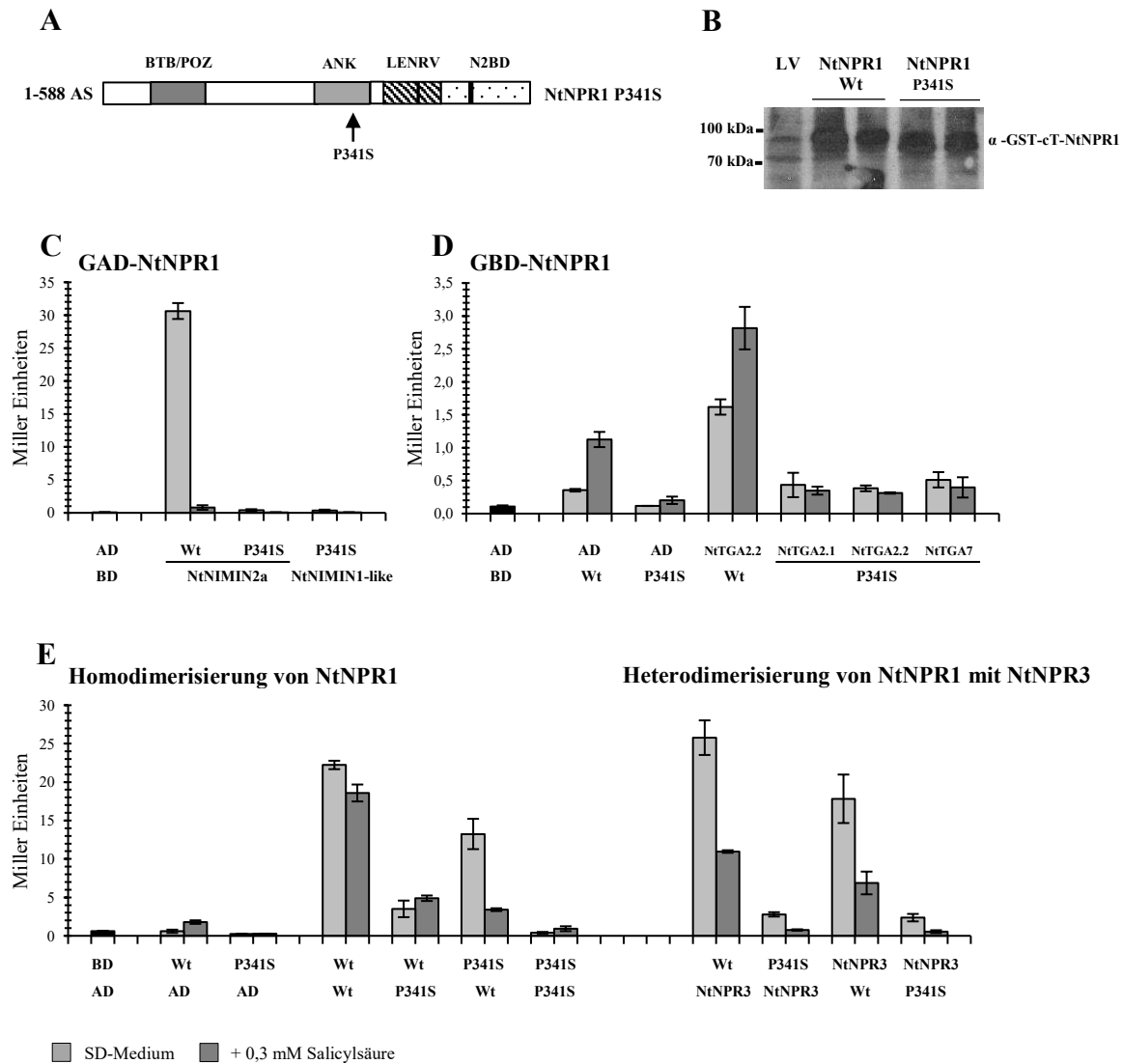


Abb. 14 Auswirkung von P341S in Tabak NPR1 auf die Interaktionsfähigkeit in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR1 P341S. (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-NtNPR1 (81 kDa) und GAL4-BD-NtNPR1 P341S (81 kDa) mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (C) Test auf Interaktion zwischen NtNPR1 bzw. NtNPR1 P341S und NIMIN-Proteinen. (D) Interaktion von NtNPR1 und NtNPR1 P341S mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (E) Interaktion von NtNPR1, NtNPR1 P341S und NtNPR3 mit NtNPR1, NtNPR1 P341S und NtNPR3. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.1.3 Mutanten von Tabak NPR3

Tabak NPR3 ist ein weiteres Mitglied der NPR-Proteinfamilie, ein Paralog von NtNPR1. NtNPR3 reagiert ebenfalls sensitiv auf die Anwesenheit von Salicylsäure. Zwischen Tabak NPR1 und NPR3 gibt es Ähnlichkeiten, aber auch Unterschiede im Hinblick auf die biochemischen Eigenschaften beider Proteine. Beispielsweise können beide NPR-Proteine mit NIMIN-Proteinen Salicylsäure-abhängig interagieren. Ebenso ist die TGA-Transkriptionsfaktorbindung beiden gemein. Allerdings ist diese Bindung bei NtNPR3 moderat Salicylsäure-sensitiv, was bei NtNPR1 nicht zu beobachten ist. Dafür weist NtNPR1 ein Transaktivierungspotential in Hefen auf, welches durch Salicylsäure verstärkt wird. Tabak NPR3 hingegen besitzt keine Transaktivierungsaktivität in Hefe. Zur näheren Charakterisierung von Tabak NPR3 hinsichtlich der Salicylsäure-Sensitivität und NIMIN-Proteinbindung wurden dafür ähnliche Mutanten wie für Tabak NPR1 generiert.

4.1.3.1 NtNPR3 R435K

Tabak NPR3 besitzt eine ähnliche Domänenstruktur wie NPR1. Neben der BTB/POZ-Domäne und der Ankyrin-Domäne im N-terminalen beziehungsweise zentralen Bereich des Proteins, verfügt es ebenso über die konservierte NIMIN-Bindedomäne sowie das hochkonservierte LENRV-Motiv im C-Terminus. Das Arginin innerhalb des LENRV-Motivs von NPR1 ist dabei essentiell für Wahrnehmung von Salicylsäure (Maier *et al.*, 2011). Entsprechend der *nim1-4* Mutante in Arabidopsis NPR1 und der *nim1-4* Mutante in Tabak NPR1 wurde eine Mutante mit einem Aminosäureaustausch von Arginin zu Lysin im LENRV-Motiv von NPR3 generiert. Mit Hilfe von NtNPR3 R435K sollte die Salicylsäure-Sensitivität von NPR3 genauer charakterisiert werden (Abb. 15A).

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Test konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von NPR3 trotz des Aminosäureaustauschs R435K ohne Beeinträchtigung NIMIN1-like weiterhin binden kann. Allerdings verliert die Bindung durch die Mutation ihre Salicylsäure-Sensitivität. Die Interaktion von NtNPR3 mit NtNIMIN1-like wird durch Salicylsäure nicht mehr negativ beeinflusst (Abb. 15B). Im Volllängenkontext wird die Interaktion zwischen den NIMIN-Proteinen NtNMIN2a und NtNIMIN1-like und NtNPR3 R435K ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die Bindung verliert jedoch auch hier die für diese Protein-Protein-Interaktion charakteristische Salicylsäure-Sensitivität (Abb. 15C). Des Weiteren ist in Bezug auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an NPR3 durch die Mutation R435K ebenfalls keine Beeinträchtigung zu beobachten. Allerdings wird die moderate negative Wirkung von Salicylsäure auf die Interaktion von NPR3 und NtTGA2.2 durch die Mutation aufgehoben (Abb. 15D). Durch den Aminosäureaustausch R435K im LENRV-Motiv von NtNPR3 kann es ebenso wie NPR1 nicht mehr Salicylsäure wahrnehmen. Die Bindung von NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren an NPR3 wird dadurch aber nicht gestört. Das Arginin im LENRV-Motiv spielt auch in Tabak NPR3 eine essentielle Rolle bei der Wahrnehmung von Salicylsäure.

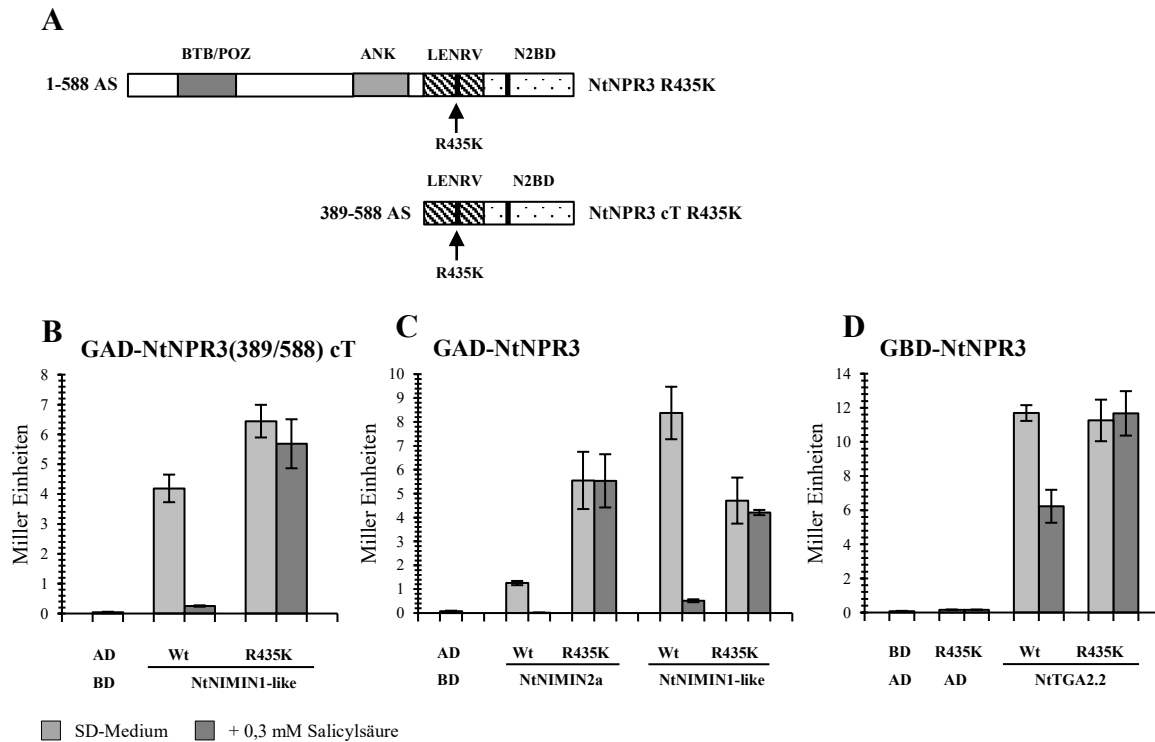


Abb. 15 Auswirkung von R435K in Tabak NPR3 auf die Interaktionsfähigkeit in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR3 R435K. (B) Interaktion von NtNPR3(389/588) und NtNPR3(389/588) R435K mit NtNIMIN1-like. (C) Interaktion von NtNPR3 und NtNPR3 R435K mit NIMIN-Proteinen. (D) Interaktion von NtNPR3 und NtNPR3 R435K mit NtTGA2.2. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.1.3.2 NtNPR3cT(389/588) Y508S F509S

Die Bindedomäne für NIMIN-Proteine wurde im C-Terminus von Tabak NPR1 im Bereich von Aminosäure 494 bis 510 kartiert. Die Bindung der NIMIN-Proteine kann durch den Austausch zweier Phenylalanine an den Aminosäurepositionen 505 und 506 zu Serinen unterbunden werden, ohne NPR1 hinsichtlich seiner weiteren biochemischen Eigenschaften in Hefe zu verändern. Auch in Arabidopsis NPR1 konnte mit der analogen Mutante AtNPR1 F507/508S die Bindung von NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen völlig unterbunden werden. Die NIMIN-Bindedomäne befindet sich bei Tabak NPR3 innerhalb des Bereiches von Aminosäure 497 bis 513. Aufgrund von Sequenzunterschieden handelt es sich in diesem Fall bei den entsprechenden Aminosäuren um ein Tyrosin und ein Phenylalanin an Position 508 und 509 (Maier *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2013). Analog zu der Mutante in NPR1 wurden die betreffenden Aminosäuren in NPR3 durch Serine ersetzt und so die Mutante NtNPR3 Y508S F509S erzeugt. Allerdings wurde diese Mutante vorerst lediglich im Kontext des C-Terminus von NPR3(389/588) generiert (Abb. 16A). Bei Protein-Protein-Interaktionstests in Hefe wurde deutlich, dass durch den Aminosäureaustausch Y508S F509S in der C-terminalen Deletionsmutante von Tabak NPR3 dieser im Gegensatz zum Wildtyp nicht mehr in der Lage ist, NtNIMIN2a zu binden (Abb. 16B).

Anhand der C-terminalen Deletionsmutante kann also festgestellt werden, dass auch im Fall von Tabak NPR3 diese Aminosäuren essentiell für die Bindung von NIMIN-Proteinen sind. Ob sich der Aminosäureaustausch Y508S F509S in Tabak NPR3 ebenso wie der Austausch FF505/506SS in Tabak NPR1 verhält und das NPR-Protein in seinen weiteren biochemischen Eigenschaften in Hefen nicht weiter beeinträchtigt, muss im Volllängenkontext weiter analysiert werden.

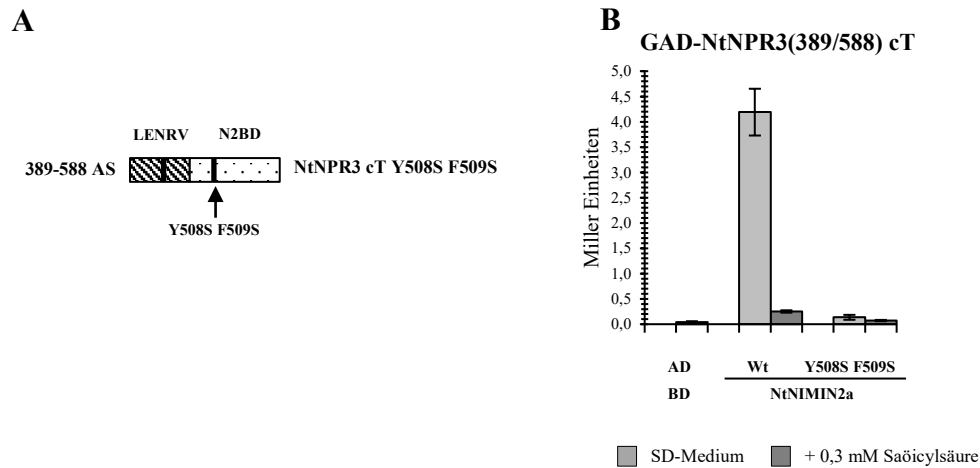


Abb. 16 Auswirkung von Y508S F509S in Tabak NPR3 auf die Bindung von NtNIMIN2a in Hefe. (A) Schematische Darstellung von NtNPR3 Y508S F509S (389/588). (B) Test auf Interaktion zwischen NtNPR3(389/588) bzw. NtNPR3(389/588) Y508S F509S und NtNIMIN2a im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure.

4.2 Charakterisierung von Arabidopsis NPR-Proteinen in Hefe

Zusätzlich zu *NPR1* beinhaltet das Genom von *Arabidopsis thaliana* noch fünf weitere Gene, die Ähnlichkeiten zu *NPR1* zeigen. Die NPR-Protein-Familie von Arabidopsis unterteilt sich in drei Gruppen. Arabidopsis NPR2 hat die größte Ähnlichkeit zu NPR1. Die Identität liegt hier bei 63,1%. AtNPR1 und AtNPR2 bilden eine Gruppe. Arabidopsis NPR3 und NPR4 bilden ebenfalls eine Gruppe. Die Ähnlichkeit zu AtNPR1 ist nicht mehr so stark ausgeprägt wie bei AtNPR2. Die Identität zu AtNPR1 liegt bei 34,5% für AtNPR3 beziehungsweise bei 36,0% für AtNPR4. Arabidopsis NPR3 und NPR4 weisen zueinander eine Identität von 72% auf. Eine weitere Gruppe besteht aus AtNPR5 und AtNPR6, welche auch unter den Namen BOP2 und BOP1 bekannt sind (Liu *et al.*, 2005). Die Beteiligung der *BLADE-ON-PETIOLE*-Gene bei der Salicylsäure-induzierten *PR1*-Genexpression im Rahmen der systemisch aktivierten Resistenz ist allerdings noch wenig untersucht worden und liegt nicht im Fokus dieser Arbeit.

Arabidopsis NPR2 wurde im Gegensatz zu den weiteren Paralogen von NPR1 bislang relativ wenig Beachtung geschenkt. Wie alle sechs Mitglieder der *NPR*-Genfamilie in Arabidopsis wird AtNPR2 konstitutiv exprimiert, dabei weist es allerdings die geringste Expressionsrate im Vergleich zu den anderen Mitgliedern auf. Am höchsten ist die Expression von *AtNPR2* in seneszentem Blattgewebe (Shi *et al.*, 2013). Die Domänenstruktur des Proteins ähnelt der von Arabidopsis NPR1 und ist AtNPR1, AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 gemein. Im N-terminalen und im zentralen Bereich befindet sich eine BTB/POZ-Domäne beziehungsweise eine Ankyrin-Domäne. Der C-Terminus beinhaltet ein LENRV-ähnliches Motiv und einen homologen Bereich zur hoch konservierten NIMIN-Bindedomäne von AtNPR1. Das LENRV-ähnliche Motiv ist in AtNPR2 YENRV und bei AtNPR3 und AtNPR4 LEKRV. Arabidopsis NPR3 und NPR4 können Salicylsäure mit verschiedenen Affinitäten binden und sind somit Rezeptoren für Salicylsäure (Fu *et al.*, 2012). Weiterhin sind beide Paraloge in der Lage, mit verschiedenen Mitgliedern der bZIP-TGA-Transkriptionsfamilie zu interagieren (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Für Arabidopsis NPR4 ist ferner bekannt, dass es in Hefe nicht mit NIMIN3 interagieren kann (Liu *et al.*, 2005).

Hinsichtlich der biochemischen Eigenschaften der Paralogen von Arabidopsis NPR1 ist relativ wenig bekannt. Aufgrund dessen erfolgen im folgenden Kapitel weitere vergleichende Charakterisierungen. Abbildung 17 gibt eine Übersicht über die verwendeten Teilkonstruktionen. Weitere mutante *NPR*-Gene wurden entweder durch Deletion oder *in vitro* Mutagenese erstellt. Die Aktivität der einzelnen Domänen der verschiedenen NPR-Proteine wurde im heterologen Hefesystem untersucht. Dies erfolgte im Hefe-Zwei-Hybridsystem (Y2H) und im Hefe-Drei-Hybridsystem (Y3H) basierend auf dem GAL4-aktivierbaren *lacZ*-Reportergen. Bei Untersuchungen des Einflusses von Salicylsäure auf Protein-Protein-Interaktionen wurde die Standardkonzentration von 0,3 mM eingesetzt.

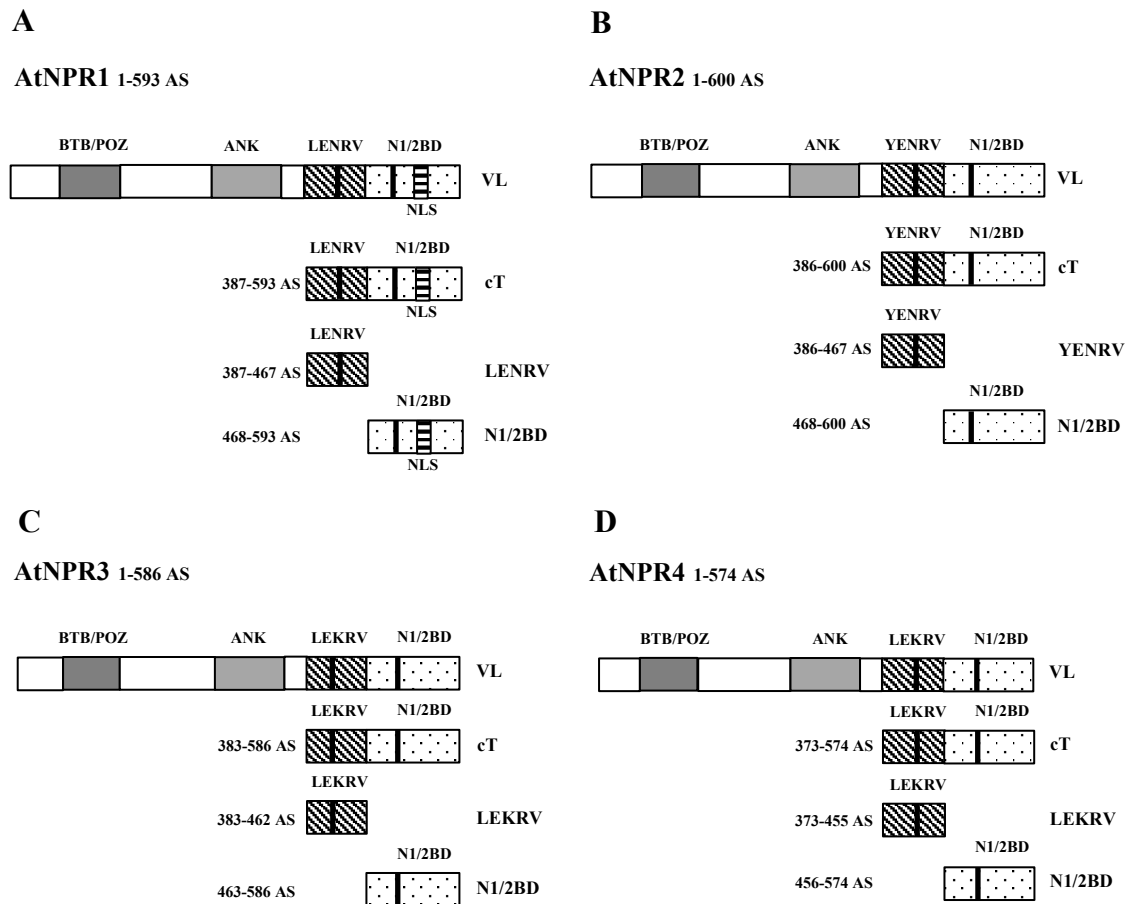


Abb. 17 Schematische Darstellung der verwendeten Teilstücke von Arabidopsis NPR1, NPR2, NPR3 und NPR4. (A) AtNPR1. Der Balken in der LENRV-Domäne stellt das LENRV-Motiv dar. Der Balken in der NIMIN1/2-Bindedomäne stellt den kartierten Bereich der NIMIN-Bindestelle dar. (B) AtNPR2. Der Balken in der YENRV-Domäne stellt das YENRV-Motiv dar. Der Balken in der NIMIN1/2-Bindedomäne stellt den homologen Bereich der NIMIN-Bindestelle zu NPR1 dar. (C) AtNPR3. Der Balken in der LEKRV-Domäne stellt das LEKRV-Motiv dar. Der Balken in der NIMIN1/2-Bindedomäne stellt den homologen Bereich der NIMIN-Bindestelle zu NPR1 dar. (D) AtNPR4. Der Balken in der LEKRV-Domäne stellt das LEKRV-Motiv dar. Der Balken in der NIMIN1/2-Bindedomäne stellt den homologen Bereich der NIMIN-Bindestelle zu NPR1 dar. VL, Volllänge; cT, C-Terminus; xExRV, xExRV-Domäne; N1/2BD, NIMIN1-NIMIN2-Bindedomäne.

4.2.1 Charakterisierung von Arabidopsis NPR1

Die identifizierten Mutanten aus der Analyse von mutagenbehandelten Arabidopsispflanzen von Canet und Mitarbeitern (2010) veränderten die biochemischen Eigenschaften von Tabak NPR1 und NPR3 im heterologen Hefesystem drastisch. Zur Prüfung auf etwaige ähnliche Veränderungen der Eigenschaften wurden die Mutanten auch in Arabidopsis NPR1 getestet. Ferner sollte die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR1 mit Hilfe von Deletionsmutanten näher charakterisiert werden.

4.2.1.1 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR1(387/596) und AtNPR1(1/467)

Arabidopsis NPR1 interagiert mit bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren. Es ist bekannt, dass die TGA-Transkriptionsfaktoren AtTGA2, AtTGA3, AtTGA6 und AtTGA7 an AtNPR1 binden (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Die zentrale Ankyrindomäne ist wichtig für die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren (Zhang *et al.*, 1999). Mit Hilfe der Deletionsmutanten AtNPR1(1/467) und AtNPR1(387/593) sollte nochmals die Wichtigkeit bestimmter Domänen von AtNPR1 für die TGA-Transkriptionsfaktorbindung analysiert werden (Abb. 18A).

Die Expression von AtNPR1(387/593) cT konnte als GAL4BD- und GAL4AD-Fusion in Hefezellen immunologisch mit dem Antikörper α -AtNPR1 nachgewiesen werden. Das Fusionsprodukt weist ein Molekulargewicht von 39 kDa beziehungsweise 36 kDa auf (Abb. 18B). In Abbildung 18C ist die normale Situation im Volllängenkontext dargestellt. AtNPR1 bindet die TGA-Transkriptionsfaktoren AtTGA2, AtTGA3 und AtTGA7 in Hefe. Diese Interaktion wird nur unwesentlich durch die Anwesenheit von Salicylsäure beeinflusst. Im Vergleich dazu ist die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren an die Deletion AtNPR1(1/467) deutlich schwächer, aber dennoch gewährleistet. Besonders deutlich wird dieser Effekt bei dem direkten Vergleich der Bindung von AtTGA2 an AtNPR1 und AtNPR1(1/467) (Abb. 18D). Wird nun anstelle von AtNPR1(1/467) AtNPR1(387/593) eingesetzt, können die TGA-Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden. Der C-Terminus von AtNPR1 reicht nicht als Bindeplattform für TGA-Transkriptionsfaktoren aus (Abb. 18E). Durch AtNPR1(1/467) wird deutlich, dass die 126 Aminosäuren am C-terminalen Ende, welche die NIMIN-Bindedomäne beinhalten, keine wesentliche Rolle bei der TGA-Transkriptionsfaktor-Bindung übernehmen.

In Tabak gibt es einen besonderen TGA-Transkriptionsfaktor. NtTGA7 bindet präferentiell an den C-terminalen Teil von Tabak NPR1 und hebt sich so von den weiteren Mitgliedern der TGA-Transkriptionsfaktorfamilie ab. Es ist bereits bekannt, dass NtTGA7 in Hefe auch mit Arabidopsis NPR1 interagieren kann (Stos-Zweifel *et al.*, 2018). Hier sollte nun getestet werden, ob diese Eigenschaft von NtTGA7 auch für den C-Terminus von Arabidopsis NPR1 zutrifft. Die Bindung von Arabidopsis NIMIN2 (Klon AtNIMIN2pA(20/122)) an den C-Terminus von AtNPR1 und die Interaktion von NtTGA7 mit dem C-Terminus von NtNPR1, welche als Kontrolle dienen, funktionieren einwandfrei. Allerdings kann NtTGA7 nicht an den C-Terminus von AtNPR1 binden. Hinsichtlich der Bindestelle von NtTGA7 unterscheiden sich die C-Termini von Arabidopsis NPR1 und Tabak NPR1 wesentlich (Abb. 18F).

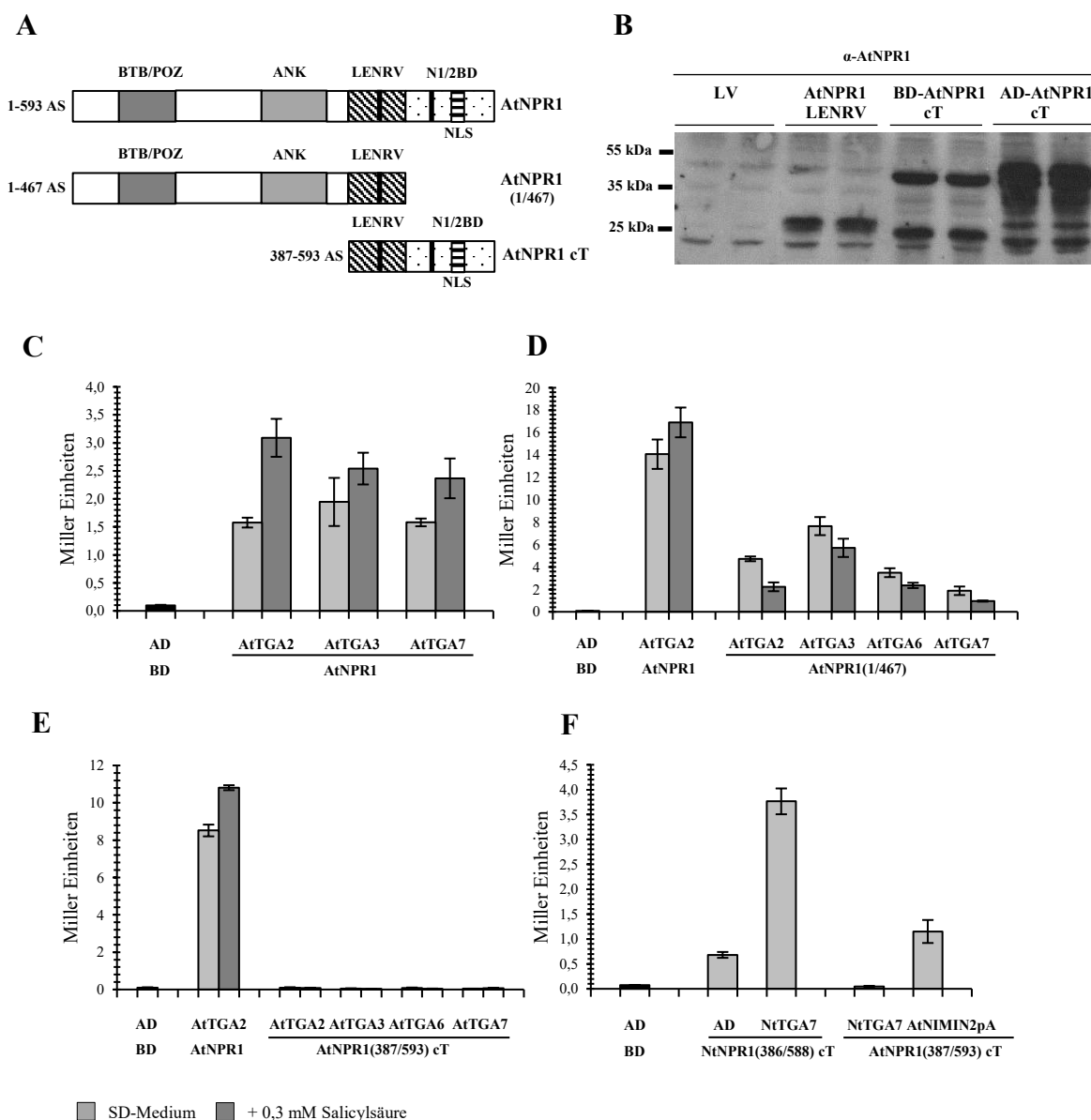


Abb. 18 Interaktion von Arabidopsis NPR1(1/467) und AtNPR1(387/593) mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (A) Schematische Darstellung von AtNPR1(1/467) und AtNPR1(387/593). (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-AtNPR1(387/467) LENRV (26 kDa), GAL4BD-AtNPR1(387/593) cT (39 kDa) und GAL4AD-AtNPR1(387/493) cT (36kDa) mit dem Antikörper α -AtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle diente die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (C) Interaktion von AtNPR1 mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (D) Interaktion von AtNPR1 mit AtTGA2 und AtNPR1(1/467) mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (E) Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 und AtTGA2 und zwischen AtNPR1(387/593) und TGA-Transkriptionsfaktoren. (F) Interaktion von NtNPR1(386/588) mit NtTGA7 und AtNPR1(387/593) mit NtTGA7 und AtNIMIN2pA(20/122). Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.2.1.2 AtNPR1 H80Y

Die BTB/POZ-Domäne ist für Protein-Protein-Interaktionen von Bedeutung. Innerhalb dieser Domäne an Position 80 konnte von Canet und Mitarbeitern (2010) bei Analysen mutagen behandelter Arabidopsis-Pflanzen ein Aminosäureaustausch von Histidin zu Tyrosin identifizieren (Abb. 19A). Diese betroffenen Pflanzen wiesen ein verstärktes Wachstum bei BTH-Behandlung auf. Im heterologen Hefesystem konnten für die analoge Mutation H81Y in Tabak NPR1 drastische Veränderungen der biochemischen Eigenschaften festgestellt werden. Die Fähigkeit zur Interaktion mit verschiedenen Proteinen wird durch diesen Aminosäureaustausch negativ beeinflusst. Im Folgenden sollte der Einfluss des Aminosäureaustauschs H80Y auf die biochemischen Eigenschaften von Arabidopsis NPR1 untersucht werden.

Die Expression von AtNPR1 H80Y konnte als GAL4BD- und GAL4AD-Fusion in Hefezellen immunologisch mit dem Antikörper α -AtNPR1 nachgewiesen werden. Das Fusionsprodukt weist ein Molekulargewicht von 81 kDa beziehungsweise 79 kDa auf (Abb. 19B). Aufgrund der Mutation in der BTB/POZ-Domäne des Arabidopsis NPR1-Proteins wird dessen Fähigkeit, an verschiedene Interaktionspartner zu binden, ebenfalls negativ beeinflusst. AtNPR1 ist nicht mehr in der Lage, mit NIMIN-Proteinen zu interagieren (Abb. 19C). Überraschenderweise wird dabei auch die Bindung von AtNIMIN1 und AtNIMIN2 vollständig inhibiert, obwohl die NIMIN1-NIMIN2-Bindedomäne in Arabidopsis NPR1 im C-Terminus im Bereich von Aminosäure 469 bis 512 des Proteins kartiert wurde (Maier *et al.*, 2011). Für AtNIMIN3 ist allerdings bekannt, dass dieses Mitglied der NIMIN-Proteinfamilie im N-terminalen Bereich von AtNPR1 bindet. AtNIMIN3 hat die Fähigkeit, noch an die Deletionsmutante AtNPR1(1/264) zu binden (Weigel *et al.*, 2001). Diese Deletionsmutante enthält die BTB/POZ-Domäne und endet vor der Ankyrin-Domäne. Hier könnte es durchaus möglich sein, dass sich die Mutation in der Binderegion von AtNIMIN3 befindet. Da die BTB/POZ-Domäne generell eine Plattform für Protein-Protein-Interaktionen ist, kann sich diese Mutation möglicherweise auch im Allgemeinen auf die Interaktionsfähigkeit der Proteine auswirken. Die entsprechende Mutation in Tabak NPR1 an Position 81 wirkt sich ähnlich negativ auf die Bindung von NIMIN-Proteinen wie in Arabidopsis NPR1 aus (4.1.2.4). Die Interaktion der NIMIN-Proteine wird auch in NtNPR1 H81Y völlig unterbunden. Zusätzlich zu der inhibierten NIMIN-NPR1-Interaktion ist bei AtNPR1 H80Y auch die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren betroffen. Die Interaktion wird dabei ohne Salicylsäure annähernd vollständig unterbunden, entsprechend der NIMIN-Protein-Interaktion mit AtNPR1 H80Y. In Anwesenheit von Salicylsäure wird die Intensität der Interaktion zwischen TGA-Transkriptionsfaktoren und AtNPR1 H80Y wesentlich gesteigert, ist aber dennoch im Vergleich zum wildtypischen AtNPR1 deutlich reduziert. Besonders gut ist die Reduktion der Interaktionsstärke im direkten Vergleich bei der Bindung von AtTGA2 mit AtNPR1 und AtNPR1 H80Y zu sehen (Abb. 19D). In Tabak NPR1 bewirkte der entsprechende Aminosäureaustausch ebenfalls eine deutliche Reduktion der Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an NPR1, welche im Fall von NtTGA2.2 noch stärker

ausgeprägt war. Allerdings konnte hier kein verstärkender Salicylsäure-Effekt beobachtet werden. Die Auswirkung des Aminosäureaustauschs in der BTB/POZ-Domäne auf die TGA-Transkriptionsfaktorbindung lässt vermuten, dass auch die BTB/POZ-Domäne neben der Ankyrin-Domäne (Zhang *et al.*, 1999) eine Bedeutung bei dieser Interaktion hat. Möglicherweise erfolgt die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren in Arabidopsis und Tabak NPR1 nicht über denselben Aminosäuresequenzbereich, sodass sich die Mutation in der BTB/POZ-Domäne in AtNPR1 nicht so stark auf die Interaktion mit den TGA-Faktoren auswirkt wie vergleichsweise in Tabak NPR1.

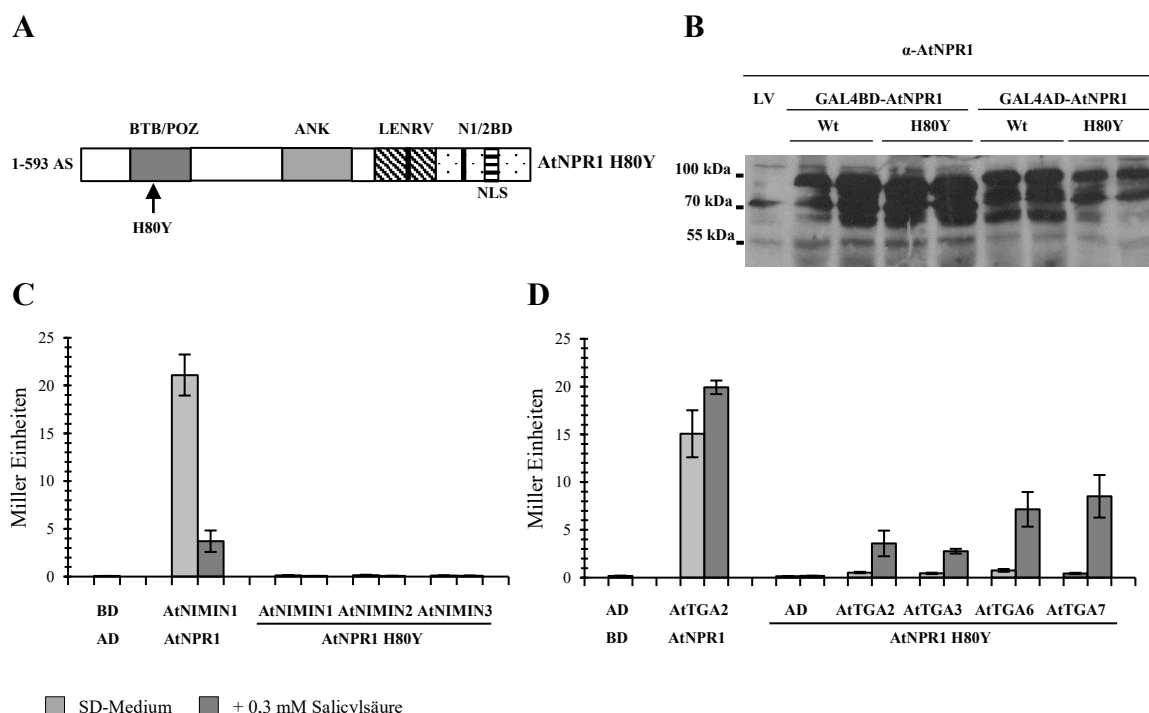


Abb. 19 Einfluss der Mutation H80Y in Arabidopsis NPR1 auf die Bindung von NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren. (A) Schematische Darstellung von AtNPR1 H80Y. (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-AtNPR1 (81 kDa), GAL4BD-AtNPR1 H80Y (81 kDa), GAL4AD-AtNPR1 (79 kDa) und GAL4AD-AtNPR1 H80Y (79 kDa) mit dem Antikörper α -AtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle diente die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (C) Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 bzw. AtNPR1 H80Y und NIMIN-Proteinen. (D) Interaktion von AtNPR1 und AtNPR1 H80Y mit TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.2.2 Charakterisierung von Arabidopsis NPR2

Bisher ist wenig über das Mitglied NPR2 der Arabidopsis NPR-Proteinfamilie bekannt, obwohl NPR2 die größte Ähnlichkeit zu NPR1 innerhalb der Proteinfamilie aufweist. Mittels dem heterologen Hefesystem sollten im Folgenden die biochemischen Eigenschaften von Arabidopsis NPR2 analysiert und charakterisiert werden und mit den bereits bekannten Eigenschaften der weiteren Mitglieder der NPR-Proteinfamilie verglichen werden.

4.2.2.1 Interaktion von NIMIN-Proteinen mit Arabidopsis NPR2

NIMIN1- und NIMIN2-Proteine binden an Arabidopsis und Tabak NPR1 sowie an das Tabak-NPR1-Paralog NPR3. Die Bindung erfolgt dabei an eine Domäne im C-terminalen Bereich der Proteine. Diese Domäne ist innerhalb der NPR-Proteinfamilie und verschiedener Pflanzenspezies hoch konserviert (Maier *et al.*, 2011). Arabidopsis NPR2 besitzt im C-terminalen Bereich eine dazu homologe Domäne. Im nachfolgenden Versuch sollte die Fähigkeit von AtNPR2 untersucht werden, NIMIN-Proteine zu binden. Zuerst wurde mit Hilfe einer C-terminalen Deletionsmutante AtNPR2(386/600) geprüft, ob die NIMIN-Proteine entsprechend der C-terminalen Deletionsmutante von AtNPR1 daran binden können (D.Neeley&U.M.Pfzner, persönliche Mitteilung; Abb. 20A). Der C-Terminus von Arabidopsis NPR2 ist nicht in der Lage, NIMIN1 und NIMIN2 zu binden. Weiterhin konnte in diesem Test gezeigt werden, dass der C-Terminus von AtNPR2 ebenso wie der von AtNPR1 keine Transaktivierungsaktivität aufweist (D.Neeley&U.M.Pfzner, persönliche Mitteilung; Abb. 20B). Im Volllängenkontext war Arabidopsis NPR2 allerdings auch nicht in der Lage, NIMIN-Proteine zu binden. Anders als AtNPR1 kann AtNPR2 weder mit AtNIMIN1 und AtNIMIN2 noch mit AtNIMIN3 interagieren (Abb. 20C). Im Hinblick auf die Interaktion von NIMIN1 und NIMIN2 war dies allerdings zu erwarten, da diese im Vorfeld schon nicht mit der C-terminalen Deletionsmutante interagieren konnten.

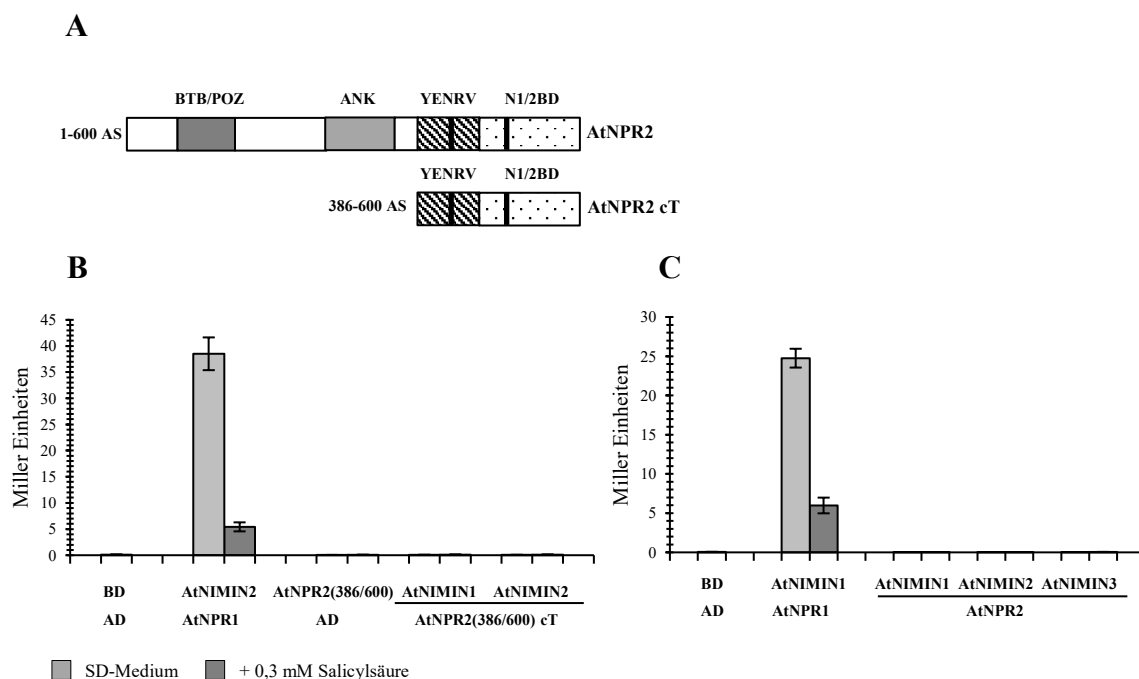


Abb. 20 Bindung von NIMIN-Proteinen an Arabidopsis NPR2. (A) Schematische Darstellung von AtNPR2(387/600) und AtNPR2. (B) Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 bzw. AtNPR2(387/600) cT mit NIMIN-Proteinen. (C) Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 bzw. AtNPR2 und NIMIN-Proteinen. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.2.2.2 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR2

bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren binden an Mitglieder der NPR-Proteinfamilie. Die Interaktion zwischen den TGA-Transkriptionsfaktoren und Arabidopsis NPR1 ist dabei weitgehend insensitive gegenüber Salicylsäure (Maier *et al.*, 2011). Hier sollte nun die Interaktionsfähigkeit von Arabidopsis NPR2 mit TGA-Transkriptionsfaktoren geprüft und charakterisiert werden.

Wie in Abbildung 21B zu sehen ist, binden TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II und III an Arabidopsis NPR2. Die Interaktion von AtNPR2 mit AtTGA2, AtTGA3, AtTGA6 und AtTGA7 erfolgt dabei spontan mit moderater Stärke. Anders als bei Arabidopsis NPR1 ist die Interaktion gegenüber der Anwesenheit von Salicylsäure sensitiv und wird dadurch erheblich intensiviert. Besonders groß ist dieser verstärkende Effekt unter Beteiligung von AtTGA7. Ebenfalls wie bei AtNPR1 ist bei Arabidopsis NPR2 keine Transaktivierungsaktivität in Hefe messbar.

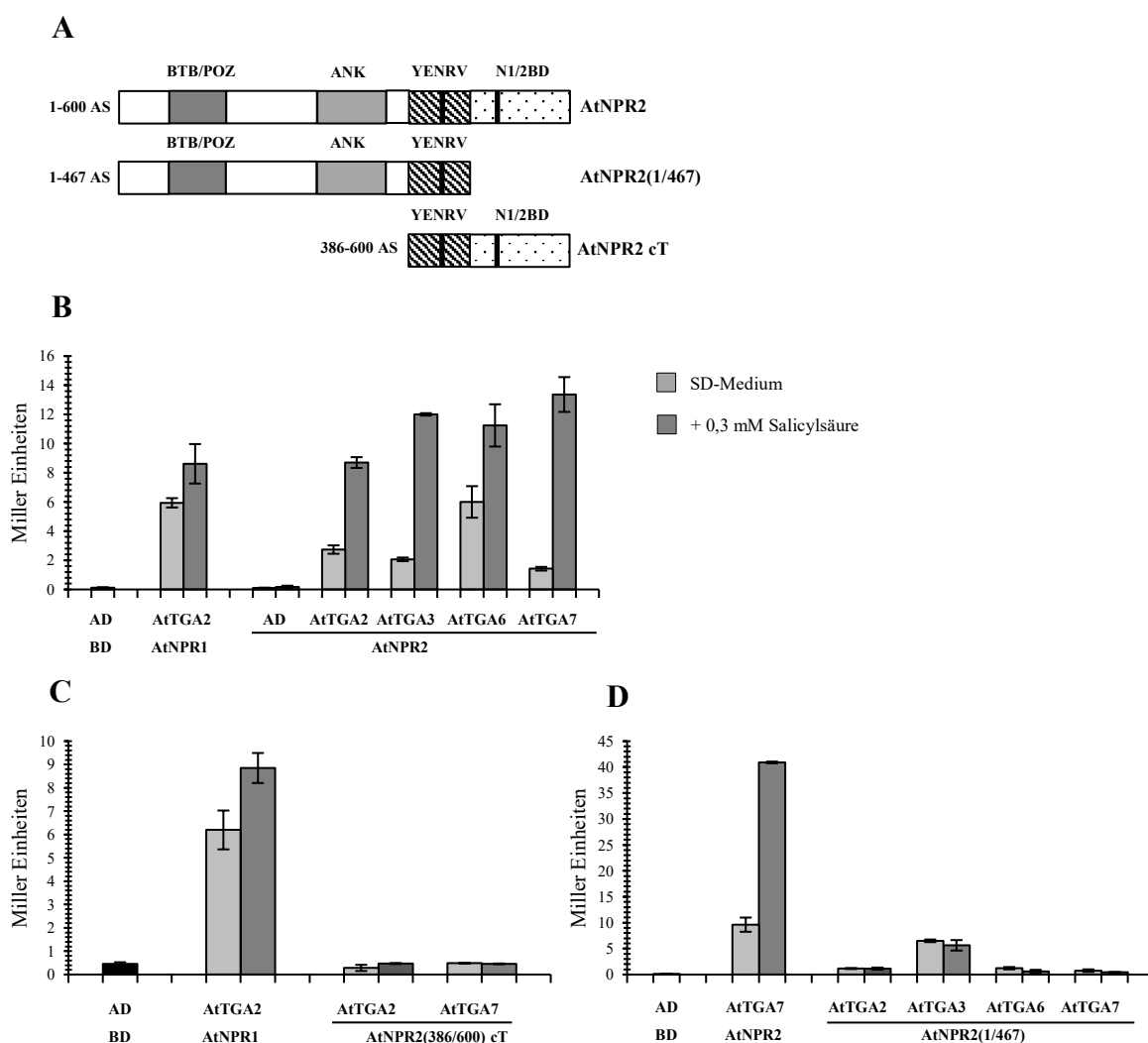


Abb. 21 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR2. (A) Schematische Darstellung von AtNPR2(386/600) cT und AtNPR2(1/467). (B) Interaktion von AtNPR1 und AtNPR2 mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (C) Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 bzw. AtNPR2(386/600) cT und TGA-Transkriptionsfaktoren. (D) Test auf Interaktion zwischen AtNPR2 und AtTGA7 bzw. AtNPR2(1/467) und TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Mit Hilfe zweier Deletionsmutanten sollte die Bindestelle der TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR2 näher charakterisiert werden. Die Deletion AtNPR2(386/600) umfasst dabei den C-terminalen Teil mit YENRV-Motiv und NIMIN-Bindedomäne. AtNPR2(1/467) beinhaltet neben der BTB/POZ-Domäne und der Ankyrin-Domäne noch das YENRV-Motiv. Die NIMIN-Bindedomäne fehlt hier (Abb. 21A). Ebenso wie bei AtNPR1 ist der C-Terminus von AtNPR2 nicht in der Lage, mit TGA-Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Abb. 21C). Die Deletionsmutante AtNPR2(1/467) hingegen bindet AtTGA2, AtTGA6 und AtTGA7 stark eingeschränkt. Lediglich die Bindung von AtTGA3 hebt sich davon ab und zeigt mehr Reportergenaktivität (Abb. 21D). Im Vergleich dazu ist die Interaktion von AtNPR1(1/467) mit den TGA-Transkriptionsfaktoren allgemein nicht so stark eingeschränkt wie bei AtNPR2. Aber auch hier ist die Bindung von AtTGA3 am stärksten innerhalb der verwendeten TGA-Transkriptionsfaktoren (Abb. 18D).

4.2.2.3 Affinität der C-terminalen Domänen YENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von Arabidopsis NPR2

Die C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von Tabak NPR1 zeigen in Hefe eine Salicylsäure-induzierbare Affinität zueinander. Für die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR1 konnte dies nicht nachgewiesen werden. Allerdings assoziieren die C-terminalen Domänen der Paralogen AtNPR3 und AtNPR4 in Anwesenheit von Salicylsäure miteinander (D.Neeley&U.M.Pfzner, persönliche Mitteilung). Mit Hilfe zweier Deletionskonstruktionen, AtNPR2(386/467) und AtNPR2(468/600), welche die jeweiligen Domänen enthalten, wurde die Affinität der C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR2 zueinander in Hefe untersucht (Abb. 22A).

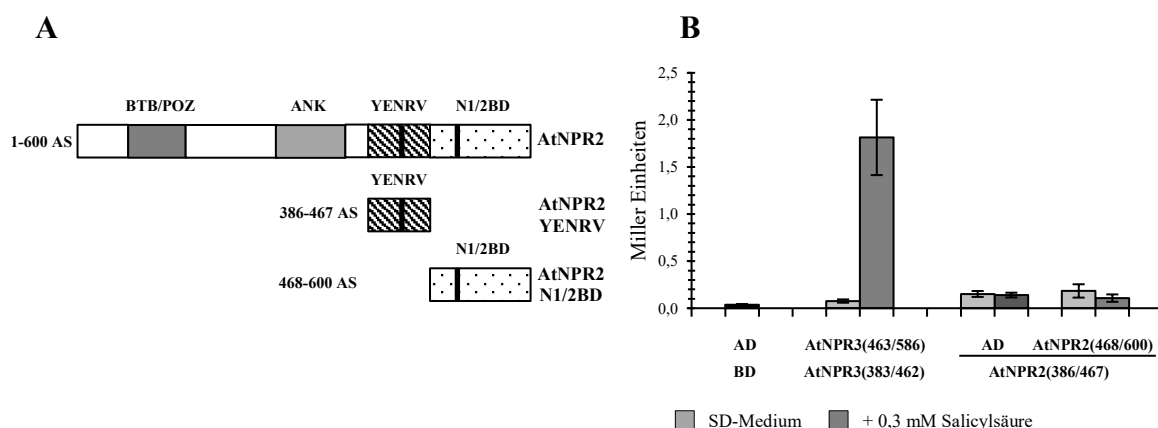


Abb. 22 Interaktion der beiden C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR2. (A) Schematische Darstellung der C-terminalen Domänen AtNPR2(386/467) und AtNPR2(468/600). (B) Test auf Interaktion zwischen AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) bzw. AtNPR2(386/467) und AtNPR2(468/600) im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure.

Wie in Abbildung 22B zu sehen ist, zeigen die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR2 weder eine spontane noch eine Salicylsäure-induzierbare Affinität zueinander. Die C-terminalen Domänen von NPR2 können ebenso wie die C-terminalen Domänen von NPR1 nicht assoziieren. Allerdings ist im

Gegensatz zu den LENRV- bzw. LEKRV-Domänen von Arabidopsis NPR1, NPR3 und NPR4 bei der YENRV-Domäne von NPR2 eine geringfügige Transaktivierungsaktivität messbar.

4.2.3 Charakterisierung von Arabidopsis NPR3

Arabidopsis NPR3 wurde im Zusammenhang mit der Degradierung von NPR1 als Salicylsäurerezeptor beschrieben (Fu *et al.*, 2012). Weiterhin ist bekannt, dass NPR3 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Interaktion treten kann. Im folgenden Abschnitt sollten die biochemischen Eigenschaften von NPR3 näher betrachtet werden.

4.2.3.1 Interaktion von Arabidopsis NPR3 mit NIMIN-Proteinen

Arabidopsis NPR3 enthält im C-Terminus einen homologen Bereich zur hoch konservierte NIMIN-Bindedomäne von Arabidopsis NPR1. Bisher konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus von AtNPR3 im Gegensatz zum C-Terminus von AtNPR1 nicht in der Lage ist, Arabidopsis NIMIN1 und NIMIN2 zu binden (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Nun sollte überprüft werden, ob diese Tatsache auch für das Volllängenprotein AtNPR3 zutrifft. Das Volllängenprotein kann ebenso wie der C-Terminus von AtNPR3 nicht mit AtNIMIN1 und AtNIMIN2 interagieren. Dies war aufgrund der Ergebnisse für den C-Terminus von AtNPR3 zu erwarten. AtNIMIN3, welches im N-terminalen Bereich von AtNPR1 bindet, kann allerdings ebenso wie AtNIMIN1 und AtNIMIN2 nicht an AtNPR3 binden. Arabidopsis NPR3 interagiert wie AtNPR2 nicht mit NIMIN-Proteinen in Hefe (Abb. 23).

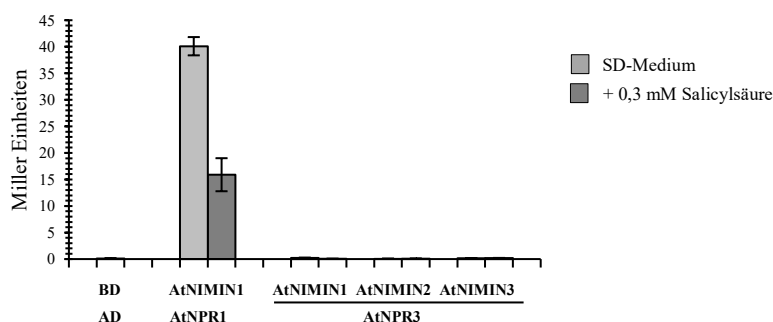


Abb. 23 Bindung von NIMIN-Proteinen an Arabidopsis NPR3. Interaktion von AtNIMIN1 mit AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtNPR3 und NIMIN-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure.

4.2.3.2 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR3

Arabidopsis NPR3 interagiert mit bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II und III in Hefe. Für AtTGA2, welcher zur Klasse II der TGA-Transkriptionsfaktoren gehört, konnte dies nicht nur in Hefen gezeigt werden, sondern auch mittels bimolekularer Fluoreszenzkomplementation in Zwiebelepidermiszellen und im Zellkern von Arabidopsis Mesophyllprotoplasten (Zhang *et al.*, 2006).

Allerdings wurde der mögliche Einfluss von Salicylsäure auf die Interaktion nicht untersucht. Dies sollte nun im folgenden Versuch analysiert werden.

Wie in den Abbildungen 24B und C zu sehen ist, ist die Bindung von AtTGA2, AtTGA3 und AtTGA7 an Arabidopsis NPR3 insensitiv gegenüber Salicylsäure, vergleichbar mit der Interaktion dieser TGA-Transkriptionsfaktoren mit AtNPR1 (4.2.1.1). Die Interaktion von AtNPR3 mit AtTGA6 scheint aber eine moderate Sensitivität aufzuweisen. Des Weiteren besitzt AtNPR3, wie AtNPR1 und AtNPR2 keine Transaktivierungsaktivität in Hefe. Mit Hilfe der Deletionsmutante AtNPR3(1/235) sollte der Bindebereich der TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR3 näher charakterisiert werden. Diese Mutante enthält nur die BTB/POZ-Domäne als wichtige Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Abb. 24A). Wie Abbildung 24D zeigt, ist die Deletion AtNPR3(1/235) nicht mehr in der Lage, mit TGA-Transkriptionsfaktoren zu interagieren. Die BTB/POZ-Domäne reicht nicht aus, um eine Interaktion zwischen AtNPR3 und TGA-Transkriptionsfaktoren zu gewährleisten. Das ist allerdings nicht sehr überraschend, da die zentral gelegene Ankyrin-Domäne bei dieser Deletionsmutante nicht mehr vorhanden ist. Die Ankyrin-Domäne wird als wichtig für die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an NPR-Proteine beschrieben (Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005).

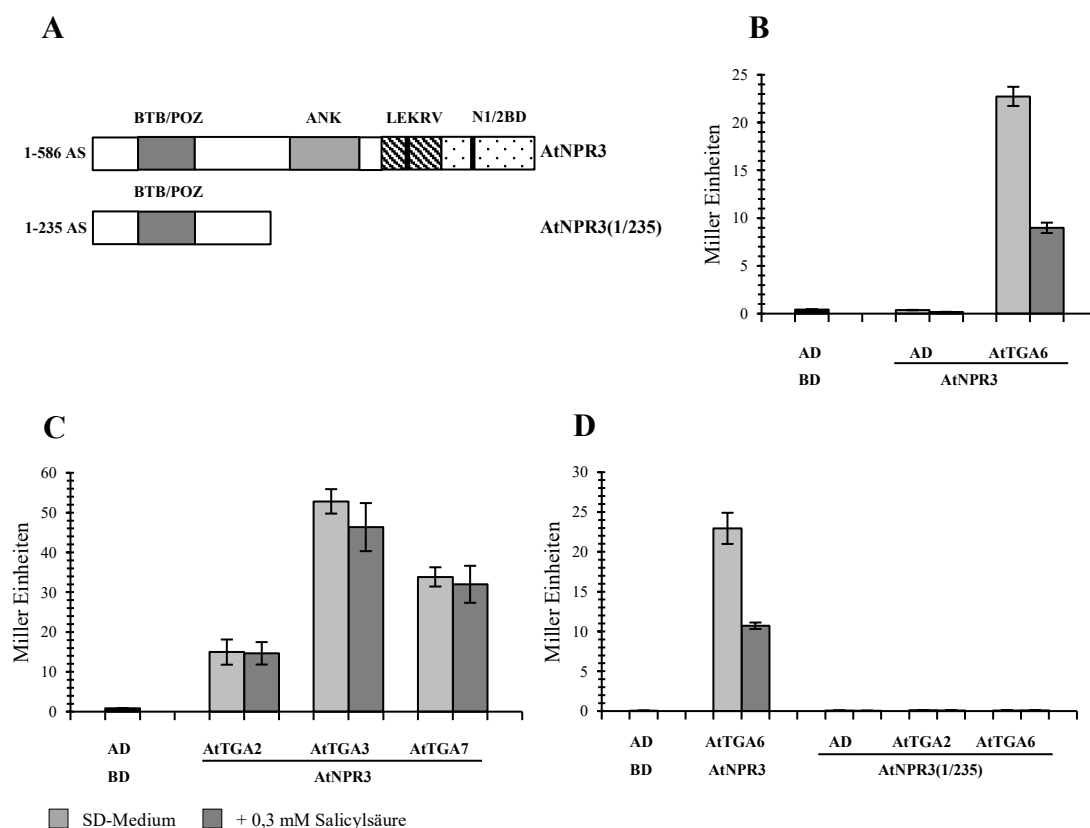


Abb. 24 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR3. (A) Schematische Darstellung von AtNPR3(1/235). (B) Interaktion von AtNPR3 mit AtTGA6. (C) Interaktion von AtNPR3 mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (D) Test auf Interaktion zwischen AtNPR3 bzw. AtNPR3(1/235) mit TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.2.4 Charakterisierung von Arabidopsis NPR4

Ebenso wie NPR3 wurde NPR4 als Salicylsäurerezeptor beschrieben (Fu *et al.*, 2012). Es ist weiterhin bekannt, dass NPR4 ebenfalls TGA-Transkriptionsfaktoren binden kann. Die Interaktionsfähigkeit von NPR4 mit TGA-Faktoren sowie weitere biochemische Eigenschaften des Proteins sollten in diesem Abschnitt näher untersucht werden.

4.2.4.1 Interaktion von NIMIN-Proteinen mit Arabidopsis NPR4

Arabidopsis NPR4 enthält im C-Terminus ebenso wie NPR2 und NPR3 einen homologen Bereich zur hoch konservierte NIMIN-Bindedomäne von Arabidopsis NPR1. Allerdings konnte in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt werden, dass der C-Terminus von Arabidopsis NPR4 ebenso wie der C-Terminus von AtNPR3 und AtNPR2 im Gegensatz zu dem C-Terminus von AtNPR1 NIMIN1 und NIMIN2 nicht binden kann (D.Neeley&U.M.Pfitzner, persönliche Mitteilung, 4.2.2.1). Im folgenden Versuch sollte analysiert werden, ob sich Arabidopsis NPR4 im Volllängenkontext entsprechend Arabidopsis NPR3 und NPR2 hinsichtlich der NIMIN-Proteininteraktion verhält.

Arabidopsis NPR4 ist analog zu den Paralogen NPR2 und NPR3 nicht in der Lage, mit den NIMIN-Proteinen NIMIN1 und NIMIN2 zu interagieren. Dies war hinsichtlich der fehlenden Interaktionsfähigkeit des C-Terminus von AtNPR4 mit NIMIN1 und NIMIN2 zu erwarten. Wie bereits für AtNPR4 beschrieben, kann NIMIN3 in diesem Versuch auch nicht an AtNPR4 binden (Abb. 25; Liu *et al.*, 2005). Die Fähigkeit mit NIMIN-Proteinen zu interagieren, bleibt innerhalb der Arabidopsis NPR-Proteine ausschließlich NPR1 vorbehalten.

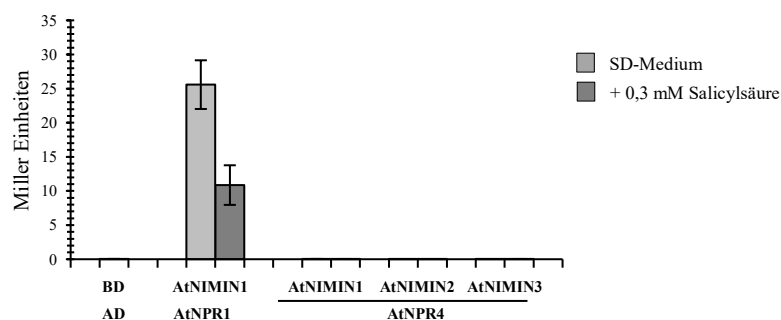


Abb. 25 Bindung von NIMIN-Proteinen an Arabidopsis NPR4. Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 bzw. AtNPR4 NIMIN-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure.

4.2.4.2 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR4

Ebenso wie die Mitglieder NPR1, NPR2 und NPR3 der Arabidopsis NPR-Proteinfamilie kann auch NPR4 mit TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). Der Einfluss von Salicylsäure auf diese Bindung wurde noch nicht untersucht. Wie in den Abbildungen 26B und C zusehen ist, ist die Interaktion von AtNPR4 mit AtTGA2, AtTGA3 und AtTGA6 insensitiv gegenüber Salicylsäure. Die Bindung von AtTGA7 hingegen weist eine geringfügige Sensitivität auf. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass AtNPR4 ebenso wie AtNPR1, AtNPR2 und AtNPR3 keine Transaktivierungsaktivität in Hefe aufweist (Liu *et al.*, 2005).

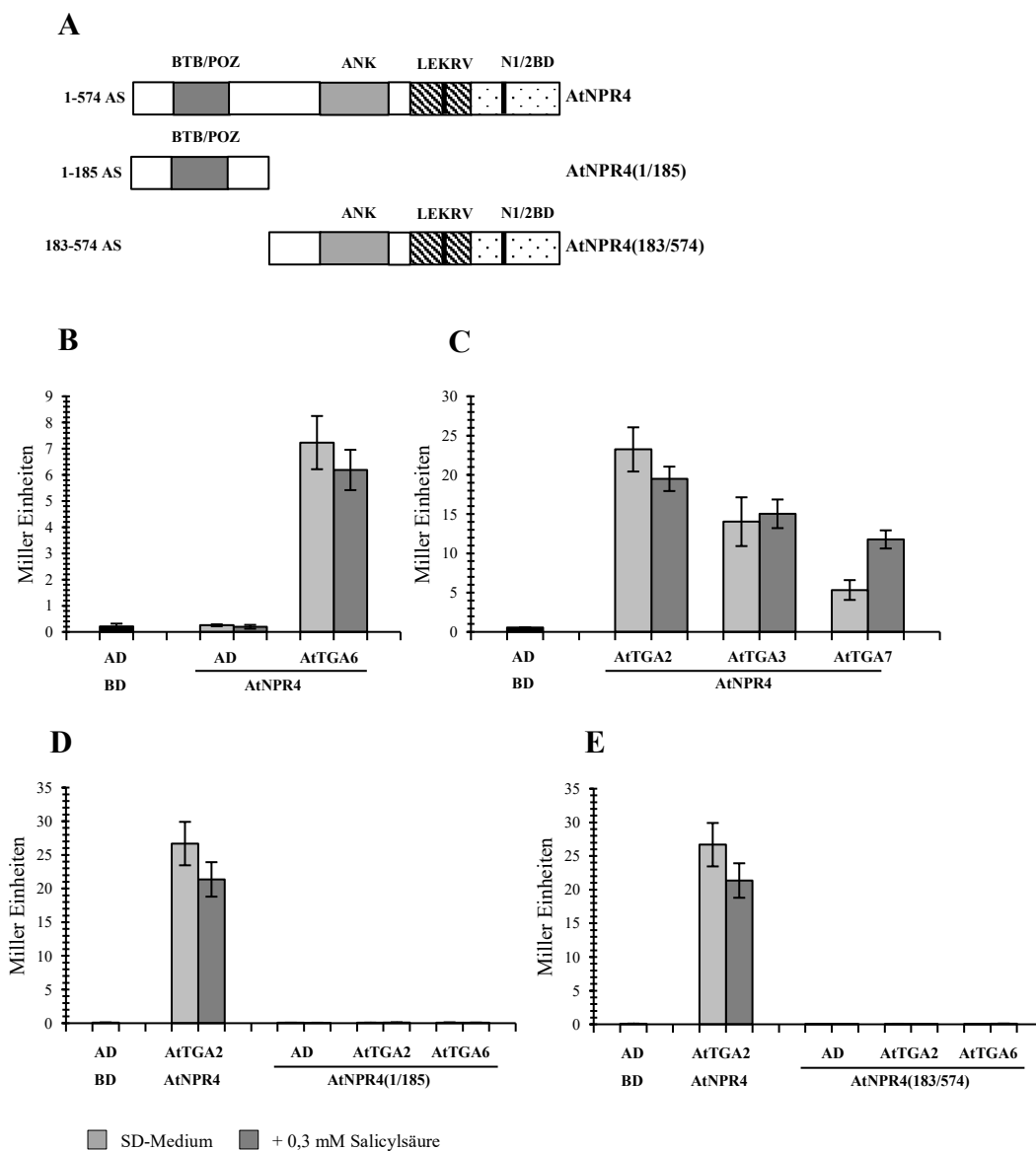


Abb. 26 Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR4. (A) Schematische Darstellung von AtNPR4(1/185) und AtNPR4(183/574). (B) Interaktion von AtNPR4 mit AtTGA6. (C) Interaktion von AtNPR4 mit TGA-Transkriptionsfaktoren. (D) Test auf Interaktion zwischen AtNPR4 bzw. AtNPR4(1/185) und TGA-Transkriptionsfaktoren. (E) Test auf Interaktion zwischen AtNPR4 bzw. AtNPR4(183/574) und TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridssystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

In der Studie von Liu und Mitarbeitern (2005) wird die Ankyrin-Domäne im zentralen Bereich von Arabidopsis NPR4 als notwendig für die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Mit Hilfe verschiedener Deletionsmutanten sollte die Bedeutung der Domänen innerhalb von AtNPR4 für die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren näher charakterisiert werden (Abb. 26A). Die Deletion AtNPR4(1/185) enthält lediglich noch die BTB/POZ-Domäne als bekannte Interaktionsdomäne. Die Interaktion von AtTGA2 und AtTGA6 ist hier nicht mehr möglich. Die BTB/POZ-Domäne allein von AtNPR4 ist kein adäquater Interaktionspartner für die TGA-Transkriptionsfaktoren (Abb. 26D). Die Deletion AtNPR4(183/574) beinhaltet die NIMIN-Binde-Domäne, das LEKRV-Motiv und die zentral gelegene Ankyrin-Domäne. Der N-Terminus und die BTB/POZ-Domäne fehlen hier. Die TGA-Transkriptionsfaktoren AtTGA2 und AtTGA6 können auch an diese Deletionsmutante nicht binden, obwohl diese die für die Bindung als wichtige beschriebene Ankyrin-Domäne enthält (Abb. 26E; Liu *et al.*, 2005). Für die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR-Proteine scheint neben der Ankyrin-Domäne ebenfalls die BTB/POZ-Domäne wie bei Tabak NPR1 wichtig zu sein (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung).

4.2.5 Zusammenspiel von Arabidopsis NPR-Proteinen, NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren in Hefe

Die Mitglieder AtNPR1, AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 der NPR-Proteinfamilie in Arabidopsis können mit verschiedenen bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren interagieren. Hierbei ist auffällig, dass diese jeweils mit demselben Spektrum der Mitglieder der TGA-Transkriptionsfaktoren in Interaktion treten. Dabei handelt es sich um bZIP-TGA-Transkriptionsfaktoren der Gruppen II und III. Diese beiden Gruppen sind neben Gruppe I in der Pathogenabwehr und der allgemeinen Stressantwort der Pflanzen involviert (Zhang *et al.*, 2003; Keserwani *et al.*, 2007; Shearer *et al.*, 2012; Gatz, 2013).

4.2.5.1 Bildung ternärer Komplexe mit Arabidopsis NPR-Proteinen in Hefe

Arabidopsis NPR1 bindet sowohl NIMIN-Proteine als auch TGA-Transkriptionsfaktoren. Diese Interaktionen können simultan erfolgen und Arabidopsis NPR1 kann zusammen mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse II ternäre Komplexe in Hefe bilden (Weigel *et al.*, 2001). Der Komplex aus NPR1, TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN1 ist in Anwesenheit von Salicylsäure instabil. Salicylsäure hat eine dissoziierende Wirkung auf diesen Komplex. Wenn NIMIN2 an der Bildung des ternären Komplexes beteiligt ist, reagiert dieser nicht auf Salicylsäure, obwohl Salicylsäure die Bindung von NIMIN2 an NPR1 negativ beeinflusst (Hermann *et al.*, 2013). Hierbei stellte sich nun die Frage, ob die Insensitivität gegenüber Salicylsäure möglicherweise konzentrationsabhängig ist und ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden muss. Ausgehend von der verwendeten Standardkonzentration von 0,3 mM wurde die Konzentration schrittweise bis zu einer Endkonzentration

von 1 mM erhöht. Die Endkonzentration war dabei der limitierende Faktor, da Salicylsäure sich ab etwa 1 mM negativ auf das Wachstum der Hefen auswirkt. Wie in Abbildung 27A zu sehen ist, haben die verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Stabilität des ternären Komplexes. Der Komplex aus NPR1-TGA2-NIMIN2 bleibt auch bei Konzentrationen von 1 mM weiterhin gegenüber Salicylsäure insensitiv. Ferner wurde untersucht, ob Arabidopsis NPR1 auch mit TGA-Transkriptionsfaktoren der Klasse III ternäre Komplexe in Hefe bilden kann. Hierfür wurden die TGA-Transkriptionsfaktoren AtTGA3 und AtTGA7 verwendet. Arabidopsis NPR1 bindet diese Faktoren im Hefe-Zwei-Hybridtest (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). AtNPR1 ist ebenso in der Lage, mit AtTGA3 und AtTGA7 ternäre Komplexe in Hefe zu bilden wie mit AtTGA2 und AtTGA6 (Weigel *et al.*, 2001). Die ternären Komplexe mit AtNIMIN1 sind weiterhin sensitiv gegenüber Salicylsäure, wohingegen die Komplexe unter Beteiligung von AtNIMIN2 ihre Stabilität gegenüber Salicylsäure beibehalten (Abb. 27B; Hermann *et al.*, 2013).

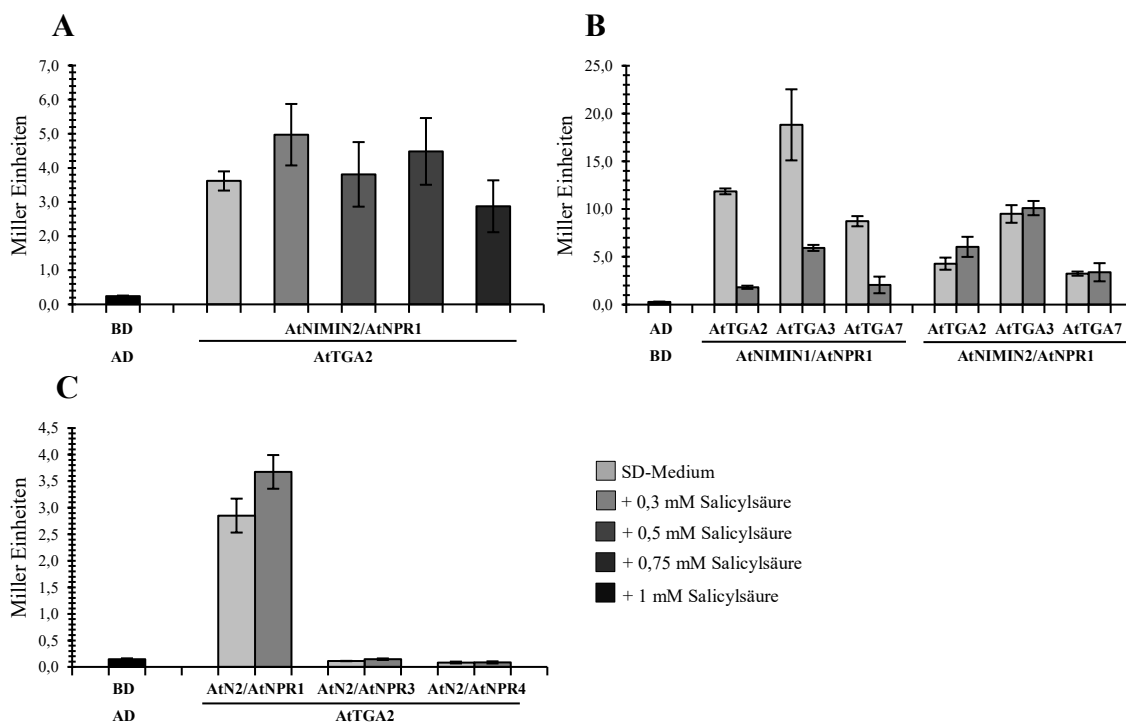


Abb. 27 Bildung und Stabilität ternärer Komplexe aus Arabidopsis NPR-Proteinen, TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen. (A) Interaktion von AtNIMIN2 und AtTGA2 in Anwesenheit von AtNPR1 und von Salicylsäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,5 mM, 0,75 mM und 1 mM in Hefe (Y3H). *AtNPR1*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*. (B) Interaktion von AtNIMIN1 bzw. AtNIMIN2 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von AtNPR1. *AtNPR1*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*. (C) Test auf Interaktion zwischen NIMIN2 und AtTGA2 in Anwesenheit von AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4. *AtNPR1*-, *AtNPR3*- und *AtNPR4*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*. Die Interaktionen fanden im Hefe-Drei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium statt.

Es ist bekannt, dass TGA-Transkriptionsfaktoren nicht mit NIMIN-Proteinen in Hefe interagieren (Weigel *et al.*, 2001). Die Paralogen NPR3 und NPR4 von Arabidopsis NPR1 können in Hefe keine Bindung mit NIMIN-Proteinen, aber mit TGA-Transkriptionsfaktoren eingehen (4.2.3; 4.2.4). Möglicherweise könnten aber Arabidopsis NPR3 und NPR4 in Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktoren zusammen mit NIMIN-Proteinen wie Arabidopsis NPR1 ternäre Komplexe

bilden. Dabei würden die TGA-Transkriptionsfaktoren eine Art Adapterrolle übernehmen. Um diese Annahme zu prüfen, wurde ein Hefe-Drei-Hybridtest mit den Arabidopsis NPR-Proteinen NPR1, NPR3 und NPR4, dem Transkriptionsfaktor AtTGA2 und AtNIMIN2 durchgeführt. Die Bildung eines Komplexes aus AtNPR1, AtTGA2 und AtNIMIN2 erfolgte einwandfrei und war auch in Anwesenheit von Salicylsäure stabil. Mit den Paralogen AtNPR3 und AtNPR4 war weder in Ab- noch in Anwesenheit von Salicylsäure eine Bildung ternärer Komplexe in Hefe möglich. Die Fähigkeit, ternäre Komplexe zu bilden, ist ebenso wie die Bindung von NIMIN-Proteinen für Arabidopsis NPR1 einzigartig (Abb. 27C).

4.2.5.2 Einfluss von NIMIN-Proteinen auf die Bindung von Arabidopsis NPR-Proteinen mit TGA-Transkriptionsfaktoren

Arabidopsis NPR1 besitzt die Fähigkeit, simultan TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteine zu binden. Es ist allerdings nicht bekannt, ob die Bindung des einen Interaktionspartners die Bindung des zweiten Interaktionspartners an AtNPR1 beeinflusst. Zunächst erfolgte die Analyse des Effekts von NIMIN-Proteinen auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR1. Die Interaktion von AtTGA2, AtTGA3 und AtTGA7 mit AtNPR1 wurde durch die Anwesenheit von AtNIMIN1, AtNIMIN2 und AtNIMIN3 eingeschränkt (Abb. 28). Der negative Einfluss der NIMIN-Proteine war in Anwesenheit von AtNIMIN1 am stärksten ausgeprägt gefolgt von AtNIMIN3. Der Effekt von AtNIMIN2 auf die Interaktion von AtNPR1 mit TGA-Transkriptionsfaktoren war am geringsten. Dieser Einfluss muss direkt mit der simultanen Bindung von NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR1 in Verbindung stehen, denn NIMIN-Proteine interagieren nicht mit Transkriptionsfaktoren in Hefe. Somit ist eine Art von Konkurrenz in dem Fall um die Bindung mit TGA-Transkriptionsfaktoren zwischen AtNPR1 und NIMIN-Proteinen als Erklärung für diesen Effekt ausgeschlossen. Der Einfluss der NIMIN-Proteine auf die AtNPR1-Transkriptionsfaktor-Interaktion war weitgehend unbeeinflusst von Salicylsäure, obwohl die Bindung und der ternäre Komplex mit

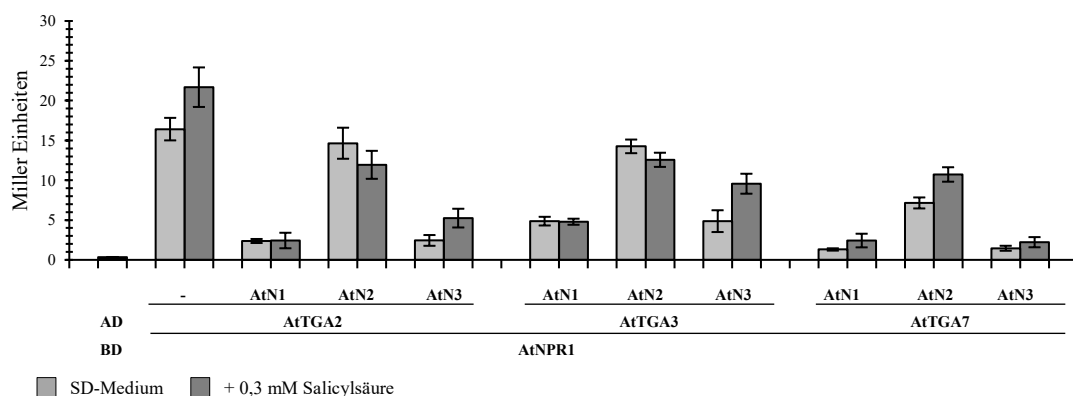


Abb. 28 Einfluss von NIMIN-Proteinen auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR1. Interaktion von AtNPR1 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von NIMIN-Proteinen. *AtNIMIN1*-, *AtNIMIN2*- und *AtNIMIN3*-Expression stehen unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*. Die Interaktionen fanden im Hefe-Drei-Hybridssystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium statt.

AtNIMIN1 instabil in Anwesenheit von Salicylsäure ist, die TGA-Transkriptionsfaktor-Bindung hingegen durch Salicylsäure nicht beeinflusst wird (Maier *et al.*, 2011; 4.2.1.1).

Wie bereits beschrieben, können die Paralogen AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 nicht mit NIMIN-Proteinen interagieren. Weiterhin können AtNPR3 und AtNPR4 keine ternären Komplexe in Hefe mit TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen bilden. Trotzdem sollte ein möglicher Einfluss von NIMIN-Proteinen auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an diese NPR-Proteine analysiert werden.

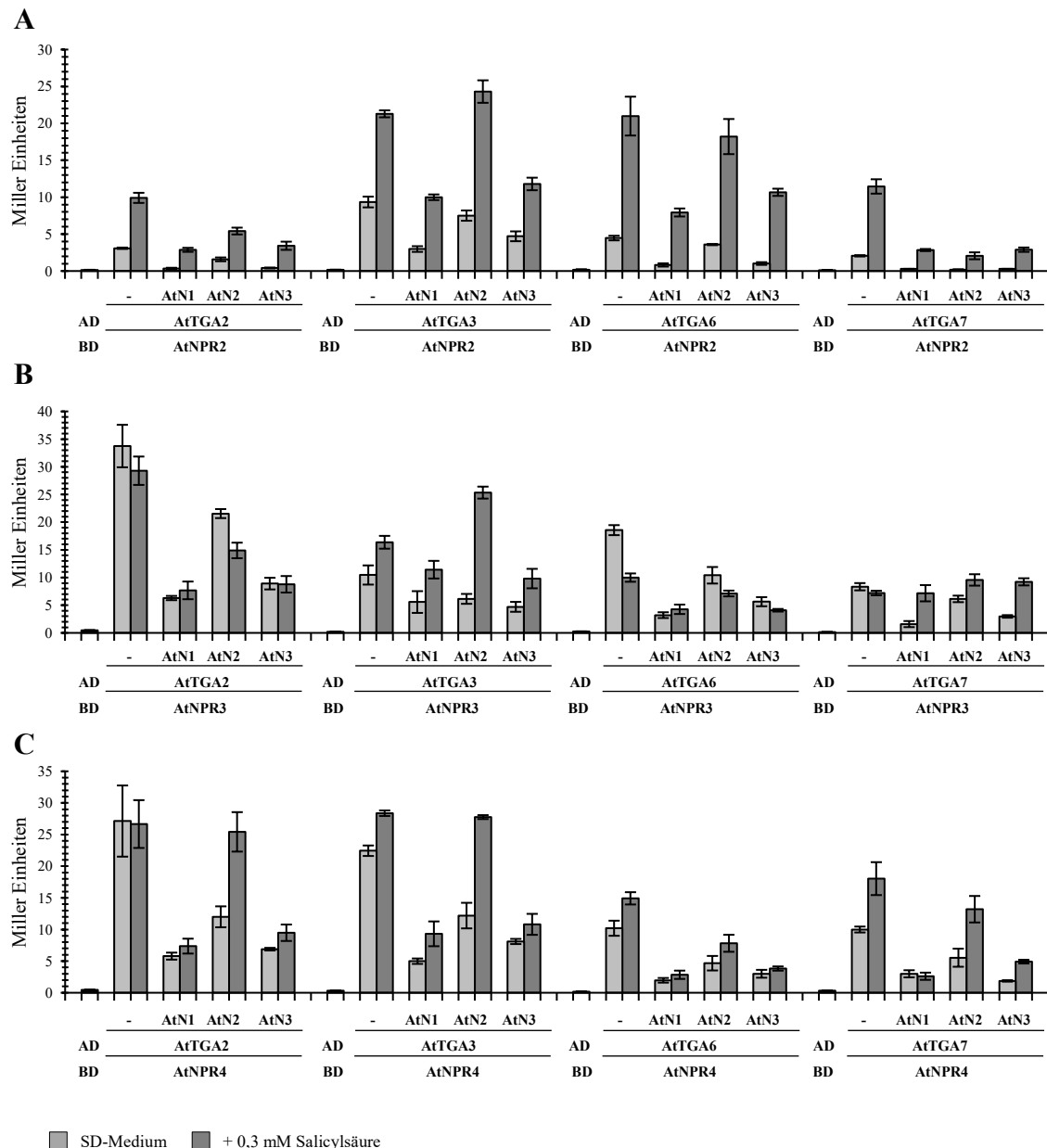


Abb. 29 Einfluss von NIMIN-Proteinen auf die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Arabidopsis NPR-Proteine. (A) Interaktion von AtNPR2 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von NIMIN-Proteinen. (B) Interaktion von AtNPR3 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von NIMIN-Proteinen. (C) Interaktion von AtNPR4 mit TGA-Transkriptionsfaktoren in Anwesenheit von NIMIN-Proteinen. *AtNIMIN1*-, *AtNIMIN2*- und *AtNIMIN3*-Expression stehen unter der Kontrolle von *Met25^{Pro}*. Die Interaktionen fanden im Hefe-Drei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium statt.

Überraschenderweise konnte auch hier eine Einschränkung der Interaktionsstärke zwischen TGA-Transkriptionsfaktoren und NPR-Proteinen in Anwesenheit von NIMIN-Proteinen gemessen werden. Die Salicylsäure-Sensitivität der Interaktion von AtNPR2 mit TGA-Transkriptionsfaktoren bleibt dabei erhalten. Auf die Bindung von AtTGA3 und AtTGA6 an AtNPR2 hat AtNIMIN2 anders als AtNIMIN1 und AtNIMIN3 keinen wesentlichen Effekt. Die Interaktion von AtNPR2 mit AtTGA2 und AtTGA7 wird hingegen durch alle verwendeten NIMIN-Proteinen negativ beeinflusst (Abb. 29A). Die Interaktion von Arabidopsis NPR3 mit TGA-Transkriptionsfaktoren erfährt durch die Anwesenheit der NIMIN-Proteine ebenso eine Einschränkung der Intensität. Die Bindung von AtNPR3 an AtTGA2 wird dabei durch AtNIMIN2 am geringsten beeinflusst und reagiert nicht auf Salicylsäure. Die Interaktion von AtTGA3 mit AtNPR3 wird ebenfalls durch NIMIN-Proteine eingeschränkt, erfährt aber durch Salicylsäure einen Interaktionsverstärkenden Effekt. Die Bindung von AtTGA6 an AtNPR3 wird wiederum durch NIMIN-Proteine negativ beeinflusst, allerdings ohne Salicylsäure-Effekt. Der negative Einfluss der NIMIN-Proteine auf die Interaktion zwischen AtNPR3 und AtTGA7 wird hingegen in Anwesenheit von Salicylsäure umgekehrt (Abb. 29B). Die Bindung zwischen Arabidopsis NPR4 und TGA-Transkriptionsfaktoren wird durch die Anwesenheit der NIMIN-Proteine eingeschränkt. Hierbei wird ungeachtet der beteiligten TGA-Transkriptionsfaktoren deutlich, dass AtNIMIN2 auch hier den geringsten Einfluss auf die Interaktion hat. Bei AtTGA2 und AtTGA3 kann dieser Effekt durch Anwesenheit von Salicylsäure umgekehrt werden. Dies trifft in gewisser Weise auch auf AtTGA7 zu (Abb. 29C). Obwohl NIMIN-Proteine nicht mit den Paralogen von Arabidopsis NPR1 interagieren und keine ternären Komplexe mit TGA-Transkriptionsfaktoren bilden können, beeinflussen sie die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren an die Paralogen negativ und schränken diese ein.

4.2.6 Dimerisierung von Arabidopsis NPR-Proteinen

Ein Modell der Salicylsäure-Wahrnehmung während der systemisch aktivierten Resistenz basiert auf der aktiven Beteiligung der Arabidopsis NPR1 Paralogen NPR3 und NPR4. Hierbei binden AtNPR3 und AtNPR4 jeweils Salicylsäure-abhängig an AtNPR1. Die paralogen NPR-Proteine fungieren als Adapterproteine für die Cullin3 E3 Ligase und gewährleisten so die Degradierung von AtNPR1 (Fu *et al.*, 2012).

4.2.6.1 Homo- und Heterodimerisierung der Arabidopsis NPR-Proteine

Laut der Studie von Fu und Mitarbeitern können die Mitglieder der NPR-Proteinfamilie von Arabidopsis Homo- und Heterodimere bilden. AtNPR1 und AtNPR3 sollen in Anwesenheit von Salicylsäure oder dem funktionellen Analog INA Heterodimere formen. Durch Salicylsäure wird die Heterodimerisierung von AtNPR1 und AtNPR3 gefördert, wohingegen die Dimerisierung zwischen AtNPR1 und AtNPR4 durch Anwesenheit von Salicylsäure gestört wird. Weiterhin können Arabidopsis AtNPR3 und AtNPR4

untereinander Homo- und Heterodimere in Gegenwart von Salicylsäure oder INA bilden. AtNPR1 selbst kann jedoch keine Homodimere bilden, allerdings kann AtNPR1 mit AtNPR2 unabhängig von Salicylsäure in Hefe interagieren. Die jeweiligen Dimerisierungsfähigkeiten der Arabidopsis NPR-Proteine wurden unter anderem im qualitativen Hefe-Zwei-Hybridtest nachgewiesen. In einem quantitativen Hefe-Zwei-Hybridtest sollten die Ergebnisse von Fu *et al.* (2012) überprüft werden.

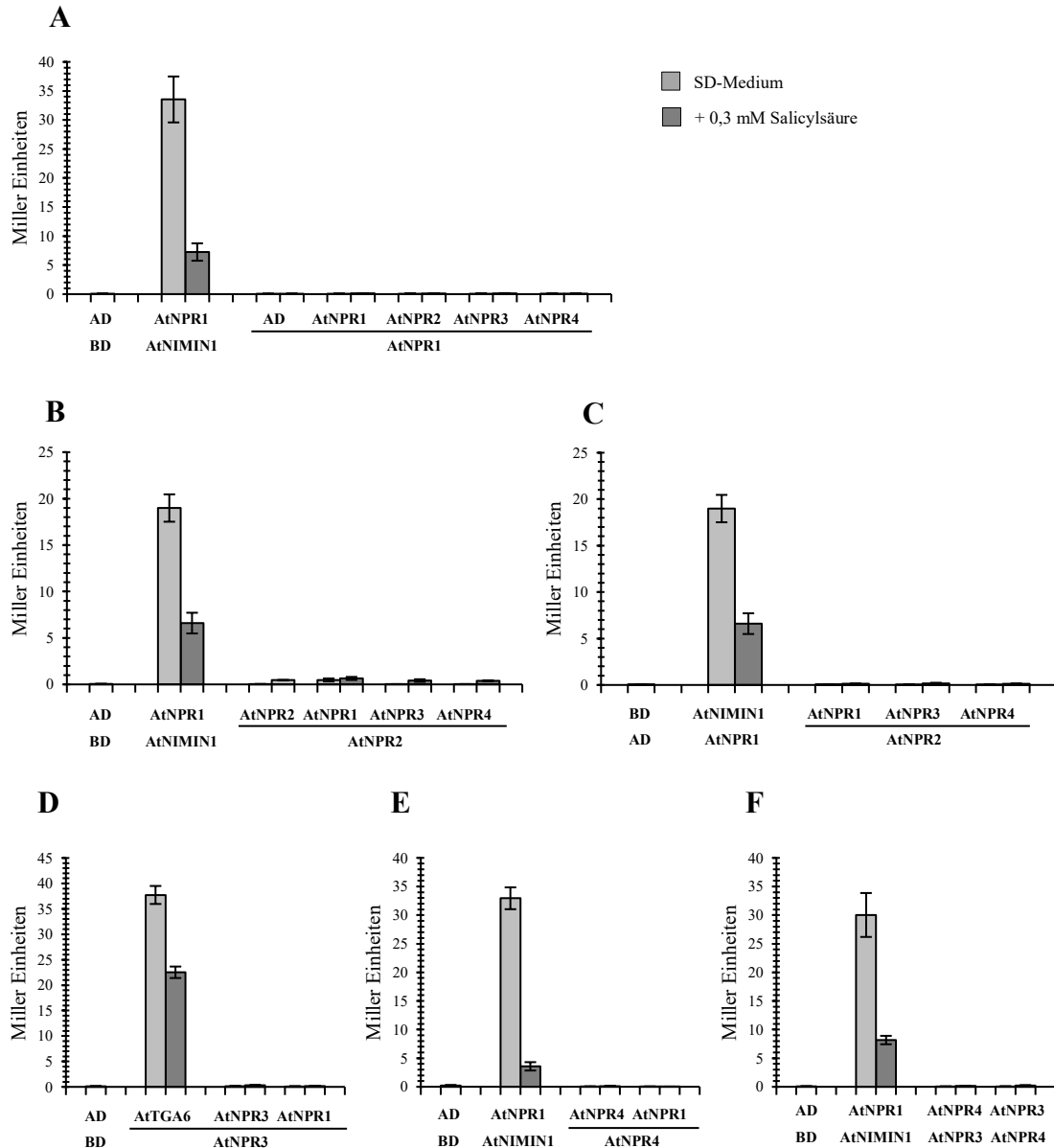


Abb. 30 Dimerisierung von Arabidopsis NPR-Proteinen. (A) Interaktion von AtNIMIN1 und AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 und Arabidopsis NPR-Proteinen. (B) und (C) Interaktion von AtNIMIN1 und AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtNPR2 und Arabidopsis NPR-Proteinen. (D) Interaktion von AtNPR3 mit AtTGA6 und Test auf Interaktion mit AtNPR3 und AtNPR4. (E) Interaktion von AtNIMIN1 und AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtNPR4 und AtNPR1 und AtNPR4. (F) Interaktion von AtNIMIN1 und AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtNPR3 und AtNPR4. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Es konnte bestätigt werden, dass AtNPR1 in Hefe keine Homodimere bilden kann (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Allerdings konnte auch keine Fähigkeit zur Heterodimerisierung festgestellt werden. AtNPR1 interagiert in Hefe weder mit AtNPR2 und AtNPR3 noch mit AtNPR4, unabhängig von der Fusion an die GAL4-Bindedomäne oder GAL4-Aktivierungsdomäne. Dies steht in Diskrepanz zu den Daten von Fu und Mitarbeitern. Ferner wurde klar, dass AtNPR2 keine Homodimere und auch keine Heterodimere mit AtNPR3 und AtNPR4 bilden kann. AtNPR3 und AtNPR4 können ebenfalls keine Homodimere bilden und sind nicht in der Lage, heterodimere Interaktionen einzugehen (Abb. 30). Die Ergebnisse von Fu und Mitarbeitern konnten in quantitativen Hefetests nicht reproduziert werden.

4.2.6.2 Interaktion von Arabidopsis NPR3 und NPR4 mit CULLIN3

In dem Modell von Fu und Mitarbeitern wird die Verfügbarkeit von Arabidopsis NPR1 Salicylsäure-abhängig durch die Interaktion mit AtNPR3 und AtNPR4 reguliert. Dabei sollen Arabidopsis NPR3 und NPR4 über die BTB/POZ-Domäne mit AtCullin3 interagieren und somit die proteasomale Degradierung von AtNPR1 gewährleisten. Der Nachweis der Interaktion erfolgte *in vitro* über ein *pull down* Experiment. Es sollte nun geprüft werden, ob NPR3 und NPR4 im quantitativen Hefe-Zwei-Hybridsystem mit AtCullin3 interagieren können. Abbildung 31 zeigt, dass keine Reporterogenaktivität bei der Interaktion zwischen AtCullin3 und Arabidopsis NPR1 gemessen werden konnte. Dies wurde auch so von Fu und Mitarbeitern (2012) beschrieben. Durch Co-Immunopräzipitation wurde gezeigt, dass für diese Interaktion AtNPR3 und AtNPR4 benötigt werden. Allerdings konnte die beschriebene Interaktion zwischen AtNPR3 und AtCullin3 in Hefe nicht nachgewiesen werden. AtCullin3 interagiert auch nicht mit Arabidopsis NPR4. Tabak NPR1 besitzt ebenfalls im N-terminalen Bereich eine BTB/POZ-Domäne. Aber auch in diesem Fall konnte AtCullin3 nicht an Tabak NPR1 binden.

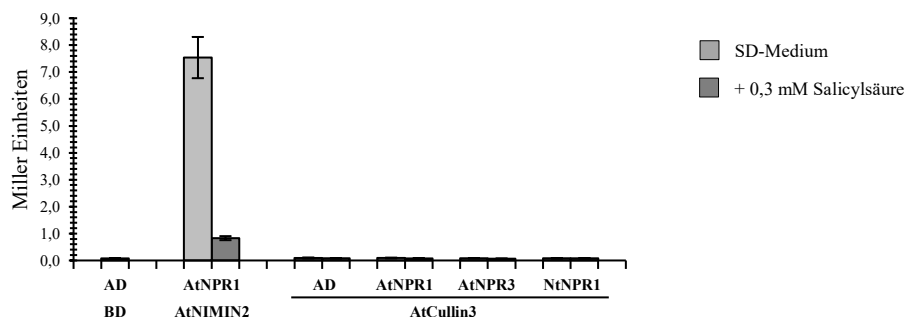


Abb. 31 Bindung von AtCullin3 an Arabidopsis NPR-Proteine. Interaktion von AtNIMIN2 mit AtNPR1 und Test auf Interaktion zwischen AtCullin3 und AtNPR1, AtNPR3 und NtNPR1 sowie Test auf Transkriptionsaktivität von AtCullin3. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.2.6.3 Einfluss von AtTGA2 auf die Homodimerisierung von Arabidopsis NPR1

Die Homodimerisierung von Arabidopsis NPR1 ist in Hefe nicht möglich (4.2.6.1). Boyle und Mitarbeitern (2009) zufolge kann Arabidopsis NPR1 aber in Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktor AtTGA2 Homodimere bilden. Dies wurde mit Hilfe eines Pflanzen-Drei-Hybridtests nachgewiesen. Zur Überprüfung des Ergebnisses sollte das Experiment in Hefe wiederholt werden. Die Kontrollinteraktion verlief wie erwartet. Arabidopsis NPR1 ist in der Lage, in Anwesenheit von AtTGA2 mit AtNIMIN1 (Klon AtNIMIN1pA(35/142)) zu interagieren. Diese Interaktion zeigte auch den erwarteten negativen Effekt der Salicylsäure. Im Gegensatz dazu konnte in Anwesenheit von AtTGA2 bei der Homodimerisierung von AtNPR1 allerdings lediglich eine schwache Reporterogenaktivität gemessen werden, welche sich nur marginal vom allgemeinen Hintergrund des Messsystems abhebt (Abb. 32). Eine geringe Tendenz ist dadurch möglicherweise erkennbar. Im heterologen Hefesystem ist die Homodimerisierung von AtNPR1 in Anwesenheit von AtTGA2 nicht eindeutig nachweisbar.

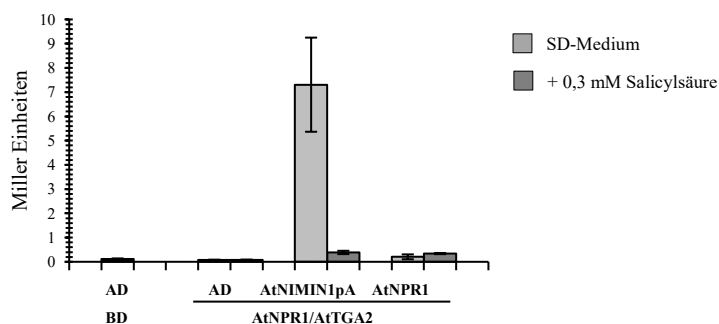


Abb. 32 Einfluss von AtTGA2 auf die Homodimerisierung von Arabidopsis NPR1. Test auf Interaktion zwischen AtNPR1 und AtNIMIN1pA(35/142) bzw. AtNPR1 in Anwesenheit von AtTGA2. *AtTGA2*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{Pro}*. Die Interaktionen fanden im Hefe-Drei-Hybridssystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium statt.

4.2.6.4 Heterodimerisierung von AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 mit Tabak NPR1

Die Homo- und Heterodimerisierung zwischen Mitgliedern der AtNPR-Proteinfamilie konnte entgegen den Angaben von Fu *et al.* (2012) in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. NtNPR1 hingegen besitzt die Fähigkeit, in Hefe Salicylsäure-unabhängig Dimere zu bilden. NtNPR1 kann sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit NtNPR3 bilden. Für die Dimerisierung wird dabei die BTB/POZ-Domäne benötigt (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Aufgrund der erfolgreichen Dimerisierung der NtNPR-Proteine in Hefe sollte nun versucht werden, Hybride aus NtNPR1 und Arabidopsis NPR1, NPR3 und NPR4 zu bilden. Allerdings konnte weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Salicylsäure eine nennenswerte Interaktion zwischen den Proteinen gemessen werden. Eine marginale Aktivität konnte bei der Interaktion zwischen NtNPR1 und AtNPR3 beziehungsweise AtNPR4

gemessen werden. Eine Heterodimerisierung zwischen NtNPR1 und Arabidopsis NPR1 scheint in diesem Fall nicht möglich zu sein (Abb. 33).

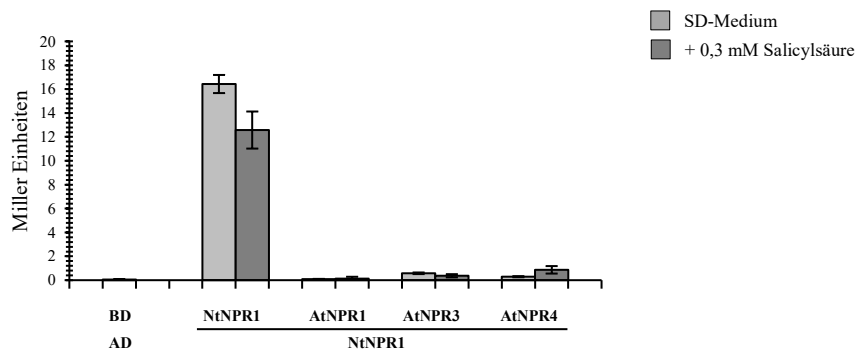


Abb. 33 Heterodimerisierung von Tabak NPR1 mit Arabidopsis NPR-Proteinen in Hefe. Interaktion von NtNPR1, AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 mit NtNPR1 im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure.

Die Basis des Modells der Salicylsäure-Wahrnehmung nach Fu *et al.* (2012) konnte im quantitativen Hefe-Zwei-Hybridsystem nicht reproduziert werden. Weder die Homo- und Heterodimerisierung der AtNPR-Proteine noch die Bindung von AtNPR3 und AtNPR4 an AtCullin3 ließen sich nachweisen.

4.3 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR-Proteine in Hefe

In vorangegangenen Studien und Kapitel 4.2 konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure auf Arabidopsis NPR1 und seine Paralogen NPR2, NPR3 und NPR4 eine direkte Wirkung in Hefen hat. Salicylsäure bewirkt die Dissoziation der Interaktionen von NPR1 mit NIMIN1 beziehungsweise NIMIN2 und verstärkt die spontane Interaktion von NPR2 mit Vertretern der TGA-Transkriptionsfaktorfamilie signifikant. Diese intensivierende Wirkung ist besonders bei der Interaktion von NPR2 mit AtTGA7 zu beobachten. Für die Paralogen NPR3 und NPR4 konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure in der Lage ist, die Affinität der beiden C-terminalen Domänen LEKRV und NIMIN1/2-Bindedomäne zu induzieren (D.Neeley&U.M.Pfizer, persönliche Mitteilung).

Neben Salicylsäure sind noch weitere Substanzen bekannt, welche Einfluss auf die *PR1*-Induktion haben oder in der Pflanzenabwehr aktiv sind. Benzoessäure beispielsweise ist nicht nur ein Zwischenprodukt in der Salicylsäurebiosynthese, sondern ist ebenso wie Salicylsäure selbst in der Lage, die Abwehr gegen *TMV* zu induzieren (White, 1979). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Benzoessäure sowohl die Expression von *PR1*-Genen als auch die systemisch aktivierte Resistenz induzieren kann (Maier *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 1998). 2,6-Dichlorisonicotinsäure (INA) ist wie Salicylsäure ein Auslöser der SAR. INA induziert Resistenz gegen eine Bandbreite von Pathogenen, dabei wirken weder INA selbst noch Metaboliten von INA *in vitro* antimykotisch (Métraux *et al.*, 1991). Durch INA werden dieselben SAR-Gene induziert wie bei Salicylsäure und biologischer Induktion durch Pathogene (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992). INA induziert aber nicht die Akkumulation von Salicylsäure, denn es ist auch in transgenen Pflanzen effektiv, welche nicht mehr in der Lage sind, Salicylsäure zu akkumulieren (Vernooij *et al.*, 1995). Neben Salicylsäure und INA ist auch S-Methyl-1,2,3-benzothiadiazol-7-carbothioat (BTH; Schurter *et al.*, 1987; Schurter *et al.*, 1993) ein chemischer Aktivator der SAR. BTH hat keine direkte antimykotische Wirkung, ebenso wie der Hauptmetabolit 1,2,3-Benzothiadiazol-7-carboxylsäure und verschiedene andere Metaboliten (Friedrich *et al.*, 1996). BTH schützt Pflanzen gegen dasselbe Spektrum von Pathogenen wie Salicylsäure-, INA- und Pathogen-induzierte SAR. Durch die Behandlung der Pflanzen mit BTH wird die Akkumulation von *PR1*-Transkripten induziert, allerdings geht dies nicht mit der Akkumulation von Salicylsäure einher (Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). Ferner ist BTH in der Lage, wie Salicylsäure und *Tabak-Mosaik-Virus (TMV)*, den *PR1a*-Promotor zu aktivieren (Friedrich *et al.*, 1996; Uknes *et al.*, 1993; Van de Rhee *et al.*, 1990). Ebenso wie INA kann BTH in *NahG*-Pflanzen die Akkumulation von *PR1* mRNA und Resistenz gegen Pathogene induzieren (Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). *NahG*-Pflanzen exprimieren das bakterielle Gen *NahG*, welches für das Enzym Salicylsäure-Hydroxylase kodiert. Diese Pflanzen können dadurch keine signifikanten Mengen von Salicylsäure mehr akkumulieren (Gaffney *et al.*, 1993). Die *Arabidopsis thaliana nim1/npr1* Mutante ist nach der Salicylsäureakkumulation im SAR-Signaltransduktionsweg fehlerhaft. Die Behandlung von *nim1/npr1* Mutanten mit Salicylsäure, INA

oder BTH induziert weder die Akkumulation von *PR1* mRNA noch eine Resistenz gegen Pathogene (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1997). Des Weiteren ist die Wirkung von BTH nicht von der Sensitivität gegenüber Ethylen oder Jasmonsäure abhängig (Lawton *et al.*, 1996). Aufgrund phytotoxischer Eigenschaften von INA wurde diese Substanz nie kommerziell in der Landwirtschaft eingesetzt. BTH hingegen war für den Schutz der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen adäquat und wird kommerziell unter dem Handelsnamen Bion® in Europa und Actigard® in den USA genutzt (Schurter *et al.*, 1987; Schurter *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 1997; Oostendorp *et al.*, 2001).

Bei der Analyse verschiedener Verbindungen wurde als chemischer Induktor der Pathogen-responsiven *CaBP22_{Pro}:GUS*-Reportergenkonstruktion in *Arabidopsis* die Substanz 3,5-Dichloranthranilsäure identifiziert (Knoth *et al.*, 2009; Knoth&Eulgem, 2014). 3,5-Dichloranthranilsäure schützt Pflanzen gegen *Hyaloperonospora parasitica* und *Pseudomonas syringae*. Durch 3,5-Dichloranthranilsäure werden verschiedene Salicylsäure-responsive Gene, welche im Zusammenhang mit der Abwehr stehen, hoch reguliert. Dazu gehören *WRKY70*, *PR1* und *CaBP22*. Ebenso wie bei INA und BTH benötigt die Wirkung von 3,5-Dichloranthranilsäure keine Salicylsäure-Akkumulation. Im Gegensatz zu INA und BTH wird die durch 3,5-Dichloranthranilsäure vermittelte Resistenz nicht vollständig in *npr1* Mutanten unterbunden, allerdings wird die Wirkung in *wrky70* Mutanten ebenfalls teilweise unterbunden. Dies bedeutet, dass 3,5-Dichloranthranilsäure vermutlich neben dem NPR1-abhängigen Signalweg noch teilweise auf einen WRKY70-abhängigen Zweig der Pflanzenabwehr, welcher kein NPR1 benötigt, wirkt (Knoth *et al.*, 2009; Bektas&Eulgem, 2015). Im Zuge dieser Analyse wurden auch strukturelle Analoga der 3,5-Dichloranthranilsäure getestet, wie beispielsweise Anthranilsäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure. 3,5-Dichlorbenzoesäure ist in der Lage, sowohl die basale Abwehr gegen *Hyaloperonospora parasitica* als auch die Expression von *CaBP22_{Pro}:GUS* in *Arabidopsis* zu induzieren (Knoth *et al.*, 2009).

In diesem Kapitel sollte die Wirkung der Salicylsäure auf NPR1 und seine Paralogen NPR2, NPR3 und NPR4 in Hefe miteinander verglichen werden. Zusätzlich sollten die Spezifität und Sensitivität der jeweiligen Salicylsäure-sensitiven Interaktionen untersucht werden. Hierfür wurden strukturelle Analoga der Salicylsäure getestet. Die Analyse fand im heterologen Hefe-Zwei-Hybridsystem statt. Als Hintergrundkontrolle des Messsystems wurde eine Co-Transformation der jeweiligen leeren Hefektoren verwendet. Sämtliche zu testende Substanzen wurden dem Hefe-Medium in entsprechender Konzentration hinzugefügt. Es ist bekannt, dass Hefen in der Lage sind, Substanzen wie Salicyl- und Benzoesäure aus dem Medium aufzunehmen und diese nicht in ihrem Metabolismus umzusetzen (Henriques *et al.*, 1997; Macris, 1975; Scharff *et al.*, 1982). Somit eignet sich das Hefe-Zwei-Hybridsystem als adäquates Testsystem für die verschiedenen Substanzen im Hinblick auf ihre direkte Wirkung auf NPR-Proteine. Die Wirkung der ausgewählten Substanzen wurde in drei verschiedenen Konzentrationen untersucht: 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wurden aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit

statt in H₂O in DMSO gelöst. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Konzentration von 0,5% DMSO im Hefe-Medium nicht überschritten wird. In dieser geringen Menge hat DMSO keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen. Zur Kontrolle wurde der Negativkontrolle jeweils ebenfalls 0,5% DMSO beigelegt. Es zeigte sich allerdings, dass sich die chlorierten Substanzen 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure in einer Konzentration von 0,3 mM negativ auf das Wachstum von Hefen auswirkten.

4.3.1 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR1

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener analoger Verbindungen im Vergleich zu Salicylsäure auf die Dissoziation von NPR1 und NIMIN2 analysiert. Zu den untersuchten Substanzen gehörten Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure (Abb. 34).

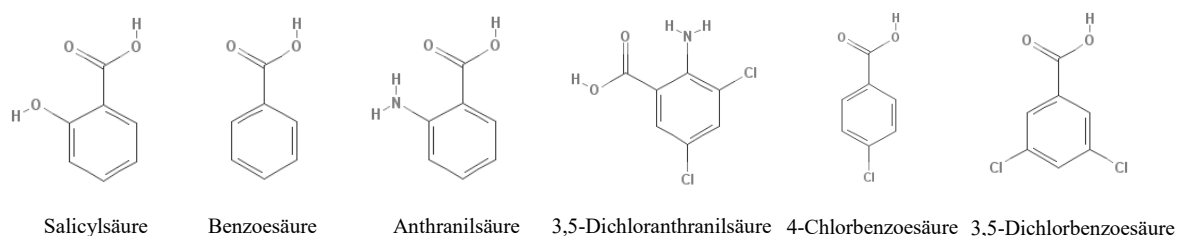


Abb. 34 Strukturformeln von Salicylsäure, Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure. Strukturformel von Salicylsäure (PubChem CID 338); Strukturformel von Benzoesäure (PubChem CID 243); Strukturformel von Anthranilsäure (PubChem CID 227); Strukturformel von 3,5-Dichloranthranilsäure (PubChem CID 76036); Strukturformel von 4-Chlorbenzoesäure (PubChem CID 6318); Strukturformel von 3,5-Dichlorbenzoesäure (PubChem CID 5811).

Bereits bei einer Konzentration von 0,3 mM sind wesentliche Unterschiede innerhalb der Substanzen auf den Effekt der NPR1-NIMIN2-Interaktion zu erkennen. Die dissoziierende Wirkung von Salicylsäure ist vergleichbar mit der Wirkung von 4-Chlorbenzoesäure. Der Effekt von Benzoesäure und Anthranilsäure ist im Vergleich zur Salicylsäure wesentlich schwächer, allerdings ist der negative Effekt im Vergleich zur Kontrolle ohne zusätzliche Substanz dennoch sichtbar. Die beiden dichlorierten Substanzen 3,5-Dichloranthranilsäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure weisen eine deutlich stärkere dissoziierende Wirkung auf die Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN2 als Salicylsäure selbst auf. Diese Unterschiede werden mit abnehmender Konzentration noch deutlicher. Bei 0,03 mM zeigen die dichlorierten Substanzen weiterhin den stärksten Effekt. Benzoesäure ebenso wie Anthranilsäure sind bei dieser Konzentration bereits wirkungslos und zeigen keinen Effekt mehr auf die Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN2. Auch der Effekt von Salicylsäure lässt nun deutlich nach. Die chlorierten Substanzen zeigten auch bei einer Konzentration von 0,03 mM die stärkste Wirkung auf die Interaktion im Vergleich zu Salicylsäure und den weiteren Substanzen. Bei 0,003 mM lässt die Wirkung der Substanzen im Allgemeinen sehr stark nach. 3,5-Dichloranthranilsäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure

zeigen aber weiterhin einen geringen Effekt. Bei den weiteren Substanzen so wie auch bei Salicylsäure ist kein Effekt mehr zu erkennen (Abb. 35A).

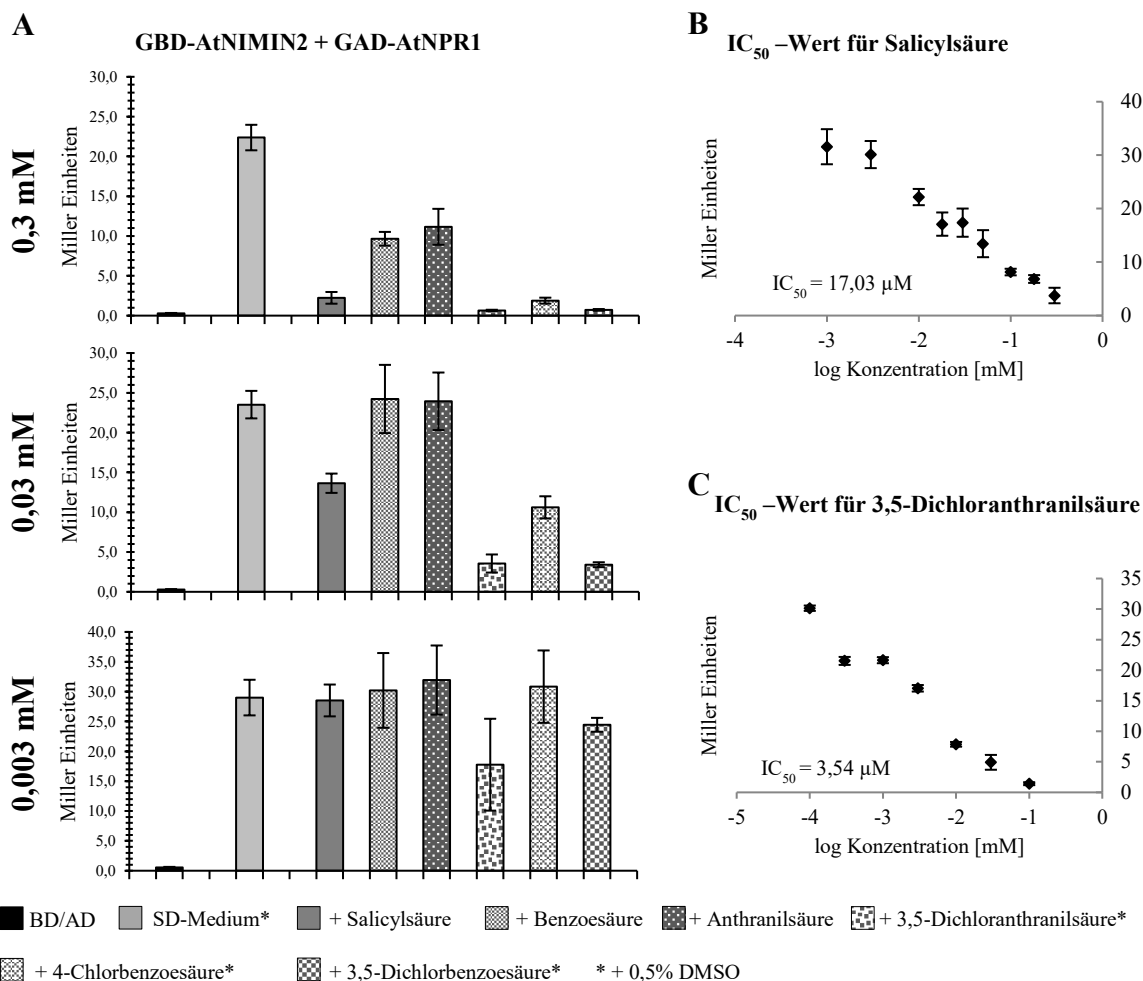


Abb. 35 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR1. (A) Interaktion von AtNIMIN2 und AtNPR1 in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. (B) Abhängigkeit der Interaktion von AtNIMIN2 und AtNPR1 von Salicylsäure. (C) Abhängigkeit der Interaktion von AtNIMIN2 und AtNPR1 von 3,5-Dichloranthranilsäure. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem statt. Die Substanzen 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirken sich bei einer Konzentration von 0,3 mM hemmend auf das Wachstum der Hefen aus.

Zum Vergleich der dissoziierenden Wirkung der Substanzen zu Salicylsäure auf die Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN2 wurden IC_{50} -Werte aufgenommen. Hierfür wurde neben Salicylsäure beispielhaft die 3,5-Dichloranthranilsäure verwendet, welche auch bei geringer Konzentration die stärksten Effekte auf die NPR1-NIMIN2-Interaktion zeigte. Der IC_{50} -Wert beträgt bei Salicylsäure für die Dissoziation von NPR1 und NIMIN2 17,03 μM (Abb. 35B). Der IC_{50} -Wert für 3,5-Dichloranthranilsäure ist mit 3,54 μM (Abb. 35C) annähernd fünf Mal geringer als der Wert für Salicylsäure. Anhand der IC_{50} -Werte wird deutlich, was sich bereits im Vorfeld vermuten ließ: Die Wirkung von 3,5-Dichloranthranilsäure ist im Vergleich zur Salicylsäure wesentlich effektiver.

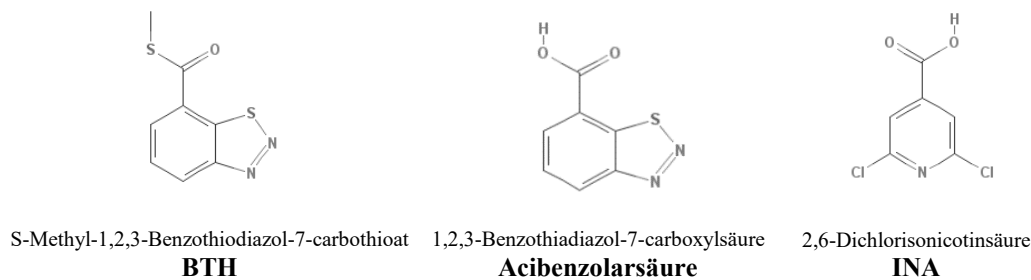


Abb. 36 Strukturformeln von BTH, Acibenzolarsäure und INA. Strukturformel von S-Methyl-1,2,3-benzothiadiazol-7-carbothioat (BTH; PubChem CID 86412); Strukturformel von 1,2,3-Benzothiadiazol-7-carboxylsäure (Acibenzolarsäure; PubChem CID 10921109); Strukturformel von 2,6-Dichlorisonicotinsäure (INA; PubChem CID 94830).

Zusätzlich zu diesen strukturellen Analoga wurde weiterhin die Wirkung von BTH und INA auf die Dissoziation von Arabidopsis NPR1 und NIMIN2 getestet. Neben INA und BTH wurde auch als freie Säure vorliegendes BTH (1,2,3-Benzothiadiazol-7-carboxylsäure, Acibenzolarsäure) verwendet (Abb. 36). Die drei Substanzen wurden ebenfalls in drei verschiedenen Konzentrationen (0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM) getestet. Bereits bei einer Konzentration von 0,3 mM wird deutlich, dass die Substanzen in Hefe nicht dasselbe Potential wie in Pflanzen aufweisen. Salicylsäure wirkt hier mit Abstand am effektivsten auf die Interaktion zwischen AtNPR1 und NIMIN2. Acibenzolarsäure zeigt innerhalb der drei Substanzen die stärkste dissoziierende Wirkung auf die Interaktion beider Proteine. Allerdings ist der Unterschied in der Wirkung zu INA relativ gering.

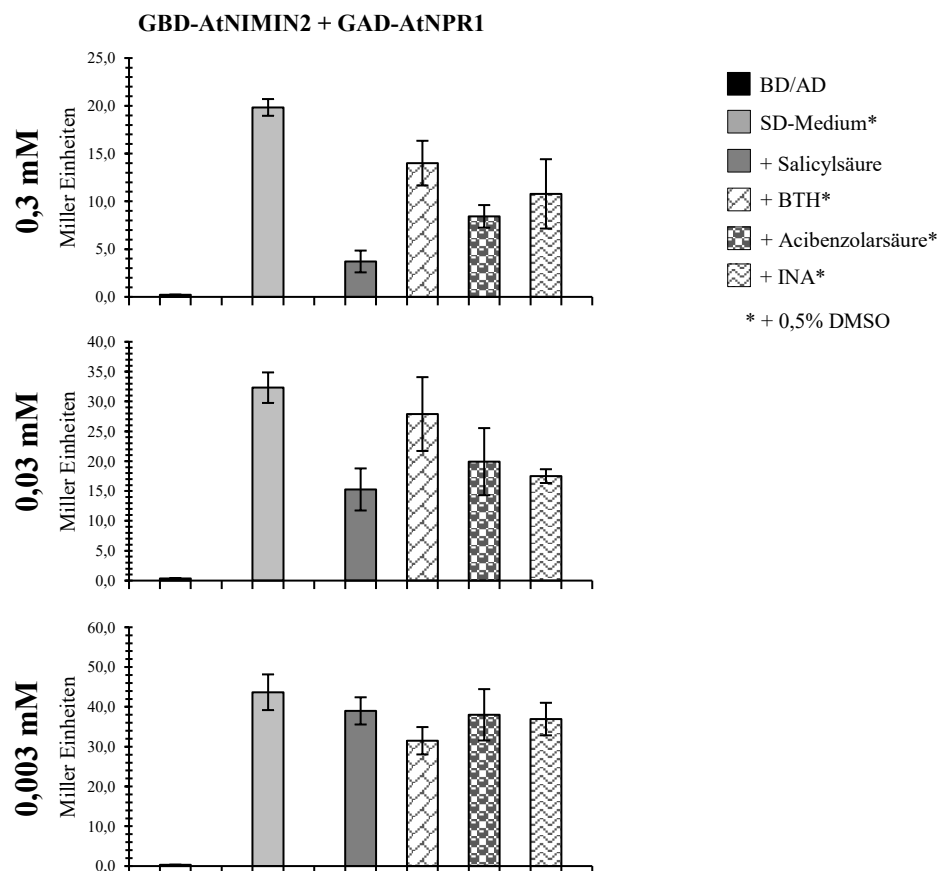


Abb. 37 Einfluss von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Arabidopsis NPR1. Interaktion von AtNIMIN2 und AtNPR1 in Anwesenheit von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem statt.

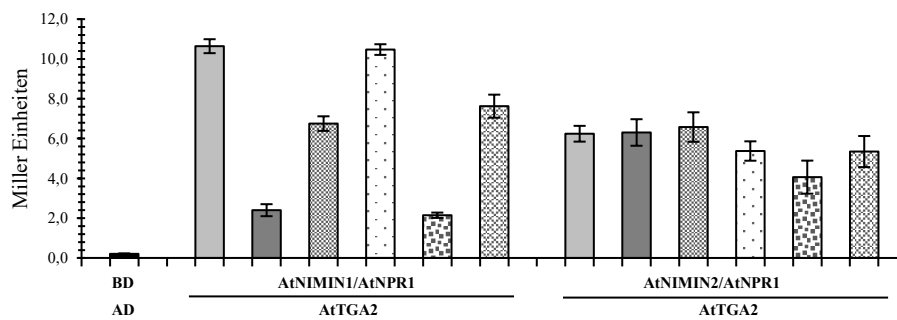
Den geringsten negativen Effekt auf die Interaktion von AtNPR1 und NIMIN2 wies hier BTH auf. Bei 0,03 mM werden die Unterschiede wesentlich geringer. Die negative Wirkung von Salicylsäure ist nun etwa vergleichbar mit der von Acibenzolarsäure und INA und weitaus weniger effektiv als bei 0,3 mM. Auch hier zeigt BTH den geringsten Effekt auf die Interaktion und unterscheidet sich kaum noch von der Kontrolle ohne zusätzlich hinzugefügte Substanz im Hefe-Medium. Bei der geringen Konzentration von 0,003 mM sind keine negativen Wirkungen mehr von Salicylsäure und den verwendeten drei Substanzen auf die Interaktion von AtNPR1 und NIMIN2 messbar (Abb. 37).

Arabidopsis NPR1 ist als einziges Mitglied der NPR-Proteinfamilie in der Lage, mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren ternäre Komplexe in Hefe zu bilden. Dabei ist der ternäre Komplex aus NPR1, TGA-Faktoren und NIMIN1 gegenüber Salicylsäure sensitiv. Stellt allerdings NIMIN2 ein Teil des ternären Komplexes dar, ist dieser insensitiv gegenüber Salicylsäure, obwohl die Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN2 Salicylsäure-sensitiv ist (Hermann *et al.*, 2013, 4.2.5.1).

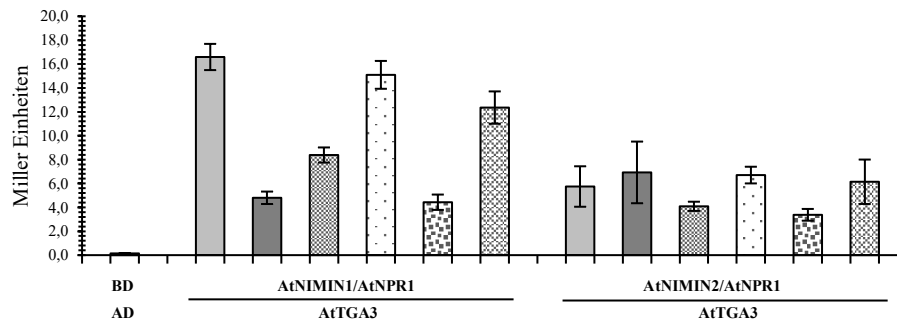
Im Weiteren sollte geprüft werden, ob die getesteten strukturellen Analoga der Salicylsäure einen Einfluss auf die ternären Komplexe aus NPR1, NIMIN1 oder NIMIN2 sowie den TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA3 und TGA7 zeigen. Für die Analyse wurden folgende Substanzen in der Standardkonzentration 0,3 mM eingesetzt: Salicylsäure, Benzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure und 4-Chlorbenzoesäure. 3,5-Dichloranthranilsäure wurde dabei abweichend von der Standardkonzentration mit 0,03 mM verwendet. Hinsichtlich des ternären Komplexes unter Beteiligung von NIMIN1 verhalten sich die Substanzen ungeachtet der verwendeten TGA-Transkriptionsfaktoren annähernd ähnlich. 4-Hydroxybenzoesäure hat keinen Effekt auf die Stabilität des ternären Komplexes und die Interaktionsstärke ist ähnlich der Kontrolle ohne zusätzliche Substanz. Im Gegensatz zur Benzoesäure ist 4-Hydroxybenzoesäure inaktiv in Bezug auf *PRI*-Geninduktion und SAR (White, 1979; Xie *et al.*, 1998). 4-Chlorbenzoesäure weist eine relativ geringe Wirkung auf die Interaktion zwischen NPR1-TGA-NIMIN1 auf. Benzoesäure verhält sich dabei ähnlich wie 4-Chlorbenzoesäure. 3,5-Dichloranthranilsäure zeigte eine ähnliche dissoziierende Wirkung auf den ternären Komplex wie Salicylsäure, obwohl es zehnmal geringer konzentriert vorlag (Abb. 38).

Die ausgewählten Substanzen hatten wie Salicylsäure keine dissoziierende Wirkung auf den ternären Komplex, wenn NIMIN2 beteiligt war. Unter Beteiligung von TGA2 und TGA3 sind hinsichtlich der Substanzen und der Kontrolle keine nennenswerten Unterschiede zu erkennen. Im Falle von TGA7 jedoch scheinen sich Salicylsäure und die weiteren Substanzen verstärkend auf die Stabilität des ternären Komplexes auszuwirken. Die Stabilität des NIMIN2-NPR1-TGA-Transkriptionsfaktor-Komplexes wird also weder von Salicylsäure noch von weiteren potentiellen Substanzen, welche einen Einfluss auf die Interaktion von NPR1 mit NIMIN2 aufweisen, verringert (Abb. 38).

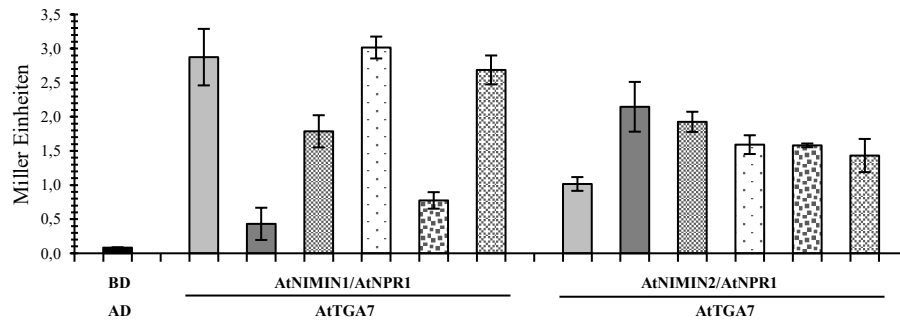
A



B



C



■ SD-Medium* ■ + Salicylsäure ■ + Benzoessäure □ + 4-OH-Benzoessäure ■ + 3,5-Dichloranthranilsäure* ■ + 4-Chlorbenzoessäure* * + 0,5% DMSO

Abb. 38 Einfluss unterschiedlicher Verbindungen auf die Bildung ternärer Komplexe von Arabidopsis NPR1 mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren. (A) Interaktion von AtNIMIN1 bzw. AtNIMIN2 mit AtTGA2 in Anwesenheit von AtNPR1. (B) Interaktion von AtNIMIN1 bzw. AtNIMIN2 mit AtTGA3 in Anwesenheit von AtNPR1. (C) Interaktion von AtNIMIN1 bzw. AtNIMIN2 mit AtTGA7 in Anwesenheit von AtNPR1. Die Interaktionen fanden im Hefe-Drei-Hybridsystem in Anwesenheit von 0,3 mM Salicylsäure, 0,3 mM Benzoessäure, 0,3 mM 4-OH-Benzoessäure, 0,03 mM 3,5-Dichloranthranilsäure und 0,03 mM 4-Chlorbenzoessäure und ohne Zugabe von Methionin zum Hefemedium statt. *AtNPR1*-Expression steht unter der Kontrolle von *Met25_{PRO}*.

4.3.2 Einfluss von Salicylsäure auf Arabidopsis NPR2

Wie bereits in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben, interagiert NPR2 mit Mitgliedern der bZIP-TGA-Transkriptionsfaktorfamilie. Die Interaktion zwischen den Proteinen erfolgt spontan und wird durch die Anwesenheit von Salicylsäure verstärkt. Dieser verstärkende Effekt der Salicylsäure wurde besonders bei der Interaktion von NPR2 mit TGA7 beobachtet. Bei Arabidopsis NPR1 wie auch bei Tabak NPR1 ist das Arginin in der LENRV-Domäne im C-terminalen Teil der Proteine ausschlaggebend für die

Wahrnehmung von Salicylsäure. Das wurde durch die *nim1-4* Mutante in Arabidopsis NPR1 und einer vergleichbaren Mutante in Tabak eindeutig nachgewiesen. Durch den Austausch des Arginins zu einem Lysin verlieren die Mutanten die Fähigkeit, auf Salicylsäure zu reagieren (Ryals *et al.*, 1997; Maier *et al.*, 2011). Analog zur LENRV-Domäne in NPR1 gibt es im C-terminalen Bereich des NPR2 eine YENRV-Domäne. Mittels *overlap extension* PCR wurde eine analoge *nim1-4* Mutante für NPR2 generiert. Mit Hilfe von NPR2 R432K (Abb. 39A) sollte untersucht werden, ob das Arginin auch hier wichtig für die Salicylsäure-Sensitivität der Interaktion zwischen NPR2 und TGA-Faktoren ist. Die Analyse fand im heterologen Hefe-Zwei-Hybridsystem statt. Es wurde beispielhaft die Interaktion von NPR2 mit Transkriptionsfaktor TGA7 untersucht. Die Wildtyp-Situation wurde der Mutante direkt gegenübergestellt. Für den Hefe-Test wurde die Standardkonzentration von 0,3 mM für Salicylsäure verwendet. Wie in Abbildung 39B zusehen ist, interagieren NPR2 und TGA7 in der Wildtyp-Situation spontan miteinander. Durch Zugabe von Salicylsäure vervierfacht sich die Interaktionsstärke zwischen den Proteinen. NPR2 R432K interagiert ebenso wie der Wildtyp spontan mit TGA7. Nach Zugabe von Salicylsäure verbleibt aber die Interaktionsstärke der beiden Proteine auf dem Niveau der spontanen Interaktion. Durch den Aminosäureaustausch R432K konnte ebenso wie in NPR1 der Einfluss von Salicylsäure unterbunden werden. Das bedeutet, dass auch in NPR2 das Arginin im YENRV-Motiv essentiell für die Wahrnehmung von Salicylsäure ist.

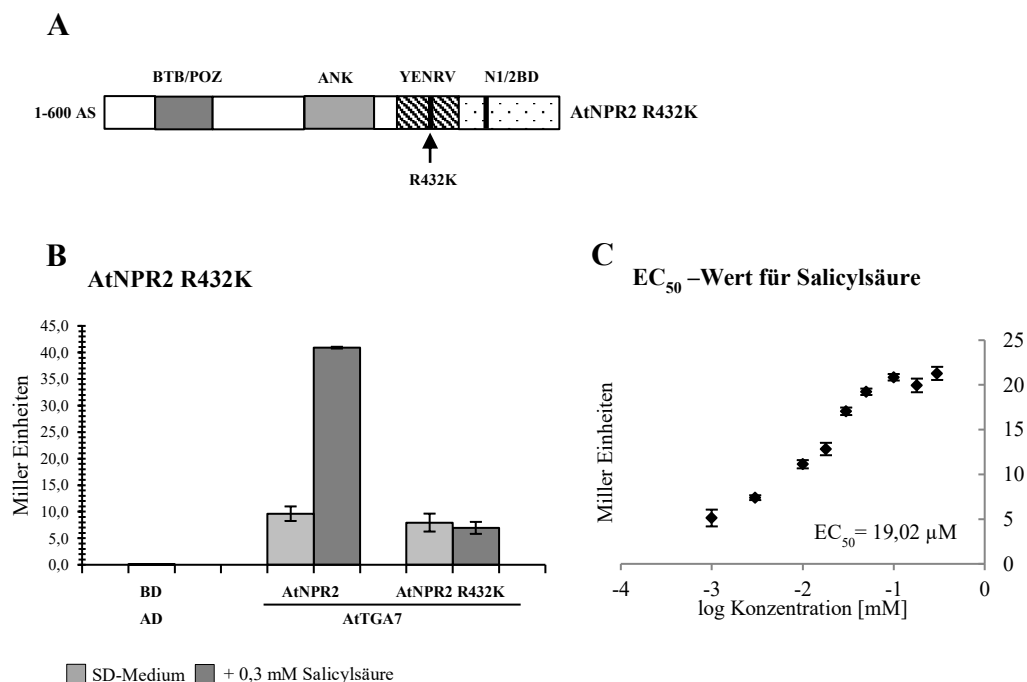


Abb. 39 Einfluss der R432K Mutante im YENRV-Motiv von Arabidopsis NPR2 auf die Wahrnehmung von Salicylsäure. (A) Schematische Darstellung von AtNPR2 R432K. (B) Interaktion zwischen AtNPR2 bzw. AtNPR2 R432K und AtTGA7 in An- und Abwesenheit von Salicylsäure. (C) Konzentrationsabhängigkeit der Interaktion zwischen AtNPR2 und AtTGA7 von Salicylsäure. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Zum besseren direkten Vergleich der Salicylsäure-sensitiven Interaktionen der NPR-Proteine wurde für die Interaktion zwischen NPR2 und TGA-Transkriptionsfaktoren der EC_{50} -Wert für Salicylsäure ermittelt. Dabei wurde beispielhaft wieder die Interaktion von NPR2 mit TGA7 verwendet. Der EC_{50} -Wert liegt hier bei 19,02 μ M (Abb. 39C) und ist vergleichbar mit dem IC_{50} -Wert für die Interaktion zwischen NPR1 und NIMIN2, welcher bei 17,03 μ M liegt.

4.3.3 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR3

Anders als bei Arabidopsis NPR1 ist die Salicylsäure-abhängige Assoziation der C-terminalen Domänen LEKRV und NIMIN-Bindedomäne bei Arabidopsis NPR3 ebenso wie bei Tabak NPR1 möglich (D.Neeley&U.M.Pfitzner, persönliche Mitteilung). Es ist bekannt, dass die Phenylalanine an den Positionen 505 und 506 in Tabak NPR1 und entsprechend Tyrosin an der Stelle 508 und Phenylalanin an Stelle 509 in Tabak NPR3 essentiell für die Bindung von NIMIN-Proteinen sind. Analog dazu befinden sich in Arabidopsis NPR1 in der NIMIN-Bindedomäne an den Positionen 507 und 508 Phenylalanine, welche auch hier notwendig für die Bindung der NIMIN1- und NIMIN2-Proteine sind (Maier *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2013; 4.1.3.2). Anders als Arabidopsis NPR1 und Tabak NPR1 und NPR3 ist Arabidopsis NPR3 nicht in der Lage, mit Mitgliedern der NIMIN-Proteinfamilie zu interagieren (Weigel *et al.*, 2001; Zwicker *et al.*, 2007; Maier *et al.*, 2011; 4.2.3.1). Dennoch weist NPR3 im C-Terminus einen Bereich mit hoher Homologie zur konservierten NIMIN-Bindedomäne von AtNPR1 auf. Analog zu Tabak NPR1 befinden sich an Position 502 und 503 bei NPR3 ebenfalls zwei Phenylalanine. Diese Phenylalanine wurden zu Serinen ausgetauscht. Die Mutation F502/503S wurde in den C-terminalen Domänenklon NPR3(463/586) eingebracht (Abb. 40A). Im heterologen Hefe-Zwei-Hybridsystem wurde nun getestet, ob diese Mutation Auswirkungen auf die Fähigkeit der induzierbaren Affinität der C-terminalen Domänen von NPR3 hat.

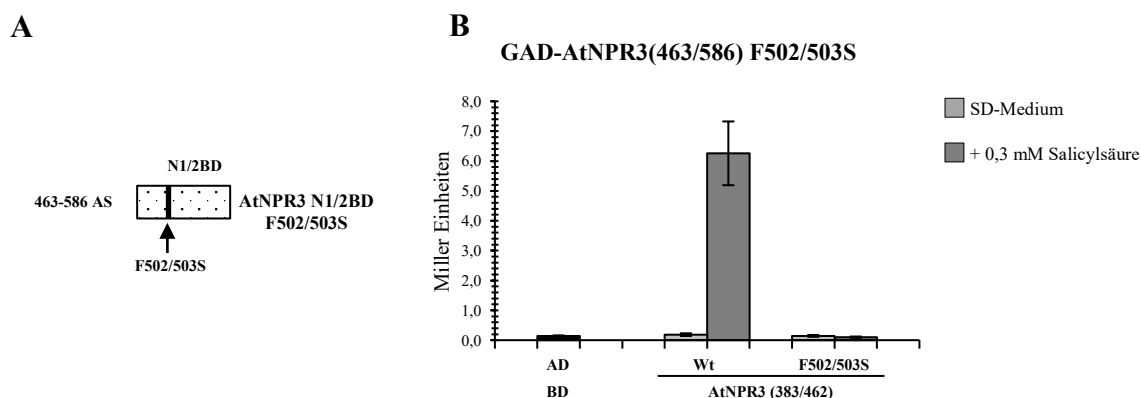


Abb. 40 Einfluss der Mutation F502/503S auf die Salicylsäure-induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR3. (A) Schematische Darstellung von AtNPR3(463/586) F502/503S. (B) Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) bzw. AtNPR3(463/586) F502/503S in An- und Abwesenheit von 0,3 mM Salicylsäure im Hefe-Zwei-Hybridsystem.

Die Interaktion des mutanten Domänenklons wurde der Wildtyp-Situation direkt gegenübergestellt. Bei der wildtypischen Situation ist eine klare Assoziation der beiden Domänen bei Anwesenheit von Salicylsäure zu erkennen. Im Falle der F502/503S Mutation in der Deletionsmutante NPR3(463/586) sind die beiden Domänen nicht mehr in der Lage, miteinander zu interagieren (Abb. 40B).

Des Weiteren sollte in diesem Kapitel die Spezifität der Salicylsäure als Induktor der Interaktion der C-terminalen Domänen von NPR3 sowie die Wirkung verschiedener Verbindungen auf diese Interaktion analysiert werden. Dafür wurden dieselben Verbindungen verwendet wie in Kapitel 4.3.1. Im Gegensatz zur Interaktion von NPR1 mit NIMIN2 zeigt sich bei der induzierten Affinität der C-terminalen Domänen ein anderes Bild der Wirkung der verwendeten Substanzen. Bereits bei einer Konzentration von 0,3 mM sind nun deutliche Unterschiede erkennbar. Anders als bei NPR1 hat Anthranilsäure keine nennenswerte Wirkung auf die Assoziation der C-terminalen Domänen, die über das Niveau der spontanen Interaktion hinausgeht. Auch die induzierende Wirkung der Benzoessäure ist hier sehr schwach ausgeprägt. Im Fall von NPR1 hatte 4-Chlorbenzoessäure eine ausgeprägte dissoziierende Wirkung auf die NPR1-NIMIN2-Interaktion. Hier allerdings ist die Wirkung der Substanz auf die Assoziation der C-terminalen Domänen gleich Null. Die dichlorierten Substanzen 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure zeigten eindeutig die stärkste Wirkung innerhalb der getesteten Substanzen. Allerdings konnten sie Salicylsäure in diesem Fall in ihrer induzierenden Wirkung nicht übertreffen. Hierbei gilt es aber zu beachten, dass das Wachstum der Hefen bei dieser Konzentration durch die dichlorierten Substanzen erheblich eingeschränkt wird und dieses Ergebnis differenziert zu betrachten ist. Bei einer Konzentration von 0,03 mM wird jedoch deutlich, dass die dichlorierten Substanzen 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure eine deutlich stärkere induzierende Wirkung auf die Affinität der C-terminalen Domänen von NPR3 haben als Salicylsäure. Die induzierende Wirkung von Salicylsäure hebt sich nur geringfügig vom Niveau der spontanen Interaktion ab. Der Effekt von Benzoessäure, Anthranilsäure und 4-Chlorbenzoessäure auf die Affinität der C-terminalen Domänen geht bei 0,03 mM gegen Null. Ein noch deutlicheres Bild liefert die Wirkung der Substanzen bei einer Konzentration von 0,003 mM. Alle Substanzen einschließlich Salicylsäure mit Ausnahme der dichlorierten Verbindungen zeigen bei dieser niedrigen Konzentration keinerlei Wirkung auf die zu untersuchende Interaktion mehr. Der Effekt von 3,5-Dichlorbenzoessäure ist dabei nicht ganz so stark ausgeprägt wie der Effekt von 3,5-Dichloranthranilsäure auf die Affinität der C-terminalen Domänen von NPR3 (Abb. 41A).

Ebenso wie bei NPR1 haben die dichlorierten Verbindungen auch bei NPR3 eine bessere und effektivere Wirkung als Salicylsäure. Zum direkten Vergleich der Wirkungen auf die jeweiligen Interaktionen wurden auch für die induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen von NPR3 EC_{50} -Werte für Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure ermittelt. Der EC_{50} -Wert für Salicylsäure ist größer als 121,12 μ M (Abb. 41B) und ist siebenmal höher als der Wert für die Interaktion von NPR1. Für 3,5-Dichloranthranilsäure liegt der Wert bei 5,75 μ M (Abb. 41C) und ist im Vergleich zur Salicylsäure

deutlich geringer. Der EC_{50} -Wert von 3,5-Dichloranthranilsäure ist aber im Vergleich zu dem IC_{50} -Wert für die NPR1-NIMIN2-Interaktion für 3,5-Dichloranthranilsäure mit $3,54 \mu\text{M}$ recht ähnlich.

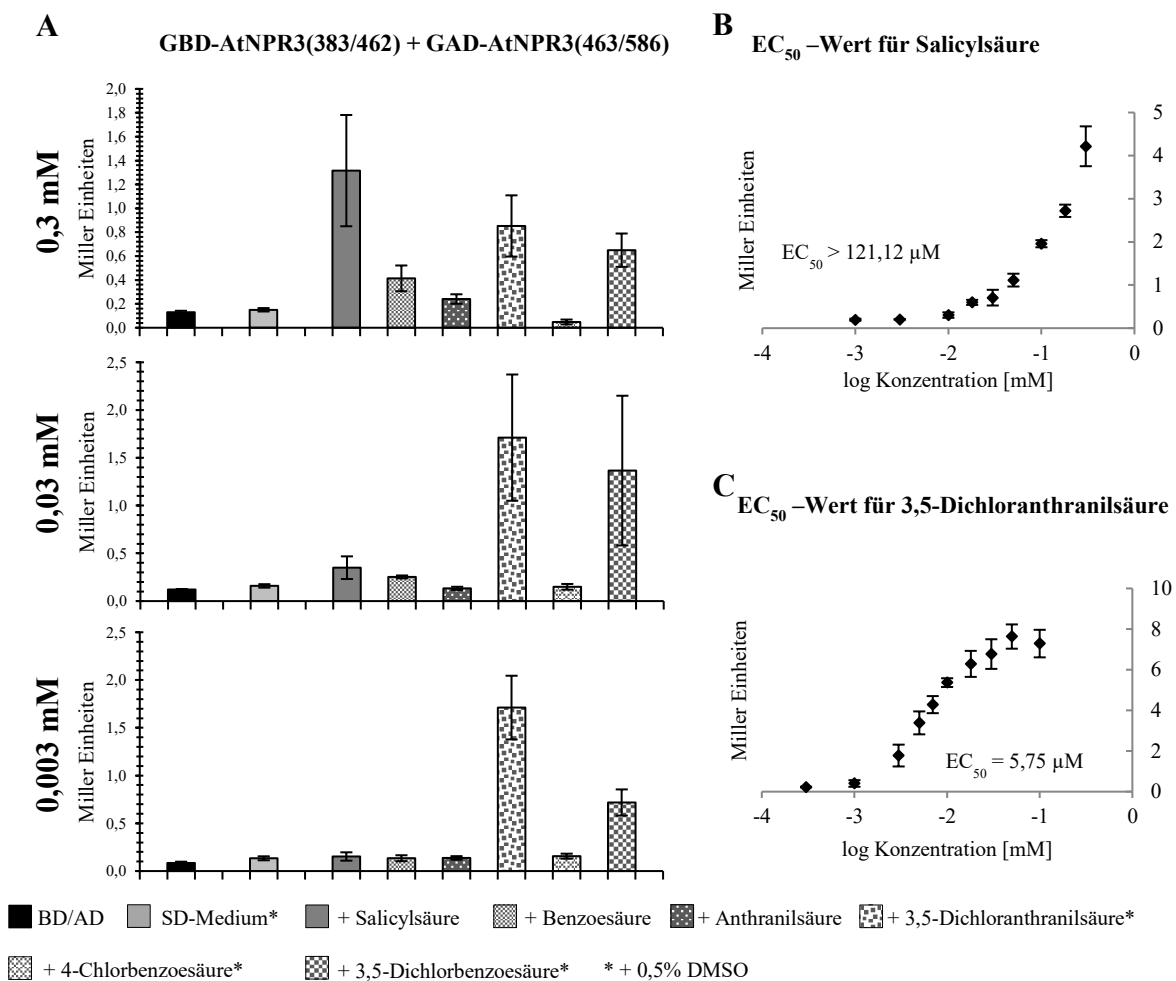


Abb. 41 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR3. (A) Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoessäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoessäure und 3,5-Dichlorbenzoessäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. (B) Abhängigkeit der Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) von Salicylsäure. (C) Abhängigkeit der Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) von 3,5-Dichloranthranilsäure. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem statt. Die Substanzen 4-Chlorbenzoessäure, 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirken sich bei einer Konzentration von 0,3 mM hemmend auf das Wachstum der Hefen aus.

Zusätzlich zu den getesteten Analoga der Salicylsäure wurde auch hier wie für AtNPR1 die Wirkung von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf die Assoziation der C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR3 getestet. Bei 0,3 mM wirkt Acibenzolarsäure induzierend auf die Assoziation der C-terminalen Domänen von AtNPR3. Allerdings ist die Wirkung nicht so stark wie die der Salicylsäure. INA weist lediglich eine sehr geringfügige induktive Wirkung auf, während BTH keinen Einfluss auf die induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen besitzt. Bei einer Konzentration von 0,03 mM bleibt das Bild im Wesentlichen erhalten, allerdings ist die Reporterogenaktivität im Allgemeinen relativ gering. Bei der geringen Konzentration von 0,003 mM ist kein Unterschied mehr zwischen Salicylsäure und den Substanzen erkennbar. Die Reporterogenaktivität hebt sich nicht mehr vom Hintergrund des Messsystems ab (Abb. 42). Die Wirkung von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Salicylsäure-

sensitive Reaktionen von Arabidopsis NPR1 und NPR3 ist ähnlich. Die beste Wirkung zeigt Acibenzolarsäure. Diese Wirkung ist aber nicht so effektiv wie die der Salicylsäure. Einen moderaten Effekt zeigt INA bei einer Konzentration von 0,3 mM. BTH hat in Hefe weder einen nennenswerten Effekt auf AtNPR1 noch auf AtNPR3.

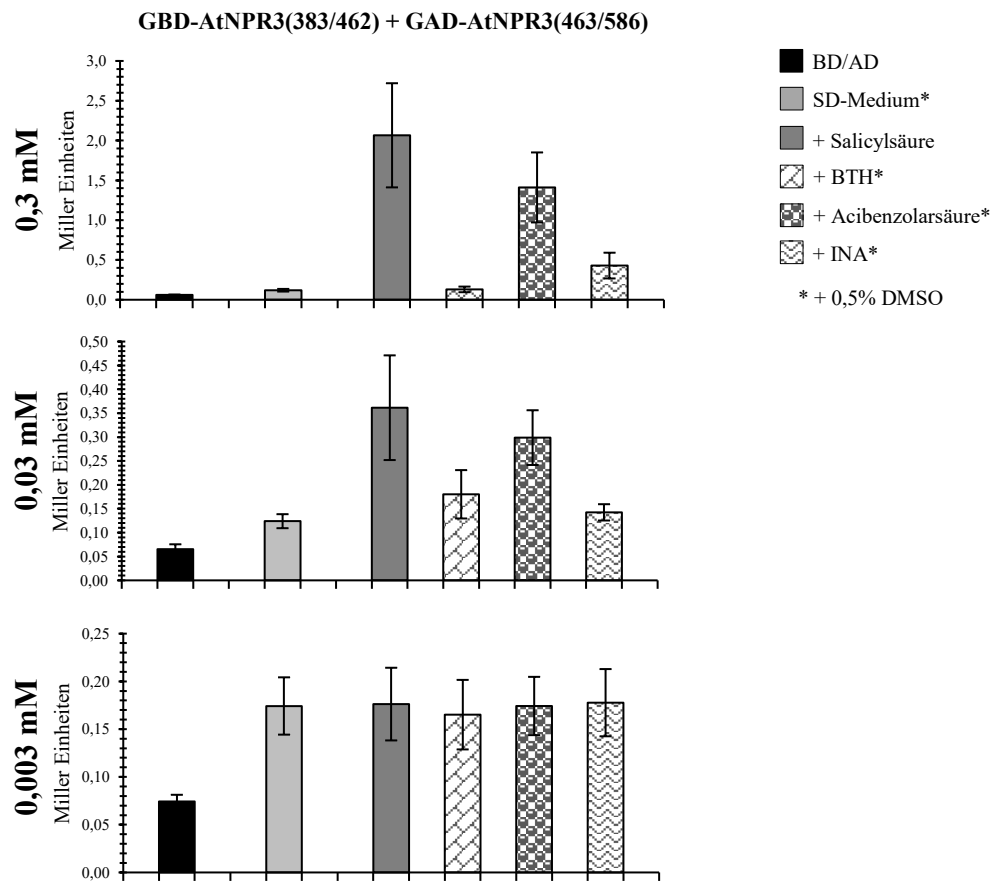


Abb. 42 Einfluss von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Arabidopsis NPR3. Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586) in Anwesenheit von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM im Hefe-Zwei-Hybridssystem.

4.3.4 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR4

Durch Salicylsäure lässt sich wie bei NPR3 die Affinität der C-terminalen Domänen von NPR4 induzieren (D.Neeley&U.M.Pfitzner, persönliche Mitteilung). Im Nachfolgenden sollte die Spezifität von Salicylsäure und die Wirkung analoger Verbindungen auf diese Interaktion getestet werden. Dabei wurden dieselben Verbindungen benutzt wie bereits in den vorangegangenen Versuchen.

Anders als NPR1 und NPR3 reagiert NPR4 sehr spezifisch auf Salicylsäure. Bei einer Konzentration von 0,3 mM ist deutlich zu sehen, dass außer Salicylsäure keine weitere Substanz die Fähigkeit besitzt, induzierend auf die Assoziation der C-terminalen Domänen von NPR4 zu wirken. Auch bei einer Konzentration von 0,03 mM bleibt das Bild bestehen, dass nur Salicylsäure einen Einfluss auf NPR4 hat. Bei 0,003 mM sind keine Unterschiede mehr zwischen Salicylsäure und der Kontrolle ohne Zusatz

erkennbar. Die Interaktion der C-terminalen Domänen von NPR4 ist sehr spezifisch für den Induktor Salicylsäure. Selbst die dichlorierten Verbindungen, welche sich in vorangegangenen Analysen als äußerst potent erwiesen, sind nicht in der Lage, bei dieser Interaktion induzierend zu wirken (Abb. 43A).

Weiterhin wird klar, dass die Wahrnehmung von Salicylsäure bei NPR4 nicht so sensibel erfolgt, wie beispielsweise bei NPR1. Für eine deutlich erkennbare Wirkung der Induktion der Affinität der beiden C-terminalen Domänen muss Salicylsäure in Konzentrationen $>0,03$ mM vorliegen. Zum direkten Vergleich der Wirkung von Salicylsäure auf die Interaktion von NPR4 mit den Interaktionen der weiteren NPR-Proteine wurde der EC_{50} -Wert für Salicylsäure ermittelt. Der EC_{50} -Wert liegt hier bei $66,59 \mu\text{M}$ (Abb. 43B). Dieser Wert liegt ungefähr im Mittelfeld innerhalb der untersuchten NPR-Proteine. Der EC_{50} -Wert für die Interaktion der C-terminalen Domänen von NPR3 ist mit $121,12 \mu\text{M}$ deutlich der höchste Wert, gefolgt von dem EC_{50} -Wert für NPR4 mit $66,59 \mu\text{M}$. Die Interaktionen von NPR1 und NPR2 mit IC_{50} - bzw. EC_{50} -Werten von $17,03 \mu\text{M}$ beziehungsweise $19,02 \mu\text{M}$ sind dabei mit Abstand die niedrigsten Werte und weisen darauf hin, dass die Dissoziation von NIMIN2 und NPR1 und die gesteigerte Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an NPR2 möglicherweise am sensibelsten innerhalb der untersuchten NPR-Proteine auf Salicylsäure reagieren.

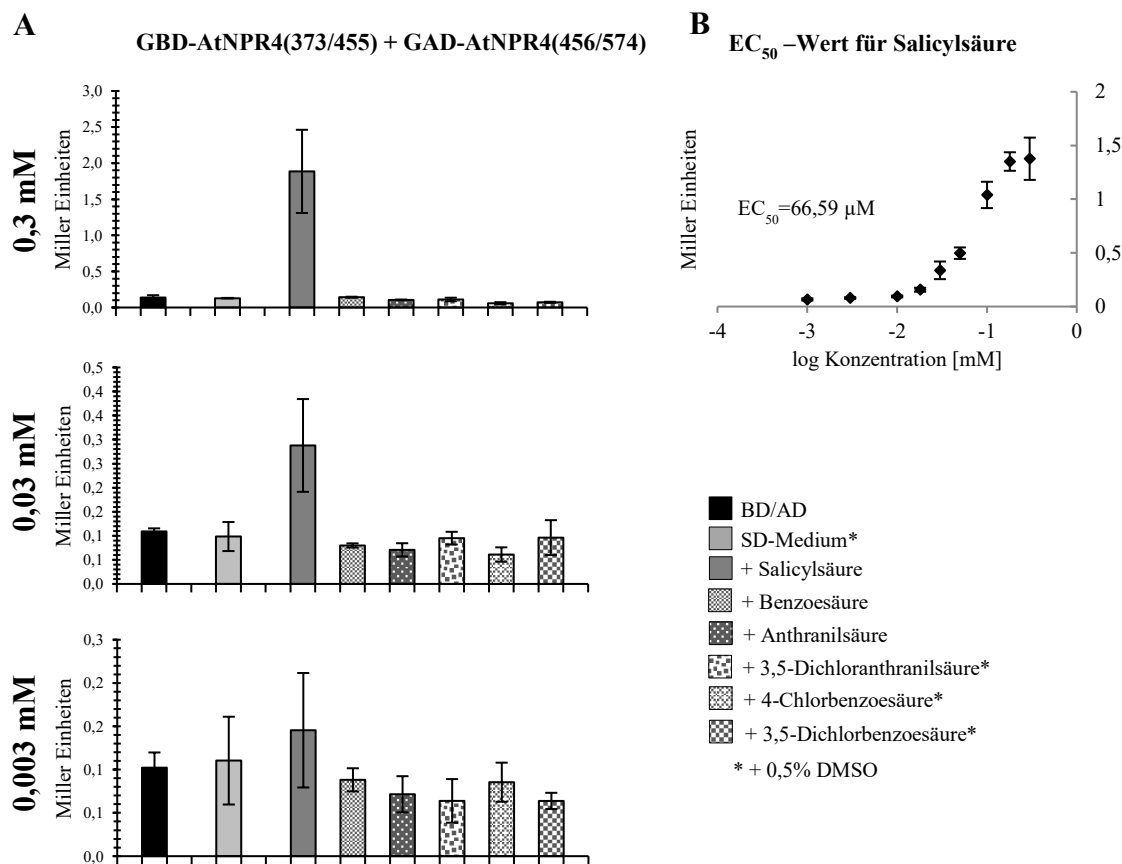


Abb. 43 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Arabidopsis NPR4. (A) Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR4(456/574) in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. (B) Abhängigkeit der Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR4(456/574) von Salicylsäure. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem statt. Die Substanzen 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirken sich bei einer Konzentration von 0,3 mM hemmend auf das Wachstum der Hefen aus.

Aufgrund der hohen Induktorspezifität der NPR4-Interaktion für Salicylsäure konnte in dem Zusammenhang kein EC_{50} -Wert für 3,5-Dichloranthranilsäure ermittelt werden.

Die Induktorspezifität von AtNPR4 sollte nun zusätzlich mittels der funktionellen Analoga der Salicylsäure BTH, Acibenzolarsäure und INA genauer charakterisiert werden. Bei 0,3 mM ist deutlich zu erkennen, dass die Assoziation der C-terminalen Domänen von NPR4 nur durch Salicylsäure induziert werden kann. Auch bei 0,03 mM ist dieser Effekt zu erkennen, auch wenn bei dieser Konzentration und bei 0,003 mM die allgemeine Reporterogenaktivität bereits sehr gering ist. Bei 0,003 mM haben weder Salicylsäure, noch BTH, Acibenzolarsäure und INA einen Effekt auf die induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen. Außer Salicylsäure hat keine weitere der getesteten Substanzen einen Einfluss auf AtNPR4 (Abb. 44). AtNPR4 reagiert äußerst spezifisch auf Salicylsäure.

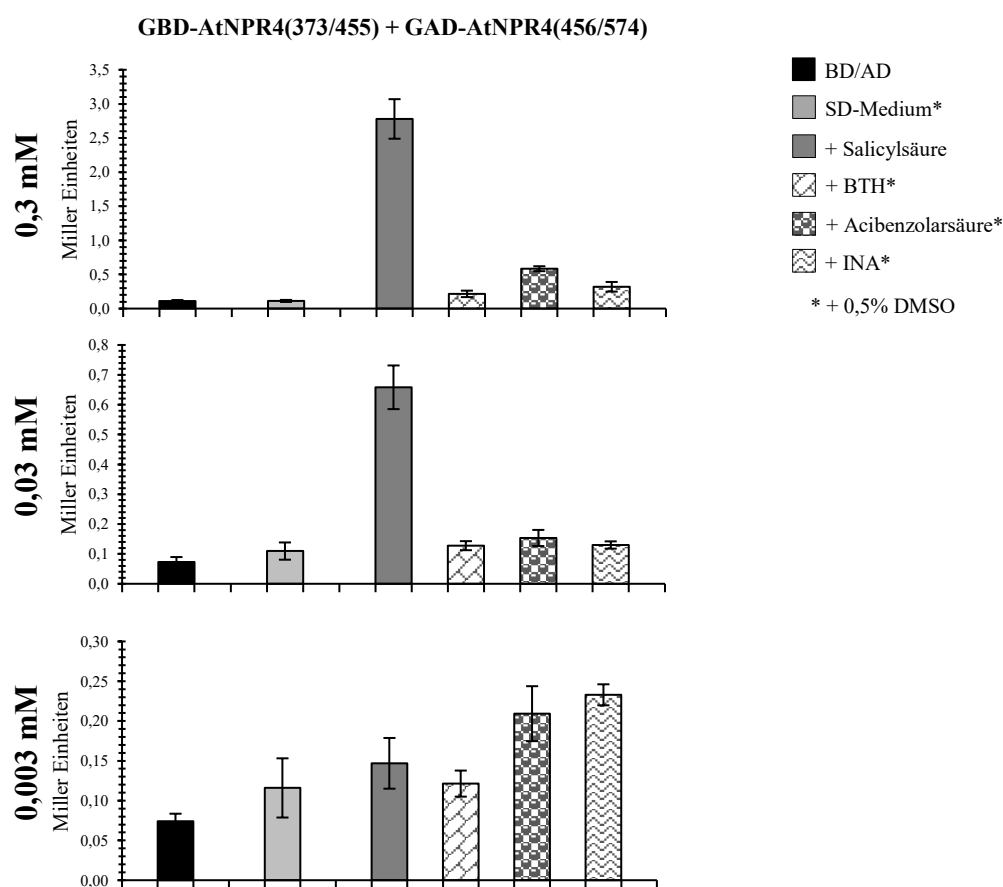


Abb. 44 Einfluss von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Arabidopsis NPR4. Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR4(456/574) in Anwesenheit von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03mM und 0,003 mM im Hefe-Zwei-Hybridssystem.

Wie bereits bekannt ist, ist bei Tabak NPR1 und NPR3 sowie Arabidopsis NPR1 und NPR2 das Arginin R innerhalb des xENRV-Motivs für die Wahrnehmung der Salicylsäure essentiell (Maier *et al.*, 2011; 4.1.3.1; 4.3.2). Bei der induzierten Affinität der C-terminalen Domänen von NPR4 handelt es sich ebenfalls um eine Salicylsäure-sensitive Reaktion. Analog zu den bisher genannten Vertretern der NPR-Proteinfamilie besitzt NPR4 im C-terminalen Bereich ein xExRV-Motiv mit dem konservierten Arginin. Durch *in vitro* Mutagenese wurden drei verschiedene Mutanten generiert (Abb. 45A). Diese dienten zur

Überprüfung, ob das Arginin ebenfalls essentiell für die Salicylsäure-Wahrnehmung von AtNPR4 ist und ob die Position des Arginins innerhalb des xExRV-Motivs eine Rolle spielt. Die Analyse der Mutanten erfolgte im heterologen Hefe-Zwei-Hybridsystem. Die verwendete Konzentration der Salicylsäure lag bei 0,3 mM. Die Mutanten wurden jeweils direkt mit der Wildtyp-Situation verglichen.

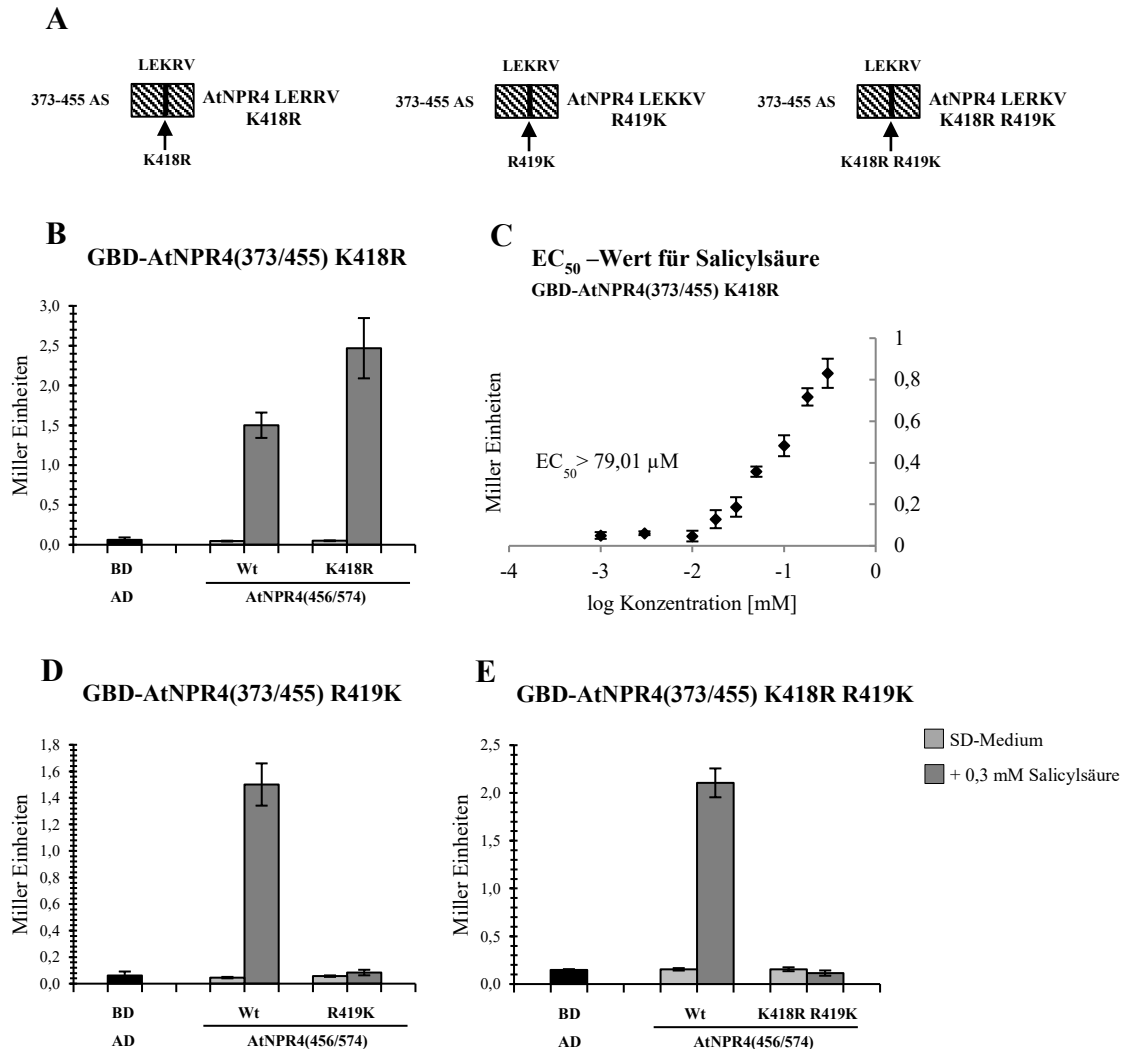


Abb. 45 Einfluss von Aminosäureaustauschen im LEKRV-Motiv von Arabidopsis NPR4 auf die Wahrnehmung von Salicylsäure. (A) Schematische Darstellung von AtNPR4(373/455) K418R, AtNPR4(373/455) R419K und AtNPR4(373/455) K418R R419K. (B) Interaktion von AtNPR4(373/455) bzw. AtNPR4(373/455) K418R und AtNPR4(456/574). (C) Abhängigkeit der Interaktion AtNPR4(373/455) K418R und AtNPR4(456/574) von Salicylsäure. (D) Test auf Interaktion zwischen AtNPR4(373/455) bzw. AtNPR4(373/455) R419K und AtNPR4(456/574). (E) Test auf Interaktion zwischen AtNPR4(373/455) bzw. AtNPR4(373/455) K418R R419K und AtNPR4(456/574). Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Bei der Mutante NPR4(373/455) K418R wurde anstelle des Lysins ein Arginin eingebracht, sodass zwei Arginine innerhalb des LEKRV-Motivs vorlagen und das LEKRV-Motiv zum LERRV-Motiv umgewandelt wurde. Im Hefe-Zwei-Hybrid-Experiment war die Stärke der Induktion der Affinität der beiden C-terminalen Domänen von NPR4 durch Salicylsäure ungefähr 1,5-mal höher als bei der Wildtyp-Situation (Abb. 45B). Um zu überprüfen, ob das zusätzliche Arginin anstelle des Lysins eventuell eine verstärkende Wirkung auf die Affinität der C-terminalen Domänen ausübt, wurde für diese Interaktion der EC_{50} -Wert für Salicylsäure ermittelt. Mit einem Wert von 79,01 μM (Abb. 45C)

ist er vergleichbar mit dem Wert von 66,59 μM (Abb. 43B) der Wildtyp-Situation. Demnach hat das doppelte Vorliegen von Arginin in dem LEKRV-Motiv keine affinitätssteigernde Wirkung auf die C-terminalen Domänen. Die Mutante NPR4(373/455) R419K ist eine Anlehnung an die *nimI-4* Mutante in Arabidopsis NPR1 (Ryals *et al.* 1997; Maier *et al.* 2011). Mit Hilfe dieser Mutante sollte in Erfahrung gebracht werden, ob das Arginin im LEKRV-Motiv auch in NPR4 eine essentielle Rolle bei der Salicylsäure-Wahrnehmung spielt. Wie Abbildung 45D zeigt, wird in der Wildtyp-Situation die Affinität der C-terminalen Domänen durch Salicylsäure induziert, wohingegen bei der Mutante NPR4(373/455) R419K keine Interaktion mehr messbar ist. Das Arginin im LEKRV-Motiv ist also auch bei NPR4 essentiell für die Wahrnehmung von Salicylsäure. Anhand der Doppelmutante NPR4(373/455) K418R R419K sollte ermittelt werden, ob die bloße Anwesenheit des Arginins innerhalb des LEKRV-Motivs für die Wahrnehmung der Salicylsäure ausreicht oder die genaue Position von Bedeutung ist. Die Assoziation der beiden C-terminalen Domänen lässt sich in der Wildtyp-Situation durch Salicylsäure induzieren. Unter Beteiligung der Doppelmutante NPR4(373/455) K418R R419K kann die Assoziation jedoch nicht mehr durch Salicylsäure induziert werden (Abb. 45E). Das Arginin muss sich also exakt auf dieser Position innerhalb des LEKRV-Motivs befinden, seine Anwesenheit alleine reicht nicht aus.

4.3.5 Interaktion zwischen der xExRV-Domäne und der NIMIN-Bindedomäne unterschiedlicher Arabidopsis NPR-Proteine

Im Gegensatz zu Tabak NPR1 sind die C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von Arabidopsis NPR1 nicht in der Lage, miteinander unter Einfluss von Salicylsäure zu interagieren (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Die C-terminalen Domänen der Paralogen NPR3 und NPR4 zeigen jedoch eine Salicylsäure-induzierbare Affinität zueinander. In einem Hybrid-Experiment konnte gezeigt werden, dass die NIMIN-Bindedomäne von NPR1 unter Salicylsäure-Einfluss chimäre Interaktionen mit den LEKRV-Domänen von NPR3 und NPR4 eingehen kann. Unter Beteiligung der LENRV-Domäne von NPR1 ist solch eine chimäre Interaktion mit den NIMIN-Bindedomänen von NPR3 und NPR4 nicht möglich. Die NPR1 LENRV-Domäne scheint inaktiv zu sein (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR2 sind ebenso wie die von NPR1 nicht in der Lage, miteinander in Anwesenheit von Salicylsäure zu interagieren. In einem weiteren Hybrid-Experiment sollte untersucht werden, ob sich die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR2 entsprechend denen von NPR1 verhalten. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die bereits im Vorfeld getesteten Substanzen neben Salicylsäure auf die chimären Interaktionen auswirken. Abweichend von der Standardkonzentration von 0,3 mM wurden die chlorierten Substanzen mit einer geringeren Konzentration von 0,03 mM eingesetzt, da sie sich bei 0,3 mM negativ auf das Hefewachstum auswirken (Abb. 46).

Die LENRV-Domäne von Arabidopsis NPR1 kann weder mit den NIMIN-Bindedomänen von NPR3 und NPR4 noch mit der NIMIN-Bindedomäne von NPR2 chimäre Interaktionen unter Salicylsäure-Einfluss eingehen. Im Fall der C-terminalen Domänen von NPR2 verhält es sich genau andersrum. Hier ist unter Beteiligung der NIMIN-Bindedomäne von NPR2 weder eine chimäre Interaktion mit der LENRV-Domäne von NPR1 noch mit den LEKRV-Domänen von NPR3 und NPR4 durch Salicylsäure induzierbar. Mit der YENRV-Domäne von NPR2 allerdings sind jegliche chimäre Interaktionen unter Salicylsäure-Einfluss mit den NIMIN-Bindedomänen der untersuchten Mitglieder der NPR-Proteinfamilie möglich. Selbst die Interaktion mit der NIMIN-Bindedomäne von NPR1 ist durch Salicylsäure induzierbar. Überraschenderweise ist gerade diese chimäre Interaktion von besonders hoher Intensität.

In Bezug auf die Wirkung der getesteten Substanzen ist eine Tendenz zu den jeweiligen wildtypischen Interaktionen erkennbar. In 4.3.1 wurde klar, dass die Dissoziation der Interaktion von NPR1 und NIMIN2 nicht sehr spezifisch für Salicylsäure ist, sondern dass analoge Verbindungen, besonders die dichlorierten Substanzen, einen gleichwertigen oder sogar größeren Einfluss auf die Interaktion hatten. Dies kommt auch bei den chimären Interaktionen mit der NIMIN-Bindedomäne von NPR1 zum Ausdruck. Besonders bei der Interaktion mit der YENRV-Domäne von NPR2 kommt die Vielfalt der potentiellen Induktoren zum Vorschein: Neben den dichlorierten Verbindungen 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirkt auch die sonst eher etwas schwach wirkende Benzoesäure stark induzierend (Abb. 46A). Bei der chimären Interaktion mit der LEKRV-Domäne von NPR3 ist diese Eigenschaft der Vielfältigkeit der Induktoren eher bedingt ausgeprägt. Hier ähnelt das Induktorenspektrum eher der wildtypischen Interaktion der C-terminalen Domänen von NPR3 (Abb. 46B). Unter Beteiligung der LEKRV-Domäne von NPR4 zeigt sich allerdings die Eigenschaft der NIMIN-Bindedomäne von NPR1 wieder, die Affinität der C-terminalen Domänen durch ein breit gefächerteres Substanzspektrum induzieren zu können. Anders als die strikt Salicylsäure-spezifische wildtypische Interaktion der C-terminalen Domänen von NPR4, ist die chimäre Interaktion durch alle eingesetzten Substanzen mit Ausnahme von 4-Chlorbenzoesäure induzierbar (Abb. 46C).

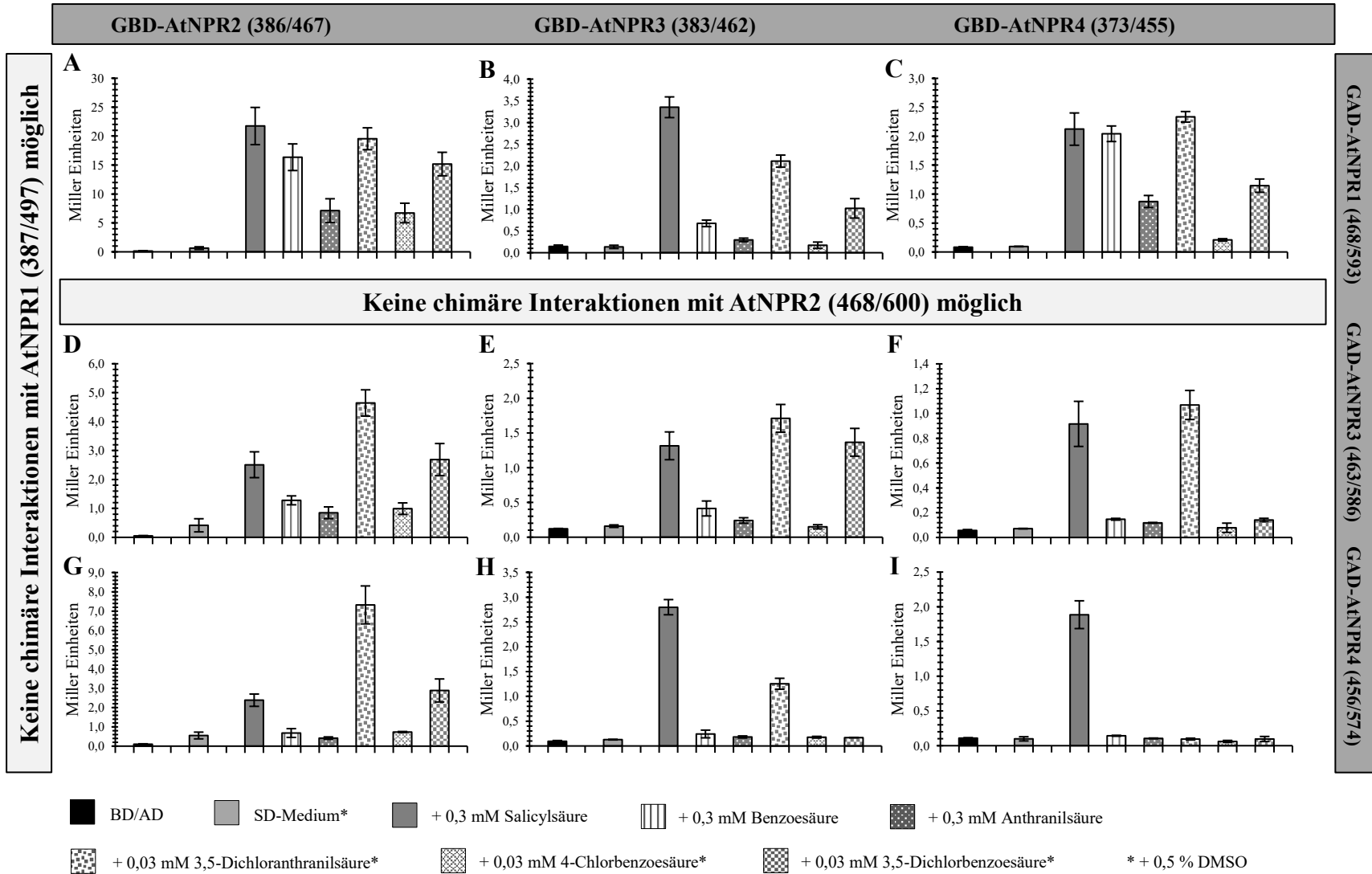
Unter Beteiligung der NIMIN-Bindedomäne von NPR3 ist die Vielfältigkeit der Induktoren bei der chimären Interaktion mit der YENRV-Domäne von NPR2 nicht mehr ganz so stark ausgeprägt wie bei der Interaktion mit der NIMIN-Bindedomäne von NPR1. Allerdings wirken alle verwendeten Substanzen weiterhin induzierend. Die dichlorierten Substanzen 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure zeigen die stärkste Wirkung (Abb. 46D). Im Falle der LEKRV-Domäne von NPR4 wirkt neben Salicylsäure nur die 3,5-Dichloranthranilsäure auf die Affinität der C-terminalen Domänen induzierend (Abb. 46F).

Wird anstelle der NIMIN-Bindedomäne von NPR3 die von NPR4 bei der chimären Interaktion mit der YENRV-Domäne von NPR2 verwendet, verringert sich das Induktorenspektrum wesentlich. Neben Salicylsäure wirken lediglich noch die dichlorierten Verbindungen induzierend. Wobei die

3,5-Dichloranthranilsäure dabei mit einer relativ starken Wirkung hervortritt (Abb. 46G). Die chimäre Interaktion zwischen der LEKRV-Domäne von NPR3 und der NIMIN-Bindedomäne von NPR4 verhält sich entsprechend der chimären Interaktion zwischen LEKRV-Domäne von NPR4 und der NIMIN-Bindedomäne von NPR3: Neben Salicylsäure wirkt lediglich noch 3,5-Dichloranthranilsäure auf die Interaktion der C-terminalen Domänen induzierend (Abb. 46H). Auf die wildtypischen Interaktionen von NPR3 und NPR4 in Bezug auf die getesteten Substanzen wurde bereits in 4.3.3 und 4.3.4 im Detail eingegangen (Abb. 46E und I).

Die Induktorspezifität der chimären Interaktionen der C-terminalen Domänen ist eine Kombination aus den jeweiligen Interaktionspartnern. Die Mannigfaltigkeit der Induktoren unter Beteiligung der YENRV-Domäne von NPR2 bei den chimären Interaktionen der C-terminalen Domänen, deutet darauf hin, dass NPR2 ebenso wie NPR1 auf eine Vielzahl von weiteren analogen Verbindungen der Salicylsäure reagiert. Besonders deutlich wird diese Eigenschaft bei der Interaktion mit der NIMIN-Bindedomäne von NPR1.

Abb. 46 Einfluss analoger Verbindungen von Salicylsäure auf die chimäre Interaktion zwischen den C-terminalen Ddomänen der Arabidopsis NPR-Proteine in Hefe. (A) Interaktion von AtNPR2(385/467) und AtNPR1(468/593). (B) Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR1(468/593). (C) Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR1(468/593). (D) Interaktion von AtNPR2(385/467) und AtNPR3(463/586). (E) Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR3(463/586). (F) Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR3(463/586). AtNPR3(463/586). (G) Interaktion von AtNPR2(385/467) und AtNPR4(456/574). (H) Interaktion von AtNPR3(383/462) und AtNPR4(456/574). (I) Interaktion von AtNPR4(373/455) und AtNPR4(456/574). Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in Anwesenheit von 0,3 mM Salicylsäure, 0,3 mM Benzoessäure, 0,3 mM Anthranilsäure, 0,03 mM 3,5-Dichloranthranilsäure, 0,03 mM 4-Chlorbenzoessäure und 0,03 mM 3,5-Dichlorbenzoessäure statt.



4.4 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR-Proteine

Salicylsäure hat einen direkten Effekt auf Tabak NPR-Proteine. Für Tabak NPR1 sind drei Salicylsäure-sensitive Reaktionen bekannt. Durch Salicylsäure wird das Transaktivierungspotential von NtNPR1 verstärkt und die Dissoziation von NtNPR1-NIMIN-Interaktionen bewirkt (Maier *et al.*, 2011). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne eine Salicylsäure-induzierbare Affinität zueinander besitzen. (D.Neeley&U.M.Pfitzner, persönliche Mitteilung). Ferner ist auch für Tabak NPR3 eine Salicylsäure-sensitive Reaktion bekannt. NPR3 kann ebenso wie NPR1 mit NIMIN-Proteinen interagieren. Diese Interaktion wird auch durch die Anwesenheit von Salicylsäure negativ beeinflusst (Maier *et al.*, 2011).

Neben Salicylsäure und den bereits in Kapitel 4.3 beschriebenen Verbindungen sind weitere Substanzen bekannt, eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr zu übernehmen oder als *PR-1*-Induktoren zu fungieren. Salicylsäure, Azelainsäure und Glycerol-3-Phosphat G3P bilden zwei parallele Signalwege aus, welche für die Induktion der systemisch aktivierten Resistenz gleichzeitig benötigt werden. Der Azelainsäure-G3P-Signalweg wirkt unterhalb der freien Radikalen Stickoxid NO und den reaktiven Sauerstoffspezies ROS, welche in einer Art Rückkopplung miteinander arbeiten (Gao *et al.*, 2014; Wendehenne *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2017). Azelainsäure induziert die Expression von Genen für die G3P-Biosynthese (Yu *et al.*, 2013). G3P ist ein phosphoryliertes Zuckerderivat, das eine wichtige Rolle in der ETI spielt, welche zur SAR führt. Des Weiteren ist es bei der Abwehr des hemibiotrophen Pilz *Colletotrichum higginsianum* von Bedeutung (Chanda *et al.*, 2008). Die Akkumulation von G3P geht der Akkumulation von Salicylsäure in infiziertem Gewebe voran. Mutanten, welche kein G3P bilden können, sind in der Ausbildung der SAR beeinträchtigt. Durch eine exogene Gabe von G3P kann diese Beeinträchtigung allerdings wieder aufgehoben werden (Chanda *et al.* 2011). In Folge einer bakteriellen Infektion steigt auch die Akkumulation von Azelainsäure in der Pflanze an. Trotz nachgewiesener schwacher antimikrobieller Wirkung *in vitro* gegen Bakterien, beruht die durch Azelainsäure induzierte Resistenz nicht auf der direkten Inhibierung der Pathogene. Die Pflanzen müssen im Vorfeld der Infektion mit dieser Substanz behandelt werden, sodass sich die Wirkung der Dicarbonsäure entfalten kann. In Folge einer Infektion können in Azelainsäure-behandelten Pflanzen größere Mengen von gebildeter Salicylsäure und *PR1* Transkripten im Vergleich zu Schein-behandelten Pflanzen nachgewiesen werden. Azelainsäure fördert die Salicylsäureproduktion und die Expression von Salicylsäure-assozierten Genen in Pflanzen im Falle einer Infektion (Jung *et al.*, 2009).

Salicylsäure kann in der Pflanze über zwei verschiedene Wege synthetisiert werden. Ausgehend von der Shikimisäure erfolgt die Biosynthese entweder über den Isochorismatweg (Wildermuth *et al.*, 2001; Catinot *et al.*, 2008) oder den Phenylalaninweg. Der verbreitetste Weg der Salicylsäuresynthese führt über das Phenylalanin (Khan *et al.*, 2015). Durch das Enzym Phenylalaninammoniumlyase PAL entsteht

aus Phenylalanin Zimtsäure. Aus Zimtsäure entsteht über zwei verschiedene enzymatische Wege entweder Coumarinsäure oder Benzoessäure. Aus diesen beiden Produkten wird letztendlich Salicylsäure gebildet (El-Basyouni *et al.*, 1964; Klämbt *et al.*, 1962; Leon *et al.*, 1995; Silverman *et al.*, 1995; Yalpani *et al.*, 1993). Die Zimtsäure ist nicht nur ein Vorläufer der Salicylsäure, sondern wird auch unter Stressbedingungen in der Pflanze gebildet. Das Phenylpropanoid ist an der Beseitigung der Schäden durch abiotischen Stress beteiligt (Wang *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2013).

β -Aminobuttersäure BABA ist eine nicht-proteinogene Aminosäure. Weder BABA selbst noch Metaboliten davon zeigen eine direkte antimikrobielle Wirkung (Cohen&Gisi, 1994; Cohen *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1996; Sunwoo *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 1999; Zimmerli *et al.*, 2000). Anders als bei Salicylsäure induziert die Behandlung von Pflanzen mit BABA nicht die Akkumulation von *PR1* mRNA. Durch eine BABA-Behandlung der Pflanze im Vorfeld eines Pathogenbefalls wird diese allerdings konditioniert und ist in der Lage, diese Abwehrgene schneller zu induzieren als unbehandelte Pflanzen. BABA verstärkt also den Abwehrmechanismus der Pflanze ohne Veränderungen vor der Infektion zu bewirken (Zimmerli *et al.*, 2000). Dieses Phänomen wurde als Konditionierung oder Potenzierung beschrieben (Kaus *et al.*, 1993; Kessmann *et al.*, 1994; Katz *et al.*, 1998).

Pipecolinsäure ist ebenfalls eine nicht-proteinogene Aminosäure, ein Katabolit des Lysins. In einigen Formen der induzierten Pflanzenabwehr ist Pipecolinsäure ein entscheidender Regulator. Die Akkumulation von Pipecolinsäure erfolgt in *A. thaliana* Pathogen-induziert sowohl in den inokulierten Blättern und deren Blattstielen als auch in nicht direkt an dem Pathogenbefall beteiligten Blättern der Pflanze (Návarová *et al.*, 2012). *ALD1* (*AGD2-LIKE-DEFENSE-RESPONSE-PROTEIN1*) kodiert für eine Aminotransferase, welche eine hohe *in vitro* Aktivität für Lysin aufweist (Song *et al.*, 2004b). Bei Pflanzen mit defektem *ALD1*-Gen ist die induzierte Pipecolinsäurebiosynthese vollständig unterbunden (Návarová *et al.*, 2012). *ald1* Pflanzen sind nicht mehr in der Lage, sowohl die systemisch aktivierte Resistenz SAR einzuleiten als auch die BABA-induzierte Resistenz gegen *P. syringae* zu etablieren (Song *et al.*, 2004a; Návarová *et al.*, 2012). Neben *ALD1* wurde *SARD4* (*SAR-DEFICIENT4*) als entscheidendes Enzym und kritischer Faktor der Pipecolinsäuresynthese identifiziert. Lysin wird durch *ALD1* zu Δ^1 -Piperidin-2-carboxylsäure umgesetzt (P2C). Dieser Katabolit des Lysins wird mit Hilfe von *SARD4* zu Pipecolinsäure reduziert. Nach Inokulation von *sard4*-Pflanzen mit *P. syringae* ist in systemischen Blattgewebe eine beträchtliche Reduktion der Akkumulation von Salicylsäure zu beobachten (Ding *et al.*, 2016).

Die beschriebenen Verbindungen stehen im Zusammenhang mit der Etablierung der SAR (Abb. 47). Einige davon haben eine konditionierende Wirkung auf die Pflanze und können eine verstärkte Akkumulation von Salicylsäure und *PR1*-Proteinen infolge einer Infektion bewirken oder stehen in direkter Verbindung zur Salicylsäurebiosynthese. Anders als die bereits getesteten Substanzen, wie zum Beispiel BTH, INA und 3,5-Dichloranthranilsäure, unterscheiden sich diese Verbindung mit Ausnahme der Zimtsäure strukturell von Salicylsäure. Im folgenden Kapitel sollte geprüft werden, ob diese

Substanzen einen direkten Effekt auf Tabak NPR1 und NPR3 in Hefe zeigen und *in planta* fähig sind, den *PR1a*-Promotor zu induzieren. Des Weiteren sollte auch der Einfluss struktureller Analoga von Salicylsäure auf Tabak NPR1 und NPR3 analysiert werden. Zu diesen Substanzen gehören die bereits beschriebenen Verbindungen INA, BTH, Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure 3,5-Dichloranthranilsäure und 4-Chlorbenzoesäure. Die Analyse fand dabei im heterologen Hefesystem analog zu den bereits in Kapitel 4.3 erläuterten Bedingungen statt.

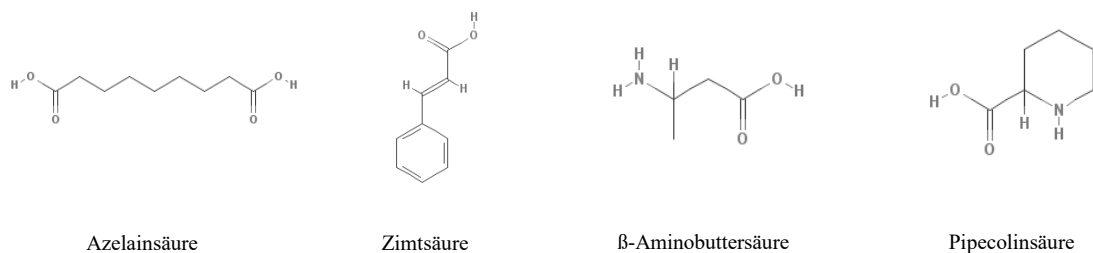


Abb. 47 Strukturformeln von Azelainsäure, Zimtsäure, β-Aminobuttersäure und Pipecolinsäure. Strukturformel von Azelainsäure (PubChem CID 2266); Strukturformel von Zimtsäure (PubChem CID 444539); Strukturformel von β-Aminobuttersäure (PubChem CID 10932); Strukturformel von Pipecolinsäure (PubChem CID 849).

4.4.1 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR1

Zunächst wurde der Einfluss von Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und Zimtsäure im Vergleich zur Salicylsäure auf Tabak NPR1 untersucht. Zum einen wurde der Einfluss auf die Affinität der C-terminalen Domänen LENRV und NIMIN2-Bindedomäne getestet und zum anderen auf die Dissoziation der Interaktion von NtNPR1 und NtNIMIN2a.

Wie in Abbildung 48A zu sehen ist, beeinflussen die untersuchten Substanzen die Affinität der C-terminalen Domänen LENRV und NIMIN2-Bindedomäne von NtNPR1 unterschiedlich. Keinen Einfluss auf diese Interaktion zeigte Zimtsäure. Auch die Anthranilsäure zeigte bei Konzentrationen <0,3 mM nur noch eine geringe Wirkung. 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure bewegen sich hinsichtlich ihres Einflusses auf diese Interaktion im Mittelfeld. Benzoesäure und Salicylsäure hingegen zeigten einen starken positiven Einfluss auf die Affinität der C-terminalen Domänen. Das dichlorierte Derivat der Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, zeigte die stärkste Wirkung auf die Interaktion. Selbst bei Konzentrationen von 0,003 mM wirkte es induzierender auf die Affinität der C-terminalen Domänen als Salicylsäure selbst.

Analog dazu wurde auch der Einfluss dieser Substanzen auf die Interaktion zwischen NtNPR1 und NtNIMIN2a getestet (Abb. 48B). Es wurden dieselben Substanzen, mit Ausnahme von Zimtsäure, wie in Abbildung 48A verwendet. Bei einer Konzentration von 0,3 mM zeigte sich kein Unterschied zwischen den Substanzen und Salicylsäure in Hinsicht auf die dissoziierende Wirkung auf die Interaktion zwischen NtNPR1 und NtNIMIN2a. Bei Betrachtung der niedrigeren Konzentrationen wird

deutlich, dass sich die Substanzen auch hinsichtlich dieser Art von Interaktion ähnlich wie in Abbildung 48A verhalten. Anthranilsäure zeigt auch hier den geringsten Effekt, gefolgt von 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure. Benzoe- und Salicylsäure haben weiterhin einen starken negativen Effekt auf die NtNPR1-NtNIMIN2a- Interaktion. 3,5-Dichloranthranilsäure zeigte auch in diesem Fall die stärkste Wirkung.

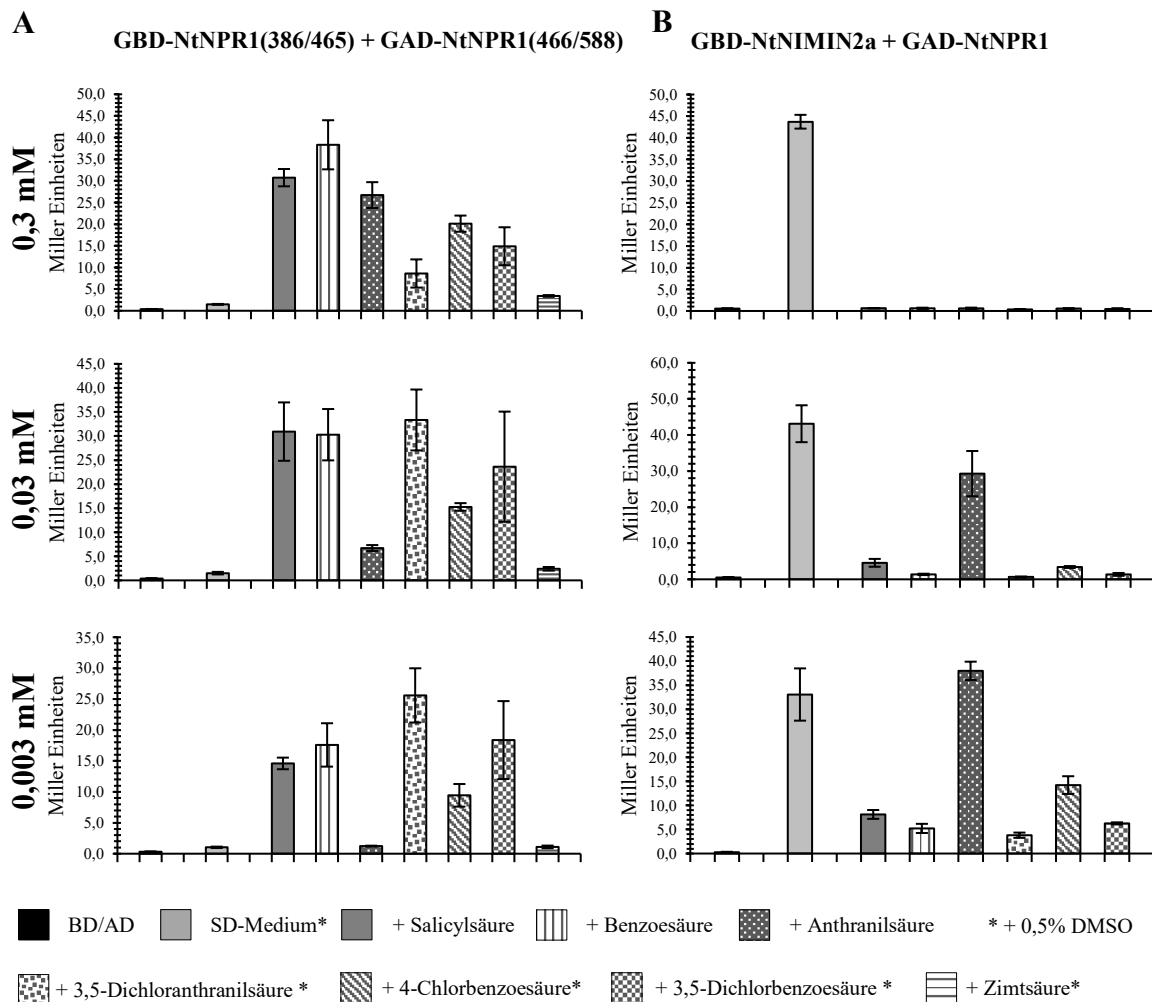


Abb. 48 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR1. (A) Interaktion von NtNPR1(386/465) und NtNPR1(466/588) (B) Interaktion von NtNIMIN2a und NtNPR1. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoessäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM statt. Die Substanzen 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirken sich bei einer Konzentration von 0,3 mM hemmend auf das Wachstum der Hefen aus.

3,5-Dichloranthranilsäure zeigte in beiden Versuchen einen stärkeren Effekt auf die Interaktionen von Tabak NPR1 als Salicylsäure. Zum direkten Vergleich der Wirkungen beider Substanzen wurden IC_{50} - beziehungsweise EC_{50} -Werte für die untersuchten Interaktionen bestimmt. Ebenso wurde für Salicylsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure und zusätzlich Benzoessäure die EC_{50} -Werte für das Transaktivierungspotential von Tabak NPR1 ermittelt. Der IC_{50} -Wert für die Dissoziation von NtNPR1 und NtNIMIN2a beträgt für Salicylsäure $0,7 \mu\text{M}$ und für 3,5-Dichloranthranilsäure $0,28 \mu\text{M}$ (Abb. 49A). Der EC_{50} -Wert für die Assoziation der C-terminalen Domänen von NtNPR1 liegt für 3,5-Dichloranthranilsäure mit $1,0 \mu\text{M}$ niedriger als für Salicylsäure mit $3,16 \mu\text{M}$ (Abb. 49B). Dieser

direkte Vergleich der Wirkung zeigt, was sich anhand der Analyse in Abbildung 48 im Vorfeld vermuten ließ: 3,5-Dichloranthranilsäure wirkt stärker als Salicylsäure auf die untersuchten Interaktionen von NtNPR1 in Hefe. Die verstärkende Wirkung von Salicylsäure, Benzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure auf das Transkriptionspotential von NtNPR1 in Hefen unterscheidet sich allerdings nur marginal zwischen den Substanzen. Salicylsäure hat den besten Effekt mit einem EC_{50} -Wert von $0,45 \mu\text{M}$, gefolgt von Benzoesäure mit $0,66 \mu\text{M}$ und 3,5-Dichloranthranilsäure mit $0,7 \mu\text{M}$ (Abb. 49C).

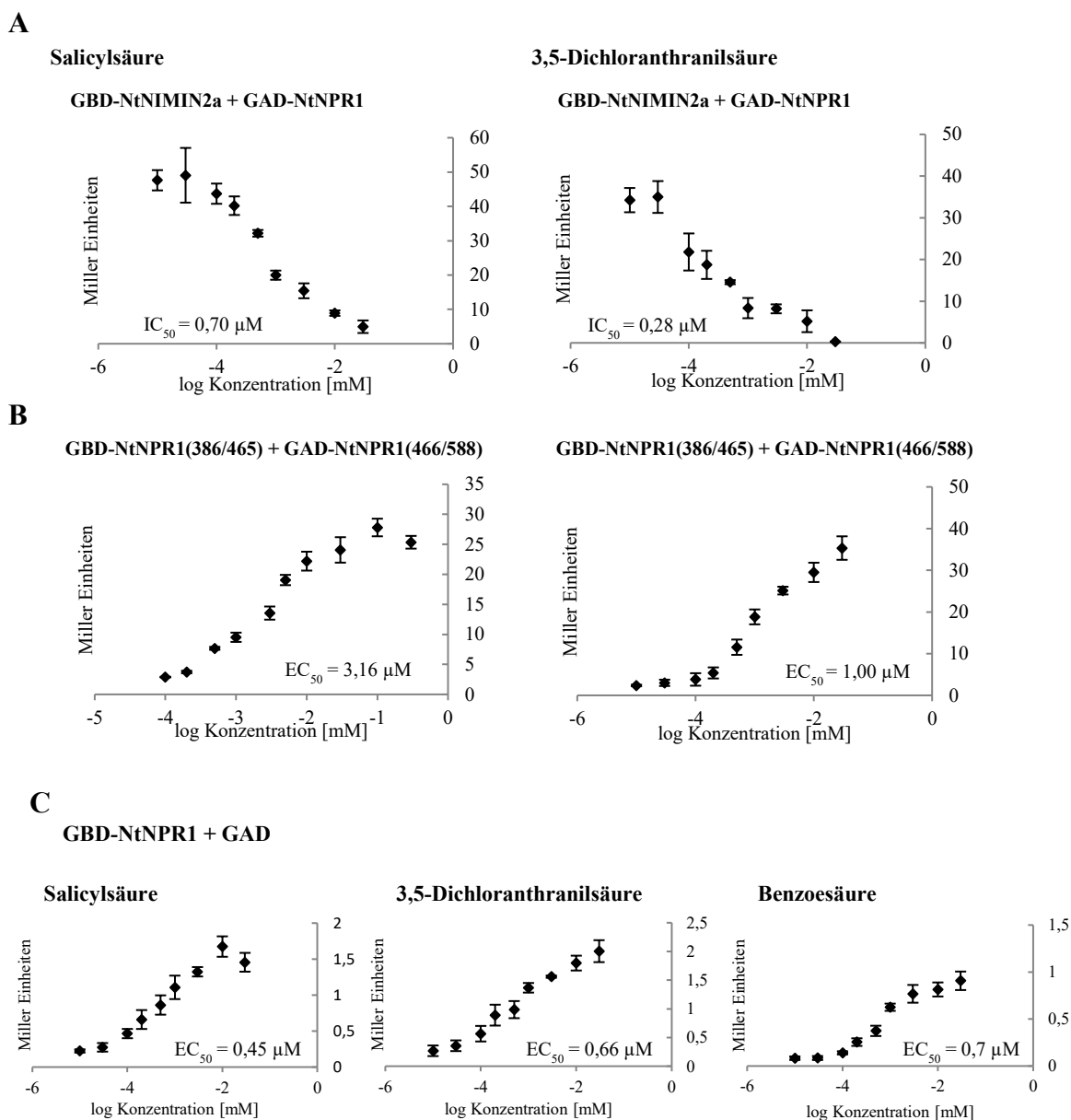


Abb. 49 IC_{50} und EC_{50} Werte von Tabak NPR1 für Salicylsäure, Benzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure. (A) Abhängigkeit der Interaktion NtNIMIN2a und NtNPR1 von Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure. (B) Abhängigkeit der Interaktion NtNPR1(386/465) und NtNPR1(466/588) von Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure. (C) Abhängigkeit der Transkriptionsaktivität von GAL4BD-NtNPR1 von Salicylsäure, Benzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure. Die Interaktionen fanden im heterologen Hefesystem statt.

BTH und INA induzieren ebenso wie Salicylsäure *PR-1* Genexpression in Pflanzen (Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996; Vernooij *et al.*, 1995). Im heterologen Hefe-Zwei-Hybridsystem wurde der Einfluss dieser beiden Substanzen in drei verschiedenen Konzentrationen (0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM) auf die Dissoziation von NtNPR1 und NtNIMIN2a sowie auf die Assoziation beider C-terminalen Domänen LENRV und NIMIN2-Bindedomäne untersucht. Zusätzlich zu INA und BTH wurde noch Acibenzolarsäure verwendet (Abb. 36). Wie in Abbildung 50A zu sehen ist, ist bei einer Konzentration von 0,3 mM kein wesentlicher Unterschied zwischen den Substanzen und Salicylsäure hinsichtlich ihres Einflusses auf die Assoziation der C-terminalen Domänen von Tabak NPR1 erkennbar. Bei niedrigeren Konzentrationen (0,03 mM und 0,003 mM) werden allerdings Unterschiede sichtbar. Im Gegensatz zu Salicylsäure nimmt der Effekt von BTH, Acibenzolarsäure und INA deutlich ab. Bei einer Konzentration von 0,003 mM zeigt Acibenzolarsäure noch den stärksten Effekt auf die Assoziation der C-terminalen Domänen von NtNPR1. Allerdings ist dieser Effekt trotzdem signifikant schwächer als die Wirkung von Salicylsäure auf diese Interaktion.

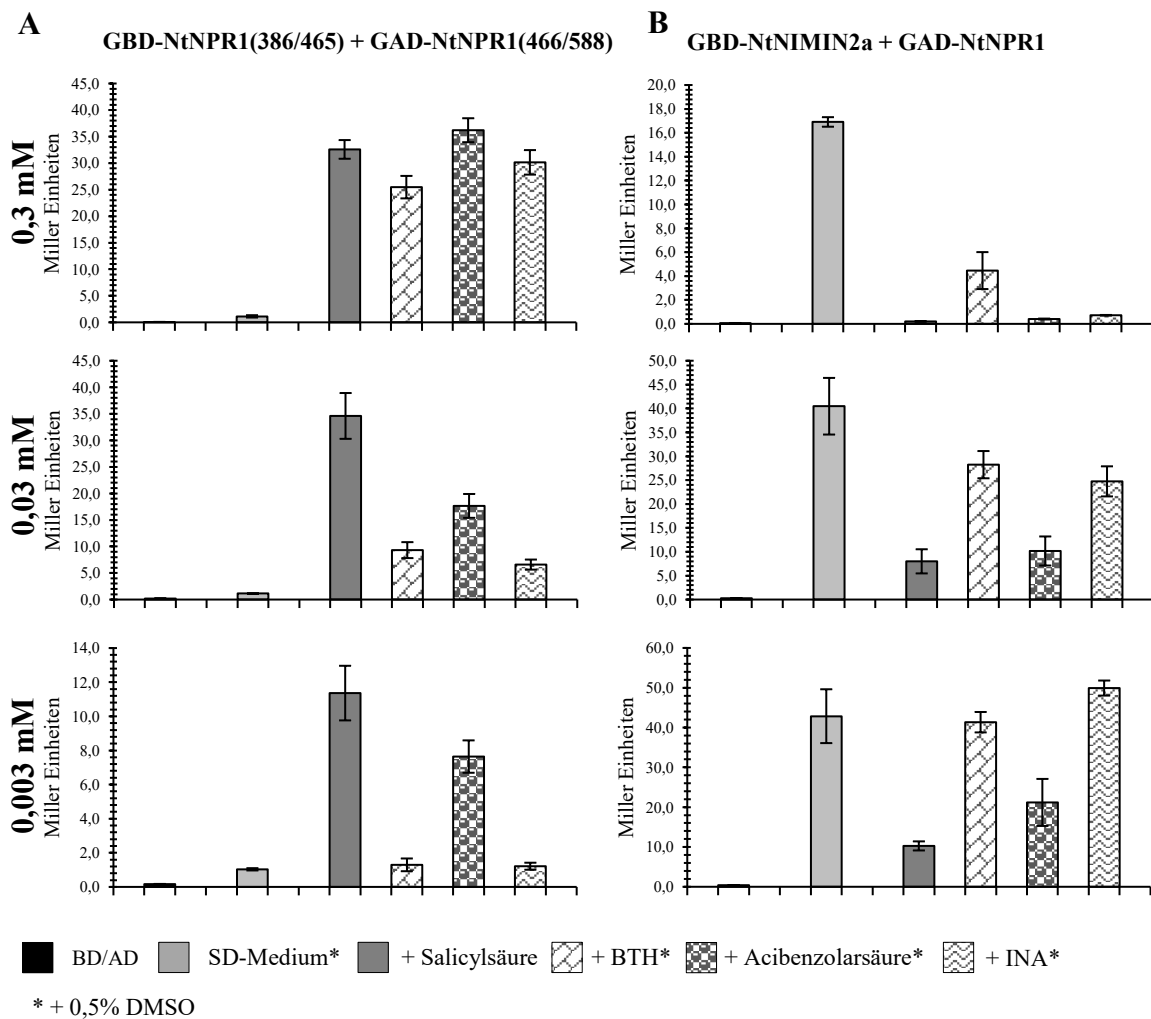


Abb. 50 Einfluss von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Tabak NPR1. (A) Interaktion von NtNPR1(386/465) und NtNPR1(466/588) (B) Interaktion von NtNIMIN2a und NtNPR1. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in Anwesenheit von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM statt.

Ähnlich verhält es sich auch mit dem Einfluss von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf die Dissoziation von NtNPR1 und NtNIMIN2a. Hier zeigt sich jedoch schon bei einer Konzentration von 0,3 mM ein Unterschied zu Abbildung 50A: BTH hat nicht denselben negativen Einfluss auf die Interaktion wie Salicylsäure und die anderen beiden Substanzen. Bei 0,03 mM zeigt Acibenzolarsäure einen vergleichbaren Effekt auf die Interaktion von NtNPR1 und NtNIMIN2a wie Salicylsäure. Allerdings ist der Einfluss bei einer Konzentration von 0,003 mM nicht mehr mit dem von Salicylsäure auf die NtNPR1-NtNIMIN2a-Interaktion vergleichbar, sondern signifikant geringer (Abb. 50B).

Nicht nur BTH und INA werden mit der SAR in Verbindung gebracht, sondern auch weitere Substanzen wie beispielsweise Pipecolinsäure, Azelainsäure und β -Aminobuttersäure (4.4). Auch für diese Substanzen wurde die Wirkung auf Tabak NPR1 in Hefe untersucht. Dabei zeigte sich in diesem Fall nun deutlich, dass Pipecolinsäure und Azelainsäure keinen Einfluss auf die Assoziation der C-terminalen Domänen LENRV und NIMIN2-Bindedomäne haben (Abb. 51A). Ebenso beeinflusst β -Aminobuttersäure weder die Assoziation der C-terminalen Domänen noch die Interaktion von NtNPR1 und NtNIMIN2a (Abb. 51A und B). Pipecolinsäure, Azelainsäure und β -Aminobuttersäure haben demnach im Gegensatz zu BTH und INA keine direkte Wirkung auf Tabak NPR1 in Hefe.

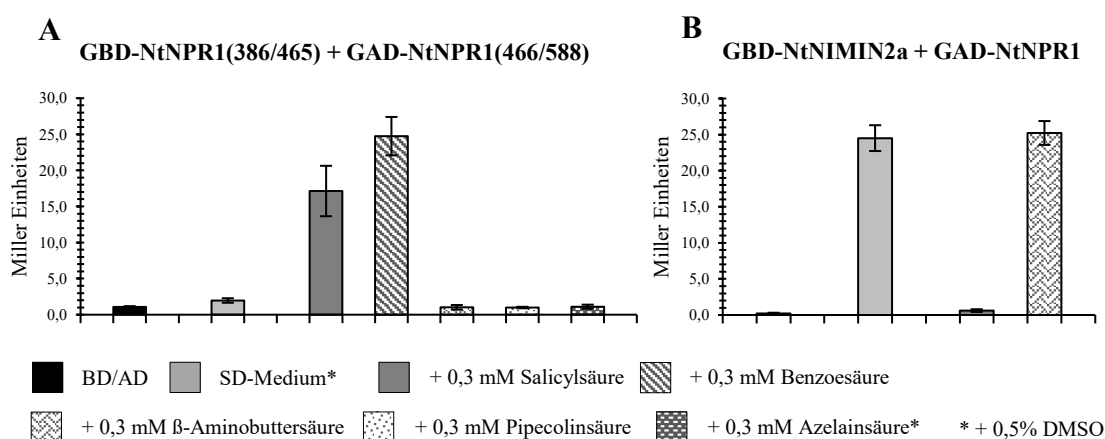


Abb. 51 Einfluss von Salicylsäure, Benzoesäure, β -Aminobuttersäure, Pipecolinsäure und Azelainsäure auf Tabak NPR1. (A) Interaktion von NtNPR1(386/465) und NtNPR1(466/588) in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoesäure, β -Aminobuttersäure, Pipecolinsäure und Azelainsäure in der Konzentration 0,3 mM. (B) Interaktion von NtNIMIN2a und NtNPR1 in Anwesenheit von Salicylsäure und β -Aminobuttersäure in der Konzentration 0,3 mM. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem statt.

Im Anschluss an die Protein-Protein-Interaktionstests in Hefe wurde das Potential der Substanzen zur *PR1*-Promotorinduktion getestet. Hierfür wurden Blattscheiben definierter Größe von transgenen *Nicotiana benthamiana* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen für drei Tage schwimmend auf den jeweiligen Substanzen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde H₂O verwendet, da Wasser keinen induktiven Effekt auf den *PR1a*-Promotor zeigt. Zusätzlich zu H₂O wurde als weitere Negativkontrolle 0,5% DMSO verwendet, da Azelainsäure in DMSO gelöst vorlag. Nach drei Tagen wurden Proteinextrakte von den Blattscheiben hergestellt (3.2.2, 3.4.3, 3.4.4). Bei den verwendeten Pflanzen handelt es sich um [*PR1a_{Pro}*:*GUS*] Linien. Diese Linien tragen eine Fusionskonstruktion aus dem *PR1a*-Promotor und dem

nachgeschalteten *GUS*-Reportergen. Das *GUS*-Reportergen kodiert für das Enzym β -Glucuronidase. Anhand eines *GUS*-Enzymaktivitätstests können über die ermittelten Aktivitätswerte Rückschlüsse auf die Aktivität des vorgeschalteten *PR1a*-Promotors gezogen werden.

Wie in Abbildung 52B zu sehen ist, ist BTH wie auch Benzoesäure in der Lage, den *PR1a*-Promotor in diesem Versuch zu induzieren. Allerdings ist das Induktionspotential von Benzoesäure im Vergleich zum Potential der Salicylsäure deutlich geringer, während das Potential von BTH sogar größer als das von Salicylsäure ist. Die Induktionsfähigkeit des *PR1a*-Promotors von Benzoesäure und BTH wurde bereits im Vorfeld beschrieben (Friedrich *et al.* 1996; Maier *et al.* 2011). Zwischen den Ergebnissen in Abbildung 51 und Abbildung 52A gibt es eine klare Diskrepanz. β -Aminobuttersäure, Pipecolinsäure und Azelainsäure zeigen in Hefe keine direkte Wirkung auf Tabak NPR1, können aber den *PR1a*-Promotor *in planta* induzieren. Im Vergleich zu Salicylsäure ist das Induktionspotential dieser Substanzen allerdings wesentlich geringer.

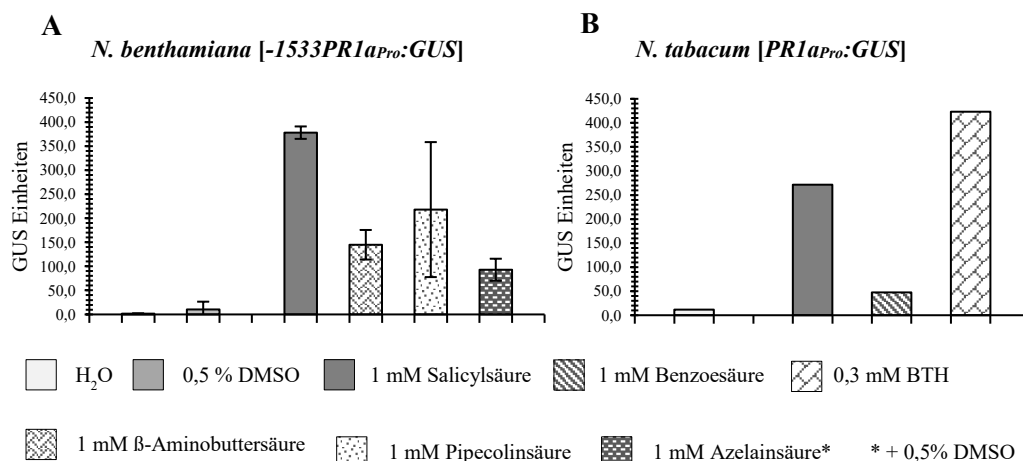


Abb. 52 Induktionspotential des *PR1a*-Promotors von Salicylsäure, Benzoesäure, BTH, β -Aminobuttersäure, Pipecolinsäure und Azelainsäure. (A) *GUS*-Assay nach Inkubation von *N. benthamiana* [-1533*PR1a*_{Pro}:*GUS*] Blattscheiben auf H₂O, 0,5 % DMSO, 1 mM Salicylsäure, 1 mM β -Aminobuttersäure, 1 mM Pipecolinsäure und 1 mM Azelainsäure. (B) *GUS*-Assay nach Inkubation von *N. tabacum* [*PR1a*_{Pro}:*GUS*] Blattscheiben auf H₂O, 1 mM Salicylsäure, 1 mM Benzoesäure und 0,3 mM BTH.

4.4.2 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR3

Analog wie in 4.4.1 wurden dieselben Substanzen wie in Abbildung 34 verwendet, um ihre Wirkung auf Tabak NPR3 zu untersuchen. Salicylsäure bewirkt die Dissoziation von NtNPR3-NtNIMIN2a. Bei einer Konzentration von 0,3 mM sind zwischen Salicylsäure und den Substanzen keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich ihrer Wirkung zu beobachten. Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure sind in der Lage, die Interaktion zwischen NtNPR3 und NtNIMIN2a zu inhibieren. Mit abnehmender Konzentration wird deutlich, dass auch hier Anthranilsäure den geringsten Einfluss auf die Interaktion hat. Des Weiteren zeigte sich, dass die chlorierten Substanzen und auch Benzoesäure eine bessere inhibierende Wirkung auf die Interaktion zwischen NtNPR3 und NtNIMIN2a haben als Salicylsäure selber (Abb. 53A). Zum

direkten Vergleich des Einflusses von Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wurden IC_{50} -Werte für die Dissoziation von Tabak NPR3 und Tabak NIMIN2a bestimmt. Der IC_{50} -Wert für die Dissoziation von NtNPR3 und NtNIMIN2a beträgt für Salicylsäure $0,14 \mu\text{M}$ und für 3,5-Dichloranthranilsäure $0,4 \mu\text{M}$ (Abb. 53B und C). Vergleichsweise dazu liegt der IC_{50} -Wert für die Dissoziation von Tabak NPR1 und Tabak NIMIN2a für Salicylsäure bei $0,7 \mu\text{M}$ und für 3,5-Dichloranthranilsäure bei $0,28 \mu\text{M}$ (Abb. 49A).

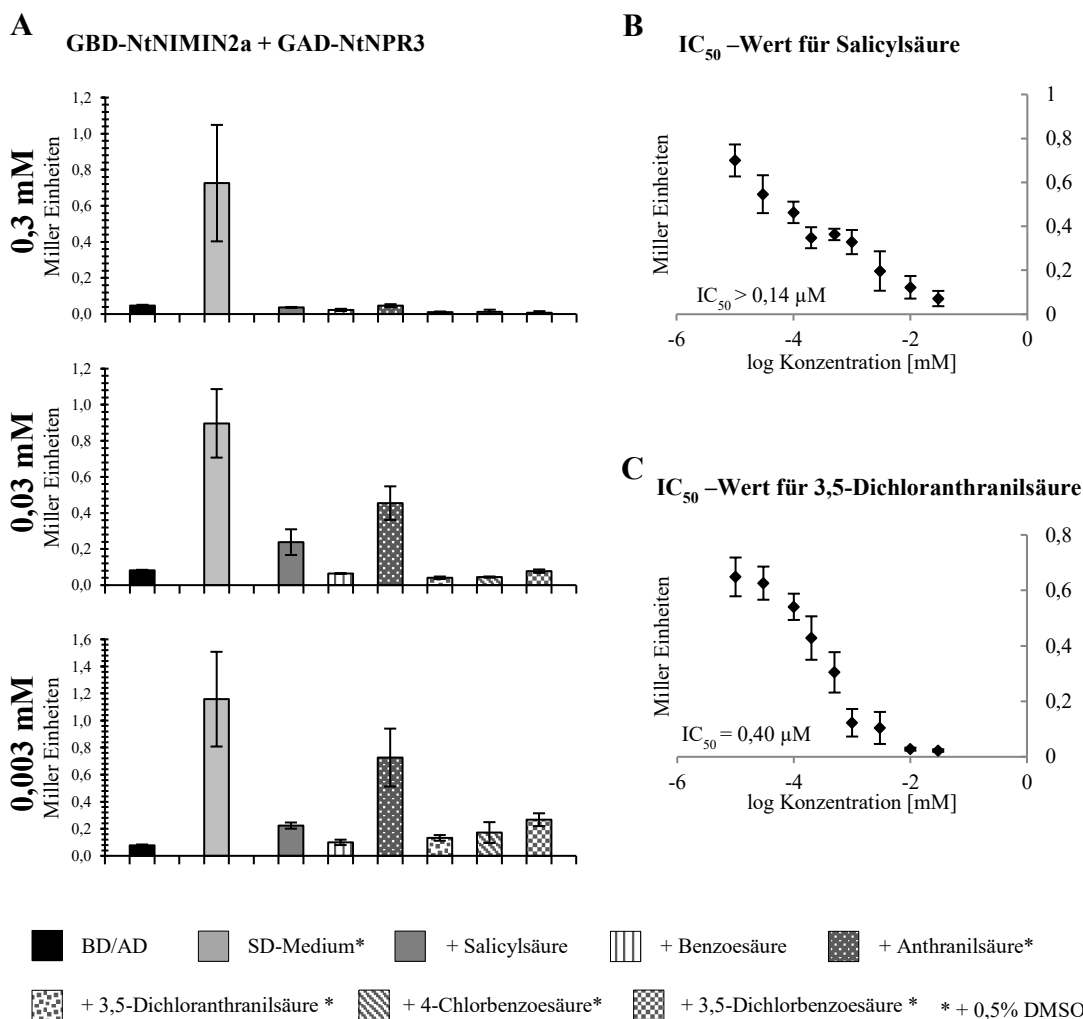


Abb. 53 Einfluss von Salicylsäure und analogen Verbindungen auf Tabak NPR3. (A) Interaktion von NtNIMIN2a und GAL4AD-NtNPR3 in Anwesenheit von Salicylsäure, Benzoesäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoesäure und 3,5-Dichlorbenzoesäure in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM. Die Substanzen 4-Chlorbenzoesäure, 3,5-Dichlorbenzoesäure und 3,5-Dichloranthranilsäure wirken sich bei einer Konzentration von 0,3 mM hemmend auf das Wachstum der Hefen aus. (B) + (C) Abhängigkeit der Interaktion NtNIMIN2a und NtNPR3 von Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure. Die Stärke der Protein-Protein-Wechselwirkung wurde durch Hefe-Zwei-Hybridanalysen bestimmt.

Im Anschluss wurde ebenfalls die Wirkung von BTH, Acibenzolarsäure und INA auf die Dissoziation von NtNPR3 und NtNIMIN2a untersucht. Im heterologen Hefe-Zwei-Hybridssystem wurde der Einfluss dieser beiden Substanzen in drei verschiedenen Konzentrationen (0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM) analysiert. Bei einer Konzentration von 0,3 mM ist zwischen Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in ihrer Wirkung kein wesentlicher Unterschied zu erkennen. Die Interaktion von NtNPR3 und NtNIMIN2a wird durch den Einfluss der Substanzen gehemmt. Etwas geringer konzentriert mit

0,03 mM wird ein Unterschied zwischen den Substanzen sichtbar. Im Gegensatz zur Salicylsäure haben die Substanzen BTH, Acibenzolarsäure und INA einen geringeren Einfluss auf die Interaktion zwischen NtNPR3 und NtNIMIN2a. Dabei zeigt INA die geringste Wirkung, während BTH und Acibenzolarsäure ungefähr gleich effektiv sind. Bei einer Konzentration von 0,003 mM wird sehr deutlich, dass Salicylsäure den stärksten Effekt auf die Dissoziation von NtNPR3 und NtNIMIN2a hat. INA dagegen hat bei dieser geringen Konzentration keinen Effekt mehr. BTH und Acibenzolarsäure zeigen noch eine moderate Wirkung auf die Interaktion zwischen NtNPR3 und NtNIMIN2a, wobei Acibenzolarsäure hier etwas effektiver ist (Abb. 54).

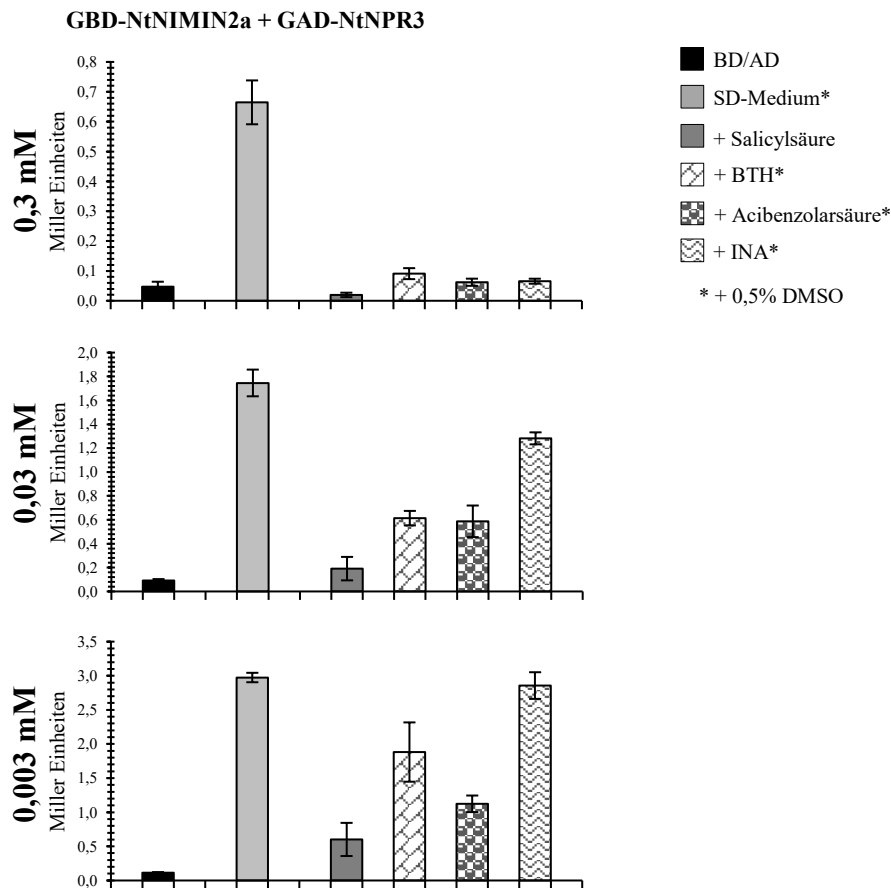


Abb. 54 Einfluss von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA auf Tabak NPR3. Interaktion von NtNIMIN2a und NtNPR3. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in Anwesenheit von Salicylsäure, BTH, Acibenzolarsäure und INA in den Konzentrationen 0,3 mM, 0,03 mM und 0,003 mM statt.

4.4.3 Interaktion zwischen der LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von Tabak NPR1 und NPR3

Tabak NPR3 ist Arabidopsis NPR1 biochemisch ähnlich. NtNPR3 ist ebenso wie AtNPR1 in der Lage, NIMIN-Proteine zu binden. Diese Interaktion wird durch Salicylsäure negativ beeinflusst. Des Weiteren interagiert NtNPR3 ebenfalls mit TGA-Transkriptionsfaktoren und diese Interaktion wird von Salicylsäure nicht beeinflusst. Bei NtNPR3 ist wie in AtNPR1 eine Salicylsäure-abhängige Assoziation der LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne nicht möglich. Die biochemischen Eigenschaften der

C-terminalen Domänen von NtNPR1 (Abb. 55A) und NtNPR3 (Abb. 55B) sollten mit Hilfe von Chimärbildung im Hefe-Zwei-Hybridsystem näher charakterisiert werden. Für die Chimärbildung wurden neben den wildtypischen C-terminalen Domänen von NtNPR1 und NtNPR3 auch trunkate Versionen der jeweiligen NIMIN2-Bindedomänen verwendet. In Abbildung 55C zeigt sich, dass die Assoziation der C-terminalen Domänen von NtNPR1 LENRV und NIMIN-Bindedomäne spontan erfolgt und die Interaktion durch Salicylsäure verstärkt wird. Wird nun anstelle der wildtypischen NIMIN-Bindedomäne die trunkate Version für diese Interaktion verwendet, kommt es nicht mehr zur spontanen Interaktion und die durch Salicylsäure induzierte Assoziation ist wesentlich geringer. Die Chimärbildung zwischen NtNPR1 LENRV und NtNPR3 NIMIN-Bindedomäne ist nach Zugabe von Salicylsäure möglich, fällt aber relativ gering aus. Die Salicylsäure-induzierte Affinität von NtNPR1 LENRV ist zu der trunkaten Version NtNPR3 NIMIN-Bindedomäne (469/528) deutlich stärker als bei der wildtypischen NIMIN-Bindedomäne von NtNPR3. Wird nun anstelle von NtNPR1 LENRV NtNPR3 LENRV eingesetzt, zeigt sich ein ganz anderes Bild. NtNPR3 LENRV ist weder in der Lage, mit der wildtypischen noch mit der trunkanten NIMIN-Bindedomäne von NtNPR3 spontan oder in Anwesenheit von Salicylsäure zu assoziieren. Eine Chimärbildung mit der wildtypischen NIMIN-Bindedomäne und der trunkaten Version (466/525) von NtNPR1 ist für NtNPR3 LENRV ebenfalls nicht möglich. Die C-terminale Domäne LENRV ist auch hier inaktiv, vergleichbar mit AtNPR1.

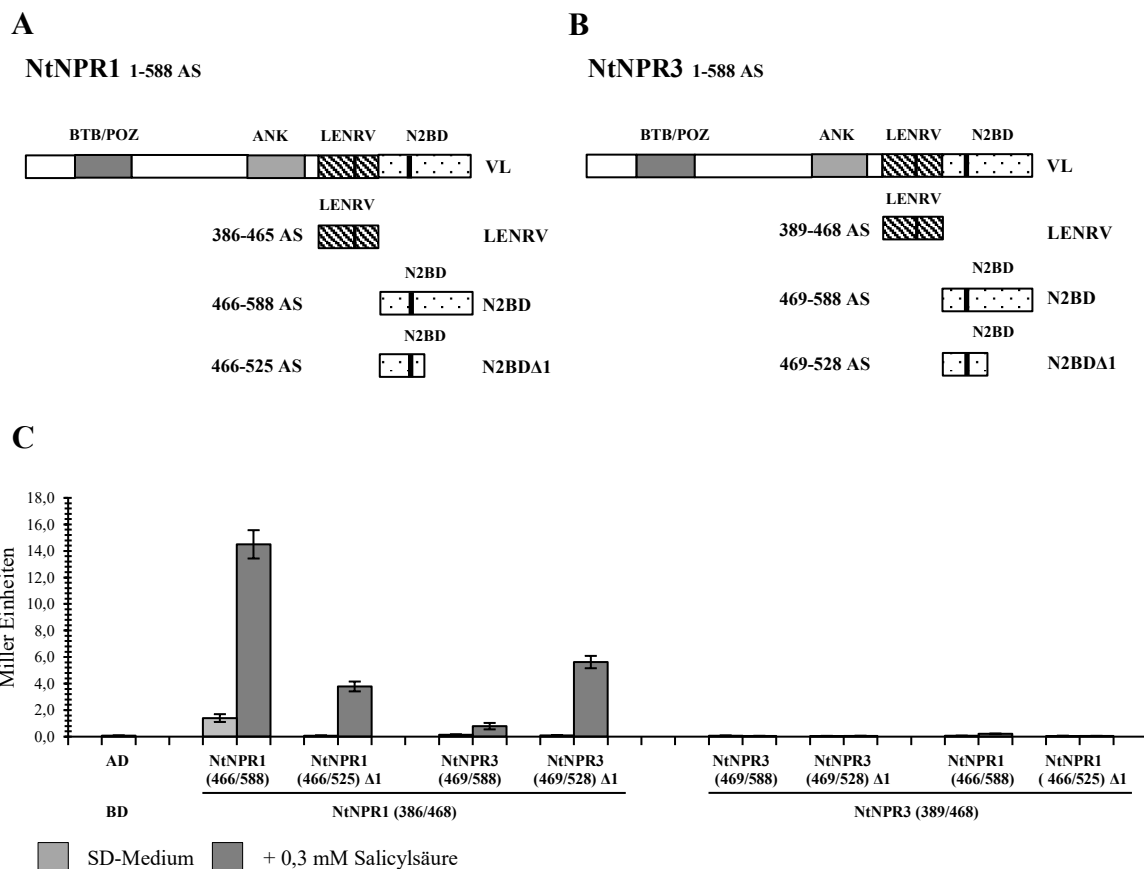


Abb. 55 Chimärbildung der C-terminalen Subdomänen von Tabak NPR1 und NPR3. Interaktion von NtNPR1(386/465) und NtNPR3(389/468) mit NtNPR1(466/588), NtNPR1(466/525) Δ1, NtNPR3(469/588) und NtNPR3(469/528) Δ1. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridsystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

4.5 Nachweis von NPR1-Proteinen in Hefe, Arabidopsis und Tabak

Für den Nachweis von NPR1-Proteinen aus *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* wurden polyklonale Antikörper verwendet. Für den Nachweis von NtNPR1 wurde der Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 benutzt. Der in *E. coli* exprimierte C-Terminus (386/588) mit GST-Markierung von NtNPR1 wurde dabei über eine Glutathionsepharosesäule gereinigt und zur Gewinnung der Antikörper zur Immunisierung von Kaninchen eingesetzt (U.M. Pfitzner, unveröffentlicht). Für den Nachweis von Arabidopsis NPR1 wurde der Antikörper α -6xHis-AtNPR1 (α -AtNPR1) herangezogen. AtNPR1 wurde ebenfalls in *E. coli* exprimiert, über eine Ni-NTA-Säule aufgereinigt und zur Gewinnung der Antikörper zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (Bäuscher, 2000). In den folgenden Abschnitten wird die Spezifität der Antikörper zum Nachweis der NPR1-Proteine zweier unterschiedlicher Pflanzenspezies charakterisiert. Hierfür wurden die Antikörper im heterologen Hefesystem und *in planta* getestet.

4.5.1 Nachweis von Arabidopsis und Tabak NPR1-Proteinen in Hefe

Die Expression der Proteine im heterologen Hefesystem wurde herangezogen, um mögliche Kreuzreaktionen ausschließen zu können. Hierfür wurden neben den NPR1-Proteinen von Tabak und Arabidopsis auch die jeweiligen Paralogen der entsprechenden Pflanzenspezies in Hefen exprimiert. Die Proteine von Interesse wurden dabei im pGBT9-Vektor als GAL4-Bindedomänenfusion exprimiert. Als Negativ- und Hintergrundkontrolle wurden Hefen mit den Leervektoren pGBT9 und pGAD424 co-transformiert (LV). Die Kolonien der transformierten Hefen wurden in SD-Flüssigkultur angezogen und anschließend eine Proteinextraktion durchgeführt. Die Hefeproteinextrakte wurden dann für die SDS-PAGE mit anschließender Immunodetektion eingesetzt.

Zuerst erfolgte die Prüfung, ob der Antikörper α -AtNPR1 innerhalb der NPR-Proteinfamilie von Arabidopsis spezifisch für NPR1 ist. Dafür wurden von AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 jeweils die Vollängenproteine sowie die jeweiligen LExRV-Domänen als GAL4-Bindedomänenfusion in Hefe exprimiert und für die Immunodetektion eingesetzt. Mit α -AtNPR1 konnte ausschließlich bei BD-AtNPR1 (81 kDa) und bei BD-AtNPR1(387/467) (25 kDa) ein Signal auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts detektiert werden. Bei AtNPR3 und AtNPR4 war lediglich der Hintergrund vergleichbar mit der LV-Kontrolle detektierbar (Abb. 56A). α -AtNPR1 ist für in Hefen exprimiertes AtNPR1 sehr spezifisch und kann innerhalb der Paralogen der Proteinfamilie diskriminieren. Anschließend sollte auch für α -GST-cT-NtNPR1 die Spezifität innerhalb der NPR-Proteinfamilie von Tabak geprüft werden. Die Expression von NtNPR1 und NtNPR3 erfolgte auch hier als GAL4-Bindedomänenfusion in Hefen. Mit α -GST-cT-NtNPR1 konnte lediglich bei BD-NtNPR1 ein Signal auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 81 kDa detektiert werden. Bei BD-NtNPR3 unterschied sich das detektierte Muster nicht vom Hintergrund der LV-Kontrolle (Abb. 56B). Auch

α -GST-cT-NtNPR1 ist für in Hefe exprimiertes NtNPR1 sehr spezifisch und kann zwischen NtNPR1 und NtNPR3 klar unterscheiden.

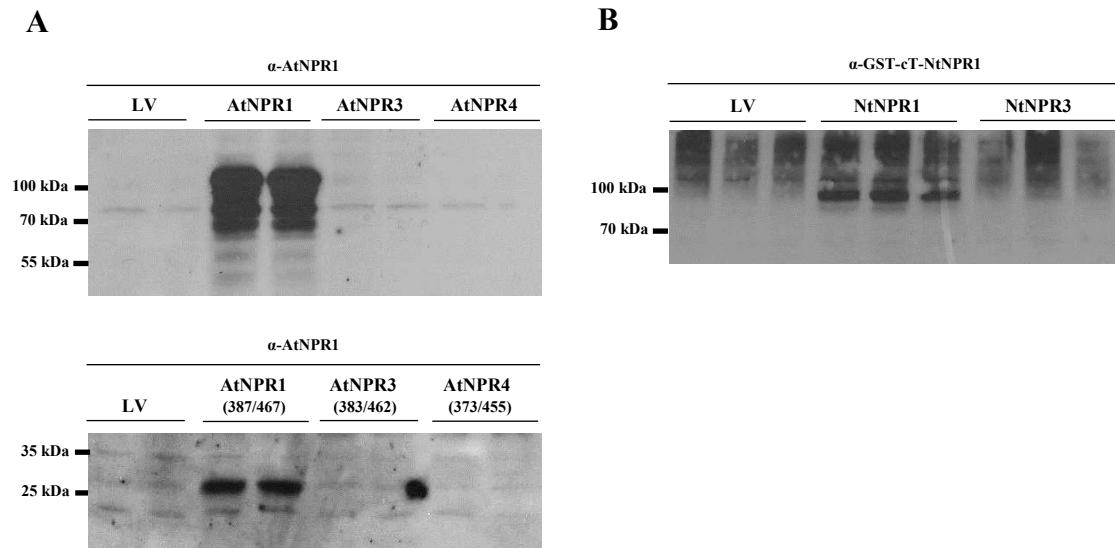


Abb. 56 Immunologischer Nachweis von NPR1-Proteinen aus Arabidopsis und Tabak in Hefeproteinextrakten. (A) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-AtNPR1 (81 kDa), GAL4BD-AtNPR3 (81 kDa), GAL4-BD-AtNPR4 (79 kDa) und GAL4BD-AtNPR1(387/467) (25 kDa), GAL4BD-AtNPR3(383/462) (25 kDa), GAL4-BD-AtNPR4(373/455) (25 kDa) mit dem Antikörper α -AtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient jeweils die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-NtNPR1 (81 kDa) und GAL4BD-NtNPR3 (81 kDa) mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. Es wurden Proteinextrakte aus zwei oder drei unabhängigen Kolonien analysiert.

Fortführend sollte nun geprüft werden, ob die jeweiligen Antikörper für Arabidopsis und Tabak NPR1 nicht nur innerhalb der eigenen NPR-Proteinfamilie diskriminieren können, sondern ob speziessübergreifende Kreuzreaktionen ebenfalls ausgeschlossen werden können. Hierfür wurden zuerst GAL4-Bindedomänenfusionen der C-Termini von Arabidopsis NPR1 und Tabak NPR1 herangezogen. Als Hintergrundkontrolle diente wiederum die Leervektortransformation. Die Proteinextrakte wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Membran wurde in die Hälfte geteilt und eine Hälfte mit α -GST-cT-NtNPR1 und die andere mit α -AtNPR1 behandelt. Für die Exposition wurden beide Membranhälften wieder aneinandergefügt. Beim Einsatz von α -GST-cT-NtNPR1 konnte nur ein Signal auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 38 kDa bei BD-NtNPR1(386/588) detektiert werden. Analog dazu verhielt es sich beim Einsatz von α -AtNPR1. Auch hier konnte lediglich ein Signal auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 38 kDa bei BD-AtNPR1(387/593) detektiert werden (Abb. 57A). Zusätzlich sollte analysiert werden, ob bei α -AtNPR1 eine Kreuzreaktion mit NtNPR3 ausgeschlossen ist. Dafür wurden Proteinextrakte der GAL4-Bindedomänenfusionen BD-AtNPR1, BD-NtNPR1 und BD-NtNPR3 verwendet. Auch hier konnte nur ein Signal bei BD-AtNPR1 mit α -AtNPR1 auf der Höhe des erwarteten Molekulargewichts von 81 kDa detektiert werden (Abb. 57B). Die Antikörper von Tabak NPR1 und Arabidopsis NPR1 können auch speziessübergreifend untereinander diskriminieren.

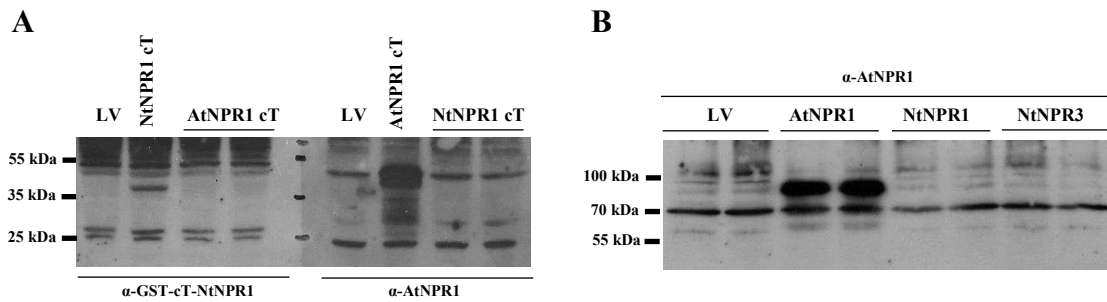


Abb. 57 Immunologischer Nachweis von NPR1-Proteinen aus Arabidopsis und Tabak in Hefeproteinextrakten. (A) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-NtNPR1 cT(386/588) (38 kDa) und GAL4BD-AtNPR1 cT(387/593) (38 kDa) mit den Antikörpern α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient jeweils die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424. (B) Immunologischer Nachweis von GAL4BD-AtNPR1 (81 kDa), GAL4BD-NtNPR1 (81 kDa) und GAL4BD-NtNPR3 (81 kDa) mit dem Antikörper α -AtNPR1 in Hefeproteinextrakten. Als Kontrolle dient die Leervektortransformation mit pGBT9 und pGAD424.

4.5.2 Nachweis von Arabidopsis NPR1

Arabidopsis NPR1 liegt im uninduzierten Zustand der Pflanze als Oligomer im Cytoplasma vor. Durch Änderungen des Redox-Status der Zelle durch den Anstieg von Salicylsäure werden die Disulfidbrückenbindungen zwischen den Cysteinresten der NPR1-Proteine reduziert. NPR1 nimmt seine monomere Form an und wird in den Zellkern transportiert. Für Arabidopsis NPR1 konnte nachgewiesen werden, dass unter nicht reduzierenden Bedingungen bei der Probenaufbereitung und Analyse per SDS-PAGE und Immunodetektion lediglich NPR1 Monomere in induziertem Pflanzengewebe detektiert werden. Unter reduzierenden Bedingungen war sowohl in Pflanzengewebe unbehandelter Pflanzen als auch in Pflanzengewebe behandelter Pflanzen NPR1 nachweisbar ohne erkennbare Veränderung der Akkumulation des Proteins (Mou *et al.*, 2003).

Bei Verwendung des α -AtNPR1 Antikörpers gegen das gesamte Arabidopsis NPR1 konnte allerdings in Pflanzenextrakten von Salicylsäure- und Bion-behandelten Arabidopsispflanzen unter reduzierenden Bedingungen eine verstärkte Akkumulation von AtNPR1 nachgewiesen werden. Bei Proteinextrakten 14 Stunden nach Behandlung mit 1 mM Salicylsäure und 0,3 mM BTH in Form von Bion ist eine deutliche Verstärkung des Signals auf der Höhe von 66 kDa im Vergleich zu den Proteinextrakten unbehandelter Arabidopsispflanzen zu sehen (Abb. 58A).

Im Gegensatz zu den in Hefe exprimierten NPR-Proteinen reagiert α -GST-cT-NtNPR1 bei Proteinextrakten aus Pflanzenmaterial kreuz und detektiert endogenes AtNPR1 (Abb. 58B). Für den immunologischen Nachweis von NPR1 wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von Arabidopsis 14 und 20 Stunden nach Behandlung mit 1 mM Salicylsäure und zur Kontrolle aus unbehandelten Blattmaterial hergestellt. NPR1 wurde einmal mit dem Antikörper α -AtNPR1 und einmal mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 immunologisch nachgewiesen. Dafür wurden die Extrakte nach Auftrennen mittels SDS-PAGE auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Diese Membran wurde halbiert. Beide Hälften waren identisch beladen. Die Hälften wurden mit den entsprechenden

Antikörpern behandelt und für die Exposition wieder aneinandergesetzt. In beiden Fällen sind zwei Banden in Höhe des 70 kDa Markers zu erkennen. Im Falle des α -GST-cT-NtNPR1 Antikörpers ist die obere Bande prominenter als die obere Bande bei der Detektion mit α -AtNPR1. Allerdings ist in beiden Fällen eine deutliche Verstärkung des Signals der unteren Bande bei den Extrakten nach Salicylsäure-Behandlung sichtbar. Bei Detektion mit α -GST-cT-NtNPR1 ist zusätzlich eine Verstärkung der oberen Bande erkennbar. Dies weist auf eine verstärkte Akkumulation von AtNPR1 in Folge der Behandlung mit Salicylsäure hin, unabhängig vom verwendeten Antikörper.

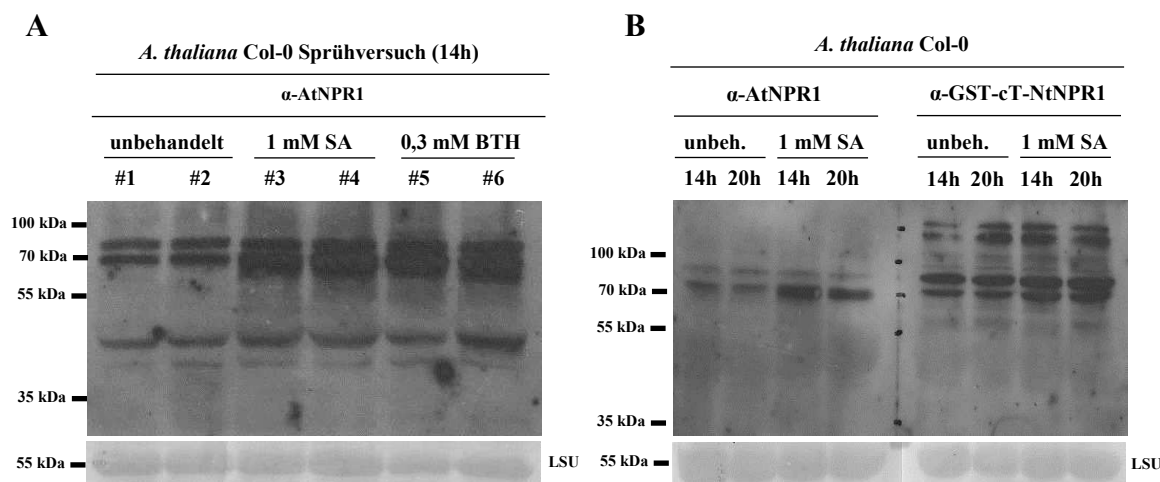


Abb. 58 Akkumulation von Arabidopsis NPR1 14 Stunden nach Behandlung mit 1 mM Salicylsäure und 0,3 mM BTH (Bion). (A) Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial hergestellt, welches 14 Stunden zuvor entweder mit 1 mM Salicylsäure oder 0,3 mM BTH (Bion) behandelt wurde. Als Kontrolle diente unbehandeltes Blattmaterial von *A. thaliana* Col-0. (B) Die verwendeten Proteinextrakte stammen von Blattmaterial, welches mit 1 mM Salicylsäure behandelt wurde und 14 Stunden und 20 Stunden später geerntet wurde. Als Kontrolle diente unbehandeltes Blattmaterial von *A. thaliana* Col-0. Der immunologische Nachweis von NPR1 wurde vergleichend mit den Antikörpern α -AtNPR1 und α -GST-cT-NtNPR1 durchgeführt. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach der Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

4.5.3 Nachweis von Tabak NPR1

Mou und Mitarbeiter (2003) konnten unter nicht reduzierenden Bedingungen Arabidopsis NPR1 in unbehandelten Pflanzen nicht nachweisen, sondern nur in INA-behandelten Pflanzen. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass dies auf Tabak nicht zutrifft. Anders als Arabidopsis NPR1 verfügt Tabak NPR1 nicht über die Cysteinreste, welche für die Oligomerisierung im Cytoplasma von Bedeutung sein sollen. Tabak NPR1 konnte sowohl unter nicht reduzierenden als auch reduzierenden Bedingungen gleichermaßen in unbehandelten, H₂O behandelten und Salicylsäure-behandelten Tabakpflanzen nachgewiesen werden (Stüttgen, 2016).

Bei Verwendung des α -GST-cT-NtNPR1 Antikörpers sind beim immunologischen Nachweis von NPR1 in Tabak mehrere Banden zu erkennen. Die multiplen Banden befinden sich im Bereich um den 70 kDa Marker, wo auch das Signal des 66 kDa großen NPR1-Proteins erwartet wird. Im nachfolgenden Versuch sollte untersucht werden, ob Salicylsäure auch in Tabak eine Akkumulation von NPR1

bewirken kann. Für den immunologischen Nachweis wurden hier Proteinextrakte von Blattmaterial von *N. tabacum* cv. Samsun NN verwendet, welches zuvor ein, zwei, drei, vier und sieben Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurde. Als Kontrolle wurden Extrakte aus Blattmaterial auf H₂O für die entsprechende Dauer inkubiert. Als weitere Kontrolle wurden Proteinextrakte von unbehandelten Blattmaterial hergestellt. Zwischen den NPR1-Proteinbandenmustern des Salicylsäure- und H₂O-inkubierten und dem unbehandelten Blattmaterial sind keine spezifischen Unterschiede erkennbar. Im Gegensatz zu Arabidopsis ist eine verstärkte Akkumulation von NPR1 durch Behandlung mit Salicylsäure in Tabak nicht zu beobachten. Die Dauer der Behandlung mit Salicylsäure hat auch keinen Einfluss auf die Akkumulation von NPR1. Das Proteinbandenmuster zeigt keine wesentlichen Veränderungen. Die Proteinextrakte des Salicylsäure-inkubierten Blattmaterials wurden ferner zum immunologischen Nachweis von PR1 mittels des Antikörpers α -PR1a genutzt. Der Einfluss der Dauer der Salicylsäure-Inkubation ist hier deutlich erkennbar. Mit zunehmender Zeit verstärkt sich die Akkumulation von PR1 und das Signal bei 15 kDa wird intensiver (Abb. 59).

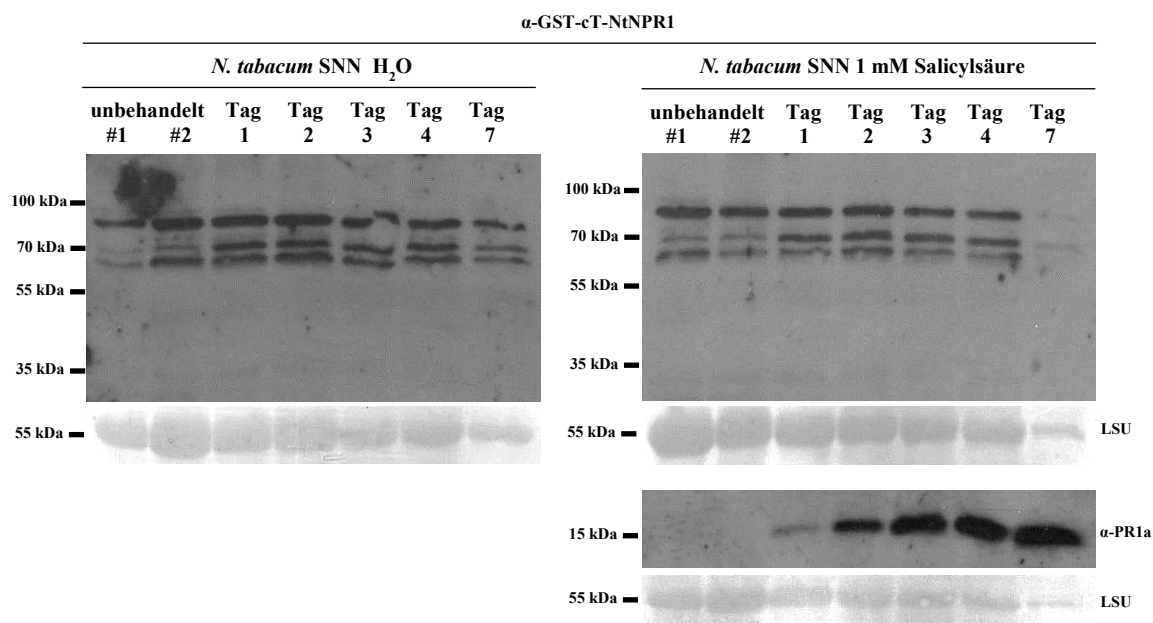


Abb. 59 Immunologischer Nachweis von NPR1 und die Kinetik der Akkumulation von PR1 im Verlauf der Inkubation auf 1 mM Salicylsäure in *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN). Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial von wildtypischen SNN Pflanzen hergestellt, die ein, zwei, drei, vier oder sieben Tage auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise H₂O inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach der Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Anschließend sollte geprüft werden, ob durch Bion-Behandlung Änderungen des Proteinbandenmusters von NPR1 bewirkt werden. Die zum immunologischen Nachweis von NPR1 verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial hergestellt, welches zuvor vier Tage auf H₂O, 1 mM Salicylsäure oder 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert wurde. Als Kontrolle wurde zusätzlich unbehandeltes Blattmaterial verwendet. Bei Verwendung des α -GST-cT-NtNPR1 Antikörpers ist zwischen den einzelnen Extrakten kein wesentlicher Unterschied erkennbar. Lediglich das Signal der Proben aus den unbehandelten Blattmaterial erscheint intensiver als die anderen. Allerdings ist anhand der Ponceau S Färbung erkennbar, dass diese Proben deutlich mehr Gesamtprotein enthielten als die restlichen Proben.

Der Versuch zeigte, dass die Inkubation von Blattmaterial von *N. tabacum* cv. Samsun NN mit Bion ebenso wie Salicylsäure keinen Effekt auf das Proteinbandenmuster von NPR1 hat (Abb. 60). Dieselben Tabakextrakte wurden dann in eine Immunodetektion mit dem Antikörper α -AtNPR1 eingesetzt. Der Antikörper α -AtNPR1 reagiert ebenfalls kreuz und ist in der Lage, Tabak NPR1 zu detektieren. Bei der Verwendung dieses Antikörpers sind nun anstelle der multiplen Banden nur noch zwei Banden erkennbar. Eine der Banden befindet sich auf der Höhe des 70 kDa Markers und die zweite etwas darüber. Aber auch hier kann keine Akkumulation von NPR1 beobachtet werden. Als Kontrolle der Wirkung der Salicylsäure und Bion wurde PR1 in den Proteinextrakten nachgewiesen. Wie erwartet, konnte PR1 (15 kDa) in den Salicylsäure- und Bion-inkubierten Proben nachgewiesen werden, wohingegen in den Proben des unbehandelten Blattmaterials und des H₂O- inkubierten Probenmaterials kein PR1 mit dem Antikörper α -PR1a detektiert werden konnte (Abb. 60).

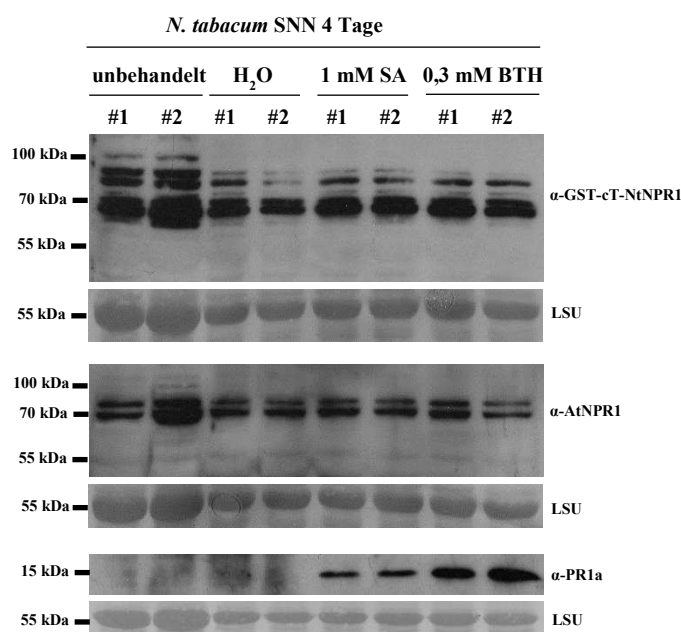


Abb. 60 Vergleichende Analyse der Proteinbanden von NPR1 und der Akkumulation von PR1 bei der Inkubation auf H₂O, Salicylsäure und Bion bei *N. tabacum* cv. Samsun NN. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial von SNN Pflanzen hergestellt, welche zuvor für vier Tage auf H₂O, 1 mM Salicylsäure oder 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte unbehandelter SNN Pflanzen verwendet. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach der Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

In einem weiteren Versuch wurde geprüft, ob eine Pathogen-Infektion einen Effekt auf die Akkumulation von Tabak NPR1 auslöst. Drei *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen wurden mit *TMV* infiziert. Als Kontrolle wurden drei nicht infizierte Tabakpflanzen verwendet. Nach vier Tagen wurden Proben aus Nekrosennähe im lokalen Gewebe entnommen und nach sieben Tagen nochmals. Nach sieben und 14 Tagen wurden dem nicht-infizierten Gewebe über dem infizierten Blatt ebenfalls Proben entnommen (systemisch). Aus dem Blattmaterial wurden Proteinextrakte hergestellt und für einen immunologischen Nachweis von NPR1 mittels des Antikörpers α -GST-cT-NtNPR1 verwendet. Im Proteinbandenmuster zwischen den infizierten Tabakpflanzen und den nicht infizierten Pflanzen gibt es

keine wesentlichen Unterschiede (Abb. 61). Eine Infektion mit *TMV* hat ebenfalls keinen Effekt auf die Akkumulation von NPR1 in Tabak.

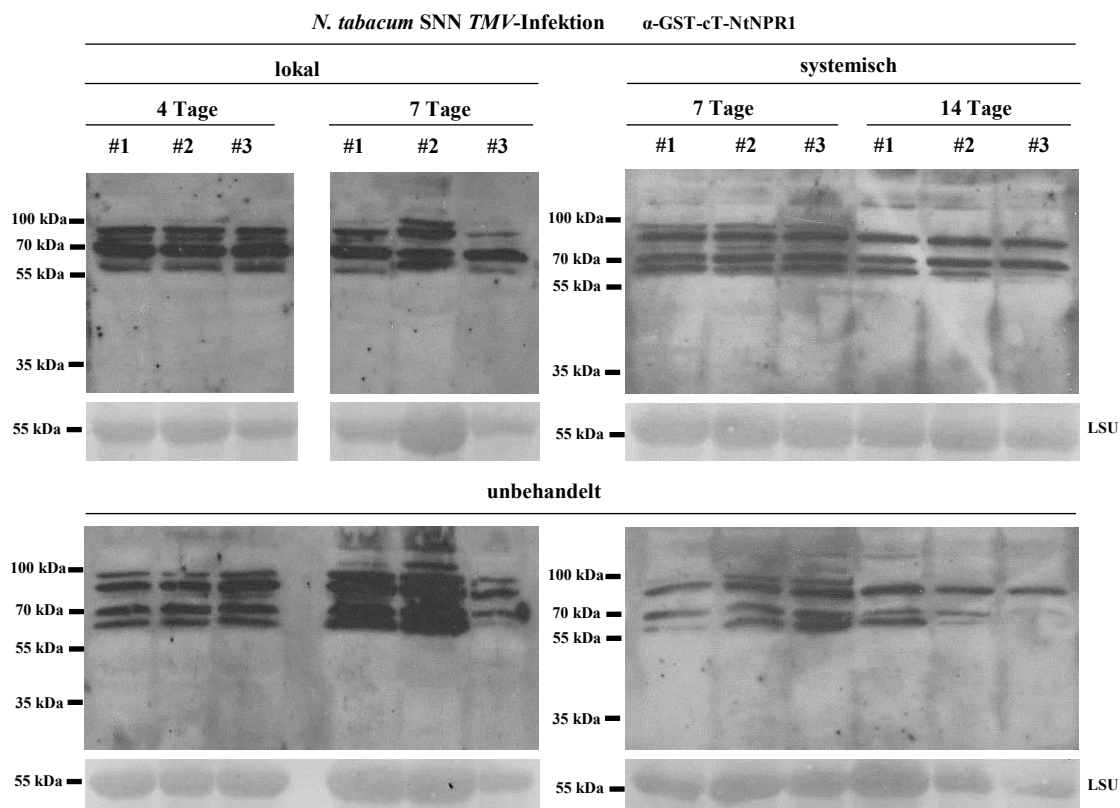


Abb. 61 Analyse des Proteinbandenmusters von NPR1 bei *TMV*-infizierten *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen in infizierten Blattgewebe und nicht-infizierten Blattgewebe nahe der Infektion. Für den immunologischen Nachweis von NPR1 im infizierten Blattgewebe während der hypersensitiven Reaktion wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial in Nekrosennähe vier und sieben Tage nach Infektion (dpi) hergestellt. Für den Immunologischen Nachweis von NPR1 im nicht-infizierten Blattgewebe bei Etablierung der SAR wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial aus den uninfizierten Blättern sieben und 14 Tage nach Infektion (*days post infection*, dpi) hergestellt. Als Kontrolle wurden uninfizierte SNN Pflanzen verwendet. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach der Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Im Gegensatz zu *Arabidopsis* NPR1 wird die Akkumulation von Tabak NPR1 weder durch Induktion durch Salicylsäure oder Bion noch durch *TMV*-Infektion beeinflusst. Das Proteinbandenmuster bleibt relativ konstant. Die Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 können zwischen in Hefe exprimierten NPR-Proteinen klar unterscheiden. Sie sind sehr spezifisch. Bei NPR1 aus Pflanzenproteinextrakten reagieren beide Antikörper kreuz. Bei Tabak-Proteinextrakten gibt es klare Unterschiede in der Verwendung der Antikörper. α -GST-cT-NtNPR1 detektiert multiple Banden im Bereich um die 70 kDa, wohingegen α -AtNPR1 zwei diskrete Banden detektiert. Eine der Banden befindet sich auf der Höhe von 70 kDa und die andere etwas darüber. Mit beiden Antikörpern lassen sich keine Veränderungen der Akkumulation oder des Proteinbandenmusters in Folge von Salicylsäure-, Bion- oder Pathogen-Behandlung nachweisen.

4.6 Erzeugung von Mutanten in den *NPR1*- und *NPR3*-Genen von *N. tabacum*

Nicotiana tabacum ist ein natürlich entstandener Hybrid aus *Nicotiana sylvestris* und *Nicotiana tomentosiformis*. Anders als die Elternarten ist *N. tabacum* nicht diploid, sondern tetraploid (Murad *et al.*, 2002). Ebenso wie *A. thaliana* und weitere Pflanzenspezies verfügt *N. tabacum* auch über eine *NPR*-Genfamilie. In Tabak besteht diese Genfamilie aus drei Mitgliedern, wobei innerhalb dieser Familie die Mitglieder *NtNPR1* und *NtNPR3* mit der Pflanzenabwehr stark assoziiert werden (Liu *et al.*, 2002; Maier *et al.*, 2011). Anders als für *A. thaliana* ist über die *NPR*-Genfamilie in *N. tabacum* relativ wenig bekannt. Aufgrund der offensichtlichen Unterschiede im Hinblick auf die biochemischen Eigenschaften und die Akkumulation von *NPR1* in Reaktion auf Pathogenbefall und Salicylsäurebehandlung soll Tabak *NPR1* Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Ferner wird auch *NPR3* an den Untersuchungen beteiligt. Für die Analyse wurden für das als *NPR1* identifizierte Gen und sein Paralog *NPR3* Mutanten in *N. tabacum* cv. Samsun NN erzeugt. Die Mutagenese erfolgte dabei über das CRISPR/Cas9-System.

Das CRISPR/Cas9-System (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR-associated proteins*) ist Teil des prokaryotischen, adaptiven Immunsystems zum Schutz gegen Viren und Bakteriophagen. In Bakterien und Archaeen konnten drei verschiedene CRISPR/Cas-Systeme identifiziert werden (Bhaya *et al.*, 2011; Terns&Terns, 2011; Wiedenheft *et al.*, 2012). Jedes davon verfügt über einen eigenen Mechanismus. Für die Genomeditierung wird häufig das Typ II System verwendet. Kurze DNA-Sequenzen, beispielsweise viralen Ursprungs, werden in das Genom integriert und so wird ein zelluläres Gedächtnis vorheriger Infektionen gebildet. Die Abschnitte der Fremd-DNA werden dabei in den CRISPR-Locus eingebracht. Dieser Locus ist hoch variabel und besteht aus Wiederholungen (*repeats*), die durch die Integration der Fremd-DNA (*spacer*) getrennt werden (Barrangou *et al.*, 2007; Bolotin *et al.*, 2005; Jansen *et al.*, 2002). Bei der Transkription des CRISPR-Locus wird ein langes RNA-Molekül gebildet (pre-crRNA), der Vorläufer der CRISPR-RNA (crRNA). Oberhalb des CRISPR-Locus wird währenddessen die *transactivating* CRISPR-RNA (tracrRNA) transkribiert, welche an der Prozessierung der pre-crRNA beteiligt ist. Über einen komplementären Bereich bindet die tracrRNA an *Repeat*-Regionen der pre-crRNA und bildet so eine doppelsträngige RNA-Struktur aus, welche durch das Enzym RNaseIII erkannt und geschnitten wird. Durch diese Prozedur entsteht ein tracrRNA:crRNA-Komplex. Die crRNA enthält die CRISPR-Sequenz und die Sequenz der Fremd-DNA (Deltcheva *et al.*, 2011). Dieser Komplex bildet zusammen mit der Endonuklease Cas9 einen aktiven Ribonukleoproteinkomplex aus, welcher eindringende Nukleinsäuren spezifisch als fremd erkennt, schneidet und unschädlich macht. Die Zielsequenz ist dabei komplementär zur crRNA, reicht alleine aber zur spezifischen Erkennung und zum Schneiden nicht aus. Für die Bindung von Cas9 wird zusätzlich eine sogenannte PAM-Sequenz (*protospacer adjacent motif*) benötigt, welche sich in unmittelbarer Nähe zur Zielsequenz befinden muss (Sternberg *et al.*, 2014). Im Typ II System von *Streptococcus pyogenes* handelt es sich dabei um die Trinukleotidsequenz

5'-NGG-3'. Sind alle Bedingungen erfüllt, bildet sich ein DNA:RNA-Hybrid aus und Cas9 verursacht glatte Doppelstrangbrüche der DNA an spezifischen Stellen, welche durch eine 20 Nukleotid lange Sequenz vorgegeben wird, die sich innerhalb des crRNA-Transkripts befindet (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012).

In Eukaryonten kann dieses System zur präzisen Genomeditierung verwendet werden. In Folge des DNA-Doppelstrangbruchs wird einer von zwei DNA-Reparaturmechanismen induziert. Zum einen gibt es den Mechanismus des *non homologous end joining* (NHEJ). Dieser Mechanismus ist sehr fehleranfällig und führt meist zu Insertionen oder Deletionen. Dies kann unter anderem zum gezielten Ausschalten gewünschter Gene genutzt werden. Zum anderen gibt es außerdem den Mechanismus des *homology-directed repair* (HDR). Dieser Mechanismus kann dafür genutzt werden, gezielt bestimmte DNA-Sequenzen einzubringen. Normalerweise wird HDR nach der Replikation verwendet, bevor es zur Zellteilung kommt, um Doppelstrangbrüche ohne etwaige Mutationen reparieren zu können (Bétermier *et al.*, 2014; Cromie *et al.*, 2001; Wyman&Kanaar, 2006). Zur Optimierung des Systems für die Verwendung zur Genomeditierung wurden die beteiligten Komponenten Cas9, tracrRNA und crRNA genauer charakterisiert. Es stellte sich dabei heraus, dass die tracrRNA für die Bindung von Cas9 zwingend benötigt wird. Allerdings ist es möglich, das System trotzdem zu vereinfachen und die Anzahl der benötigten Komponenten zu reduzieren. crRNA und tracrRNA können in einer *single guide* RNA (sgRNA) kombiniert werden. Die sgRNA verfügt über die jeweiligen Funktionen, welche für die Bindung von Cas9 und für die Zielsequenzerkennung benötigt werden (Hwang *et al.*, 2013; Jinek *et al.*, 2012; Mali *et al.*, 2013). Zusammen mit sgRNA ist Cas9 in der Lage, doppelsträngige DNA an jeder gewünschten Stelle, welche durch die *guide* RNA vorgegeben wird und in unmittelbarer Umgebung ein PAM-Motiv enthält, zu schneiden (Jinek *et al.*, 2012; Sapranaukas *et al.*, 2011).

Die Vorselektion der F₁-Generation der mit der CRISPR/Cas9-Konstruktion transformierten Tabakpflanzen erfolgte über eine vierwöchige Behandlung mit 0,3 mM BTH in Form von Bion (3.4.5). Bion ist ein kommerziell erhältlicher Pflanzenaktivator mit dem Wirkstoff BTH. Während der vierwöchigen Bion-Behandlung werden die Keimlinge zweimal pro Woche mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht und sind so permanent dem *PR1* und SAR induzierenden Einfluss dieser Substanz ausgesetzt. Dem zufolge wird von der Pflanze stetig Energie in die Aufrechterhaltung der SAR investiert, welche für das Wachstum der Keimlinge nicht mehr zur Verfügung steht. Wildtypische Keimlinge zeigen deutliche Defizite im Wachstum. Keimlinge, die durch erfolgreiche Mutagenese nicht mehr über ein funktionstüchtiges *NPR1* verfügen, können jedoch ungehindert wachsen und heben sich deutlich durch ihre Größe von wildtypischen Keimlingen ab. Die Durchführung der Vorselektion fand im S1-Gewächshaus statt. Es wurden für jede zu untersuchende Linie ca. 1000 Samen auf Anzuchterde ausgesät. Nach ungefähr zwei Wochen, wenn die Keimblätter der Keimlinge vollständig ausgebildet, aber die Keimlinge noch so klein wie möglich waren, wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden die Keimlinge zweimal pro Woche mit 0,3 mM BTH (Bion)

besprüht. Als Positivkontrolle dienten Keimlinge von *N. tabacum* cv. Samsun NN. Diese wurden ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen. Zum direkten Vergleich wurden als Negativkontrolle Keimlinge von *N. tabacum* cv. Samsun NN anstelle von Bion mit H₂O besprüht. Im Anschluss an die vierwöchige Bion-Behandlung wurden die größten Pflanzen der jeweiligen Linien ausgewählt und ausgetopft. Sobald genügend Blattmaterial zur Verfügung stand, wurde von den selektionierten Pflanzen genomische DNA isoliert und über PCR, Restriktionsanalyse und Sequenzierung auf molekularer Ebene analysiert. Da es sich bei *N. tabacum* um eine tetraploide Spezies handelt, wurde bei der molekularen Analyse darauf geachtet, von *NPR1* beziehungsweise *NPR3* beide Varianten, *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* zu untersuchen. Pflanzen mit erfolgreich durchgeführter Mutagenese wurden für weitere Tests und zur Samengewinnung verwendet.

4.6.1 Erzeugung von Mutanten im *NPR1*-Gen des Eltern *N. tomentosiformis* (Linien 90H)

Den Transformationshintergrund der Linien 90H stellt die transgene Linie *N. tabacum* cv. Samsun NN 138 dar. Diese transgene Linie verfügt über eine *PR1a_{pro}:GUS*-Reportergenkonstruktion. Hier steht das *GUS*-Reporter-gen, welches für das Enzym β -Glucuronidase kodiert, unter der Kontrolle des *PR1a*-Promotors. Auf die Aktivität des *PR1a*-Promotors können über einen GUS-Enzymtest und die dadurch ermittelten Aktivitätswerte Rückschlüsse gezogen werden. So werden Analyse und Selektion potentieller Mutanten erleichtert, da für die Aktivierung des *PR1a*-Promotors funktionelles *NPR1*-Protein vorliegen muss. Der GUS-Enzymtest lässt also auch indirekt Rückschlüsse auf den *NPR1*-Protein-Status der jeweiligen Pflanzen zu.

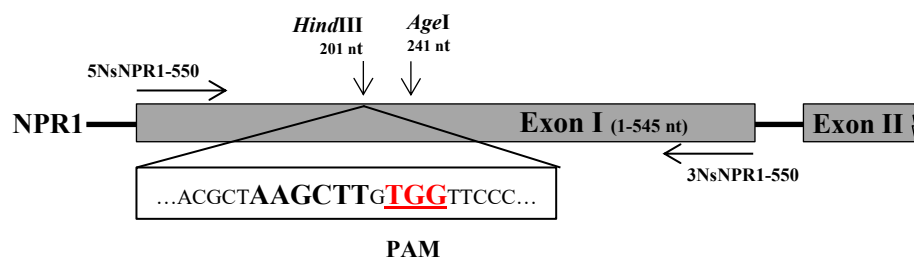


Abb. 62 Schematische Darstellung des ersten Exons von *NPR1* von *N. tomentosiformis*. Das erste Exon von *NPR1* erstreckt sich von Nukleotid 1 bis 545. Mit dem Primerpaar 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550 kann das erste Exon zu Analyse Zwecken vollständig amplifiziert werden. Bei Nukleotid 201 schneidet das Enzym *HindIII* im Anschluss daran befindet sich die PAM-Sequenz. Für weitere Analyse Zwecke wurde das Restriktionsenzym *AgeI* ausgewählt, welches unweit von *HindIII* bei Nukleotid 241 schneidet.

Die Mutagenese erfolgte über das CRISPR/Cas9-System. Die Zielsequenz wurde dabei so konzipiert, dass die *HindIII* Schnittstelle im ersten Exon von *NPR1* betroffen ist und durch Deletion oder Insertion von Nukleotiden entfernt wird. Durch die fehlende Schnittstelle wird die Selektion auf molekularer Ebene erleichtert. Aufgrund von Sequenzunterschieden im *NPR1*-Gen von *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* schließt sich an die Zielsequenz in *N. sylvestris* nicht die PAM-Sequenz an, welche als Erkennungssequenz für die Cas9-Endonuklease benötigt wird. Deswegen betrifft die Mutagenese

lediglich das *NPR1*-Gen der *N. tomentosiformis*-Variante. Abbildung 62 stellt das erste Exon von *NPR1* und die für die molekulare Analyse verwendeten Restriktionsschnittstellen und Oligonukleotide schematisch dar.

4.6.1.1 Charakterisierung der F₁-Generation

Zu Beginn der Charakterisierung der Linie 90H lagen Samen von 21 Primärtransformanten vor: 90H-1, 90H-2, 90H-3, 90H-4, 90H-5, 90H-6, 90H-7, 90H-8, 90H-9, 90H-10, 90H-11, 90H-12, 90H-13, 90H-14, 90H-15, 90H-17, 90H-18, 90H-20, 90H-21, 90H-22 und 90H-23. Die Vorselektion der Pflanzen der F₁-Generation erfolgte über eine vierwöchige Bion-Behandlung. Insgesamt wurden über die 21 Linien verteilt 49 Pflanzen selektioniert und auf molekularer Ebene weiter analysiert. Von den ausgewählten Pflanzen wurde jeweils genomische DNA isoliert. Diese diente als Matrize zur Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* mittels PCR und der Primerkombination 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Als Kontrolle diente genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) und der Linie 138-3/7 sowie eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1. Durch einen Restriktionsverdau mit *Hind*III konnte getestet werden, ob es sich dabei um eine wildtypische Pflanze handelt oder um eine potentielle *npr1* Mutante. Durch die gezielte Mutagenese sollte die Eliminierung der *Hind*III-Schnittstelle erfolgen. Somit konnte klar zwischen Wildtyp und Mutante auf molekularer Ebene differenziert werden. Das Amplifikat des ersten Exons von *NPR1* mit einer Größe von 545 Bp wird bei der wildtypischen Variante vollständig geschnitten und weist dann Fragmente der Größen 344 Bp und 201 Bp auf, während es bei erfolgreicher Mutagenese nur zu 50% geschnitten ist. Der verbleibende wildtypische Anteil mit einer

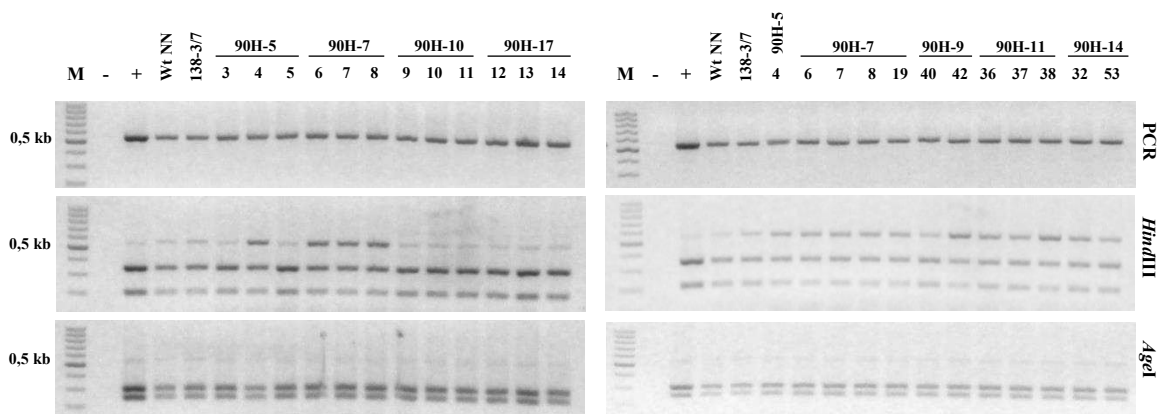


Abb. 63 Amplifikate des ersten Exons von *NPR1* und die analytische Restriktion mit *Hind*III und *Age*I. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* wurde mit dem Primerpaar 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550 durchgeführt. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Als weitere Kontrollen wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) und der Linie 138-3/7 eingesetzt. Das Amplifikat weist eine Größe von 545 Bp auf. Durch eine Restriktion mit *Hind*III wird das PCR-Produkt der Wildtypsequenz vollständig in 344 Bp und 201 Bp große Fragmente geschnitten. Handelt es sich dabei um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht vollständig geschnitten und es bleibt zusätzlich zu den 344 Bp und 201 Bp großen Fragmenten das ungeschnittene PCR-Produkt der Größe 545 Bp zurück. Durch eine weitere Restriktion des PCR-Produkts mit *Age*I entstehen Fragmente der Größe 241 Bp und 304 Bp ungeachtet dessen, ob es sich um eine wildtypische oder mutante Sequenz handelt.

Größe von 545 Bp rührt daher, dass nur *NPRI* der *N. tomentosiformis*-Variante von der Mutagenese betroffen sind.

Durch einen weiteren Restriktionsverdau mit *AgeI* des Amplifikats sollte sichergestellt werden, dass unweit der Zielsequenz die Sequenz weiterhin intakt ist. *AgeI* schneidet 40 Nukleotide 3' der *HindIII*-Schnittstelle. Alle Amplifikate verhielten sich unauffällig und ließen sich in Fragmente der Größe 241 Bp und 304 Bp schneiden (Abb. 63). Von den insgesamt 49 getesteten Pflanzen konnten mittels des Restriktionsverdaus 12 Pflanzen der Linien 90H-3, 90H-5, 90H-7, 90H-9, 90H-11, 90H-14 und 90H-15 als potentielle *npr1* Mutanten identifiziert werden. Die selektionierten Pflanzen der weiteren 14 Linien erwiesen sich als wildtypisch. Die Mutagenese mit CRISPR/Cas9 war somit bei einem Drittel der erzeugten 90H-Linien erfolgreich.

Von diesen 12 Pflanzen wurde das Amplifikat einer Auswahl von sechs Pflanzen der Linien 90H-5, 90H-7, 90H-9, 90H-11 und 90H-14 in den T-Vektor kloniert. Nur etwa 39% der untersuchten Klone konnten mit Hilfe eines analytischen Restriktionsverdaus als mutant eingestuft werden. Diese geringe Quote ist mitunter darauf zurückzuführen, dass nur das *NPRI* der *N. tomentosiformis*-Variante durch die Mutagenese betroffen sein kann. Die als mutant eingestuften Klone wurden anschließend sequenziert. Die Sequenzierung zeigte deutlich, dass die Sequenz des ersten Exons von *NPRI* der sechs ausgewählten Pflanzen Mutationen im gewünschten Bereich aufwiesen. Dabei wurden drei verschiedene Mutationen identifiziert. Es handelt sich um zwei Deletionen von fünf beziehungsweise acht Nukleotiden und um eine Insertion eines Cytosins. Durch die Deletionen bzw. Insertion wurde die

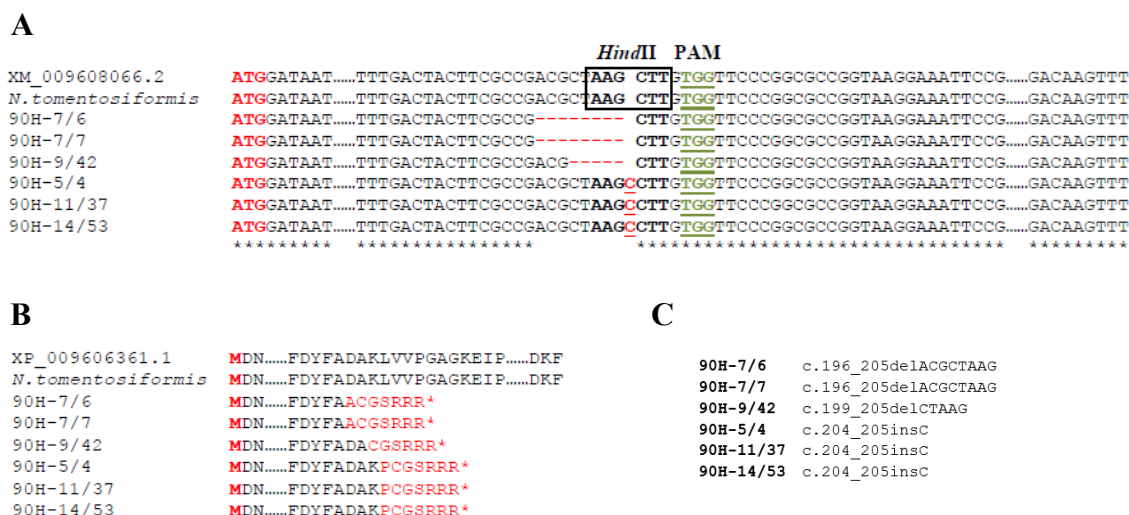


Abb. 64 Auswertung der Sequenzierung der F₁-Generation der 90H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009608066.2 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 90H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *HindIII*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XM_009606361.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 90H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 90H.

*Hind*III-Schnittstelle zerstört und in Folge dessen wurde der Leserahmen verschoben und ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet (Abb. 64).

4.6.1.2 Charakterisierung der F₂-Generation (Linie 90H-7/7)

Für die Untersuchung der F₂-Generation wurden Samen der Pflanze #7 der Linie 90H-7 (90H-7/7) ausgewählt. Diese trägt im ersten Exon von *NPR1* eine Deletion von acht Nukleotiden. In Folge dessen wird ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet und es erfolgt somit der Abbruch der Translation. Die Aussaat der Samen von 90H-7/7 und die Anzucht erfolgte zunächst auf selektivem MS-Medium versetzt mit Hygromycin und Kanamycin unter Standardbedingungen im Lichtschrank. Die Pflanzen der Linie 90H sind aufgrund des CRISPR/Cas9-Vektors Hygromycin-resistent und weisen wegen der zuvor erfolgten Transformation mit der *PR1a_{Pro}:GUS*-Konstruktion zusätzlich eine Kanamycinresistenz auf. Als Kontrolle wurde die Linie 138-3/7 mitgeführt, welche nur eine Kanamycinresistenz aufweist. Nach vier Wochen wurden die Keimlinge im Gewächshaus auf Erde pikiert. Sobald genügend Blattmaterial zur Verfügung stand, wurde von 60 Pflanzen genomische DNA isoliert. Diese wiederum wurde als Matrize zur Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* mittels PCR verwendet. Als Kontrolle wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Das Amplifikat der Größe 545 Bp wurde dann mittels *Hind*III restringiert. Durch die Restriktionsanalyse konnten 39 von den 60 Pflanzen als mutant identifiziert werden. In diesen Fällen konnte das Amplifikat mit *Hind*III nur zu 50% geschnitten werden und weist somit auf eine erfolgreiche Mutagenese hin (Abb. 65). In der F₂-Generation sind mehr als die Hälfte der Abkömmlinge von 90H-7/7 weiterhin mutant. Die als positiv identifizierten Pflanzen wurden anschließend weiteren Tests unterzogen.

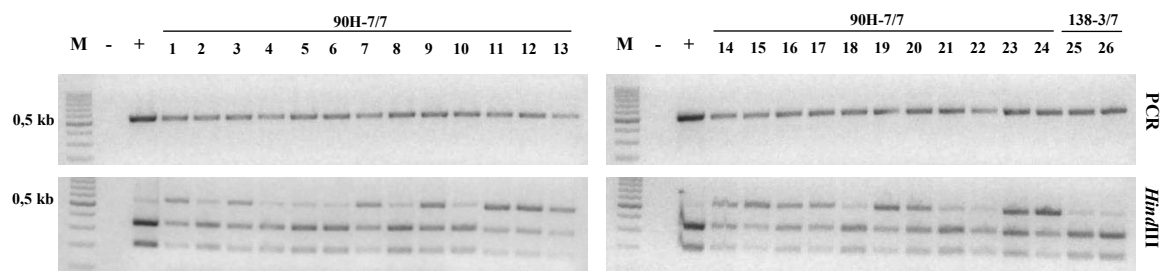


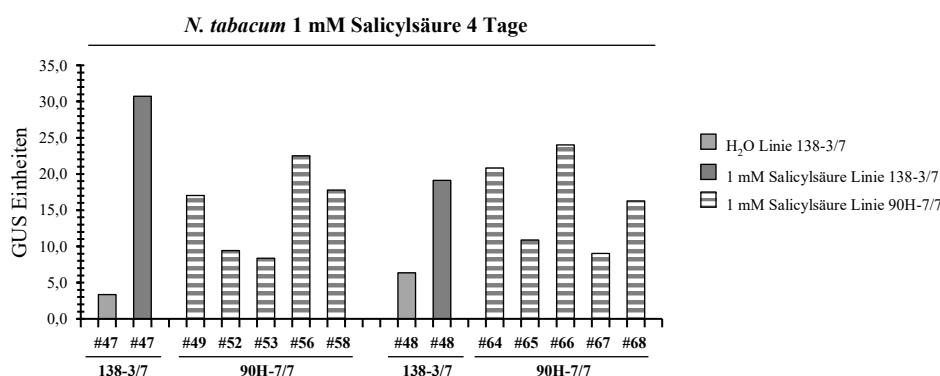
Abb. 65 Nachweis erfolgreicher Mutagenese-Ereignisse in der F₂-Generation 90H-7/7. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* erfolgte per PCR über die Primer 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA der Linie 138-3/7 eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 545 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *Hind*III entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 201 Bp und 344 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht vollständig geschnitten und es bleibt zusätzlich zu den Fragmenten von 201 Bp und 344 Bp ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe von 545 Bp zurück.

Für *Arabidopsis thaliana* ist bekannt, dass *npr1* Mutanten nicht mehr in der Lage sind, die Salicylsäure-induzierte *PR1*-Genexpression zu aktivieren. Der Transformationshintergrund der Linie 90H ist die Linie 138, welche eine Reporter-genfusionskonstruktion trägt. Dabei steht das Reportergen *GUS*,

welches für das Enzym β -Glucuronidase kodiert, unter der Kontrolle des *PR1a*-Promoters. Aufgrund dieser Reportergenkonstruktion lässt sich relativ einfach überprüfen, ob die ausgewählten Pflanzen in der Lage sind, den *PR1a*-Promoter zu induzieren oder diese Fähigkeit eingeschränkt oder ganz verloren gegangen ist.

Zuerst wurde geprüft, ob Salicylsäure weiterhin einen induzierenden Effekt auf den *PR1a*-Promoter ausgewählter Pflanzen der Linie 90H-7/7 zeigt. Hierfür wurden jeweils zwei Blattscheiben definierter Größe der entsprechenden Pflanzen ausgestanzt und für vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert. Anschließend wurden Extrakte aus den Blattscheiben hergestellt und ein GUS-Enzymaktivitätstest durchgeführt. Als Kontrolle wurden Blattscheiben der Linie 138-3/7 ebenfalls auf 1 mM Salicylsäure und auf H₂O inkubiert. Die Auswertung des Enzymtests zeigt, dass es keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Pflanzen der Linie 90H-7/7 und den Kontrollen in Hinblick auf die Induktionsfähigkeit des *PR1a*-Promoters durch Salicylsäure gibt. Zusätzlich dazu ist die GUS-Enzymaktivität im

A



B

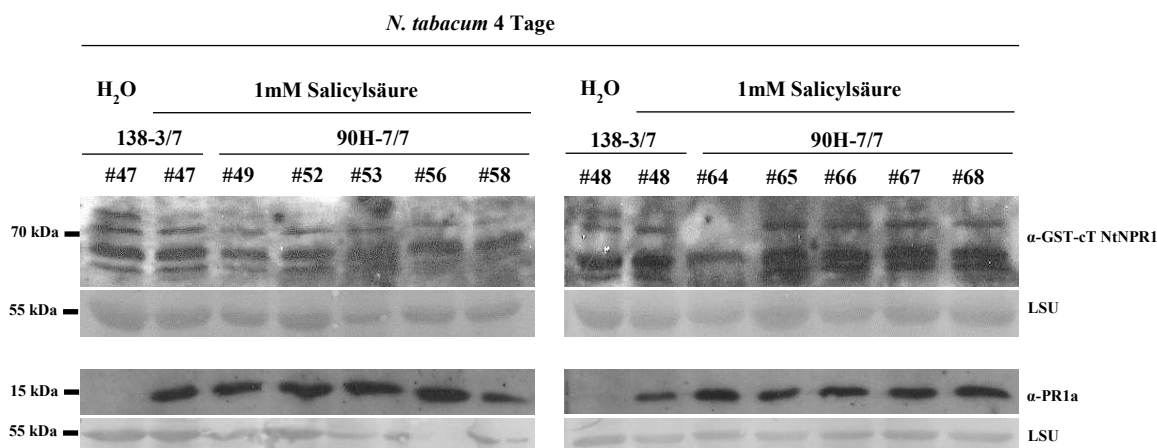


Abb. 66 Inkubation von Blattscheiben der F₂-Generation 90H-7/7 auf 1 mM Salicylsäure für vier Tage. (A) GUS-Enzymaktivitätstest. Inkubation von Blattscheiben der entsprechenden Pflanzen auf 1 mM Salicylsäure über vier Tage. Als Kontrolle wurden Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet und ebenso über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise auf H₂O inkubiert. (B) Immunologischer Nachweis von endogenem NPR1 und PR1. Die Herstellung der Proteinextrakte erfolgte aus Blattscheiben der entsprechenden Pflanzen, welche zuvor vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet und ebenso über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise H₂O inkubiert. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Allgemeinen recht gering und der Hintergrund des Systems relativ hoch (Abb. 66A). Im Anschluss an den Enzymaktivitätstest wurden dieselben Extrakte für einen immunologischen Nachweis von NPR1 (66 kDa) und PR1 (15 kDa) genutzt. Auch hier ließ sich kein Unterschied im Proteinbandenmuster von NPR1 zwischen der Kontrolllinie 138-3/7 und den Pflanzen der Linie 90H-7/7 feststellen.

Das multiple Bandenmuster nach Verwendung von α -GST-cT NtNPR1 ist innerhalb der verwendeten Proben ähnlich. Das Signal bei 15 kDa für den Nachweis des PR1-Proteins war ebenso zwischen den Pflanzen der Linie 90H und der Kontrolle relativ gleich stark ausgeprägt. Die verwendeten Pflanzen der 90H-7/7-Linie scheinen hinsichtlich der endogenen *PR1*-Induktion nicht eingeschränkt zu sein (Abb. 66B).

Weiterhin sollte geprüft werden, ob durch eine Infektion mit *Tabak-Mosaik-Virus TMV* Unterschiede zwischen der Linie 138-3/7 und der Linie 90H-7/7 in Hinblick auf das Proteinbandenmuster von NPR1 sichtbar werden. Sieben Tage nach der Infektion wurden Blattscheiben definierter Größe aus dem infizierten Gewebe gestanzt. Als Negativkontrolle fungierte eine nicht infizierte Pflanze der Linie 138-3/7. Aus den Blattscheiben wurden Extrakte hergestellt und für einen immunologischen Nachweis des NPR1 mittels des Antikörpers α -GST-cT NtNPR1 genutzt. Das Bandenmuster der Linie 138-3/7 und der Linie 90H-7/7 unterschied sich auch nach einer *TMV*-Infektion nur unwesentlich voneinander (Abb. 67).

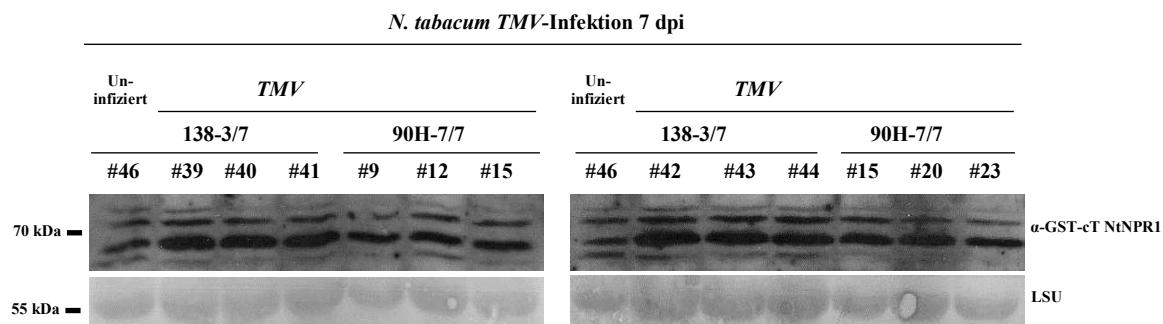


Abb. 67 Immunologischer Nachweis von NPR1 in *TMV*-infizierten Pflanzen der F₂-Generation 90H-7/7. Die Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial infizierter Blätter der entsprechenden Pflanzen sieben Tage nach Infektion (dpi) hergestellt. Als Kontrolle diente eine nicht infizierte Pflanze der Linie 138-3/7. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Aufgrund von Sequenzunterschieden zwischen den *NPR1*-Varianten *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* ist nur die Variante von *N. tomentosiformis* durch die Mutagenese betroffen. Dies wurde auch in der Restriktionsanalyse mit *Hind*III ersichtlich. Es besteht also die Möglichkeit, dass der verbleibende wildtypische Anteil von *NPR1* der *N. sylvestris*-Variante die Auswirkungen der Mutation ausgleichen kann. Dadurch könnten keine Unterschiede zwischen den Pflanzen der Linien 90H und den wildtypischen Kontrollpflanzen im Hinblick auf die untersuchten Kriterien erkennbar sein.

4.6.2 Erzeugung von Mutanten der *NPR1*-Gene der Eltern *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* (Linien 111H)

Das Ziel der CRISPR/Cas9-Mutagenese in Pflanzen der Linien 111H war wie bei Linie 90H das Tabak *NPR1*-Gen. Beide Linien unterscheiden sich aber dennoch wesentlich voneinander. Der Transformationshintergrund der Linien 111H ist *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN. Die Zielsequenz wurde anders als bei der Linie 90H so konzipiert, dass die *NarI*-Schnittstelle im ersten Exon von *NPR1* betroffen ist und durch Deletion oder Insertion einzelner Nukleotide eliminiert wird. Durch die fehlende Schnittstelle wird die Selektion potentieller Mutanten auf molekularer Ebene wesentlich erleichtert. Im Gegensatz zur Linie 90H sind nun beide Varianten *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* von *NPR1* von der Mutagenese betroffen. In Abbildung 68 ist das erste Exon von *NPR1* schematisch dargestellt mit den zur molekularen Analyse verwendeten Restriktionsschnittstellen und Oligonukleotiden.

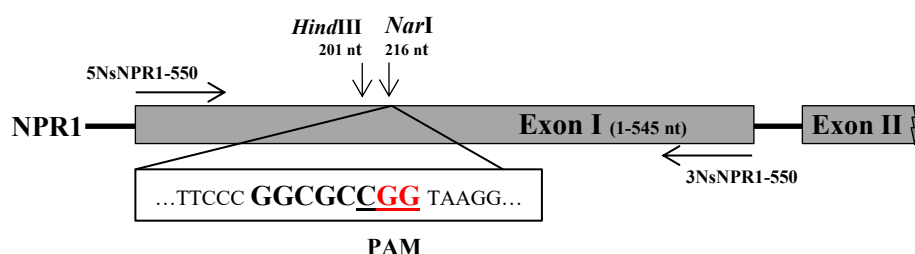


Abb. 68 Schematische Darstellung von Exon I von *NPR1*. Das erste Exon von *NPR1* erstreckt sich von Nukleotid 1 bis 545. Mit dem Primerpaar 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550 kann das erste Exon zu Analyse Zwecken vollständig amplifiziert werden. Bei Nukleotid 216 schneidet das Enzym *NarI* im Anschluss daran befindet sich die PAM-Sequenz. Für weitere Analyse Zwecke wurde das Restriktionsenzym *HindIII* ausgewählt, welches unweit von *NarI* bei Nukleotid 201 schneidet.

4.6.2.1 Charakterisierung der F₁-Generation

Zu Beginn der Charakterisierung lagen Samen von fünf Primärtransformanten vor. Die Samen der Linien 111H-1, 111H-3, 111H-6, 111H-10 und 111H-11 wurden im Gewächshaus ausgesät und die Keimlinge wurden einer vierwöchigen Bion-Behandlung unterzogen. Für Linie 111H-1 standen weniger als 1000 Samen zur Aussaat zur Verfügung. Als Kontrolle wurde *N. tabacum* cv. Samsun NN verwendet. Diese Keimlinge wurden in zwei Ansätzen zu je 1000 Samen ausgesät. Ein Ansatz wurde ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen und der weitere Ansatz wurde parallel dazu mit H₂O behandelt. Wie in Abbildung 69 zu sehen ist, ist der Effekt der Bion-Behandlung bei der Kontrolle SNN gut zu beobachten. Die H₂O-behandelten Kontrollpflanzen sind wesentlich größer und besser entwickelt als die Bion-behandelten Pflanzen. Diese wiesen starke Wachstumsdefizite und durch Bion angegriffenes Blattgewebe auf. Bei allen 111H-Linien waren einzelne größere Pflanzen zu finden. Allerdings keine, die sehr auffällig groß waren. Von den größten Pflanzen wurden jeweils sechs pro Linie ausgewählt und in einen größeren Topf umgetopft. Zusätzlich dazu wurden drei SNN-Pflanzen der Bion-Behandlung umgetopft.

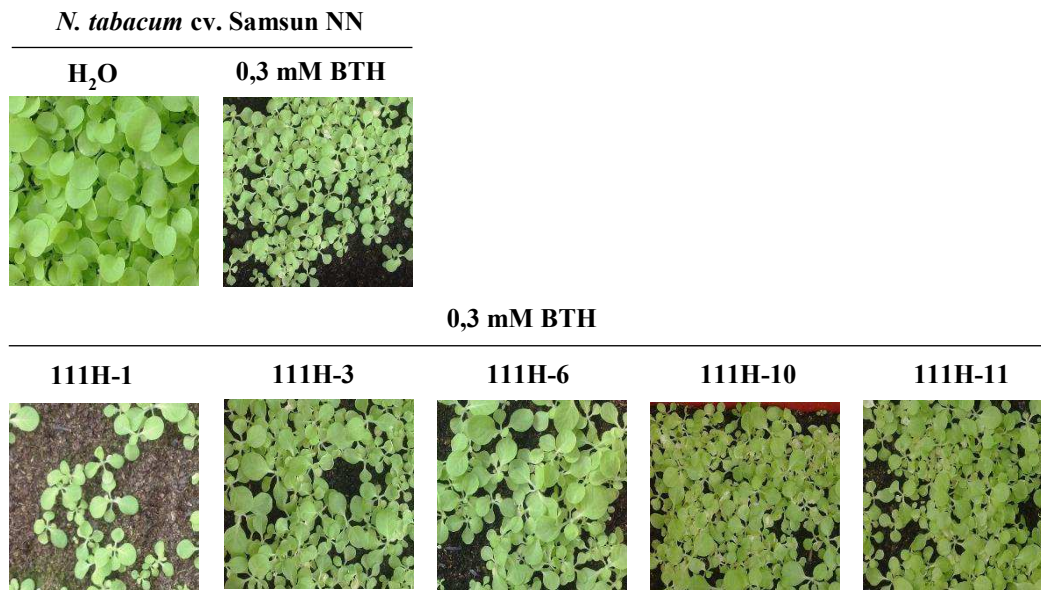


Abb. 70 Vorselektion der F₁-Generation der Linie 111H durch vierwöchige Bion-Behandlung. Zwei Wochen nach Aussaat wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Vier Wochen lang zwei Mal in der Woche wurden die Keimlinge mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Als Kontrolle diente *N. tabacum* cv. Samsun NN. Die Kontrolle wurde ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen, bzw. mit H₂O besprüht.

Sobald ausreichend Blattmaterial zur Verfügung stand, wurde genomische DNA der selektionierten Pflanzen isoliert und einer molekularen Analyse mittels PCR und Restriktionsverdau unterzogen. Die genomische DNA diente als Matrize zur Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* per PCR. Für die PCR wurde das Primerpaar 5'-NsNPR1-550/3'-NsNPR1-550 verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Das Amplifikat wies eine Größe von 545 Bp auf. Das PCR-Produkt wurde im Anschluss mit *NarI* geschnitten.

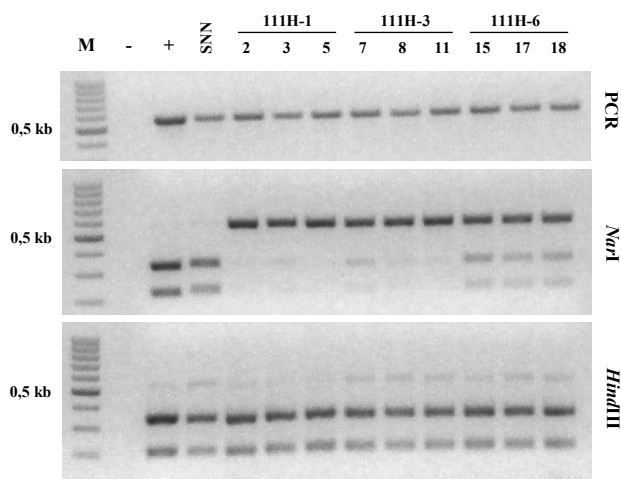


Abb. 69 Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* und die analytische Restriktion mit *NarI* und *HindIII* von Pflanzen der Linien 111H. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* erfolgte per PCR über die Primer 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 545 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *NarI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 216 Bp und 329 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR Produkt der Größe von 545 Bp zurück. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *HindIII* entstehen zwei Fragmente der Größe 201 Bp und 344 Bp.

Im Falle einer Wildtypsequenz entstehen dabei zwei Fragmente der Größe 216 Bp und 329 Bp. Bei erfolgreicher Mutagenese ist die *NarI*-Schnittstelle eliminiert und das PCR-Produkt wird nicht geschnitten. Die Linien 111H-10 und 111H-11 verhielten sich bei dieser Restriktionsanalyse wie die Wildtypkontrolle SNN. Das PCR-Produkt wurde vollständig geschnitten. Die PCR-Produkte der Linien 111H-1 und 111H-3 blieben durch den Restriktionsverdau mit *NarI* annähernd ungeschnitten und weisen so auf eine erfolgreiche Mutagenese hin. Im Fall der Linie 111H-6 wurden die PCR-Produkte durch *NarI* partiell geschnitten. Etwa 75 % der PCR-Produkte bleibt ungeschnitten. Der partielle Verdau deutet darauf hin, dass bei Linie 111H-6 die Mutagenese nicht vollständig abgeschlossen und ein wildtypischer Anteil von *NPR1* zurückgeblieben ist. Für eine weitere Restriktionsanalyse wurden die Amplifikate der Linien 111H-1, 111H-3 und 111H-6 mit *HindIII* geschnitten. Dieses Enzym schneidet 15 Bp überhalb der *NarI*-Schnittstelle. Mittels dieser Restriktion sollte geprüft werden, ob die Sequenzen unweit des Mutageneseziels intakt sind. Alle PCR-Produkte ließen sich wie die Wildtypkontrolle und die Plasmidkontrolle vollständig schneiden, sodass zwei Fragmente der Größe 201 Bp und 344 Bp entstanden (Abb. 69). Jeweils zwei Pflanzen der Linien 111H-1, 111H-3 und 111H-6 wurden für die Sequenzierung ausgewählt. Hierfür wurde das Amplifikat des ersten Exons von *NPR1* aus genomischer DNA in den T-Vektor kloniert. Mittels Restriktionsanalyse konnten 90% der untersuchten Klone als mutant eingestuft werden. Die Unterscheidung zwischen *N. sylvestris*- und *N. tomentosiformis*-Variante erfolgte im Vorfeld der Sequenzierung über eine Restriktionsanalyse. Dafür wurde entweder das Enzym *BspEI* (173 nt) oder das Enzym *BglII* (517 nt) verwendet. Beide Enzyme schneiden ausschließlich im ersten Exon von *NPR1* der *N. sylvestris*-Variante.

A		NarI PAM	
XM_009804145.1	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCGG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
<i>N. sylvestris</i>	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-1/2	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-1/5	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-3/8	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-3/11	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-6/17	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
111H-6/18	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGATTCCCG CGCC GGTAAGGAAATTCGGGTGCACCG.....GACAAGTTT		
*****		*****	
B		C	
XP_009802447.1	MDN.....FDYFADAKLVIPGAGKEIP.....DKF	111H-1/2	c.218_219insA
<i>N. sylvestris</i>	MDN.....FDYFADAKLVIPGAGKEIP.....DKF	111H-1/5	c.218_219insA
111H-1/2	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*	111H-3/8	c.218_219insA
111H-1/5	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*	111H-3/11	c.218_219insA
111H-3/8	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*	111H-6/17	c.218_219insT
111H-3/11	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*	111H-6/18	c.218_219insT
111H-6/17	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*		
111H-6/18	MDN.....FDYFADAKLVIPGRR*		

Abb. 71 Auswertung der Sequenzierung der F₁-Generation von *N. sylvestris* *NPR1* der 111H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009804145.1 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 111H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *NarI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XM_009802447.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 111H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 111H.

Die Sequenzierungsergebnisse zeigen deutlich, dass alle als potentielle *npr1* Mutanten deklarierte Pflanzen in der Tat an der erwarteten Position eine Mutation tragen. Durch die Mutagenese wurde innerhalb der *NarI*-Schnittstelle ein zusätzliches Nukleotid eingefügt. Die Schnittstelle wurde so eliminiert und ein vorzeitiges Stoppkodon entstand, welches zum Abbruch der Translation von NPR1 führt. In beiden Sequenzvarianten von *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* konnten insgesamt zwei verschiedene Mutationsvarianten identifiziert werden. Entweder kam es zur Insertion eines Adenins oder eines Thymins zwischen Nukleotid 218 und 219 (Abb. 71 und Abb. 72). Die sequenzierten Pflanzen wurden zur Samengewinnung und für weiterführende Analysen verwendet. Für die weiteren Untersuchungen wurden zusätzlich neben den sequenzierten Pflanzen weitere potentielle *npr1* Mutanten der Linie 111H verwendet.

A

		<i>NarI</i> PAM
XM_009608066.2	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
<i>N. tomentosiformis</i>	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-1/2	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-1/5	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-3/8	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-3/11	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-6/17	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT
111H-6/18	ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG	CGCGGGTAAGGAAATTCGGT.....GACAAGTTT

B

XP_009606361.1	MDN.....FDYFADAKLVVPGAGKEIP.....DKF
<i>N. tomentosiformis</i>	MDN.....FDYFADAKLVVPGAGKEIP.....DKF
111H-1/2	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
111H-1/5	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
111H-3/8	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
111H-3/11	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
111H-6/17	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
111H-6/18	MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*

C

111H-1/5	c.218_219insT
111H-1/2	c.218_219insT
111H-3/8	c.218_219insA
111H-3/11	c.218_219insA
111H-6/17	c.218_219insA
111H-6/18	c.218_219insA

Abb. 72 Auswertung der Sequenzierung der F₁-Generation von *N. tomentosiformis* NPR1 der 111H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009608066.2 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 111H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *NarI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XM_009606361.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 111H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 111H.

Die Probenentnahme von Blattgewebe für die Isolation der genomischen DNA von potentiellen *npr1* Mutanten beschränkte sich auf eine definierte Größe. Da dies aber die Grundlage der Sequenzierung darstellt, sollte verifiziert werden, dass die Sequenzierungsergebnisse für die gesamte Pflanze gelten. Für diesen Versuch wurden zwei Pflanzen herangezogen, welche bereits sequenziert wurden. Die Pflanzen 111H-1/2 und 111H-3/8 waren in der Zwischenzeit soweit in der Entwicklung vorangeschritten, dass sie bereits Blütenstände ausbildeten. Es wurden jeweils vier Proben Blattmaterial von verschiedenen Stellen jeder Pflanze entnommen. Es wurde Blattmaterial vom untersten Blatt (A), einem Blatt im unteren Mittelbereich (B), einem Blatt im oberen Mittelbereich (C) und vom obersten Blatt (D) entnommen. Aus dem Blattmaterial wurde genomische DNA isoliert. Die genomische DNA

diente bei der Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* als Matrize. Als Positivkontrolle wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Die PCR-Produkte wurden einem *NarI*-Restriktionsverdau unterzogen. Die PCR-Produkte der Pflanze 111H-1/2 wurden dabei nicht geschnitten. Die PCR-Produkte der Pflanze 111H-3/8 blieben nicht vollständig ungeschnitten. Ein gewisser Anteil von ungefähr 5 % wird dennoch geschnitten und weist auf eine unvollständige Mutagenese hin. Die Ergebnisse des *NarI*-Verdaus sind bei beiden Pflanzen über die gesamte Pflanze homogen verteilt und decken sich mit den Ergebnissen der ersten molekularen Analyse. Der Restriktionsverdau mit *HindIII* war bei allen PCR-Produkten unauffällig. Die Amplifikate wurden jeweils vollständig geschnitten und es entstanden Fragmente der Größe 201 Bp und 344 Bp (Abb. 73). Aufgrund der homogenen Ergebnisse beider Pflanzen kann davon ausgegangen werden, dass es ausreichend ist, sich bei der Isolation der genomischen DNA auf eine Blattprobe zu beschränken, um dennoch aussagekräftige Ergebnisse zum Ausmaß der Mutagenese zu erhalten.

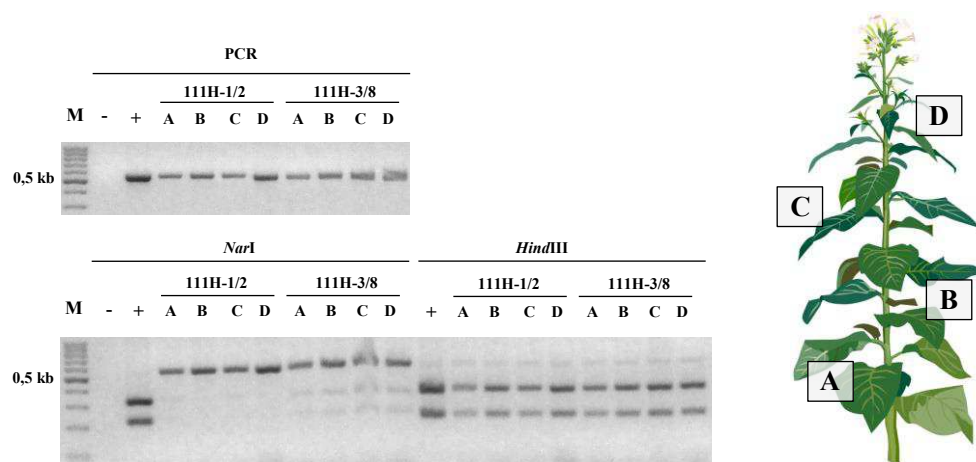
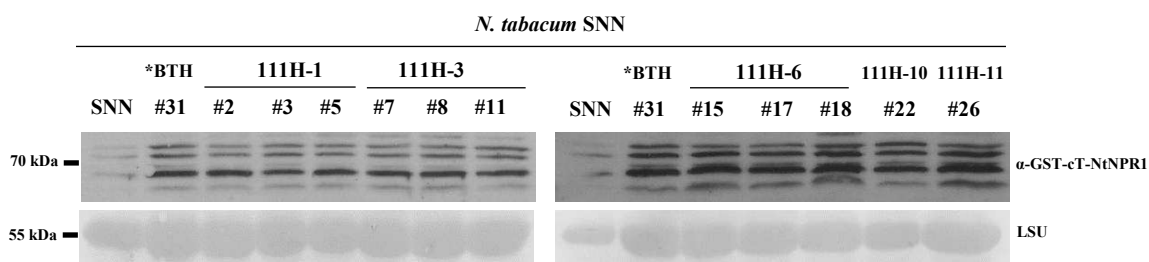


Abb. 73 Verteilung der erfolgreichen Mutagenese innerhalb der Tabakpflanzen der Linien 111H der F₁-Generation. Die genomische DNA zur Analyse stammt von dem untersten Blatt (A), von einem unteren Blatt im mittleren Bereich (B), von einem oberen Blatt im mittleren Bereich (C) und vom obersten Blatt der Pflanzen (D). Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* erfolgte per PCR über die Primer 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 545 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *NarI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 216 Bp und 329 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR Produkt der Größe von 545 Bp zurück. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *HindIII* entstehen zwei Fragmente der Größe 201 Bp und 344 Bp. (Tabakpflanze: <https://www.pflanzenforschung.de/files/2913/7656/3671/tabak.pdf>)

Für ausgewählte Pflanzen der F₁-Generation der Linie 111H sollte nun ein immunologischer Nachweis von *NPR1* Aufschluss darüber geben, ob sich durch die eingebrachten Mutationen im *NPR1*-Proteinstatus der Pflanzen Veränderungen ergeben haben. Hierfür wurden Pflanzen der Linien 111H-1, 111H-3 und 111H-6 verwendet von denen klar war, dass es sich um *npr1* Mutanten handelt. Ferner wurde je eine Pflanze der Linie 111H-10 und 111H-11 verwendet, welche im Vorfeld als wildtypisch identifiziert wurden. Als Kontrolle wurde eine wildtypische SNN-Pflanze und eine SNN-Pflanze aus der Bion-Behandlung der Vorselektion verwendet. Von diesen Pflanzen wurden Proteinextrakte von unbehandelten Blattgewebe hergestellt, sowie Proteinextrakte von Blattmaterial, welches zuvor drei

Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurde. Als Kontrolle wurde ein weiterer Proteinextrakt hergestellt, aus auf H₂O inkubiertem Blattmaterial von SNN-Pflanzen. Die Proteinextrakte des unbehandelten Blattmaterials wurden für den immunologischen Nachweis von NPR1 mittels des Antikörpers α -GST-cT-NtNPR1 verwendet. Hier zeigte sich, dass es im Proteinbandenmuster zwischen den Pflanzen der Linie 111H und den Kontrollen keine wesentlichen Unterschiede gibt (Abb. 74A). Da NPR1 unmittelbar mit der *PR1*-Induktion im Zusammenhang steht, sollte mit Hilfe der Proteinextrakte aus auf Salicylsäure-inkubiertem Blattmaterial untersucht werden, ob die Akkumulation von PR1 durch die Mutation im ersten Exon von *NPR1* beeinflusst wird. Der immunologische Nachweis des PR1 erfolgte dabei über den Antikörper α -PR1a. Wie in Abbildung 74B zu sehen ist, gibt es auch hier keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den Pflanzen der Linie 111H. Scheinbar geringere Akkumulationen von PR1 korrelieren mit ebenfalls geringerem Gesamtproteingehalt der Proben. Dies wird anhand der Ponceau S-Färbung der Nitrocellulosemembran und der Referenz der großen Untereinheit der RuBisCo deutlich. In der F₁-Generation der Linien 111H konnte kein Effekt auf die Akkumulation von NPR1 und PR1 durch die eingebrachten Mutationen nachgewiesen werden. Alle analysierten Pflanzen verhielten sich wie die jeweiligen Wildtyp-Kontrollen.

A



B

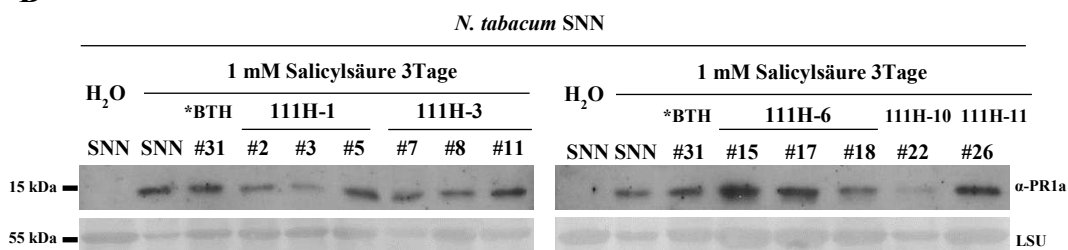


Abb. 74 Immunologischer Nachweis von NPR1 und PR1 in der F₁-Generation der Linien 111H. (A) Immunologischer Nachweis von NPR1 (66 kDa) in Proteinextrakten aus Blattmaterial von unbehandelten Pflanzen der F₁-Generation der Linien 111H. Bei *BTH #31 handelt es sich um eine wildtypische *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanze aus der Vorselektion, welche mit Bion behandelt wurde. (B) Immunologischer Nachweis von PR1 (15 kDa) in Proteinextrakten aus über drei Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiertem Blattmaterial der entsprechenden Pflanzen. Bei *BTH #31 handelt es sich um eine wildtypische *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanze aus der Vorselektion, welche mit Bion behandelt wurde. Als Kontrolle wurden Blattscheiben wildtypischer *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen verwendet, welche ebenfalls über drei Tage auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise H₂O inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

4.6.2.2 Charakterisierung der F₂-Generation

Für die Charakterisierung der F₂-Generation der Linie 111H wurden Samen der bereits sequenzierten F₁-Pflanzen verwendet. Die Samen der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/8, 111H-3/11, 111H-6/17 und 111H-6/18 wurden jeweils in zwei kleine Töpfchen mit Anzuchterde ausgesät. Nach drei Wochen wurden die Keimlinge des einen Ansatzes analog zur Vorselektion der F₁-Generation einer vierwöchigen Bion-Behandlung unterzogen. Zweimal pro Woche über einen Zeitraum von vier Wochen wurden die Keimlinge mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Der zweite Ansatz wurde dazu parallel mit H₂O besprüht und diente jeweils als direkte Kontrolle. Als allgemeine Kontrolle der Wirksamkeit der Bion-Behandlung dienten zwei Ansätze von Keimlingen der Linie 138-3/7, von denen einer der Bion-Behandlung unterzogen wurde und der andere lediglich mit H₂O besprüht wurde. Am Ende der Behandlung konnte zwischen der H₂O behandelten Kontrolle und der Bion-behandelten Kontrolle ein klarer Effekt beobachtet werden. Die Bion-behandelten Pflanzen der Linie 138-3/7 wiesen ein deutliches Wachstumsdefizit im Gegensatz zur H₂O-Kontrolle auf. Auch die Pflanzen der Linien 111H waren nach Bion-Behandlung deutlich kleiner als die jeweiligen H₂O-Kontrollen. Im Vergleich zur Kontrolllinie 138-3/7 konnten nach der Behandlung mit Bion bei den Pflanzen der Linie 111H keine überdurchschnittlich großen Pflanzen beobachtet werden.

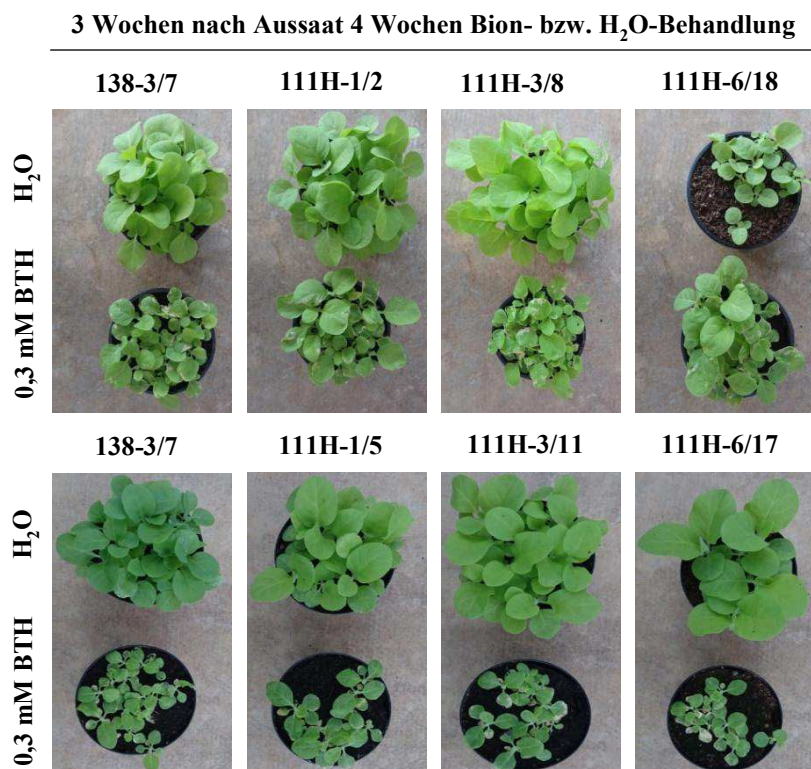


Abb. 75 Vierwöchige Bion-Behandlung der F₂-Generation der Linien 111H. Drei Wochen nach Aussaat der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/8, 111H-3/11, 111H-6/17 und 111H-6/18 wurden die Keimlinge vier Wochen zwei Mal in der Woche mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Als Kontrolle wurde die Linie 138-3/7 mitgeführt. Zum direkten Vergleich wurde ein weiterer Ansatz derselben Linien parallel mit H₂O besprüht.

Lediglich die Pflanzen der Linie 111H-6/18 wiesen nach Bion-Behandlung deutlich größere Individuen auf (Abb. 75). Im Allgemeinen aber decken sich die Ergebnisse des Versuchs mit den Ergebnissen der Vorselektion der F₁-Generation.

Parallel zu diesem Versuch wurden die Samen derselben Linien der F₁-Generation für weitere Charakterisierungszwecke auf selektiven MS-Medium mit Kanamycin und auf MS-Medium mit Kanamycin und zusätzlich 0,3 mM Salicylsäure ausgebracht. Die Keimlinge wurden unter Standardbedingungen im Lichtschrank angezogen. Die Pflanzen der Linie 111H tragen aufgrund des CRISPR/Cas9-Vektors eine Kanamycinresistenz. Als Kontrolle wurden Samen der Linie 138-3/7 verwendet und ebenfalls auf MS-Medium mit Kanamycin und auf MS-Medium mit Kanamycin und 0,3 mM Salicylsäure ausgesät. Nach vier Wochen konnte der Effekt der Salicylsäure beobachtet werden. Die Kontrolllinie 138-3/7 zeigte deutliche Wachstumsdefizite, während die Keimlinge auf MS-Medium ohne Salicylsäure normal wuchsen. Entsprechend zu den Ergebnissen der Sprühversuche mit Bion in der F₁- und F₂-Generation konnten auch hier bei den Keimlingen der Linie 111H keine deutlich größeren Kandidaten beobachtet werden. Die Keimlinge verhielten sich entsprechend der Kontrolllinie. Die Keimlinge auf Salicylsäure-haltigem MS-Medium waren deutlich kleiner als die Keimlinge auf MS-Medium ohne Zusatz von Salicylsäure (Abb. 76).

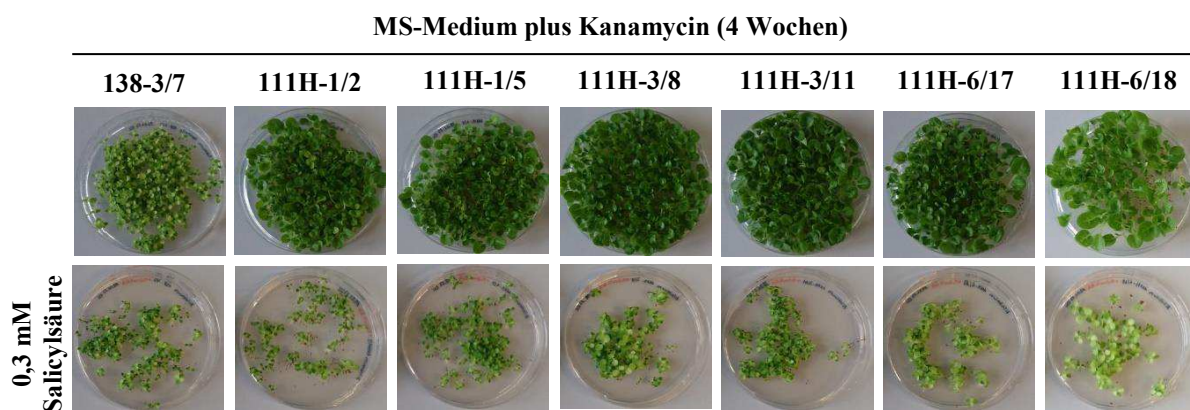


Abb. 76 Keimlinge der F₂-Generation der Linien 111H auf MS-Medium. Aussaat der F₂-Generation der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/8, 111H-3/11, 111H-6/17 und 111H-6/18 auf selektivem MS-Medium mit Kanamycin mit und ohne Zusatz von 0,3 mM Salicylsäure. Als Kontrolle dienten Samen der Linie 138-3/7.

Anschließend wurden die Keimlinge von den Platten mit MS-Medium ohne Salicylsäure im Gewächshaus auf Erde pikiert. Sobald genügend Blattmaterial vorlag, wurde aus den Pflanzen genomische DNA isoliert und auf molekularer Ebene analysiert. Die genomische DNA diente als Matrize für die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* mit Hilfe des Primerpaars 5'-NsNPR1-550/3'-NsNPR1-550. Als Kontrolle wurde genomische DNA einer SNN-Pflanze verwendet und als Positivkontrolle eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1. Das 545 Bp große PCR-Produkt wurde anschließend mit *NarI* restringiert. Über die sechs Linien verteilt wurden insgesamt 84 Pflanzen nach diesem Schema analysiert. Die PCR-Produkte der Pflanzen der F₂-Generation verhielten sich entsprechend der jeweiligen F₁-Generation. Amplifikate der Linien 111H-1/2, 111H-1/5 und 111H-3/11 blieben völlig ungeschnitten. Das PCR-Produkt der Pflanzen der Linie 111H-3/8 wurde zu

ungefähr 5 % noch von *NarI* geschnitten. Die Amplifikate der Linien 111H-6/17 und 111H-6/18 wurden noch bis zu ungefähr 15 % von *NarI* geschnitten (Abb. 77). Die partielle Restriktion durch *NarI* weist weiterhin auf einen wildtypischen Anteil innerhalb der F₂-Generation dieser Linien hin.

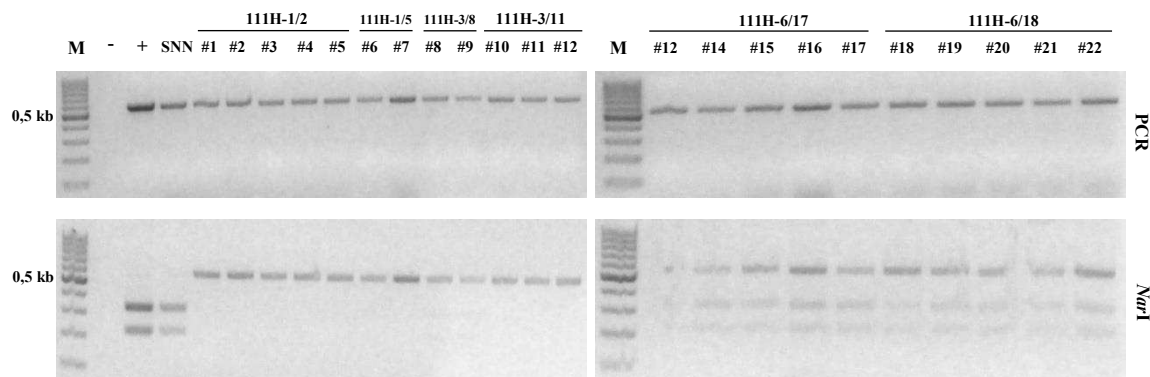


Abb. 77 Amplifikation des ersten Exons von NPR1 und Restriktion mit *NarI* der F₂-Generation der Linien 111H. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* erfolgte per PCR über die Primer 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Als Matrice wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 545 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *NarI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 216 Bp und 329 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe von 545 Bp zurück.

Von den analysierten Pflanzen wurden im Anschluss einige Pflanzen der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/11 und 111H-6/17 ausgewählt und weiteren Tests unterzogen. Zuerst wurden Proteinextrakte aus unbehandeltem Blattmaterial der Linien 111H-1/2 und 111H-3/11 hergestellt. Zur Kontrolle wurden Proteinextrakte aus unbehandeltem Blattmaterial drei verschiedener SNN-Pflanzen verwendet. Diese Extrakte dienten zur Untersuchung der F₂-Generation auf Veränderungen im Proteinbandenmuster des NPR1. Der immunologische Nachweis wurde mittels des Antikörpers α -GST-cT NtNPR1 durchgeführt. Wie in Abbildung 78A zusehen ist, sind auch in der F₂-Generation keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den Pflanzen der Linie 111H hinsichtlich des Proteinbandenmusters des NPR1 erkennbar. Anschließend sollte untersucht werden, ob die Mutation im NPR1 einen Einfluss auf die Induktion der Expression von *PR1* zeigt. Hierfür wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von Pflanzen der Linie 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/11 und 111H-6/17 hergestellt. Das Blattmaterial wurde zuvor über drei Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von SNN-Pflanzen und Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet, welches ebenfalls über drei Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurde. Der immunologische Nachweis für die Akkumulation von PR1 wurde mittels des Antikörpers α -PR1a durchgeführt. Wie in Abbildung 78B zusehen ist, unterscheiden sich die jeweiligen Kontrollpflanzen und die ausgewählten Pflanzen der F₂-Generation der Linie 111H unwesentlich im Hinblick auf die PR1-Akkumulation. Die Akkumulation von PR1 der SNN-Pflanzen ist relativ schwach ausgeprägt, sodass sich die vermeintlich schwächere Akkumulation von PR1 der Pflanzen der Linie 111H-3/11 wieder relativiert.

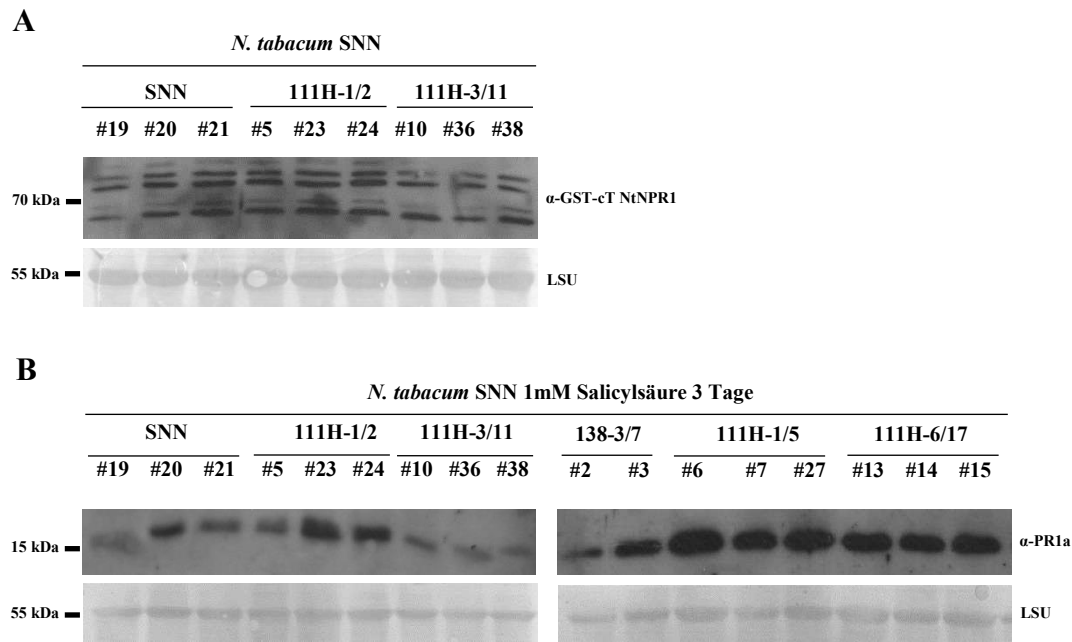


Abb. 78 Immunologischer Nachweis von NPR1 und PR1 in Pflanzen der F₂-Generation der Linien 111H. (A) Immunologischer Nachweis von NPR1 (66 kDa) in unbehandelten Pflanzen der F₂-Generation der Linien 111H. Als Kontrolle dienten unbehandelte wildtypische SNN Pflanzen. (B) Immunologischer Nachweis von PR1 (15 kDa). Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial aus über drei Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubierten Blattscheiben der entsprechenden Pflanzen hergestellt. Als Kontrolle dienten wildtypische SNN Pflanzen sowie Pflanzen der Linie 138-3/7. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

In einem zusätzlichen Versuch sollte geklärt werden, ob die Induktion der Expression von *PR1* durch eine *TMV*-Infektion bei der F₂-Generation der Linie 111H von der Wildtypsituation abweicht. Für den Versuch wurden jeweils drei Pflanzen der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/11 und 111H-6/17 mit *TMV* infiziert. Als Kontrollpflanzen dienten ebenfalls jeweils zwei infizierte SNN-Pflanzen und Pflanzen der Linie 138-3/7. Sieben Tage nach der Infektion (dpi) wurden Proteinextrakte aus infiziertem Blattmaterial hergestellt. Diese Proteinextrakte wurden für den immunologischen Nachweis der PR1-Akkumulation mittels des Antikörpers α-PR1a verwendet. Auch bei Induktion der *PR1*-Genexpression durch *TMV* konnten keine Abweichungen der Akkumulation von PR1 (15 kDa) zwischen den Kontrollen und der F₂-Generation der Linie 111H festgestellt werden.

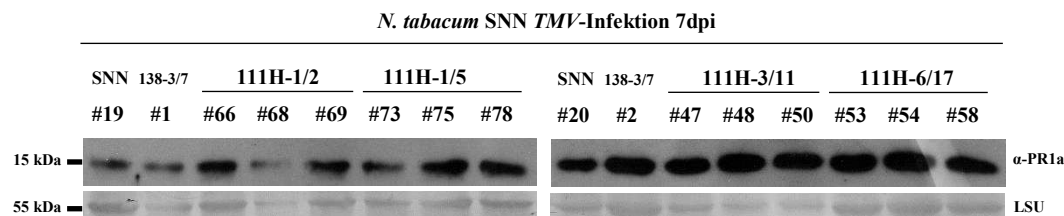


Abb. 79 Immunologischer Nachweis von PR1 in *TMV*-infizierten Pflanzen der F₂-Generation der Linien 111H. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus infiziertem Blattmaterial der entsprechenden Pflanzen hergestellt. Als Kontrollen wurden die Linie 138-3/7 und *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) verwendet. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Das Signal der Kontrollpflanzen #19 und #1 ist relativ schwach im Vergleich zu dem Signal der anderen Kontrollpflanzen, sodass sich die vermeintlich geringere Akkumulation von PR1 der Pflanzen # 68 und #73 der Linien 111H-1/2 und 111H-1/5 wieder relativiert (Abb. 79).

Eine Transkriptanalyse zeigte zusätzlich, dass die Transkription von *NPR1* in diesen *npr1* Mutanten nicht beeinträchtigt ist. Für die Analyse wurde RNA von Blattgewebe von Pflanzen der Linien 111H-1/2, 111H-1/5, 111H-3/11 und 111H-6/17 isoliert. Als Kontrolle wurde RNA von Blattgewebe der Linie 138-3/7 isoliert. 50 ng/ μ l RNA wurden für die RT-PCR eingesetzt. Für die Synthese der cDNA wurde der Primer 3'NtNPR1-3 verwendet. Dieser Primer erstreckt sich über das Ende des ersten Exons und den Anfang des zweiten Exons. Pro Pflanze wurden je ein Ansatz mit und ohne reverser Transkriptase verwendet. 3 μ l der cDNA wurde anschließend als Matrize in einer PCR mit dem Primerpaar 5'NtNPR1-17/3'NtNPR1-3 verwendet. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass das Amplifikat der PCR 3' der *NarI*-Schnittstelle und der Zielsequenz der Mutagenese liegt. Als Kontrollen wurde 1 μ l einer 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1, 1 μ l genomische DNA einer wildtypischen Pflanze verwendet und 3 μ l der Ansätze ohne Zugabe von reverser Transkriptase. Das Amplifikat der PCR wies eine Größe von 0,3 kb auf. Die Plasmidkontrolle funktionierte einwandfrei. Die Kontrolle der genomischen DNA war negativ. Dies wurde auch so erwartet, da sich der Reversprimer über die Grenze des ersten und zweiten Exons erstreckt. Die Ansätze ohne Zugabe reverser Transkriptase waren ebenfalls negativ und zeigen, dass die Amplifikate tatsächlich ihren Ursprung in der synthetisierten cDNA haben und nicht fälschlicherweise von genomischer DNA stammen. Leider ist der direkte Vergleich mit der Kontrolllinie 138-3/7 nicht möglich, da hier recht wenig Transkript vorliegt. Trotzdem kann bei den Pflanzen der F₂-Generation der Linie 111H aufgrund der Banden auf der korrekten Höhe von 0,3 kb darauf geschlossen werden, dass die Transkription von *NPR1* durch die Mutagenese nicht beeinträchtigt worden ist (Abb. 80).

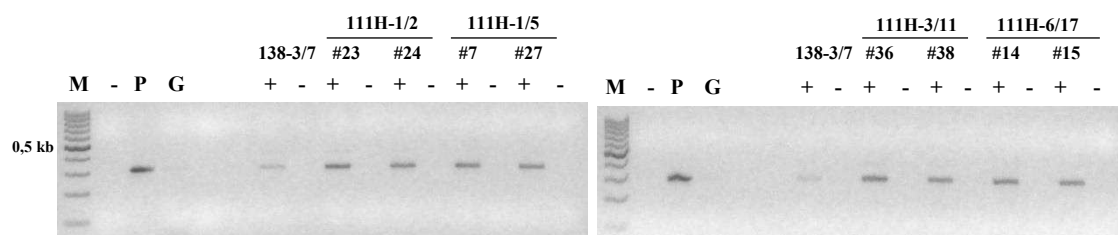


Abb. 80 Transkriptanalyse von Pflanzen der F₂-Generation der Linien 111H. Als Matrize für die RT-PCR wurde 50 ng/ μ l RNA isoliert aus Blattmaterial verwendet. Für die cDNA-Synthese wurde der Primer 3'NtNPR1-3 verwendet. Die cDNA wurde anschließend als Matrize in einer PCR mit den Primern 5'NtNPR1-17/3'NtNPR1-3 verwendet. Das Amplifikat hat eine Größe von 0,3 kb. Pro Pflanze wurden je ein Ansatz mit (+) und ohne (-) Zugabe reverser Transkriptase verwendet. Als Kontrolle wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 (P) und genomische DNA (G) der Kontrollpflanze der Linie 138-3/7 eingesetzt.

Die molekularen Analysen der F₁- und der F₂-Generation der Linie 111H, sowie die Sequenzierungsergebnisse für die F₁-Generation belegen die erfolgreiche Mutagenese des ersten Exons von *NPR1* über das CRISPR/Cas9-System. Leider konnten bezüglich der *NPR1*- und der *PR1*-Akkumulation im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich bei den Mutanten nicht um vollständige *npr1* Mutanten. Die Mutagenese könnte noch

nicht abgeschlossen sein, sodass auch in der F₂-Generation ein geringer Anteil wildtypischen *NPR1* zurückbleibt. Der Anteil von 10% der untersuchten T-Vektorklone mit wildtypischer Sequenz in der F₁-Generation deutet darauf hin. Der zurückgebliebene wildtypische Anteil reicht möglicherweise sogar aus, um das ganze System weiterhin aufrechtzuerhalten und die Auswirkungen der Mutagenese zu puffern.

4.6.3 Erzeugung von Mutanten der *NPR3*-Gene der Eltern *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* (Linien 113H)

Den Transformationshintergrund der Linien 113H stellt *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN dar. Die Zielsequenz wurde so konzipiert, dass die *PciI*-Schnittstelle innerhalb des ersten Exons von *NPR3* betroffen ist. Durch die Eliminierung dieser Schnittstelle durch Insertion oder Deletion einzelner Nukleotide in diesem Bereich wird die Selektion potentieller Mutanten auf molekularer Ebene erleichtert. Aufgrund von Sequenzunterschieden innerhalb von *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* hinsichtlich *NPR3* unterscheidet sich die PAM-Sequenz im Anschluss an die identische Zielsequenz in einem Nukleotid. Da die erste Position innerhalb der PAM-Sequenz variabel ist, spielt es keine Rolle, dass es sich hierbei um ein Thymin bei *N. sylvestris* und bei *N. tomentosiformis* um ein Cytosin handelt. Die Guanine auf Position zwei und drei sind ausschlaggebend für die Erkennung der PAM-Sequenz durch die Endonuklease Cas9. Die Mutagenese betrifft so die Allele der *N. sylvestris*-Variante als auch die der *N. tomentosiformis*-Variante. In Abbildung 81 ist das erste Exon von *NPR3* zusammen mit den für die Analyse verwendeten Restriktionsschnittstellen und Oligonukleotiden dargestellt.

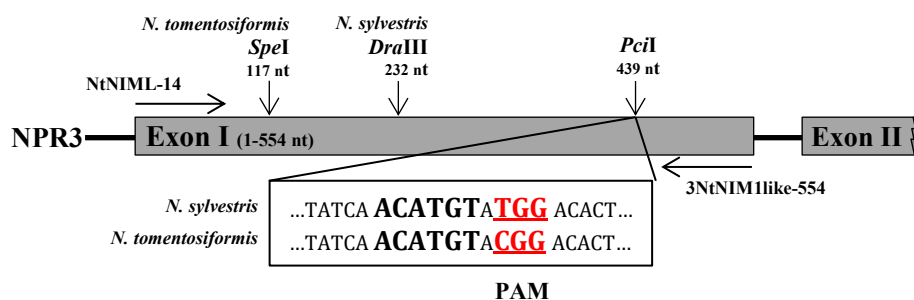


Abb. 81 Schematische Darstellung von Exon I von *NPR3*. Das erste Exon von *NPR3* erstreckt sich von Nukleotid 1 bis 554. Mit dem Primerpaar NtNIML-14/3NtNIM1like-554 kann das erste Exon zu Analyse Zwecken vollständig amplifiziert werden. Bei Nukleotid 439 schneidet das Enzym *PciI*, im Anschluss daran befindet sich die PAM-Sequenz. Für weitere Analyse Zwecke wurde das Restriktionsenzym *SpeI* (117 nt), welches nur innerhalb der Sequenz von *N. tomentosiformis* vorkommt, und das Restriktionsenzym *DraIII* (232 nt), welches nur innerhalb der Sequenz von *N. sylvestris* vorkommt, verwendet.

4.6.3.1 Charakterisierung der F₁-Generation

Zu Beginn der Charakterisierung wurde die F₁-Generation der Linie 113H durch eine vierwöchige Bion-Behandlung vorselektioniert. Insgesamt wurden Samen von sieben Linien dafür ausgesät. Von den Linien 113H-3, 113H-4, 113H-5, 113H-7, 113H-9, 113H-10 wurden standardmäßig 1000 Samen

ausgebracht. Lediglich bei Linie 113H-8 standen nur ungefähr ein Viertel davon zur Verfügung. Als Kontrolle wurden zwei Ansätze zu je 1000 Samen von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) verwendet. Ein Ansatz wurde ebenfalls der vierwöchigen Behandlung unterzogen und der andere Ansatz wurde parallel dazu mit H₂O besprüht. Die Bion-Behandlung wurde drei Wochen nach Aussaat begonnen. Am Ende der Behandlung war zwischen den Kontrollpflanzen eine deutliche Wirkung des Bions zu beobachten. Die H₂O-besprühten SNN-Pflanzen waren wesentlich größer und sahen vitaler aus als die Bion-besprühten Pflanzen. Diese zeigten deutliche Wachstumsdefizite und angegriffenes Blattgewebe aufgrund der häufigen Bion-Behandlung. Die F₁-Generation der 113H-Linien, mit Ausnahme der Linie 113H-8, waren phänotypisch kaum von der H₂O-Kontrolle zu unterscheiden. Es bot sich ein homogenes Bild von gut gewachsenen und entwickelten, vitalen Pflanzen. Lediglich an den Blättern konnte angegriffenes Blattgewebe durch die Bion-Behandlung im geringen Maße ausgemacht werden. Linie 113H-8 wurde aufgrund der sehr wenigen Keimlingen nicht weiter bei den Analysen verwendet (Abb. 82). Von den sechs verbleibenden Linien wurden jeweils sechs der optisch schönsten und größten Pflanzen ausgewählt und in größere Töpfe umgetopft. Sobald genügend Blattmaterial verfügbar war, wurde daraus genomische DNA isoliert, um die F₁-Generation zu analysieren.

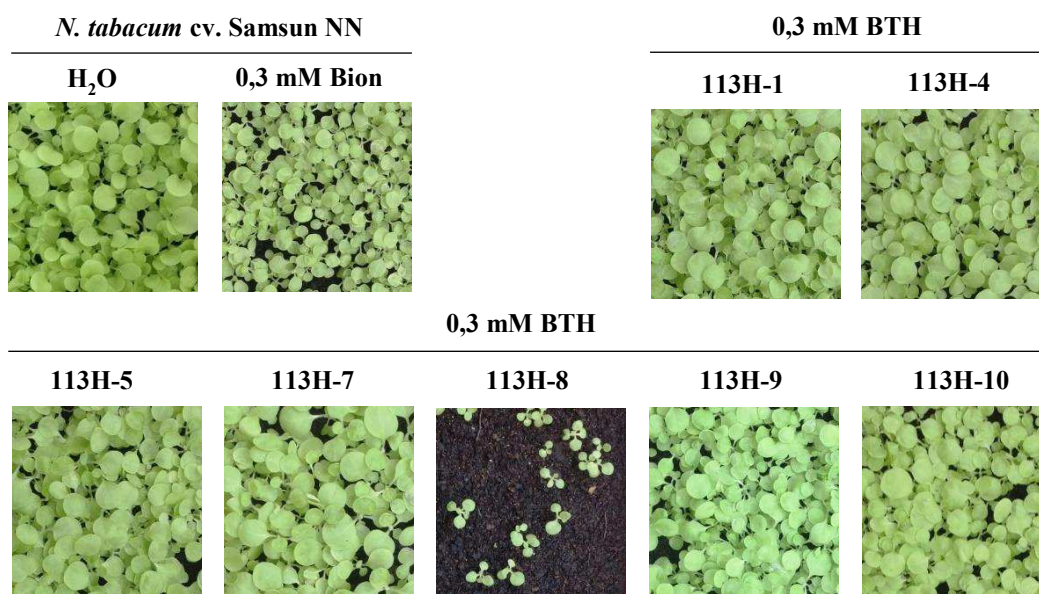


Abb. 82 Vorselektion F₁-Generation der Linien 113H durch vierwöchige Bion-Behandlung. Drei Wochen nach Aussaat wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Vier Wochen lang zwei Mal in der Woche wurden die Keimlinge mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Als Kontrolle diente *N. tabacum* cv. Samsun NN. Diese wurde ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen, beziehungsweise mit H₂O besprüht.

Für die molekulare Analyse der potentiellen *npr3* Mutanten wurde über die Primerkombination 5'NtNIML-14/3'NtNIM1like-554 das erste Exon von *NPR3* amplifiziert. Die genomische DNA der ausgewählten Pflanzen der F₁-Generation der Linie 113H wurde als Matrize verwendet. Als Kontrollen wurden genomische DNA einer SNN-Pflanze verwendet sowie eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3. Das erwartete Amplifikat wies eine Größe von 554 Bp auf. Die Amplifikation war in allen Fällen erfolgreich. Anschließend wurden die PCR-Produkte einer Restriktionsanalyse unterzogen. Das Enzym *Pci*I schneidet das Amplifikat der wildtypischen Sequenz in zwei Fragmente der Größe

115 Bp und 439 Bp. Bei erfolgreicher Mutagenese und der damit einhergehenden Eliminierung der Erkennungssequenz von *PciI* werden Amplifikate potentieller Mutanten durch dieses Enzym nicht geschnitten. Bei der Restriktion der PCR-Produkte durch *PciI* wurde die Plasmidkontrolle sowie das Amplifikat der Sequenz von SNN annähernd vollständig geschnitten. Die PCR-Produkte der Pflanzen der Linie 113H blieben jedoch alle ungeschnitten. Dies deutet auf eine sehr erfolgreiche Mutagenese hin. Um das zu verifizieren und auszuschließen, dass die Amplifikate möglicherweise nicht schneidbar sind, wurde ein weiterer Restriktionsverdau mit dem Enzym *DraIII* durchgeführt. Das Enzym schneidet nur im ersten Exon von *NPR3* der *N. sylvestris*-Variante, da die Sequenz von *N. tomentosiformis* nicht über diese Schnittstelle verfügt. Aus diesem Grund wird das Amplifikat zur Hälfte geschnitten und es bleiben Fragmente der Größe 232 Bp und 322 Bp und ungeschnittenes PCR-Produkt zurück. Alle Amplifikate aus genomischer DNA zeigten nach der Restriktion dieses Bandenmuster auf. Lediglich die Plasmidkontrolle wurde vollständig geschnitten, da diese die Sequenz von *N. sylvestris NPR3* enthält. Alle untersuchten Pflanzen der Linie 113H in der F₁-Generation sind potentielle *npr3* Mutanten (Abb. 83).

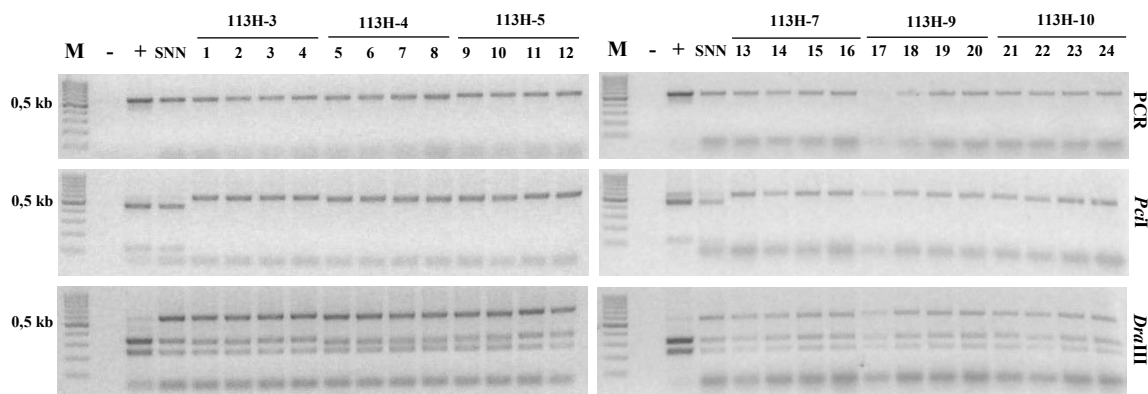


Abb. 83 Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* von Pflanzen der Linien 113H und die analytische Restriktion mit *PciI* und *DraIII*. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* erfolgte per PCR über die Primer NtNIML-14/3NtNIM1like-554. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 554 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *PciI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 115 Bp und 439 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR Produkt der Größe von 554 Bp zurück. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *DraIII* entstehen zwei Fragmente der Größe 232 Bp und 322 Bp und es bleibt ein Teil ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe 554 Bp zurück, da *DraIII* nur die *N. sylvestris*-Variante schneidet.

Die PCR-Produkte von acht verschiedenen Pflanzen verteilt über die sechs verbliebenen 113H-Linien wurden in den T-Vektor kloniert. Die Unterscheidung der Varianten *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* erfolgte im Vorfeld über Restriktionsanalysen mit *DraIII* und *SpeI*. Mittels einer weiteren Restriktionsanalyse mit *PciI* konnten 91% der untersuchten Klone als mutant eingestuft werden. Pro Pflanze und *NPR3*-Variante wurden zwei der als mutant eingestuft Klone für die Sequenzierung verwendet. Innerhalb einer Pflanze und einer *NPR3*-Variante enthielten jeweils beide sequenzierten Klone dieselbe Mutation. Lediglich bei Pflanze 113H-10/24 unterschieden sich die identifizierten Mutationen voneinander. Durch die Sequenzierung konnten insgesamt vier verschiedene Mutationen in den Sequenzen des ersten Exons von *NPR3* der *N. sylvestris*-Variante identifiziert werden. Eine

Insertion eines Thymins zwischen Nukleotid 442 und 443 und Deletionen von vier, zehn und 26 Nukleotiden. Bei allen Mutationen war die Erkennungssequenz von *PciI* betroffen und wurde eliminiert. Bei der Deletion von 26 Nukleotiden zwischen Nukleotid 438 und 464 wurde zusätzlich noch die PAM-Sequenz zerstört. Durch die Insertion und Deletionen von Nukleotiden wurde der Leserahmen verschoben und jeweils ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet (Abb. 84).



Abb. 84 Auswertung der Sequenzierung der *N. sylvestris*-Variante von *NPR3* der F₁-Generation der 113H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009778209.1 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz von *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 113H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *PciI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XP_009776511.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 113H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 113H.

Innerhalb der Sequenzen des ersten Exons von *NPR3* der *N. tomentosiformis*-Variante konnten mittels Sequenzierung vier verschiedene Mutationsarten identifiziert werden. Zum einen gab es zwischen Nukleotid 438 und 440 eine Deletion eines Cytosins. Zum anderen gab es Insertionen von einem, 15 und 19 Nukleotiden. Zur Verschiebung des Leserahmens kommt es nur bei der Deletion eines Cytosins und der Insertion eines Thymins. In Folge dessen wird auch ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet. In den weiteren Fällen wird der Leserahmen durch Insertion der Nukleotide geändert und es erfolgt keine Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 85).

A

XM_009603895.2	ATGGATTGT.....TTCCTCCGGAGGTATCA	PciI PAM	ACATGTA CGG ACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
<i>N. tomentosiformis</i>	ATGGATTGT.....TTCCTCCGGAGGTATCA		ACATGTA CGG ACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-3/1	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGG ATCTTGT		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-3/3	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGGTATCA TATAGTGTCCGCACATATA TGTA CGG ACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC		A-ATGTA CGG ACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-4/6	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGGTATCA		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-5/9	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGG ATCTTGT		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-5/10	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGG ATCTTGT		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-7/14	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGG ATCTTGT		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-9/19	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGG ATCTTGT		CAGATTCC GTA CGGACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
113H-10/24	ATGGCTTGT.....TTCCTCCGGAGGTATCA		ACAT TTG TAC CGG ACACTATATGTGCTCATGACTCT.....CACTTTTCC
	*****		*****

B

XP_009602190.1	MDC.....LKHFPPEVST	CTDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
<i>N. tomentosiformis</i>	MAC.....LKHFPPEVST	CTDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-3/1	MAC.....LKHFPPE DLVRFR	TDITCAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-3/3	MAC.....LEHFPPEV SHIVSAHIC CTDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF	
113H-4/6	MAC.....LKHFPPEV SNVRTLYVLM TLADQQLVLVWS*	
113H-5/9	MAC.....LKHFPPE DLVRFR	TDITCAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-5/10	MAC.....LKHFPPE DLVRFR	TDITCAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-7/14	MAC.....LKHFPPE DLVRFR	TDITCAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-9/19	MAC.....LKHFPPE DLVRFR	TDITCAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
113H-10/24	MAC.....LKHFPPEVST LYGHYMC S*	

C

113H-3/1	c.433_443insATCTTGTCAGATTCC	113H-5/10	c.433_443insATCTTGTCAGATTCC
113H-3/3	c.438_442insTATAGTGTCCGCACATATA	113H-7/14	c.433_443insATCTTGTCAGATTCC
113H-4/6	c.439_440delC	113H-9/19	c.433_443insATCTTGTCAGATTCC
113H-5/9	c.432_442insATCTTGTCAGATTCC	113H-10/24	c.441_442insT

Abb. 85 Auswertung der Sequenzierung der *N. tomentosiformis*-Variante von *NPR3* der F₁-Generation der 113H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009603895.2 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 113H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *PciI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XP_009602190.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 113H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 113H.

Innerhalb der Linie 113H konnte in der F₁-Generation beobachtet werden, dass durch die Mutagenese zwar die Restriktionsstelle *PciI* eliminiert wurde und es zur Insertion oder Deletion von Nukleotiden kam, welche allerdings nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens und der damit verbundenen Ausbildung eines vorzeitigen Stoppkodons führten. Deswegen sollte im heterologen Hefesystem überprüft werden, ob solche Mutationen Auswirkungen auf die Interaktionsfähigkeit von *NPR3* mit TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen zeigen. Beispielhaft wurde die Mutation verwendet, welche innerhalb der Sequenz der *N. tomentosiformis*-Variante der Pflanze 113H-9/19 via Sequenzierung identifiziert wurde. Bei dieser Mutation handelt es sich um eine Insertion von 15 Nukleotiden zwischen Nukleotid 433 und 443. Die *PciI*-Schnittstelle wird eliminiert, aber der Leserahmen verschiebt sich nicht und es wird kein vorzeitiges Stoppkodon ausgebildet. Mittels *in vitro* Mutagenese wurde diese Mutation in den *N. sylvestris*-Kontext von *NPR3* überführt und in die Hefektoren pGBT9 und pGAD424 eingebracht. In Abbildung 86A ist deutlich zusehen, dass wildtypisches *NPR3* in der Lage ist, mit NtNIMIN2a und NtNIMIN1-like zu interagieren und diese Interaktion jeweils negativ durch Salicylsäure beeinflusst wird. Im Fall des mutanten Proteins *NPR3*-

Ins ist jedoch keine Interaktion mit den NIMIN-Proteinen möglich, weder in An- noch in Abwesenheit von Salicylsäure. Des Weiteren hat das wildtypische NPR3 die Fähigkeit, mit den TGA-Transkriptionsfaktoren NtTGA2.2 und NtTGA7 zu interagieren. Die Interaktion wird auch hier moderat negativ durch Salicylsäure beeinflusst. NPR3-Ins hat jedoch auch die Fähigkeit verloren, mit TGA-Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Abb. 86B). Die Insertion der Nukleotide verschiebt zwar nicht den Leserahmen, aber die zusätzlichen Aminosäuren verändern die Struktur des NPR3-Proteins so stark, dass grundlegende Interaktionen mit wichtigen Interaktionspartnern nicht mehr möglich sind. Aufgrund dieser Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass auch *in planta* die Funktion von NPR3 starke Einschränkungen aufweisen muss. Es ist also anzunehmen, dass die Mutationen ohne Leserahmenverschiebung und Ausbildung eines vorzeitigen Stoppkodons trotzdem die Funktionsweise von NPR3 maßgeblich stören können.

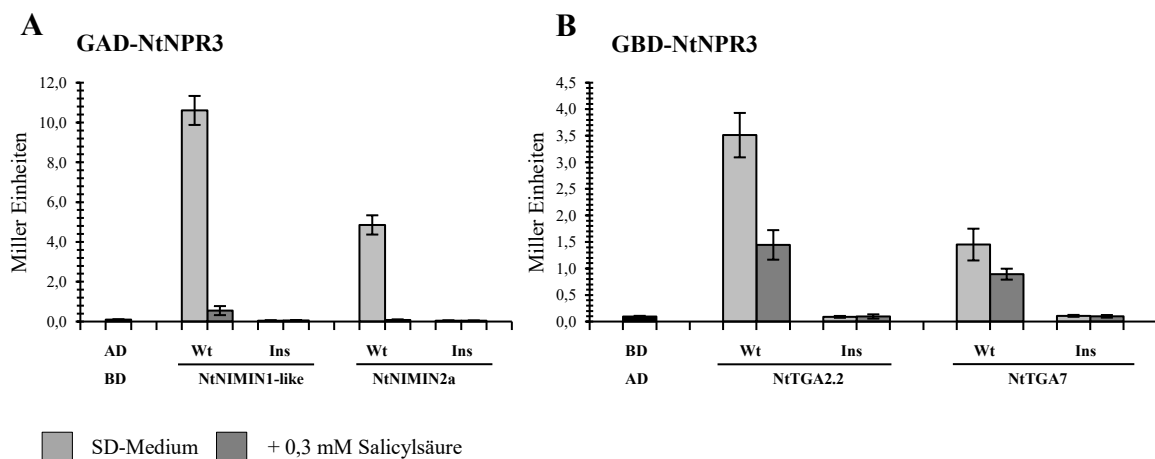


Abb. 86 Auswirkung der Insertion c.433_443insATCTTGTCAGATTCC der *N. tomentosiformis*-Variante 113H-9/19 in Tabak NPR3 auf die Interaktionsfähigkeit in Hefe. (A) Interaktion von NtNPR3 und NtNPR3 Ins mit NIMIN-Proteinen (B) Interaktion von NtNPR3 und NtNPR3 Ins mit TGA-Transkriptionsfaktoren. Die Interaktionen fanden im Hefe-Zwei-Hybridssystem in An- und Abwesenheit von Salicylsäure statt.

Auf molekularer Ebene sind alle analysierten Pflanzen *npr3* Mutanten. Zur Untersuchung, ob diese Mutationen in irgendeiner Form Auswirkungen auf das Proteinbandenmuster von NPR1 hat, wurde ein immunologischer Nachweis mittels des Antikörpers α -GST-cT NPR1 durchgeführt. Die Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial hergestellt, welches über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurde. Als Kontrolle wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial von SNN-Pflanzen hergestellt, welches ebenfalls auf Salicylsäure oder auf H₂O inkubiert wurde. Wie in Abbildung 87 zu sehen ist, sind keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den Pflanzen der Linie 113H zu erkennen. Das Proteinbandenmuster ist bei allen Proben ähnlich. Dieselben Extrakte wurden anschließend für den immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Es sollte geprüft werden, ob die Mutationen in *NPR3* Effekte auf die Akkumulation von PR1 zeigen. Aber auch hier konnten keine Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen und den Pflanzen der Linien 113H hinsichtlich der Akkumulation von PR1 festgestellt werden.

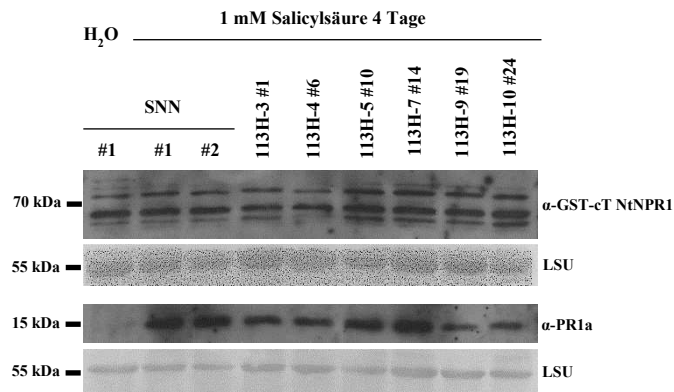


Abb. 87 Immunologischer Nachweis von NPR1 und PR1 in Pflanzen der F₁-Generation der Linien 113H. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial hergestellt, welches über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurde. Als Kontrolle wurden wildtypische SNN Pflanzen verwendet, welche ebenfalls auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise H₂O inkubiert wurden. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

4.6.3.2 Charakterisierung der F₂-Generation

Die F₂-Generationen ausgewählter Linien von 113H wurden zur Vorselektion auf selektivem MS-Medium angezogen. Hierfür wurden Samen der Linien 113H-3/1, 113H-3/3, 113H-4/6, 113H-4/7, 113H-5/9, 113H-5/10, 113H-7/13, 113H-7/14, 113H-9/18, 113H-9/19, 113H-10/22 und 113H-10/24 auf MS-Medium ausgesät, welches mit Kanamycin versetzt war. Aufgrund des CRISPR/Cas9-Vektors tragen Pflanzen der Linie 113H eine Kanamycinresistenz und können so selektioniert werden. Als Kontrolle wurde die Linie 138-3/7 eingesetzt. Die Kontrolllinie ist ebenso eine transgene Linie und verfügt auch über eine Kanamycinresistenz. Die Anzucht fand unter Standardbedingungen im Lichtschrank statt. Nach vier Wochen wurden die Keimlinge im Gewächshaus auf Erde pikiert. Allerdings zeigte sich, dass nicht alle Linien von 113H die erwartete Kanamycinresistenz aufwiesen. Die Keimlinge der Linie 113H-3/1 und 113H-4/7 waren sehr klein und ohne Ausnahme weiß und konnten nicht auf Erde pikiert werden. Die Keimlinge der Linien 113H-3/3, 113H-5/9, 113H-5/10, 113H-9/18 und 113H-9/19 waren ebenfalls kleiner als die Kontrolle und wiesen hellgrün-grün gescheckte Blätter auf. Die Linien 113H-4/6, 113H-7/13, 113H-7/14, 113H-10/22 und 113H-10/24 hingegen verhielten sich ähnlich der Kontrolle und zeigten keine Auffälligkeiten (Abb. 88). Die Keimlinge der Linien 113H-3/3 und 113H-5/9 wuchsen nicht auf Erde an und wurden separat nochmals auf Erde zusammen mit den Kanamycin-sensitiven Linien 113H-3/1 und 113H-4/7 ausgesät und angezogen. Die Keimlinge wuchsen dort normal.

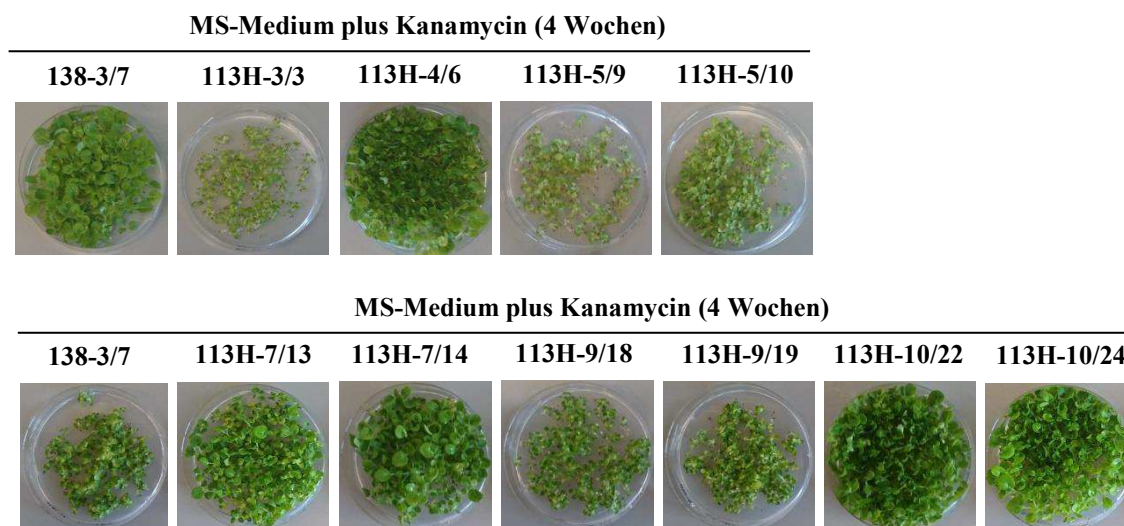


Abb. 88 Keimlinge der F₂-Generation der Linien 113H auf MS-Medium. Aussaat der F₂-Generation der Linien 113H-3/3, 113H-4/6, 113H-5/9, 113H-5/10, 113H-7/13, 113H-7/14, 113H-9/18, 113H-9/19, 113H-10/22 und 113H-10/24 auf selektivem MS-Medium mit Kanamycin. Als Kontrolle dienten Samen der Linie 138-3/7, welche ebenfalls über eine Kanamycinresistenz verfügt.

Zur Klärung der Frage, ob die Linien ohne Kanamycinresistenz weiterhin mutant für *NPR3* sind, wurde genomische DNA von den Pflanzen der Linien 113H-3/1 und 113H-4/7 isoliert, welche auf Erde angezogen wurden. Die genomische DNA diente anschließend als Matrize für die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* über das Primerpaar NtNIML-14/3NtNIM1like-554. Als Kontrollen wurden neben der genomischen DNA von SNN-Pflanzen und der 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 auch die genomische DNA der entsprechenden F₁-Generation verwendet. Das erwartete PCR-Produkt von 554 Bp ließ sich in allen Fällen amplifizieren. Durch einen *PciI*-Restriktionsverdau ließen sich die Plasmidkontrolle sowie die SNN-Kontrolle schneiden, die Amplifikate der F₁- und F₂-Generation der Linien 113H-3/1 und 113H-4/7 jedoch nicht (Abb. 89). Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Linien 113H-3/1 und 113H-4/7 zwar nicht mehr über

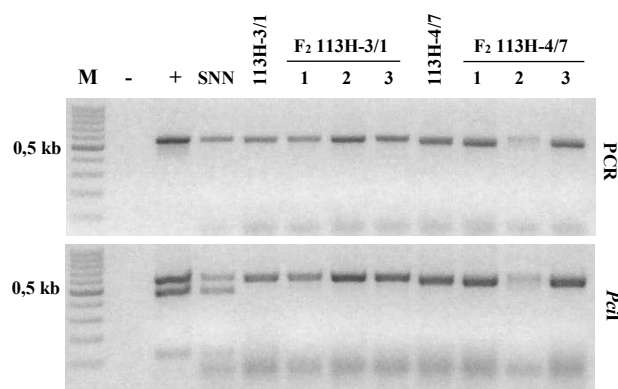


Abb. 89 Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* von 113H-Linien in der F₂-Generation ohne Kanamycinresistenz und anschließende Restriktion mit *PciI*. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* erfolgte per PCR über die Primer NtNIML-14/3NtNIM1like-554. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 554 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *PciI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 115 Bp und 439 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe von 554 Bp zurück.

die Kanamycinresistenz und somit nicht mehr über die CRISPR/Cas9-Konstruktion verfügen, aber die jeweilige Mutation immer noch im Genom enthalten ist.

Anschließend wurde die F₂-Generation durch Ansprühen mit Bion getestet. Die Samen der Linien 113H-3/1, 113H-3/3, 113H-4/6, 113H-4/7, 113H-5/9, 113H-5/10, 113H-7/13, 113H-7/14, 113H-10/22 und 113H-10/24 wurden jeweils in zwei separate Töpfe auf Erde ausgesät und angezogen. Als Kontrolle dienten Samen der Linie 138-3/7. Drei Wochen nach der Aussaat wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Ein Ansatz der Linien wurde dabei über vier Wochen zweimal pro Woche mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Der zweite Ansatz wurde parallel dazu mit H₂O besprüht und diente als direkte Kontrolle. Nach Abschluss der Behandlung war bei der Kontrolllinie 138-3/7 eine Wirkung von Bion zu sehen. Die H₂O-besprühten Pflanzen waren deutlich größer und vitaler als die Bion-besprühten Pflanzen. Im direkten Vergleich zwischen H₂O- und Bion-besprühten Pflanzen gab es auch zwischen den Linien der F₂-Generation von 113H Unterschiede. Die Bion-gesprühten Pflanzen waren auch hier kleiner als die jeweiligen H₂O-Kontrollen, aber dennoch größer als die der Kontrolllinie 138-3/7 (Abb. 90). Von den Linien 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 wurden jeweils vier Bion-behandelte Pflanzen und jeweils sechs der H₂O-behandelten Pflanzen zu weiteren Analysezwecken ausgetopft.

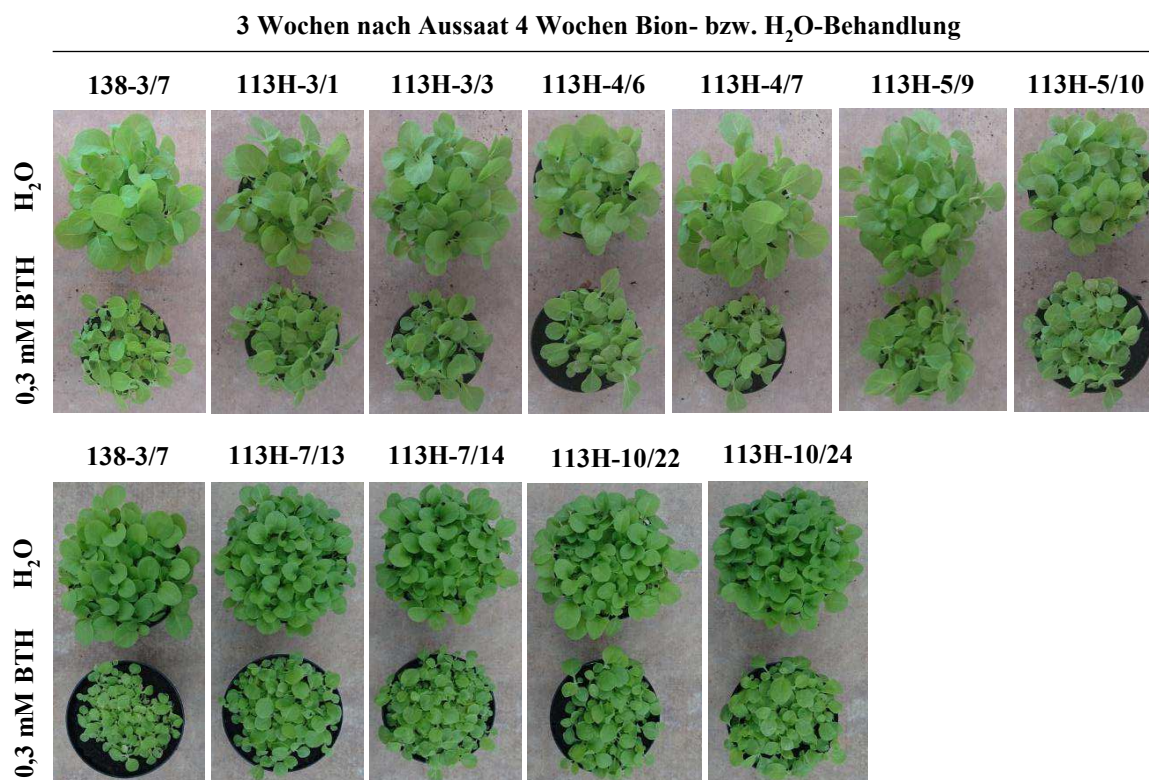


Abb. 90 Vierwöchige Bion-Behandlung der F₂-Generation der Linien 113H. Drei Wochen nach Aussaat der Linien 113H-3/1, 113H-3/3, 113H-4/6, 113H-4/7, 113H-5/9, 113H-5/10, 113H-7/13, 113H-7/14, 113H-10/22 und 113H-10/24 wurden die Keimlinge vier Wochen zwei Mal in der Woche mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Als Kontrolle wurde die Linie 138-3/7 mitgeführt. Zum direkten Vergleich wurde ein weiterer Ansatz derselben Linien parallel mit H₂O besprüht.

Zur Verifizierung, dass auch die Pflanzen der F₂-Generation weiterhin mutant sind, wurde eine molekulare Analyse per PCR und Restriktionsverdau durchgeführt. Die genomische DNA wurde aus Blattmaterial isoliert. Das Blattmaterial der Linien 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 stammt dabei von Pflanzen der Bion-Behandlung. Das Blattmaterial der Linien 113H-4/6 und 113H-5/10 stammt hingegen von den auf MS-Medium angezogenen und anschließend auf Erde pikierten Keimlingen. Von den Linien 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 wurden jeweils zehn Pflanzen analysiert und von den Linien 113H-4/6 und 113H-5/10 sieben beziehungsweise fünf Pflanzen. Die genomische DNA diente als Matrize zur Amplifikation des ersten Exons von *NPR3*. Als Kontrollen dienten eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 und genomische DNA einer SNN-Pflanze. Das erwartete PCR-Produkt von 554 Bp konnte in allen Fällen amplifiziert werden. Allerdings wies es im Falle der PCR-Produkte von 113H-3/1 #3, 113H-4/6 #4, #7 und 113H-5/10 #1 eine weitere kleinere Bande auf. Dies konnte in der F₁-Generation nicht beobachtet werden. Durch den Restriktionsverdau mit *PciI* wurden die Kontrollen geschnitten. Die PCR-Produkte der F₂-Generation von 113H blieben ungeschnitten. Die Doppelbanden der entsprechenden Amplifikate blieben nach dem Restriktionsverdau weiterhin erhalten (Abb. 91). Die Pflanzen der F₂-Generation der Linie 113H können aufgrund dieser molekularen Analyse weiterhin als mutant betrachtet werden.

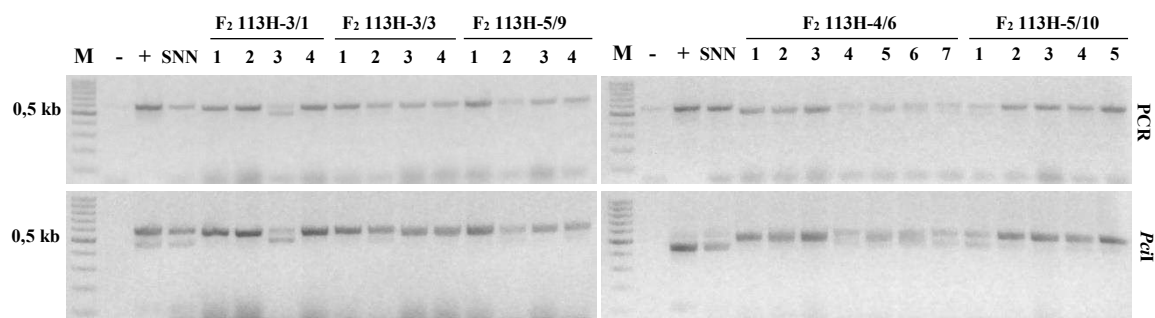


Abb. 91 Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* und die analytische Restriktion mit *PciI* von Pflanzen der F₂-Generation der Linien 113H. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* erfolgte per PCR über die Primer NtNIML-14/3NtNIM1like-554. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat dabei eine Größe von 554 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *PciI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 115 Bp und 439 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe von 554 Bp zurück.

Auch die F₂-Generation der *npr3* Mutanten in *N. tabacum* cv. Samsun NN sollte auf etwaige Effekte auf das Proteinbandenmuster von NPR1 und die Induktion von *PR1* untersucht werden. Der immunologische Nachweis von NPR1 erfolgte dabei über die Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1. Der immunologische Nachweis von Tabak NPR1 ist mit dem Arabidopsis NPR1 Antikörper möglich, da dieser bei Proteinextrakten aus Pflanzenmaterial kreuz reagiert. Für die Herstellung der Proteinextrakte wurde Blattmaterial der Bion-gesprühten Pflanzen der Linie 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 verwendet. Als Kontrollen dienten Pflanzen der Linie 138-3/7, welche aus der H₂O-beziehungsweise Bion-Behandlung stammten. Das NPR1-Proteinbandenmuster der Pflanzen der Linie 113H zeigte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen keine Auffälligkeiten. Es konnten weder bei

Verwendung des α -GST-cT-NtNPR1 Antikörpers noch bei α -AtNPR1 wesentliche Unterschiede beobachtet werden. Dieselben Proteinextrakte wurden anschließend für den immunologischen Nachweis der PR1-Akkumulation mittels des Antikörpers α -PR1a eingesetzt. Interessanterweise konnten nun im Gegensatz zur F₁-Generation Unterschiede in der Stärke der Akkumulation von PR1 (15 kDa) beobachtet werden. Die Pflanzen 113H-3/3 #1, #2, #3, #4 und 113H-5/9 #2 zeigen eine deutlich geringere Akkumulation von PR1 bei gleichmäßiger Beladung des SDS-Gels, was aus der Ponceau S-Färbung hervorgeht (Abb. 92).

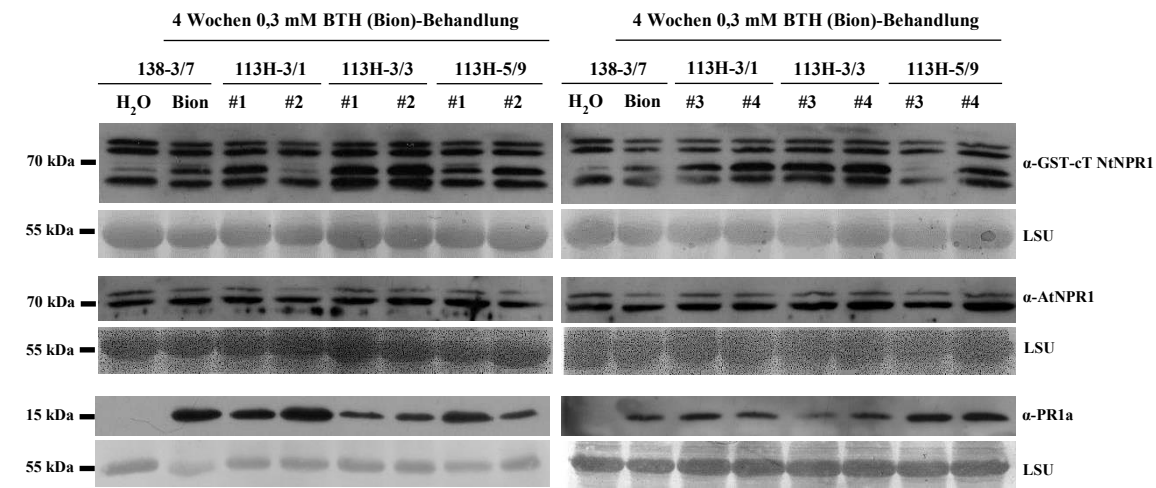


Abb. 92 Immunologischer Nachweis von NPR1 und PR1 in Pflanzen der F₂-Generation der Linien 113H nach vierwöchiger Bion-Behandlung. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial von den entsprechenden Pflanzen nach vierwöchiger Behandlung mit 0,3 mM BTH (Bion) hergestellt. Als Kontrolle dienten Pflanzen der Linie 138-3/7, welche ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen worden sind beziehungsweise als H₂O-Kontrolle während dieser Behandlung dienten. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Zur Verifizierung des Ergebnisses wurden weitere Pflanzen dieser Linien untersucht. Die hergestellten Proteinextrakte stammen in dem Fall von H₂O-gesprühten Pflanzen der Bion-Behandlung. Blattmaterial definierter Größe dieser Pflanzen wurde zuvor über vier Tage auf 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert. Der immunologische Nachweis von NPR1 wurde ebenfalls mit beiden Antikörpern α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 durchgeführt. Entsprechend zu vorherigen Versuchen haben die Mutationen in *NPR3* keinen Einfluss auf das Proteinbandenmuster von NPR1, weder beim Nachweis mit dem α -GST-cT-NtNPR1 noch dem α -AtNPR1 Antikörper. Etwaige stärkere Signale können durch die Ladekontrolle der Ponceau S-Färbung relativiert werden, da diese größere Mengen Gesamtprotein in diesen Fällen zeigt. Dieselben Proteinextrakte wurden anschließend für den immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Auch hier konnten Abweichungen in der Stärke der Akkumulation von PR1 im Vergleich zu der SNN-Kontrolle beobachtet werden. Alle Pflanzen der Linie 113H-5/9 waren stark in der Akkumulation von PR1 beeinträchtigt (Abb. 93A). Im Anschluss sollte geklärt werden, ob eine Inkubation auf 1 mM Salicylsäure über dieselbe Zeit den gleichen Effekt auf die Akkumulation von PR1 der F₂-Generation der Linie 113H hervorruft. Hierfür wurde Blattmaterial derselben Pflanzen über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert. Als Kontrolle wurde wiederum Blattmaterial einer SNN-Pflanze entsprechend auf 1 mM Salicylsäure beziehungsweise H₂O inkubiert. Die aus dem Blattmaterial hergestellten

Proteinextrakte wurden für den immunologischen Nachweis von NPR1 mittels des Tabak und Arabidopsis Antikörpers verwendet. Es zeigten sich keinerlei Unterschiede zwischen den SNN-Kontrollextrakten und den Pflanzenextrakten der Linie 113H hinsichtlich des Proteinbandenmusters von NPR1. Auch hier können etwaige stärkere Signale mit einem höheren Gesamtproteinanteil erklärt werden. Die Mutation in *NPR3* hat keinen Einfluss auf das Bandenmuster von NPR1. Dieselben Extrakte wurden nun auch für den immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Hier konnten ebenfalls Unterschiede in der Akkumulation von PR1 zwischen der SNN-Kontrolle und den Pflanzen der Linie 113H beobachtet werden. Zusätzlich zu den Pflanzen der Linie 113H-5/9 mit stark eingeschränkter Akkumulation von PR1 kamen nun noch die Pflanzen der Linie 113H-3/3 #5 und #7 hinzu, welche ebenfalls eine erheblich schwächere Akkumulation von PR1 aufwiesen (Abb. 93B).

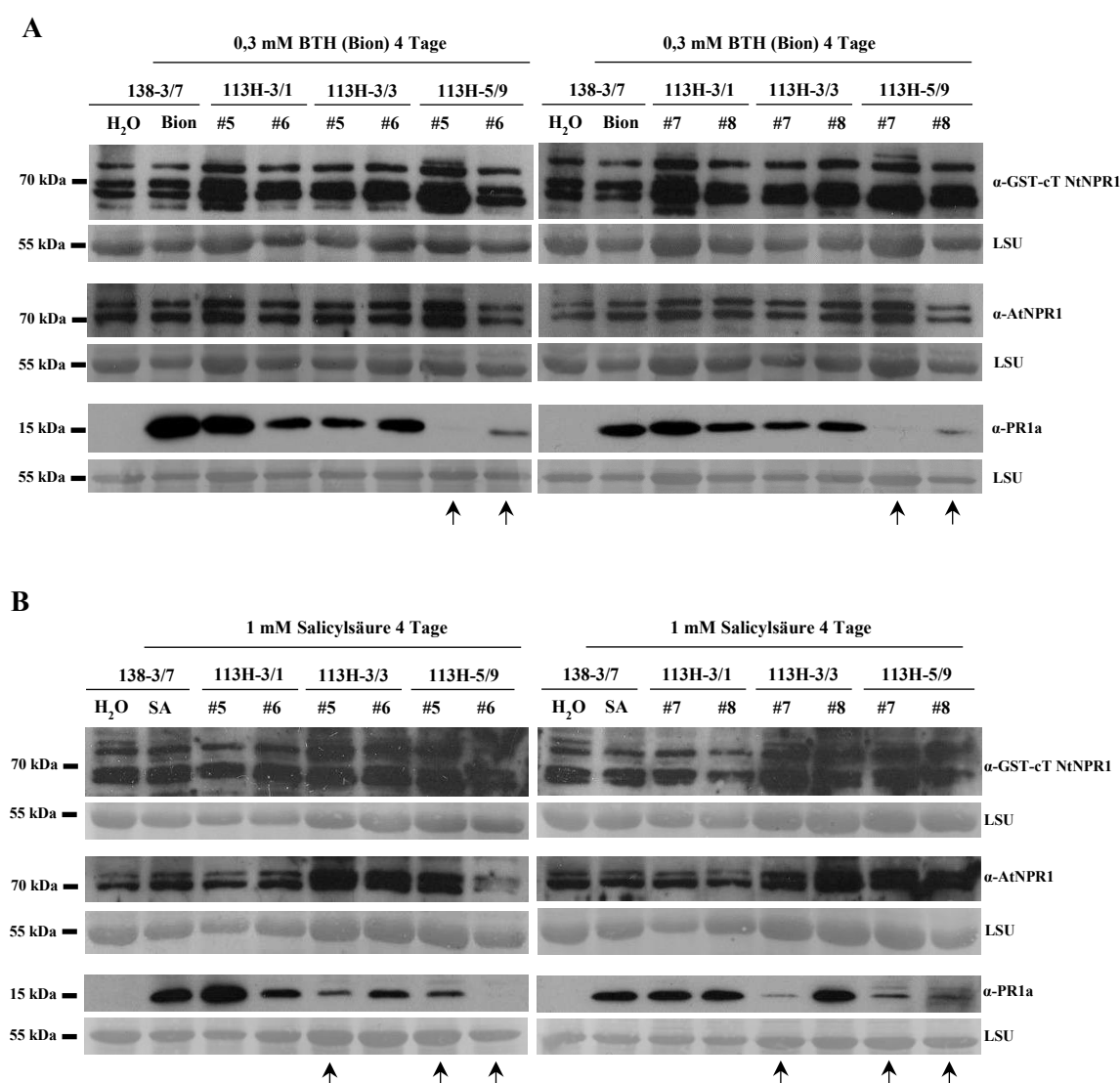


Abb. 93 Vergleich der Bion- und Salicylsäurewirkung auf die endogene PR1-Akkumulation von Pflanzen der F₂-Generation der Linien 113H. (A) Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial der entsprechenden Pflanzen verwendet, welche zuvor über vier Tage auf 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet. Blattscheiben davon wurden entsprechend auf 0,3 mM Bion oder auf H₂O inkubiert. (B) Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial derselben Pflanzen wie in A verwendet, welche zuvor über vier Tage auf 1 mM Salicylsäure inkubiert wurden. Als Kontrolle wurden Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet. Blattscheiben davon wurden entsprechend auf 1 mM Salicylsäure oder auf H₂O inkubiert. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Zwischen der Ausprägung des Effekts der eingeschränkten PR1-Akkumulation gibt es Variationen hinsichtlich der induktiven Substanz, aber auch eine gewisse Deckungsgleichheit bei einigen Individuen.

Ein weiterer Versuch sollte klären, ob neben der induktiven Substanz für die Akkumulation von PR1 auch das Alter des Blattgewebes Variationen zwischen der Ausprägung von PR1-Akkumulationsdefiziten hervorrufen kann. Hierfür wurden Proteinextrakte von Pflanzen der Linie 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 verwendet. Das Blattmaterial stammte von Pflanzen im Gewächshaus, die auf Erde angezogen worden waren. Blattmaterial definierter Größe wurde dafür zuvor über vier Tage auf 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert. Die Proteinextrakte wurden dann für den immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Innerhalb der verwendeten Linien von 113H konnten einige PR1-Akkumulationseinschränkungen beobachtet werden. Besonders die Individuen der Linie 113H-3/1 waren davon betroffen. Zwölf Tage später wurde von denselben Pflanzen wiederum Proteinextrakte von Blattmaterial hergestellt, welches über vier Tage auf 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert. Die Proteinextrakte wurden für den immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Zwischen den Ausprägungen der PR1-Akkumulation zwischen diesen Extrakten und den Extrakten, welche zwölf Tagen zuvor hergestellt wurden, gab es wesentliche Unterschiede. Einige Individuen der Linie 113H-3/1 waren weiterhin noch etwas in ihrer PR1-Akkumulation eingeschränkt, aber nicht mehr so gravierend wie bei den älteren Extrakten. Die Pflanzen #17 und #18 der Linie 113H-3/3 decken sich wiederum mit ihrer eingeschränkten PR1-Akkumulation in beiden Fällen. Die Pflanzen der Linie 113H-5/9 zeigen weiterhin Einschränkungen in der Akkumulation von PR1, decken sich aber nur bedingt mit den Ergebnissen der älteren Extrakten (Abb. 94).

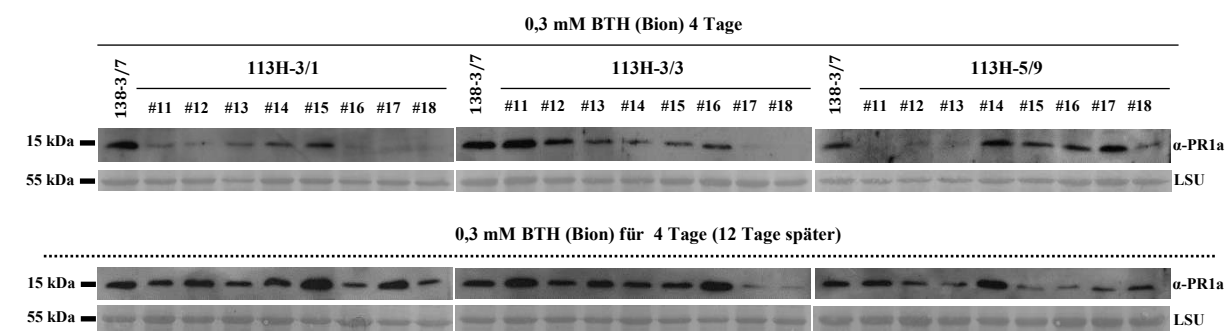


Abb. 94 Abhängigkeit der PR1-Akkumulation vom Alter der Pflanzen der F₂-Generation der Linien 113H. Die verwendeten Proteinextrakte wurden aus Blattmaterial der entsprechenden Pflanzen hergestellt, welches zuvor für vier Tage auf 0,3 mM BTH (Bion) inkubiert wurde. Diese Prozedur wurde 12 Tage später mit denselben Pflanzen wiederholt. Als Kontrolle wurden Pflanzen der Linie 138-3/7 verwendet. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird.

Ferner sollte in einem zusätzlichen Versuch analysiert werden, wie sich die PR1-Akkumulation hinsichtlich der Induktion durch *TMV*-Infektion verhält. Hierfür wurden Pflanzen der Linie 113H-3/1, 113H-3/3 und 113H-5/9 verwendet, die bereits im Vorfeld eine gewisse Reduktion der PR1-Akkumulation durch Induktion mit Bion gezeigt hatten. Als Kontrolle diente eine Pflanze der Linie 138-3/7. Es wurden jeweils zwei Blatthälften pro Pflanze mit *TMV* infiziert. Sieben Tage nach der Infektion (dpi) wurde infiziertes Blattgewebe in Nekrosennähe entnommen. Nach 14 Tagen (dpi) wurde

Blattgewebe der uninfierten Hälfte des Blattes genommen. Aus dem Blattgewebe wurde jeweils ein Proteinextrakt hergestellt und für einen immunologischen Nachweis von PR1 verwendet. Die Extrakte aus lokalem, infiziertem Gewebe sieben Tage nach der Infektion zeigten keinen Unterschied in der Akkumulation von PR1 zwischen den Pflanzen der Linie 113H und der Kontrolle. Im Gewebe der uninfierten Blatthälfte konnten allerdings Unterschiede beobachtet werden. Einige Pflanzen der F₂-Generation der Linie 113H zeigten während der SAR eine deutlich schwächere Akkumulation von PR1 als die Kontrollpflanze (Abb. 95). Die Mutationen in *NPR3* in *N. tabacum* cv. Samsun NN scheint einen gewissen negativen Einfluss auf die Akkumulation von PR1 während der SAR zu haben.

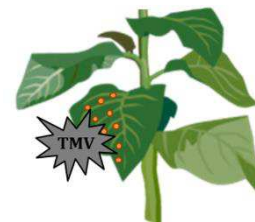
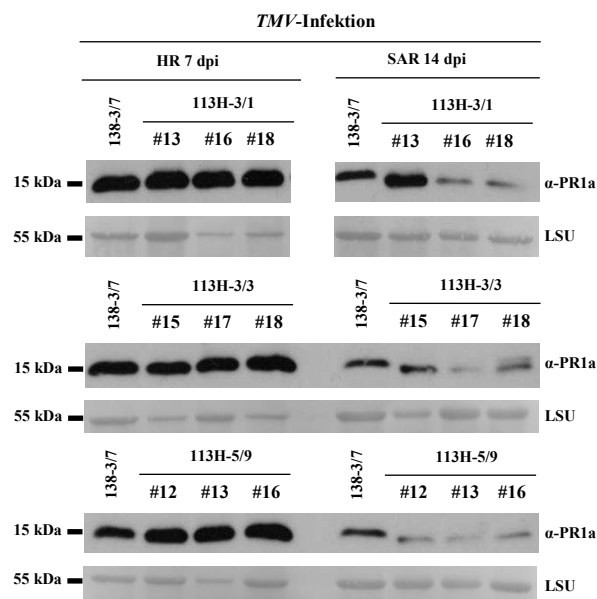


Abb. 95 Immunologischer Nachweis von PR1 in TMV-infizierten Pflanzen der F₂-Generation der Linien 113H. Für den immunologischen Nachweis der Akkumulation von PR1 im lokalen Blattgewebe während der hypersensitiven Reaktion wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial in Nekrosennähe sieben Tage nach Infektion (dpi) hergestellt. Für den immunologischen Nachweis von PR1 in distalem Blattgewebe bei Etablierung der SAR wurden Proteinextrakte aus Blattmaterial aus der uninfierten Blatthälfte desselben Blattes 14 Tage nach Infektion (dpi) hergestellt. Als Kontrolle dienten infizierte Pflanzen der Linie 138-3/7. Als Ladekontrolle diente die große Untereinheit der RuBisCo (LSU), welche nach Färbung der Nitrocellulosemembran mit Ponceau S sichtbar wird. (Tabakpflanze: <https://www.pflanzenforschung.de/files/2913/7656/3671/tabak.pdf>)

Die molekulare Analyse der F₁-Generation der Linien 113H zeigte deutlich, dass die Mutagenese mittels CRISPR/Cas9 erfolgreich war. Alle untersuchten Pflanzen trugen an der erwarteten Stelle eine Mutation. In einigen Fällen führte diese Mutation allerdings nicht zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons. Mit Hilfe des heterologen Hefesystems konnte gezeigt werden, dass Mutanten mit intaktem Leserahmen trotzdem in wichtigen biochemischen Eigenschaften gravierende Defizite aufwiesen und die Mutagenese auch hier erfolgreich war. In der F₁-Generation konnten allerdings keine Unterschiede in der Akkumulation von NPR1 und PR1 nachgewiesen werden. In der F₂-Generation wurden zwei Linien identifiziert, welche zwar aufgrund von Restriktionsanalysen als mutant identifiziert wurden, jedoch keine Kanamycinresistenz mehr aufwiesen. Alle weiteren analysierten Linien wurden ebenfalls als weiterhin mutant identifiziert. Innerhalb der F₂-Generation konnten nun einige Individuen ausgemacht werden, welche zwar in der NPR1-Akkumulation unauffällig waren, aber deutliche Unterschiede in der PR1-Akkumulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle aufwiesen.

Möglicherweise sind bei den Linien 113H in den weiterführenden Generationen Individuen mit vollständig unterbundener PR1-Akkumulation möglich.

4.6.4 Erzeugung von Mutanten der *NPR1*- und *NPR3*-Gene der Eltern *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* (Linien 118H)

Den Transformationshintergrund der Linien 118H stellt *N. tabacum* cv. Samsun NN dar. Linie 118H ist im Prinzip eine Mischung aus Linie 111H und 113H. Die verwendeten Zielsequenzen waren dieselben der Linien 111H und 113H. Im Falle von *NPR1* war die *NarI*-Schnittstelle im ersten Exon an Nukleotidstelle 216 betroffen. Bei der Mutagenese von *NPR3* war dadurch die *PciI*-Schnittstelle im ersten Exon an Nukleotidstelle 439 betroffen. In beiden Fällen sollten durch Deletion oder Insertion einzelner Nukleotide die Schnittstellen eliminiert werden, um die Selektion mutanter Tabakpflanzen auf molekularer Ebene zu vereinfachen. Die Mutagenese betrifft die Varianten *N. tomentosiformis* und auch *N. sylvestris* von *NPR1* beziehungsweise *NPR3*. In Abbildung 96 sind die ersten Exons von *NPR1* und *NPR3* zusammen mit den jeweils zur Analyse verwendeten Restriktionsschnittstellen und Oligonukleotide dargestellt.

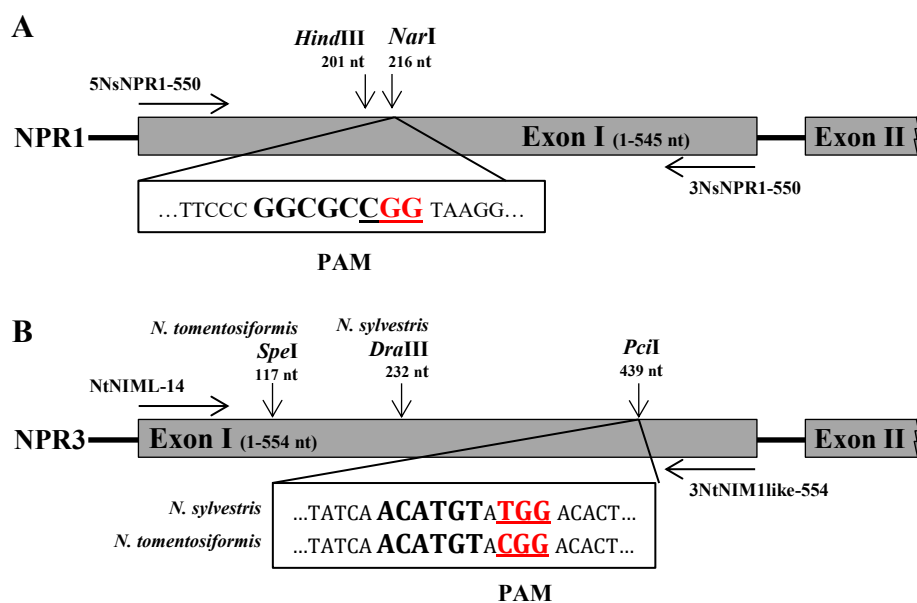


Abb. 96 Schematische Darstellung vom ersten Exon von *NPR1* und *NPR3* von *N. tabacum*. (A) Erstes Exon *NPR1*. Das erste Exon von *NPR1* erstreckt sich von Nukleotid 1 bis 545. Mit dem Primerpaar 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550 kann das erste Exon zu Analysezielen vollständig amplifiziert werden. Bei Nukleotid 216 schneidet das Enzym *NarI* im Anschluss daran befindet sich die PAM-Sequenz. Für weitere Analysezielen wurde das Restriktionsenzym *HindIII* ausgewählt, welches unweit von *NarI* bei Nukleotid 201 schneidet. (B) Erstes Exon *NPR3*. Das erste Exon von *NPR3* erstreckt sich von Nukleotid 1 bis 554. Mit dem Primerpaar NtNIML-14/3NtNIM1like-554 kann das erste Exon zu Analysezielen vollständig amplifiziert werden. Bei Nukleotid 439 schneidet das Enzym *PciI* im Anschluss daran befindet sich die PAM-Sequenz. Für weitere Analysezielen wurde das Restriktionsenzym *SpeI* (117 nt), welches nur innerhalb der Sequenz von *N. tomentosiformis* vorkommt, und das Restriktionsenzym *DraIII* (232 nt), welches nur innerhalb der Sequenz von *N. sylvestris* vorkommt, verwendet.

4.6.4.1 Charakterisierung der F₁-Generation

Die Vorselektion der Pflanzen der F₁-Generation der Linie 118H erfolgte über eine vierwöchige Behandlung mit Bion. Hierfür wurden die Samen der Primärtransformanten auf Erde ausgesät. Es standen insgesamt fünf verschiedene Primärtransformanten zur Verfügung: 118H-2, 118H-5, 118H-6, 118H-7 und 118H-8. Als Kontrolle wurden Samen von *N. tabacum* cv. Samsun NN verwendet. Hier wurden zwei Ansätze zu je 1000 Samen ausgesät. Zwei Wochen nach Aussaat wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Der erste Kontrollansatz wurde ebenfalls der vierwöchigen Bion-Behandlung unterzogen. Der zweite wurde parallel dazu über vier Wochen mit H₂O besprüht. Nach Beenden der Behandlung war ein deutlicher Effekt der Bion-Behandlung bei den Kontrollpflanzen zu beobachten. Die H₂O-besprühten Pflanzen waren wesentlich größer und besser entwickelt als die Bion-behandelten SNN-Pflanzen. Die mit Bion behandelten Kontrollpflanzen waren dagegen sehr klein und lagen im Wachstum deutlich zurück. Durch die Bion-Behandlung wiesen die Blätter der Pflanzen zusätzlich Schädigungen auf. Die Pflanzen der Linien 118H-2 und 118H-6 waren ebenfalls sehr klein und zeigten starke Defizite im Wachstum nach der vierwöchigen Bion-Behandlung. Die Keimlinge der beiden Linien waren hinsichtlich ihrer Größe relativ homogen. Es gab keine Pflanzen, die sich durch ihre Größe deutlich vom Rest der Pflanzen unterschieden. Die Keimlinge der Linien 118H-5, 118H-7 und 118H-8 waren dagegen hinsichtlich der Größe einzelner Pflanzen deutlich inhomogener. Hier gab es neben deutlich kleineren Keimlinge ebenso wesentlich größere Pflanzen, die sich vom Rest der Keimlinge abhoben. Im Vergleich zu den Pflanzen der Linien 118H-5 und 118H-7 waren die Keimlinge der Linie 118H-8 im Allgemeinen kleiner, wiesen aber ebenfalls einige größere Pflanzen auf, die sich deutlich vom Rest der Keimlinge abhoben (Abb. 97).

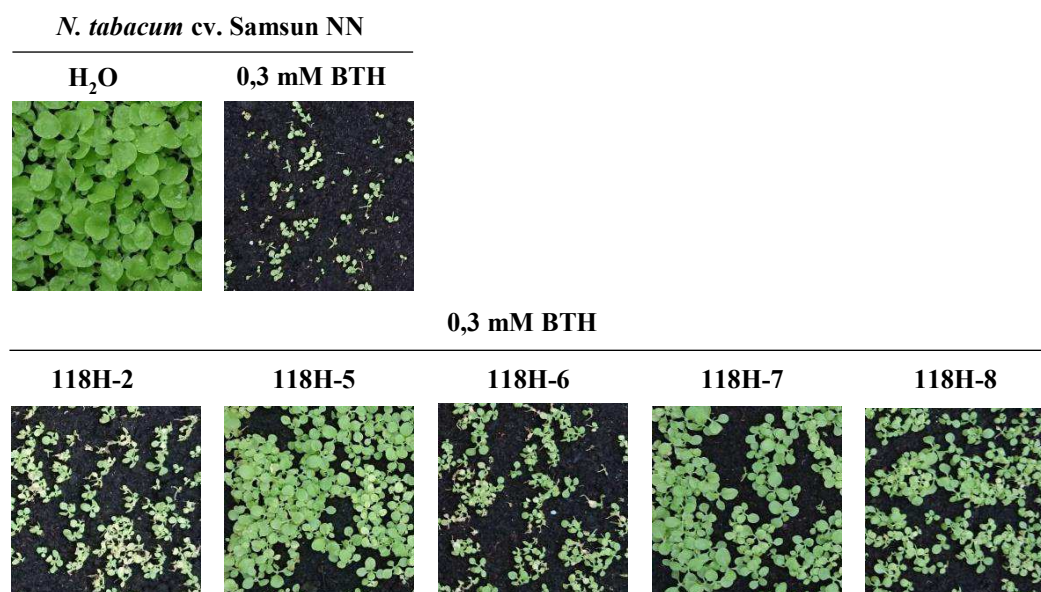


Abb. 97 Vorselektion F₁-Generation der Linien 118H durch vierwöchige Bion-Behandlung. Zwei Wochen nach Aussaat wurde mit der Bion-Behandlung begonnen. Vier Wochen lang zwei Mal in der Woche wurden die Keimlinge mit 0,3 mM BTH (Bion) besprüht. Als Kontrolle diente *N. tabacum* cv. Samsun NN. Diese wurde ebenfalls der Bion-Behandlung unterzogen, bzw. mit H₂O besprüht.

Jeweils zwölf der größten Pflanzen der Linien 118H-5, 118H-7 und 118H-8 wurden ausgewählt und ausgetopft. Sobald genügend Blattmaterial zur Verfügung stand wurden jeweils von den sechs größten Pflanzen pro Linie genomische DNA isoliert. Die genomische DNA wurde zur molekularen Analyse der F₁-Generation der Linie 118H verwendet. Da es sich bei der Linie um eine *npr1/npr3* Doppelmутante in *N. tabacum* cv. Samsun NN handelt, wurden sowohl *NPR1* als auch *NPR3* beider Varianten *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* untersucht. Für die Analyse von *NPR1* wurde über die Primerkombination 5'NsNPR1-550/3'NsNPR1-550 das erste Exon amplifiziert. Als Matrize diente die genomische DNA der Pflanzen der F₁-Generation der Linie 118H. Als Kontrollen wurden genomische DNA von SNN-Pflanzen und eine 1:1000-Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Das jeweilige Amplifikat wies eine Größe von 545 Bp auf. Mittels Restriktionsanalyse mit dem Enzym *NarI* wurde überprüft, ob die Mutagenese erfolgreich war und die Restriktionsstelle eliminiert wurde. Wie in Abbildung 98 zu sehen ist, konnte das erste Exon von *NPR1* in allen Fällen erfolgreich amplifiziert werden. Die Plasmidkontrolle und die PCR-Produkte der SNN-Kontrollpflanzen konnten durch *NarI* erwartungsgemäß vollständig geschnitten werden. Die Amplifikate der Linien 118H-5 und 118H-8 konnten dagegen gar nicht geschnitten werden, was auf eine erfolgreiche Mutagenese hindeutet. Wohingegen die PCR-Produkte der Linie 118H-7 weiterhin partiell durch *NarI* restringierbar sind. Ein gewisser Anteil von ungefähr 25% ist weiterhin zugänglich für das Enzym *NarI*. Die Mutagenese scheint hier nicht vollständig verlaufen zu sein.

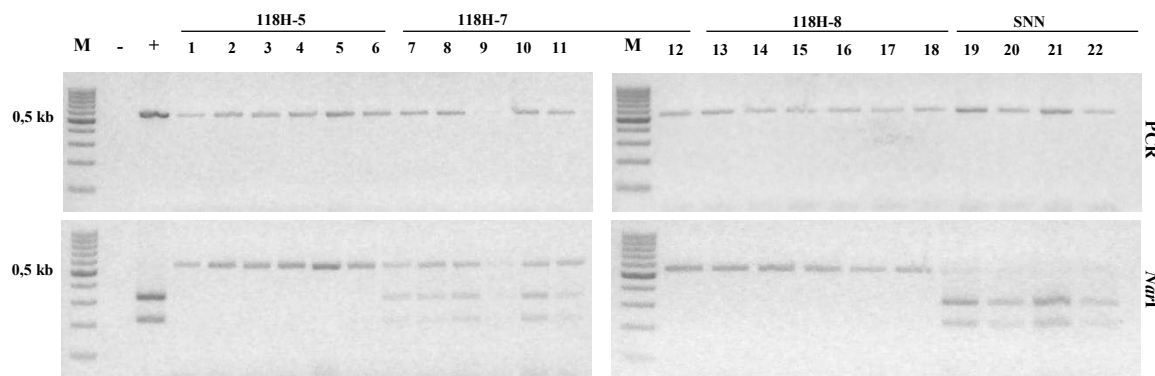


Abb. 98 Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* und die analytische Restriktion mit *NarI*. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR1* erfolgte per PCR über die Primer 5NsNPR1-550/3NsNPR1-550. Als Matrize wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR1 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 545 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *NarI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 216 Bp und 329 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR-Produkt der Größe von 545 Bp zurück.

Die PCR-Produkte von jeweils zwei Pflanzen pro untersuchter Linie wurden zur Sequenzierung in den T-Vektor kloniert. Die Unterscheidung zwischen den Varianten *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* erfolgte dabei im Vorfeld durch eine Restriktionsanalyse. Für diese Restriktionsanalyse wurde entweder das Enzym *BspEI* (173 nt) oder *BglII* (517 nt) herangezogen. Beide Enzyme schneiden ausschließlich im ersten Exon von *NPR1* der *N. sylvestris*-Variante. Anhand einer weiteren Restriktionsanalyse mit *NarI* konnten 87% der untersuchten Klone als mutant identifiziert werden. In diese Quote sind Klone der

Linie 118H-7 Pflanze #11 der *N. sylvestris*-Variante nicht eingeschlossen. Alle untersuchten Klone enthielten eine wildtypische Sequenz. Es war nicht möglich für Linie 118H-7 Pflanze #11 der *N. sylvestris*-Variante einen mutanten Klon zu identifizieren.

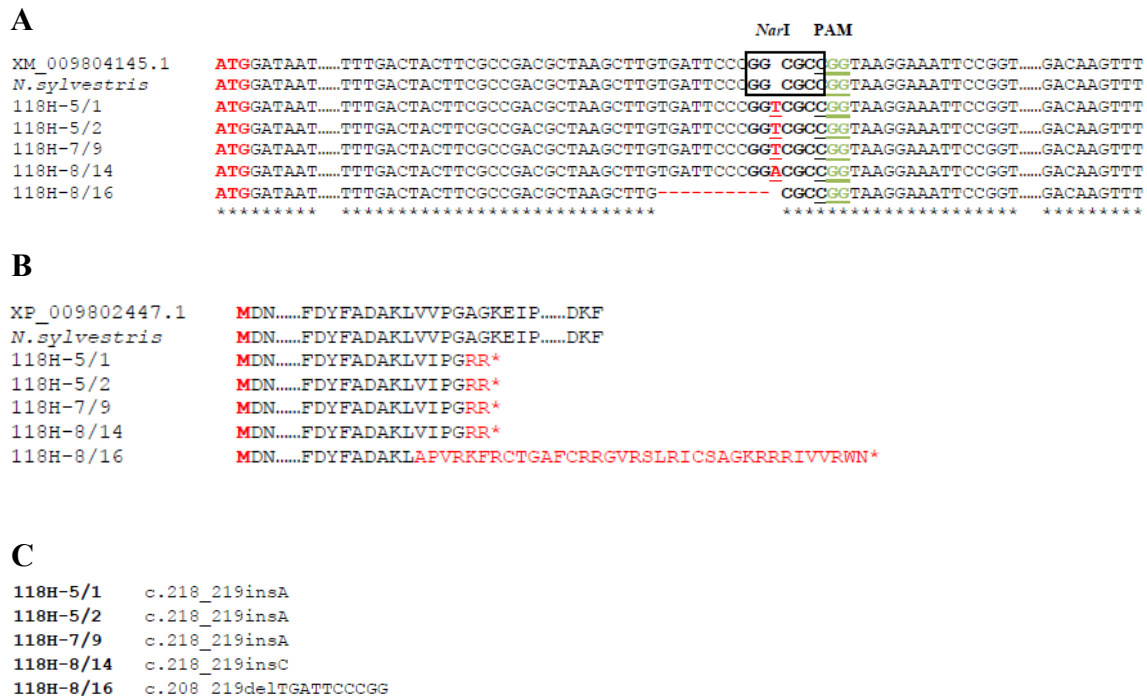


Abb. 99 Auswertung der Sequenzierung der *N. sylvestris*-Variante von *NPRI* der F₁-Generation der 118H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009804145.1 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *NarI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XM_009802447.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 118H.

Anhand der Sequenzierung konnten im ersten Exon von *NPRI* in der *N. sylvestris*-Variante drei verschiedene Mutationen identifiziert werden. Zum einen kam es zur Insertion eines Thymins oder eines Adenins zwischen Nukleotid 218 und 219 innerhalb der Erkennungssequenz des *NarI*-Restriktionsenzym, welche durch die Insertion des einzelnen Nukleotids eliminiert wurde. Zum anderen konnte eine Deletion von zehn Nukleotiden zwischen Nukleotid 208 und 219 identifiziert werden. Durch diese Deletion war die Erkennungssequenz von *NarI* ebenfalls betroffen und nicht mehr verfügbar. In Folge der Insertionen und der Deletion kam es in allen Fällen zur Ausbildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 99). Durch die Sequenzierung des ersten Exons von *NPRI* der *N. tomentosiformis*-Variante konnten ebenfalls drei verschiedene Mutationen identifiziert werden. In allen drei Fällen handelt es sich um Insertionen einzelner Nukleotide innerhalb der Erkennungssequenz von *NarI*, sodass diese dadurch eliminiert wurde. Zwischen Nukleotid 218 und 219 kam es zur Insertion eines Adenins, eines Thymins oder eines Cytosins. In Folge dieser Insertionen wurde der Leserahmen verschoben und es kam zur Ausbildung vorzeitiger Stoppkodons (Abb. 100).

A

NarI PAM

```

XM_009608066.2      ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG CGCGGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
N. tomentosiformis  ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGG CGCGGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-5/1            ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGACGCCGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-5/2            ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGACGCCGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-7/9            ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGACGCCGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-7/11           ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGACGCCGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-8/14           ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGCGCGGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
118H-8/16           ATGGATAAT.....TTTGACTACTTCGCCGACGCTAAGCTTGTGGTTCCCGGGT CGCGGGTAAGGAATTCGGGT.....GACAAGTTT
*****

```

B

```

XP_009606361.1      MDN.....FDYFADAKLVVPGAGKEIP.....DKF
N. tomentosiformis  MDN.....FDYFADAKLVVPGAGKEIP.....DKF
118H-5/1            MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
118H-5/2            MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
118H-7/9            MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
118H-7/11           MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
118H-8/14           MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*
118H-8/16           MDN.....FDYFADAKLVVPGRR*

```

C

```

118H-5/1            c.218_219insA
118H-5/2            c.218_219insA
118H-7/9            c.218_219insA
118H-7/11           c.218_219insA
118H-8/14           c.218_219insC
118H-8/16           c.218_219insT

```

Abb. 100 Auswertung der Sequenzierung der *N. tomentosiformis*-Variante von *NPR1* der F₁-Generation der 118H-Linien. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009608066.2 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *NarI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XM_009606361.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 118H.

Für die Analyse von *NPR3* wurde anschließend mittels der Primerkombination 5'NtNIML-14/3'NtNIM1like-554 das erste Exon von *NtNPR3* amplifiziert. Die genomische DNA der ausgewählten Pflanzen der Linie 118H diente dabei als Matrice. Als Kontrollen wurden genomische DNA von SNN-Pflanzen und eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 verwendet. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* verlief erfolgreich. Das jeweilige Amplifikat wies eine Größe von 554 Bp auf. Die PCR-Produkte der Linie 118H-7 jedoch wiesen neben dem eigentlichen Amplifikat noch ein etwas kleineres Fragment auf. Bei Pflanze #9 wurde dabei die Größe des ursprünglichen Amplifikats bevorzugt, wohingegen bei #11 und #12 das etwas kleinere Fragment präferiert wird. Bei den Pflanzen #7 und #8 traten das eigentliche Amplifikat der Größe 554 Bp und das etwas kleinere Fragment etwa zu gleichen Teilen auf. Dieses Phänomen konnte bereits bei einigen Pflanzen der F₂-Generation der Linie 113H beobachtet werden. Die durch PCR erhaltenen Amplifikate wurden anschließend einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym *PciI* unterzogen. Die PCR-Produkte der Plasmidkontrolle sowie der SNN-Pflanzen wurden wie erwartet in zwei kleinere Fragmente der Größen 115 Bp und 439 Bp geschnitten. Die Amplifikate der Linien 118H-5 und 118H-8 wurden durch *PciI* nicht geschnitten, was auf potentielle Mutanten hindeutet. Die PCR-Produkte der Linie 118H-7 wurden ebenfalls nicht geschnitten, allerdings war wiederum das gleiche Phänomen zu beobachten: Statt einer Bande bei 554 Bp konnte hier noch eine zusätzliche etwas kleinere Bande beobachtet werden. Diese kleinere Bande war jedoch größer als das Fragment von 439 Bp, welches bei der Restriktion mit *PciI* im wildtypischen Fall anfiel (Abb. 101).

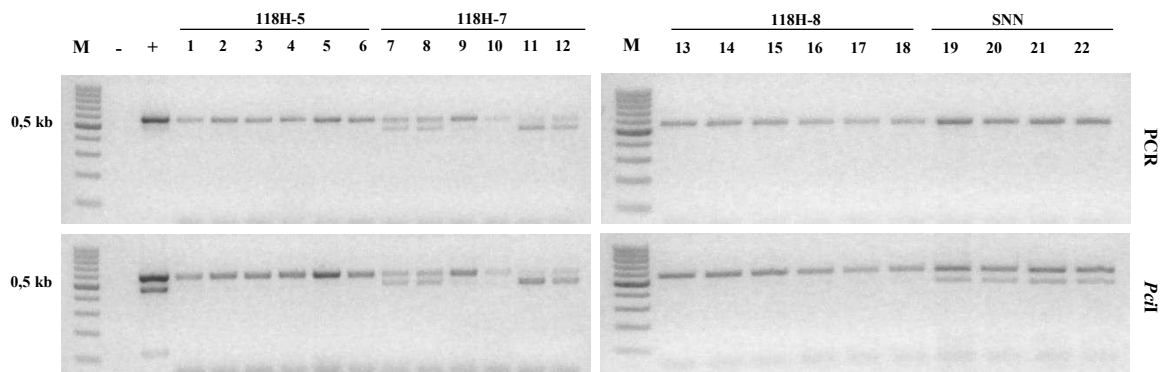


Abb. 101 Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* und die analytische Restriktion mit *PciI*. Die Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* erfolgte per PCR über die Primer NtNIML-14/3NtNIM1like-554. Als Matrice wurde genomische DNA der jeweiligen Pflanzen verwendet. Für die Negativkontrolle (-) wurde H₂O eingesetzt. Als Positivkontrolle (+) wurde eine 1:1000 Verdünnung des Plasmids pGBT9/NtNPR3 verwendet. Als weitere Kontrolle wurde genomische DNA von *N. tabacum* cv. Samsun NN (SNN) eingesetzt. Das PCR-Produkt hat eine Größe von 554 Bp. Durch die analytische Restriktion des PCR-Produkts mit *PciI* entstehen im Falle des Wildtyps zwei Fragmente der Größe 115 Bp und 439 Bp. Handelt es sich um eine Mutante, wird das PCR-Produkt nicht geschnitten und es bleibt ungeschnittenes PCR Produkt der Größe von 554 Bp zurück.

Zur genaueren Analyse der potentiellen *npr3* Mutanten wurden die PCR-Produkte derselben Pflanzen wie bei Analyse von *NPR1* in den T-Vektor kloniert und sequenziert. Die Unterscheidung der Varianten *N. sylvestris* und *N. tomentosiformis* erfolgte wieder im Vorfeld durch Restriktionsanalysen. Hierfür wurden sich die Sequenzunterschiede zwischen den Varianten zu Nutze gemacht. Das Restriktionsenzym *SpeI* kommt nur in der Sequenz des ersten Exons von *NPR3* von *N. tomentosiformis* vor und *DraIII* nur im ersten Exon der *N. sylvestris*-Variante von *NPR3*. Durch eine weitere Restriktionsanalyse mit *PciI* konnten 86% der untersuchten Klone als mutant identifiziert werden. Von diesen mutanten Klonen wurde eine Auswahl sequenziert. Die Ergebnisse der Sequenzierung brachten Klarheit über den Grund des Auftauchens der kleineren Bande bei der Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* bei der Linie 118H-7. In der Sequenz von Pflanze #11 wurde eine große Deletion von 83 Nukleotiden zwischen Nukleotid 417 und 500 identifiziert. Durch diese Deletion wurde die gesamte Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *PciI* sowie die PAM-Sequenz eliminiert. Weiterhin wurden in der Sequenz dieser Pflanze zwischen Nukleotid 325 und 417 diverse einzelne Nukleotidaustausche identifiziert. Eine solch große Deletion könnte ebenfalls der Grund für das Phänomen des Auftretens der kleineren Bande bei der Amplifikation des ersten Exons von *NPR3* innerhalb der F₂-Generation der Linie 113H sein. Da dieses Phänomen in der F₁-Generation nicht beobachtet werden konnte, könnte dies zu der Annahme führen, dass CRISPR/Cas9 in diesen Pflanzen auf jeden Fall weiterhin aktiv ist. Die Sequenzen der weiteren analysierten Pflanzen enthielten fünf weitere Mutationsarten. Drei weitere Deletionen von zwei, vier und sechs Nukleotiden und eine Insertion von 15 Nukleotiden im Bereich von Nukleotid 433 bis 443. Bei allen Mutationen ist die Erkennungssequenz von *PciI* betroffen, sodass diese nicht mehr für eine Restriktion zur Verfügung steht. Durch die Insertion der 15 Nukleotide wird allerdings ebenso wie bei der Deletion von sechs Nukleotiden nicht der Leserahmen verschoben und es wird kein vorzeitiges Stoppkodon gebildet. Die weiteren identifizierten Deletionen führen jedoch zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 102).

A

```

XM_009778209.1  ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
N. sylvestris    ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-5/1         ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-5/2         ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-7/9         ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-7/11        ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-8/14        ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
118H-8/16        ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTTCGTTACCTTCCTAAGCTATTTGTA
                  *****  * * * * *
                  PciI  PAM
XM_009778209.1  GTAT  CACATGTAATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
N. sylvestris    GTAT  CACATGTAATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-5/1         GTAT  CAACAT---GGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-5/2         GTAT  CACATGTAATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-7/9         GTAT  CAACGT--ATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-7/11        GTAT  CAACGT--ATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-8/14        GTAT  CAACGT--ATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
118H-8/16        GTAT  CAACGT--ATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
                  -----AG...GTATCACTTTTCC
                  GATCTTGTCAGATTCCGTATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
                  GTA-      -----TGTAATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGGAG...GTATCACTTTTCC
                  *****

```

B

```

XP_009776511.1  MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTC  MDTICAHDSRPAINFVELMYASSMFQVPELVSLF
N. sylvestris    MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTC  MDTICAHDSRPAINFVELMYASSMFQVPELVSLF
118H-5/1         MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTWTLVYVMTLADQQLILVWS*
118H-5/2         MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTDLVRFMRMDTICAHDSRPAINFVELMYASSMFQVPELVSLF
118H-7/9         MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTYGHYMC*
118H-7/11        MAC.....VG*F*
118H-8/14        MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEVSTDLVRFMRMDTICAHDSRPAINFVELMYASSMFQVPELVSLF
118H-8/16        MAC.....VGYEAFVTFSLSYSGKLKHFPEV--C  MDTICAHDSRPAINFVELMYASSMFQVPELVSLF

```

C

```

118H-5/1         c.442_447delGTAT
118H-5/2         c.433_443insATCTTGTTCAGATTCC
118H-7/9         c.442_445delGT + C.441A/G
118H-7/11        c.417_500delCATTTCCTCCGAGGATCAACATGTATGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGCAGACCAGCAATTAATTTTAGTGTGG
                  c.325_417 diverse Nukleotidaustausche
118H-8/14        c.433_443insATCTTGTTCAGATTCC
118H-8/16        c.435_442delTCAACA

```

Abb. 102 Auswertung der Sequenzierung der *N. sylvestris*-Variante von *NPR3* der F₁-Generation der 118H-Linie. (A) Nukleotidsequenzvergleich. XM_009778209.1 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *PciI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. Nukleotidaustausche sind rot dargestellt. (B) Aminosäuresequenzvergleich. XP_009776511.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 118H.

Die Sequenz der *N. tomentosiformis*-Variante von Pflanze #11 der Linie 118H-7 enthält eine ähnliche Mutation wie in der *N. sylvestris*-Variante. Es wurden ebenfalls 83 Nukleotide deletiert, allerdings an einer anderen Position, nämlich zwischen Nukleotid 370 und 459. Zwischen Nukleotid 364 und 370 wurden zusätzlich diverse einzelne Nukleotide ausgetauscht. Dieselbe Mutation wurde auch in der Sequenz von Pflanze #9 derselben Linie gefunden. Ferner wurde eine weitere Deletion und zwei verschiedene Insertionen innerhalb der Sequenzen der weiteren Pflanzen identifiziert. Die Deletion erstreckt sich dabei auf 19 Nukleotide und betrifft die gesamte Erkennungssequenz von *PciI* sowie die PAM-Sequenz. Die Insertionen von einem beziehungsweise 15 Nukleotiden betreffen ebenso die *PciI*-Schnittstelle und eliminieren diese. Der Leserahmen wird lediglich bei der Deletion von 19 Nukleotiden

und der Insertion von einem Nukleotid verschoben und ein vorzeitiges Stoppkodon gebildet. Bei den weiteren identifizierten Mutationen werden Aminosäuren lediglich ausgetauscht, eingefügt oder deletiert, ohne den Leserahmen zu verschieben (Abb. 103).

A

```

XM_009603895.2      ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
N.tomentosiformis   ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
118H-5/1            ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
118H-5/2            ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
118H-7/9            ATGGCTTGT.....GTAGACACT-----
118H-7/11           ATGGCTTGT.....GTAGACACT-----
118H-8/14           ATGGC-TGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
118H-8/16           ATGGCTTGT.....GTTGGATATGAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCG
                    *****

```



```

                    PciI  PAM
XM_009603895.2      GAGGTAT      CACATGTACGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
N.tomentosiformis   GAGGTAT      CACATGTACGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-5/1            GAGGATCTTGTGTCAGATTCCGTACGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-5/2            GA-----GCTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-7/9            -----ATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-7/11           -----ATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-8/14           GAGGTAT      CAACATTGTACGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
118H-8/16           GAGGATCTTGTGTCAGATTCCGTACGGACACTATATGTGCTCATGACTCTTGC.....TCC
                    *****

```

B

```

XP_009602190.1      MAD.....VGYEAFLTFLSYLYSGKLKHFPEVSTC  TDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
N.tomentosiformis   MAC.....VGYEAFLTFLSYLYSGKLKHFPEVSTC  TDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
118H-5/1            MAC.....VGYEAFLTFLSYLYSGKLKHFPPEDLVRFRTDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
118H-5/2            MAC.....VGYEAFLTFLSYLYSGKLKHFPELYVLMTLADQQLVLVWS*
118H-7/9            MAC.....V-----DTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
118H-7/11           MAC.....V-----DTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF
118H-8/14           MAVLLNHHHL*
118H-8/16           MAC.....VGYEAFLTFLSYLYSGKLKHFPPEDLVRFRTDTICAHDSRPAISFSVELMYASSVFQVPELVSLF

```

C

```

118H-5/1  c.433_443insATCTTGTGTCAGATTCC
118H-5/2  c.432_452delGTATCAACATGTACGGACA
118H-7/9  c.370_459delAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCGGAGGTATCAACATGTACGGACACT
          c.364_370 diverse Nukleotidaustausche
118H-7/11 c.370_459delAGGCTTTCCTTACTTTCTTAAGCTATTGTGACTCGGGAAAGTTGAAGCATTTCCCTCCGGAGGTATCAACATGTACGGACACT
          c.364_370 diverse Nukleotidaustausche
118H-8/14 c.5_6delT    c.442_443insT
118H-8/16 c.433_443insATCTTGTGTCAGATTCC

```

Abb. 103 Auswertung der Sequenzierung der *N. tomentosiformis*-Variante von *NPR3* der F₁-Generation der 118H-Linien. (A) Nukleotidsequenzalignment. XM_009603895.2 ist eine Vergleichssequenz aus der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startkodon ATG ist rot hervorgehoben. Die *PciI*-Schnittstelle ist fett gedruckt und mit einem Kästchen umrahmt. Die PAM-Sequenz ist grün und unterstrichen. Die Insertion von Nukleotiden ist rot und unterstrichen dargestellt. Deletionen sind als einzelne rote Striche dargestellt. Nukleotidaustausche sind rot dargestellt. (B) Aminosäuresequenzalignment. XP_009602190.1 ist eine Vergleichssequenz der Datenbank. Darunter ist die Sequenz aus *N. tabacum* cv. Samsun NN Pflanzen aus dem Gewächshaus. Die nachfolgenden Sequenzen sind aus Pflanzen der Linien 118H in der F₁-Generation. Das Startmethionin ist rot hervorgehoben. Sternchen am Ende einer Sequenz weisen auf ein Stoppkodon hin. (C) Identifizierte Mutationen durch Sequenzierung der Pflanzen der F₁-Generation der Linien 118H.

Die molekulare Analyse und die Sequenzierung der F₁-Generation der Linien 118H weisen auf eine erfolgreiche Mutagenese der *NPR1*- und *NPR3*-Gene von *N. tabacum* hin. Eine molekulare Analyse der F₂-Generation sowie weitere Tests mit ausgewählten Individuen können in fortführenden Untersuchungen Aufschluss darüber geben, ob diese Doppelmutante Auswirkungen auf den *NPR1*-Status der Pflanzen und die PR1-Akkumulation in Folge von Pathogenbefall oder chemische Induktion hat.

5 Diskussion

Zur Abwehr von Fraßfeinden und Pathogenen haben Pflanzen im Laufe der Zeit eine Vielfalt an Strategien entwickelt. Zu diesen Strategien gehört auch die systemisch erworbene Resistenz. Die SAR vermittelt eine breitgefächerte und langanhaltende Resistenz gegen verschiedene Gruppen von Pathogenen wie Bakterien, Pilze, Oomyceten und Viren. Durch Pathogenbefall steigt der endogene Salicylsäurespiegel der Pflanze an. Mit dem Anstieg des Salicylsäurespiegels geht ebenso die Akkumulation von PR-Proteinen einher. Aufgrund des Zusammenhangs von *PR1*-Genexpression und Etablierung der SAR, wird *PR1* als Markergen bei Analysen der SAR verwendet. In unabhängigen Versuchen konnte NPR1 als zentrales Regulatorprotein der SAR identifiziert werden. Der genaue Mechanismus der Regulation der *PR1*-Genexpression durch NPR1 ist allerdings noch ungeklärt. NPR1 selbst verfügt nicht über bekannte DNA-Bindedomänen, sodass ausgeschlossen werden kann, dass NPR1 alleine agiert. Es ist aber bekannt, dass NPR1 sowohl mit TGA-Transkriptionsfaktoren als auch mit NIMIN-Proteinen interagieren kann. Beide Proteinfamilien besitzen Eigenschaften der Gen-Regulierung. Die TGA-Transkriptionsfaktoren vermitteln vermutlich die DNA-Bindung. Es konnte gezeigt werden, dass TGA-Transkriptionsfaktoren an *as1*-ähnliche Elemente innerhalb der *PR1*-Promotoren binden können. Zusammen mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren kann NPR1 ternäre Komplexe auf dem *as-1*-ähnlichen Element des *PR1*-Promotors bilden. Für die Wahrnehmung der Salicylsäure während der SAR existieren drei unterschiedliche Modelle. In einem Modell wird die Verfügbarkeit von NPR1 über die Cullin3-vermittelte Degradierung von NPR1 Salicylsäure-abhängig mit Hilfe von NPR3 und NPR4 reguliert. NPR3 und NPR4 sind dabei die Rezeptoren der Salicylsäure (Fu *et al.*, 2012). Während in einem weiteren Modell NPR1 selbst der Rezeptor der Salicylsäure ist und über Cys^{521/529} an Kupferionen bindet, welche wiederum an Salicylsäure binden. Durch die Bindung wird die C-terminale Transaktivierungsdomäne von NPR1 freigelegt (Wu *et al.*, 2012). Im dritten Modell nimmt NPR1 Salicylsäure ebenfalls selbst wahr. Der C-Terminus spielt hier auch eine entscheidende Rolle. Im C-Terminus wurde neben der Bindedomäne für NIMIN1- und NIMIN2-Proteine auch ein LENRV-Motiv identifiziert. Beide Domänen sind in NPR1-Homologen verschiedener Pflanzenspezies sowie in den jeweiligen Paralogen von NPR1 konserviert. Das Arginin innerhalb des LENRV-Motivs ist dabei essentiell für die Salicylsäurewahrnehmung. Sobald das Arginin mutiert wird, sind in Hefe sämtliche Salicylsäure-abhängigen Reaktionen nicht mehr möglich (Maier *et al.*, 2011).

5.1 Dimerisierung von NPR1 und NPR1-ähnlichen Proteinen in Hefe

Die Dimerisierungsfähigkeit von NPR-Proteinen stellt die Grundlage des Modells von Fu und Mitarbeitern (2012) dar. Durch die Salicylsäurekonzentrations-abhängige Bildung von Heterodimeren aus Arabidopsis NPR1 und NPR3 beziehungsweise NPR4 soll die Verfügbarkeit von NPR1 im

Zusammenspiel mit Cullin3 reguliert werden. NPR1 wie auch seine Paraloge verfügen über eine ähnliche Domänenstruktur und beinhalten eine BTB/POZ-Domäne und eine Ankyrin-Domäne. Diese Domänen sind bekannte Protein-Protein-Interaktionsdomänen, wobei die BTB/POZ-Domäne als Interaktionsplattform für Cullin3 gilt. Nach Spoel *et al.* (2009) stellt NPR1 selbst das Zielprotein von Cullin3 dar. Durch die Bindung von Cullin3 wird die proteasomale Degradierung von NPR1 durch das 26S-Proteasom gewährleistet und somit die Aufrechterhaltung der pflanzlichen Abwehr. In dem Modell nach Fu *et al.* (2012) fungieren die Paralogen NPR3 und NPR4 als Adapterproteine von Cullin3, welche zusammen mit NPR1 Salicylsäure-abhängig Komplexe bilden. Die Komplexbildung führt zum Abbau von NPR1. Die Protein-Protein-Interaktionen wurden dabei unter anderem im qualitativen Hefe-Zwei-Hybridtest gezeigt.

In dieser Arbeit konnten die erzielten Ergebnisse allerdings im quantitativen Hefe-Zwei-Hybridtest nicht reproduziert werden. Obwohl alle beteiligten NPR-Proteine über die N-terminale BTB/POZ-Domäne verfügen, konnte keine Interaktion von NPR1, NPR3 und NPR4 mit Cullin3 nachgewiesen werden (Abb. 31). Weiterhin konnte die Heterodimerisierung von NPR1 mit NPR3 beziehungsweise NPR4 nicht gezeigt werden, obwohl die Heterodimerisierung die Basis des Modells nach Fu *et al.* (2012) darstellt (Abb. 30). Ferner ist es im quantitativen Hefesystem nicht möglich, eine Hetero-beziehungsweise Homodimerisierung von AtNPR3 und AtNPR4 festzustellen. Obwohl postuliert wurde, dass die NPR-Proteine so einer Art Selbstregulation unterliegen (Abb. 30A, D, E, F). Ding *et al.* (2018) konnten ebenfalls eine Interaktion zwischen NPR3 beziehungsweise NPR4 mit Cullin3A mittels Co-Immunopräzipitation sowie die Heterodimerisierung von NPR1 und NPR3 beziehungsweise NPR4 im Hefe-Zwei-Hybridsystem nicht bestätigen. Die Rolle als Adapterproteine von AtNPR3 und AtNPR4 könnte fortführend in einem weiteren quantitativen Hefe-Drei-Hybridexperiment nochmals überprüft werden. Dabei sollten AtNPR1 und AtCullin3 als GAL4AD- beziehungsweise GAL4BD-Fusion und AtNPR3 beziehungsweise AtNPR4 unter der Kontrolle des *Met25*-Promotors verwendet werden. Möglicherweise sind alle drei Proteine für eine erfolgreiche Interaktion zur gleichen Zeit notwendig. Fu *et al.* (2012) beschreiben, dass bei der Co-Immunopräzipitation die Anwesenheit von AtNPR3 beziehungsweise AtNPR4 nötig war, um eine Interaktion zwischen AtNPR1 und Cullin3A zeigen zu können. Es stellt sich allerdings die Frage, aus welchem Grund eine Dimerisierung zwischen AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 im qualitativen Hefesystem möglich ist, im quantitativen Hefesystem jedoch nicht. Die grundlegenden Protein-Protein-Interaktionen des Modells von Fu und Mitarbeitern (2012) konnten im quantitativen Hefesystem nicht reproduziert werden.

Zusätzlich konnte mehrfach unabhängig voneinander demonstriert werden, dass NPR1 Salicylsäure direkt binden kann und in Abwesenheit anderer Pflanzenproteine Salicylsäure-sensitiv ist (Ding *et al.*, 2018; Maier *et al.*, 2011; Manohar *et al.*, 2014; Kuai *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2012), sodass es fraglich ist, ob NPR1 einer indirekten Wahrnehmung der Salicylsäure durch Bindung der Paralogen AtNPR3 und AtNPR4 bedarf. Im Zusammenhang mit der Wahrnehmung von Salicylsäure und der Induktion des

SAR-Markergens *PR1* wurden zu keiner Zeit *npr3* oder *npr4* Mutanten identifiziert, sondern hauptsächlich *npr1* Mutanten. Diese Tatsache ist ein weiterer Hinweis darauf, dass NPR1 die wichtigste regulatorische Rolle bekleidet und selbst direkt an der Wahrnehmung des endogenen Salicylsäurespiegels der Pflanze beteiligt ist. Sollten NPR3 und NPR4 tatsächlich eine solch wichtige Rolle übernehmen, wie sie das Modell nach Fu *et al.* (2012) vorsieht, hätten Mutanten gefunden werden müssen. Für Arabidopsis NPR3 und NPR4 wurde kürzlich eine Funktion als Salicylsäure-responsive Repressoren postuliert, welche unabhängig von AtNPR1 agieren (Ding *et al.*, 2018). Diese Ergebnisse weisen AtNPR3 sowie NPR4 zwar ebenfalls eine regulatorische Rolle zu, jedoch nicht im Sinne von Fu *et al.* (2012).

Die Mitglieder der Tabak-NPR-Proteinfamilie NPR1 und NPR3 verfügen ebenfalls über eine ähnliche Domänenstruktur wie die NPR-Proteine in Arabidopsis und weisen auch eine BTB/POZ-Domäne sowie eine Ankyrindomäne auf. Anders als die untersuchten Arabidopsis NPR-Proteine können Tabak NPR1 und NPR3 durchaus im heterologen Hefesystem Dimere bilden. Tabak NPR1 kann Homodimere bilden und mit NtNPR3 heterodimere Interaktionen eingehen. Die Homodimerisierung weist im direkten Vergleich eine höhere Reportergenaktivität auf, wohingegen die Heterodimerisierung eine gewisse Salicylsäure-Sensitivität aufweist. Es wurde festgestellt, dass die Dimerisierung möglicherweise über die BTB/POZ-Domäne erfolgt (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Die dimeren Interaktionen von Tabak NPR1 und NPR3 werden durch die Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktoren maßgeblich gestört und nahezu vollständig unterbunden. Die Bindung von NIMIN-Proteinen stört die Dimerisierung ebenfalls, wirkt sich aber nicht so gravierend aus (Abb. 8C, D, E, F; Abb. 9). Für die Interaktion von TGA-Transkriptionsfaktoren mit NPR1 ist neben der Ankyrin-Domäne auch die BTB/POZ-Domäne essentiell. Die massive Störung der dimeren Interaktionen durch die Anwesenheit von TGA-Transkriptionsfaktoren könnte auf eine mögliche Konkurrenz um die BTB/POZ-Domäne zurückzuführen sein, wobei die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren der Dimerisierung vorgezogen wird. Dieser Effekt wird unabhängig von der Anwesenheit von Salicylsäure beobachtet. Tabak NPR1 verfügt, anders als für Arabidopsis NPR1 beschrieben, nicht über Cys^{82/216}, welche in Verbindung mit der Fähigkeit zur Oligomerisierung von NPR1 benötigt werden (Mou *et al.*, 2003). In Tabak muss demnach ein anderer Mechanismus vorliegen. Für Arabidopsis NPR1 wurde postuliert, dass die monomere Form von NPR1 die biologisch aktive Form ist, welche in den Zellkern transloziert wird (Kinkema *et al.*, 2000; Mou *et al.*, 2003). In Tabak könnte die Dimerisierung über die BTB/POZ-Domäne die Funktion der inaktiven Speicherform vergleichbar mit der Oligomerisierung von AtNPR1 im Cytoplasma übernehmen. Durch den Anstieg des Salicylsäurespiegels innerhalb der Zelle wird die Translokation der Dimere in den Zellkern veranlasst. Die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren führt dann zur Monomerisierung der importierten Dimere und aktiviert so NPR1.

5.2 Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften von NPR1 und seinen Paralogen in Hefe

Canet und Mitarbeiter (2010) konnten im Zuge einer Analyse von mutagenbehandelten Arabidopsispflanzen eine Reihe von Mutanten in NPR1 identifizieren. Diese Mutanten wiesen nach Behandlung mit BTH ein verstärktes Wachstum auf. Interessanterweise häufen sich die identifizierten Mutationen im C-terminalen Bereich von NPR1. Dies unterstützt die These, dass der C-Terminus von NPR1 bedeutend für die Wahrnehmung von Salicylsäure ist. Zusätzlich wurden aber auch Mutanten im N-terminalen und zentralen Bereich von NPR1 entdeckt, welche nicht mehr auf BTH reagierten. Zwei dieser Mutanten wurden sowohl im Tabakkontext als auch im Arabidopsiskontext in Hefe näher untersucht.

Die Mutante innerhalb der N-terminalen BTB/POZ-Domäne trägt in AtNPR1 an Position 80 und in NtNPR1 an Position 81 einen Aminosäureaustausch von Histidin zu Tyrosin. Durch den Aminosäureaustausch H81Y in Tabak NPR1 wird die spontane Transkriptionsaktivität in Hefe im Gegensatz zum Wildtyp deutlich verstärkt und ist gegenüber Salicylsäure weitgehend insensitive (Abb. 13E). Wu und Mitarbeiter (2012) beschreiben in ihrem Modell eine autoinhibitorische Funktion der BTB/POZ-Domäne. Diese soll das Transaktivierungspotential des C-Terminus von NPR1 in Abwesenheit von Salicylsäure unterdrücken. Möglicherweise ist durch den Austausch von Histidin zu Tyrosin innerhalb der BTB/POZ-Domäne diese autoinhibitorische Funktion nicht mehr verfügbar. Das Transaktivierungspotential kann nicht mehr unterdrückt werden und erfährt somit auch keine Salicylsäure-abhängige Steigerung. Die Mutation innerhalb der BTB/POZ-Domäne verdeutlicht ferner die Wichtigkeit dieser Domäne bei der Dimerisierung der Tabak NPR-Proteine. Sowohl die Homodimerisierung von NPR1 als auch die Heterodimerisierung mit NPR3 ist dadurch deutlich eingeschränkt (Abb. 13E). Weiterhin scheint die BTB/POZ-Domäne auch bei der Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren eine Rolle zu spielen. In Tabak wird diese deutlich reduziert und nahezu unterbunden (Abb. 13D). Bei Arabidopsis NPR1 ist dieser Effekt ebenfalls zu beobachten, allerdings kann die Reportergenaktivität durch Salicylsäure gesteigert werden (Abb. 19D). Für die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren wird bei Arabidopsis NPR-Proteinen die Ankyrin-Domäne im zentralen Bereich der Proteine verantwortlich gemacht (Liu *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 1999). Versuche mit Deletionsmutanten zeigten jedoch, dass auch die N-terminale BTB/POZ-Domäne daran beteiligt sein muss. Deletionsmutanten mit fehlender BTB/POZ-Domäne waren nicht mehr in der Lage, TGA-Transkriptionsfaktoren in Hefe zu binden, obwohl die Ankyrin-Domäne vollständig vorhanden war (Abb. 26E). Die Interaktion von NIMIN-Proteinen wurde sowohl im Arabidopsis- als auch im Tabakkontext durch den Aminosäureaustausch H80Y beziehungsweise H81Y nahezu vollständig unterbunden (Abb. 13C; Abb. 19C). Eine weitere Mutante, *npr1-2*, welche eine stark reduzierte *PRI*-Geninduktion aufweist und an Position 150 des NPR1-Proteins einen Aminosäureaustausch von Cystein zu Tyrosin trägt, ist ebenfalls nicht mehr in der Lage, mit NIMIN-Proteinen zu interagieren (Cao *et al.*,

1997; Weigel *et al.* 2001). Dieser Austausch befindet sich in direkter Nachbarschaft zur BTB/POZ-Domäne. Obwohl beide Mutationen im N-Terminus und nicht im C-terminalen Bereich lokalisiert sind, in dem die Bindestelle für NIMIN1- und NIMIN2-Proteine kartiert wurde, kann die Bindung nicht mehr stattfinden. Auch NIMIN3, welches im N-terminalen Teil von NPR1 bindet, kann nicht mehr mit AtNPR1 H80Y interagieren. Allerdings ist es möglich, dass die Bindestelle von NIMIN3 in Zusammenhang mit der BTB/POZ-Domäne steht und die Mutation die Bindung stört. Durch die Mutation H80Y beziehungsweise H81Y werden die biochemischen Eigenschaften von NPR1 sowohl aus Tabak als auch aus Arabidopsis deutlich verändert. Die Veränderungen beschränken sich nicht auf konkrete Eigenschaften von NPR1, sodass davon ausgegangen werden kann, dass dieser Aminosäureaustausch eine Konformationsänderung von NPR1 bewirkt und die Bindung von Interaktionspartnern nicht normal möglich ist. Aufgrund der veränderten biochemischen Eigenschaften des Proteins ist es somit auch nicht mehr möglich, Salicylsäure oder BTH wahrzunehmen beziehungsweise die *PRI*-Geninduktion zu aktivieren. Dadurch kann die SAR nicht aktiviert werden und die betroffenen Pflanzen zeigen nach BTH-Behandlung nicht die typischen Einschränkungen des Wachstums wildtypischer Pflanzen.

Die untersuchte Mutation im zentralen Bereich von NPR1 bewirkt einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Serin innerhalb der Ankyrin-Domäne (Canet *et al.*, 2010). Die Ankyrin-Domäne spielt bei der Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Die Auswirkung dieser Mutation auf die biochemischen Eigenschaften von NPR1 wurde im Tabakkontext untersucht. Hier befindet sich der Aminosäureaustausch an Position 341. Bei der Analyse zeigte sich, dass die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren zwar stark beeinträchtigt ist, aber nicht vollständig unterbunden wird (Abb. 14D). Ähnlich verhielt es sich bei der Mutante NtNPR1 H81Y. Vorangegangenen Untersuchungen zu Folge spielen bei der Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an Tabak NPR1 sowohl die BTB/POZ-Domäne als auch die Ankyrin-Domäne eine Rolle (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Da in beiden Fällen nur eine der benötigten Interaktionsplattformen betroffen ist, kann die Bindung weiterhin erfolgen, wenn auch signifikant schwächer. Interessanterweise ist bei NtNPR1 P341S die Bindung von NtTGA7 gleichermaßen wie die Bindung von NtTGA2.1 und NtTGA2.2 geschwächt, wohingegen die Bindung von NtTGA7 an NtNPR1 H81Y zwar auch geschwächt wurde, aber dennoch deutlich stärker war als die Bindung von NtTGA2.2. Der Austausch von Prolin zu Serin scheint einen stärkeren Einfluss auf die Konformation von NPR1 zu haben als H81Y. Zusätzlich zu der signifikanten Schwächung der NtTGA7-Bindung im C-Terminus können auch NIMIN1- und NIMIN2-Proteine nicht mehr mit NtNPR1 P341S interagieren. Die NIMIN-Bindestelle wurde ebenso wie die Bindung für NtTGA7 im C-Terminus kartiert, welche durch die Mutation in der zentralen Region von NtNPR1 nicht direkt betroffen ist (Abb. 14C). Ein weiterer Hinweis darauf, dass durch den Austausch des Prolins zu Serin im zentralen Bereich von NPR1 die Konformation des Proteins drastisch verändert wird, sodass es nicht mehr funktionsfähig ist, ist die Tatsache, dass NtNPR1 P341S weder über eine spontane noch eine Salicylsäure-induzierbare Transaktivierungsaktivität in Hefe verfügt (Abb. 14D und E). Das Prolin

innerhalb der zentralen Ankyrin-Domäne könnte eine maßgebliche Rolle bei der Konformation des Proteins spielen. Durch die zyklische Struktur und die Unfähigkeit, Wasserstoffbrücken zu bilden, wird das Protein durch Prolin an dieser Position starr. Durch den Austausch zu Serin wird die starre Konformation von NPR1 aufgehoben, sodass NPR1 möglicherweise seine Funktionalität verliert. Es ist so nicht mehr in der Lage, mit wichtigen Interaktionspartnern normal in Kontakt zu treten. Dadurch ist die Wahrnehmung und die Reaktion auf Salicylsäure gestört und NPR1 kann nicht mehr als Co-Aktivator der *PRI*-Geninduktion fungieren. Die betroffenen Pflanzen können durch Salicylsäure- oder BTH-Behandlung nicht mehr SAR etablieren und weisen folglich nicht die dafür charakteristischen Einschränkungen im Wachstum auf.

Die Charakterisierung der Arabidopsis NPR-Proteine in Hefe zeigte, dass die Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren der Klassen II und III allen untersuchten Mitgliedern dieser Proteinfamilie gemein ist. Die Interaktion der TGA-Transkriptionsfaktoren mit AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 ist gegenüber Salicylsäure weitgehend insensitive (Abb. 18C; Abb. 24C; Abb. 26B und C), wohingegen die spontane Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren an AtNPR2 durch Salicylsäure signifikant verstärkt wird (Abb. 21B). Die Interaktionsstärke zwischen AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4 und den TGA-Transkriptionsfaktoren ist recht ähnlich und weist eine relativ hohe Reportergenaktivität im Hefe-Zwei-Hybridtest auf. Die Interaktion zwischen AtNPR2 und TGA-Transkriptionsfaktoren erreicht erst in Anwesenheit von Salicylsäure eine vergleichbare Intensität wie bei AtNPR1, AtNPR3 und AtNPR4. Die spontane Interaktion ist in dem Fall signifikant geringer. Die Fähigkeit der Paralogen von NPR1, mit TGA-Transkriptionsfaktoren der Klassen II und III zu interagieren, deutet daraufhin, dass auch AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 an der Regulation von Genen der Abwehr beteiligt sein könnten. Tatsächlich werden Arabidopsis NPR3 und NPR4 unabhängig von NPR1 redundante Aktivitäten als transkriptionelle Co-Repressoren Salicylsäure-responsiver Gene zugeschrieben. Innerhalb des C-Terminus von NPR3 und NPR4 befindet sich das konservierte Motiv VDLNETP, welches Ähnlichkeiten zum EAR-Motiv (L/F DLN L/F (X) P) aufweist. Dieses Motiv wird für die repressorischen Eigenschaften verantwortlich gemacht (Ding *et al.*, 2018). Auch im C-Terminus von NPR2 befindet sich eine EAR-Motiv ähnliche Domäne. Diese weicht mit der Aminosäureabfolge LDLNAP zwar von den Motiven von NPR3 und NPR4 ab, erfüllt aber dennoch den vorgegebenen Konsensus. Die Funktion eines transkriptionellen Co-Repressors könnte also auch für Arabidopsis NPR2 zutreffen.

Im Gegensatz zur TGA-Transkriptionsfaktorinteraktion ist die Fähigkeit zur Bindung von NIMIN-Proteinen innerhalb der Arabidopsis NPR-Proteine auf AtNPR1 beschränkt. Trotz ähnlicher Domänenstruktur der Proteine und einem Aminosäuresequenzbereich mit hoher Ähnlichkeit zur NIMIN1/2-Bindedomäne können die Arabidopsis Paralogen AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 weder in An- noch Abwesenheit von Salicylsäure NIMIN-Proteine binden (Abb. 20; Abb. 23; Abb. 25). Anders als in Tabak ist die NIMIN-Proteinbindung in Arabidopsis exklusiv für NPR1. Nicht nur die Interaktion

mit NIMIN-Proteinen ist einzigartig für Arabidopsis NPR1, sondern ebenso die Bildung ternärer Komplexe mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren (Abb. 27C). Die ternären Komplexe sind in der Lage, auf *as-1*-ähnlichen Elementen zu binden, welche beispielsweise in *PRI*-Promotoren zu finden sind (Weigel *et al.*, 2005). Die Exklusivität für Arabidopsis NPR1, solche ternären Komplexe zu bilden, spricht dafür, dass ausschließlich NPR1 im Arabidopsiskontext zusammen mit den Genregulatoren TGA-Transkriptionsfaktoren und NIMIN-Proteinen für die Induktion der *PRI*-Genexpression verantwortlich ist und die Paralogen nicht direkt in diesem Zusammenhang stehen. Der ternäre Komplex aus AtNPR1, TGA-Transkriptionsfaktoren und AtNIMIN2 ist anders als die Interaktion von AtNPR1 und AtNIMIN2 auch bei hohen Salicylsäurekonzentrationen bis zu 1mM stabil (Abb. 27A). Dieser Befund unterstützt das Modell nach Hermann *et al.* (2013), in dem AtNIMIN2 aktiv von AtNIMIN1 aus dem ternären Komplex verdrängt wird und von dem umgebenden Salicylsäureniveau unbeeinflusst bleibt. Sowohl AtNIMIN1 als auch AtNIMIN2 binden an die NIMIN-Bindedomäne im C-terminalen Bereich von NPR1. Durch den Anstieg des endogenen Salicylsäurespiegels der Pflanze wird zuerst die Expression von *NIMIN2* induziert, gefolgt von der Induktion der Expression von *NIMIN1*. NIMIN2 bindet NPR1 und wird im Anschluss von NIMIN1 aktiv verdrängt. Sobald der Salicylsäurespiegel ein bestimmtes Niveau erreicht, wird NIMIN1 direkt durch die Wirkung von Salicylsäure vom C-Terminus von NPR1 verdrängt und der Komplex aus TGA-Transkriptionsfaktoren und NPR1 kann die *PRI*-Genexpression induzieren. Im heterologen Hefesystem konnte gezeigt werden, dass der ternäre Komplex unter Beteiligung von NIMIN1 sensitiv auf die Anwesenheit von Salicylsäure reagiert (Hermann *et al.*, 2013). Zur besseren Einordnung und zum Vergleich mit der Sensitivität anderer Reaktionen von AtNPR1 gegenüber Salicylsäure könnten ebenfalls IC₅₀-Werte für die Dissoziation des ternären Komplexes aus AtNPR1, AtNIMIN1 und TGA-Transkriptionsfaktoren aufgenommen werden.

Die Bindedomäne für NIMIN1- und NIMIN2-Proteine wurde für Arabidopsis NPR1 und Tabak NPR1 im C-Terminus kartiert. Innerhalb dieser Bindedomäne wurden jeweils zwei Phenylalanine identifiziert, welche essentiell für die Interaktion der NIMIN-Proteine mit NPR1 sind. Der Austausch der Phe^{505/506} in NtNPR1 beziehungsweise Phe^{507/508} in AtNPR1 zu Serinen unterbindet die Interaktion von NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen mit NPR1 vollständig (Maier *et al.*, 2011; Hermann *et al.*, 2013). In Tabak kann neben NPR1 auch NPR3 mit NIMIN-Proteinen interagieren. Innerhalb der NIMIN-Bindedomäne von NtNPR3 handelt es sich aufgrund von Sequenzunterschieden nicht um zwei benachbarte Phenylalanine, sondern um ein Tyrosin und ein Phenylalanin an den Positionen 508 und 509. Der Austausch dieser Aminosäuren bewirkt ebenso wie bei AtNPR1 und NtNPR1, dass NIMIN-Proteinen nicht mehr binden können (Abb. 16). Die Phenylalanine beziehungsweise das Tyrosin innerhalb der Bindedomänen sind für die Bindung von NIMIN-Proteinen von zentraler Bedeutung. Durch Mutagenese dieser Aminosäuren verlieren diese NPR-Proteine die Fähigkeit, NIMIN-Proteine zu binden ohne dabei in den weiteren biochemischen Eigenschaften beeinträchtigt zu werden. Insbesondere bei Tabak NPR1 lässt sich zeigen, dass dadurch auch das Salicylsäure-sensitive Transaktivierungspotential unberührt bleibt

180

(Maier *et al.*, 2011). Für Tabak NPR3 muss dies allerdings noch im Volllängenkontext untersucht werden, da hier für die Untersuchungen lediglich ein C-terminaler Deletionsklon vorlag.

Innerhalb des homologen Aminosäuresequenzbereichs zur hochkonservierten NIMIN-Bindestelle von AtNPR1 in Arabidopsis NPR3 befinden sich ebenfalls zwei Phenylalanine analog zu den Phenylalaninen in Tabak und Arabidopsis NPR1, welche mit der Bindung der NIMIN-Proteine an den C-Terminus assoziiert werden. Im Gegensatz zu Tabak NPR1 und NPR3 sowie Arabidopsis NPR1 kann Arabidopsis NPR3 jedoch nicht mit NIMIN-Proteinen interagieren. Allerdings können die C-terminalen Domänen LEKRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne Salicylsäure-abhängig assoziieren. Durch den Austausch von Phe^{502/503} zu Serinen kann die induzierte Affinität unterbunden werden (Abb. 40). Die Unterbindung der Salicylsäure-induzierbaren Affinität der C-terminalen Domänen konnte aufgrund des Aminosäureaustauschs F505/506S auch bei Tabak NPR1 beobachtet werden (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Austausch gezielt die Bindung von NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen beeinflusst, die Salicylsäure-Sensitivität aber weiterhin erhalten bleibt (Maier *et al.*, 2011). Die Wahrnehmung von Salicylsäure und die Bindung von NIMIN-Proteinen erfolgt also unabhängig von einander an verschiedenen Bereichen des C-Terminus. Die Phenylalanine, welche Voraussetzung für die Bindung der NIMIN-Proteine sind, nehmen eine duale Funktion ein. Zusätzlich sind diese Aminosäuren für die Konformationsänderung des C-Terminus durch die Wahrnehmung von Salicylsäure von großer Bedeutung. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass nicht der Verlust der Salicylsäure-Wahrnehmung die Unterbindung der Assoziation der C-terminalen Domänen von AtNPR3 bewirkt, sondern dass dies in Folge der gestörten Funktionalität der NIMIN-Bindedomäne nicht mehr möglich ist.

Zur Prüfung der Annahme, dass die entsprechenden Phenylalanine der weiteren NPR-Proteine ohne Fähigkeit zur NIMIN-Bindung nicht im direkten Zusammenhang mit der Salicylsäurewahrnehmung stehen, könnte eine analoge Mutante für AtNPR2 generiert werden. Arabidopsis NPR2 verfügt als einziges Mitglied der AtNPR-Proteinfamilie über eine Salicylsäure-sensitive Reaktion, welche nicht in Verbindung mit der NIMIN-Bindedomäne steht. Es besteht zwischen den Phenylalaninen und der Salicylsäurewahrnehmung keine Verbindung, wenn der verstärkende Effekt der Salicylsäure auf die Interaktion von TGA-Transkriptionsfaktoren mit AtNPR2 durch die Mutation nicht beeinträchtigt wird. Im Gegensatz zu Tabak NPR1 können die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR1 nicht assoziieren. Mit Hilfe von chimären Interaktionen könnte trotzdem geprüft werden, ob die Mutation F507/508S sich in diesem Fall ebenfalls negativ auf die Rekonfiguration des C-Terminus auswirken würde. Es ist bekannt, dass die NIMIN-Bindedomäne von AtNPR1 mit den LENRV-ähnlichen Domänen der Paralogen AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 Salicylsäure-abhängig assoziieren kann. Eine konservierte Funktion der Phenylalanine innerhalb der NPR-Proteinfamilie von Tabak und Arabidopsis kann angenommen werden, wenn die Fähigkeit der Assoziation durch den Aminosäureaustausch F507/508S negativ beeinflusst wird.

Den untersuchten NPR-Proteinen aus Tabak und Arabidopsis ist nicht nur die NIMIN-Bindedomäne gemein, sondern auch eine LENRV-ähnliche Domäne im C-Terminus. Das Arginin im hochkonservierten LENRV-Motiv von NPR1 ist wichtig für die Salicylsäure-Wahrnehmung. Durch Mutagenese des Arginins werden sämtliche Salicylsäure-abhängigen biochemischen Eigenschaften von NPR1 unterbunden (Maier *et al.*, 2011). Diese Ergebnisse wurden kürzlich von der Arbeitsgruppe um Yuli Ding (2018) bestätigt. Es wurde gezeigt, dass sich die Bindungsaffinität für Salicylsäure durch Mutation von Arg⁴³² im LENRV-Motiv von AtNPR1 drastisch verringert. Der K_d -Wert von 221,3 nM des wildtypischen NPR1-Proteins erhöht sich durch die Mutagenese um das 50-fache. Arg⁴³² ist also auch direkt an der Bindung von Salicylsäure an NPR1 beteiligt und dafür wichtig (Ding *et al.*, 2018).

Im LENRV-Motiv von Tabak NPR3 und in den LENRV-ähnlichen Motiven von Arabidopsis NPR2, NPR3 und NPR4 ist das Arginin ebenfalls enthalten. In dieser Arbeit konnte durch die Generierung von *nim1-4*-ähnlichen Mutanten und die anschließende Analyse dieser Mutanten im heterologen Hefesystem eindeutig gezeigt werden, dass das Arginin auch bei den Paralogen von NPR1 in Tabak und Arabidopsis eine maßgebliche Rolle bei der Wahrnehmung von Salicylsäure spielt. Durch den Austausch des Arginins zu einem Lysin in NtNPR3 wird der negative Effekt von Salicylsäure auf die NIMIN-Bindung aufgehoben (Abb. 15B und C). Die spontane Interaktion von TGA-Transkriptionsfaktoren mit AtNPR2 wird durch die Mutation R432K bei Anwesenheit von Salicylsäure nicht weiter verstärkt (Abb. 39B). In Arabidopsis NPR4 wirkt sich die Mutation R419K negativ auf die Salicylsäure-induzierbare Affinität der C-terminalen Domänen aus, sodass eine Assoziation nicht mehr möglich ist (Abb. 45D). Ebenso wie für AtNPR1 konnte von Ding *et al.* (2018) auch für Arabidopsis NPR4 demonstriert werden, dass durch Mutation von Arg⁴¹⁹ die Bindungsaffinität für Salicylsäure drastisch reduziert wird und der K_d -Wert von 23,54 nM des wildtypischen NPR4-Proteins dadurch um das 250-fache ansteigt. Arabidopsis NPR3 verhält sich relativ ähnlich wie AtNPR4. Anhand dieser Ergebnisse kann angenommen werden, dass auch bei AtNPR3 Arg⁴²⁸ im LEKRV-Motiv eine entscheidende Rolle bei der Salicylsäure-Wahrnehmung einnimmt. Für Arabidopsis NPR4 konnte weiterhin demonstriert werden, dass ein doppeltes Vorliegen des Arginins im mutierten LEKRV-Motiv LERRV weder negative noch positive Effekte hinsichtlich der Wahrnehmung von Salicylsäure zeigt (Abb. 45B und C). Ein Vertauschen von Lys⁴¹⁸ mit Arg⁴¹⁹, sodass aus dem LEKRV-Motiv ein LERKV entsteht, hat allerdings denselben Effekt wie die analoge *nim1-4* Mutante in AtNPR4. Die Affinität der C-terminalen Domänen wird durch Salicylsäure nicht mehr induziert (Abb. 45E). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Position des Arginins innerhalb des LENRV- bzw. LENRV-ähnlichen Motivs wichtig ist, eine Verdopplung des Arginins allerdings keinen Effekt auf die Salicylsäurewahrnehmung zeigt. Ferner wird durch diese Untersuchungen zusammen mit den Ergebnissen von Ding *et al.* (2018) klar, dass die Wahrnehmung und die Bindung von Salicylsäure direkt mit dem Arginin innerhalb der LENRV-ähnlichen Motive der jeweiligen NPR-Proteine im Zusammenhang stehen. Die biochemischen Eigenschaften dieser Proteine werden durch die Mutagenese des Arginins nicht beeinträchtigt, sondern nur gezielt die Salicylsäure-abhängigen Reaktionen unterbunden. Anders als die Cys^{521/529}, welche nach Wu *et al.* (2012) zusammen

mit Kupferionen für die Bindung von Salicylsäure an NPR1 verantwortlich sein sollen, ist das Arg⁴³² nicht nur innerhalb der Paralogen der NPR-Proteinfamilie von Arabidopsis konserviert. Es ist auch in weiteren Pflanzenspezies konserviert, verbunden mit einer direkten Rolle bei der Salicylsäurewahrnehmung und vermutlich auch Salicylsäurebindung.

5.3 Die Induktorspezifität der NPR-Proteine von Tabak und Arabidopsis

Die direkte Wirkung von Salicylsäure auf Arabidopsis NPR1 und Tabak NPR1 und NPR3 war bereits bekannt. Für die weiteren Mitglieder der NPR-Proteinfamilie von Arabidopsis mit ähnlicher Domänenstruktur wie NPR1, konnte in vorangegangenen Studien und dieser Arbeit ebenfalls eine direkte Wirkung der Salicylsäure auf die Proteine gezeigt werden. Neben Salicylsäure gibt es noch weitere bekannte Verbindungen, welche einen Einfluss auf die Induktion der *PR1*-Genexpression haben oder mit der Pflanzenabwehr in Verbindung gebracht werden. Bei einigen davon konnte in dieser Arbeit ebenso wie für Salicylsäure ein direkter Einfluss auf die NPR-Proteine gezeigt werden.

BTH und INA zeigen in Pflanzen einen deutlichen Einfluss auf die *PR1*-Induktion. BTH beispielsweise zeigt bei transgenen *PR1a_{pro}::GUS*-Tabakpflanzen eine stärkere Reporter-geninduktion als Salicylsäure (Abb. 52B). Der direkte Einfluss von BTH und INA auf die untersuchten NPR-Proteine unterscheidet sich jedoch im heterologen Hefesystem hinsichtlich der Effektivität von der Reporter-geninduktion *in planta*. Bezüglich der NPR-Proteine von Arabidopsis zeigt sich, dass die Substanzen BTH und INA eine signifikant geringere Wirkung als Salicylsäure auf die Proteine aufweisen (Abb. 37). BTH hat als freie Säure (*free carboxylic acid*, Acibenzolarsäure) vorliegend im Vergleich zu BTH und INA den stärksten Effekt auf die AtNPR-Proteine. Besonders deutlich wird die bessere Wirksamkeit von Acibenzolarsäure bei der Induktion der Assoziation der C-terminalen Domänen von AtNPR3. Dennoch erreicht Acibenzolarsäure nicht die Effektivität von Salicylsäure (Abb. 42). Die untersuchten NPR-Proteine aus Tabak verhalten sich hinsichtlich der Wirksamkeit von BTH, Acibenzolarsäure und INA anders als die Arabidopsis NPR-Proteine. Bei 0,3 mM entsprach die Wirkung von BTH, Acibenzolarsäure und INA der Effektivität von Salicylsäure auf NtNPR1 und NtNPR3. Die Substanzen konnten die Assoziation der C-terminalen Domänen von NtNPR1 sowie die Dissoziation der Bindung von NIMIN2a an NtNPR1 beziehungsweise NtNPR3 mit gleicher Effektivität wie Salicylsäure bewirken. Sobald die Substanzen jedoch in geringeren Konzentrationen (0,03 mM und 0,003 mM) eingesetzt wurden, nahm die Wirkung von BTH, Acibenzolarsäure und INA signifikant ab und ähnelte der Wirkung auf Arabidopsis NPR-Proteine. Acibenzolarsäure zeigte auch auf Tabak NPR-Proteine einen deutlich besseren Effekt als BTH oder INA (Abb. 50; Abb. 54).

Als freie Säure vorliegendes BTH ist der Hauptmetabolit von BTH in Pflanzen (Friedrich *et al.*, 1996). Für die Umwandlung von BTH in Acibenzolarsäure wird das Enzym SABP2 benötigt. SABP2 gehört zu der α/β -Hydrolasefamilie mit Esteraseaktivität. Das Enzym katalysiert in Pflanzen die Konvertierung von Methyl-Salicylsäure zu Salicylsäure (Forouhar *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt

werden, dass RNAi *sabp2* Tabakpflanzen durch BTH-Applikationen nicht mehr in der Lage waren, *PRI* zu exprimieren beziehungsweise die SAR zu etablieren. Die Behandlung mit Acibenzolarsäure konnte jedoch sowohl die Expression von *PRI* als auch die Etablierung der SAR bei den mutanten Tabakpflanzen induzieren (Tripathi *et al.*, 2010). Es könnte sein, dass die signifikant bessere Wirkung von Acibenzolarsäure auf die untersuchten NPR-Proteine von Tabak und Arabidopsis daher rührt, dass BTH in Hefe nicht wie in Pflanzen metabolisiert wird und so seine Wirkung nicht voll entfalten kann.

Anhand der Untersuchung verschiedener struktureller Analoga der Salicylsäure wurden chemische Induktoren der Pathogen-responsiven *CaBP22_{pro}:GUS* Reporterengenkonstruktion in Arabidopsis identifiziert (Knoth *et al.*, 2009; Knoth&Eulgem, 2014), welche zusammen mit weiteren Substanzen auf eine direkte Wirkung auf NPR-Proteine in Hefe getestet wurden. Für die vergleichende Analyse der Wirksamkeit mit Salicylsäure wurden Benzoessäure, Anthranilsäure, 4-Chlorbenzoessäure sowie die dichlorierten Verbindungen 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure verwendet. Allerdings können die Werte der chlorierten Verbindungen der Konzentration 0,3 mM nicht vergleichend verwendet werden, da diese sich negativ auf das Wachstum der Hefen auswirkten. Bei der Analyse konnten spezieübergreifend zwischen den NPR-Proteinen von Tabak und Arabidopsis Unterschiede festgestellt werden. Benzoessäure und Anthranilsäure wirken auf die Dissoziation der AtNIMIN2-AtNPR1-Bindung bereits bei 0,3mM signifikant schwächer als Salicylsäure und sind bei 0,03 mM bereits wirkungslos. Die chlorierten Verbindungen, besonders 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure erweisen sich hingegen potenter als Salicylsäure (Abb. 35). Knoth *et al.* (2009) konnten für die Pathogen-responsive *CaBP22_{pro}:GUS* Reporterengenkonstruktion in Arabidopsis ebenfalls feststellen, dass die dichlorierten Verbindungen 3,5-Dichloranthranilsäure und 3,5-Dichlorbenzoessäure die stärkste induktive Wirkung zeigten. Monochlorierte Verbindungen waren dagegen stark in ihrer induktiven Wirkung eingeschränkt. In Bezug auf die *CaBP22_{pro}:GUS*-Reporterengenkonstruktion wurden die Verbindungen Benzoessäure und Anthranilsäure als inaktiv eingestuft. Im Gegensatz zu Arabidopsis NPR1 wirkt Benzoessäure sowohl bei der Dissoziation von NtNIMIN2a von NtNPR1 und der Induktion der Affinität der C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von NtNPR1 bei 0,3 mM gleichwertig wie Salicylsäure und bei geringeren Konzentrationen (0,03 mM und 0,003 mM) sogar signifikant besser. Anthranilsäure zeigt auch hier die geringste Wirkung, wohingegen die dichlorierten Substanzen hinsichtlich ihrer Effektivität am besten abschneiden (Abb. 48). Für Tabak NPR3 und die Dissoziation von NtNIMIN2a konnte dieselbe Wirkungsweise der verwendeten Substanzen wie für NtNPR1 beobachtet werden (Abb. 53A).

Beim Vergleich der IC₅₀/EC₅₀-Werte für die Interaktionen von Tabak und Arabidopsis NPR1 wird unabhängig der Pflanzenspezies deutlich, dass 3,5-Dichloranthranilsäure einen signifikant besseren direkten Effekt auf NPR1 hat als Salicylsäure. Im Bezug auf die Höhe der Werte konnten zwischen den Pflanzenspezies allerdings Unterschiede festgestellt werden. Bei Betrachtung der IC₅₀-Werte für die Dissoziation von AtNIMIN2 beziehungsweise NtNIMIN2a von NPR1 wird klar, dass die Werte Tabak

NPR1 betreffend signifikant niedriger sind als für Arabidopsis NPR1. Der IC_{50} -Wert für Salicylsäure ist bei NtNPR1 mit $0,7 \mu M$ 24-mal geringer als der IC_{50} -Wert für AtNPR1 mit $17,03 \mu M$. Für 3,5-Dichloranthranilsäure verhalten sich die Werte ähnlich. Der IC_{50} -Wert für NtNPR1 beträgt $0,28 \mu M$ und ist somit wesentlich niedriger als der IC_{50} -Wert für AtNPR1 mit $3,54 \mu M$ (Abb. 35B und C; Abb. 49A). Der Unterschied in der Sensitivität gegenüber Salicylsäure von Arabidopsis und Tabak NPR1 könnte auf den basalen endogenen Salicylsäurespiegel beider Pflanzenspezies zurückgeführt werden. In Tabak konnten $0,01 \mu g$ freie Salicylsäure pro Gramm Frischgewicht ermittelt werden (Malamy *et al.*, 1990; Raskin *et al.*, 1990), wohingegen der Anteil von Salicylsäure in Arabidopsis mit $0,56 \mu g$ je Gramm Frischgewicht bedeutend höher liegt (Garcion *et al.*, 2008). Arabidopsis weist also einen höheren basalen endogenen Salicylsäurespiegel auf als Tabak. Somit darf die Wahrnehmung der Salicylsäure nicht ebenso sensitiv erfolgen wie in Tabak, da sonst eine permanente Induktion der SAR beziehungsweise der *PR1*-Genexpression erfolgen könnte.

Bei Tabak NPR-Proteinen konnten beim Induktorenspektrum keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden. Tabak NPR1 und NPR3 waren gegenüber denselben Substanzen sensitiv beziehungsweise insensitiv. Im Gegensatz dazu lassen sich innerhalb der NPR-Proteinfamilie von Arabidopsis bezüglich der Induktorspezifität wesentliche Unterschiede beobachten. Die Wirkungsweise der untersuchten Substanzen unterscheidet sich zwischen Arabidopsis NPR1 und NPR3. Zusätzlich zu Benzoessäure und Anthranilsäure zeigt 4-Chlorbenzoessäure nun auch eine signifikant schwächere Wirkung als Salicylsäure. Die dichlorierten Verbindungen 3,5-Dichlorbenzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure zeigen jedoch auch bei AtNPR3 den besten Effekt. Sie induzieren die Assoziation der C-terminalen Domänen von AtNPR3 besser als Salicylsäure (Abb. 41A). Der Vergleich der EC_{50} -Werte für Salicylsäure und 3,5-Dichloranthranilsäure verdeutlicht das. Für Salicylsäure liegt der EC_{50} -Wert mit $>121,12 \mu M$ deutlich höher als für 3,5-Dichloranthranilsäure mit nur $5,75 \mu M$ (Abb. 41B und C). Eine Besonderheit zeichnet die Salicylsäure-abhängige Induktion der Affinität der C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR4 aus. Im Gegensatz zu den anderen NPR-Proteinen reagiert AtNPR4 ausschließlich auf Salicylsäure. (Abb. 43A). Der EC_{50} -Wert für Salicylsäure liegt bei $66,59 \mu M$ und somit deutlich unter dem EC_{50} -Wert für NPR3 (Abb. 43B). Die *in vivo* ermittelten EC_{50} -Werte für die Sensitivität der Assoziation der C-terminalen Domänen von NPR3 und NPR4 spiegeln die jeweils *in vitro* ermittelten Bindungsaffinitäten von Salicylsäure wieder. Für NPR4 wurden K_d -Werte zwischen $23,54 nM$ und $46,2 nM$ ermittelt und für NPR3 ein K_d -Werte von $176,7 nM$ (Ding *et al.*, 2018; Fu *et al.*, 2012). Die Bindungsaffinität von NPR4 für Salicylsäure ist wesentlich höher als die von NPR3. Die *in vivo* ermittelte Salicylsäure-Sensitivität für NPR4 impliziert das mit einem ungefähr halb so hohen EC_{50} -Wert im Vergleich zu NPR3.

Einige Vertreter der NPR-Proteinfamilie von Tabak und Arabidopsis reagieren mit einer strukturellen Umlagerung des C-Terminus auf die Gegenwart von Salicylsäure. Die C-terminalen Domänen LENRV-ähnliche Domäne und NIMIN-Bindedomäne zeigen eine Salicylsäure-induzierbare Affinität in Hefe

zueinander. Neben Tabak NPR1 gehören auch Arabidopsis NPR3 und NPR4 zu diesen Vertretern. Im Gegensatz dazu können die C-terminalen Domänen von Arabidopsis NPR1 und NPR2 sowie von Tabak NPR3 weder spontan noch Salicylsäure-abhängig miteinander assoziieren. Chimäre Interaktionen vorangegangener Studien zeigten, dass die LENRV-Domäne bei AtNPR1 entscheidend dafür ist. In dieser Arbeit konnte für AtNPR2 durch ähnliche Experimente gezeigt werden, dass die NIMIN-Bindedomäne von AtNPR2 entscheidend für die nicht erfolgende, strukturelle Umlagerung des C-Terminus in Anwesenheit von Salicylsäure ist (Abb. 46). Für Tabak NPR3 wiederum ist die LENRV-Domäne entsprechend wie bei AtNPR1 dafür verantwortlich, dass keine strukturelle Umlagerung im C-Terminus in Gegenwart von Salicylsäure erfolgen kann (Abb. 55). Für die chimären Experimente mit den C-terminalen Domänen der Arabidopsis NPR-Proteine wurde nicht nur Salicylsäure als Induktor verwendet, sondern auch die bereits getesteten strukturellen Analoga Benzoessäure, Anthranilsäure, 3,5-Dichloranthranilsäure, 4-Chlorbenzoessäure und 3,5-Dichlorbenzoessäure. Die jeweilige Spezifität der einzelnen NPR-Proteine von Arabidopsis konnte dabei auch bei der chimären Interaktion der jeweiligen C-terminalen Domänen beobachtet werden. Je nach gewähltem Interaktionspartner variiert die Wirkung der untersuchten Induktoren und spiegelt in gewisser Weise die Wildtypsituation wider. Beispielsweise ist unter Beteiligung der AtNPR1 NIMIN-Bindedomäne oder der AtNPR2 YENRV-Domäne das Spektrum der induktiven Substanzen breit gefächert, wohingegen unter Beteiligung der C-terminalen Domänen LEKRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von AtNPR3 und AtNPR4 dieses Spektrum eine gewisse Einschränkung erfährt (Abb. 46).

Die unterschiedlichen Spezifitäten der untersuchten Arabidopsis NPR-Proteine deuten daraufhin, dass sie nicht ausschließlich im Zusammenhang mit der SAR beziehungsweise dem Salicylsäuresignalweg stehen könnten. Für AtNPR1 beispielsweise wurde postuliert, dass dieses Protein auch Salicylsäure-unabhängig eine Rolle in der PTI bei der Abwehr von nekrotrophen Pathogenen spielt und dabei zusammen mit Ethylen und Jasmonsäure wirkt (Nie *et al.*, 2017). Das breit gefächerte Spektrum der Induktoren der chimären Interaktionen der C-terminalen Domänen der untersuchten NPR-Proteine deutet auch bei NPR2 darauf hin, dass es nicht nur für den Salicylsäuresignalweg eine Rolle spielt. AtNPR3 ist etwas spezifischer, spricht aber trotzdem sehr gut auf dichlorierte Verbindungen an, wobei AtNPR4 ausschließlich auf Salicylsäure reagiert. Aufgrund dieser Spezifität scheint AtNPR4 ausschließlich im Salicylsäuresignalweg involviert zu sein.

5.4 Charakterisierung von *npr1* und *npr3* Mutanten in *Nicotiana tabacum*

Aufgrund verschiedener Mutageneseversuche gibt es für Arabidopsis *NPR1* sowie für die Paralogen *NPR3* und *NPR4* Mutanten, welche *in planta* Aufschluss über die Rolle der Mitglieder der NPR-Proteinfamilie geben können. Anders als für Arabidopsis war das für Tabak bislang nicht der Fall. In Tabak werden NPR1 und NPR3 in Verbindung mit der Pathogenabwehr gebracht. Die Sequenzen beider Proteine weisen eine hohe Homologie zu der Sequenz von Arabidopsis NPR1 auf, wobei die Ähnlichkeit

zwischen AtNPR1 und NtNPR1 deutlich höher ist. Die Ähnlichkeit zwischen NtNPR1 und AtNPR1 liegt 68% und 72%, wohingegen die Ähnlichkeit zwischen NtNPR3 und AtNPR1 bei 58% liegt (Maier *et al.*, 2011). Tabak NPR1 und NPR3 weisen zudem eine ähnliche Domänenstruktur wie AtNPR1 auf. Mit Hilfe des CRISPR/Cas9-Systems wurden in der vorliegenden Arbeit Mutanten für *NPR1* und *NPR3* in *N. tabacum* erzeugt, um die Bedeutung der beiden Tabak NPR-Proteine *in planta* charakterisieren zu können. Der Mechanismus des CRISPR/Cas9-Systems, welcher in der Genomeditierung Anwendung findet, beruht auf dem prokaryotischen, adaptiven Immunsystem. Mittels des CRISPR/Cas9-Systems ist es möglich, Gene entweder durch *non-homologous end joining* (NHEJ) gezielt auszuschalten oder neue Sequenzabschnitte durch *homology-directed repair* (HDR) einzubringen. In dieser Arbeit sollten die Zielgene *NtNPR1* und *NtNPR3* in *Nicotiana tabacum* zu Analyse Zwecken ausgeschaltet werden.

Es wurden insgesamt vier verschiedene Linien mit unterschiedlichen Zielgenen durch die Transformation von *Nicotiana tabacum* mit den entsprechenden CRISPR/Cas9-Konstruktionen erzeugt. Die Transformation erfolgte mit einer Ausnahme bei allen verwendeten Konstruktionen in *N. tabacum* cv. Samsun NN. Den Transformationshintergrund der Linie 90H stellte die transgene *N. tabacum* Linie 138-3 dar. Diese Linie trägt eine *PR1a_{pro}:GUS*-Reporter genkonstruktion, welche weiterführende Analysen potentieller *NPR1*-Mutanten erleichtern sollte. Mit Linie 90H sollte eine *npr1* Mutante der *N. tomentosiformis* Variante erzeugt werden. Während mit Linie 111H eine *npr1* Mutante generiert werden sollte, welche beide Eltern *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* von *N. tabacum* betrifft. In Linie 113H stellte das Zielgen der Mutagenese *NtNPR3* beider Elternarten dar. Ziel der Linie 118H war es, eine *npr1npr3* Doppelmutante zu generieren, welche die Gene beider Eltern *N. tomentosiformis* und *N. sylvestris* betrifft. Die Vorselektion der F₁-Generation der jeweiligen Linien erfolgte über eine vierwöchige Behandlung mit Bion. Die Basis der Vorselektion bildet die induktive Eigenschaft von Bion auf die *PR*-Genexpression und der Etablierung der SAR. Pflanzen mit einer gestörten Wahrnehmung von Bion sollten ein erhöhtes Wachstum im Vergleich zu wildtypischen Pflanzen zeigen. Diese Methode wurde bereits von Canet *et al.* (2010) erfolgreich bei der Modellpflanze *A. thaliana* angewandt.

In der F₁-Generation der Linien 90H und 111H mit dem Zielgen *NtNPR1* der Mutagenese konnten durch die Bion-Behandlung keine bedeutend größeren Pflanzen identifiziert werden, welche sich von den restlichen Individuen abhoben. Eine Auswahl der größten Pflanzen wurde dennoch weiter analysiert. Durch Sequenzierung konnten von jeder Linie Individuen identifiziert werden, welche an der erwarteten Position eine Mutation trugen. Die Mutationen waren so lokalisiert, dass sie sich innerhalb der jeweils gewählten Zielsequenz befanden. Die Insertionen und Deletionen einzelner Nukleotide führten stets zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 64B; Abb. 71B; Abb. 72B), sodass von einem vorzeitigen Abbruch der Translation ausgegangen werden kann. Die Insertionen beziehungsweise Deletionen verursachten Änderungen im Restriktionsmuster. Es erfolgte die Eliminierung der *HindIII*-Schnittstelle im ersten Exon von *NPR1* der *N. tomentosiformis* (Nto) Variante und die Eliminierung der *NarI*

Schnittstelle im ersten Exon beider Elternarten von *N. tabacum* in Linie 111H. Von Pflanzen mit Mutationsereignissen wurden durch Selbstbestäubung Samen gewonnen und für die Charakterisierung der weiteren Generation verwendet. Für *NtNPR1* wurden insgesamt 77 Pflanzen mit Mutationen aus vier Transformationsereignissen und zwei Generationen analysiert. Für die Analyse wurde ein Teil der Pflanzen der Linie 90H mit Hilfe der enthaltenen *PR1a_{Pro}::GUS*-Reportergenkonstruktion und einem GUS-Enzymaktivitätstest auf Änderungen der Induktionsstärke des Reportergens nach Behandlung mit Salicylsäure getestet. Es wurden keine Änderungen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt. Dies deutet daraufhin, dass es zu keinen Veränderungen des Status des funktionellen NPR1 in Folge der Mutationen kam. Bei den weiteren untersuchten Pflanzen der Linie 90H und 111H wurde die Methode der Immunodetektion angewandt. In keinem Fall konnten bezüglich des Proteinbandenmusters von NPR1 durch den immunologischen Nachweis mit dem Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden. Es konnte ebenso keine deutliche Reduktion der *PR1*-Genexpression nach Induktion mit Salicylsäure, Bion oder *TMV*-Infektion im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 66; Abb. 67; Abb. 74; Abb. 78; Abb. 79). In Linie 90H ist aufgrund von Unterschieden innerhalb der *NPR1*-Sequenzen beider Elternarten von *N. tabacum* nur die *N. tomentosiformis*-Variante Ziel der Mutagenese gewesen. *NPR1* der *N. sylvestris* (Ns)-Variante ist davon nicht betroffen und bleibt wildtypisch. *NPR1* ist auch in Tabak ein konstitutiv exprimiertes Gen. Möglicherweise reicht das wildtypische *NsNPR1* aus, die erforderliche Menge an NPR1 zu gewährleisten und etwaige Auswirkungen der Mutagenese auszugleichen. In Linie 111H sind zwar beide Varianten von *NPR1* Ziel der Mutagenese gewesen, allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Mutagenese in den untersuchten F₁- und F₂-Generationen noch nicht zu hundert Prozent erfolgreich war. Der Anteil von 10% wildtypischer Sequenzen der untersuchten T-Vektor-Klone weist darauf hin. Die analysierten Sequenzen sind Amplifikate des ersten Exons von *NtNPR1* aus genomischer DNA der untersuchten Pflanzen der F₁-Generation der Linie 111H. Es könnte sein, dass diese geringen Mengen an verbliebenden, wildtypischen *NPR1* ausreichen, den Phänotyp des Wildtyps aufrechtzuerhalten.

Die Vorselektion der F₁-Generation der Linie 113H bot ein etwas anderes Bild als die der Linien 90H und 111H. Die Keimlinge der Bion-behandelten 113H-Linien waren zwar kleiner als die H₂O-behandelten Keimlinge der Kontrolllinie SNN, aber dennoch signifikant größer als die Bion-behandelten Kontrollkeimlinge. Die Pflanzen der Linie 113H zeigten kaum Spuren der Bion-Behandlung und waren sowohl im Aussehen als auch in der Größe homogen. Einige Individuen wurden für fortführende Analysezwecke ausgewählt. Durch Sequenzierung konnten auch für Linie 113H Individuen mit Mutationen an der erwarteten Stelle identifiziert werden. Die Mutationen waren innerhalb der gewählten Zielsequenz im ersten Exon von *NtNPR3* lokalisiert. Durch Insertion oder Deletion einzelner Nukleotide wurde die *PciI*-Schnittstelle in den Sequenzen beider Eltern von *N. tabacum* eliminiert und führte bei den Sequenzen der *N. sylvestris*-Variante zur Ausbildung vorzeitiger Stoppkodons (Abb. 84B). Innerhalb der Sequenzen der *N. tomentosiformis* Variante führte die Insertion von Nukleotiden in sechs von acht Fällen zur Änderung des Leserahmens, aber nicht zur

Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 85B). Die Mutation der *N. tomentosiformis*-Variante der Linie 113H-9/19 wurde in den *N. sylvestris* cDNA Klon von *NPR3* eingeführt und im heterologen Hefesystem getestet. Es konnte demonstriert werden, dass *NPR3* trotz Erhaltung des Leserahmens eine Veränderung der biochemischen Eigenschaften erfährt. Durch die Mutation erfolgten drei Aminosäureaustausche V145D S146L T147V und die Insertion der Aminosäuren R, F und R zwischen Position 147 und 148 unweit der BTB/POZ-Domäne von *NPR3*. *NPR3* ist nicht mehr in der Lage, mit wichtigen Interaktionspartnern wie NIMIN-Proteinen oder TGA-Transkriptionsfaktoren in Interaktion zu treten (Abb. 86). Durch den Verlust der Interaktionsfähigkeit ist anzunehmen, dass *NPR3* nicht länger funktionsfähig ist. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass mutante *NPR3*-Proteine ohne vorzeitigen Stoppkodon trotzdem nicht mehr funktionell sind. Der immunologische Nachweis von *NPR1* mit den Antikörpern α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 zeigte, dass die Mutagenese von *NPR3* weder in der F₁- noch in der F₂-Generation einen Effekt auf die Akkumulation von *NPR1* hat (Abb. 87, Abb. 92, Abb. 93). Die Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 konnten bei in Hefe exprimierten Proteinen zwischen Arabidopsis *NPR1* und Tabak *NPR1* spezifisch unterscheiden. Es konnte ebenso auch zwischen *NPR1* und den Paralogen klar differenziert werden. Bei Proteinen aus Pflanzenextrakten wurde jedoch eine Kreuzreaktion festgestellt. Die Antikörper α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 konnten nicht mehr zwischen den *NPR1*-Proteinen der Spezies *A. thaliana* und *N. tabacum* unterscheiden. Somit könnte auch die Möglichkeit in Betracht kommen, dass die Antikörper in Pflanzenextrakten auch zwischen *NPR1* und den Paralogen nicht differenzieren können. Der fehlende Effekt auf die Akkumulation von *NPR1* beziehungsweise *NPR3* könnte also daher rühren, dass sowohl *NPR1* als auch *NPR3* von α -GST-cT-NtNPR1 und α -AtNPR1 detektiert werden könnte. Eine Kreuzreaktion dieser Art ist nicht auszuschließen. Weiterhin ist es fraglich, ob selbst mit einem spezifischen Antikörper gegen NtNPR3 Unterschiede im *NPR3*-Status der Pflanzen nachgewiesen werden könnten. Bei 75% der analysierten Sequenzen der *N. tomentosiformis*-Variante von *NPR3* wurde keine Ausbildung vorzeitiger Stoppkodons festgestellt, sondern eine Verschiebung des Leserahmens. Daraus kann geschlossen werden, dass ein wesentlicher Anteil von mutantem *NPR3* translatiert wird ungeachtet dessen, ob es sich um ein funktionelles Protein handelt oder nicht. Mit dem immunologischen Nachweis kann allerdings nicht zwischen einem defekten und einem funktionellen Protein differenziert werden. Das könnte auch ein möglicher Grund sein, weswegen bei Linie 111H keine Unterschiede im Proteinbandenmuster von *NPR1* zwischen den Wildtypkontrollen und den Mutanten gefunden wurden. Es konnten zwar anhand der Sequenzierungen nur Fälle mit vorzeitigen Stoppkodons identifiziert werden, allerdings konnte mit der Methode die Gesamtheit der Mutationsvarianten nicht abgedeckt werden. Die Grundlagen der Sequenzierungsergebnisse bilden einzelne ausgesuchte T-Vektor-Klone, wobei die enthaltenen Sequenzen aus genomischer DNA der entsprechenden Pflanzen durch PCR gewonnen wurden. Die identifizierten Mutationsvarianten sind also nur beispielhaft, sodass es möglich ist, dass auch bei Linie 111H mutante *NPR1*-Varianten ohne vorzeitiges Stoppkodon existieren.

Nach Induktion mit Salicylsäure konnte in der F₁-Generation keine Reduktion der Akkumulation von PR1 bei Pflanzen der Linie 113H im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 87). In der F₂-Generation konnten jedoch bei einzelnen Individuen verschiedener Linien (113H-3/1, 113H-3/3, 113H-5/9) deutliche Reduktionen der PR1 Akkumulation nach Induktion im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abb. 92). Die Reduktionen variierten in ihrer Ausprägung zwischen dem eingesetzten Induktor (Salicylsäure, Bion), dem Entnahmeort sowie dem Entnahmezeitpunkt der Probe. Die Stärke der Reduktion der PR1-Akkumulation nach Induktion durch Salicylsäure beziehungsweise Bion war nicht bei allen untersuchten Pflanzen deckungsgleich. Allerdings gab es Individuen, welche bei beiden Induktoren eine ähnliche Stärke der Reduktion aufwiesen (Abb. 93). Die Ausprägung der Reduktion der PR1-Akkumulation variierte auch zwischen den Entnahmezeitpunkten der Proben. Bei diesem Experiment traten auch Individuen auf, welche zu den Entnahmezeitpunkten ungefähr dieselbe Reduktion der Stärke der PR1-Akkumulation aufwiesen (Abb. 94). Einige dieser Pflanzen wurden anschließend mit *TMV* infiziert. Anhand der Infektion konnte gezeigt werden, dass die Expression von *PR1* im lokalen Gewebe nahe den Nekrosen durch die Mutation von *NPR3* nicht beeinflusst wurde. Wohingegen die Induktion der *PR1*-Expression in uniniziertem Gewebe bei einigen Individuen deutlich verringert wurde (Abb. 95), welche auch schon im Vorfeld nach Induktion mit Bion eine reduzierte Akkumulation von PR1 aufwiesen. Interessant ist hierbei, dass es sich um eine *NPR3* Mutante handelt, welche einen Effekt auf die Akkumulation von PR1-Proteinen zeigt. Eigentlich wird das als *NPR1* identifizierte Protein mit der Induktion der *PR1*-Gene in Verbindung gebracht.

Das Auftreten einzelner Pflanzen mit reduzierter PR1-Akkumulation in der F₂ Generation lässt darauf schließen, dass die Mutagenese mittels CRISPR/Cas9 noch nicht abgeschlossen ist. Bei *N. tabacum* handelt es sich schließlich um eine tetraploide Spezies. Die Aussaat von Samen der F₁-Generation auf selektivem MS-Medium mit Kanamycin zeigte, dass die Mehrheit der Linien in der F₂-Generation weiterhin Kanamycin-resistent ist und die Keimlinge auf dem Medium wachsen konnten. Diese Linien müssten weiterhin über die CRISPR/Cas9-Konstruktion verfügen, sodass in den nächsten Generationen noch weitere Änderungen bezüglich der PR1-Akkumulation oder weiterer phänotypischer Merkmale möglich sein können. Wenige Linien wie die Linien 113H-3/1 und 113H-4/7 reagierten sensitiv auf Kanamycin. Vermutlich tragen diese Linien die CRISPR/Cas9-Konstruktion nicht mehr, sodass hier bezüglich des Phänotyps keine Änderungen mehr zu erwarten sind (Abb. 88; Abb. 89).

Nach Vorselektion der Linie 118H durch die vierwöchige Bion-Behandlung wurden zwei von fünf Linien aussortiert, da diese sich von den Kontrollen nicht unterschieden. Die Keimlinge der drei verbliebenen Linien waren größer als die Bion-behandelten Kontrollpflanzen. Mitunter gab es Pflanzen, welche wesentlich größer waren und sich vom Rest abhoben. Eine Auswahl dieser Keimlinge wurde für weitere Analysezwecke verwendet. In Linie 118H sind die Zielgene der Mutagenese *NtNPR1* und *NtNPR3*. Innerhalb beider Elternvarianten konnten in *NPR1* durch Sequenzierung Mutationen im ersten Exon an der durch die Zielsequenz vorgegebenen Stelle identifiziert werden. Durch Insertion oder

Deletion einzelner Nukleotide kam es zur Zerstörung der *NarI*-Schnittstelle und zur Verschiebung des Leserahmens verbunden mit der Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons (Abb. 99B; Abb. 100B). Innerhalb des ersten Exons von *NtNPR3* konnten ebenfalls an der vorgegebenen Stelle in den Sequenzen beider Eltern-Varianten Mutationen identifiziert werden, wodurch die *PciI*-Schnittstelle eliminiert wurde. Die Deletion oder Insertion einzelner Nukleotide führte ebenso wie bei Linie 113H in den meisten Fällen nicht zur Bildung eines vorzeitigen Stoppkodons, sondern zur Änderung des Leserahmens (Abb. 102B; Abb. 103B). Hinsichtlich der F₂-Generation der Linie 118H ist es nun interessant, ob ähnlich der Linie 113H ebenfalls einzelne Individuen mit reduzierter PR1-Akkumulation nach Induktion zu beobachten sind. Des Weiteren ist es interessant, ob es möglicherweise zu weiteren phänotypischen Effekten kommt, da es sich um eine *npr1npr3* Doppelmutanten-Linie handelt.

5.5 Übernimmt NPR3 die Funktion des positiven Regulators der SAR in Tabak?

Auf Sequenzebene weist *NtNPR1* eine höhere Ähnlichkeit zu *AtNPR1* auf als zu *NtNPR3*. Aufgrund dieser hohen Homologie wurde vermutet, dass *NtNPR1* in Tabak die Rolle des positiven Regulators der SAR übernimmt wie *AtNPR1* in Arabidopsis. *NtNPR3* hingegen besitzt höhere Sequenzhomologien zu *AtNPR3*. Beide Tabak NPR-Proteine verfügen über eine ähnliche Domänenstruktur wie sie auch bei *AtNPR1* und *AtNPR3* zu finden ist. Anders als in Arabidopsis, wo die Interaktion mit NIMIN-Proteinen einzigartig für *AtNPR1* ist, können sowohl *NtNPR1* als auch *NtNPR3* mit NIMIN1- und NIMIN2-Proteinen interagieren. Beide Tabak NPR-Proteine können TGA-Transkriptionsfaktoren binden. Neben einigen Gemeinsamkeiten zwischen *NtNPR1* und *NPR3* unterscheiden sich die Tabak NPR-Proteine aber auch in ihren biochemischen Eigenschaften. Die Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren an *NtNPR3* ist im Gegensatz zu *NtNPR1* moderat Salicylsäure-sensitiv. Die Transkriptionsaktivität in Hefe als GAL4-BD-Fusion, welche in Anwesenheit von Salicylsäure steigerbar ist, ist einzigartig für *NtNPR1*. Bislang konnte in Hefe für kein weiteres Mitglied der Proteinfamilie von Tabak und Arabidopsis mit ähnlicher Domänenstruktur ein solches Transaktivierungspotential gemessen werden. Die C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Bindedomäne von *NtNPR1* können ähnlich wie die C-terminalen Domänen von *AtNPR3* in Anwesenheit von Salicylsäure assoziieren. Diese Art von induzierter Affinität kann hingegen bei den C-terminalen Domänen LENRV-Domäne und NIMIN-Domäne weder bei *AtNPR1* noch bei *NtNPR3* beobachtet werden. Anhand von chimären Interaktionen konnte für beide NPR-Proteine gezeigt werden, dass die LENRV-Domäne entscheidend für die fehlende Affinität zwischen den C-terminalen Domänen ist. Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen *NtNPR1* und *NtNPR3* ist die Fähigkeit zur Bildung ternärer Komplexe. Tabak *NPR1* kann keine ternären Komplexe zusammen mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren bilden. Die ternären Komplexe, wie *AtNPR1* sie bilden kann, sind allerdings wichtig für die Regulation der Induktion der *PR1a*-Genexpression. Für Tabak *NPR3* gibt es jedoch Hinweise auf die Fähigkeit, ternäre Komplexe bilden zu können, welche in Anwesenheit von Salicylsäure instabil sind (D.Neeley&U.M.Pfützner, persönliche Mitteilung). Der Vergleich der biochemischen Eigenschaften der

NPR1 und NPR3 Proteine von Tabak und Arabidopsis zeigt, dass NtNPR3 AtNPR1 mehr ähnelt als NtNPR1 und dass NtNPR1 eine gewisse Ähnlichkeit zu Arabidopsis NPR3 aufweist.

Die Charakterisierung der durch CRISPR/Cas9 erzeugten Mutanten der Zielgene *NPR1* und *NPR3* in *N. tabacum* unterstützt dabei das Ergebnis des Vergleichs der biochemischen Eigenschaften. Bei der Analyse von Mutanten mit *NPR1* als Zielgen konnte in keinem Fall eine Reduktion der Akkumulation von PR1 nach Induktion durch Salicylsäure, Bion oder *TMV*-Infektion festgestellt werden, obwohl die *PR1*-Expression von NPR1 abhängt. Dagegen konnte in einigen Individuen der F₂-Generation von *npr3* Mutanten eine deutlich reduzierte Akkumulation von PR1 im Vergleich zu den Kontrollpflanzen nach Induktion beobachtet werden. Die Reduktion der PR1-Akkumulation war in den meisten Fällen reproduzierbar. NtNPR1 vermag zwar über eine höhere Sequenzhomologie zu AtNPR1 verfügen, allerdings kann durch den Vergleich biochemischer Eigenschaften eine größere funktionelle Ähnlichkeit von AtNPR1 zu NtNPR3 festgestellt werden. Die Ergebnisse der Analyse der CRISPR/Cas9 erzeugten *npr1* und *npr3* Mutanten liefern einen weiteren wichtigen Hinweis darauf, dass NtNPR3 der eigentliche funktionelle positive Regulator der SAR in Tabak sein könnte und nicht wie zuerst vermutet NtNPR1.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit die biochemischen Eigenschaften der Mitglieder der NPR-Proteinfamilie sowohl von Arabidopsis als auch von Tabak näher charakterisiert werden. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass Salicylsäure auf alle untersuchten NPR-Proteine eine direkte Wirkung zeigt. Weiterhin konnte demonstriert werden, dass neben Salicylsäure auch weitere strukturelle Analoga eine direkte Wirkung auf die jeweiligen NPR-Proteine zeigten. Dabei waren besonders dichlorierte Derivate der Benzoesäure äußerst wirksam. Eine Ausnahme bildet jedoch Arabidopsis NPR4, welches sehr spezifisch für Salicylsäure ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit sowie der Studie von Ding *et al.* (2018) unterstützen das Modell nach Maier *et al.* (2011) und Hermann *et al.* (2013). Die Wahrnehmung der Salicylsäure erfolgt über das Arg⁴³² im C-Terminus von AtNPR1. Die *PR1*-Genexpression wird dabei stringent durch Derepression kontrolliert. Arabidopsis NPR1 ist wie AtNPR3 und AtNPR4 ein Rezeptor der Salicylsäure. Die Bindung von Salicylsäure wird nicht, wie von Wu *et al.* (2012) postuliert, durch Kupfer-gebundene Cys^{521/529} vermittelt, sondern durch Arg⁴³². Das Arginin im C-terminalen LENRV-Motiv ist im Gegensatz zu Cys^{521/529} innerhalb der Paralogen in Arabidopsis sowie in NPR-Proteinen anderer Pflanzenspezies wie Tabak konserviert. Ding *et al.* (2018) konnten auch für Arabidopsis NPR4 demonstrieren, dass die Bindung der Salicylsäure über Arg⁴¹⁹ vermittelt wird. Das unterstützt die Ergebnisse der Versuche der Salicylsäure-Sensitivität im heterologen Hefesystem dieser Arbeit. Für AtNPR2, AtNPR3 und NtNPR3 konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Salicylsäure-Sensitivität vom Arginin der LENRV-ähnlichen Domänen abhängt.

Die Rolle der Paralogen AtNPR3 und AtNPR4 in der Pflanze konnte in dieser Arbeit durch die Versuche im heterologen Hefesystem nicht geklärt werden. Dennoch konnten die erzielten Ergebnisse Hinweise darauf liefern, dass die Paralogen von NPR1 möglicherweise in weitere regulatorische Funktionen involviert sind, jedoch keine redundanten Funktionen von NPR1 einnehmen. In der Studie von Ding *et*

192

al. (2018) werden Arabidopsis NPR3 und NPR4 die Funktion als transkriptionelle Co-Repressoren von Salicylsäure-induzierbaren Genen zugeschrieben, welche redundant und unabhängig von AtNPR1 ausgeübt wird. *npr3npr4* Doppelmutanten zeigen keinen Effekt auf die Induzierbarkeit von *PR*-Genen durch Salicylsäure, allerdings ist neben einer gesteigerten basalen *PR1*-Genexpression auch eine erhöhte Resistenz zu beobachten. Dies deutet auf eine Rolle in der negativen Regulation der pflanzlichen Abwehr hin (Zhang *et al.*, 2006). Die postulierte Funktion als Repressoren für NPR3 und NPR4 wird mit dem C-terminalen EAR-ähnlichen Motiv in Verbindung gebracht. Arabidopsis NPR1 verfügt als Co-Aktivatoren nicht über ein solches repressorisches Motiv (Ding *et al.*, 2018). Allerdings scheint das Fehlen des EAR-ähnlichen Motivs im C-Terminus von NPR1 nur für Mitglieder der Familie *Brassicaceae* spezifisch zu sein. Tabak NPR1 und NPR3 sowie alle Tomatengene mit hoher Homologie zu *AtNPR1* verfügen beispielsweise ebenfalls über ein EAR-ähnliches Motiv wie es für Arabidopsis NPR3 und NPR4 beschrieben wurde. Eine weitere Besonderheit der *Brassicaceae* ist das Mitglied der NIMIN-Proteinfamilie NIMIN3. Bislang konnte außerhalb dieser Pflanzenfamilie kein NIMIN3 homologes Gen identifiziert werden (Zwicker *et al.*, 2007). NIMIN3 übernimmt die Funktion des negativen Regulators von NPR1 bei basalem Salicylsäurespiegel. Es ist denkbar, dass das EAR-ähnliche Motiv die negativ-regulatorische Funktion von NIMIN3 übernimmt, da außerhalb der Pflanzenfamilie der *Brassicaceae* kein homologes *NIMIN3*-Gen bekannt ist. Die Inaktivierung der Repressordomäne könnte dabei durch Salicylsäure-induzierte Konformationsänderungen der NPR1-Homologen erfolgen. Diese Annahme, sowie der etwaige Mechanismus der Inaktivierung der Repressordomäne der NPR1-Homologen müsste in fortführenden Versuchen untersucht werden.

Nicht zuletzt konnten durch die Untersuchung der NPR-Proteine *in planta* von Tabak durch CRISPR/Cas9 generierte Mutanten neue Erkenntnisse bezüglich der funktionellen Bedeutung gewonnen werden. Unterstützt durch die vergleichende Auswertung von Protein-Protein-Interaktionsstudien in Hefe liegt die Vermutung nahe, dass NtNPR3 das funktionelle NPR1 in Tabak ist. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass NtNPR3 die Rolle des positiven Regulators der SAR in Tabak übernimmt und nicht, wie aufgrund von höheren Sequenzhomologien zwischen AtNPR1 und NtNPR1 angenommen, Tabak NPR1. Natürlich muss diese Annahme in fortführenden Versuchen genau geprüft werden. Beispielsweise könnte in Hefe die Fähigkeit von NtNPR3 zur Bildung ternärer Komplexe genau untersucht werden. Die Linie 113H könnte hinsichtlich einer Linie mit deutlich reduzierter oder ganz unterbundenen PR1-Akkumulation nach Induktion etabliert werden. Anhand einer solchen stabilen Linie könnte die Funktion von NtNPR3 und etwaigen phänotypischen Auswirkungen *in planta* genauer untersucht werden. Weiterführend könnte beispielsweise versucht werden, die *npr3* Mutante durch Expression von wildtypischen *NtNPR3* zu komplementieren und so die Fähigkeit zur PR1-Akkumulation wiederherzustellen.

Zusammenfassung

Ein wichtiger Schutzmechanismus der Pflanze gegen biotrophe Pathogene ist die systemisch aktivierte Resistenz (SAR). Die Akkumulation von PR-Proteinen in distalem, unifiziertem Blattgewebe ist ein Hauptmerkmal der SAR. Die Expression von *PR1*-Genen in Tabak (Nt) und Arabidopsis (At) wird durch Salicylsäure (SA) induziert. NPR1 ist das zentrale Regulatorprotein der SAR. Im Zusammenspiel mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren wird die Induktion der *PR1*-Genexpression SA-abhängig durch NPR1 kontrolliert. NIMIN-Proteine wirken als negative Regulatoren auf die *PR1*-Genexpression, während TGA-Transkriptionsfaktoren die Bindung an SA-responsive *cis*-aktive *asl*-ähnliche Elemente der *PR1*-Promotoren vermitteln. Die Wahrnehmung von SA erfolgt im C-Terminus von NPR1. Dort findet die SA-sensitive Bindung von NIMIN1 (N1) und NIMIN2 (N2) über die N1/2-Bindedomäne statt und das Arginin im konservierten LENRV-Motiv ist maßgeblich an der Wahrnehmung der SA beteiligt. Die Mutation des Arginins führt in AtNPR1 und NtNPR1 zur Aufhebung der SA-Sensitivität der NIMIN-Bindung. Die konservierten Phenylalanine Phe^{507/508} in AtNPR1 und Phe^{505/506} in NtNPR1 in der N1/2-Bindedomäne sind wichtig für die Bindung von NIMIN-Proteinen. Die Mutation der Phenylalanine führt zur Inhibierung der NIMIN-Bindung. Arabidopsis weist noch drei weitere Mitglieder der NPR-Proteinfamilie mit derselben Domänenstruktur wie NPR1 auf: AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4. In Tabak gibt es nur NtNPR1 und NtNPR3. Für AtNPR3, AtNPR4 und NtNPR3 sind ebenfalls SA-abhängige Reaktionen in Hefe bekannt. Während die Bindung von NIMIN2-Proteinen an den C-Terminus von NtNPR3 negativ durch SA beeinflusst wird, reagiert der C-Terminus von AtNPR3 und AtNPR4 mit einer strukturellen Umlagerung auf SA. Die C-terminalen Domänen LENRV-ähnliche-Domäne und N1/2-Bindedomäne besitzen eine SA-induzierte Affinität zueinander. Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Funktion von NPR1 und seine Homologen und Paralogen in Arabidopsis und Tabak bei der SA-abhängigen Genexpression, beim Mechanismus der SA-Wahrnehmung sowie der Signaltransduktion zu gewinnen. Für die Analyse der biochemischen Eigenschaften der At und Nt NPR-Proteine fand das heterologe Hefesystem Anwendung. Die Bedeutung der NtNPR-Proteine *in planta* wurde anhand von CRISPR/Cas9 erzeugten Mutanten analysiert. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

1. Für AtNPR2 konnte ebenfalls eine SA-abhängige Reaktion gezeigt werden. Die spontane Interaktion mit TGA-Transkriptionsfaktoren der Klassen II und III wird durch SA signifikant verstärkt. Besonders deutlich ist der Effekt unter Beteiligung von AtTGA7.
2. Das Arginin im LENRV-ähnlichen Motiv der At und Nt NPR-Proteine ist maßgeblich an der Wahrnehmung von SA beteiligt. Die Mutation des Arginins unterbindet die SA-abhängigen Reaktionen der At und Nt NPR-Proteine völlig, ohne dabei weitere biochemische Eigenschaften der

Proteine zu verändern. Die Mutante K418R R419K in AtNPR4 zeigt, dass das Arginin nicht durch ein benachbartes Arginin ersetzbar ist, sondern die Position ebenso eine wichtige Rolle spielt.

3. Die SA-abhängigen Reaktionen der untersuchten At und Nt NPR-Proteine sind auch durch strukturelle Analoga der SA induzierbar. Besonders potent erwiesen sich die dichlorierten Verbindungen 3,5-Dichloranthranilsäure (3,5-DCA) und 3,5-Dichlorbenzoesäure, aber auch BTH (Benzothiadiazol-S-Methyl-Ester) und INA (2,6-Dichlorisonicotinsäure), bekannte Induktoren der *PR1*-Genexpression, zeigten eine direkte Wirkung auf NPR-Proteine. Eine Ausnahme bildet AtNPR4. Als einziges Mitglied der Proteinfamilie ist AtNPR4 spezifisch für SA. Anhand von IC₅₀ bzw. EC₅₀-Werten konnte gezeigt werden, dass Nt NPR-Proteine sensitiver auf SA reagieren als At NPR-Proteine und 3,5-DCA wirksamer als SA ist.
4. Die Paralogen AtNPR2, AtNPR3 und AtNPR4 können vergleichbar stark wie AtNPR1 mit TGA-Transkriptionsfaktoren der Klassen II und III in Interaktion treten. Die Interaktionen sind mit Ausnahme von AtNPR2 insensitiv gegenüber SA. Allerdings sind die Paralogen trotz konservierter N1/2-Bindedomäne im C-Terminus nicht in der Lage, mit Mitgliedern der NIMIN-Proteinfamilie zu interagieren. Die Bindung von NIMIN-Proteinen und die Bildung ternärer Komplexe mit NIMIN-Proteinen und TGA-Transkriptionsfaktoren ist einzigartig für AtNPR1.
5. Die Aminosäuren Tyr⁵⁰⁸ Phe⁵⁰⁹ innerhalb der N2-Bindedomäne von NtNPR3 sind für die Bindung der NIMIN2-Proteine essentiell. Der Austausch Y508S F509S unterbindet die NIMIN2-Bindung völlig. Auch für die Affinität der C-terminalen Domänen von AtNPR3 sind die analogen Aminosäuren Phe^{502/503} wichtig. Der Aminosäureaustausch F502/503S unterbindet die Interaktion.
6. Chimäre Interaktionen zeigten, dass die LENRV-Domäne im Fall von NtNPR3 entscheidend dafür ist, dass eine SA-abhängige strukturelle Umlagerung des C-Terminus von NtNPR3 genauso wie bei AtNPR1 nicht möglich ist. Ein Vergleich weiterer bekannter biochemischer Eigenschaften legt somit eine größere funktionale Ähnlichkeit von AtNPR1 zu NtNPR3 als zu NtNPR1 nahe.
7. Die Analyse von mittels CRISPR/Cas9 erzeugten Mutanten in *NtNPR1* und *NtNPR3* zeigte, dass an den gewünschten Stellen im ersten Exon der Zielgene Deletionen und Insertionen eingebracht wurden, welche zum Abbruch der Translation oder zur Veränderung des Leserahmens führten. Obwohl die Expression der *PR1*-Gene von NPR1 abhängt, konnte keine Reduktion der PR1-Akkumulation nach Induktion bei Pflanzen mit mutiertem *NtNPR1*-Gen beobachtet werden. Individuen mit *NtNPR3* als Zielgen der Mutagenese zeigten dagegen in der F₂-Generation unabhängiger Linien nach Induktion eine signifikante Reduktion der PR1-Akkumulation. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der biochemischen Analyse.

At und Nt NPR1 und weitere NPR-Familienmitglieder sind SA-sensitiv. Das Arginin im LENRV-ähnlichen Motiv vermittelt die Wahrnehmung von SA. Allerdings wirkt nur AtNPR1, nicht die Paralogen, als positiver Regulator der SAR. In Tabak ist NPR3 vermutlich das funktionale Homolog zu AtNPR1, obwohl NtNPR1 eine höhere Sequenzähnlichkeit zu AtNPR1 aufweist.

Summary

Systemic acquired resistance (SAR) is an important mechanism for plants to protect themselves against biotrophic pathogens. The main characteristic of SAR is the accumulation of PR proteins in non-infected, distal leaf tissues. The expression of *PR1* genes in tobacco (Nt) and Arabidopsis (At) is induced by salicylic acid (SA). NPR1 is the central regulatory protein of SAR. In cooperation with NIMIN proteins and TGA transcription factors, NPR1 controls the induction of *PR1* gene expression dependent on SA. NIMIN proteins function as negative regulators of *PR1* gene expression, whereas TGA transcription factors mediate binding to SA responsive *cis*-acting *as1*-like elements of *PR1* promoters. The perception of SA occurs at the C-terminus of NPR1, where SA sensitive binding of NIMIN1 (N1) and NIMIN2 (N2) proteins takes place at the N1/2 binding domain. The arginine within the conserved LENRV motif is significantly involved in the perception of SA. Mutation of the arginine leads to loss of SA sensitivity of NIMIN binding to AtNPR1 and NtNPR1. The conserved phenylalanine residues within the N1/2 binding domain, Phe^{507/508} in AtNPR1 and Phe^{505/506} in NtNPR1, are essential for the binding of NIMIN proteins. Mutation of the phenylalanines inhibits the NIMIN binding. Arabidopsis possesses three other NPR protein family members with a similar domain structure as NPR1: AtNPR2, AtNPR3 and AtNPR4. In tobacco, only NtNPR1 and NtNPR3 exist. SA dependent reactions for AtNPR3, AtNPR4 and NtNPR3 in yeast are also known. While the NIMIN2 binding to the NtNPR3 C-terminus is negatively affected by SA, the C-termini of AtNPR3 and AtNPR4 respond to SA with a structural rearrangement. The C-terminal domains LENRV-like domain and N1/2 binding domain exhibit a SA inducible affinity to each other. The aim of this work was to obtain new insights of the function of NPR1 and its homologues and paralogues in Arabidopsis and tobacco regarding the SA dependent gene expression, the mechanism of SA perception and signal transduction. The heterologous yeast system was applied for the analysis of the biochemical properties of At and Nt NPR proteins. The relevance of Nt NPR proteins *in planta* was analyzed by using CRISPR/Cas9 generated mutants. The following results were obtained:

1. A SA dependent reaction for AtNPR2 could be shown. The spontaneous interaction with TGA transcription factors of clades II and III is reinforced in a SA dependent manner. The effect is particularly visible under the participation of AtTGA7.
2. The arginine within the LENRV-like motifs of At and Nt NPR proteins is substantially involved in SA perception. Mutation of the arginine leads to a total loss of the SA dependent reactions of At and Nt NPR proteins, without changing further biochemical capabilities. As shown by the mutant K418R R419K in AtNPR4, the position of the arginine is very important and is not replaceable by an adjacent arginine.

3. SA dependent reactions of the analyzed At and Nt NPR proteins are also inducible by structural analogues of SA. Especially dichlorinated compounds like 3,5 dichloroanthranilic acid (3,5 DCA) and 3,5 dichlorobenzoic acid proved to be very potent, but also BTH (benzothiadiazole) and INA (2,6-dichloroisonicotinic acid), known inducers of *PR1* gene expression, show direct effects on NPR proteins. AtNPR4 is an exception. It is the only member of the protein family that is specific for SA. IC_{50} and EC_{50} values indicate that NtNPR proteins are more sensitive to SA than AtNPR proteins and that 3,5 DCA is more effective than SA.
4. The paralogues AtNPR2, AtNPR3 and AtNPR4 can interact with TGA transcription factors of clades II and III as strongly as AtNPR1. With exception of AtNPR2, the interactions are insensitive to SA. However, the paralogues are not able to interact with members of the NIMIN protein family in spite of a conserved N1/2 binding domain in the C-termini. Binding to NIMIN proteins and forming ternary complexes with NIMIN proteins and TGA transcription factors are unique to AtNPR1.
5. The amino acids Tyr⁵⁰⁸ and Phe⁵⁰⁹ within the N2 binding domain of NtNPR3 are essential for NIMIN2 binding. The exchange Y508S F509S entirely prevents NIMIN2 binding. The analogous amino acids Phe^{502/503} are important for the affinity of the C-terminal domains of AtNPR3 as well. The amino acid exchange F502/503S prevents the interaction.
6. Chimeric interactions show that the LENRV domain of NtNPR3 is pivotal for the C-terminus to rearrange in response to SA as found previously for AtNPR1. Thus, the comparison of other known biochemical characteristics suggests a higher functional similarity of AtNPR1 to NtNPR3 than to NtNPR1.
7. Analysis of *NtNPR1* and *NtNPR3* mutants generated by CRISPR/Cas9 shows that deletions and insertions were introduced at specific positions within the first exon of the target genes, which result in breakdown of translation or transition of the open reading frame. Although *PR1* gene expression is dependent on *NtNPR1*, reduction of accumulation of PR1 proteins was not observed after induction in plants with mutated *NtNPR1* gene. In contrast, individuals with *NtNPR3* as target gene for mutagenesis show a significant reduction of PR1 accumulation in independent lines of the F₂ generation after induction. These results are in accordance with the biochemical analysis.

At and Nt NPR1 proteins and other NPR family members are sensitive to SA. The arginine within the LENRV-like domain mediates the perception of SA. In fact, only AtNPR1 and not its paralogues functions as a positive regulator of SAR. In tobacco, NPR3 is probably the functional homologue of AtNPR1, even though NtNPR1 exhibits a higher sequence similarity to AtNPR1.

Literaturverzeichnis

Agrawal, A.A., Fishbein, M., Jetter, R., Salminen, J.P., Goldstein, J.B., Freitag, A.E., and Sparks, J.P. (2009). Phylogenetic ecology of leaf surface traits in the milkweeds (*Asclepias* spp.): chemistry, ecophysiology, and insect behavior. *New Phytol.* **183**: 848-67.

Alves, M.S., Dadalto, S.P., Goncalves, A.B., De Souza, G.B., Barros, V.A., and Fietto, L.G. (2013). Plant bZIP transcription factors responsive to pathogens: a review. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 7815–7828.

Antoniw, J.F., Ritter, C.E., Pierpoint, W.S., and Van Loon, L.C. (1980). Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *J. Gen. Virol.* **47**: 79–87.

Aravind, L., and Koonin, E.V. (1999). Fold prediction and evolutionary analysis of the POZ domain: Structural and evolutionary relationship with the potassium channel tetramerization domain. *J. Mol. Biol.* **285**: 1353–1361.

Arimura, G.I., Matsui, K., and Takabayashi, J. (2009). Chemical and molecular ecology of herbivore-induced plant volatiles: proximate factors and their ultimate functions. *Plant Cell Physiol.* **50**: 911-923.

Attaran, E., Zeier, T.E., Griebel, T., and Zeier, J. (2009). Methyl salicylate production and jasmonate signaling are not essential for systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 954–971.

Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369–377.

Baker, B., Zambryski, P., Stascawicz, B., and Dinesh-Kumar, S.P. (1997). Signaling in plant-microbe interactions. *Science* **276**: 726-733.

Bari, R., and Jones, J.D. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* **69**: 473-488.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.

Bardwell, V.J., and Treisman, R. (1994). The POZ domain: A conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.* **8**: 1664–1677.

Bartel, P.L., Chien, C.-T., Sternglanz, R., and Fields, S. (1993). Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *cellular interactions in Development: A Practical Approach*, ed. Hartley, D.A. (Oxford University Press, Oxford), 153-179.

Bartels, S., and Boller, T. (2015). Quo vadis, Pep? Plant elicitor peptides at the crossroads of immunity, stress, and development. *J. Exp. Bot.* **66**: 5183–5193.

Bäuscher, C. (2000). Überexpression und Reinigung des NPR1-Proteins und der NIMIN-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* für in vitro Protein/Protein-Bindungsstudien und die Herstellung von Antiseren. Diplomarbeit, Universität Hohenheim.

Bektas, Y., and Eulgem, T. (2015). Synthetic plant defense elicitors. *Front. Plant Sci.* **5**: 804. doi:10.3389/fpls.2014.00804

Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D.S., and Ryan, C.A. (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1756–1760.

- Bétermier, M., Bertrand, P., Lopez, B. S., and Jinks-Robertson, S.** (2014). Is non-homologous end-joining really an inherently error-prone process? *PLoS Genet.* **10**: e1004086.
- Bhaya, D., Davison, M., and Barrangou, R.** (2011). CRISPR–Cas systems in bacteria and archaea: Versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu. Rev. Genet.* **45**: 273–297.
- Bi, Y.M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R., and Draper, J.** (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* **8**: 235–245.
- Blander, J.M., and Sander, L.E.** (2012). Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat. Rev. Immunol.* **12**: 215–225.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R.** (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 396–403.
- Boerjan, W., Cervera, M.-T., Delarue, M., Beeckman, T., Dewitte, W., Bellini, C., Caboche, M., Onckelen, H.V., Montagu, M.V., and Inze, D.** (1995). Superroot, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**: 1405–1419.
- Boller, T., and He, S.Y.** (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* **324**: 742–744.
- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379–406.
- Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Dusko, S.** (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiol.* **151**: 2551–2561.
- Bonardi, V.; Cherkis, K.; Nishimura, M.T.; and Dangl, J.L.** (2012). A new eye on NLR proteins: Focused on clarity or diffused by complexity? *Curr. Opin. Immunol.* **24**: 41–50.
- Bork, P.** (1993). Hundreds of Ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: Mobile modules that cross phyla horizontally? *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **17**: 363–374.
- Boutrot, F., and Zipfel, C.** (2017). Function, discovery, and exploitation of plant pattern recognition receptors for broad-spectrum disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**: 257–286.
- Boyle, P., Le Su, E., Rochon, A., Shearer, H.L., Murmu, J., Chu, J.Y., Fobert, P.R., and Després, C.** (2009). The BTB/POZ domain of the Arabidopsis disease resistance protein NPR1 interacts with the repression domain of TGA2 to negate its function. *Plant Cell* **21**: 3700–3713.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248–254.
- Canet, J.V., Dobón, A., Roig, A., and Tornero, P.** (2010). Structure-function analysis of npr1 alleles in Arabidopsis reveals a role for its paralogs in the perception of salicylic acid. *Plant, Cell & Environ.* **33**: 1911–1922.
- Catanzariti, A., Dodds, P., Lawrence, G., Ayliffe, M., and Ellis, J.** (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* **1**: 243–256.
- Catanzariti, A., Dodds, P., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J., and Staskawicz, B.** (2010). The AvrM effector from flax rust has a structured C-terminal domain and interacts directly with the M resistance protein. *Mol. Plant-Microbe-Interact.* **1**: 49–57.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.** (1994). Characterization of an Arabidopsis mutant that is non-responsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583–1592.

- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**: 57–63.
- Cao, H., Li, X., and Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by over-expression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6531–6536.
- Caplan, J., Padmanabhan, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2008). Plant NB-LRR immune receptors: from recognition to transcriptional reprogramming. *Cell Host Microbe* **3**: 126–35.
- Carr, J.P., Dixon, D.C., and Klessig, D.F.** (1985). Synthesis of pathogenesis-related proteins in tobacco is regulated at the level of mRNA accumulation and occurs on membrane-bound polySomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7999–8003.
- Carr J.P., and Klessig, D.F.** (1989). The pathogenesis-related proteins of plants. *Genetic Engineering; principles and methods* **11**: 65–109.
- Casper-Lindley, C., Dahlbeck, D., Clark, E.T., and Staskawicz, B.J.** (2002). Direct biochemical evidence for type III secretion-dependent translocation of the AvrBs2 effector protein into plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 8336–8341.
- Catinot, J., Buchala, A., Abou-Mansour, E., and Métraux, J.P.** (2008). Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* **582**: 473–478.
- Chanda, B., Venugopal, S.C., Kulshrestha, S., Navarre, D.A., Downie, B., Vaillancourt, L., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2008). Glycerol-3-phosphate levels are associated with basal resistance to the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum higginsianum* in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**: 2017–2029.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M.K., Yu, K., Sekine, K.T., Gao, Q.M., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nat. Genet.* **43**: 421–427.
- Chern, M.-S., Fitzgerald, H.A., Yadav, R.C., Canlas, P.E., Dong, X. and Ronald, P.C.** (2001). Evidence for a disease-resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signaling pathway in Arabidopsis. *Plant J.* **27**: 101–113.
- Chern, M., Fitzgerald, H.A., Canlas, P.E., Navarre, D.A. and Ronald, P.C.** (2005a). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **18**: 511–520.
- Chern, M., Canlas, P.E., Fitzgerald, H.A. and Ronald, P.C.** (2005b). Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with Arabidopsis NPR1 and rice NH1. *Plant J.* **43**: 623–635.
- Chern, M., Canlas, P.E. and Ronald, P.C.** (2008). Strong suppression of systemic acquired resistance in Arabidopsis by NRR is dependent on its ability to interact with NPR1 and its putative repression domain. *Mol. Plant* **1**: 552–559.
- Chern, M., Bai, W., Sze-To, W. H., Canlas, P.E., Bartley, L.E., and Ronald, P.C.** (2012). A rice transient assay system identifies a novel domain in NRR required for interaction with NH1/OsNPR1 and inhibition of NH1-mediated transcriptional activation. *Plant Meth.* **8**: 6. doi: 10.1186/1746-4811-8-6.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T., and Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**: 465–476.

- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500.
- Choi, H.W., and Klessig, D.F.** (2016). DAMPs, MAMPs, and NAMPs in plant innate immunity. *BMC Plant Biol.* **16**: 232.
- Choi, J., Tanaka, K., Cao, Y., Qi, Y., Qiu, J., Liang, Y., Lee, S.Y., and Stacey, G.** (2014). Identification of a plant receptor for extracellular ATP. *Science* **343**: 290–294.
- Choi, H.W., Manohar, M., Manosalva, P., Tian, M., Moreau, M., and Klessig, D.F.** (2016). Activation of plant innate immunity by extracellular high mobility group box 3 and its inhibition by salicylic acid. *PLoS Pathog.* **12**: e1005518. doi:10.1371/journal.ppat.100551.
- Chuang, C.F., Running, M.P., Williams, R.W., and Meyerowitz, E.M.** (1999). The PERIANTHIA gene encodes a bZIP protein involved in the determination of floral organ number in *Arabidopsis thaliana*. *Genes&Dev.* **13**: 334–344.
- Coaker, G., Fallick, A., and Staskawicz, B.J.** (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* **308**: 548-550.
- Coaker, G., Zhu, G., Ding, Z., Van Doren, S., and Staskawicz, B.J.** (2006). Eukaryotic cyclophilin acts as a molecular switch for effector activation. *Mol. Microbiol.* **61**: 1485–1496.
- Cohen, Y.** (1994). 3-Aminobutyric acid induces systemic resistance against *Peronospora tabacina*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **44**: 273–288
- Cohen, Y., and Gisi, U.** (1994). Systemic translocation of ¹⁴C-DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **45**: 441–446
- Cohen, Y., Niderman, T., Möisinger, E., and Fluhr, R.** (1994). β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **104**: 59–66.
- Coll, N.S.; Eppe, P.; and Dangl, J.L.** (2011). Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ.* **18**: 1247–1256.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R., and Klessig, D.F.** (1995). Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7143–7147.
- Couto, D., and Zipfel, C.** (2016). Regulation of pattern recognition receptor signaling in plants. *Nat. Rev. Immunol.* **16**: 537-52.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., and Leach, D.R.F.** (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Mol. Cell* **8**: 1163–1174.
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, K.** (2015). Effector-Triggered Immunity: From pathogen perception to robust defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **66**: 6.1–6.25.
- Cunnac, S., Lindeberg, M., and Collmer, A.** (2009). *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**: 53-60.
- Dangl, J.L.; and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250.

Delaney, T.P., Friedrich, L., and Ryals, J.A. (1995). Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 6602–6606.

De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., and Cervone, F. (2001). The role of polygalacturonase- inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 313–335.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., Eckert, M. R., Vogel, J., and Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**: 602.

Deppmann, C., Alvania, R., and Taparowsky, E. (2006). Cross-species annotation of basic leucine zipper factor interactions: insight into the evolution of closed interaction networks. *Mol. Biol. Evol.* **23**:1480–1492.

Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., and Fobert, P.R. (2000). The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**: 279–290.

Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., and Fobert, P.R. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* **15**: 2181–2191.

De Wit, P. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**: 2726 – 2732.

Ding, P., Rekhter, D., Ding, Y., Feussner, K., Busta, L., Haroth, S., Xu, S., Li, X., Jetter, R., Feussner, I., and Zhang, Y. (2016). Characterization of a pipecolic acid biosynthesis pathway required for systemic acquired resistance. *Plant Cell* **28**: 2603-2615.

Ding, Y., Sun, T., Ao, K., Peng, Y., Zhang, Y., Li, X., and Zhang, Y. (2018). Opposite roles of salicylic acid receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in transcriptional regulation of plant immunity. *Cell* **173**: 1454-1467.

Dodds, P., Lawrence, G., Catanzariti, A., Ayliffe, M., and Ellis, J. (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **3**: 755–768.

Dodds, P., Lawrence, G., Catanzariti, A., Teh, T., Wang, C., Ayliffe, M., Kobe, B., and Ellis, J. (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **23**: 8888–8893.

Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K.R., and Ausubel, F.M. (1991). Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell*. **3**: 61–72.

Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 547–552.

Durrant, W.E. and Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185-209.

Eggli, U., and Nyffeler, R. (2009). Living under temporarily arid conditions - succulence as an adaptive strategy. *Bradleya*, **27**: 13-36.

- El-Basyouni, S.Z., Chen, D., Ibrahim, R.K., Neish, A.C., and Towers, G.H.N.** (1964). The biosynthesis of hydroxybenzoic acids in higher plants. *Phytochem.* **3**: 485–492.
- Ellenberger, T.E., Brandl, C.J., Struhl, K., and Harrison, S.C.** (1992). The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted alpha helices: Crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* **71**: 1223–1237.
- Espinás, M.L., Jiménez-García, E., Vaquero, A., Canudas, S., Bernués, J., and Azorín, F.** (1999). The N-terminal POZ domain of GAGA mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J. Biol. Chem.* **274**: 16461–16469.
- Fan, W., and Dong, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1377–1389.
- Ferrari, S., Savatin, D.V., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and Lorenzo, G.D.** (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Front. Plant Sci.* **4**: 49. doi: 10.3389/fpls.2013.00049.
- Feys, B.J., and Parker, J.E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* **16**: 449–455.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* **9**: 275–296.
- Fonseca, J.P., Menossi, M., Thibaud-Nissen, F., and Town, C.D.** (2010). Functional analysis of a TGA factor-binding site located in the promoter region controlling salicylic acid-induced NIMIN-1 expression in Arabidopsis. *Genet. Mol. Res.* **9**: 167–175.
- Fontana, M.F., and Vance, R.E.** (2011). Two signal models in innate immunity. *Immunol. Rev.* **243**: 26–39.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S.W., Chiang, Y., Acton, T.B., Montelione, G.T., Pichersky, E., Klessig, D.F., and Tong, L.** (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 1773–1778.
- Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A., and Ryals, J.** (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol. Biol.* **29**: 959–968.
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M.G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J.P., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* **10**: 61–70.
- Fromm, H., Katagiri, F., and Chua, N.** (1991). The tobacco transcription activator TGAla binds to a sequence in the 5' upstream region of a gene encoding a TGAla-related protein. *Mol. Gen. Genet.* **229**: 181–188.
- Fu, Z., and Dong, X.** (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 839–63.
- Fu, Z., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., Oka, N., Mohan, R., Spoel, S., Tada, Y., Zheng, N., and Dong, X.** (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**: 228–232.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J., and Tanksley, S.D.** (1995). Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **13**: 207–209.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**: 754–756.

- Gao, X., Chen, X., Lin, W., Chen, S., Lu, D., Niu, Y., Li, L., Cheng, C., McCormack, M., Sheen, J., Libo Shan, L., and He, P.** (2013). Bifurcation of Arabidopsis NLR immune signaling via Ca^{2+} -dependent protein kinases. *PLOS Pathog.* **9**: e1003127.
- Gao, Q.M., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2014). Chemical inducers of systemic immunity in plants. *J. Exp. Bot.* **65**: 1849–1855.
- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., and Métraux, J.P.** (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **147**: 1279–1287.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V.** (2012). Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**: E2579–E2586.
- Gatz, C.** (2013). From pioneers to team players: TGA transcription factors provide a molecular link between different stress pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **26**: 151–159.
- Gilbert, G.S., Mejia-Chang, M., and Rojas, E.** (2002). Fungal diversity and plant disease in mangrove forests: salt excretion as a possible defense mechanism. *Oecologia* **132**: 278–285.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**: 973–982.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* **43**: 205–227.
- Glocova, I., Thor, K., Roth, B., Babbick, M., Pfitzner, A.J.P. and Pfitzner, U.M.** (2005). Salicylic acid (SA)-dependent gene activation can be uncoupled from cell death-mediated gene activation: the SA-inducible *NIMIN-1* and *NIMIN-2* promoters, unlike the *PR-1a* promoter, do not respond to cell death signals in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* **6**: 299–314.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* **8**: 629–643.
- Gohre, V., and Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* **46**: 189–215.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol. Cell* **5**: 1003–1011.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1155–1163.
- Grant, M., and Lamb, C.** (2006). Systemic immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 414–420.
- Griebel, T., Maekawa, T., and Parker, J.E.** (2014). NOD-like receptor cooperativity in effector-triggered immunity. *Trends Immunol.* **35**: 562–70.
- Grüner, R., and Pfitzner, U.M.** (1994). The upstream region of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco responds to environmental as well as to developmental signals in transgenic plants. *Eur. J. Biochem.* **220**: 247–255.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., and Nürnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute

pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **282**: 32338–32348.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557–580.

Halim, V.A., Altmann, S., Ellinger, D., Eschen-Lippold, L., Miersch, O., Scheel, D., and Rosahl, S. (2009). PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant J.* **57**: 230–242.

Hanley, M.E., Lamont, B.B., Fairbanks, M.M., and Rafferty, C.M. (2007) Plant structural traits and their role in antiherbivore defense. *Perspec. Plant Ecol. Evol. Syst.* **8**: 157–178.

He, J., Chen, F., Chen, S., Lv, G., Deng, Y., Fang, W., Liu, Z., Guan, Z., and He, C. (2011). Chrysanthemum leaf epidermal surface morphology and antioxidant and defense enzyme activity in response to aphid infestation. *J. Plant Physiol.* **168**: 687–693.

Henriques, M., Quintas, C., and Loureiro-Dias, M.C. (1997). Extrusion of benzoic acid in *Saccharomyces cerevisiae* by an energy-dependent mechanism. *Microbiol.* **143**: 1877–1883.

Hermann, M., Maier, F., Masroor, A., Hirth, S., Pfitzner, A.J.P., and Pfitzner, U.M. (2013). The Arabidopsis NIMIN proteins affect NPR1 differentially. *Front. Plant Sci.* **4**: 88. doi: 10.3389/fpls.2013.00088.

Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51–59.

Hong, J.K., Hwang, B.K., and Kim, C.H. (1999). Induction of local and systemic resistance to *Colletotrichum coccodes* in pepper plants by DL-beta-aminobutyric acid. *J. Phytopathol.* **147**: 193–198.

Hooft Van Huijsduijnen, R.A.M., Alblas, S.W., De Rijk, R.H., and Bol, J.F. (1986). Induction by salicylic acid of pathogenesis-related proteins and resistance to alfalfa mosaic virus infection in various plant species. *J. gen. Virol.* **67**: 2135–2143.

Horvath, D.M., Huang, D.J., and Chua, N.-H. (1998). Four classes of salicylate-induced tobacco genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **11**: 895–905.

Hwang, W. Y., Fu, Y., Reyon, D., Maeder, M.L., Tsai, S.Q., Sander, J.D., Peterson, R.T., Yeh, J.-R.J., and Joung, J.K. (2013). Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR–Cas system. *Nat. Biotechnol.* **31**: 227–229.

Hurley, B., Subramaniam, R., Guttman, D., and Desveaux, D. (2014). Proteomics of effector-triggered immunity (ETI) in plants. *Virulence* **5**: 752–760.

Iizasa, E., Mitsutomi, M., and Nagano, Y. (2010). Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. *J. Biol. Chem.* **285**: 2996–3004.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., and Parcy, F. (2002). bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trend. Plant Sci.* **7**: 106–111.

Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gastra, W., and Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**: 1565–1575.

Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R., and Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J.* **62**: 367–378.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E.** (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**: 816–821.
- Johnson, C., Boden, E., and Arias, J.** (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**: 1846–1858.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329.
- Jung, H.-W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**: 89–91.
- Katagiri, F., Lam, E., and Chua, N.** (1989). Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* **340**: 727–730.
- Katagiri, F., Seipel, K., and Chua, N.H.** (1992). Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 4809–4816.
- Katsani, K.R., Hajibagheri, M.A., and Verrijzer, C.P.** (1999). Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology. *EMBO J.* **18**: 698–708.
- Katz, A.V., Thulke, O.U., and Conrath, U.** (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* **117**: 1333–1339.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Geoffroy, P., and Fritig, B.** (1987). Biological function of pathogenesis-related (PR) proteins. Four PR-proteins have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J.* **6**: 3209–3212.
- Kauss, H., Franke, R., Krause, K., Conrath, U., Jeblick, W., Crimmig, B., and Matern, U.** (1993). Conditioning of parsley (*Petroselinum crispum* L.) suspension cells increases elicitor-induced incorporation of cell wall phenolics. *Plant Physiol.* **102**: 459–466.
- Kawata, T., Imada, T., Shiraishi, H., Okada, K., Shimura, Y., and Iwabuchi, M.** (1992). A cDNA clone encoding HBP-1b homologue in Arabidopsis thaliana. *Nucl. Acids Res.* **20**: 1141.
- Kesarwani, M., Yoo, J., and Dong, X.** (2007). Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **144**: 336–346.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., and Herzog, J.** (1994). Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**: 439–59.
- Khan, M., Xu, H., and Hepworth, S.R.** (2013). BLADE-ON-PETIOLE genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Sci.* **216**: 157–171.
- Khan, M.I.R., Fatma, M., Per, T.S., Anjum, N.A., and Khan, N.A.** (2015). Salicylic acid-induced abiotic stress tolerance and underlying mechanisms in plants. *Front. Plant Sci.* **6**: 462. doi:10.3389/fpls.2015.00462.
- Kim, M., da Cunha, L., McFall, A., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J., and Mackey, D.** (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* **121**: 749–759.
- King, J.J., Stimart, D.P., Fisher, R.H., and Bleecker, A.B.** (1995). A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in Arabidopsis. *Plant Cell* **7**: 2023–2031.
- Kinkema, M., Fan, W., and Dong, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**: 2339–2350.

- Klämbt, H.D.** (1962). Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its β -D-glucoside. *Nature* **196**: 491.
- Knoth, C., and Eulgem, T.** (2014). High-through put screening of small-molecule libraries for inducers of plant defense responses. *Plant Chem. Genom.*, eds G. R. Hicks and S. Robert (New York: Humana Press).
- Knoth, C., Salus, M.S., Girke, T., and Eulgem, T.** (2009). The synthetic elicitor 3,5-dichloroanthranilic acid induces NPR1-dependent and NPR1-independent mechanisms of disease resistance in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **150**: 333–347.
- Kuai, X., Barraco, C., and Després, C.** (2017). Combining fungicides and prospective NPR1-based “just-in-time” immunomodulating chemistries for crop protection. *Front. Plant Sci.* **8**: 1715. doi: 10.3389/fpls.2017.01715.
- Kuc J.** (1987). Translocated signals for plant immunization. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **494**: 221–23.
- Kunz, W., Schurter, R., and Maetzke, T.** (1997). The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pestic. Sci.* **50**: 275–282.
- Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.X., and Chua, N.H.** (1989). Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7890–7894.
- Landschulz, W. H., Johnson, P. F., and McKnight, S. L.** (1988). The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., and Ryals, J.** (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* **10**: 71–82.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E.** (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J.* **16**: 223–233.
- Lee, H.-J., Park, Y.-J., Seo, P.J., Kim, J.-H., Sim, H.-J., Kim, S.-G., Sim, H.J., Kim, S.G., and Park, C.M.** (2015). Systemic Immunity Requires SnRK2.8-Mediated Nuclear Import of NPR1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**: 3425–343.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P., and Fritig, B.** (1987). Biological function of ‘pathogenesis-related’ proteins: Four tobacco PR proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6750- 6754.
- Leon, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A., and Raskin, I.** (1995). Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10413–10417.
- Li, J., Zingen-Sell, I., and Buchenauer, H.** (1996). Induction of resistance of cotton plants to Verticillium wilt and of tomato to Fusarium wilt by 3-aminobutyric acid and methyl jasmonate. *J. Plant Dis. Plant Prot.* **103**: 288–299.
- Li, X., Zhang, Y., Clarke, J.D., Li, Y., and Dong, X.** (1999). Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SN11, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell* **98**: 329-339.
- Li, L., Li, M., Yu, L.P., Zhou, Z.Y., Liang, X.X., Liu, Z.X., Cai, G.H., Gao, L.Y., Zhang, X.J., Wang, Y.C., Chen, S., and Zhou, J.M.** (2014). The FLS2- associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* **15**: 329–338.

- Li, Z., Chakraborty, S., and Xu, G.** (2016). X-ray crystallographic studies of the extracellular domain of the first plant ATP receptor, DORN1, and the orthologous protein from *Camelina sativa*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **72**: 782–787.
- Lin, W., Lu, D., Gao, X., Jiang, S., Ma, X., Wang, Z., Mengiste, T., He, P., and Shan, L.** (2013). Inverse modulation of plant immune and brassinosteroid signaling pathways by the receptor-like cytoplasmic kinase BIK1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**: 12114–12119.
- Lin, W., Li, B., Lu, D., Chen, S., Zhu, N., He, P., and Shan, L.** (2014). Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**: 3632–3637.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S. P.** (2002). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**: 415–429.
- Liu, Y., and 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. *Plant Cell* **16**: 3386–3399.
- Liu, G., Holub, E.B., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Fobert, P.R.** (2005). An Arabidopsis NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. *Plant J.* **41**: 304–318.
- Lotze, M.T., and Tracey, K.J.** (2005). High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* **5**: 331–342.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., and He, P.** (2010). A receptor- like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 496–501.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379–389.
- Macris, B.J.** (1975). Mechanism of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.* **30**: 503–506.
- Maier, F., Zwicker, S., Hückelhoven, A., Meissner, M., Funk, J., Pfitzner, A. J.P., and Pfitzner, U.M** (2011). NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS1 (NPR1) and some NPR1-related proteins are sensitive to salicylic acid. *Mol.Plant Pathol.* **12**: 73–91.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., and Raskin, I.** (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250**: 1002–1004.
- Mali, P., Yang, L., Esvelt, K. M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J. E., Norville, J. E., and Church, G. M.** (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**: 823–826.
- Manohar, M., Tian, M., Moreau, M., Park, S. W., Choi, H. W., Fei, Z., Friso, G., Asif, M., Manosalva, P., von Dahl, C.C., Shi, K., Ma, S., Dinesh-Kumar, S.P., O'Doherty, I., Schroeder, F.C., van Wijk, K.J., and Klessig, D.F.** (2014). Identification of multiple salicylic acid-binding proteins using two high throughput screens. *Front. Plant Sci.* **5**: 777. doi: 10.3389/fpls.2014.00777
- Masroor, A.** (2013). Effects of overexpression of *NIMIN* genes on Salicylic acid-mediated *PR-I* gene activation and phenotype in *Nicotiana benthamiana* (Domin). Dissertation. Universität Hohenheim.
- Melchers, L.S., Apotheker-de Groot, M., Van der Knaap, J.A., Ponstein, A.S., Sela-Buurlage, M.B., Bol, J.F., Cornelissen, B.J.C., Van den Elzen, P.J.M., and Linthorst, H.J.M.** (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant J.* **5**: 469–480.

- Métraux, J.P., Streit, L., and Staub, T.** (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**: 1–9.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., and Inverardi, B.** (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004–1006.
- Métraux, J.P., Ahlgoy, P., Staub, T., Speich, J., Steinemann, A., Ryals, J., and Ward, E.** (1991). Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloroisonicotinic acid and pathogens. *Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact.*, Vol.1, eds H. Hennecke and D. Verma (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers).
- Miao, Z.H., Liu, X., and Lam, E.** (1994). TGA3 is a distinct member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **25**: 1–11.
- Mishina, T.E., and Zeier, J.** (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant J.* **50**: 500–513.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **104**: 19613–19618.
- Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., and Dong, X.** (2006). A comprehensive structure-function analysis of *Arabidopsis* SN1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell* **18**: 1750–1765.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**: 935–944.
- Murad, L., Lim, K.Y., Christopodoulou, V., Matyasek, R., Lichtenstein, C.P., Kovarik, A., and Leitch, A.R.** (2002). The origin of tobacco's T genome is traced to a particular lineage within *Nicotiana tomentosiformis* (Solanaceae). *Am. J. Bot.* **89**: 921–928.
- Murmu, J., Bush, M.J., DeLong, C., Li, S., Xu, M., Khan, M., Malcolmson, C., Fobert, P.R., Zachgo, S., and Hepworth, S.R.** (2010). *Arabidopsis* basic leucine-zipper transcription factors TGA9 and TGA10 interact with floral glutaredoxins ROXY1 and ROXY2 and are redundantly required for anther development. *Plant Physiol.* **154**: 1492–1504.
- Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A., and Zeier, J.** (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* **24**: 5123–5141.
- Nie, P., Li, X., Wang, S., Guo, J., Zhao, H., and Niu, D.** (2017). Induced systemic resistance against *Botrytis cinerea* by *Bacillus cereus* AR156 through a JA/ET- and NPR1-dependent signaling pathway and activates PAMP-Triggered immunity in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **8**: 238. doi: 10.3389/fpls.2017.00238
- Nicaise, V., Roux, M., and Zipfel, C.** (2009). Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant Physiol.* **150**: 1638–1647.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Mössinger, E.** (1995). Pathogenesis-Related PR-1 proteins are antifungal. Isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and of a basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* **108**: 17–27.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C., and Gatz, C.** (2000a). Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J. Biol. Chem.* **275**: 19897–19905.

Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U., and Gatz, C. (2000b). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol. Biol.* **42**: 775–788.

Nishimura, M.T.; and Dangl, J.L. (2010). Arabidopsis and the plant immune system. *Plant J.* **61**: 1053–1066.

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H., and Ohme-Takagi, M. (2001). Repression domains of class II ERF transcriptional repressors share an essential motif for active repression. *Plant Cell* **13**: 1959–196.

Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B., and Staub, T. (2001). Induced disease resistance in plants by chemicals. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 19–28.

Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113–16.

Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U., and Lipka, V. (2010). The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **285**: 28902–28911.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Hoffland, E., Van Pelt, J.A., and Van Loon, L.C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225–1237.

Pieterse, C.M.J., Van Wees, S.C.M., Van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and Van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1571–1580.

Pieterse, C.M., and Van Loon, L.C. (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 456–464.

Pieterse, C.M.J.; Van der Does, D.; Zamioudis, C.; Leon-Reyes, A.; and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Bi.* **28**: 489–521.

Qin, X.F., Holuigue, L., Horvath, D.M., and Chua, N.H. (1994). Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell* **6**: 863–874.

Rafiqi M, Gan, P., Ravensdale, M., Lawrence, G., Ellis, J., Jones, D., Hardham, A., and Dodds, P. (2010). Internalization of flax rust avirulence proteins into flax and tobacco cells can occur in the absence of the pathogen. *Plant Cell* **6**: 2017–2032.

Ralevic, V., and Burnstock, G. (1998). Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol. Rev.* **50**: 413–492.

Raskin, I., Skubatz, H., Tang, W., and Meeuse, B.J.D. (1990). Salicylic acid levels in thermogenic and non- thermogenic plants. *Ann. Bot.* **66**: 369–373.

Robert-Seilaniantz, A.; Grant, M.; and Jones, J.D. (2011). Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu. Rev. Phytopathol.* **49**: 317–343.

Rochon, A., Boyle, P., Wignes, T., Fobert, P.R., and Després, C. (2006). The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* **18**: 3670–3685.

Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., and Martin, G.B. (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* **448**: 370–374.

- Ross, A.F.** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329–339.
- Ross, A.F.** (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* **14**: 340–358.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., and Uknes, S.** (1997). The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B. *Plant Cell* **9**: 425–439.
- Saijo, Y., Po-ian Loo, E., and Yasuda, S.** (2018). Pattern recognition receptors and signaling in plant–microbe interactions. *Plant J.* **93**: 592–613.
- Sairam, R.K., Rao, K.V., and Srivastava, G.C.** (2002). Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* **163**: 1037–1046.
- Saleh, A., Withers, J., Mohan, R., Marqués, J., Gu, Y., Yan, S., Zavaliev, R., Nomoto, M., Tada, Y., and Dong, X.** (2015). Posttranslational modifications of the master transcriptional regulator NPR1 enable dynamic but tight control of plant immune responses. *Cell hostµbe* **18**: 169–182.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sanabria, N., Goring, D., Nürnberger, T., and Dubery, I.** (2008). Self/nonself perception and recognition mechanisms in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytologist* **178**: 503–514.
- Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and Siksnys, V.** (2011). The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*. *Nucl. Acids Res.* **39**: 9275–82.
- Scharff, T.G., Badr, M.Z., and Doyle, R.J.** (1982). The nature of salicylate inhibition of sugar transport in yeast. *Fundam. Appl. Toxicol.* **2**: 168–172.
- Schiermeyer, A., Thurow, C., and Gatz, C.** (2003). Tobacco bZIP factor TGA10 is a novel member of the TGA family of transcription factors. *Plant Mol. Biol.* **51**: 817–829.
- Schindler, U., Beckmann, H., and Cashmore, A.R.** (1992). TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of Arabidopsis leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell* **4**: 1309–1319.
- Schurter, R., Kunz, W., and Nyfelder, R.** (1987). EU Patent 0313-512, US Patent 4-931-581.
- Schurter, R., Kunz, W., and Nyfeler, R.** (1993). Process and a composition for immunizing plants against diseases. US Patent, US5190928A
- Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., and Zipfel, C.** (2011). Phosphorylation-dependent differential regulation of plant growth, cell death, and innate immunity by the regulatory receptor-like kinase BAK1. *PLoS Genet.* **7**: e1002046.
- Shah, J., Tsui, F., and Klessig, D.F.** (1997). Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (sai1) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA inducible expression of the *tms2* gen. *Am. Phytopathol. Soc.* **10**: 69-78.
- Shearer, H.L., Cheng, Y.T., Wang, L., Liu, J., Boyle, P., Després, C., Zhang, Y., Li, X., and Fobert, P.R.** (2012). Arabidopsis clade I TGA transcription factors regulate plant defenses in an NPR1-independent fashion. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **25**: 1459-1468.

Shen, L., Liu, Z., Yang, S., Yang, T., Liang, J., Wen, J., Liu, Y., Li, J., Shi, L., Tang, Q., Shi, W., Hu, J., Liu, C., Zhang, Y., Lin, W., Wang, R., Yu, H., Mou, S., Hussain, A., Cheng, W., Cai, H., He, L., Guan, D., Wu, Y., and He, S. (2016). Pepper CabZIP63 acts as a positive regulator during *Ralstonia solanacearum* or high temperature-high humidity challenge in a positive feedback loop with CaWRKY40. *J. Exp. Bot.* **67**: 2439–2451.

Shi, Z., Maximova, S., Liu, Y., Verica, J., and Gultinan, M. (2013). The salicylic acid receptor NPR3 is a negative regulator of the transcriptional defense response during early flower development in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **6**: 802–816.

Silverman, P., Seskar, M., Kanter, D., Schweizer, P., Metraux, J.P., and Raskin, I. (1995). Salicylic acid in rice: biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* **108**: 633–639.

Singh, K., Foley, R.C., and Onate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 430–436.

Singh, P.K., Bose, B., Sharma, M.K., and Singh, A. (2008). Physiological and molecular action of salicylate in plants. *Develop. Physiol., Biochem. Mol. Biol. Plants*, New India Publishing Agency, New Delhi **2**: 135–155.

Singh, P.K., Singh, R., Singh, S. and (2013). Cinnamic acid induced changes in reactive oxygen species scavenging enzymes and protein profile in maize (*Zea mays* L.) plants grown under salt stress. *Physiol Mol. Biol. Plants* **19**: 53–59.

Singh, A., Lim, G.H., and Kachroo, P. (2017). Transport of chemical signals in systemic acquired resistance. *J. Integr. Plant Biol.* **59**: 336–344.

Sharma, H.C., Sujana, G., and Rao, D.M. (2009). Morphological and chemical components of resistance to pod borer, *Helicoverpa armigera* in wild relatives of pigeonpea. *Arthropod-Plant Interact.* **3**: 151–161.

Song, J.T., Lu, H., McDowell, J.M., and Greenberg, J.T. (2004a). A key role for ALD1 in activation of local and systemic defenses in *Arabidopsis*. *Plant J.* **40**: 200–212.

Song, J.T., Lu, H., and Greenberg, J.T. (2004b). Divergent roles in *Arabidopsis thaliana* development and defense of two homologous genes, aberrant growth and death2 and AGD2-LIKE DEFENSE RESPONSE PROTEIN1, encoding novel aminotransferases. *Plant Cell* **16**: 353–366.

Spoel, S.H.; Johnson, J.S.; and Dong, X. (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 18842–18847.

Spoel, S.H., Mou, Z., Tada, Y., Spivey, N.W., Genschik, P., and Dong, X. (2009). Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. *Cell* **137**: 860–872.

Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* **507**: 62–67.

Stos-Zweifel, V., Neeley, D., Konopka, E., Meissner, M., Hermann, M., Maier, F., Häfner, V., Pfitzner, A.J.P., and Pfitzner, U.M. (2018). Tobacco TGA7 mediates gene expression dependent and independent of salicylic acid. *bioRxiv* doi: <http://dx.doi.org/10.1101/341834>.

Strompen, G., Grüner, R., and Pfitzner, U.M. (1998). An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol. Biol.* **37**: 871–883.

Stütze, J. (2016). Untersuchungen zur Akkumulation von NPR1 in Tabak und *Arabidopsis* und zur Zelltodinduktion durch TOPLESS. Bachelorarbeit. Universität Hohenheim.

- Sun, Y., Li, L., Macho, A.P., Han, Z., Hu, Z., Zipfel, C., Zhou, J.M., and Chai, J.** (2013). Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* **342**: 624–628.
- Sunwoo, J.Y., Lee, Y.K., and Hwang, B.K.** (1996). Induced resistance against *Phytophthora capsici* in pepper plants in response to DL- β -amino-n-butyric acid. *Eur. J. Plant. Pathol.* **102**: 663–670.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X.** (2008). Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952–956.
- Takken, F., and Goverse, A.** (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 375–84.
- Tameling, W.I., Elzinga, S.D., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L., Haring, M.A., and Cornelissen, B.J.** (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **14**: 2929–2939.
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., and Stacey, G.** (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Front. Plant Sci.* **5**: 446.
- Tang, D., Wang, G., and Zhou, J.M.** (2017). Receptor kinases in plant-pathogen interactions: more than pattern recognition. *Plant Cell* **29**: 618–637.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317–30.
- Terras, F.R., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F.** (1995). Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* **7**: 573–588.
- Terns, M.P., and Terns, R.M.** (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**: 321–7.
- Tirole, F., Malaguti, C., Romero, F., Attar, R., Camonis, J., and Egly, J.M.** (1997). A conditionally expressed third partner stabilizes or prevents the formation of a transcriptional activator in a three hybrid system. *J. Biol. Chem.* **272**: 22995–22999.
- Thomashow, L., Reeves, S., and Thomashow, M.** (1984). Crown gall oncogenesis: Evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5071–5075.
- Tripathi, D., Jiang, Y., and Kumar, D.** (2010). SABP2, a methyl salicylate esterase is required for the systemic acquired resistance induced by acibenzolar-S-methyl in plants. *FEBS Lett.* **584**: 3458–3463.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., and Katagiri, F.** (2008a). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J.* **53**: 763–775.
- Tsuda, K., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2008b). The interplay between MAMP and SA signaling. *Plant Signal. Behav.* **3**: 359–361.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet.* **5**: e1000772.
- Tsuda, K., and Katagiri, F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 459–465.

- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M., and Katagiri, F.** (2013). Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet.* **9**: e1004015.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., and Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 645–656.
- Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E., and Ryals, J.** (1993). Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* **5**: 159-169.
- Usha Rani, P., and Jyothsna, Y.** (2010). Biochemical and enzymatic changes in rice as a mechanism of defense. *Acta. Physiol. Plant* **32**: 695-701.
- Van de Rhee, M.D., Van Kan, J.A.L., Gonzalez-Jaen, M.T., and Bol, J.F.** (1990). Analysis of regulatory elements involved in the induction of two tobacco genes by salicylate treatment and virus infection. *Plant Cell* **2**: 357-366.
- Van Loon, L.C., and Van Kammen, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun NN'. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Phytopathol.* **81**: 728-734.
- Van Loon, L.C.** (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection, in: R.K.S. Wood (Ed.), *Active Defense Mechanisms in Plants*, Plenum Press, New York, pp. 247–273.
- Van Loon, L.C., and Van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 85-97.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A., and Pieterse, C.M.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- Van Peer, R., Nieman, G.J., and Schippers, B.** (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417R. *Phytopathol.* **81**: 728-734.
- Ve, T., Williams, S., Catanzariti, A., Rafiqi, M., Rahmand, M., Ellis, J., Hardham, A., Jones, D., Anderson, P., Dodds, P., and Kobe, B.** (2013). Structures of the flax-rust effector AvrM reveal insights into the molecular basis of plant-cell entry and effector-triggered immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**: 17594–17599.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1994). Salicylic-acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired-resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* **6**: 959-965.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Goy, P.A., Staub, T., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1995). 2,6-dichloroisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 228–234.
- Vincentz, M., Bandeira-Kobarg, C., Gauer, L., Schlogl, P., and Leite, A.** (2003). Evolutionary pattern of angiosperm bZIP factors homologous to the maize Opaque2 regulatory protein. *J. Mol. Evol.* **56**: 105–116.
- Vinson, C.R., Sigler, P.B., and McKnight, S.L.** (1989). Scissors-grip model for DNA recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science* **246**: 911–6.

- Wan, J., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G., and Stacey, G.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471–481.
- Wang, X., Wang, H., Wu, F., and Liu, B.** (2007). Effects of cinnamic acid on the physiological characteristics of cucumber seedlings under salt stress. *Front. Agric. China* **1**: 58–61.
- Wang CI, Gunčar, G., Forwood, J., Teh, T., Catanzariti, A., Lawrence, G., Loughlin, F., Mackay, J., Schirra, H., Anderson, P., Ellis, J., Dodds, P., and Kobe, B.** (2007). Crystal structures of flax rust avirulence proteins AvrL567-A and -D reveal details of the structural basis for flax disease resistance specificity. *Plant Cell* **19**: 2898–2912.
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., and Ignacimuthu, S.** (2011a). Jasmonic acid- mediated induced resistance in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) against *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Plant Growth Regul.* **30**: 512–523.
- War, A.R., Paulraj, M.G., War, M.Y., and Ignacimuthu, S.** (2011b). Herbivore- and elicitor-induced resistance in groundnut to asian armyworm, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). *Plant Signal Behav.* **6**: 1769–1777.
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Métraux, J.P., and Ryals, J.A.** (1991). Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* **3**: 1085–1094.
- Wei, G., Kloepper, J.W., and Tuzun, S.** (1991). Induction of systemic resistance in cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathol.* **81**: 1508–1512.
- Wei, K., Chen, J., Wang, Y., Chen, Y., Chen, S., Lin, Y., Pan, S., Zhong, X., and Xie, D.** (2012). Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize. *DNA Res.* **19**: 463–476.
- Wendehenne, D., Gao, Q.M., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2014). Free radical-mediated systemic immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **20**: 127–134.
- Weigel, R.R., Bäuscher, C., Pfitzner, A.J.P., and Pfitzner, U.M.** (2001). NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.* **46**: 143–160.
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., and Gatz, C.** (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 1279–1291.
- White, R.F.** (1979). Acetyl-salicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410–412.
- White, R.F., Rybicki, E.P., von Wechmar, M.B., Dekker, J.L., and Antoniw, J.F.** (1987). Detection of PR-1 type proteins in *Amaranthaceae*, *Chemopodiaceae*, *Graminae* and *Solanaceae* by immunoelectroblotting. *J. Gen. Virol.* **68**: 2043–2048.
- Wiedenheft, B., Sternberg, S.H., and Doudna, J.A.** (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**: 331–8.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Götz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A., and Nürnberger, T.** (2011). *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 19824–19829.

- Wingender, E., Chen, X., Fricke, E., Geffers, R., Hehl, R., Liebich, I., Krull, M., Matys, V., Michae, H., Ohnhäuser, R., Prüß, M., Schacherer, F., Thiele, S., and Urbach, S.** (2001). The transfacsystem on gene expression regulation. *Nucl. Acid Res.* **29**: 281–283.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismatesynthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562–565.
- Wu, X., Yu, Y., Han, L., Li, C., Wang, H., Zhong, N., Yao, Y., and Xi, G.** (2012). The tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 Gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant Physiol.* **159**: 835–850.
- Wu, Y., Zhang, D., Chu, J.Y., Boyle, P., Wang, Y., Brindle, I.D., De Luca, V., and Després, C.** (2012). The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. *Cell Rep.* **1**: 639–647.
- Wyman, C., and Kanaar, R.** (2006). DNA double-strand break repair: All's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 363–383.
- Xiang, C., Miao, Z., and Lam, E.** (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**: 403–415.
- Xie, Z., Fan, B., and Chen, Z.** (1998). Induction of PR-1 proteins and potentiation of pathogen signals by salicylic acid exhibit the same dose–response and structural specificity in plant cell cultures. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**: 568–571.
- Yalpani, N., Leôn, J., Lawton, M.A., and Raskin, I.** (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* **103**: 315–321.
- Yamaguchi, Y., and Huffaker, A.** (2011). Endogenous peptide elicitors in higher plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 351–357.
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H., and Hayaishi, O.** (1965). Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. I. purification and general properties. *J. Biol. Chem.* **240**: 3408–13.
- Ye, X.S., Pan, S.Q., and Kuć, J.** (1989). Pathogenesis-related proteins and systemic resistance to blue mould and tobacco mosaic virus induced by tobacco mosaic virus, *Peronospora tabacina* and aspirin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **88**: 161.
- Yeo, A.** (1998). Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *J. Exper. Bot.* **49**: 915–929.
- Yu, K., Soares, J.M., Mandal, M.K., Wang, C., Chanda, B., Gifford, A.N., Fowler, J.S., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2013). A feedback regulatory loop between G3P and lipid transfer proteins DIR1 and AZI1 mediates azelaic-acid-induced systemic immunity. *Cell Rep.* **3**: 1266–1278.
- Yuan, Y., Zhong, S., Li, Q., Zhu, Z., Lou, Y., Wang, L., Wang, J., Wang, M., Li, Q., Yang, D., and He, Z.** (2007). Functional analysis of rice *NPR1*-like genes reveals that *OsNPR1/NH1* is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. *Plant Biotechn. J.* **5**: 313–324.
- Zhang, B., Foley, R.C., and Singh, K.B.** (1993). Isolation and characterization of two related *Arabidopsis* ocs-element bZIP binding proteins. *Plant J.* **4**: 711–716.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., and Dong, X.** (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6523–6528.

- Zhang, Y., Tessaro, M.J., Lassner, M., and Li, X. (2003).** Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**: 2647-2653.
- Zhang, Y.L., Cheng, Y.T., Qu, N., Zhao, Q.G., Bi, D.L., and Li, X. (2006):** Negative regulation of defense responses in Arabidopsis by two NPR1 paralogs. *Plant J.* **48**:647-656.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T., Liu, Z., Laluk, K., Ding, X., Zou, Y., Gao, M., Zhang, X., Chen, S., Mengiste, T., Zhang, Y., and Zhou, J. (2010).** Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe* **7**: 290–301.
- Zhou, J.-M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J.; and Klessig, D.F. (2000).** NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **13**: 191–202.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J.P., and Mauch-Mani, B. (2000).** Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12920–12925
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T. (2004).** Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**: 764–767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006).** Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760.
- Zwicker, S., Mast, S., Stos, V., Pfitzner, A.J.P., and Pfitzner, U.M. (2007).** Tobacco NIMIN2 proteins control PR gene induction through transient repression early in systemic acquired resistance. *Mol. Plant Pathol.* **8**: 385–400.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Ø	Durchmesser
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AD	Aktivierungsdomäne
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
<i>as-I</i>	<i>as-I-Element (activation sequence I)</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BD	DNA-Bindedomäne
BOP	BLADE-ON-PETIOLE
Bp	Basenpaar(e)
BTH	Benzol-(1,2,3)-thiadiazol-7-Thiocarbonsäure S-Methylester
BTB/POZ	<i>broad complex tramtrack bric-à-brac/pox virus and zinc finger</i>
bZIP	<i>basic leucine zipper</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CaBP22	<i>calcium-binding protein22</i>
C-Terminal	am Carboxyterminus
Cys	Cystein
dpi	Tage nach Infektion (<i>days post infection</i>)
DEPC	Diethyldicarbonat
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DTT	Dithiothreitol
CRISPR/Cas9	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9</i>

EAR	<i>ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere
ETI	<i>effector-triggered-immunity</i>
G	Guanin
GUS	β-Glucuronidase
HCl	Salzsäure
HR	Hypersensitive Reaktion
INA	2,6-Dichlorisonicotinsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _d	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria Bertani Medium
M	molar
Min.	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger</i> -RNA)
MS	Murashige und Skoog
N1	AtNIMIN1
N2	AtNIMIN2
N3	AtNIMIN3
N ₂	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NBD	NIMIN-Bindedomäne
NIM1	NON-INDUCIBLE-IMMUNITY1
NIMIN	NIM1-INTERACTING-PROTEIN
NLS	Zellkernlokalisierungssignal
NPR1	NONEXPRESSOR-OF-PATHOGENESIS-RELATED-GENES1
N-Terminal	am Aminoterminus

Nt	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD _x	optische Dichte bei x nm
oNPG	o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PAM	<i>protospacer adjacent motif</i>
PAMP	<i>pathogen-associated-molecular-pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PR	PATHOGENESIS-RELATED-PROTEIN
PTI	<i>PAMP-triggered-immunity</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAR	Systemisch erworbene Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> DNA-Polymerase
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
<i>TMV</i>	Tabak-Mosaik-Virus
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Enzymeinheit(en) (<i>units</i>)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
WT	Wildtyp
x g	Gravitationskonstante

Anhang

Dieser Anhang umfasst:

- I. Mittelwerte und Standardabweichungen der Miller-Einheiten der Hefe-Zwei-Hybridtests, der Hefe-Drei-Hybridtests sowie der EC_{50} - beziehungsweise IC_{50} -Werte für Salicylsäure, Benzoessäure und 3,5-Dichloranthranilsäure
- II. Messwerte der β -Glucuronidase-Enzymaktivitätstests
- III. Klonierungsstrategien verschiedener Konstruktionen für Protein-Protein-Interaktionsmessungen in Hefe

I. Mittelwerte und Standardabweichungen der Hefe-Tests

MW – Mittelwert; STABW – Standardabweichung; SA-Salicylsäure, BA – Benzoesäure;
4-OH-BA – 4-Hydroxybenzoesäure; 4-CB – 4-Chlorbenzoesäure; 3,5-DCB – Dichlorbenzoesäure;
AA – Anthranilsäure; 3,5-DCA – Dichloranthranilsäure

zu Abb. 8B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01
NtNPR1 // pGAD424	0,15	0,02
+ 0,3 mM SA	0,31	0,10
NtNPR1 // NtNPR1	7,15	0,38
+ 0,3 mM SA	2,12	0,33
NtNPR1 // NtNPR1Δ2	3,57	0,32
+ 0,3 mM SA	6,33	0,79

zu Abb. 8C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,16	0,03
NtNPR1 // NtNPR1	25,24	1,24
+ 0,3 mM SA	22,87	1,03
NtNPR1 / NtTGA7 // pGAD424	0,99	0,04
+ 0,3 mM SA	1,41	0,41
NtNPR1 / NtTGA7 // NtNPR1	3,47	0,32
+ 0,3 mM SA	3,84	0,34
NtNPR1 / NtTGA7 // NtNPR1Δ2	1,18	0,06
+ 0,3 mM SA	1,58	0,45

zu Abb. 8D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,15	0,03
NtNPR1 // NtNPR1	6,69	0,20
+ 0,3 mM SA	5,87	0,77
NtNPR1 / NtTGA7 // pGAD424	0,47	0,06
+ 0,3 mM SA	0,12	0,02
NtNPR1 / NtTGA7 // NtNPR1	1,83	0,36
+ 0,3 mM SA	6,22	0,72
NtNPR1 / NtTGA7 // NtNPR1Δ2	0,83	0,25
+ 0,3 mM SA	2,19	0,69

zu Abb. 8E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
NtNPR1 // pGAD424	0,26	0,05
+ 0,3 mM SA	1,84	0,41
NtNPR1 // NtNPR1	28,42	3,05
+ 0,3 mM SA	22,36	0,99
NtNPR1 / NtTGA2.2 // pGAD424	1,15	0,26
+ 0,3 mM SA	1,62	0,16
NtNPR1 / NtTGA2.2 // NtNPR1	2,92	0,07
+ 0,3 mM SA	2,01	0,55

zu Abb. 8F

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,01
NtNPR1 // pGAD424	0,35	0,02
+ 0,3 mM SA	1,74	0,27
NtNPR1 // NtNPR1	19,99	2,64
+ 0,3 mM SA	18,98	1,83
NtNPR1 / NtNIMIN2a // pGAD424	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	0,93	0,16
NtNPR1 / NtNIMIN2a // NtNPR1	5,15	0,31
+ 0,3 mM SA	11,93	1,84

zu Abb. 9

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,01
NtNPR1 // pGAD424	0,35	0,02
+ 0,3 mM SA	1,74	0,27
NtNPR1 // NtNPR3	8,16	0,13
+ 0,3 mM SA	5,14	1,39
NtNPR1 / NtTGA7 // pGAD424	0,80	0,35
+ 0,3 mM SA	1,74	0,19
NtNPR1 / NtTGA7 // NtNPR3	2,76	0,18
+ 0,3 mM SA	1,93	0,41
NtNPR1 / NtTGA2.2 // pGAD424	1,50	0,07
+ 0,3 mM SA	1,57	0,05
NtNPR1 / NtTGA2.2 // NtNPR3	1,61	0,21
+ 0,3 mM SA	1,87	0,04
NtNPR1 / NtNIMIN2a // pGAD424	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	0,93	0,16
NtNPR1 / NtNIMIN2a // NtNPR3	1,69	0,12
+ 0,3 mM SA	4,51	0,17

zu Abb.10

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,00
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // pGAD424	0,15	0,02
+ 0,3 mM SA	0,44	0,06
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // NtTGA1a	0,17	0,00
+ 0,3 mM SA	0,47	0,11
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // NtTGA2.1	0,18	0,00
+ 0,3 mM SA	0,83	0,08
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // NtTGA2.2	0,20	0,02
+ 0,3 mM SA	0,54	0,17
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // NtTGA7	0,16	0,02
+ 0,3 mM SA	3,19	0,27
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/525) // NtTGA10	0,13	0,09
+ 0,3 mM SA	0,38	0,07

zu Abb. 11B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,19	0,01
NtNPR1(386/588) // pGAD424	1,25	0,24
+ 0,3 mM SA	7,52	1,10
NtNPR1(386/588) R431F // pGAD424	0,11	0,03
+ 0,3 mM SA	0,14	0,02

zu Abb. 11C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,02
NtNPR1(386/588) // pGAD424	1,15	0,27
+ 0,3 mM SA	7,00	2,64
NtNPR1(386/588) // NtTGA7	4,46	0,92
+ 0,3 mM SA	3,96	0,61
NtNPR1(386/588) R431F // NtTGA7	0,18	0,04
+ 0,3 mM SA	0,16	0,01

zu Abb. 11D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,19	0,01
NtNIMIN2a // NtNPR1(386/588)	3,91	0,39
+ 0,3 mM SA	0,14	0,02
NtNIMIN2a // NtNPR1(386/588) R431F	11,83	1,57
+ 0,3 mM SA	10,27	0,55

zu Abb. 11E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,02
NtNPR1(386/465) // NtNPR1(466/588)	2,20	0,21
+ 0,3 mM SA	32,79	1,39
NtNPR1(386/465) R431F // pGAD424	0,72	0,21
+ 0,3 mM SA	0,57	0,16
NtNPR1(386/465) R431F // NtNPR1(466/588)	2,94	0,93
+ 0,3 mM SA	0,85	0,19

zu Abb. 12B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) // pGAD424	0,06	0,02
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) R491K// pGAD424	0,06	0,00
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) // NtNIMIN1-like	0,64	0,11
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) R491K// NtNIMIN1-like	0,38	0,08

zu Abb. 12C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,02
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) // pGAD424	0,08	0,02
+ 0,3 mM SA	2,10	0,25
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) R491K// pGAD424	0,06	0,00
+ 0,3 mM SA	1,96	0,20
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) // NtTGA2.1	0,11	0,04
+ 0,3 mM SA	3,19	0,42
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) R491K// NtTGA2.1	0,09	0,01
+ 0,3 mM SA	3,22	0,41
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) // NtTGA7	0,07	0,02
+ 0,3 mM SA	2,83	0,38
NtNPR1(386/465) / NtNPR1(466/588) R491K// NtTGA7	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	3,35	0,52

zu Abb. 13C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,00
NtNIMIN2a // NtNPR1 WT	32,06	3,08
+ 0,3 mM SA	0,53	0,07
NtNIMIN2a // NtNPR1 H81Y	0,70	0,09
+ 0,3 mM SA	0,03	0,01
NtNIMIN1-like BP // NtNPR1 H81Y	0,86	0,16
+ 0,3 mM SA	0,04	0,01

zu Abb. 13D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,15	0,03
NtTGA2.2 // NtNPR1 WT	5,15	0,82
+ 0,3 mM SA	7,79	1,18
NtTGA2.2 // NtNPR1 H81Y	0,38	0,06
+ 0,3 mM SA	0,48	0,06
NtTGA7Δ1 (107/363) // NtNPR1 WT	7,72	1,13
+ 0,3 mM SA	10,25	1,88
NtTGA7Δ1 (107/363) // NtNPR1 H81Y	2,87	0,58
+ 0,3 mM SA	2,60	0,25

zu Abb. 13E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,19	0,02
NtNPR1 WT // pGAD424	0,25	0,02
+ 0,3 mM SA	1,07	0,12
NtNPR1 H81Y // pGAD424	2,56	0,36
+ 0,3 mM SA	2,95	0,57
NtNPR1 WT // NtNPR1 WT	13,69	1,47
+ 0,3 mM SA	12,29	0,25
NtNPR1 WT // NtNPR1 H81Y	2,14	0,14
+ 0,3 mM SA	2,82	0,59
NtNPR1 H81Y // NtNPR1 WT	15,76	1,06
+ 0,3 mM SA	11,78	0,72
NtNPR1 H81Y // NtNPR1 H81Y	2,66	0,24
+ 0,3 mM SA	4,53	0,68
NtNPR1 WT // NtNPR3	3,91	0,59
+ 0,3 mM SA	1,90	0,23
NtNPR1 H81Y // NtNPR3	2,55	0,61
+ 0,3 mM SA	3,07	0,80
NtNPR3 // NtNPR1 WT	4,66	0,72
+ 0,3 mM SA	1,32	0,65
NtNPR3 // NtNPR1 H81Y	0,36	0,04
+ 0,3 mM SA	0,18	0,02

zu Abb. 14C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01
NtNIMIN2a // NtNPR1 WT	30,63	1,21
+ 0,3 mM SA	0,81	0,35
NtNIMIN2a // NtNPR1 P341S	0,39	0,16
+ 0,3 mM SA	0,06	0,03
NtNIMIN1-like BP // NtNPR1 P341S	0,35	0,13
+ 0,3 mM SA	0,06	0,02

zu Abb. 14D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,02
NtNPR1 WT // pGAD424	0,35	0,02
+ 0,3 mM SA	1,12	0,12
NtNPR1 P341S // pGAD424	0,12	0,00
+ 0,3 mM SA	0,20	0,06
NtNPR1 // NtTGA2.2	1,62	0,12
+ 0,3 mM SA	2,82	0,32
NtNPR1 P341S // NtTGA2.1	0,43	0,19
+ 0,3 mM SA	0,35	0,06
NtNPR1 P341S // NtTGA2.2	0,38	0,04
+ 0,3 mM SA	0,31	0,01
NtNPR1 P341S // NtTGA7	0,51	0,12
+ 0,3 mM SA	0,40	0,15

zu Abb. 14E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,61	0,01
NtNPR1 WT // pGAD424	0,59	0,21
+ 0,3 mM SA	1,78	0,23
NtNPR1 P341S // pGAD424	0,22	0,04
+ 0,3 mM SA	0,27	0,01
NtNPR1 // NtNPR1	22,23	0,55
+ 0,3 mM SA	18,58	1,10
NtNPR1 // NtNPR1 P341S	3,50	1,08
+ 0,3 mM SA	4,89	0,36
NtNPR1 P341S // NtNPR1	13,25	1,97
+ 0,3 mM SA	3,40	0,18
NtNPR1 P341S // NtNPR P341S	0,40	0,11
+ 0,3 mM SA	0,92	0,32
NtNPR1 // NtNPR3	25,78	2,25
+ 0,3 mM SA	10,96	0,17
NtNPR1 P341S // NtNPR3	2,79	0,28
+ 0,3 mM SA	0,76	0,09
NtNPR3 // NtNPR1	17,83	3,15
+ 0,3 mM SA	6,88	1,48
NtNPR3 // NtNPR1 P3421S	2,36	0,49
+ 0,3 mM SA	0,54	0,19

zu Abb. 15B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,04	0,02
NtNIMIN1-like //NtNPR3 (389/588) WT	4,19	0,46
+ 0,3 mM SA	0,25	0,02
NtNIMIN1-like //NtNPR3 (389/588) R435K	6,44	0,55
+ 0,3 mM SA	5,69	0,82

zu Abb. 15C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,02
NtNIMIN2a//NtNPR3 Wt	1,26	0,09
+ 0,3 mM SA	0,01	0,01
NtNIMIN2a//NtNPR3 R435K	5,55	1,20
+ 0,3 mM SA	5,53	1,11
NtNIMIN1-like//NtNPR3 Wt	8,37	1,10
+ 0,3 mM SA	0,51	0,06
NtNIMIN1-like//NtNPR3 R435K	4,71	0,96
+ 0,3 mM SA	4,21	0,11

zu Abb. 15D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,02
NtNPR3 R435K//pGAD424	0,16	0,01
+ 0,3 mM SA	0,16	0,02
NtNPR3 Wt// NtTGA2.2	11,69	0,46
+ 0,3 mM SA	6,23	0,97
NtNPR3 R435K// NtTGA2.2	11,26	1,22
+ 0,3 mM SA	11,67	1,30

zu Abb. 16B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,04	0,02
NtNIMIN1-like //NtNPR3 (389/588) WT	4,19	0,46
+ 0,3 mM SA	0,25	0,02
NtNIMIN1-like //NtNPR3 (389/588) Y508S F509S	0,14	0,05
+ 0,3 mM SA	0,07	0,01

zu Abb. 18C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,01
AtNPR1 // AtTGA2	1,58	0,09
+ 0,3 mM SA	3,09	0,34
'AtNPR1 // AtTGA3	1,94	0,43
+ 0,3 mM SA	2,54	0,28
'AtNPR1 // AtTGA7	1,58	0,07
+ 0,3 mM SA	2,37	0,35

zu Abb. 18D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNPR1 // AtTGA2	14,07	1,31
+ 0,3 mM SA	16,91	1,33
'AtNPR1 (1/467) // AtTGA2	4,73	0,21
+ 0,3 mM SA	2,23	0,39
'AtNPR1 (1/467) // AtTGA3	7,65	0,81
+ 0,3 mM SA	5,71	0,82
'AtNPR1 (1/467) // AtTGA6	3,49	0,40
+ 0,3 mM SA	2,36	0,24
'AtNPR1 (1/467) // AtTGA7	1,87	0,38
+ 0,3 mM SA	0,96	0,05

zu Abb. 18E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,02
AtNPR1 // AtTGA2	8,52	0,32
+ 0,3 mM SA	10,81	0,13
'AtNPR1 (378/593) // AtTGA2	0,09	0,03
+ 0,3 mM SA	0,09	0,01
'AtNPR1 (378/593) // AtTGA3	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,04	0,00
'AtNPR1 (378/593) // AtTGA6	0,08	0,02
+ 0,3 mM SA	0,04	0,01
'AtNPR1 (378/593) // AtTGA7	0,04	0,00
+ 0,3 mM SA	0,07	0,01

zu Abb. 18F

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,00
NtNPR1 (386/588) // pGAD424	0,68	0,06
NtNPR1 (386/588) // NtTGA8	3,77	0,26
AtNPR1 (378/593) // NtTGA	0,05	0,01
AtNPR1 (378/593) // AtNIMIN2pA	1,15	0,23

zu Abb. 19C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	21,10	2,15
+ 0,3 mM SA	3,71	1,12
AtNIMIN1 // AtNPR1 H80Y	0,12	0,03
+ 0,3 mM SA	0,06	0,01
AtNIMIN2 // AtNPR1 H80Y	0,16	0,04
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02
AtNIMIN3 // AtNPR1 H80Y	0,10	0,02
+ 0,3 mM SA	0,08	0,03

zu Abb. 19D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,17	0,04
AtNPR1 // AtTGA2	15,06	2,46
+ 0,3 mM SA	19,92	0,71
AtNPR1 H80Y // pGAD424	0,15	0,03
+ 0,3 mM SA	0,18	0,03
AtNPR1 H80Y // AtTGA2	0,54	0,07
+ 0,3 mM SA	3,58	1,34
AtNPR1 H80Y // AtTGA6	0,44	0,07
+ 0,3 mM SA	2,77	0,25
AtNPR1 H80Y // AtTGA3	0,76	0,15
+ 0,3 mM SA	7,15	1,81
AtNPR1 H80Y // AtTGA7	0,44	0,07
+ 0,3 mM SA	8,52	2,23

zu Abb. 20B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,02
AtNIMIN2 // AtNPR1	38,51	3,13
+ 0,3 mM SA	5,42	0,86
AtNPR2 (386/600) // pGAD424	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02
AtNIMIN1 // AtNPR2 (386/600)	0,07	0,00
+ 0,3 mM SA	0,10	0,01
AtNIMIN2 // AtNPR2 (386/600)	0,06	0,00
+ 0,3 mM SA	0,10	0,01

zu Abb. 20C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,00
AtNIMIN1 // AtNPR1	24,75	1,20
+ 0,3 mM SA	5,98	1,00
AtNIMIN1 // AtNPR2	0,03	0,01
+ 0,3 mM SA	0,03	0,01
AtNIMIN2 // AtNPR2	0,03	0,01
+ 0,3 mM SA	0,03	0,00
AtNIMIN3 // AtNPR2	0,04	0,00
+ 0,3 mM SA	0,05	0,01

zu Abb. 21B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,12	0,03
AtNPR1 // AtTGA2	5,94	0,32
+ 0,3 mM SA	8,62	1,35
AtNPR2 // pGAD424	0,10	0,03
+ 0,3 mM SA	0,17	0,08
AtNPR2 // AtTGA2	2,73	0,29
+ 0,3 mM SA	8,70	0,37
AtNPR2 // AtTGA6	2,06	0,12
+ 0,3 mM SA	12,00	0,08
AtNPR2 // AtTGA3	6,00	1,08
+ 0,3 mM SA	11,25	1,45
AtNPR2 // AtTGA7	1,42	0,13
+ 0,3 mM SA	13,37	1,19

zu Abb. 21C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,46	0,07
AtNPR1 // AtTGA2	6,19	0,83
+ 0,3 mM SA	8,85	0,64
AtNPR2 (386/600) // AtTGA2	0,28	0,13
+ 0,3 mM SA	0,47	0,02
AtNPR2 (386/600) // AtTGA7	0,49	0,02
+ 0,3 mM SA	0,46	0,02

zu Abb. 21D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,02
AtNPR2 // AtTGA7	9,62	1,37
+ 0,3 mM SA	40,90	0,16
AtNPR2 (1/467) // AtTGA2	1,16	0,10
+ 0,3 mM SA	1,14	0,21
AtNPR2 (1/467) // AtTGA3	6,50	0,25
+ 0,3 mM SA	5,64	1,01
AtNPR2 (1/467) // AtTGA6	1,22	0,23
+ 0,3 mM SA	0,60	0,31
AtNPR2 (1/467) // AtTGA7	0,75	0,25
+ 0,3 mM SA	0,44	0,04

zu Abb. 22B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,06	0,02
+ 0,3 mM SA	1,32	0,10
AtNPR2 (386/467) // AtNPR2 (468/600)	0,26	0,11
+ 0,3 mM SA	0,22	0,02

zu Abb. 23

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	40,10	1,72
+ 0,3 mM SA	15,89	3,11
AtNIMIN1 // AtNPR3	0,24	0,04
+ 0,3 mM SA	0,05	0,01
AtNIMIN2 // AtNPR3	0,06	0,02
+ 0,3 mM SA	0,07	0,02
AtNIMIN3 // AtNPR3	0,15	0,01
+ 0,3 mM SA	0,19	0,03

zu Abb. 24B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,42	0,02
AtNPR3 // pGAD424	0,37	0,02
+ 0,3 mM SA	0,17	0,02
AtNPR3 // AtTGA6	22,74	1,00
+ 0,3 mM SA	8,98	0,54

zu Abb. 24D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
AtNPR3 // AtTGA 6	22,95	1,96
+ 0,3 mM SA	10,71	0,41
AtNPR3 (1/235) // pGAD424	0,06	0,01
+ 0,3 mM SA	0,04	0,01
AtNPR3 (1/235) // AtTGA2	0,09	0,04
+ 0,3 mM SA	0,07	0,01
AtNPR3 (1/235) // AtTGA6	0,09	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02

zu Abb. 24C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,85	0,06
AtNPR3 // AtTGA2	14,96	3,17
+ 0,3 mM SA	14,66	2,82
'AtNPR3 // AtTGA3	52,82	3,07
+ 0,3 mM SA	46,36	6,04
'AtNPR3 // AtTGA7	33,85	2,42
+ 0,3 mM SA	31,99	4,64

zu Abb. 25

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,04	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	25,58	3,57
+ 0,3 mM SA	10,86	2,90
AtNIMIN1 // AtNPR4	0,04	0,01
+ 0,3 mM SA	0,02	0,02
AtNIMIN2 // AtNPR4	0,02	0,01
+ 0,3 mM SA	0,03	0,00
AtNIMIN3 // AtNPR4	0,01	0,01
+ 0,3 mM SA	0,02	0,01

zu Abb. 26C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,56	0,04
AtNPR4 // AtTGA2	23,23	2,81
+ 0,3 mM SA	19,49	1,55
AtNPR4 // AtTGA3	14,03	3,11
+ 0,3 mM SA	15,04	1,82
'AtNPR4 // AtTGA7	5,33	1,26
+ 0,3 mM SA	11,78	1,15

zu Abb. 26B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,21	0,11
AtNPR4 // pGAD424	0,25	0,04
+ 0,3 mM SA	0,20	0,07
AtNPR4 // AtTGA6	7,23	1,02
+ 0,3 mM SA	6,19	0,77

zu Abb. 26D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,09	0,02
AtNPR4 // AtTGA2	26,68	3,23
+ 0,3 mM SA	21,36	2,56
AtNPR4 (1/185) // pGAD424	0,06	0,01
+ 0,3 mM SA	0,06	0,01
AtNPR4 (1/185) // AtTGA2	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,10	0,02
AtNPR4 (1/185) // AtTGA6	0,09	0,02
+ 0,3 mM SA	0,08	0,01

zu Abb. 26E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,09	0,02
AtNPR4 // AtTGA2	26,68	3,23
+ 0,3 mM SA	21,36	2,56
AtNPR4 (183/574) // pGAD424	0,07	0,00
+ 0,3 mM SA	0,07	0,01
AtNPR4 (183/574) // AtTGA2	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,07	0,00
AtNPR4 (183/574) // AtTGA6	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,09	0,00

zu Abb. 27A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,24	0,02
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA2	3,62	0,28
+ 0,3 mM SA	4,97	0,90
+ 0,5 mM SA	3,81	0,95
+ 0,75 mM SA	4,48	0,98
+ 1 mM SA	2,87	0,76

zu Abb. 27C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,02
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA2	2,85	0,32
+ 0,3 mM SA	3,67	0,32
AtNIMIN2 / AtNPR3 // AtTGA2	0,11	0,00
+ 0,3 mM SA	0,15	0,01
AtNIMIN2 / AtNPR4 // AtTGA2	0,08	0,02
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02

zu Abb. 27B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,28	0,04
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA2	11,85	0,31
+ 0,3 mM SA	1,81	0,17
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA3	18,81	3,72
+ 0,3 mM SA	5,93	0,32
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA7	8,73	0,53
+ 0,3 mM SA	2,06	0,87
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA2	4,28	0,64
+ 0,3 mM SA	6,04	1,05
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA3	9,49	0,92
+ 0,3 mM SA	10,10	0,75
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA7	3,24	0,22
+ 0,3 mM SA	3,39	0,95

zu Abb. 28

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,34	0,02
AtNPR1 // AtTGA2	16,42	1,41
+ 0,3 mM SA	21,69	2,48
AtNPR1/AtNIMIN1 // AtTGA2	2,37	0,25
+ 0,3 mM SA	2,43	0,97
AtNPR1/AtNIMIN2 // AtTGA2	14,65	1,95
+ 0,3 mM SA	11,94	1,76
AtNPR1/AtNIMIN3 // AtTGA2	2,44	0,68
+ 0,3 mM SA	5,24	1,18
AtNPR1/AtNIMIN1 // AtTGA3	4,86	0,54
+ 0,3 mM SA	4,79	0,38
AtNPR1/AtNIMIN2 // AtTGA3	14,25	0,86
+ 0,3 mM SA	12,57	0,89
AtNPR1/AtNIMIN3 // AtTGA3	4,86	1,37
+ 0,3 mM SA	9,56	1,25
AtNPR1/AtNIMIN1 // AtTGA7	1,31	0,14
+ 0,3 mM SA	2,43	0,86
AtNPR1/AtNIMIN2 // AtTGA7	7,15	0,69
+ 0,3 mM SA	10,73	0,91
AtNPR1/AtNIMIN3 // AtTGA7	1,45	0,31
+ 0,3 mM SA	2,22	0,64

zu Abb. 29A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,15	0,02	+ 0,3 mM SA	20,99	2,63
AtNPR2/- // AtTGA2	3,08	0,09	AtNPR2/AtNIMIN1 // AtTGA6	0,82	0,22
+ 0,3 mM SA	9,91	0,69	+ 0,3 mM SA	7,93	0,54
AtNPR2/AtNIMIN1 // AtTGA2	0,34	0,10	AtNPR2/AtNIMIN2 // AtTGA6	3,58	0,08
+ 0,3 mM SA	2,87	0,27	+ 0,3 mM SA	18,21	2,38
AtNPR2/AtNIMIN2 // AtTGA2	1,58	0,26	AtNPR2/AtNIMIN3 // AtTGA6	1,01	0,18
+ 0,3 mM SA	5,41	0,46	+ 0,3 mM SA	10,66	0,49
AtNPR2/AtNIMIN3 // AtTGA2	0,41	0,06	pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
+ 0,3 mM SA	3,42	0,56	AtNPR2/- // AtTGA7	2,06	0,09
pGBT9 // pGAD424	0,17	0,02	+ 0,3 mM SA	11,45	0,97
AtNPR2/- // AtTGA3	9,35	0,73	AtNPR2/AtNIMIN1 // AtTGA7	0,28	0,01
+ 0,3 mM SA	21,29	0,47	+ 0,3 mM SA	2,84	0,14
AtNPR2/AtNIMIN1 // AtTGA3	2,98	0,39	AtNPR2/AtNIMIN2 // AtTGA7	0,18	0,06
+ 0,3 mM SA	9,99	0,38	+ 0,3 mM SA	2,06	0,47
AtNPR2/AtNIMIN2 // AtTGA3	7,51	0,70	AtNPR2/AtNIMIN3 // AtTGA7	0,28	0,02
+ 0,3 mM SA	24,31	1,52	+ 0,3 mM SA	2,89	0,29
AtNPR2/AtNIMIN3 // AtTGA3	4,70	0,67			
+ 0,3 mM SA	11,79	0,85			
pGBT9 // pGAD424	0,17	0,07			
AtNPR2/- // AtTGA6	4,47	0,31			

zu Abb. 29B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,46	0,06
AtNPR3/- // AtTGA2	33,74	3,84
+ 0,3 mM SA	29,29	2,56
AtNPR3/AtNIMIN1 // AtTGA2	6,29	0,38
+ 0,3 mM SA	7,68	1,60
AtNPR3/AtNIMIN2 // AtTGA2	21,54	0,81
+ 0,3 mM SA	14,89	1,40
AtNPR3/AtNIMIN3 // AtTGA2	8,90	1,05
+ 0,3 mM SA	8,78	1,49
pGBT9 // pGAD424	0,20	0,01
AtNPR3/- // AtTGA3	10,45	1,73
+ 0,3 mM SA	16,36	1,16
AtNPR3/AtNIMIN1 // AtTGA3	5,57	1,96
+ 0,3 mM SA	11,41	1,59
AtNPR3/AtNIMIN2 // AtTGA3	6,14	0,89
+ 0,3 mM SA	25,34	1,08
AtNPR3/AtNIMIN3 // AtTGA3	4,70	0,89
+ 0,3 mM SA	9,81	1,76
pGBT9 // pGAD424	0,26	0,02
AtNPR3/- // AtTGA6	18,56	0,91
+ 0,3 mM SA	9,98	0,75
AtNPR3/AtNIMIN1 // AtTGA6	3,20	0,52
+ 0,3 mM SA	4,26	0,85
AtNPR3/AtNIMIN2 // AtTGA6	10,40	1,49
+ 0,3 mM SA	7,12	0,52
AtNPR3/AtNIMIN3 // AtTGA6	5,63	0,82
+ 0,3 mM SA	4,09	0,24
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,04
AtNPR3/- // AtTGA7	8,34	0,66
+ 0,3 mM SA	7,20	0,40
AtNPR3/AtNIMIN1 // AtTGA7	1,59	0,55
+ 0,3 mM SA	7,16	1,47
AtNPR3/AtNIMIN2 // AtTGA7	6,14	0,59
+ 0,3 mM SA	9,56	1,03
AtNPR3/AtNIMIN3 // AtTGA7	2,97	0,23
+ 0,3 mM SA	9,22	0,64

zu Abb. 29C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,45	0,02
AtNPR4/- // AtTGA2	27,13	5,62
+ 0,3 mM SA	26,66	3,78
AtNPR4/AtNIMIN1 // AtTGA2	5,79	0,55
+ 0,3 mM SA	7,37	1,18
AtNPR4/AtNIMIN2 // AtTGA2	12,00	1,65
+ 0,3 mM SA	25,43	3,12
AtNPR4/AtNIMIN3 // AtTGA2	6,89	0,21
+ 0,3 mM SA	9,48	1,30
pGBT9 // pGAD424	0,32	0,02
AtNPR4/- // AtTGA3	22,45	0,83
+ 0,3 mM SA	28,37	0,44
AtNPR4/AtNIMIN1 // AtTGA3	4,99	0,43
+ 0,3 mM SA	9,31	1,96
AtNPR4/AtNIMIN2 // AtTGA3	12,19	2,02
+ 0,3 mM SA	27,76	0,31
AtNPR4/AtNIMIN3 // AtTGA3	8,10	0,41
+ 0,3 mM SA	10,81	1,66
pGBT9 // pGAD424	0,17	0,06
AtNPR4/- // AtTGA6	10,20	1,19
+ 0,3 mM SA	14,92	0,97
AtNPR4/AtNIMIN1 // AtTGA6	1,97	0,37
+ 0,3 mM SA	2,84	0,66
AtNPR4/AtNIMIN2 // AtTGA6	4,67	1,15
+ 0,3 mM SA	7,82	1,35
AtNPR4/AtNIMIN3 // AtTGA6	3,00	0,62
+ 0,3 mM SA	3,83	0,33
pGBT9 // pGAD424	0,33	0,02
AtNPR4/- // AtTGA7	9,99	0,47
+ 0,3 mM SA	18,04	2,60
AtNPR4/AtNIMIN1 // AtTGA7	3,00	0,56
+ 0,3 mM SA	2,61	0,57
AtNPR4/AtNIMIN2 // AtTGA7	5,54	1,43
+ 0,3 mM SA	13,20	2,09
AtNPR4/AtNIMIN3 // AtTGA7	1,87	0,11
+ 0,3 mM SA	4,92	0,29

zu Abb. 30A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	33,53	3,96
+ 0,3 mM SA	7,25	1,50
AtNPR1 // pGAD424	0,05	0,00
+ 0,3 mM SA	0,06	0,01
AtNPR1 // AtNPR1	0,06	0,00
+ 0,3 mM SA	0,13	0,02
AtNPR1 // AtNPR2	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,11	0,03
AtNPR1 // AtNPR3	0,08	0,02
+ 0,3 mM SA	0,12	0,05
AtNPR1 // AtNPR4	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,01

zu Abb. 30C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	18,99	1,47
+ 0,3 mM SA	6,60	1,12
AtNPR1 // AtNPR2	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,12	0,01
AtNPR3 // AtNPR2	0,04	0,00
+ 0,3 mM SA	0,16	0,07
AtNPR4 // AtNPR2	0,03	0,01
+ 0,3 mM SA	0,12	0,01

zu Abb. 30E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,21	0,11
AtNIMIN1 // AtNPR1	32,94	1,91
+ 0,3 mM SA	3,57	0,73
AtNPR4 // AtNPR4	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,11	0,02
AtNPR4 // AtNPR1	0,04	0,01
+ 0,3 mM SA	0,02	0,00

zu Abb. 30B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	18,99	1,47
+ 0,3 mM SA	6,60	1,12
AtNPR2 // AtNPR2	0,04	0,01
+ 0,3 mM SA	0,46	0,03
AtNPR2 // AtNPR1	0,48	0,16
+ 0,3 mM SA	0,64	0,16
AtNPR2 // AtNPR3	0,03	0,00
+ 0,3 mM SA	0,41	0,14
AtNPR2 // AtNPR4	0,03	0,00
+ 0,3 mM SA	0,39	0,03

zu Abb. 30D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
AtNPR3 // AtTGA6	37,73	1,77
+ 0,3 mM SA	22,53	1,13
AtNPR3 // AtNPR3	0,13	0,00
+ 0,3 mM SA	0,30	0,09
AtNPR3 // AtNPR1	0,10	0,01
+ 0,3 mM SA	0,16	0,01

zu Abb. 30F

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNIMIN1 // AtNPR1	30,02	3,84
+ 0,3 mM SA	8,17	0,74
AtNPR3 // AtNPR4	0,06	0,02
+ 0,3 mM SA	0,14	0,03
AtNPR4 // AtNPR3	0,07	0,02
+ 0,3 mM SA	0,22	0,08

zu Abb. 31

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNIMIN2 // AtNPR1	7,54	0,77
+ 0,3 mM SA	0,83	0,07
AtCullin3 // pGAD424	0,09	0,02
+ 0,3 mM SA	0,08	0,01
AtCullin3 // AtNPR1	0,09	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,01
AtCullin3 // AtNPR3	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	0,07	0,01
AtCullin3 // NtNPR1	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,00

zu Abb. 32

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,02
AtNPR1 // AtTGA2 // pGAD424	0,08	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02
AtNPR1 // AtTGA2 // AtNIMIN1pA	7,31	1,94
+ 0,3 mM SA	0,39	0,07
AtNPR1 // AtTGA2 // AtNPR1	0,20	0,10
+ 0,3 mM SA	0,34	0,02

zu Abb. 33

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,01
NtNPR1 // NtNPR1	16,43	0,76
+ 0,3 mM SA	12,57	1,55
AtNPR1 // NtNPR1	0,09	0,02
+ 0,3 mM SA	0,13	0,15
AtNPR3 // NtNPR1	0,58	0,07
+ 0,3 mM SA	0,37	0,13
AtNPR4 // NtNPR1	0,29	0,05
+ 0,3 mM SA	0,87	0,31

zu Abb. 35A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,28	0,05	pGBT9 // pGAD424	0,55	0,10
AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	22,37	1,60	AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	29,00	2,98
+ 0,3 mM SA	2,23	0,74	+ 0,003 mM SA	28,52	2,66
+ 0,3 mM BA	9,65	0,86	+ 0,003 mM BA	30,20	6,26
+ 0,3 mM AA	11,15	2,26	+ 0,003 mM AA	31,94	5,79
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,64	0,10	+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	17,76	7,69
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	1,88	0,38	+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	30,84	6,06
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,72	0,11	+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	24,45	1,16
pGBT9 // pGAD424	0,29	0,03			
AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	23,52	1,73			
+ 0,03 mM SA	13,64	1,21			
+ 0,03 mM BA	24,22	4,29			
+ 0,03 mM AA	23,94	3,61			
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,56	1,14			
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	10,61	1,39			
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	3,40	0,31			

zu Abb. 35B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNIMIN2 // AtNPR1	25,65	4,09
+ 0,3 mM SA	3,75	1,45
+ 0,18 mM SA	6,84	0,73
+ 0,1 mM SA	8,14	0,61
+ 0,05 mM SA	13,45	2,53
+ 0,03 mM SA	17,38	2,64
+ 0,018 mM SA	17,11	2,18
+ 0,01 mM SA	22,17	1,52
+ 0,003 mM SA	30,12	2,54
+ 0,001 mM SA	31,59	3,28

zu Abb. 35C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	20,33	0,95
+ 0,1 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,42	0,24
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	4,92	1,21
+ 0,01 mM 3,5-DCA (DMSO)	7,87	0,39
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	17,03	0,53
+ 0,001 mM 3,5-DCA (DMSO)	21,63	0,50
+ 0,0003 mM 3,5-DCA (DMSO)	21,51	0,65
+ 0,0001 mM 3,5-DCA (DMSO)	30,14	0,44

zu Abb. 37

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,22	0,01	pGBT9 // pGAD424	0,32	0,02
AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	19,83	0,88	AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	43,68	4,48
+ 0,3 mM SA	3,71	1,14	+ 0,003 mM SA	38,99	3,42
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	14,00	2,34	+ 0,003 mM BTH (DMSO)	31,49	3,44
+ 0,3 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	8,43	1,18	+ 0,003 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	38,01	6,45
+ 0,3 mM INA (DMSO)	10,78	3,63	+ 0,003 mM INA (DMSO)	36,93	4,08
pGBT9 // pGAD424	0,36	0,04			
AtNIMIN2 // AtNPR1 (DMSO)	32,31	2,56			
+ 0,03 mM SA	15,26	3,52			
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	27,90	6,18			
+ 0,03 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	19,92	5,62			
+ 0,03 mM INA (DMSO)	17,50	1,15			

zu Abb. 38A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,21	0,02
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA2 (DMSO)	10,64	0,35
+ 0,3 mM SA	2,40	0,30
+ 0,3 mM BA	6,75	0,37
+ 0,3 mM 4-OH BA	10,47	0,27
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	2,15	0,13
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	7,63	0,58
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA2 (DMSO)	6,24	0,40
+ 0,3 mM SA	6,30	0,67
+ 0,3 mM BA	6,58	0,74
+ 0,3 mM 4-OH BA	5,37	0,49
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	4,06	0,83
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	5,35	0,78

zu Abb. 38B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,15	0,02
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA3 (DMSO)	16,59	1,10
+ 0,3 mM SA	4,80	0,52
+ 0,3 mM BA	8,38	0,63
+ 0,3 mM 4-OH BA	15,10	1,17
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	4,43	0,64
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	12,36	1,35
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA3 (DMSO)	5,75	1,69
+ 0,3 mM SA	6,93	2,58
+ 0,3 mM BA	4,09	0,39
+ 0,3 mM 4-OH BA	6,70	0,70
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,38	0,49
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	6,15	1,86

zu Abb. 38C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNIMIN1 / AtNPR1 // AtTGA7 (DMSO)	2,87	0,41
+ 0,3 mM SA	0,43	0,24
+ 0,3 mM BA	1,79	0,24
+ 0,3 mM 4-OH BA	3,02	0,16
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,77	0,12
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	2,69	0,21
AtNIMIN2 / AtNPR1 // AtTGA7 (DMSO)	1,02	0,10
+ 0,3 mM SA	2,15	0,36
+ 0,3 mM BA	1,93	0,15
+ 0,3 mM 4-OH BA	1,59	0,14
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,58	0,03
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	1,43	0,24

zu Abb. 39B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,02
AtNPR2 // AtTGA7	9,62	1,37
+ 0,3 mM SA	40,90	0,16
AtNPR2 R432K // AtTGA7	7,95	1,69
+ 0,3 mM SA	6,95	1,13

zu Abb. 39C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNPR2 // AtTGA7	4,55	0,59
+ 0,3 mM SA	21,29	0,73
+ 0,18 mM SA	19,95	0,76
+ 0,1 mM SA	20,86	0,36
+ 0,05 mM SA	19,23	0,36
+ 0,03 mM SA	17,05	0,42
+ 0,018 mM SA	12,84	0,69
+ 0,01 mM SA	11,14	0,46
+ 0,003 mM SA	7,40	0,27
+ 0,001 mM SA	5,13	0,94

zu Abb. 40B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,02
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,19	0,04
+ 0,3 mM SA	6,26	1,07
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586) F502/503S	0,14	0,03
+ 0,3 mM SA	0,10	0,02

zu Abb. 41A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,13	0,01
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,15	0,01
+ 0,3 mM SA	1,32	0,47
+ 0,3 mM BA	0,41	0,11
+ 0,3 mM AA	0,24	0,04
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,85	0,26
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	0,05	0,02
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,65	0,14
pGBT9 // pGAD424	0,12	0,00
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,16	0,02
+ 0,03 mM SA	0,35	0,12
+ 0,03 mM BA	0,25	0,02
+ 0,03 mM AA	0,13	0,02
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,71	0,66
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,15	0,03
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	1,37	0,78
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,13	0,02
+ 0,003 mM SA	0,15	0,04
+ 0,003 mM BA	0,13	0,03
+ 0,003 mM AA	0,14	0,02
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,71	0,33
+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	0,16	0,03
+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,72	0,14

zu Abb. 41B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,13	0,01
+ 0,3 mM SA	4,22	0,46
+ 0,18 mM SA	2,72	0,14
+ 0,1 mM SA	1,96	0,08
+ 0,05 mM SA	1,11	0,15
+ 0,03 mM SA	0,71	0,18
+ 0,018 mM SA	0,60	0,06
+ 0,01 mM SA	0,30	0,06
+ 0,003 mM SA	0,20	0,01
+ 0,001 mM SA	0,20	0,02

zu Abb. 41C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,19	0,05
+ 0,0003 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,23	0,02
+ 0,001 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,40	0,16
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,78	0,54
+ 0,005 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,38	0,56
+ 0,007 mM 3,5-DCA (DMSO)	4,28	0,42
+ 0,01 mM 3,5-DCA (DMSO)	5,37	0,22
+ 0,018 mM 3,5-DCA (DMSO)	6,29	0,64
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	6,77	0,73
+ 0,05 mM 3,5-DCA (DMSO)	7,63	0,60
+ 0,1 mM 3,5-DCA (DMSO)	7,29	0,68

zu Abb. 42

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,00	pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,12	0,02	AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,17	0,03
+ 0,3 mM SA	2,07	0,65	+ 0,003 mM SA	0,18	0,04
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	0,13	0,04	+ 0,003 mM BTH (DMSO)	0,17	0,04
+ 0,3 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	1,41	0,44	+ 0,003 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	0,17	0,03
+ 0,3 mM INA (DMSO)	0,43	0,16	+ 0,003 mM INA (DMSO)	0,18	0,04
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01			
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,12	0,01			
+ 0,03 mM SA	0,36	0,11			
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	0,18	0,05			
+ 0,03 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	0,30	0,06			
+ 0,03 mM INA (DMSO)	0,14	0,02			

zu Abb. 43A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,03
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,13	0,00
+ 0,3 mM SA	1,89	0,58
+ 0,3 mM BA	0,14	0,01
+ 0,3 mM AA	0,10	0,01
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,11	0,02
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	0,06	0,02
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,07	0,01
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,10	0,03
+ 0,03 mM SA	0,29	0,10
+ 0,03 mM BA	0,08	0,00
+ 0,03 mM AA	0,07	0,01
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,10	0,01
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,06	0,01
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,10	0,04
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,02
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,11	0,05
+ 0,003 mM SA	0,15	0,07
+ 0,003 mM BA	0,09	0,01
+ 0,003 mM AA	0,07	0,02
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,06	0,03
+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	0,09	0,02
+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,06	0,01

zu Abb. 43B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,05	0,00
+ 0,3 mM SA	1,38	0,20
+ 0,18 mM SA	1,35	0,09
+ 0,1 mM SA	1,04	0,12
+ 0,05 mM SA	0,50	0,05
+ 0,03 mM SA	0,34	0,08
+ 0,018 mM SA	0,16	0,02
+ 0,01 mM SA	0,09	0,01
+ 0,003 mM SA	0,08	0,01
+ 0,001 mM SA	0,07	0,01

zu Abb. 44

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,11	0,01
+ 0,3 mM SA	2,78	0,29
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	0,22	0,05
+ 0,3 mM Acibenzolensäure (DMSO)	0,58	0,04
+ 0,3 mM INA (DMSO)	0,32	0,07
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,02
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,11	0,03
+ 0,03 mM SA	0,66	0,07
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	0,13	0,02
+ 0,03 mM Acibenzolensäure (DMSO)	0,15	0,03
+ 0,03 mM INA (DMSO)	0,13	0,01
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,12	0,04
+ 0,003 mM SA	0,15	0,03
+ 0,003 mM BTH (DMSO)	0,12	0,02
+ 0,003 mM Acibenzolensäure (DMSO)	0,21	0,03
+ 0,003 mM INA (DMSO)	0,23	0,01

zu Abb. 45B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,03
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	1,50	0,16
AtNPR4 (373/455) K418R // AtNPR4 (456/574)	0,05	0,00
+ 0,3 mM SA	2,47	0,38

zu Abb. 45C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
AtNPR4 (373/455) K418R // AtNPR4 (456/574)	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,83	0,07
+ 0,18 mM SA	0,72	0,04
+ 0,1 mM SA	0,48	0,05
+ 0,05 mM SA	0,36	0,02
+ 0,03 mM SA	0,19	0,05
+ 0,018 mM SA	0,13	0,04
+ 0,01 mM SA	0,05	0,03
+ 0,003 mM SA	0,06	0,01
+ 0,001 mM SA	0,05	0,02

zu Abb. 45D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,03
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	1,50	0,16
AtNPR4 (373/455) R419K // AtNPR4 (456/574)	0,06	0,01
+ 0,3 mM SA	0,08	0,02

zu Abb. 45E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,15	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,15	0,01
+ 0,3 mM SA	2,11	0,15
AtNPR4 (373/455) K418R R419K // AtNPR4 (456/574)	0,15	0,02
+ 0,3 mM SA	0,11	0,03

zu Abb. 46

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,11	0,04
AtNPR1 (387/467) // AtNPR1 (468/593)	0,09	0,01
+ 0,3 mM SA	0,11	0,02
AtNPR2 (386/467) // AtNPR2 (468/600)	0,33	0,04
+ 0,3 mM SA	0,26	0,06
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,11	0,02
+ 0,3 mM SA	2,19	0,46
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,10	0,00
+ 0,3 mM SA	1,76	0,29
AtNPR1 (387/467) // AtNPR2 (468/600)	0,11	0,01
+ 0,3 mM SA	0,07	0,00
AtNPR1 (387/467) // AtNPR3 (463/586)	0,16	0,05
+ 0,3 mM SA	0,07	0,02
AtNPR1 (387/467) // AtNPR4 (456/574)	0,08	0,02
+ 0,3 mM SA	0,05	0,02

zu Abb. 46

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,07	0,00
AtNPR1 (387/467) // AtNPR1 (468/593)	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,09	0,02
AtNPR2 (386/467) // AtNPR2 (468/600)	0,43	0,07
+ 0,3 mM SA	0,22	0,04
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,11	0,01
+ 0,3 mM SA	1,65	0,17
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,08	0,03
+ 0,3 mM SA	2,09	0,16
AtNPR3 (383/462) // AtNPR2 (468/600)	0,14	0,03
+ 0,3 mM SA	0,08	0,00
AtNPR4 (373/455) // AtNPR2 (468/600)	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,03	0,00

zu Abb. 46A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,02
AtNPR2 (385/467) // AtNPR1 (468/593)	0,64	0,23
+ 0,3 mM SA	21,74	3,21
+ 0,3 mM BA	16,35	2,30
+ 0,3 mM AA	7,12	2,05
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	19,54	1,89
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	6,71	1,69
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	15,17	2,03

zu Abb. 46B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,03
AtNPR3 (383/462) // AtNPR1 (468/593)	0,13	0,04
+ 0,3 mM SA	3,35	0,24
+ 0,3 mM BA	0,68	0,08
+ 0,3 mM AA	0,29	0,04
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	2,11	0,14
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,17	0,07
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	1,02	0,22

zu Abb. 46C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR1 (468/593)	0,09	0,00
+ 0,3 mM SA	2,12	0,28
+ 0,3 mM BA	2,04	0,13
+ 0,3 mM AA	0,87	0,10
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	2,34	0,09
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,21	0,02
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	1,15	0,11

zu Abb. 46D

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,01
AtNPR2 (385/467) // AtNPR3 (463/586)	0,42	0,23
+ 0,3 mM SA	2,51	0,45
+ 0,3 mM BA	1,28	0,15
+ 0,3 mM AA	0,85	0,20
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	4,64	0,45
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,99	0,20
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	2,69	0,55

zu Abb. 46E

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,13	0,01
AtNPR3 (383/462) // AtNPR3 (463/586)	0,15	0,01
+ 0,3 mM SA	1,32	0,47
+ 0,3 mM BA	0,41	0,11
+ 0,3 mM AA	0,24	0,04
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,71	0,66
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,15	0,03
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	1,37	0,78

zu Abb. 46F

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,01
AtNPR4 (373/455) // AtNPR3 (463/586)	0,07	0,00
+ 0,3 mM SA	0,92	0,18
+ 0,3 mM BA	0,15	0,01
+ 0,3 mM AA	0,12	0,00
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,07	0,12
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,08	0,04
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,14	0,01

zu Abb. 46 G

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,02
AtNPR2 (385/467) // AtNPR4 (456/574)	0,55	0,17
+ 0,3 mM SA	2,38	0,32
+ 0,3 mM BA	0,68	0,23
+ 0,3 mM AA	0,42	0,06
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	7,32	0,98
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,73	0,03
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	2,88	0,60

zu Abb. 46H

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,09	0,02
AtNPR3 (383/462) // AtNPR4 (456/574)	0,13	0,01
+ 0,3 mM SA	2,80	0,15
+ 0,3 mM BA	0,24	0,08
+ 0,3 mM AA	0,18	0,02
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	1,25	0,11
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,18	0,02
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,17	0,00

zu Abb. 46I

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,14	0,03
AtNPR4 (373/455) // AtNPR4 (456/574)	0,13	0,00
+ 0,3 mM SA	1,89	0,58
+ 0,3 mM BA	0,14	0,01
+ 0,3 mM AA	0,10	0,01
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,10	0,01
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,06	0,01
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,10	0,04

zu Abb. 48A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,37	0,04
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,47	0,11
+ 0,3 mM SA	30,74	2,00
+ 0,3 mM BA	38,33	5,67
+ 0,3 mM AA	26,72	2,98
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	8,61	3,26
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	20,12	1,87
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	14,89	4,40
+ 0,3 mM CA (DMSO)	3,42	0,20
pGBT9 // pGAD424	0,37	0,09
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,50	0,27
+ 0,03 mM SA	30,92	6,07
+ 0,03 mM BA	30,28	5,34
+ 0,03 mM AA	6,71	0,63
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	33,34	6,33
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	15,26	0,80
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	23,63	11,45
+ 0,03 mM CA (DMSO)	2,40	0,38
pGBT9 // pGAD424	0,32	0,06
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,03	0,11
+ 0,003 mM SA	14,60	0,94
+ 0,003 mM BA	17,59	3,51
+ 0,003 mM AA	1,23	0,07
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	25,59	4,38
+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	9,44	1,83
+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	18,37	6,30
+ 0,003 mM CA (DMSO)	1,10	0,22

zu Abb. 48B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,55	0,03
NtNIMIN2a // NtNPR1	43,71	1,59
+ 0,3 mM SA	0,64	0,03
+ 0,3 mM BA	0,62	0,14
+ 0,3 mM AA	0,60	0,18
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,36	0,05
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	0,56	0,07
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,46	0,18
pGBT9 // pGAD424	0,50	0,04
NtNIMIN2a // NtNPR1	43,12	5,11
+ 0,03 mM SA	4,57	1,09
+ 0,03 mM BA	1,36	0,19
+ 0,03 mM AA	29,29	6,27
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,68	0,10
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	3,41	0,26
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	1,36	0,39
pGBT9 // pGAD424	0,27	0,09
NtNIMIN2a // NtNPR1	33,05	5,43
+ 0,003 mM SA	8,13	0,92
+ 0,003 mM BA	5,22	0,95
+ 0,003 mM AA	37,98	1,90
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,80	0,55
+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	14,22	1,84
+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	6,26	0,21

zu Abb. 49A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNIMIN2a // NtNPR1	49,54	5,40
+ 0,00001 mM SA	47,61	2,95
+ 0,00003 mM SA	49,06	7,97
+ 0,0001 mM SA	43,70	2,94
+ 0,0002 mM SA	40,21	2,71
+ 0,0005 mM SA	32,16	0,97
+ 0,001 mM SA	19,97	1,34
+ 0,003 mM SA	15,42	2,17
+ 0,01 mM SA	8,92	0,79
+ 0,03 mM SA	4,96	1,83

zu Abb. 49B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	0,95	0,09
+ 0,0001 mM SA	2,88	0,06
+ 0,0002 mM SA	3,73	0,21
+ 0,0005 mM SA	7,67	0,25
+ 0,001 mM SA	9,52	0,77
+ 0,003 mM SA	13,55	1,09
+ 0,005 mM SA	19,05	0,86
+ 0,01 mM SA	22,20	1,57
+ 0,03 mM SA	24,07	2,12
+ 0,1 mM SA	27,81	1,47
+ 0,3 mM SA	25,35	1,06

zu Abb. 49A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNIMIN2a // NtNPR1 (DMSO)	40,63	2,00
+ 0,00001 mM 3,5-DCA (DMSO)	34,24	2,91
+ 0,00003 mM 3,5-DCA (DMSO)	34,98	3,82
+ 0,0001 mM 3,5-DCA (DMSO)	21,80	4,45
+ 0,0002 mM 3,5-DCA (DMSO)	18,71	3,38
+ 0,0005 mM 3,5-DCA (DMSO)	14,56	0,49
+ 0,001 mM 3,5-DCA (DMSO)	8,34	2,43
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	8,17	1,08
+ 0,01 mM 3,5-DCA (DMSO)	5,19	2,62
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,25	0,06

zu Abb. 49B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588) (DMSO)	1,08	0,02
+ 0,00001 mM 3,5-DCA (DMSO)	2,37	0,18
+ 0,00003 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,01	0,75
+ 0,0001 mM 3,5-DCA (DMSO)	3,82	1,50
+ 0,0002 mM 3,5-DCA (DMSO)	5,38	1,32
+ 0,0005 mM 3,5-DCA (DMSO)	11,55	1,84
+ 0,001 mM 3,5-DCA (DMSO)	18,82	1,78
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	25,13	0,93
+ 0,01 mM 3,5-DCA (DMSO)	29,50	2,32
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	35,33	2,82

zu Abb. 49C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNPR1 // pGAD424	0,19	0,03
+ 0,00001 mM SA	0,22	0,02
+ 0,00003 mM SA	0,27	0,06
+ 0,0001 mM SA	0,47	0,06
+ 0,0002 mM SA	0,66	0,13
+ 0,0005 mM SA	0,86	0,13
+ 0,001 mM SA	1,11	0,16
+ 0,003 mM SA	1,32	0,07
+ 0,01 mM SA	1,67	0,14
+ 0,03 mM SA	1,46	0,13

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNPR1 // pGAD424	0,08	0,01
+ 0,00001 mM BA	0,08	0,02
+ 0,00003 mM BA	0,09	0,02
+ 0,0001 mM BA	0,14	0,02
+ 0,0002 mM BA	0,25	0,04
+ 0,0005 mM BA	0,37	0,05
+ 0,001 mM BA	0,63	0,04
+ 0,003 mM BA	0,77	0,09
+ 0,01 mM BA	0,81	0,07
+ 0,03 mM BA	0,91	0,10

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNPR1 // pGAD424 (DMSO)	0,15	0,02
+ 0,00001 mM 3,5-DCA	0,27	0,09
+ 0,00003 mM 3,5-DCA	0,36	0,09
+ 0,0001 mM 3,5-DCA	0,57	0,14
+ 0,0002 mM 3,5-DCA	0,89	0,18
+ 0,0005 mM 3,5-DCA	0,99	0,15
+ 0,001 mM 3,5-DCA	1,37	0,08
+ 0,003 mM 3,5-DCA	1,56	0,02
+ 0,01 mM 3,5-DCA	1,80	0,13
+ 0,03 mM 3,5-DCA	2,00	0,19

zu Abb. 50A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,06	0,03
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,13	0,22
+ 0,3 mM SA	32,58	1,76
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	25,48	2,12
+ 0,3 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	36,20	2,26
+ 0,3 mM INA (DMSO)	30,15	2,31
pGBT9 // pGAD424	0,19	0,04
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,13	0,08
+ 0,03 mM SA	34,60	4,32
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	9,32	1,50
+ 0,03 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	17,64	2,25
+ 0,03 mM INA (DMSO)	6,59	0,95
pGBT9 // pGAD424	0,16	0,01
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,03	0,07
+ 0,003 mM SA	11,36	1,60
+ 0,003 mM BTH (DMSO)	1,29	0,37
+ 0,003 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	7,64	0,95
+ 0,003 mM INA (DMSO)	1,21	0,21

zu Abb. 51A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	1,07	0,11
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,96	0,31
+ 0,3 mM SA	17,14	3,49
+ 0,3 mM BA	24,74	2,66
+ 0,3 mM β -Aminobuttersäure	1,02	0,32
+ 0,3 mM Pipecolinsäure	0,99	0,10
+ 0,3 mM Azelainsäure (DMSO)	1,10	0,29

zu Abb. 50B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,02
NtNIMIN2a // NtNPR1 (DMSO)	16,91	0,40
+ 0,3 mM SA	0,20	0,02
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	4,46	1,55
+ 0,3 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	0,41	0,04
+ 0,3 mM INA (DMSO)	0,72	0,02
pGBT9 // pGAD424	0,27	0,00
NtNIMIN2a // NtNPR1 (DMSO)	40,47	5,93
+ 0,03 mM SA	8,00	2,53
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	28,24	2,85
+ 0,03 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	10,17	3,04
+ 0,03 mM INA (DMSO)	24,74	3,15
pGBT9 // pGAD424	0,40	0,01
NtNIMIN2a // NtNPR1 (DMSO)	42,86	6,76
+ 0,003 mM SA	10,27	1,14
+ 0,003 mM BTH (DMSO)	41,34	2,56
+ 0,003 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	21,19	5,90
+ 0,003 mM INA (DMSO)	49,92	1,89

zu Abb. 51B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,21	0,10
NtNIMIN2a // NtNPR1	24,51	1,79
+ 0,3 mM SA	0,61	0,19
+ 0,3 mM β -Aminobuttersäure	25,22	1,65

zu Abb. 53A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,00	pGBT9 // pGAD424	0,08	0,01
NtNIMIN2a // NtNPR3	0,73	0,32	NtNIMIN2a // NtNPR3	1,16	0,35
+ 0,3 mM SA	0,04	0,00	+ 0,003 mM SA	0,22	0,02
+ 0,3 mM BA	0,02	0,01	+ 0,003 mM BA	0,10	0,02
+ 0,3 mM AA	0,05	0,01	+ 0,003 mM AA	0,73	0,21
+ 0,3 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,01	0,00	+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,13	0,02
+ 0,3 mM 4-CB (DMSO)	0,01	0,01	+ 0,003 mM 4-CB (DMSO)	0,17	0,08
+ 0,3 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,01	0,01	+ 0,003 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,27	0,05

zu Abb. 53A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,00
NtNIMIN2a // NtNPR3	0,90	0,19
+ 0,03 mM SA	0,24	0,07
+ 0,03 mM BA	0,06	0,00
+ 0,03 mM AA	0,45	0,09
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,04	0,01
+ 0,03 mM 4-CB (DMSO)	0,04	0,00
+ 0,03 mM 3,5-DCB (DMSO)	0,08	0,01

zu Abb. 53B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNIMIN2a // NtNPR3	0,84	0,05
+ 0,0001 mM SA	0,70	0,07
+ 0,0002 mM SA	0,55	0,09
+ 0,0005 mM SA	0,46	0,05
+ 0,001 mM SA	0,35	0,05
+ 0,003 mM SA	0,36	0,03
+ 0,005 mM SA	0,33	0,06
+ 0,01 mM SA	0,20	0,09
+ 0,03 mM SA	0,12	0,05
+ 0,1 mM SA	0,07	0,03
+ 0,3 mM SA		

zu Abb. 53C

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
NtNIMIN2a // NtNPR3 (DMSO)	0,61	0,07
+ 0,00001 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,65	0,07
+ 0,00003 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,63	0,06
+ 0,0001 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,54	0,05
+ 0,0002 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,43	0,08
+ 0,0005 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,30	0,07
+ 0,001 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,12	0,05
+ 0,003 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,10	0,06
+ 0,01 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,03	0,01
+ 0,03 mM 3,5-DCA (DMSO)	0,02	0,00

zu Abb. 54

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW	GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,05	0,02	pGBT9 // pGAD424	0,11	0,01
NtNIMIN2a // NtNPR3 (DMSO)	0,66	0,07	NtNIMIN2a // NtNPR3 (DMSO)	2,97	0,07
+ 0,3 mM SA	0,02	0,01	+ 0,003 mM SA	0,60	0,24
+ 0,3 mM BTH (DMSO)	0,09	0,02	+ 0,003 mM BTH (DMSO)	1,88	0,43
+ 0,3 mM Acibenolarsäure (DMSO)	0,06	0,01	+ 0,003 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	1,12	0,12
+ 0,3 mM INA (DMSO)	0,07	0,01	+ 0,003 mM INA (DMSO)	2,86	0,20
pGBT9 // pGAD424	0,09	0,01			
NtNIMIN2a // NtNPR3 (DMSO)	1,75	0,11			
+ 0,03 mM SA	0,19	0,10			
+ 0,03 mM BTH (DMSO)	0,61	0,06			
+ 0,03 mM Acibenzolarsäure (DMSO)	0,59	0,13			
+ 0,03 mM INA (DMSO)	1,28	0,05			

zu Abb. 55

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,08	0,00
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/588)	1,40	0,29
+ 0,3 mM SA	14,50	1,07
NtNPR1 (386/465) // NtNPR1 (466/521) Δ1	0,08	0,00
+ 0,3 mM SA	3,78	0,37
NtNPR1 (386/465) // NtNPR3 (469/588)	0,15	0,03
+ 0,3 mM SA	0,79	0,24
NtNPR1 (386/465) // NtNPR3 (469/528) Δ1	0,10	0,01
+ 0,3 mM SA	5,62	0,47
NtNPR3 (389/468) // NtNPR3 (469/588)	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,05	0,01
NtNPR3 (389/468) // NtNPR3 (469/528) Δ1	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,05	0,02
NtNPR3 (389/468) // NtNPR1 (466/588)	0,07	0,01
+ 0,3 mM SA	0,22	0,02
NtNPR3 (389/468) // NtNPR1 (466/521) Δ1	0,05	0,03
+ 0,3 mM SA	0,05	0,01

zu Abb. 86A

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,10	0,01
NtNIMIN1-like // NtNPR3	10,61	0,73
+ 0,3 mM SA	0,55	0,23
NtNIMIN1-like // NtNPR3-INS	0,05	0,00
+ 0,3 mM SA	0,05	0,00
NtNIMIN2a // NtNPR3	4,85	0,48
+ 0,3 mM SA	0,08	0,03
NtNIMIN2a // NtNPR3-INS	0,05	0,01
+ 0,3 mM SA	0,04	0,01

zu Abb. 86B

GAL4BD // GAL4AD	MW	STABW
pGBT9 // pGAD424	0,09	0,01
NtNPR3 // NtTGA2.2	3,51	0,42
+ 0,3 mM SA	1,44	0,28
NtNPR3-INS // NtTGA2.2	0,09	0,02
+ 0,3 mM SA	0,10	0,04
NtNPR3 // NtTGA7	1,45	0,30
+ 0,3 mM SA	0,89	0,10
NtNPR3-INS // NtTGA7	0,11	0,02
+ 0,3 mM SA	0,10	0,02

II. Messwerte der β -Glucuronidase-Enzymaktivitätstests

zu Abb. 52A

Bezeichnung	GUS-Einheiten	
	MW	StabW
H ₂ O	1,63	0,22
0,5% DMSO	10,60	15,90
1 mM Salicylsäure	378,01	12,93
1 mM β -Aminobuttersäure	144,84	30,76
1 mM Pípecolinsäure	218,01	140,35
1 mM Azelainsäure	92,93	22,91

zu Abb. 52B

Bezeichnung	GUS-Einheiten
H ₂ O	11,68
1 mM Salicylsäure	271,45
1 mM Benzoesäure	47,45
0,3 mM BTH (Bion)	423,22

zu Abb. 66 A

Bezeichnung	GUS-Einheiten
138-3/7 # 47 H ₂ O	3,35
138-3/7 # 47	30,73
90H-7/7 #49	17,01
90H-7/7 #52	9,43
90H-7/7 #53	8,38
90H-7/7 #56	22,52
90H-7/7 #58	17,79
138-3/7 # 48 H ₂ O	6,35
138-3/7 # 48	19,12
90H-7/7 #64	20,83
90H-7/7 #65	10,89
90H-7/7 #66	24,00
90H-7/7 #67	9,04
90H-7/7 #68	16,25

III. Klonierungsstrategien

1. *Arabidopsis thaliana*

1.1 Klonierungen für das Hefe-Zwei-Hybridsystem

1.1.1 pGBT9/ bzw. pGAD424/AtNPR1(1/467)

Für die Klonierung von pGAD424/AtNPR1(1/467) wurde zunächst die Sequenz von AtNPR1(387/467) aus dem Vektor pGBT9 mittels *Bam*HI/*Sal*I Restriktion in den Vektor pGAD424 überführt. Anschließend wurde pGAD424/AtNPR1(387/467) über eine *Bam*HI/*Bst*API-Restriktion der N-terminale Teil der Größe 1,3 kb aus pGAD424/AtNPR1 hinzugefügt. Die Sequenz von AtNPR1(1/467) wurde ebenfalls in den Hefevektor pGBT9 überführt. Dies wurde mittels einer *Bam*HI/*Sal*I Restriktion durchgeführt.

1.1.2 pGBT9/ bzw. pGAD424/AtNPR1 H80Y BTB/POZ

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte über eine Overlap-Extension-PCR. Als Matrize diente eine 1:1000 Verdünnung der Konstruktion pGBT9/AtNPR1. Im ersten Klonierungsschritt wurden zwei Teilfragmente mit den Primerkombinationen npr1 forward/AtNPR1H80Y reverse und AtNPR1-M6/AtNPR1 H80Y forward mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die entstandenen Teilfragmente als Matrizen verwendet und mit der flankierenden Primerkombination npr1 forward/AtNPR1-M6 mittels PCR verbunden. Das dabei entstandene Amplifikat wurde in einen als T-Vektor präparierten pBS(KS+)-Vektor subkloniert und mittels Sequenzierung verifiziert. Im nächsten Schritt wurde die verifizierte Insertion über *Spe*I/*Pml*I aus dem T-Vektor isoliert und in die *Spe*I/*Pml*I restringierte Konstruktion pGAD424/AtNPR1 kloniert. Die dabei entstandene Konstruktion pGAD424/AtNPR1 H80Y wurde zur Verifikation sequenziert. Mittels eines *Bam*HI/*Sal*I Restriktionsverdaus wurde die verifizierte Insertion in den Hefevektor pGBT9 überführt.

1.1.3 pGBT9/AtNPR2(386/467) YENRV und pGAD424/AtNPR2(468/600) N1/2BD

Für die Klonierung der Domänen von AtNPR2 wurden als erstes aus genomischer DNA von *A. thaliana* drei Teilfragmente amplifiziert. Fragment I wurde mit der Primerkombination AtNPR2-3/-7 amplifiziert und enthält den Teil von Exon 2 mit dem unvollständigen Pentaaminosäuremotiv „YENR“. Fragment II wurde mittels der Primerkombination AtNPR2-8/-10 amplifiziert und enthält Exon 3 vollständig. Fragment III wurde mit der Primerkombination AtNPR2-9/-6 amplifiziert und beinhaltet Exon 4 ebenfalls vollständig. Im nächsten Schritt wurden die Teilfragmente miteinander verbunden. Fragment I und II mit Hilfe der flankierenden Primer AtNPR2-3 und AtNPR2-10 und Fragment II und III mittels AtNPR2-8 und AtNPR2-6. Aus den so entstandenen Fragmenten wurden nun die entsprechenden Domänen amplifiziert. Der Klon mit der Domäne „YENRV“ wurde mittels der Primerkombination

AtNPR2-3/-5 amplifiziert. Als Matrize diente dafür das Fragment I+II. Für den Klon mit der NIMIN1/NIMIN2-Bindedomäne wurde die Primerkombination AtNPR2-4/-6 und das Fragment II+III als Matrize verwendet. Die jeweiligen Amplifikate wurden in den T-Vektor subkloniert und mittels einer anschließenden Sequenzierung verifiziert. Im letzten Klonierungsschritt wurden die verifizierten Insertionen aus den T-Vektoren in die jeweiligen Hefektoren überführt. Dies erfolgte über einen *BamHI/SalI* Restriktionsverdau. Domäne „YENRV“ wurde in den pGBT9-Vektor überführt und Domäne „N1/N2BD“ in den pGAD424-Vektor.

1.1.4 pGBT9/ bzw. pGAD424/AtNPR2(386/600) cT

Die Amplifizierung des C-Terminus von AtNPR2 erfolgte über OE-PCR, wobei die Domänen „YENRV“ und „N1/N2BD“ als Matrizen dienten. Zuerst wurden mit Hilfe der Primerkombinationen AtNPR2-3/AtNPR2-12 für „YENRV“ und AtNPR2-11/AtNPR2-6 für „N1/N2BD“ die Sequenzen der Domänen für die OE-PCR modifiziert. Das bedeutet, dass am 3'-Ende der „YENRV“-Sequenz das Stopcodon und am 5'-Ende der „N1/N2BD“-Sequenz das Startcodon entfernt und ein überhängender Nukleotidbereich angefügt wurde. Dann wurden mittels einer weiteren PCR mit den flankierenden Primern AtNPR2-3 und AtNPR2-6 die so entstandenen Teilfragmente über den überhängenden Nukleotidbereich miteinander verbunden. Das Amplifikat wurde anschließend im T-Vektor subkloniert und über eine Sequenzierung verifiziert. Im letzten Klonierungsschritt wurde die verifizierte Insertion über eine *BamHI/SalI*-Restriktion aus dem T-Vektor in die Hefektoren pGBT9 und pGAD424 überführt.

1.1.5 pGBT9/AtNPR4(373/455) K418R R419K LERKV

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte über eine Overlap-Extension-PCR. Als Matrize wurde eine 1:1000 Verdünnung der Konstruktion pGBT9/AtNPR4(373/455) LEKRV verwendet. Im ersten Schritt wurden zwei Teilfragmente mit den Primerkombinationen AtNPR4-5/-16LERKV und AtNPR4-6/-15LERKV per PCR amplifiziert. Anschließend wurden die entstandenen Teilfragmente als Matrizen verwendet und mit der flankierenden Primerkombination AtNPR4-5/-6 mittels PCR verbunden. Das dabei entstandene Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und mittels einer Sequenzierung verifiziert. Im anschließenden Klonierungsschritt wurde die verifizierte Insertion aus dem T-Vektor mittels eines *BamHI/SalI* Restriktionsverdaus in den Hefektor pGBT9 überführt.

1.1.7 pGBT9/ bzw. pGAD424/AtTGA3

Die Sequenz von AtTGA3 lag als pUNI51/AtTGA3 vor. Für die Klonierung von AtTGA3 in die Hefektoren pGAD424 und pGBT9 wurde zuerst eine PCR durchgeführt. Die Konstruktion pUNI51/AtTGA3 diente hier als Matrize. Über die Primerkombination AtTGA3-1/-2 wurde die Sequenz amplifiziert und den 3'- und 5'-Enden jeweils eine *BamHI*-Schnittstelle hinzugefügt. Das 1,1 kb große Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und mittels einer anschließenden Sequenzierung

verifiziert. Die verifizierte Insertion wurde in einem anschließenden Klonierungsschritt über einen *Bam*HI-Restriktionsverdau in die Hefevektoren überführt. Hierfür wurden die mit *Bam*HI linearisierten Vektoren mittels *calf intestinal alkaline phosphatase* CIAP zuvor dephosphoryliert.

1.1.8 pGBT9/ bzw. pGAD424AtTGA7

Die Sequenz von AtTGA7 lag als pUNI51/AtTGA7 vor. Für die Klonierung von AtTGA7 in die Hefevektoren pGAD424 und pGBT9 wurde zuerst eine PCR durchgeführt. Die Konstruktion pUNI51/AtTGA7 diente hier als Matrize. Über die Primerkombination AtTGA7-1/-2 wurde die Sequenz amplifiziert und den 3'- und 5'-Ende jeweils eine *Bam*HI-Schnittstelle hinzugefügt. Das 1,1 kb große Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und mittels einer anschließenden Sequenzierung verifiziert. Die verifizierte Insertion wurde in einem anschließenden Klonierungsschritt über einen *Bam*HI-Restriktionsverdau in die Hefevektoren überführt. Hierfür wurden die mit *Bam*HI linearisierten Vektoren mittels CIAP zuvor dephosphoryliert.

1.2 Klonierungen für das Hefe-Drei-Hybridsystem

1.2.1 pBD-AtNPR1/AtTGA2

Zuerst wurde der leere pBD-/- Vektor mittels eines *Bgl*II-Restriktionsverdaus linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtTGA2 wurde über einen *Bam*HI-Verdau aus der pGAD424/AtTGA2-Konstruktion isoliert. Auf Grund der gleichen Überhänge, die bei der Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI entstehen, können der *Bgl*II restringierte Vektor und das *Bam*HI restringierte Fragment unter Verlust der Schnittstellen ligiert werden. Anschließend wurde die entstandene Konstruktion pBD-/AtTGA2 mittels *Bam*HI/*Sal*I-Restriktion linearisiert. Die Sequenz von AtNPR1 wurde über einen *Bam*HI/*Sal*I-Verdau aus der pGAD424/AtNPR1-Konstruktion isoliert und in die *Bam*HI/*Sal*I-restringierte Konstruktion pBD-/AtTGA2 kloniert.

1.2.2 pBD-AtNPR2/AtNIMIN1

Im ersten Schritt wurde die Sequenz von AtNPR2 über einen *Bam*HI/*Sal*I-Verdau aus der pGBT9/AtNPR2-Konstruktion isoliert und in den *Bam*HI/*Sal*I-restringierten Leervektor pBD-/- in die erste *multiple cloning site* MCS kloniert. Anschließend wurde die dabei entstandene pBD-AtNPR2/- Konstruktion an der zweiten MCS mittels eines *Bgl*II-Restriktionsverdaus linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtNIMIN1 wurde über einen *Bam*HI-Restriktionsverdau aus der pGBT9/AtNIMIN1-Konstruktion isoliert und in die zweite MCS der Konstruktion pBD-AtNPR2/- kloniert.

1.2.3 pBD-AtNPR2/AtNIMIN2

Die pBD-AtNPR2/- Konstruktion wurde an der zweiten MCS mittels eines *Bg/II*-Restriktionsverdaus linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtNIMIN2 wurde über einen *BamHI*-Restriktionsverdaus aus der pGBT9/AtNIMIN2-Konstruktion isoliert und in die zweite MCS der Konstruktion pBD-AtNPR2/- kloniert.

1.2.4 pBD-AtNPR2/AtNIMIN3

Die pBD-AtNPR2/- Konstruktion wurde an der zweiten MCS mittels eines *Bg/II*-Restriktionsverdaus linearisiert und mit CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtNIMIN3 wurde über einen *BamHI*-Restriktionsverdaus aus der pGBT9/AtNIMIN3-Konstruktion isoliert und in die zweite MCS der Konstruktion pBD-AtNPR2/- kloniert.

1.2.5 pBD-AtNPR4/AtNIMIN1

Für die Klonierung von pBD-AtNPR4/AtNIMIN1 diente pBD-AtNPR3/AtNIMIN1 als Ausgangskonstruktion. Hier wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus die Sequenz von AtNPR3 aus der ersten MCS entfernt. Die Sequenz von AtNPR4 wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus aus der pGBT9/AtNPR4-Konstruktion isoliert und in die erste MCS anstelle von AtNPR3 in die Konstruktion kloniert.

1.2.6 pBD-AtNPR4/AtNIMIN2

Für die Klonierung von pBD-AtNPR4/AtNIMIN2 diente pBD-AtNPR3/AtNIMIN2 als Ausgangskonstruktion. Hier wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus die Sequenz von AtNPR3 aus der ersten MCS entfernt. Die Sequenz von AtNPR4 wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus aus der pGBT9/AtNPR4-Konstruktion isoliert und in die erste MCS anstelle von AtNPR3 in die Konstruktion kloniert.

1.2.7 pBD-AtNPR4/AtNIMIN3

Für die Klonierung von pBD-AtNPR4/AtNIMIN3 diente pBD-AtNPR3/AtNIMIN3 als Ausgangskonstruktion. Hier wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus die Sequenz von AtNPR3 aus der ersten MCS entfernt. Die Sequenz von AtNPR4 wurde mittels eines *BamHI/PstI*-Restriktionsverdaus aus der pGBT9/AtNPR4-Konstruktion isoliert und in die erste MCS anstelle von AtNPR3 in die Konstruktion kloniert.

1.2.8 pBD-AtNIMIN2/AtNPR3

Ausgangskonstruktionen für diese Klonierung waren pBD-AtNIMIN2/- und pGAD424/AtNPR3 (*BamHI*). Die Konstruktion pBD-AtNIMIN2/- wurde mittels eines *Bg/II* Restriktionsverdaus linearisiert

und die offenen Enden mittels CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtNPR3 wurde mittels eines *Bam*HI Restriktionsverdaus aus der Konstruktion pGAD424/AtNPR3 (*Bam*HI) isoliert. Auf Grund der gleichen Überhänge, die bei der Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI entstehen, können der *Bgl*II restringierte Vektor und das *Bam*HI restringierte Fragment unter Verlust der Schnittstellen ligiert werden.

1.2.9 pBD-AtNIMIN2/AtNPR4

Ausgangskonstruktionen für diese Klonierung waren pBD-AtNIMIN2/- und pGAD424/AtNPR4 (*Bam*HI). Die Konstruktion pBD-AtNIMIN2/- wurde mittels eines *Bgl*II Restriktionsverdaus linearisiert und die offenen Enden mittels CIAP dephosphoryliert. Die Sequenz von AtNPR4 wurde mittels eines *Bam*HI Restriktionsverdaus aus der Konstruktion pGAD424/AtNPR4 (*Bam*HI) isoliert. Auf Grund der gleichen Überhänge, die bei der Restriktion mit den Enzymen *Bgl*II und *Bam*HI entstehen, können der *Bgl*II restringierte Vektor und das *Bam*HI restringierte Fragment unter Verlust der Schnittstellen ligiert werden.

2. *Nicotiana tabacum*

2.1 Klonierungen für das Hefe-Zwei-Hybridsystem

2.1.1 pGBT9/ bzw. pGAD424/NgNPR1 H81Y BTB/POZ

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte über eine Overlap-Extension-PCR. Als Matrize diente eine 1:1000 Verdünnung der Konstruktion pGBT9/NgNPR1. Im ersten Klonierungsschritt wurden zwei Teilfragmente mit den Primerkombinationen NgNPR1-1 forward/NgNPR1 H81Y reverse und NgNPR1-32 reverse/NgNPR1 H81Y forward mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die entstandenen Teilfragmente als Matrizen verwendet und mit der flankierenden Primerkombination NgNPR1-1 forward/NgNPR1-32 reverse mittels PCR verbunden. Das dabei entstandene Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und mittels Sequenzierung verifiziert. Im nächsten Schritt wurde die verifizierte Insertion über *Bam*HI/*Stu*I aus dem T-Vektor isoliert und in die *Bam*HI/*Stu*I restringierte Konstruktion pGBT9/NgNPR1 kloniert. Die dabei entstandene Konstruktion pGBT9/NgNPR1 H81Y wurde zur Verifikation sequenziert. Mittels eines *Bam*HI/*Sal*I Restriktionsverdaus wurde die verifizierte Sequenz von NgNPR1 H81Y in den Hefektor pGAD424 überführt.

2.1.2 pGBT9/ bzw. pGAD424/NgNPR1 P341S ANK

Die Ausgangskonstruktionen für diese Klonierung stellten pGAD424/NgNPR1 und pBS(KS+)/NgNPR1-7+1-24 P341S dar. Zunächst wurde pBS(KS+)/NgNPR1-7+1-24 P341S mittels *Hind*III/*Sal*I Restriktion linearisiert. Mit denselben Enzymen wurde auch die Konstruktion

pGAD424/NgNPR1 geschnitten und das dabei entstandene Fragment von 0,54 kb isoliert und in die linearisierte T-Vektor-Konstruktion kloniert. Dabei entstand die Konstruktion pBS(KS+)/NgNPR1(270/588) P341S. Die Insertion wurde mittels eines *Bam*HI/*Sal*I Restriktionsverdau aus dem T-Vektor in den Hefevektor pGAD424 überführt. Die entstandene Konstruktion wurde durch einen *Nde*I Restriktionsverdau linearisiert und mittels CIAP dephosphoryliert. Die Konstruktion pGAD424/NgNPR1 wurde ebenfalls mit *Nde*I restringiert. Das dabei entstandene Fragment von 0,9 kb wurde isoliert und in die bereits dephosphorylierte Konstruktion kloniert. Die Verifizierung der Konstruktion pGAD424/NgNPR1 P341S erfolgte über eine Sequenzierung. Die verifizierte Insertion der Konstruktion wurde anschließend über einen *Bam*HI/*Sal*I Restriktionsverdau in den Hefevektor pGBT9 überführt.

2.1.3 pGBT9/ bzw. pGAD424/ NtNIM1-like1 Insertion c.433_443insATC TTG TCA GAT TCC

Die *in vitro* Mutagenese erfolgte über eine Overlap-Extension-PCR. Als Ausgangsmatrize diente eine 1:1000 Verdünnung der Konstruktion pGBT9/NtNIM1-like1. Im ersten Schritt wurden zwei Teilfragmente mit den Primerkombinationen NtNIML-14/ -17 und NtNIML-16/ -15 per PCR amplifiziert. Im nächsten Schritt wurden die Teilfragmente mittels der flankierenden Primerkombination NtNIML-14/ -15 via PCR verbunden. Das dabei entstandene Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und bei einer anschließenden Sequenzierung verifiziert. Die verifizierte Insertion des T-Vektors wurde über einen *Msc*I/*Bgl*II Restriktionsverdau isoliert. Dieses Teilstück wurde anschließend in die ebenfalls mit *Msc*I/*Bgl*II restringierte Konstruktion pGBT9/NtNIM1-like1 kloniert. Die Verifikation der neu entstandenen Konstruktion erfolgte über eine Sequenzierung. Die Überführung der sequenzierten Insertion in den Hefevektor pGAD424 erfolgte über einen *Eco*RI/*Sal*I Restriktionsverdau. Die eingebrachte Insertion in die Sequenz von NtNIM1-like1 entspricht der Mutation, welche in der CRISPR-Linie 113H-9 #19 in der *N. tomentosiformis* Variante gefunden wurde.

2.2 Klonierungen für das Hefe-Drei-Hybridsystem

2.2.1 pBD-NgNPR1/NtTGA2.2

Für die Klonierung von pBD-NgNPR1/NtTGA2.2 wurde im ersten Klonierungsschritt der Sequenz von NtTGA2.2 eine *Bam*HI-Restriktionsschnittstelle am 5'- sowie am 3'-Ende per PCR hinzugefügt. Als Matrize diente eine 1:1000 Verdünnung der Konstruktion pGAD424/NtTGA2.2 und für die Amplifikation wurde die Primerkombination NtTGA2.2-1/ -2 verwendet. Das Amplifikat wurde in den T-Vektor subkloniert und durch anschließende Sequenzierung verifiziert. Für den nächsten Klonierungsschritt wurde die verifizierte Insertion mittels *Bam*HI-Restriktionsverdau aus dem T-Vektor isoliert und in den mittels *Bgl*II Restriktionsverdau linearisierten und mit CIAP dephosphorylierten pBD-/- Vektor in die zweite MCS kloniert. Als nächstes wurde aus der Konstruktion

pBD-NgNPR1/NtTGA7 über einen *BamHI/AarI* Restriktionsverdau ein Fragment der Größe von 2,3 kb isoliert, welches die Sequenz von NgNPR1 enthielt. Dieses Fragment wurde anschließend in die ebenfalls mit *BamHI/AarI* restringierte Konstruktion pBD-/NtTGA2.2 kloniert.

2.2.2 pBD-NgNPR1(1/465)/NtTGA7 bzw. pBD-NgNPR1/NtTGA7

Die Klonierung von pBD-NgNPR1/NtTGA7 wurde in zwei Schritten durchgeführt, da die Sequenz von NtTGA7 am C-Terminus über eine zusätzliche *SalI*-Schnittstelle verfügt und somit keine Klonierung über *BamHI/SalI* in der ersten MCS durchgeführt werden kann. Als Ausgangskonstruktionen dienen pBD-NgNPR1(386/465)/NtTGA7 und pGAD424/NgNPR1. Über eine *BamHI/NheI*-Restriktion wurde der N-terminale Teil von NgNPR1 mit einer Größe von 1,3 kb an NgNPR1 (386/465) angefügt, so dass die Konstruktion pBD-NgNPR1(1/465)/NtTGA7 entstand. Anschließend wurde der Konstruktion pBD-NgNPR1(1/465)/NtTGA7 über eine *NheI/BstXI*-Restriktion der fehlende Teil des C-Terminus aus der Konstruktion pBD-NgNPR1(386/588)/- angefügt.



Anlage 2 zur Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

Eidesstattliche Versicherung gemäß § 7 Absatz 7 der Promotionsordnung der Universität Hohenheim zum Dr. rer. nat.

1. Bei der eingereichten Dissertation zum Thema

"Funktionelle Bedeutung unterschiedlicher NPR-Proteine für die Salicylsäure-abhängige Genexpression im Rahmen der systemisch aktivierten Resistenz in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*"

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung.

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht.

3. Ich habe nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung oder -beratung in Anspruch genommen.

4. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und der strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt.

Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärung bestätige ich: Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erklärt und nichts verschwiegen habe.

Vaihingen/Enz, den 18. Juli 2018

Unterschrift (Evelyn Konopka)

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name: Evelyn Maria Anna Hedwig Konopka

Geburtsdaten: 03.05.1989 in Paderborn

Staatsangehörigkeit: deutsch

Akademischer Werdegang

05/14 bis 10/18	Promotion am Institut für Genetik, FG Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
10/11 bis 12/13	Studium der Biologie, Fachrichtung Mikrobiologie (Master of Science), Universität Hohenheim, Stuttgart
10/08 bis 09/11	Studium der Agrarbiologie, Fachrichtung Biotechnologie (Bachelor of Science) Universität Hohenheim, Stuttgart
09/99 bis 06/08	Friedrich-Abel-Gymnasium, Vaihingen an der Enz, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufliche Tätigkeiten

09/14 bis 12/17	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Genetik, FG Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
02/14 bis 08/14	geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Genetik, FG Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim, Stuttgart
11/10 bis 11/12	Studentische Hilfskraft am Institut für Tierzüchtung, FG Genetik und Züchtung landwirtschaftlicher Nutztiere, Universität Hohenheim, Stuttgart
03/11 bis 10/11	Laborhilfe im Bereich Mikrobiologie der Firma AgenoLAB, Stuttgart-Wangen

Vaihingen/Enz, den 18. Juli 2018

Unterschrift (Evelyn Konopka)

Wissenschaftliche Beiträge

Publikation

Stos-Zweifel, V., Neeley, D., Konopka, E., Meissner, M., Hermann, M., Maier, F., Häfner, V., Pfitzner, A.J.P., Pfitzner, U.M. (2018). Tobacco TGA7 mediates gene expression dependent and independent of salicylic acid. bioRxiv doi: <http://dx.doi.org/10.1101/341834>

Tagungsbeiträge

Konopka, E. (2017). Signaling of the plant hormone salicylic acid through members of the NPR family. Seminarreihe “Biologische Signale“, Universität Hohenheim, Juni 2017, Vortrag

Neeley, D., Konopka, E., Maier, F., Pfitzner, U.M. (2017). The mechanism how salicylic acid activates tobacco NPR1. 9th Regio Plant Science Meeting, MPI Tübingen, April 2017, Posterpräsentation

Konopka, E. (2015). *In vivo* test system for structural analogs that bind to salicylic acid receptors of the NPR family. 2nd Summer Academy in Plant Molecular Biology, Freudenstadt, Juli 2015, Vortrag

Konopka, E., Pfitzner, U.M. (2015). *In vivo* test system for structural analogs that bind to salicylic acid receptors of the NPR family. 8th Regio Plant Science Meeting, Universität Ulm, Februar 2015, Posterpräsentation

Konopka, E., Pfitzner, A.J.P. (2014). A conserved GW/WG motif within the methyltransferase/helicase protein of *ToMV* is essential for silencing suppression and virus fitness. 7th Regio Plant Science Meeting, Universität Hohenheim, Februar 2014, Posterpräsentation

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen ein herzliches Dankeschön aussprechen, die aktiv und auch passiv zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei Frau PD Dr. Ursula M. Pfitzner möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Ihre umfangreiche Unterstützung, Ratschläge und Hilfestellungen im Hinblick auf die praktische Tätigkeit, sowie die zahlreichen fachlichen Diskussionen zum Thema und darüber hinaus haben einen maßgeblichen Teil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nicht zuletzt möchte ich mich bei ihr für die Unterstützung und die hilfreiche, sachliche Kritik während der Zeit des Schreibens bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. Artur J. P. Pfitzner möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas, die Möglichkeit der Erarbeitung der experimentellen Daten am FG Allgemeine Virologie und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Andreas Schaller möchte ich für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit danken.

Frau Prof. Dr. Waltraud Schulze danke ich für ihre Bereitschaft, Mitglied der Prüfungskommission meiner mündlichen Prüfung zu sein.

Herrn Dr. Klaus Tietjen (Bayer AG, Division Crop Science, Monheim) danke ich für die Bereitstellung der Substanzen S-Methyl-1,2,3-benzothiadiazol-7-carbothioat, Acibenzolarsäure und 2,6-Dichlorisonicotinsäure.

Ein Dank geht natürlich auch an all die Mitglieder des Fachgebiets Allgemeine Virologie für das schöne und entspannte Arbeitsklima. Bei Ingrid und Christine möchte ich mich nicht nur für die Generierung der CRISPR-Mutanten in Tabak bedanken, sondern auch für die zahlreichen Tipps und Tricks und die stets freundliche Unterstützung. Mathias danke ich für die gute Zusammenarbeit und die entspannten Gespräche im Labor. Roxy, Thomas und Thorsten möchte ich für die Versorgung meiner vielen Pflanzen im Gewächshaus und für die netten Gespräche zwischendurch danken.

Ein besonders herzliches Dankeschön geht an Anna, Kamila und Nicky, die nicht nur meinen Laboralltag durch zahlreiche fachliche und weniger fachliche Diskussionen und entspannte Gespräche bunter gestaltet haben, sondern mir auch privat freundschaftlich verbunden sind.

Ich möchte all den lieben Menschen in meinem persönlichen Umfeld für ihre Unterstützung aber auch für die Zeit der Zerstreuung in jeglicher Art und Weise danken. Meine Familie ist mir dabei immer die größte Stütze gewesen. Meiner Schwester Carina danke ich sehr für ihr kritisches Auge bei der Korrektur. Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir mein Studium und die anschließende Promotion in dieser Form durch ihre Unterstützung und den bedingungslosen Rückhalt ermöglicht haben.