

**Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer
Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum*
in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Saskia Flörl
aus Bad Karlshafen

Göttingen 2007

D 7

Referent: Prof. Dr. Andrea Polle

Korreferent: Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung: 01. November 2007

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	<i>Verticillium</i> spp.: Verbreitung und Lebenszyklus des Pathogens.....	1
1.2	<i>Brassica napus</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i> als Wirtspflanzen.....	3
1.3	Pathogen induzierte Abwehrreaktionen in Pflanzen	4
1.4	Extrazelluläre Abwehrreaktionen	6
1.5	Die Funktion von Peroxidasen in der Pathogen-Abwehr.....	8
1.6	Die Funktion von Chitinasen in der Pathogen-Abwehr.....	9
2.	ZIELE.....	11
3.	MATERIAL & METHODEN.....	12
3.1	Chemikalien	12
3.2	Pflanzenanzucht und Inokulation mit <i>Verticillium longisporum</i>	13
3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Inokulation	13
3.2.2	Anzuchtbedingungen für Raps und Inokulation	14
3.2.3	Vorbereitung von <i>Verticillium longisporum</i> für die Inokulation	14
3.3	Ökophysiologische Methoden.....	15
3.3.1	Messung der Chlorophyllfluoreszenz.....	15
3.3.2	Messung der Elektrolytleitfähigkeit	16
3.3.3	Bestimmung des osmotischen Drucks.....	16
3.3.4	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes	16
3.3.5	Messung der Photosyntheserate	17
3.3.6	Blattflächenmessung bei <i>Arabidopsis thaliana</i>	17
3.3.7	C/N Analyse.....	18
3.3.8	Optische ICP-Emissionsspektrometrie zur Elementanalyse.....	19
3.3.9	Extraktion von Zellwänden	19
3.3.10	FTIR (Fourier-Transmissions-Infrarot) Spektrometrie.....	19
3.3.11	Ligninbestimmung	20
3.4	Extraktion von Proteinen	20
3.4.1	Gewinnung von apoplastischer Waschflüssigkeit (AWF) aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern	20
3.4.2	Gewinnung von AWF aus Rapsblättern.....	21
3.4.3	Gewinnung von Xylemsaft aus Raps.....	21
3.4.4	Proteinextraktion aus Gesamtblattmaterial und Gelfiltration.....	22
3.5	Biochemische Methoden	23
3.5.1	Proteinbestimmung.....	23

Inhaltsverzeichnis

3.5.2	Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	24
3.5.2.1	Malatdehydrogenase	24
3.5.2.2	Guajakolperoxidase.....	25
3.5.2.3	Chitinase.....	25
3.5.3	Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Fällung.....	26
3.5.4	Peroxidase Nachweis im PhastGel.....	26
3.5.5	Eindimensionale Elektrophorese	27
3.5.6	Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese.....	29
3.5.7	Zweidimensionale Elektrophorese.....	30
3.5.7.1	Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)	30
3.5.7.2	Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	30
3.5.8	Färbung der Gele mit Silbernitrat oder Coomassie Brilliant Blue	31
3.5.9	Analyse der zweidimensionalen Gele.....	32
3.5.10	Proteinverdau mit Trypsin und Proteinidentifizierung	32
3.5.11	Signalpeptid-Analyse mit TargetP	33
3.6	Molekularbiologische Methoden	34
3.6.1	RNA-Extraktion	34
3.6.2	RNA-Aufreinigung.....	34
3.6.3	c-DNA Synthese	35
3.6.4	Quantitative real time PCR	35
3.6.5	Quantifizierung von <i>Verticillium</i> -DNA in inokulierten Pflanzen	37
3.6.6	RNA-Gele	37
3.7	Statistik.....	38
4.	ERGEBNISSE	39
4.1	Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i> auf <i>Brassica napus</i>	39
4.1.1	Entwicklung von Krankheitssymptomen bei Raps	39
4.1.2	Charakterisierung von Proteinmustern unter dem Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i>	43
4.1.2.1	Kontaminationsbestimmung in der apoplastischen Waschflüssigkeit von Raps ...	43
4.1.2.2	Vergleich von Proteinmustern in apoplastischen und Gesamtblattextrakten.....	43
4.1.2.3	Vergleich von Proteinmustern und Proteinanalyse in AWF und Xylemsäften	44
4.1.2.4	Zweidimensionale Auftrennung apoplastischer Rapsproteine.....	47
4.1.3	Peroxidase Aktivitäten	51
4.2	Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i> auf die Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
4.2.1	Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen.....	52
4.2.1.1	Vergleich der <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotypen Columbia und Landsberg erecta....	52

Inhaltsverzeichnis

4.2.1.2	Untersuchung des <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyps Columbia unter Lang- und Kurztagsbedingungen.....	55
4.2.2	Krankheitssymptome und Nährstoffversorgung von <i>Arabidopsis thaliana</i> im Infektionsverlauf	57
4.2.2.1	Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i> auf den Phänotyp von <i>Arabidopsis</i>	57
4.2.2.2	Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i> auf die Nährelementsituation in <i>Arabidopsis thaliana</i> Blättern	59
4.2.2.3	Infektionsnachweis mittels quantitativer PCR.....	60
4.2.2.4	Ökophysiologische Charakterisierung <i>Verticillium longisporum</i> infizierter <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
4.2.2.5	Kontaminationsbestimmung in der AWF von <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
4.2.3	Charakterisierung extrazellulärer Proteinmustern	64
4.2.3.1	Vergleich von Proteinmustern in apoplastischen und Gesamtblattextrakten.....	64
4.2.3.2	Zweidimensionale Auftrennung apoplastischer <i>Arabidopsis thaliana</i> Proteine	65
4.2.3.3	Analyse der Hauptproteine in Gesamtblattextrakten von <i>Arabidopsis thaliana</i>	68
4.2.4	Peroxidase Aktivitäten	70
4.2.5	Expressionsanalyse differentiell auftretender Proteine.....	71
4.2.6	In silico Analyse der Expressionslevel der differentiell regulierten Proteine unter diversen Stressbedingungen	74
4.2.7	Untersuchungen zum Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i> auf die Zellwandzusammensetzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
4.2.8	FTIR-Analyse zur Ermittlung des chemischen Fingerprints <i>Verticillium longisporum</i> infizierter <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
4.3	Untersuchung des Einflusses von <i>Verticillium longisporum</i> auf eine <i>Arabidopsis thaliana</i> Chitinase	79
4.3.1	Expression eines sauren Endochitinase-Gens (At5g24090) in <i>Verticillium longisporum</i> infizierten Wildtyp <i>Arabidopsis</i> Pflanzen	79
4.3.2	Untersuchung einer <i>Arabidopsis thaliana</i> Chitinase-Mutante unter Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i>	80
4.3.2.1	Chitinase-Aktivitätsmessungen in mock- und <i>Verticillium</i> -infizierten Pflanzen	80
4.3.2.2	Untersuchung der Chitinase Insertionsmutante im Hinblick auf die Symptomausprägung unter Einfluss von <i>Verticillium longisporum</i>	81
4.3.2.3	Infektionsnachweis mittels quantitativer PCR.....	82
5.	DISKUSSION	84
5.1	<i>Verticillium</i>-induzierte Schäden an Raps und <i>Arabidopsis</i>.....	84
5.1.1	Wachstum und Photosynthese	84
5.1.2	Die Nährelementsituation in <i>Arabidopsis thaliana</i>	85
5.1.3	Der Wasserhaushalt in <i>Arabidopsis thaliana</i>	86

5.2	Das extrazelluläre Proteom von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Raps	87
5.2.1	Apoplasten-spezifische Proteine in <i>Arabidopsis thaliana</i>	87
5.2.2	Apoplasten-spezifische Proteine in Raps	90
5.2.3	Kontamination mit intrazellulären Proteinen	91
5.3	Proteinantworten auf <i>V. longisporum</i> Infektion und mögliche Funktionen der differentiell auftretenden Proteine	92
5.3.1	Das extrazelluläre Proteom von Arabidopsis unter <i>Verticillium</i> -Einfluss	92
5.3.2	Das extrazelluläre Proteom von Raps unter <i>Verticillium</i> -Einfluss	98
5.3.3	<i>Verticillium</i> -induzierte Antworten in Raps und Arabidopsis im Vergleich.....	99
6.	ZUSAMMENFASSUNG	101
7.	LITERATUR.....	104
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	117
9.	ANHANG	119
9.1	Peroxidasen Sequenzvergleich.....	119
9.2	Überprüfung der T-DNA Insertion in das Chitinase-Gen At5g24090	121
9.3	Expressionsvergleich des Chitinase-Gens At5g24090 in Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen.....	121

1. EINLEITUNG

1.1 *Verticillium* spp.: Verbreitung und Lebenszyklus des Pathogens

Verticillium-Arten sind bodenbürtige Pilze, die weltweit in gemäßigten und subtropischen Regionen verbreitet sind. Sie gehören zur Abteilung der Ascomyceten und sind für die sogenannte „*Verticillium* Welke“ verantwortlich. Die *Verticillium* Pilze gelten als wenig wirtsspezifisch und verursachen landwirtschaftlich bedeutsame Schäden (Bhat & Subbarao 1999; Pegg & Brady, 2002). Zusammen genommen befallen die *Verticillium* spp. über 200 Pflanzenarten weltweit (Agrios, 1997), darunter viele ökonomisch bedeutsame Kulturpflanzen wie Tomaten, Blumenkohl etc., aber auch Bäume wie z.B. Ahorn und Olivenbäume. Besonders *V. dahliae* und *V. albo-atrum* besitzen eine große Zahl von Wirtspflanzen. *V. longisporum* ist dagegen vor allem auf *Brassicaceen* spezialisiert (Karapapa *et al.*, 1997; Zeise & Tiedemann, 2002). Im Vergleich zu *V. dahliae* hat *V. longisporum* eine deutlich unterschiedliche Morphologie (Karapapa *et al.*, 1997), wobei umstritten ist, ob es sich bei *V. longisporum* um eine eigene Art oder um eine Unterart von *V. dahliae* handelt (Barbara & Clewes 2003). *V. longisporum* und *V. dahliae* können vor allem durch Form und Größe ihrer Sporen unterschieden werden. Die Sporen von *V. dahliae* sind klein, kugelig und ca. 3,5-6 µm groß, während die Sporen von *V. longisporum* länglich und 7-9 µm lang sind (Karapapa *et al.*, 1997). Der DNA-Gehalt von *V. longisporum* ist fast doppelt so hoch wie der DNA-Gehalt nicht-langsporiger Isolate (Steventon *et al.*, 2002). Daher wurde diskutiert, ob *V. longisporum* ein Hybrid aus *V. dahliae* und *V. albo atrum* wäre (Karapapa *et al.*, 1997; Collins *et al.*, 2003). Dieses wurde widerlegt, indem Barbara *et al.* (2005) mit Hilfe von Mikrosatelliten Markern zeigten, dass *V. albo atrum* kein „Elternteil“ von *V. longisporum* ist.

Interaktionsstudien von Fluoreszenz-gefärbten *V. longisporum* oder *V. dahliae* mit *Brassica napus* (Eynck *et al.*, 2007) zeigten, dass *V. longisporum* 36 Stunden nach Inokulation die Epidermiszellen der Wurzelhaare netzartig bedeckt und dann inter- und intrazellulär durch den Wurzelcortex zum Zentralzylinder wächst. Die Kolonisierung der Xylemgefäße mit *V. longisporum* ist auf einzelne Leitgefäße beschränkt, während benachbarte Gefäße nicht angegriffen werden. *V. dahliae* konnte zwar ebenfalls in die Wurzeln eindringen, war im Gegensatz zu *V. longisporum* aber nicht in der Lage sich systemisch in der Pflanze auszubreiten, ein Hinweis darauf, dass *Brassica napus* kein Wirt für *V. dahliae* ist (Eynck *et al.*, 2007).

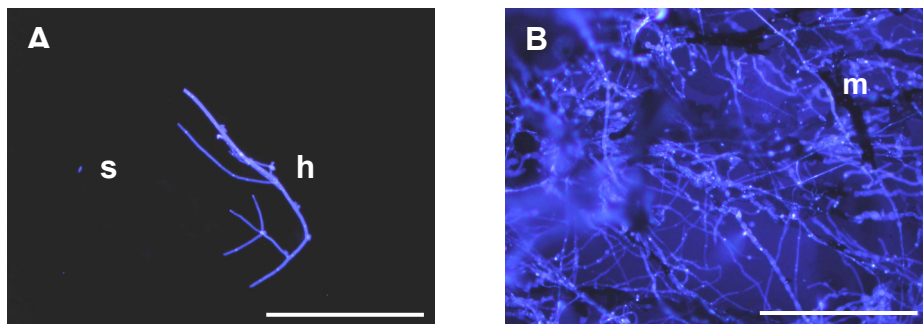


Abb. 1.1: Mikroskopische Aufnahmen einer einzelnen Spore (s) und Hyphe (h) von *Verticillium longisporum* (A) und vom Myzel (B) mit Mikrosklerotien (m). Der Pilz wurde mit *Calcofluor white* angefärbt. (Fotos: S. Flörl; Maßstab: 100 µm).

Die Symptome, die durch *Verticillium* spp. hervorgerufen werden, variieren stark zwischen den verschiedenen Wirtspflanzen (Fradin & Thomma, 2006). Es konnten Welkeerscheinungen, Kümmerwuchs und Stauchung (Abb. 1.2A) von befallenen Pflanzen beobachtet werden. Bei einigen Pflanzenarten zeigten sich Chlorosen und Nekrosen an Blättern. Neben den äußerlichen Schadsymptomen konnten in zahlreichen Pflanzenarten auch braune Verfärbungen von Leitgefäßen in Stängelquerschnitten nachgewiesen werden (Abb. 1.2B). Diese vaskulären Verfärbungen sind vermutlich auf die Anreicherung phenolischer Substanzen in befallenen Gefäßabschnitten zurückzuführen (Pegg, 1976).

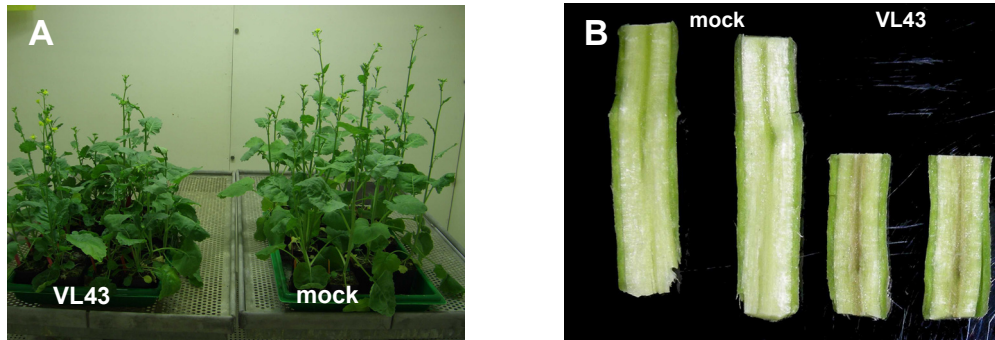


Abb. 1.2: Stauchung der Sprossachse (A) und bräunliche Verfärbung von Leitgefäßen in Hypokotylsegmenten (B) von *V. longisporium* (VL43) infiziertem Raps im Vergleich zu gesunden Kontrollpflanzen (mock). (Fotos: S. Flörl).

Der vegetative Lebenszyklus von *Verticillium* (Abb. 1.3) besteht aus drei Phasen, der parasitischen, die saprophytischen und die ruhenden Phase. Im Boden befindliche Dauerformen von *Verticillium*, sogenannte Mikrosklerotien, werden durch Wurzelexudate, die von Pflanzen in die Rhizosphäre abgegeben werden, zur Keimung angeregt (Mol & van Riessen, 1995; Schreiber & Green, 1969). Hyphen, die aus den keimenden Mikrosklerotien herauswachsen, können eine kurze Distanz überwinden, um eine potentielle Wirtspflanze zu erreichen. Für *V. dahliae* wurde gezeigt, dass die Keimrate der Mikrosklerotien mit zunehmendem Abstand zur Pflanzenwurzel abnimmt (Mol & van Riessen 1995). Die Mikrosklerotienkeimung tritt sowohl bei Exudaten von Wirts- als auch von Nicht-Wirtspflanzen auf, dabei wurde die beeinflusste Wurzelzone für die meisten untersuchten Pflanzen mit unter 2 mm berechnet (Mol 1995). Wenn die Hyphen die Wurzel einer Wirtspflanze erreichen, beginnt das parasitische Stadium mit dem Eindringen des Pilzes in die Wurzel. Um in die Xylemgefäße zu gelangen, muss der Pilz die Endodermis durchqueren, die der Pflanze unter anderem als physikalische Barriere gegen Infektionen dient. Daher findet die Infektion vor allem über das Apikalmeristem der Wurzelspitzen, bei denen die Endodermis noch nicht entwickelt ist oder über Wunden, die z.B. durch Nematoden hervorgerufen werden können, statt (Bowers *et al.*, 1996). Wenn die Hyphen in den Wurzelcortex und das Xylem eingedrungen sind, können Sporen gebildet werden, die mit dem Xylemstrom in andere Pflanzenteile gelangen, wo sie in Aushöhlungen und am Ende von Gefäßen hängen bleiben, den sogenannten *trapping sites* (Heinz *et al.*, 1998). Von dort keimt der Pilz erneut aus und dringt in benachbarte Gefäße ein. Es wurde gezeigt, dass es zwischen 2 und 4 Tagen dauert, bis der Pilz das Xylem erreicht und einen weiteren Tag um benachbarte Gefäße zu befallen und zu sporulieren (Chen *et al.*, 2004; Gold & Robb

1995; Heinz *et al.*, 1998). In dieser Phase ist der Pilz strikt apoplastisch lokalisiert. Erst im späteren saprophytischen Infektionsstadium kolonisiert der Pilz auch andere Pflanzengewebe. Der Pilz bildet Mikrosklerotien, die mit absterbendem Gewebe wieder in den Boden gelangen und dort in der ruhenden Phase für viele Jahre überdauern können (Wilhelm, 1955). Die Bekämpfung von *Verticillium* Pilzen in der Landwirtschaft wird durch die lange Lebensdauer der Mikrosklerotien und seine Lebensweise im Xylem erschwert.

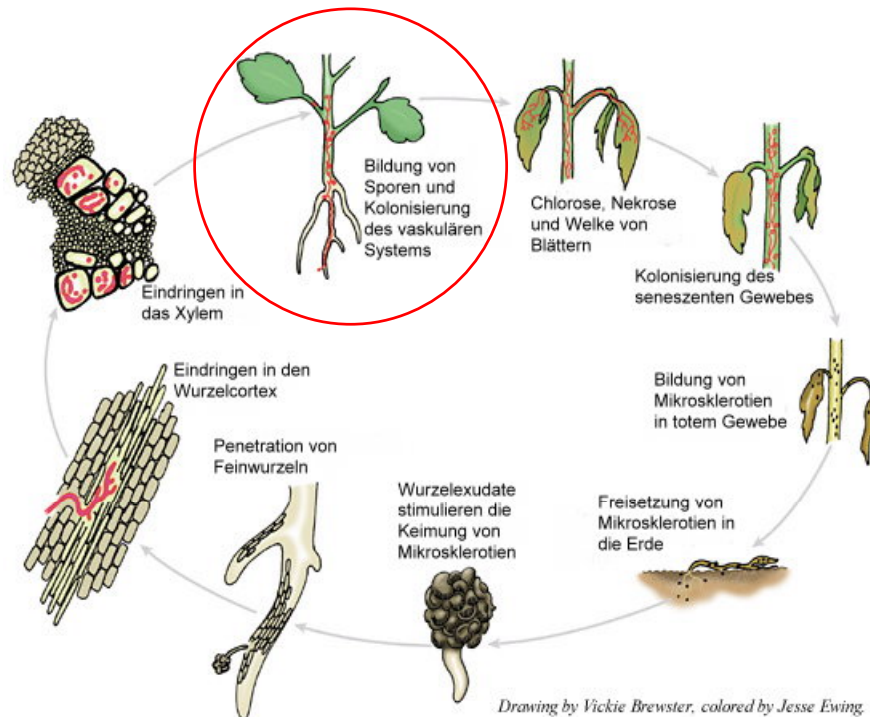


Abb. 1.3: Lebenszyklus von *Verticillium* in Raps, verändert nach <http://www.apsnet.org/education/lessonsPlantPath/Verticillium/discycleFull.htm>. Der rote Kreis kennzeichnet das in der vorliegenden Arbeit untersuchte Stadium.

1.2 *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* als Wirtspflanzen

Die *Verticillium* Welke an Raps (*Brassica napus*) wurde in Europa erstmals vor ca. 50 Jahren in Schweden beobachtet und wird seither als zunehmendes Problem wahrgenommen (Dixelius *et al.*, 2005). Seit den 1980er Jahren hat der Rapsanbau in Deutschland auch aufgrund steigender Nachfrage nach nachwachsenden Rohstoffen stark zugenommen. Mit der Intensivierung des Rapsanbaus geht ein verstärktes Auftreten pilzlicher Pathogene, darunter auch *Verticillium*, einher (Krüger, 1989). Die *Verticillium* Welke an Raps wird durch den langsporigen, auf *Brassicaceen* spezialisierten Pilz *V. longisporum* verursacht (Karapapa *et al.*, 1997).

Die meisten ökonomisch wichtigen *Brassicaceen* haben einen langen Lebenszyklus zwischen 0,5 und 2 Jahren, was die Untersuchung der Pathogenreaktion dieser Arten erschwert. Zur Untersuchung von Pflanzenkrankheiten wurden deshalb in den 1980er Jahren *Brassica*-Arten mit kurzem Lebenszyklus (*rapid cycle*) gezüchtet (Williams & Hill 1986), darunter *B. rapa*, *B. nigra*, *B. oleracea*, *B. juncea*, *B. carinata* und *B. napus*. Wegen ihrer nahen Verwandtschaft zu den landwirtschaftlich wichtigen *Brassica*-Arten, finden die *rapid*

cycling Brassicaceen ein weites Anwendungsgebiet in der Forschung (Musgrave, 2000). *Rapid cycling Brassica napus* kennzeichnen folgende Charakteristika: im Mittel 25 Tage bis zur ersten Blüte, 55 Tage bis zur Samenreife und eine Chromosomenanzahl von 38 (Musgrave, 2000).

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) gehört wie Raps zu den *Brassicaceen*, und ist eine nahe Verwandte nicht nur von Raps, sondern auch von anderen *V. longisporum* sensitiven *Brassicaceen*, wie Blumenkohl und Brokkoli. Verbreitet ist *Arabidopsis thaliana* sowohl in Europa, als auch in Asien und Nordamerika. In den letzten 25 Jahren wurde *Arabidopsis thaliana*, im Folgenden kurz als *Arabidopsis* bezeichnet, zum Modellorganismus in der Pflanzenbiologie. Da *Arabidopsis* relativ klein ist, wenig Anforderungen an Wachstumsbedingungen stellt und einen kurzen Lebenszyklus von ca. 8 Wochen hat, können die Pflanzen einfach unter Laborbedingungen kultiviert werden (Somerville & Koornneef, 2002). Außerdem hat *Arabidopsis* für eine Blütenpflanze ein kleines Genom von ca. 125 Mb, dessen Sequenzierung im Dezember 2000 abgeschlossen wurde (Somerville & Koornneef, 2002). Das Genom besteht aus 5 Chromosomenpaaren mit mehr als 25000 Genen, von denen detaillierte Karten erstellt wurden. Genetische Manipulationen können relativ einfach durch Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt werden.

Vor wenigen Jahren konnte gezeigt werden, dass die Modellpflanze *Arabidopsis* empfindlich für *Verticillium* ist (Steventon *et al.*, 2001; Veronese *et al.*, 2003). Verschiedene *Arabidopsis*-Ökotypen wurden von Veronese *et al.* (2003) auf ihre Empfindlichkeit gegenüber *Verticillium dahliae* überprüft. Alle untersuchten Ökotypen, die mit *Verticillium* infiziert worden waren, wiesen Krankheitssymptome wie Verkümmern, nachgewiesen durch Gewichtsverluste, und Vergilbungen an Blättern auf. Im Vergleich zum Ökotyp Columbia waren die Symptome beim Ökotyp C-24 weniger stark ausgeprägt, woraus gefolgert wurde, dass C-24 toleranter gegenüber *Verticillium* ist (Veronese *et al.*, 2003).

1.3 Pathogen induzierte Abwehrreaktionen in Pflanzen

Pflanzen haben ein breites Spektrum an Schädlingen, darunter Bakterien, Pilze, Nematoden und Insekten. Obwohl Pflanzen kein Immunsystem besitzen, verfügen sie über eine große Anzahl von Abwehrmechanismen. Eine der effektivsten Abwehrreaktionen der Pflanzen wird durch Resistenz (R)-Gene vermittelt. Die R-Gene kodieren für Rezeptoren, die spezifische Moleküle von Pathogenen (Elicitoren) erkennen und binden. Bei den Elicitoren kann es sich z.B. um Proteine, Lipide oder Polysaccharidfragmente aus der Zellwand des Pathogens handeln. Pflanzen sind empfindlich für den Angriff bestimmter pathogener Stämme, aber resistent gegenüber anderen. Bei der pflanzlichen Pathogenabwehr unterscheidet man deshalb zwischen zwei Arten von Wirt-Parasit-Interaktion, der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion. Kompatibel bedeutet, dass es bei Befall der Pflanze mit einem Pathogen zur Krankheitsausprägung kommt, die Pflanze also anfällig ist. Das Pathogen bezeichnet man in diesem Fall als virulent. Wenn die Pflanze in der Lage ist die Ausbreitung und Vermehrung des Pathogens zu verhindern, handelt es sich um eine inkompatible Interaktion. Vermutlich wird diese Spezifität durch die Interaktion zwischen den Produkten der R-Gene und den Produkten der Avirulenz (*avr*) Gene der Pathogene, die für spezielle Elicitoren codieren, bestimmt. Verfügt der Wirt über ein bestimmtes R-Gen und das

Pathogen über das entsprechende *avr*-Gen so kommt es zur Abwehrreaktion (Inkompatibilitätsreaktion). Fehlt allerdings das entsprechende R-Gen oder *avr*-Gen kann das Pathogen nicht erkannt werden und es kommt zur kompatiblen Reaktion und zur Krankheitsausprägung (Feys & Parker, 2000; Dangl & Jones, 2001; Hammond-Kosack & Parker, 2003).

Häufig ist die inkompatible Reaktion dadurch gekennzeichnet, dass infizierte und benachbarte Zellen absterben und so die Ausbreitung des Pathogens verhindern. Dieser Zelltod um eine Infektionsstelle dient dem Schutz der Pflanze und wird als hypersensitive Reaktion bezeichnet. Durch vermehrte Lignin- oder Kallosesynthese werden die Zellwände um das nekrotische Gewebe verstärkt, um ein Eindringen des Pathogens zu verhindern (Heath, 1998; Scheel, 1998; Thordal-Christensen *et al.*, 1997). Ebenfalls relevant bei der Abwehr pathogener Pilze und Bakterien ist die Produktion von Phytoalexinen. Diese sehr heterogene Gruppe sekundärer Pflanzenstoffe hat eine starke antimikrobielle Wirkung. Zu den Phytoalexinen gehören unter anderem Isoprenoide, Stilbene und Flavonoide (Dixon, 2001). Nachdem die Pflanzenzelle über die Rezeptor-Elicitor-Bindung das Pathogen erkannt hat, kommt es zu Änderungen der Permeabilität der Plasmamembran. Calciumionen und Protonen strömen in die Zelle ein, während Kalium- und Chloridionen ausströmen (Scheel, 1998). Verschiedene Elicitor-abhängige Ca^{2+} Kanäle konnten identifiziert werden (Zimmermann *et al.*, 1997; Gelli *et al.* 1997). Bei Fehlen von Ca^{2+} im Kulturmedium, war die Elicitor induzierte Abwehrreaktion in Zellen von Petersilie stark reduziert (Dietrich *et al.*, 1990). Es wurde außerdem gezeigt, dass die Ionenströme für die Induktion des sogenannten *oxidative burst*, für die Aktivierung von Abwehrgenen und die Produktion von Phytoalexinen erforderlich sind (Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997). Die extrazelluläre Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie Superoxid-Anionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Hydroxylradikalen ($\bullet\text{OH}$) spielt eine zentrale Rolle im pflanzlichen Abwehrmechanismus (Scheel, 1998). ROS wirken direkt gegen Pathogene, sind aber auch an der Signalweiterleitung für spätere Abwehrreaktionen beteiligt, z.B. an der Phytoalexinsynthese, an der Aktivierung von Abwehrgenen, am programmierten Zelltod und an der H_2O_2 -vermittelten Vernetzung von Zellwänden (Baker & Orlandi, 1995; Bradley *et al.*, 1992; Jabs *et al.*, 1996; Lamb & Dixon, 1997).

Zusätzlich zu lokalen Resistenz Antworten können Pflanzen eine systemische Resistenz entwickeln. Die erfolgreiche lokale Pathogenabwehr führt dabei in nicht unmittelbar befallenen Pflanzenteilen ebenfalls zur Erhöhung der Resistenz und schützt so vor späteren Angriffen. Dieses Phänomen der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) entwickelt sich im allgemeinen innerhalb mehrerer Tage nach der Infektion (Ryals *et al.*, 1996). SAR wirkt gegen ein breites Spektrum von Pathogenen und erfordert das phenolische Signalmolekül Salicylsäure (SA) (Dempsey, 1999). Korrelierend mit der Aktivierung von SAR werden einige *pathogen-related* (PR) Proteine mit antimikrobieller Wirkung exprimiert (Feys & Parker, 2000; Weigel *et al.*, 2005). PR-Proteine können in 17 Familien (PR-1 bis PR-17) unterteilt werden (van Loon *et al.*, 2006). Viele PR-Proteine werden durch die Signalmoleküle SA, Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) induziert (van Loon *et al.*, 2006), wobei die Signaltransduktionswege nicht im Einzelnen geklärt sind. Zu den PR-Proteinen gehören z.B. β -1,3-Endoglucanasen (PR-2) und Endochitinasen (PR-3,

PR-4, PR-8 und PR-11), die pilzliche Zellwände hydrolysieren können (Schröder *et al.*, 1992; Hong *et al.*, 2000; Jung & Hwang, 2000). Ein breites Spektrum an antibakteriellen und antipilzlichen Aktivitäten weisen die kleinen (ca. 5 kDa) basischen cystein-reichen Defensine (PR-12) und Thionine (PR-13) auf (Lay & Anderson, 2005; Bohlmann, 1994; Epple *et al.*, 1997). Mitglieder der PR-1 und der PR-5 Familie (*thaumatin-like proteins*) wurden mit Aktivitäten gegen Oomyceten wie z.B. *Phytophthora* assoziiert (van Loon *et al.*, 2006). Bei den PR-9 Proteinen handelt es sich um einen spezifischen Typ von Peroxidasen, die die Lignifizierung zur Verstärkung der Zellwand katalysieren (Passardi *et al.*, 2004) und so die Resistenz gegen viele Pathogene erhöhen.

Tab. 1.1: Bekannte Familien von PR-Proteinen. Verändert nach van Loon *et al.* (2006, <http://www.bio.uu.nl/~fytopath//PR-families.htm>).

Familie	Mitglied	Funktion	Symbol	Referenz
PR-1	Tabak PR-1a	Antifungale Aktivität	<i>Ypr1</i>	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	Tabak PR-2	β -1,3-Glucanase	<i>Ypr2</i>	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	Tabak P, Q	Chitinase Typ I,II, IV,V,VI,VII	<i>Ypr3, Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	Tabak R	Chitinase Typ I,II	<i>Ypr4, Chid</i>	Van Loon, 1982
PR-5	Tabak S	Thaumatococcus-ähnlich	<i>Ypr5</i>	Van Loon, 1982
PR-6	Tomate, Inhibitor I	Proteinase-Inhibitor	<i>Ypr6, Pis</i>	Green & Ryan, 1972
PR-7	Tomate P69	Endoproteinase	<i>Ypr7</i>	Vera & Conejero, 1988
PR-8	Gurke Chitinase	Chitinase Typ III	<i>Ypr8, Chib</i>	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	Tabak Lignin-bildende Peroxidase	Peroxidase	<i>Ypr9, Prx</i>	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	Petersilie PR-1	Ribonuclease-ähnlich	<i>Ypr10</i>	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	Tabak Klasse V Chitinase	Chitinase	<i>Ypr11, Chic</i>	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rettich Rs-AFP3	Defensin	<i>Ypr12</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI2.1	Thionin	<i>Ypr13, Thi</i>	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	Gerste LTP4	Lipid-Transfer Protein	<i>Ypr14, Ltp</i>	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	Gerste OxOa (Germin)	Oxalat Oxidase	<i>Ypr15</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	Gerste OxOLP	Oxalat Oxidase-ähnlich	<i>Ypr16</i>	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	Tabak PRp27	unbekannt	<i>Ypr17</i>	Okushima <i>et al.</i> , 2000

1.4 Extrazelluläre Abwehrreaktionen

Der apoplastische Raum von Pflanzen ist der extrazelluläre Bereich in dem die wässrige Phase frei diffundieren kann. Dieser Bereich besteht aus einer komplexen Mischung aus Kohlenhydraten, Proteinen, Wasser, anorganischen Komponenten und anderen Metaboliten. Mit dem Apoplasten werden verschiedene Funktionen verbunden, in erster Linie der apoplastische Transport, aber auch Abwehr, Entgiftung, Signalweiterleitung, Zell-Zell Erkennung, Zellstreckung, -adhäsion und -entwicklung (Grignon & Sentenac 1991; Showalter, 1993; Dietz, 1997). Eine bedeutende Rolle spielt der Apoplast bei der pflanzlichen Antwort auf biotischen und abiotischen Stress (Bolwell *et al.*, 2002; Wilkinson & Davies, 2002; Plöchl *et al.*, 2000). Zum extrazellulären Raum wird außerdem der Xylemsaft gezählt. Der Wassertransport geschieht durch die toten und hohlen Xylemgefäße. In höheren Landpflanzen sind die Xylemsäfte ein wesentliches Transportmedium für die Versorgung der oberirdischen Pflanzenteile mit Wasser, Nährsalzen und anderen Metaboliten (DeBoer & Volkov 2003). Da Xylemsäfte auch Aminosäuren und Proteine enthalten, bieten sie

Mikroorganismen eine gute Lebensgrundlage. So wurden im Xylemsaft von Raps beispielsweise 4,8 mM Aminosäuren und 0,06 mM Saccharose gefunden (Zhou, 2000). Die Proteinzusammensetzung in Xylemsäften verschiedener Pflanzen ist weitgehend konserviert, wobei Proteasen, Chitinasen und Peroxidasen besonders häufig vorkommende Proteine sind (Buhtz *et al.*, 2004).

Durch Infektion mit *Verticillium* Arten werden auch in den Xylemgefäßen verschiedene Abwehrreaktionen aktiviert, z.B. Suberinisierung der Xylemgefäße, Phytoalexin Synthese und Kallosebildung, sowie die Expression von PR-Genen (Dubery & Slater, 1997; Gold & Robb 1995; Tjamos & Beckman 1989). In *V. dahliae* infizierten Baumwollpflanzen war die Expression von PR-Genen wie Glucanase (PR-2), Chitinase (PR-3) und Ypr10-like (PR-10) hochreguliert (McFadden *et al.*, 2001). In Blattscheiben, die mit *Verticillium* Zellwandfragmenten behandelt worden waren, konnten höhere Aktivitäten von Chitinasen und 1,3- β -Glucanase nachgewiesen werden (Dubery & Slater, 1997). Jedoch scheint die Proliferation des Pilzes im Xylem in keinem festen Zusammenhang mit der Ausbildung von Schadsymptomen zu stehen. So zeigten zum Beispiel Veronese *et al.* (2003), dass die Besiedelung mit *V. dahliae* in zwei unterschiedlich empfindlichen Ökotypen von *Arabidopsis thaliana* zunächst ähnlich verlief. Dennoch waren die Verluste an Biomasse und das Ausmaß der Vergilbung im Ökotyp Columbia deutlich stärker als bei C-24. Außerdem wurde durch die Infektion im Vergleich zu mock-inokulierten Kontrollen der Blühzeitpunkt bei Columbia deutlich nach vorne und bei C-24 nach hinten verschoben. Aus diesen Ergebnissen wurde gefolgert, dass die Reaktion der Pflanze auf *Verticillium* Arten nicht allein durch Pilz-bürtige Signale bedingt wird, sondern auch von der eigenen genetischen Konstitution abhängt (Veronese *et al.*, 2003).

Bei vielen Pflanzen wurde beobachtet, dass *Verticillium*-Infektionen Thyllenbildung im Xylem auslösen (Benhamou, 1995). Dem Xylem benachbarte Parenchymzellen bilden Ausstülpungen in die Gefäße, durch die der Xylemfluss und damit die Ausbreitung des Pilzes verhindert werden soll (Fradin & Thomma, 2006). Die Rolle von Thyllenbildung in der *Verticillium*-Abwehr wurde kontrovers diskutiert, da Thyllen sowohl bei kompatiblen als auch bei nicht kompatiblen Reaktionen vorkommen und häufig erst spät im Infektionsverlauf auftreten, wenn der Pilz sich im Xylem bereits systemisch ausgebreitet hat (Beckman, 1964; Pegg & Brady, 2002). Die Blockade des Xylems durch die Thyllen und Pilzhyphen könnte zur Symptomausprägung und Welkeerscheinungen der Pflanzen im Krankheitsverlauf beitragen; alternativ dazu wurden vom Pilz ausgehende Signale für die Symptominduktion vorgeschlagen (Pegg & Brady, 2002). Als potentielles Signalpeptid von *Verticillium* ist unter anderem ein Glycoprotein diskutiert worden, welches auch in Abwesenheit des Pilzes typische Symptome an Wirtspflanzen hervorrufen kann (Meyer *et al.*, 1994; Nachmias *et al.*, 1987; 1990).

Allgemein wurde in mit pilzlichen Pathogenen infizierten Pflanzen die Akkumulation potentiell antimikrobieller Komponenten, wie PR-Proteinen, Phytoalexinen und phenolischen Verbindungen in Wurzeln und Stämmen beobachtet (Benhamou, 1995; Cooper *et al.*, 1996; Daayf *et al.*, 1997; Williams *et al.*, 2002). Auch im Blattapoplasten konnte schon die Akkumulation potentiell antimikrobieller Proteine beobachtet werden. So wurde beispielsweise im Blattapoplasten von Tomate nach Infektion mit *Cladosporium fulvum* die

Bildung der PR-Proteine Chitinase und 1,3- β -Glucanase gezeigt (Joosten & De Wit, 1989). Ein Germin-artiges Protein mit Aktivität als Protease-Inhibitor wurde im Blattapoplasten von Weizen nach Infektion mit *Septoria tritici* nachgewiesen (Segarra *et al.*, 2003). In Reis führte die Infektion mit dem vaskulären Pathogen *Xanthomonas oryzae* zur Akkumulation einer kationischen Peroxidase im Apoplasten von Mesophyllzellen, in den Zellwänden und Gefäßlumina von Xylemelementen (Young *et al.*, 1995).

Die Proteinzusammensetzung im Xylemsaft von Tomate änderte sich stark durch Infektion mit dem xylem-kolonisierenden Pilz *Fusarium oxysporum* (Rep *et al.*, 2002). Es traten mit unterschiedlicher zeitlicher Kinetik neue Proteine auf, die neben einem pilz-bürtigen Protein, überwiegend pflanzlichen Ursprungs waren. Mit Hilfe von Massenspektrometrie wurden unter den neu auftauchenden Proteinen eine saure und eine basische Glucanase identifiziert (Rep *et al.*, 2002), die durch Pathogene auch im Blattapoplasten induziert werden (Joosten & De Wit, 1989). Außerdem wurde ein neues Mitglied der PR-5 Familie identifiziert, das eine hohe Homologie mit basischen, vakuolären Proteinen (auch bekannt als Osmotine) aufweist. Diese xylem-sezernierte Isoform von PR-5 akkumulierte zu einem relativ frühen Zeitpunkt nach Infektion und war das einzige Protein, das in hohen Mengen auch bei inkompatiblen Interaktionen auftrat, während die anderen Proteine erst zu späteren Zeitpunkten und nur bei kompatiblen Interaktionen, begleitend mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen akkumulierten (Rep *et al.* 2002). Anders als im Blattapoplasten pathogen-infizierter Tomaten (Joosten und De Wit, 1989), konnte im Xylemsaft nach *F. oxysporum* Infektion keine starke Akkumulation der PR-3 Chitinase nachgewiesen werden, sondern diese wurde nur in geringen Mengen mittels Immunodetektion gefunden (Rep *et al.*, 2002). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Xylem und Blattapoplast unterschiedlich auf Invasion mit Xylem-lokalisierten Pilzen reagieren.

1.5 Die Funktion von Peroxidasen in der Pathogen-Abwehr

Peroxidasen kommen in Pflanzen, Tieren, Bakterien und Pilzen vor. Die Superfamilie der Pflanzenperoxidasen besteht aus drei Klassen. Die Klasse I der intrazellulären Peroxidasen beinhaltet die Cytochrom C Peroxidasen aus Hefen bzw. Bakterien, die Ascorbat-Peroxidasen aus höheren Pflanzen und die bakteriellen bzw. pilzlichen Catalase-Peroxidasen. Die Klasse II wird von den sekretorischen pilzlichen Lignin-Peroxidasen und Mangan-abhängigen Peroxidasen gebildet, während die sekretorischen Pflanzenperoxidasen die Klasse III bilden (Hiraga *et al.*, 2001; Welinder *et al.*, 1992).

In Pflanzen spielen also zum einen die intrazellulären Ascorbat-Peroxidasen der Klasse I eine Rolle und zum anderen die klassischen Pflanzenperoxidasen (POX) der Klasse III, die über das Endoplasmatische Retikulum aus der Zelle sekretiert oder in die Vakuole transportiert werden (Hiraga *et al.*, 2001). In *Arabidopsis thaliana* wurden 73 Vollängen Gene für Klasse III Peroxidasen identifiziert (Welinder *et al.*, 2002), von denen 58 als Transkripte gefunden wurden. Alle Pflanzenperoxidasen haben die gleiche generelle Struktur, bestehend aus einem Häm-Zentrum (Fe^{3+} Protoporphyrin IX) und zehn α -Helices. Klasse III Peroxidasen enthalten außerdem drei zusätzliche α -Helices, einige hochkonservierte Aminosäuren und vier Disulfidbrücken (Passardi *et al.*, 2004, Welinder *et al.*, 2002). POX katalysieren die Reduktion von H_2O_2 , indem sie Elektronen von

Donormolekülen wie phenolischen Substanzen, Ligninvorstufen, Auxin oder sekundären Metaboliten übertragen (Hiraga *et al.*, 2001). Die Vielfalt der von POX oxidierbaren Substrate ist der Grund dafür, dass diese Enzyme in einer breiten Palette von physiologischen Prozessen involviert sind (De Gara, 2004). In zahllosen Studien wurde die Rolle der Pflanzenperoxidasen untersucht und es wurden ihnen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben (Passardi *et al.*, 2005), darunter Lignifizierung (Whetten *et al.*, 1998), Suberinisierung (Espelie *et al.*, 1986), Vernetzung von Strukturproteinen der Zellwand (Fry, 1986), Auxin-Katabolismus (Lagrimini *et al.*, 1997), Abwehr gegen Pathogene (Chittoor *et al.*, 1997), Salztoleranz (Amaya *et al.*, 1999) und Seneszenz (Abeles *et al.*, 1988).

Peroxidasen tragen zur indirekten Abwehr von Pathogenen bei. Unter Nutzung von H₂O₂ können Peroxidasen aus Monolignolen Phenoxy-Radikale generieren, die dann spontan zu Ligninpolymeren vernetzen. Die Verstärkung von Zellwänden bietet einen Schutz vor dem Eindringen von Pathogenen (Passardi *et al.*, 2004). Abgesehen von der Oxidation von Substraten wurde eine weitere Funktion von Peroxidasen beschrieben: Native Peroxidasen können zu Oxyferroperoxidase reagieren, was zur Bildung verschiedener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Passardi *et al.*, 2004). Wie bereits unter 1.3 erwähnt, wirken ROS gegen Pathogene und sind an der Signalweiterleitung beteiligt. Eine weitere Funktion von Peroxidasen in der pflanzlichen Pathogen-Abwehr ist ihre Beteiligung an der Erhöhung der Synthese von Phytoalexinen (Kristensen *et al.*, 1999). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass viele verschiedene Peroxidasen mit unterschiedlichen Funktionen durch Pathogen-Infektion induziert werden (Harrison *et al.*, 1995; Chittoor *et al.*, 1997).

1.6 Die Funktion von Chitinasen in der Pathogen-Abwehr

Chitin ist die Hauptkomponente im Exoskelett von Insekten und Crustaceen, sowie in echten Pilzen, kommt aber in Oomyceten nicht vor. Pflanzen besitzen kein Chitin, aber dafür eine große Anzahl an Chitinasen. Anhand ihrer Funktionen werden Endo- und Exochitinasen unterschieden. Im folgenden soll nur auf die pflanzlichen Endochitinasen eingegangen werden, welche die Hydrolyse von Chitin, eines β -1,4-Homopolymers von N-Acetyl-D-Glucosamin, katalysieren (Cohen-Kupiec & Chet, 1998). Die Chitinase-Aktivität in Pflanzen erhöht sich stark nach Befall mit Pilzen, Bakterien und Viren (Broekert & Peumans, 1988; Kombrick *et al.*, 1988; Legrand *et al.*, 1987; Mauch *et al.*, 1984). Chitinasen werden aber nicht nur durch biotischen Stress, sondern auch durch abiotischen Stress induziert, wie z.B. durch Schwermetalle (Rivera-Becerril *et al.*, 2005), Ozon (Schraudner *et al.*, 1992) und UV-Bestrahlung (Gerhardt *et al.*, 2004). Außerdem spielen Chitinasen eine Rolle in Wachstumsprozessen und Symbiosen (Kasprzewska, 2003).

Viele Proteine mit chitinolytischer Aktivität wurden in Pflanzen beschrieben (Collinge *et al.*, 1993; Hamel *et al.*, 1997). Man findet sie in allen pflanzlichen Organen und Geweben sowohl im Apoplasten als auch in der Vakuole. Gemäß dem Klassifikationssystem der Glycosylhydrolasen, welches auf Sequenzähnlichkeiten der Aminosäuren der katalytischen Domäne basiert, werden Chitinasen in die Glycosylase-Familien 18 und 19 eingeteilt (Henrissat, 1991). Chitinasen der Familie 18 werden in Bakterien, Pilzen, Viren, Pflanzen und Tieren gefunden, während Mitglieder der Familie 19 fast ausschließlich in Pflanzen vorkommen. Höhere Pflanzen synthetisieren sieben verschiedene Klassen von Chitinasen,

die sich einerseits in ihrer Proteinstruktur und Substratspezifität unterscheiden und andererseits in ihrem Katalysemechanismus und der Sensitivität gegenüber Inhibitoren (Brunner *et al.*, 1998). Die Chitinasen der Klassen III und V gehören zu der Glycosidase Familie 18, während die anderen Chitinase Klassen in die Glycosidase Familie 19 eingeteilt werden (Hamel *et al.*, 1997; Cohen-Kupiec & Chet, 1998).

Im Hinblick auf ihre Eigenschaften und enzymatischen Aktivitäten in der Pathogenabwehr wurden pflanzliche Chitinasen als PR-Proteine eingestuft (Collinge *et al.*, 1993). Chitinasen gehören zu vier Kategorien von PR-Proteinen. Die Kategorie PR-3 beinhaltet Chitinasen der Klassen Ia, Ib, II, IV, VI und VII. Chitinasen der Klasse III gehören zu den PR-8 Proteinen und Chitinasen der Klasse V gehören zu den PR-11 Proteinen. Außerdem wurden in der Kategorie PR-4 einige chitin-bindende Proteine mit geringer Endochitinase-Aktivität gefunden (Neuhaus *et al.*, 1996; Melchers *et al.*, 1994). Die meisten Klasse Ia, III und VI Chitinasen haben einen basischen pH-Wert und sind in den Vakuolen lokalisiert. Saure Chitinasen aus den Klassen Ib, II, III, IV und VI werden in den Apoplasten sekretiert (Kasprzewska, 2003).

Chitinasen haben anscheinend eine doppelte Funktion in der Abwehr pilzlicher Pathogene: Apoplastische Chitinasen können Elicitemoleküle im frühen Stadium der Pathogenese aus Hyphen im extrazellulären Raum freisetzen (Collinge *et al.*, 1993; Gerhardt *et al.*, 1997). Die Eliciteure binden an Rezeptoren, die Abwehrmechanismen aktivieren, so dass verstärkt apoplastische und vakuoläre Chitinasen gebildet und sekretiert werden. Die Zunahme der apoplastischen Chitinasen erhöht die Produktion der Eliciteure, was wiederum die Infektionssignale erhöht (Gerhardt *et al.*, 1997). Wenn Hyphen in die Zelle eindringen und dabei den Protoplasten zerstören, treten die vakuolären Chitinasen in Aktion. Sie spalten die neu synthetisierten Chitinketten des Pilzes und unterdrücken so das Pilzwachstum (Collinge *et al.*, 1993). Demnach hätten apoplastische Chitinasen Anteil an der Signalgebung, die Pflanzen über die Pathogenattacke informiert, während die vakuolären Chitinasen das Pathogenwachstum inhibieren. Diese Hypothese wird durch die Substratspezifität der apoplastischen und vakuolären Chitinasen unterstützt. Vakuoläre Chitinasen sind aktiver gegen kristallines Chitin als apoplastische Chitinasen, während die apoplastischen Chitinasen besser lösliches Chitin hydrolysieren (Collinge *et al.*, 1993).

Passarinho und de Vries (2002) identifizierten mit Hilfe von Datenbankrecherchen 24 putative Chitinasen in *Arabidopsis*. Chitinase-Gene waren auf allen fünf *Arabidopsis* Chromosomen vorhanden. Alle gefundenen Chitinasen wiesen eine Länge von ungefähr 300 Aminosäuren auf und hatten ein vorausgesagtes Molekulargewicht zwischen 25 und 35 kDa. Basierend auf ihren Aminosäuresequenzen wurden alle *Arabidopsis* Chitinasen als Endochitinasen in fünf Klassen eingeordnet, wobei die Klassen I und III jeweils nur eine Chitinase beinhalten. Bei der Klasse III Chitinase handelt es sich um eine saure extrazellulär lokalisierte Endochitinase (At5g24090) mit einem Molekulargewicht von 33,1 kDa und einer Kettenlänge von 302 Aminosäuren. Eine Promotor-GUS Analyse zeigte, dass das Gen für diese Endochitinase durch Infektion mit dem Pathogen *Rhizoctonia solani* induziert wurde (Samac und Shah, 1991). Chitinasen wurden auch als potentielle Faktoren in der Abwehr gegen *V. dahliae* beschrieben (Berg *et al.*, 2001; McFadden *et al.*, 2001). Es ist daher naheliegend zu vermuten, dass sie auch bei *V. longisporum* Reaktionen eine Rolle spielen.

2. ZIELE

Das Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung des extrazellulären Proteoms von *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von *Verticillium longisporum* in Relation zur Ausprägung von Krankheitssymptomen.

Dazu mussten zunächst einige methodische Grundlagen, wie die Etablierung des Infektionssystems mit replizierbaren Infektionsverläufen, geschaffen werden. Die Gewinnung von Xylemsäften und apoplastischen Waschflüssigkeiten, verbunden mit der Minimierung der Kontamination durch symplastische Proteine, sollte optimiert werden. Weiterhin musste die Replizierbarkeit der Proteingele gegeben sein, um deren Auswertung mit einer speziellen Software zu ermöglichen.

Aufbauend auf diesen Grundlagen sollten die *Verticillium longisporum* bedingten Schäden an den Pflanzen *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* umfassend charakterisiert und in Relation zur Ausbreitung des Pilzes gesetzt werden. Dafür wurden verschiedene ökophysiologische Parameter an *Verticillium longisporum* infizierten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen betrachtet. Dies sollte den Vergleich zweier *Arabidopsis thaliana* Ökotypen hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber *Verticillium longisporum* und die Auswahl geeigneter Anzuchtbedingungen für die Proteomanalysen beinhalten. Da im Zusammenhang mit *Verticillium*-Infektionen das verstärkte Auftreten von Chitinasen beschrieben wurde, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit eine saure Endochitinase aus *Arabidopsis thaliana* funktionell zu charakterisieren. Dazu sollte eine Chitinase T-DNA Insertionsmutante aus *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von *Verticillium longisporum* untersucht werden.

Für die Proteomanalysen wurde ein geeigneter Zeitpunkt ermittelt zu dem differentiell auftretende Proteine im Xylemsaft und Blattapoplasten von *Verticillium*-infizierten Pflanzen durch Massenspektrometrie identifiziert werden sollten. Dabei diente Raps als Beispiel für eine landwirtschaftlich bedeutsame Pflanze, während die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* besonders als Plattform für molekulare Analysen herangezogen wurde. Ein weiteres Ziel war durch *Verticillium*-Infektion differentiell auftretende Proteine im Infektionsverlauf mittels Genexpressionsanalysen näher zu charakterisieren.

3. MATERIAL & METHODEN

3.1 Chemikalien

Alle Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertes Wasser (dd H₂O) aus dem Gerät Sartorius Arium 611 (Sartorius, Göttingen) angesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien bei der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

Aceton	AppliChem, Darmstadt
Acetonitril	Fisher Scientific, Loughborough, GB
Acrylamid (30 %)	Biomol, Hamburg
Agarose Seakem LE	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Agarose (low melting point)	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Ammoniumbicarbonat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
BCA	Uptima, Montelucon, Frankreich
CHAPS	Fluka, Buchs, Schweiz
Coomassie Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg
CTAB	Roth, Karlsruhe
dNTPs	MBI Fermentas, St.Leon-Rot
Dry-Strip cover fluid	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
DTT	Fluka, Buchs, Schweiz
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethanol	GeReSO mbH, Einbeck
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fe-EDTA Natriumsalz	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formaldehyd (37 %)	Fluka, Buchs, Schweiz
Gelrite	Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande
Guajakol	Fluka, Buchs, Schweiz
Harnstoff	KMF, Lohmar
Inosit	Serva, Heidelberg
Iodoacetamid	Fluka, Buchs, Schweiz
IPG-Puffer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	KMF, Lohmar
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Oxalessäure	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Potato Dextrose Agar	Scharlau, Barcelona, Spanien
Potato Dextrose Broth	Scharlau, Barcelona, Spanien
Phosphorsäure	KMF, Lohmar
PVPP, unlöslich	Sigma-Aldrich, Steinheim
PVPP, löslich, MW 30000	Sigma-Aldrich, Steinheim
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Schwefelsäure (96 %)	Roth, Karlsruhe
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Silbernitrat	Fluka, Buchs, Schweiz
TEMED	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Promega, Madison WI, USA

3.2 Pflanzenanzucht und Inokulation mit *Verticillium longisporum*

3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und Inokulation

Zunächst wurden die Samen von *Arabidopsis thaliana* in einem 1,5 ml Gefäß sterilisiert. Unter der Sterilbank wurde eine kleine Menge Samen in 1 ml 5 % Calciumhypochlorid ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$)/0,02 % Triton X-100 für mindestens 15 min inkubiert und anschließend dreimal mit sterilem dd H_2O gewaschen. Einzelne Samen wurden dann mit einer sterilen Impföse oder Pipettenspitze aufgenommen und steril auf Wurzelmedium (Tab. 3.1; verändert nach Murashige & Skoog, 1962) ausgelegt. Wenn nicht anders angegeben wurden die *Arabidopsis*-Samen in den Schalen mit Wurzelmedium nach drei Tagen Kältereiz bei 4 °C im Kühlschrank, in einen Klimaschrank (AR-75L, Percival Scientific, Perry, USA) überführt und für vier Wochen bei 20 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und 8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkel Zyklus wachsen gelassen. Die Lichtintensität im Klimaschrank betrug $120 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s}^{-1})$.

Tab. 3.1: Zusammensetzung des Wurzelmediums. Die Stamm-Lösungen wurden separat angesetzt und bei 4 °C gelagert. Für 1 L Wurzelmedium wurden von den Stamm-Lösungen 100 ml Makroelemente, 1 ml Mikroelemente, 1 ml Vitamine und die anderen Zusätze wie in der Tabelle angegeben gemischt. Vor der Zugabe des Gelrites wurde der pH-Wert mit NaOH auf 5,8 eingestellt, anschließend wurde das vollständige Medium autoklaviert.

	Konzentration in der Stamm-Lösung	Endkonzentration
Stamm 1: Makroelemente		
KNO_3	250 mM	25 mM
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	13,7 mM	1,4 mM
$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	16 mM	1,6 mM
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	26 mM	2,6 mM
Stamm 2: Mikroelemente		
H_3BO_3	5 mM	5 μM
$\text{MnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	6 mM	6 μM
$\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	1 mM	1 μM
KJ	0,5 mM	0,5 μM
Na_2MoO_4	0,1 mM	0,1 μM
$\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mM	0,1 μM
$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1 mM	0,1 μM
Stamm 3: Vitamine		
Nicotinsäure	4 mM	4 μM
Pyridoxin-HCl	2,4 mM	2,4 μM
Thiamin-HCl	0,3 mM	0,3 μM
Andere Zusätze		
Glycin	2 g/L	1 ml Stock/L
Inosit	20 g/L	5 ml Stock/L
EDTA-Eisen (III)-Natriumsalz	7,34 g/L	5 ml Stock/L
Saccharose		25 g/L
Gelrite		2,8 g/L

Die *Verticillium longisporum* bzw. mock-Inokulation wurde beim Einpflanzen der *Arabidopsis* in Erde durchgeführt, indem 10 ml $1\text{-}2 \times 10^6$ Sporen/ml (siehe 3.2.3) bzw. Wasser an die Wurzeln der Pflanzen gespritzt wurden. Dafür war von den Wurzeln vorher ca. 1 cm mit einer Schere abgeschnitten worden. Nach Einpflanzen und Inokulation wuchsen die Pflanzen bei

20 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und 8 h Licht/16 h Dunkel Zyklus in dem Klimaschrank weiter. Einmal pro Woche wurden die Pflanzen mit je 10 ml *Wuxal* (Aglucon, Düsseldorf; 500 µl/L Leitungswasser) gedüngt.

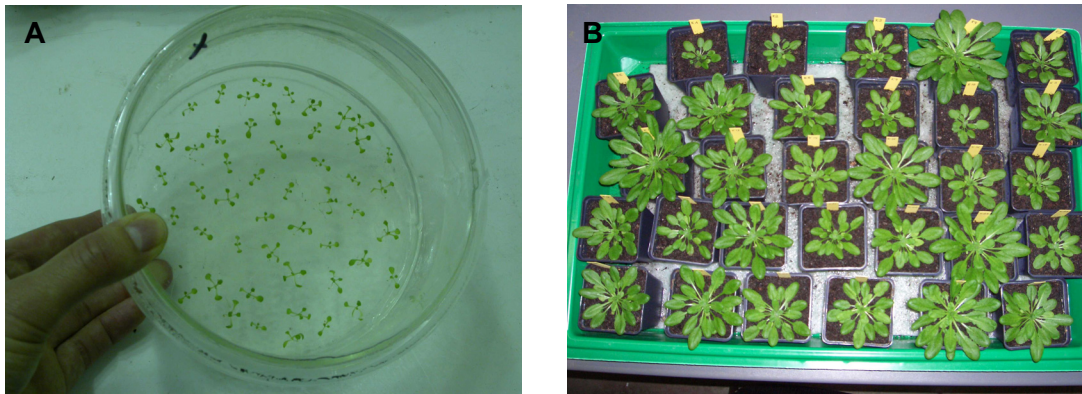


Abb. 3.1: Die Anzucht von *Arabidopsis* erfolgte zunächst auf Wurzelmedium (A), nach der Inokulation mit *Verticillium longisporum* in Erde (B).

3.2.2 Anzuchtbedingungen für Raps und Inokulation

Die Anzucht von *Brassica napus* (*rapid cycle rape*) erfolgte zunächst für zwei Wochen steril auf Wurzelmedium (Tab. 3.1). Die Sterilisation der Samen wurde wie für *Arabidopsis* unter 3.2.1 beschrieben durchgeführt. Danach wurde der Raps in ein 1:1 Erde/Sand-Gemisch gepflanzt und mit *Verticillium longisporum* inokuliert. Für die Inokulation wurden 10 ml Sporensuspension (siehe 3.2.3) mit einer Konzentration von 2×10^6 /ml direkt in das Erde/Sand-Gemisch zu vorher angeschnittenen Wurzeln gespritzt. Der Raps wuchs in einer Klimakammer bei 20 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit und 16 h Licht/8 h Dunkel Zyklus bei einer Lichtintensität von $200 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s}^{-1})$. Nach der Inokulation wurde der Raps wöchentlich mit 10 ml Dünger pro Pflanze gedüngt (10 g/L Flory Basisdünger der Firma Euflor in München und 2,2 g NH_4NO_3 /L Leitungswasser).

3.2.3 Vorbereitung von *Verticillium longisporum* für die Inokulation

Verticillium longisporum (Stamm VL43 aus *Brassica napus*; zur Verfügung gestellt von der AG von Tiedemann, Department für Nutzpflanzenwissenschaften in Göttingen) wurde standardmäßig auf Potato Dextrose Agar (Scharlau, Barcelona, Spanien) angezogen und als Glycerinkultur bei -20 °C gelagert. Zur Vermehrung für die Inokulation wurden 3-4 Stenzen mit einem sterilen Korkbohrer (Durchmesser 0,8 cm) von den Agarplatten in 250 ml flüssiges Potato Dextrose Medium (Scharlau, Barcelona, Spanien) mit 0,2 µg/ml Streptomycin (Sigma, Steinheim) überführt. Unter leichtem horizontalem Schütteln bei 80 rpm (G10 Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA) wuchsen die Kulturen für 2-3 Wochen bei 22 °C im Dunkeln wie bei Fahleson *et al.* (2003) beschrieben. Zur Pilzernte wurde die Suspension durch ein Sieb gegeben um das Myzel zu entfernen und nur die Sporen zu erhalten. Um die gewonnenen Sporen von Medium zu befreien, wurde die Sporensuspension anschließend in 50 ml Röhrchen bei 900 x g (Rotanta 96 R, Hettich, Tuttlingen) für 10 min zentrifugiert, der Überstand vollständig abgegossen und die Sporen in Leitungswasser aufgenommen. Die Anzahl der Sporen in der erhaltenen Suspension wurde

mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde die Sporenzahl in 16 Kleinquadraten gezählt und mit der Fläche (0,04 mm²) und Höhe (0,1 mm) multipliziert um Sporenzahl pro µl zu erhalten. Die Zellzahl wurde dann für die Inokulation mit Leitungswasser auf 1-2 x 10⁶ Sporen/ml eingestellt.

3.3 Ökophysiologische Methoden

3.3.1 Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Das Prinzip der Chlorophyllfluoreszenzanalyse beruht darauf, dass Lichtenergie von den Chlorophyllmolekülen in Blättern absorbiert wird und dann einen von drei verschiedenen Wegen gehen kann. Erstens kann sie für die Photosynthese genutzt werden, zweitens kann sie als Wärme verloren gehen oder drittens als Licht-Chlorophyllfluoreszenz wieder abgestrahlt werden. Da diese drei Prozesse in Konkurrenz zueinander stehen, bedeutet eine Änderung der Effizienz des einen auch eine Änderung der anderen beiden. So können durch Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz Rückschlüsse auf die Aktivität der Photosynthese gezogen werden (Maxwell und Johnson 2000). Die Chlorophyllfluoreszenz wurde mit Hilfe des MINI-PAM Gerätes der Firma Walz (Effeltrich, Deutschland) an Blättern von *Arabidopsis thaliana* und Raps gemessen. Das Prinzip der Messung beruht darauf, dass ein kurzer, starker Lichtimpuls über eine Diode auf das Blatt appliziert wird. Bevor das Licht auf das Blatt trifft, wird es über einen Filter modifiziert, der Licht mit einer Wellenlänge von $\lambda < 670$ nm durchlässt. Der Lichtimpuls erzeugt im Blatt die Emission von Chlorophyllfluoreszenz. Das emittierte Signal wird durch zwei Filter, die Licht von einer Wellenlänge von $\lambda > 700$ nm, aber keine Wärmestrahlung durchlassen, herausgefiltert, verstärkt und über einen Detektor gemessen (Betriebsanleitung Walz).

Die folgenden Parameter wurden gemessen: die maximale Fluoreszenz (F_m), die Grundfluoreszenz (F_0) und die aus der Differenz resultierende variable Fluoreszenz ($F_v = F_m - F_0$). Dabei wurde unterschieden, ob die Messung der Chlorophyllfluoreszenz im Licht oder im Dunkeln erfolgte. Im Dunkeln sind alle Reaktionszentren offen. Ein sättigender Lichtimpuls führt zum sofortigen Schließen der Reaktionszentren und zur maximalen Chlorophyllfluoreszenzemission, die durch den zeitlich versetzt erfolgten Weitertransport der Energie über die Elektronentransportkette bald wieder gelöscht wird. Mit den Fluoreszenzwerten kann die maximale photosynthetische Aktivität, auch als maximale Quantenausbeute vom Photosystem II oder kurz als „Yield“ bezeichnet, berechnet werden.

$$\text{Yield} = (F_m - F_0) / F_m = F_v / F_m$$

(Kitajima and Butler 1975, Rohacek 2002)

Im Licht sind die Fluoreszenzwerte geringer und werden entsprechend mit F_m' und F_t (*Steady State* Fluoreszenz) bezeichnet (Maxwell und Johnson 2000). Die sich daraus ergebene aktuelle Quantenausbeute wird mit Φ_{II} bezeichnet und analog zur obigen berechnet:

$$\Phi_{II} = (F_m' - F_t) / F_m' \text{ (Maxwell und Johnson 2000).}$$

3.3.2 Messung der Elektrolytleitfähigkeit

Elektrolyte kommen innerhalb der Zellmembranen von Pflanzenzellen vor. Diese Membranen sind sensitiv für Umweltstress, das heißt die Permeabilität der Membranen erhöht sich durch Stress (Campos *et al.*, 2003). Ungestresste, unversehrte Pflanzen behalten die Elektrolyte innerhalb der Membran, während Zellen die Stress ausgesetzt sind Elektrolyte in die Umgebung abgeben. Eine Bestimmung von Membranschäden kann durch den Vergleich der Leitfähigkeit von ausgetretenen Elektrolyten aus beschädigten und unbeschädigten Geweben in demineralisiertem Wasser erfolgen (Mattson, 1996; McNabb & Takahashi, 2000). Die Messung der Elektrolytleitfähigkeit (*Electrolyte leakage*) wurde nach Polle *et al.* (2001) modifiziert. Dazu wurden frische Blätter von *Arabidopsis* bzw. Raps geerntet und mit einem Korkbohrer ca. 25 Blattscheiben ausgestochen und in ein 50 ml Reaktionsgefäß eingewogen; dann wurden 20 ml dd H₂O zugegeben. Die Leitfähigkeit in der Flüssigkeit (L_0) wurde nach 10 min mit einem Konduktometer (Model LF 315/SET, WTW, Wissenschaftliche Technik, Weilheim) gemessen, um den Anteil der Elektrolyte zu bestimmen, die durch die gestanzten Ränder ausgetreten waren. Die Proben wurden 24 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wurde die Leitfähigkeit (L_t) erneut gemessen. Um die maximale Leitfähigkeit (L_{max}) zu bestimmen, wurden die Proben autoklaviert (5 min bei 121 °C) und nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erneut gemessen. Der prozentuale Anteil der in 24 Stunden ausgetretenen Elektrolyte (EL) wurde nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$EL (\%) = [(L_t - L_0) / L_{max}] * 100$$

3.3.3 Bestimmung des osmotischen Drucks

Für die Messung des osmotischen Drucks wurden ca. 0,5 g unter flüssigem Stickstoff pulverisiertes Blattmaterial in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen (Frischmasse, FM), gefriergetrocknet und anschließend das Trockenmasse (TM) bestimmt. Danach wurde als Lösungsmittel (LM) pro Probe 1 ml demineralisiertes Wasser zugegeben, gemischt und 25 min bei 900 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl blasenfrei in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß gefüllt und am Kryo-Osmometer (Osmomat 030, Ganotec, Berlin) gemessen (OS). Die Osmolarität bzw. Osmolalität und der osmotische Druck wurde nach folgenden Gleichungen berechnet:

Osmolalität (osmol/kg) = gemessene OS (osmol/kg) * Verdünnung

Osmotischer Druck (MPa) = Osmolalität * R * T

Wobei R = Gaskonstante (0,00831 L*MPa*mol⁻¹*K⁻¹); T = Temperatur = 295 K

Verdünnung = LM (ml) / Wasseranteil des Blattmaterials (FM-TM (ml))

3.3.4 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde Blattmaterial unter flüssigem Stickstoff pulverisiert. Von dem gefrorenem Pulver wurden ca. 30 mg in ein Zentrifugenröhrchen aus Glas eingewogen, die Einwaage wurde notiert und pro Röhrchen wurden 5 ml 80 %iges Aceton zugegeben. Die Proben wurden gut gemischt und anschließend 20 min im Dunkeln

auf Eis inkubiert. Danach wurden die Röhrcchen 15 min bei 4890 x g und 4 °C zentrifugiert und der Chlorophyllgehalt im Überstand photometrisch bei den Wellenlängen 663 und 646 nm bestimmt (Beckman DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

Die Chlorophyllkonzentration wurde nach Lichtenthaler und Wellburn (1983) berechnet:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/ml Extrakt}) = 12,21 * A_{663} - 2,81 * A_{646}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/ml Extrakt}) = 20,13 * A_{646} - 5,03 * A_{663}$$

Die Chlorophyllgehalte wurden mit folgenden Formeln bestimmt:

$$\text{Chl a } (\mu\text{g/g FM}) = \text{Chl a } (\mu\text{g/ml Extrakt}) * V_e (\text{ml}) / \text{FM}$$

$$\text{Chl b } (\mu\text{g/g FM}) = \text{Chl b } (\mu\text{g/ml Extrakt}) * V_e (\text{ml}) / \text{FM}$$

Wobei: A_{663} = Absorption bei $\lambda = 663$ nm

A_{646} = Absorption bei $\lambda = 646$ nm

V_e = Volumen der Extraktion (5 ml)

FM = eingewogene Frischmasse

3.3.5 Messung der Photosyntheserate

Zwischen der Pflanze und der Umgebung findet ein Austausch von Gasen statt, den man als Gaswechsel bezeichnet. Die Gase denen die größte Bedeutung zukommt sind Kohlendioxid (CO_2), Sauerstoff (O_2) und Wasserdampf (H_2O). Der Austausch von Kohlendioxid und Sauerstoff ist an primäre Prozesse der Photosynthese gekoppelt, während die Wasserdampfabgabe eine wichtige Rolle für den Wasserhaushalt der Pflanze spielt. Die Photosyntheserate und die Transpiration wurde mit Hilfe des Photosynthese Systems HCM 1000 der Firma Walz (Effeltrich, Deutschland) nach Herstellerangaben gemessen. Dafür wurde das zu untersuchende Blatt in eine Luft-durchströmte Küvette eingespannt. Die aus der Küvette austretende Luft unterscheidet sich durch die H_2O -Abgabe und CO_2 -Aufnahme des Blattes von der einströmenden Luft. Durch einen Infrarot-Gasanalysator (IRGA) wurden die H_2O und CO_2 Konzentration gemessen und anhand der Differenz in der einströmenden und austretenden Luft konnten die Photosyntheserate und Transpiration berechnet werden. Mit Hilfe eines Beleuchtungsaufsatzes wurde das zu untersuchende Blatt während der Messung mit einer konstanten Lichtintensität von $800 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \text{s}^{-1})$ bestrahlt.

3.3.6 Blattflächenmessung bei *Arabidopsis thaliana*

Zur Messung der projizierten Blattfläche der Rosetten von *Arabidopsis thaliana* wurden die Pflanzen nach mock bzw. *Verticillium*-Inokulation zweimal wöchentlich fotografiert (Digital-Kamera QV R52) und mittels einer speziell entwickelten Software (DatInf GmbH, Tübingen) analysiert. Die Diagonale des Topfes diente als Maßstab und betrug für die verwendeten Töpfe 91 mm. So konnte direkt über die Pixelzahl die sichtbare Gesamtrosettenfläche einer Pflanze berechnet werden.

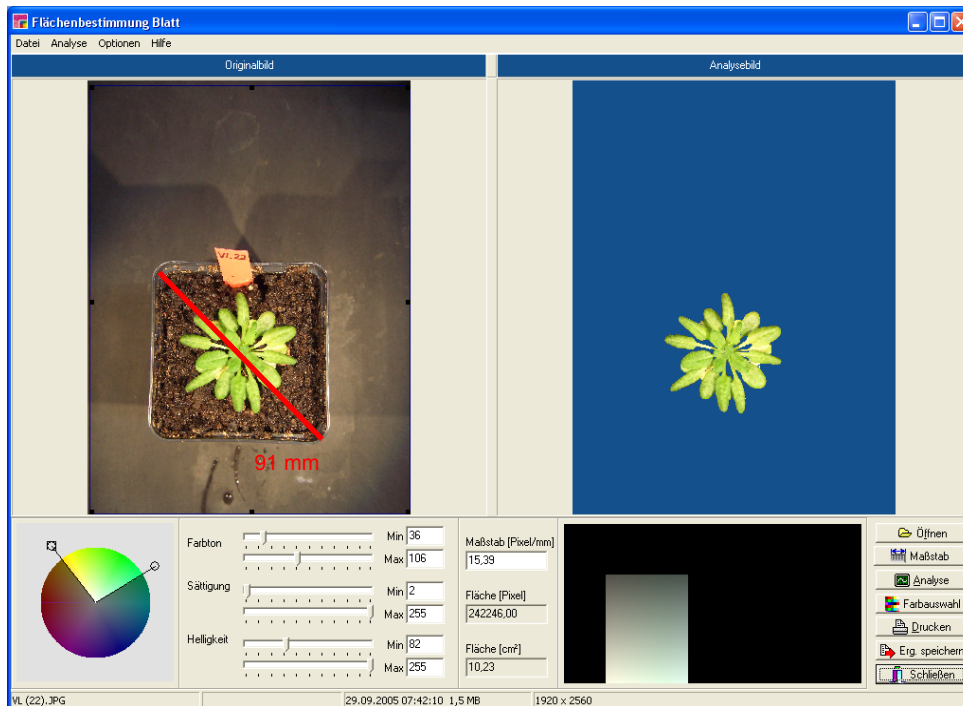


Abb. 3.2: Screenshot des Programms zur Blattflächenauswertung. Links das Foto einer *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* Pflanze. Die Topfdiagonale, hier in rot, diente als Maßstab. Rechts ist das mit Hilfe der Software analysierte Bild zu sehen. Farbton, Helligkeit und Sättigung konnten so eingestellt werden, dass die gesamte Rosette, nicht jedoch die Erde etc. erfasst wurde.

3.3.7 C/N Analyse

Gefrorene Blattproben von *Arabidopsis* wurden unter flüssigem Stickstoff in einer Mühle (Typ MM 2, Retsch, Haan) zu feinem Pulver gemahlen und anschließend gefriergetrocknet. Der C/N-Gehalt wurde mit Hilfe eines Elemental Analyser EA-1108 (Carlo Erba Instruments, Rodano, Italien) bestimmt. Zur Analyse wurden ca. 0,8 mg getrocknetes Blattpulver in eine Zinnkapsel (HEKAtech GmbH, Wegberg) eingewogen, wobei das genaue Gewicht jeweils protokolliert und bei der späteren Berechnung der Stoffkonzentration berücksichtigt wurde. Dann wurden die Proben in einen Probenhalter des Elementanalyzers gegeben. Zur Messung fallen die Proben in ein Verbrennungsrohr, wo sie bei 1020 °C verbrannt werden. Der im Verbrennungsrohr befindliche Oxidationskatalysator (Chrom-III-Oxid) spaltet die in der Probe vorhandenen Stoffe unter Zugabe von Sauerstoff auf, wobei N₂, CO₂ und H₂O reduziert werden, während im Verbrennungsrohr befindliches reduziertes Kupfer oxidiert wird. Diese Produkte werden anschließend chromatographisch getrennt. Ein an die Säule angeschlossener Wärmeleitfähigkeitsdetektor gibt elektrische Signale der aufgetrennten Elemente an einen Integrator weiter. Der Integrator erzeugt je nach Stärke der empfangenen Signale unterschiedliche hohe Peaks. Anhand der Flächen unter den Peaks wurden die Konzentration von Stickstoff und Kohlenstoff mit Hilfe der Standardsubstanz Acetanilid (C₈H₉NO, HEKAtech GmbH, Wegberg) berechnet.

3.3.8 Optische ICP-Emissionsspektrometrie zur Elementanalyse

Die ICP-OES (*inductively coupled plasma - optical emission spectrometry*) dient zur quantitativen Analyse von Elementen in wässrigen Lösungen. Die Methode beruht auf der Verwendung eines sehr heißen (ca. 8000 °C) Argonplasmas zur Anregung der optischen Emission der zu analysierenden Elemente. Die ICP-OES Messungen wurden in einem ICP-Spektrometer (Spectroflame, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Deutschland) durchgeführt, indem die Proben als Aerosol durch eine Argon-Plasmaflamme geleitet wurden. Wenn die austretenden Atome in ihren niedrigen Energiezustand zurückkehren, werden die spezifischen Spektren emittiert, die auch quantifiziert werden können. Für die Elementanalyse wurden 50 mg pulverisiertes, getrocknetes Blattmaterial mit 2 ml einer 65%igen HNO₃-Lösung versetzt und in einem Drucksystem (PDS-6; Lofffield's Analytical Solutions) bei 140 °C nach Heinrichs et al. (1986) aufgeschlossen. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit dd H₂O auf 25 ml aufgefüllt im ICP-Spektrometer analysiert.

3.3.9 Extraktion von Zellwänden

Für die Extraktion von Zellwandmaterial wurden 200 mg gefrorenes Blattpulver mit 1,5 ml 100 mM KPP/0,5 % Triton X-100 (pH 7,8) gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Danach wurden die Proben 10 min bei 14000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde noch einmal mit 100 mM KPP/0,5 % Triton X-100 (pH 7,8) gewaschen, worauf ein Waschschrift mit 1,5 ml Methanol folgte. Das erhaltene Zellwandmaterial wurde bei 70 °C getrocknet und konnte anschließend bei Raumtemperatur bis zur weiteren Analyse gelagert werden.

3.3.10 FTIR (Fourier-Transmissions-Infrarot) Spektrometrie

Durch FTIR-Analyse kann die chemische Zusammensetzung organischer Präparate untersucht werden. Das Messprinzip beruht auf der Tatsache, dass Infrarotstrahlung von Molekülbindungen wie C-H, O-H, N-H, C=O, C-C etc. absorbiert wird. Diese absorbierte Energie führt zu charakteristischen Veränderungen der Bindungen, die spezifische Transmissions- und Reflektionsmuster hervorrufen (Chalmers & Griffiths, 2002; Günzler & Gremlich, 2002). FTIR Transmissions Spektren von *Arabidopsis* Blattmaterial wurden mit einem FTIR-Spektrometer Equinox 55 (Bruker Optics, Ettlingen, Germany) mit einer ATR-Einheit (*attenuated total reflectance unit*) gemessen. Die Spektren wurden aus 32 *scans* im Wellenlängenbereich von 600-4200 cm⁻¹ wie in Naumann *et al.* (2005) beschrieben, aufgenommen. Die Auswertung der Spektren wurde mit der Software OPUS Version 5.5 (Bruker Optics, Ettlingen) durchgeführt. Die Spektren wurden einer Grundlinienkorrektur und einer Normierung unterzogen. Für die Normierung wurde die Vektornormierung ausgewählt, bei der ein Spektrum normiert wird, indem für die y-Werte ein Mittelwert berechnet wird und anschließend dieser Wert vom Spektrum subtrahiert wird. Dann wird die Summe der Quadrate aller Y-Werte berechnet und anschließend das entsprechende Spektrum durch die Wurzel dieser Summe dividiert.

Mit Hilfe der OPUS-Software wurde anschließend eine Clusteranalyse von den gemessenen Spektren durchgeführt. Zur Berechnung der spektralen Distanzen zwischen den Spektren in

der Clusteranalyse wurde der Ward's Algorithmus verwendet und die erste und zweite Ableitung des Spektrums berechnet. Durch die Berechnung der Ableitung gewinnen Signale mit einem steilen Anstieg eine größere Bedeutung als vergleichsweise flache Strukturen. Diese Methode wird verwendet, wenn scharfbandige aber relativ kleine Signale von einem relativ hohen, breiten Untergrund überlagert werden. Allerdings wird dadurch auch das spektrale Rauschen verstärkt.

3.3.11 Ligninbestimmung

Lignin wurde nach einer modifizierten Acetylbromid Methode von Brinkmann *et al.* (2002) bestimmt. 0,5 mg, 1 mg und 2 mg Zellwandpulver wurden mit 250 µl 25 %igem Acetylbromid in Essigsäure gemischt und 30 min bei 70 °C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gekühlt, mit 250 µl 2 M NaOH vermischt und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Vom Überstand wurden 139 µl in ein neues 2 ml Gefäß mit 2,8 µl Hydroxylamin-Lösung (50 % (w/v) transferiert. Vor der Absorptionsmessung bei 280 nm (Beckman DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) wurden die Proben mit 1,25 ml Essigsäure gemischt. Für die Standardkurve wurde käufliches Lignin (Coniferyl Alkohol) von 18-270 µg verwendet. Der Extinktionskoeffizient für Lignin wurde anhand der Eichkurve zu $\epsilon = 8.41/(g \cdot cm)$ bestimmt.

3.4 Extraktion von Proteinen

3.4.1 Gewinnung von apoplastischer Waschflüssigkeit (AWF) aus *Arabidopsis thaliana* Blättern

Die Extraktion der apoplastischen Waschflüssigkeit wurde für *Arabidopsis thaliana* Blätter optimiert (modifiziert nach Polle *et al.*, 1990). Dafür wurden verschiedene Infiltrationslösungen und Infiltrationszeiten, sowie verschiedene Zentrifugationsgeschwindigkeiten und -zeiten getestet. Zur Ermittlung der Kontaminationsrate der AWF mit symplastischen Proteinen wurde jeweils die Malatdehydrogenase-Aktivität gemessen (3.5.2.1). Außerdem wurde der Anteil der rückgewonnenen Infiltrationsflüssigkeit und der Proteingehalt (3.5.1) überprüft. Letztendlich führte die Methodenoptimierung zu folgendem Protokoll:

Für die Gewinnung der AWF wurden pro Probe zunächst ca. 50 Blätter von 5-10 Pflanzen mit einem Skalpell abgeschnitten und bis zur weiteren Bearbeitung in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Die Blätter wurden gewogen, um das Frischgewicht zu bestimmen und mit demineralisiertem Wasser gewaschen, um ausgetretenes Cytoplasma zu entfernen. Zur Infiltration wurden die Blätter in Schalen mit jeweils 250 ml 100 mM Kaliumchloridlösung mit 0,005 % Triton X-100 gelegt und mit einem Netz

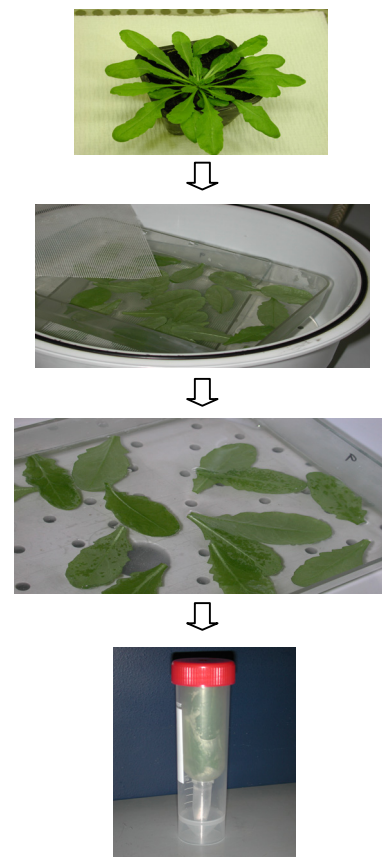


Abb. 3.3: Gewinnung von AWF

bedeckt (Abb. 3.3). Die Schalen wurden in einen Exsikkator platziert und für 5 Minuten wurde ein Vakuum angelegt, hierfür wurde der Druck um -80 kPa auf 20 kPa reduziert. Anschließend wurde der Druck langsam wieder auf Normaldruck erhöht, so dass die Infiltrationslösung in die Blätter einströmen konnte. Waren noch nicht alle Blätter infiltriert, wurde die Prozedur mit den noch nicht infiltrierten Blättern wiederholt. Danach wurden die Blätter mit Tüchern vorsichtig trocken getupft, gewogen, in eine Folie eingerollt und in ein Zentrifugenröhrchen mit einem Loch im Boden platziert. In ein 50 ml Röhrchen wurde dann ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und darüber das Zentrifugenröhrchen mit den eingerollten Blättern gestellt (Abb. 3.3) und bei 4 °C, 900 x g, 8 min zentrifugiert (Rotanta 96 R, Hettich, Tuttlingen). Zum Schluss wurde die Menge an gewonnener AWF ermittelt. Die AWF wurde bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.4.2 Gewinnung von AWF aus Rapsblättern

Für die Gewinnung von AWF aus Rapsblättern wurde das Protokoll für *Arabidopsis*-Blätter etwas modifiziert. Pro Probe wurden 5-10 Rapsblätter geerntet, die Mittelrippe wurde entfernt und große Blätter in der Mitte durchgeschnitten. Die Infiltrationslösung enthielt 100 mM KCl mit 0,01 % Triton X-100. Die Menge an Detergenz in der Infiltrationslösung wurde für die Rapsblätter etwas erhöht, weil diese sehr wasserabweisend waren. Ansonsten wurde die AWF-Gewinnung wie unter 3.4.1 beschrieben durchgeführt.

3.4.3 Gewinnung von Xylemsaft aus Raps

Der Xylemsaft wurde mit Hilfe einer Scholander-Druckpumpe gewonnen (Scholander, 1965; Kruse *et al.* 2003). Dazu wurden Wurzeln von mock- bzw. *Verticillium*-inokulierten Rapspflanzen (siehe 3.2.2) unter fließendem Wasser von Sand und Erde befreit und anschließend in Wasser gestellt. Oberhalb des Hypokotyls wurde mit einer Rasierklinge ein sauberer Schnitt gemacht und die Schnittfläche gut mit dd H₂O abgespült. Die Wurzeln wurden etwas trocken getupft, locker in Aluminiumfolie eingeschlagen und in den Zylinder der Druckpumpe gehängt. Der Stängel wurde durch den Gummiring in der Druckpumpe gedrückt und der Zylinder gut verschlossen. An der Schnittfläche austretender Xylemsaft wurde für 10-15 min bei einem Druck von ca. 0,2 MPa gesammelt. Bis zur weiteren Analyse wurden die Xylemsäfte bei -20 °C gelagert.

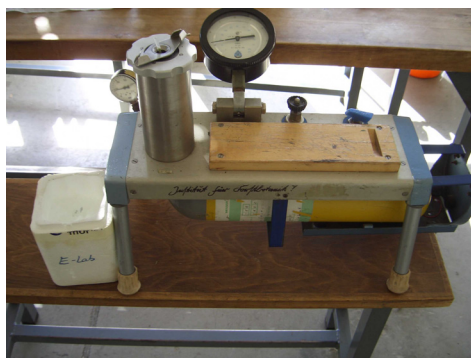


Abb. 3.4: Scholander Druckpumpe zur Gewinnung von Xylemsaft aus Raps. Mit einem Druck von 0,2 MPa wurde der Xylemsaft aus den Wurzeln nach oben gedrückt und konnte dann an der Stängelschnittfläche gesammelt werden.

3.4.4 Proteinextraktion aus Gesamtblattmaterial und Gelfiltration

Am Vortag der Extraktion wurden 100 mg unlösliches Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) pro Blattprobe in Zentrifugenröhren eingewogen, mit 2 ml Extraktionspuffer (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ Puffer/0,5 % Triton X-100, pH 7,8) gemischt und für 4 Stunden oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Das PVPP wird eingesetzt, da es in gequollenem Zustand die Eigenschaft hat, Phenole zu binden.

Für die Extraktion wurden 100 mg gefrorenes, gemahlene Blattpulver in die am Vortag vorbereiteten Röhrchen eingewogen, die Einwaage protokolliert und die Proben gut gemischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben 30 min bei 4 °C und 24700 x g (Beckmann J2-HS, Rotor JA 20.1, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) zentrifugiert. Um niedermolekulare Substanzen zu entfernen wurde anschließend eine Gelfiltration durchgeführt. Dafür wurden 500 µl des Überstandes aus der Zentrifugation auf vorher dreimal mit dd H_2O gespülte Sephadex G-25 Säulen (NAP 5 Säulen, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben. Dabei wird ausgenutzt, dass Makromoleküle (DNA/Proteine), da sie nicht in die Sephadex-Gelpartikel eindringen, sofort mit dem Ausschlussvolumen eluiert werden. Wohingegen niedermolekulare Substanzen vollständig in das Sephadex-Gel eindringen, sehr spät aus der Säule austreten und damit abgetrennt werden. Mit einem Ausschlussvolumen von 1 ml dd H_2O wurden die Proteine aus den Säulen eluiert und in 1,5 ml Gefäßen aufgefangen.

3.5 Biochemische Methoden

3.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels *Bicinchoninic acid* Reagenz (BCA-Test, Uptima, Montelucon, Frankreich). Das Prinzip des BCA-Tests beruht darauf, dass in einer ersten Reaktion zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) aus Kupfersulfat quantitativ von Peptidbindungen aus Proteinen zu einwertigen Kupferionen (Cu^{1+}) reduziert werden. Danach bilden zwei Moleküle Bicinchoninsäure-Chelator mit jeweils einem Molekül einwertiger Kupferionen einen violetten Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch erfasst werden kann.

Für den BCA-Test wurden die Gesamtblattextrakte 1:4 mit dd H_2O verdünnt, während AWF und Xylemsäfte unverdünnt eingesetzt wurden. Je 30 μl einer Probe bzw. Verdünnung wurde mit 600 μl BCA-Nachweisreagenz (nach Herstellerangaben vorbereitet) versetzt. Die Proben wurden gemischt und 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration photometrisch (Beckman DU 640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) bei einer Extinktion von $\lambda = 562$ nm. Die Proben wurden jeweils in Dreifachbestimmung gemessen. Eine Eichreihe von 10-300 $\mu\text{g/ml}$ mit Rinderserumalbumin (BSA; Uptima, Montelucon, Frankreich), die genau wie die Proben behandelt wurde, diente zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Extrakten. Ebenfalls mitgeführt wurde eine Kontrolle bei der statt Extrakt dd H_2O eingesetzt wurde und deren Extinktion ($E_{\text{Kontrolle}}$) bei der Berechnung der Extinktion der Proben und der Eichreihe abgezogen wurde.

Die Berechnungen der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe folgender Gleichungen:

$$\text{Proteinkonzentration der Probe } (\mu\text{g/ml}) = [(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Kontrolle}}) * \text{Verd}_P] / \text{Steigung}_{\text{Standard}}$$

$$\text{Proteinkonzentration im Extrakt } (\mu\text{g/ml}) = [(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Kontrolle}}) * \text{Verd}_P * \text{Verd}_G] / \text{Steigung}_{\text{Standard}}$$

$$\text{Proteingehalt (mg/g FM)} = [\text{Proteinkonzentration des Extraktes} * V_{\text{KPP}}] / \text{FM}$$

Wobei:	E	= Extinktion
	V_{KPP}	= Volumen Extraktionspuffer (ml) (siehe 3.4.4)
	Verd_G	= Verdünnung Gelfiltration (siehe 3.4.4)
	Verd_P	= Verdünnung der Probe im Test
	FM	= Frischmasse (mg) (siehe 3.4.4)
	$\text{Steigung}_{\text{Standard}}$	= Steigung der BSA-Standardkurve [$1/(\mu\text{g/ml})$]

3.5.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten

3.5.2.1 Malatdehydrogenase

Die Messung der Malatdehydrogenase (MDH) Aktivität (Bergmeyer, 1974) diente zur Erfassung von symplastischen Kontaminationen in der apoplastischen Waschflüssigkeit. Gesamtblattextrakte wurden für die Messung 1:10 verdünnt eingesetzt, während die AWF unverdünnt gemessen wurden. Die Testansätze wurden wie in Tab. 3.2 angegeben, gemischt. Zuletzt wurde für den Reaktionsstart die NADH-Lösung zugegeben, kurz mit einem Rührspatel gemischt und sofort mit der photometrischen Messung begonnen. Die Aktivität wurde über die Extinktionsabnahme durch die Umsetzung von NADH bei $\lambda = 340 \text{ nm}$ und 25 °C für 5 min photometrisch gemessen (Ultraspec 4000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England). Eine Kontrollrate wurde mit Extrakt, aber ohne Oxalessigsäure gemessen (Tab. 3.2) und bei der Berechnung abgezogen.

Tab. 3.2: Zusammensetzung eines Testansatzes für die Messung der MDH-Aktivität. Die Oxalessigsäure und die NADH-Lösung wurden jeweils frisch angesetzt.

	Konzentration der Stammlösung (mM)	Konzentration der Lösung im Test (mM)	Volumen der Lösung im Test (μL)	Volumen der Lösung in der Kontrolle (μL)
0,1 M KPP, pH 7,5	100	50	500	500
dd H ₂ O			200	300
Oxalessigsäure	1	0,1	100	0
Extrakt			100	100
Reaktionsstart:				
NADH-Lösung	1	0,1	100	100

Durch Anpassung einer Regressionsgeraden an die Messpunkte, wurde die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit bestimmt (ΔE). Daraus wurden die Enzymaktivitäten folgendermaßen berechnet:

$$\text{Aktivität (nkat/g FM)} = (\Delta E * V_T * \text{Verd}_G * \text{Verd}_P * V_{KPP} * C) / (\varepsilon * V_E * \text{FM} * d)$$

ΔE	= Extinktionsänderung (1/min)
ε	= molarer Extinktionskoeffizient (für NADH = $6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
V_T	= Gesamtvolumen des Tests (μl)
V_E	= Volumen Extrakt im Test (μl)
V_{KPP}	= Volumen Extraktionspuffer (ml) (siehe 3.4.4)
Verd_G	= Verdünnung Gelfiltration (siehe 3.4.4)
Verd_P	= Verdünnung der Probe im Test
C	= Umrechnungsfaktor zur Umrechnung in nkat (16666,67)
FM	= Frischmasse (mg) (siehe 3.4.4)
d	= Küvettendicke

3.5.2.2 Guajakolperoxidase

Als Guajakolperoxidasen (GuPOD) werden alle Enzyme bezeichnet, die Guajakol als Kosubstrat zur Umsetzung von H_2O_2 verwenden können. Die GuPOD-Bestimmung erfolgte nach der Methode von Pütter (1970), die von Polle *et al.* (1990) modifiziert wurde. Die Aktivität wurde über die Extinktionszunahme bei $\lambda = 436 \text{ nm}$ und $25 \text{ }^\circ\text{C}$ photometrisch (Ultraspec 4000, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) bestimmt. Als Extrakte wurden unverdünnte Gesamtblattextrakte und AWF eingesetzt (siehe 3.4.1, 3.4.2 und 3.4.4). Zur Bestimmung der Kontrollrate wurde die Messung ohne Extrakt mit einer Zusammensetzung wie in Tab. 3.3 angegeben, durchgeführt.

Tab. 3.3: Zusammensetzung eines Testansatzes für die Messung der GuPOD-Aktivität. Die Guajakollösung und die H_2O_2 -Lösung wurden jeweils frisch angesetzt indem $218 \mu\text{l}$ 98 %iges Guajakol in 20 ml dd H_2O und $453 \mu\text{l}$ 30 %iges H_2O_2 in 20 ml dd H_2O verdünnt wurden.

	Konzentration der Stammlösung (mM)	Konzentration der Lösung im Test (mM)	Volumen der Lösung im Test (μL)	Volumen der Lösung in der Kontrolle (μL)
0,1 M KPP, pH 5,25	100	50	500	500
dd H_2O	100		50-X	50
Extrakt			X	0
Guajakol	100	40	400	400
Reaktionsstart:				
H_2O_2	200	10	50	50

Die Extinktionsänderung (ΔE) wurde durch Anpassung einer Regressionsgeraden an die Messpunkte, die vom Photometer über 15 min aufgenommen worden waren, bestimmt. Bei zu niedrigen oder zu hohen Enzymkonzentrationen war die Linearität der Messung nicht gewährleistet, weshalb unterschiedliche Volumina des Extrakts eingesetzt wurden. Die Regressionsgrade wurde so gelegt, dass die Steigung ca. 0,1 betrug und im Extinktionsbereich zwischen 0,1 und 1,1 lag. Die Berechnung der GuPOD-Aktivität erfolgte mit der unter 3.5.2.1 angegebenen Formel und einem molaren Extinktionskoeffizient für Guajakol von $25,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.5.2.3 Chitinase

Die Messung der Chitinase Aktivität wurde mit Hilfe des Substrats 4-Methylumbelliferyl N-Acetyl- β ,D-Glucosaminid (MUF-NAG) durchgeführt. Das Substrat MUF-NAG wird durch Chitinasen in N-Acetyl- β ,D-Glucosaminid und das fluoreszierende 4-Methylumbelliferyl gespalten. Das MUF-NAG-Pulver (Sigma, Steinheim) wurde mit dem Lösungsmittel 2-Methoxyethanol auf eine Konzentration von 5 mM eingestellt und für die Verwendung im Test mit dd H_2O auf eine $1,5 \text{ mM}$ Lösung eingestellt. Da MUF-NAG lichtempfindlich ist, wurde es im Dunkeln bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Der Test wurde in schwarzen Mikrotiterplatten (Nunc, Wiesbaden) mit $100 \mu\text{l}$ Probe (AWF, Gesamtblattextrakte) und $50 \mu\text{l}$ $1,5 \text{ mM}$ MUF-NAG in Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach 30, 60 und 90 min Inkubation bei

Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 2,5 M Tris (pH>10) gestoppt. Zur Quantifizierung wurde als Standard käufliche Chitinase (Sigma, Steinheim) im Konzentrationsbereich von 0,3 bis 20 mU/µl auf der Mikrotiterplatte mitgeführt. Die Emission wurde bei einer Wellenlänge von 460 nm gemessen (CyBi-Screen-Machine, CyBio AG, Jena), die Anregungswellenlänge betrug 390 nm. Die Chitinase-Aktivität wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Aktivität (mU/}\mu\text{g Protein)} = [(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Kontrolle}}) * V_{\text{T}} * \text{Verd}_{\text{P}}] / (V_{\text{E}} * \text{Steigung}_{\text{Standard}} * P)$$

E = Extinktion

V_{T} = Gesamtvolumen des Tests (µl)

V_{E} = Volumen Extrakt im Test (µl)

Verd_{P} = Verdünnung der Probe im Test

$\text{Steigung}_{\text{Standard}}$ = Steigung der Chitinase-Standardkurve [1/(mU/ml)]

P = Proteinkonzentration (µg/ml) (siehe 3.5.1)

3.5.3 Trichloressigsäure (TCA)/Aceton-Fällung

Für die TCA/Aceton-Fällung wurden 5 Vol 10 %iges TCA/Aceton (versetzt mit 0,14 % β-Mercaptoethanol) mit 1 Vol AWF bzw. Gesamtblattextrakte vermischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 20 min bei 4 °C und 15000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Proben durch Zugabe von 200 µl Aceton (mit 0,07 % β-Mercaptoethanol) und 15-minütiges Zentrifugieren bei 4 °C und 15000 x g gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt und das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden bei -20 °C gelagert.

3.5.4 Peroxidase Nachweis im PhastGel

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine hochauflösende Technik zur Auftrennung von Proteinen auf der Basis ihres isoelektrischen Punktes. Der Vorteil des PhastSystems (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) ist die schnelle Durchführbarkeit und der geringe Aufwand. Diese Methode zur isoelektrischen Fokussierung von Proteinen besteht aus drei Schritten:

1. Vorfokussierung (pH Gradient wird gebildet; währenddessen können die Kämme beladen und eingesetzt werden) → Dauer ca. 10 min
2. Proben Applikation
3. Fokussierung → 500 Vh oder ca. 30 min

Jeweils 300 µl Probe wurde gefriergetrocknet und nach der Trocknung in 30 µl dd H₂O resuspendiert (Peroxidasen sind auch nach der Gefrier Trocknung noch aktiv). Die Proteinkonzentration wurde in einer 1:10 Verdünnung, wie unter 3.5.1 beschrieben, bestimmt. Die Minigele mit einem pH-Gradienten von pH 3 bis pH 9 (Amersham Biosciences,

Uppsala, Schweden) wurden mit 3,6 µg Protein pro Probe beladen. Die elektrophoretische Auftrennung wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

2000 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	75 Vh
200 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	15 Vh
2000 V	2,5 mA	3,5 W	15 °C	410 Vh

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel in eine Glaspetrischale mit 50 ml 100 mM Natriumacetatpuffer (pH 5,5) mit 100 µl Guajakol (98 %) und 100 µl H₂O₂ (30 %) überführt. Vorhandene Peroxidasen verknüpften mit Hilfe von H₂O₂ das farblose Guajakol zu rotbraunen Komplexen, welche im Gel als braune Banden sichtbar wurden. Die Färbung war nach ca. 15 min am stärksten. Da die Färbung wieder verblasste wurde das Gel sofort gescannt (Fluor-S Multiimager, Bio-Rad).

3.5.5 Eindimensionale Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden die Xylemsäfte (siehe 3.4.3) zuvor sterilfiltriert um möglicherweise vorhandene *Verticillium*-Sporen oder Hyphen zu entfernen. Danach wurde der Xylemsaft gefriergetrocknet und anschließend in 500 µl ddH₂O aufgenommen und über Gelelutionssäulen gereinigt. Damit gleiche Mengen an Protein auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurde die Proteinkonzentration bestimmt (siehe 3.5.1). Die apoplastischen und Gesamtblattproteine wurden mittels TCA/Aceton gefällt (siehe 3.5.3) und anschließend wurde ebenfalls die Proteinkonzentration gemessen.

Die Elektrophorese wurde in einer Anlage von Biometra (Whatman Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Gelplatten hatten eine Größe von 14 x 15 cm und es wurde ein 1 mm dicker Kamm mit 12 Taschen verwendet. Vor dem Gießen der Gele wurden die Glasplatten mit Wasser und Ethanol gereinigt, gut mit fusselfreien Tüchern getrocknet und anschließend zusammengesetzt. Das Gießen der Polyacrylamid (PAA)-Gele erfolgte mit Hilfe eines Gradientenmischers, wobei in den vorderen Zylinder eine 20 %ige Trenngellösung und in den hinteren Zylinder eine 7,5 %ige Trenngellösung pipettiert wurde (Zusammensetzung siehe Tab. 3.4). Nach Anschalten des Mischers wurden durch einen Schlauch die Gellösungen zwischen die Glasplatten gefüllt, so dass von unten nach oben ein Gradient von 20 % Acrylamid bis 7,5 % Acrylamid entstand. Danach wurde das Trenngel mit wassergesättigtem Butanol überschichtet und mindestens eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Butanol durch Dekantieren und Nachreinigen mit dd H₂O entfernt. Das Sammelgel (Tab. 3.4) wurde über das Trenngel zwischen die Glasplatten gegossen, der Kamm eingesetzt und wiederum mindestens eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen.

Tab. 3.4: Pipettierschema für ein Gradientengel. Der Polyacrylamidgradient von 20-7,5 % wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers erzeugt.

	Trenngel		Sammelgel
	7,5 %	20 %	7 %
30 % Acrylamid (w/v wässrige Lösung)	7,5 ml	20 ml	2,33 ml
Trenn-bzw. Sammelgelpuffer	7,5 ml	7,5 ml	2,55 ml
10 % SDS	0,3 ml	0,3 ml	0,1 ml
dd H ₂ O	14,5 ml	2,05 ml	5,02 ml
	entlüften und je 6,5 ml in Gradientenmischer pipettieren		entlüften
10 % Ammoniumpersulfat (APS)	65 µl	65 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Je nachdem, ob anschließend eine Silbernitrat- oder CBB-Färbung geplant war, wurden pro Spur 1,8 µg bzw. 50-100 µg Protein aufgetragen und in dem PAA-Gradientengel (Laemmli, 1970) aufgetrennt.

Die Elektrophoreseanlage wurde für die Auftrennung der Proteine auf 10 °C vorgekühlt. Die Proteinproben wurden mit Ladepuffer (Tab. 3.5) versetzt, 3 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Protein-Molekulargewichtsmarker wurde ein Proteinkit (siehe 3.5.6, Tab. 3.6; LMW 17-0446-01, Amersham Biosciences, Freiburg) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 20 mA pro Gel (Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Anschließend wurden die Gele nach Blum *et al.* (1987) mit Silber oder nach Neuhoff (1990) mit Coomassie-Brilliant-Blue gefärbt (siehe 3.5.7).

Tab 3.5: Zusammensetzung des Ladepuffers für die PAA-Elektrophorese. Die Komponenten wurden in dd H₂O gelöst.

	Konzentration	Ansatz für 10 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	0,125 M	2,5 ml
10 % SDS	4 % v/v	4 ml
Glycerin	20 % v/v	2 ml
DTT	0,2 M	0,31 g
Bromphenolblau	0,002 % w/v	2 mg

3.5.6 Molekulargewichtsmarker für die Elektrophorese

Je eine Portion Protein-Molekulargewichtsmarker (576 µg/Portion; Tab. 3.5; LMW 17-0446-01, Amersham Biosciences, Freiburg) wurde in 200 µl Ladepuffer gelöst. Bei einer geplanten CBB-Färbung (siehe 3.5.8) wurde der Marker unverdünnt verwendet, bei einer geplanten Silberfärbung (siehe 3.5.8) wurde der Marker 1:20 in Ladepuffer verdünnt. Für die eindimensionalen Elektrophorese (siehe 3.5.5) wurden jeweils 5 µl Markerprotein pro Spur aufgetragen. Für die zweidimensionale Elektrophorese (siehe 3.5.7) wurden je 10 µl Markerproteine auf ein 5 x 5 mm großes Filterpapierstück pipettiert, mit 0,5 %iger leichtschmelzender Agarose (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) überschichtet und in Portionen zu jeweils sechs Filterstücken bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Das Molekulargewicht der zu analysierenden Proteine wurde aus der Gleichung der Geraden, die aus der relativen Laufweite der Markerproteine und deren Molekulargewicht resultierte, berechnet (Abb. 3.5).

Tab. 3.6: Zusammensetzung des Protein-Markers mit Molekulargewichten von 14400 bis 97000 Da.

Protein	Organismus/Organ	Molekulargewicht (Da)
Phosphorylase b	Kaninchenmuskel	97 000
Albumin	Rinderserum	66 000
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45 000
Carbonische Anhydrase	Rindererythrozyten	30 000
Trypsin Inhibitor	Sojabohne	20 100
α-Lactalbumin	Kuhmilch	14 400

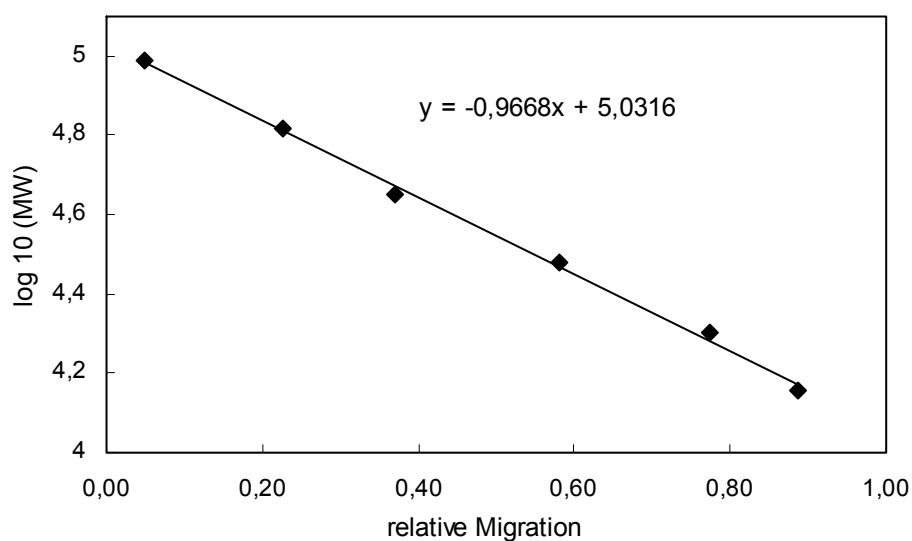


Abb. 3.5: Beispiel für eine Eichgerade zur Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen im Gel. Die relative Migration der Markerproteine zur Lauffront wurde gegen den Logarithmus (\log_{10}) der Molekulargewichte (MW) der Markerproteine aufgetragen.

3.5.7 Zweidimensionale Elektrophorese

3.5.7.1 Erste Dimension (Isoelektrische Fokussierung)

Die TCA/Aceton gefällten Proteine wurden mit 380 µl Rehydrationspuffer [8 M Harnstoff, 0,5 % w/v CHAPS, 15 mM DTT, 0,5 % v/v IPG-Puffer pH 3-10 und 0,2 % v/v Bromphenolblau (Görg & Weis, 2000)] versetzt und anschließend 30 min bei Raumtemperatur durch Schütteln gelöst. Danach erfolgte eine 5 minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C um störende Reste zu entfernen. 350 µl des Überstandes wurden in einen sogenannten *Stripholder* (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gefüllt. Die IPG-Strips mit immobilisiertem pH-Gradient (Immobiline DryStrip, 180 mm x 3 mm x 0,5 mm, pH 3-10; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurden vorsichtig mit der Gelseite nach unten über die Probenlösung geschoben, so dass sich die Probe über den gesamten Strip verteilte. Anschließend wurde der Strip mit 1 ml einer öligen Lösung (plus one Dry Strip Cover Fluid) überschichtet, um ein Austrocknen der Proben zu verhindern. Die isoelektrische Fokussierung wurde in einer Ettan IPGphor-Einheit unter folgenden Bedingungen durchgeführt (Betriebsanleitung von Amersham; Görg *et al.* 2000): Rehydrierung 12 h mit 20 V, dann 2 h mit 150 V, 1 h mit 200 V, 1 h mit 500 V, dann konstant 1000 V für 1000 Vh und anschließend eine lineare Erhöhung der Spannung auf 8000 V. Zum Schluss wurde die Spannung von 8000 V gehalten, damit die Proteine in ihrer Position blieben. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die Strips bis zur weiteren Verwendung, in der Regel über Nacht, bei -20 °C eingefroren.

3.5.7.2 Zweite Dimension (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die Glasplatten für die zweite Dimension wurden mit Glasreiniger (Viss, Lever Faberge, Hamburg) gereinigt und einige Stunden zum Trocknen stehen gelassen. Je zwei Glasplatten wurden zusammengelegt, in der Gießkassette (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gestapelt und die Kassette mit Klemmen dicht verschlossen. Für die zweite Dimension wurden sechs 12 %ige Acrylamid-Gele parallel gegossen. Dafür wurden 500 ml Trenngellösung (Tab. 3.7) benötigt. Die Trenngellösung wurde zügig über einen Schlauch von unten in die Gelkassette gefüllt und danach mit einer Verdrängungslösung (Tab. 3.7) nach oben geschoben. Die Gele wurden mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, mit einer Plastikfolie luftdicht verschlossen und zum Polymerisieren über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen.

Am nächsten Tag wurden die IPG-Strips für die zweite Dimension in zwei Schritten äquilibriert, wofür 125 ml Äquilibrationpuffer (6 M Harnstoff, 30 % (w/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS) benötigt wurden. Im ersten Schritt wurden die Strips in jeweils 10 ml Äquilibrationpuffer mit 1 % w/v DTT 15 min bei Raumtemperatur in Glasröhrchen geschüttelt. Durch die DTT Zugabe wurden die Proteine in ihrem reduzierten Zustand gehalten. Der Überstand wurde verworfen und der Schüttelvorgang mit 10 ml Äquilibrationpuffer mit 4 % w/v Iodoacetamid wiederholt. Das Iodoacetamid verhindert durch Alkylierung der Thiol-Gruppen eine Reoxidation der Proteine während der Elektrophorese. Die Strips wurden anschließend mit dd H₂O kurz gespült, mit Filterpapier auf

der Rückseite etwas getrocknet, in zweifach konzentriertem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS, 0,03 % w/v Bromphenolblau) getaucht und vorsichtig mit Hilfe eines Spatels zwischen die Glasplatten geschoben. Je ein Filterstück mit Markerproteinen (siehe 3.5.6, Tab. 3.6; LMW 17-0446-01, Amersham Biosciences, Freiburg) wurde neben dem Strip platziert und der Strip und das Filterstück wurden mit 0,5 %-iger heißer flüssiger Agarose (low-melting point) in einfach konzentriertem Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) überschichtet, um einen besseren Übergang vom Strip in das Acrylamidgel zu ermöglichen. Die Trennung der Proteine nach Größe erfolgte in einer Ettan Dalt six Einheit bei 10 °C unter folgenden Bedingungen: 600 V, 400 mA, 13 W für 30 min und 3000 V, 400 mA, 100 W für 4,5 h (Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, München). Hierfür wurden ca. 1 L eines zweifach konzentrierten und ca. 5 L eines einfach konzentrierten Elektrophoresepuffers (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) in den oberen bzw. den unteren Tank der Anlage gefüllt.

Tab. 3.7: Pipettierschema für die Acrylamidlösung, ausreichend für sechs Acrylamidgele und für die Verdrängungslösung.

für 500 ml 12 % Acrylamidgel		für 250 ml Verdrängungslösung	
Acrylamid (30 % w/v wässrige Lösung)	210 ml	dd H ₂ O	90 ml
Tris-Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % SDS)	125 ml	Tris-Puffer (1,5 M Tris, pH 8,8, 0,4 % SDS)	50 ml
Glycerol	25 ml	Glycerol	60 ml
dd H ₂ O	136 ml	Bromphenolblau (0,1 %)	50 µl
→ rühren und enlüften			
TEMED (1:10 verdünnt)	250 µl		
APS 10 %	4 ml		

3.5.8 Färbung der Gele mit Silbernitrat oder Coomassie Brilliant Blue

Nach der Elektrophorese wurden die Gele für die Silberfärbung über Nacht fixiert (50 % v/v Ethanol, 12 % v/v Eisessig, 0,05 % v/v 37%iges Formaldehyd) und am nächsten Tag nach Blum *et al.* (1987) gefärbt. Die Färbung von je zwei Gelen erfolgte bei Raumtemperatur in 500 ml Lösung. Die Gele wurden 3 x 20 min mit 30 % v/v Ethanol gewaschen, dann 1 min mit 0,01 % w/v Natriumthiosulfatpentahydrat imprägniert, 3 x 20 s mit dd H₂O gewaschen und danach 20 min in einer Färbelösung aus 0,1 % w/v Silbernitrat und 0,075 % v/v 37 %igem Formaldehyd geschüttelt. Anschließend wurden die Gele noch zweimal mit dd H₂O gewaschen und mit einer Lösung aus 3 % w/v Natriumcarbonat, 0,0002 % w/v Natriumthiosulfatpentahydrat und 0,05 % v/v 37 %iges Formaldehyd entwickelt. Die Färbung wurde nach 1-5 min durch Austausch des Entwicklers gegen eine Stopplösung (10 mM EDTA) beendet.

Die kolloidale CBB-Färbung erfolgte nach Neuhoff (1990) über Nacht in 500 ml Färbelösung (0,1 % w/v Coomassie Brilliant Blue G-250, 2 % w/v Phosphorsäure (85%), 10 % Ammoniumsulfat, 20 % v/v Methanol) unter leichtem Schütteln. Anschließend wurde der

Hintergrund durch mehrmaliges Austauschen mit dd H₂O entfärbt. Die Gele wurden nach der Färbung gescannt (Fluor-S Multiimager, Bio-Rad).

3.5.9 Analyse der zweidimensionalen Gele

Die silbergefärbten Gele dienten zu einer generellen Übersicht über das Muster der Proteine und zur Erkennung von Differenzen zwischen Proteinspots in Gelen von mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen. Die Analyse der Gelbilder erfolgte mithilfe der Proteomweaver Software (Version 3.1.0.7, Definiens Cognitionware, München). Aus den Coomassie-gefärbten Gelen wurden Spots ausgestochen und anschließend mittels Massenspektrometrie analysiert (3.5.10).

Für die Analyse der silbergefärbten Gele mit der Proteomweaver Software wurden die Gelbilder als 16 bit TIFF-Datei in das Programm geladen, so dass zusammengehörige Gele eine Gruppe bildeten. Zu einer Gruppe gehörten die Gele der *Verticillium*-infizierten Pflanzen, zu der anderen Gruppe die Gele der Kontrollpflanzen. Es folgte eine automatische Erkennung der Proteinspots in den Gelbildern und wenn nötig eine manuelle Bearbeitung. Danach wurden die Gele mittels *Pair Matching* und *Multi Matching* angepasst und einer Normierung unterzogen, wofür die Standardparameter des Programms verwendet wurden. Erst nach der Normierung wurden die Intensitäten der Spots in Gelen von *Verticillium*-infizierten Pflanzen mit denen von Kontrollpflanzen verglichen und mittels Student's T-Test statistisch ausgewertet, wobei Werte unter $p \leq 0,05$ als signifikant unterschiedlich angesehen wurden.

3.5.10 Proteinverdau mit Trypsin und Proteinidentifizierung

Der Proteinverdau erfolgte wie in Blödner et al. (2007) beschrieben nach einem modifizierten Protokoll von Havlis *et al.* (2003). Die einzelnen mit Coomassie gefärbten Proteinspots (siehe 3.5.7 und 3.5.8) wurden auf einer sauberen, fusselfreien Glasplatte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (1000 µl) aus dem Gel ausgestochen und mit einer sauberen Rasierklinge in ca. 1 x 3 mm große Stücke geschnitten, um später ein besseres Diffundieren des Trypsins in das Gel zu ermöglichen. Anschließend wurden die Gelstücke in ein 0,5 µl Gefäß (*low binding tube*, Eppendorf, Hamburg) überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert.

Für den Verdau wurden die Proben zunächst gewaschen, indem sie zweimal für 15 min in 200 µl dd H₂O geschüttelt wurden. Es folgte ein 15 minütiger Waschschrift mit 200 µl 50 %igem Methanol zur Reduzierung der Blaufärbung der Spots. Bei stark gefärbten Spots wurde dieser Schritt wiederholt. Danach wurden die Proben in reinem Acetonitril geschüttelt, nach 20 min wurde der Überstand sorgfältig abgenommen und das restliche Acetonitril unter Vakuum abgedampft.

Das Trypsin wurde in 86 µl des mitgelieferten Resuspensionspuffer (Promega, Mannheim) gelöst und mit 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) 1:5 verdünnt, so dass eine 2 µM Trypsinlösung entstand. Je nach Größe der Gelstücke wurden 15-20 µl Trypsinlösung zu den Proben gegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurde kontrolliert, ob die

Gelstücke von der Flüssigkeit ausreichend bedeckt waren, sonst wurden noch bis zu 10 µl nachpipettiert. Der Ansatz wurde für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert, um eine vollständige Aufnahme des Trypsins durch die Gelstücke zu erreichen. Danach folgte der eigentliche Trypsin-Verdau der Proteine für 30 min bei 58 °C im Wasserbad. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 200 µl 5 % v/v Ameisensäure und 30 minütiges Schütteln bei Raumtemperatur gestoppt. Die Überstände wurden in ein neues Gefäß (*low binding tube*, Eppendorf, Hamburg) überführt, die Gelstücke mit 200 µl 50% v/v Acetonitril und 5% v/v Ameisensäure versetzt und wiederum 30 min geschüttelt um die Proteine aus dem Gel zu lösen. Die Überstände wurden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge eingeeengt (SPD speed vac, Thermo Savant, Holbrook, USA). Anschließend wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für die Auftrennung wurden die Proben in 5 µl 0.1% v/v Ameisensäure gelöst und davon wurden 4 µl auf eine 180 cm lange Kapillarsäule, gepackt mit 218MS-C18 Substanz (Vydac, Columbia, USA), injiziert und flüssigkeitschromatographisch (ESI-LC-MS, HP 1100 Agilent, Palo Alto, USA; Esquire 3000, Bruker Daltonik, Bremen) aufgetrennt. Die Trennung der Peptide erfolgte in einem Gradienten aus 0,1 % Ameisensäure (Solvent A) und 95 % Acetonitril in 0,1 % Ameisensäure (Solvent B): 20 min 2 % Solvent B, gefolgt von einem Gradienten aus 50 % Solvent B in 45 min, dann 95 % Solvent B für 3 min und anschließend weitere 10 min in 95 % B. Die Ionisation der Peptide erfolgte mit Hilfe der Elektrosprayionisation (ESI). Massenspektren wurden mit einem Ionenfallen-Massenspektrometer (Esquire 3000, Bruker Daltonik, Bremen) aufgenommen. MS-Spektren wurden mit der Data Analysis Software (Bruker Daltonik) analysiert. Aus den erhaltenen Daten erfolgte die Proteinidentifizierung mittels Mascot Software (Matrix-Science, Boston, USA) und Recherche in der NCBI-Protein-Datenbank.

3.5.11 Signalpeptid-Analyse mit TargetP

Die meisten extrazellulären Proteine besitzen verschiedene Merkmale, die für ihre Translokation in den extrazellulären Raum verantwortlich sind. Eins dieser Merkmale ist das Vorhandensein eines abspaltbaren Signalpeptids am N-Terminus des Proteins. Das Signalpeptid ist für den gezielten Transport zum Endoplasmatischen Reticulum, welches die erste Organelle auf dem sekretorischen Weg darstellt, verantwortlich (Vitale & Denecke, 1999). Das Signalpeptid besitzt keine übereinstimmende Sequenz, aber ist durch drei konservierte Domänen gekennzeichnet, die positiv geladene n-Region auf dem N-Terminus und eine zentrale hydrophobe h-Region, gefolgt von einer polaren c-Region, die die Spaltstelle beinhaltet. Für die Analyse der Signalpeptide von Proteinen wurde die Vorhersageversion für Pflanzen des TargetP-Servers (Version 1.1) verwendet, die die subzelluläre Lokalisierung von eukaryotischen Proteinen vorhersagt (Emanuelsson et al., 2000). Außerdem wird durch TargetP die Sicherheit der Vorhersage für das Signalpeptid in fünf *reliability classes* (RC) angegeben. Je kleiner die RC Nummer ist, umso sicherer ist die Vorhersage.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 RNA-Extraktion

Für die quantitative real time PCR (3.6.4) wurde RNA nach der Methode von Chang *et al.* (1993) extrahiert. Es wurden 200 mg gefrorenes, gemahltes Blattmaterial in ein 13 ml PP-Röhrchen (Sarstedt) eingewogen und sofort mit 65 °C warmem CTAB-Puffer (Tab. 3.8) und 24 µl β-Mercaptoethanol versetzt, gut gemischt und 15 min bei 65 °C geschüttelt. Danach wurden die Proben zum Abkühlen 15 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Pro Probe wurden 1,2 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) zugegeben, 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Dann wurde die obere Phase mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette in ein neues Röhrchen überführt. Das Auswaschen der oberen Phase wurde so lange wiederholt bis keine Zwischenphase mehr sichtbar war (in der Regel eine Wiederholung). Die gewaschene obere Phase wurde schließlich in ein 2 ml Gefäß überführt, mit 0,25 Vol gekühltem 10 M Lithiumchlorid versetzt, gemischt und über Nacht bei 4 °C gefällt.

Am nächsten Tag wurden die Proben 20 min bei 20000 x g (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 400 µl 65 °C warmem SSTE-Puffer (Tab. 3.8) versetzt und zum Lösen 10 min bei 42 °C im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) geschüttelt. Die Proben wurden dann mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) gemischt und 5 min bei 20000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die obere Phase in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und wiederum mit 1 Vol Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) vermischt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis keine Zwischenphase mehr sichtbar war. Danach folgte eine Ethanol-fällung bei der die ausgewaschene obere Phase mit 2 Vol -20 °C kaltem Ethanol (96 %) gemischt und 1 h bei -80 °C gefällt wurde. Es folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei 20000 x g und 4 °C und zwei Waschschrte mit 500 µl bzw. 80 µl 70 %igem Ethanol. Das Pellet wurde getrocknet, in 50 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Tab. 3.8: Zusammensetzung der Puffer CTAB und SSTE für die RNA-Extraktion.

CTAB-Puffer		SSTE-Puffer	
NaCl	2 M	NaCl	1 M
EDTA	25 mM	EDTA (pH 8,0)	1 mM
Tris (pH 8,8)	100 mM	Tris (pH 8,0)	10 mM
PVPP (löslich)	2 % (w/v)	SDS	0,5 %
CTAB	2 % (w/v)		

3.6.2 RNA-Aufreinigung

Um noch vorhandene DNA aus der extrahierten RNA zu entfernen, wurde diese mit 1/10 Vol 10 x Turbo DNase Puffer und 1 µl Turbo DNase (Ambion, Austin, USA) versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach 30 min Inkubation wurde für die nächsten 30 min noch einmal 1 µl

Turbo DNase zugegeben. Danach wurde die DNase inaktiviert, indem 1/10 Vol Inaktivator (Ambion, Austin, USA) zugegeben, für 2 min inkubiert und anschließend 1,5 min bei 10000 x g zentrifugiert wurde.

Eine weitere Aufreinigung wurde durch eine Phenol/Chloroform Extraktion erzielt. Dafür wurde pro Probe 1 Vol Phenol/Chloroform/Isoamylalcohol (25/24/1 v/v/v) zu der DNase behandelten RNA gegeben und 2 min bei 18000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Gefäß transferiert, mit 1 Vol Isopropanol und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 4,8) gefällt und 15 min bei 18000 x g (4 °C) zentrifugiert. Bevor das Pellet bei 37 °C getrocknet wurde, wurde es einmal mit 1 ml und ein weiteres mal mit 80 µl Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde zum Schluss in 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst und konnte dann bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden.

3.6.3 c-DNA Synthese

Zunächst wurde die Konzentration der aufgereinigten RNA (siehe 3.6.2) durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht für RNA = 25 µg/ml und für doppelsträngige DNA = 50 µg/ml.

Für die cDNA (complementary DNA) Synthese wurden jeweils 5 µg der aufgereinigten RNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und oligo (dT)₁₈ Primern (First Strand cDNA Kit # K1612, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Dafür wurde 1 µl oligo (dT)₁₈ Primer auf Eis zu der RNA zugegeben, auf 11 µl aufgefüllt, gemischt und 5 min bei 70 °C inkubiert. Auf Eis wurden anschließend folgende Reagenzien zugegeben: 4 µl 5 x Reaktionspuffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl), gemischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Danach wurden pro Ansatz 2 µl Reverse Transkriptase (20 U/µl) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 60 min bei 37 °C und für 10 min bei 70 °C. Nach der Reaktion wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.4 Quantitative real time PCR

Die quantitative real time PCR basiert auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung mithilfe von Fluoreszenz-Messungen während der PCR-Zyklen. SYBR-Green ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Da das Fluoreszenzsignal von SYBR-Green proportional mit der Menge der PCR-Produkte zunimmt, ist eine Quantifizierung möglich.

Die PCR wurde in einem iCycler (Bio-Rad, München) mit ABSolute SYBR green fluorescein (Abgene, Epsom, UK) durchgeführt. Ein 2 µl Aliquot aus der Reverse Transkriptase Reaktion (3.6.3) wurde als Template für die quantitative real time PCR verwendet. Die Gen-spezifischen Primer (Tab. 3.9; MWG, Ebersberg) wurden mit Hilfe der Primer 3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) konstruiert.

Tab. 3.9: Sequenzen der für die real time PCR verwendeten Primer mit Schmelztemperatur (T_m) und Produktgröße. Der Name des jeweiligen Primers enthält den *Arabidopsis* AGI-Code zur besseren Wiedererkennung.

Name	Primersequenz (5'-3')	T_m in °C (MWG-Angaben)	Produktgröße
PX_At3g49120_for	AGTTAAGGTCGGACCCTCGT	59,4	243
PX_At3g49120_rev	GAGCTGCAATGGTGAGCATA	57,3	
Cb_At3g16530_for	GCTTTATCCATGACCCGAGA	57,3	159
Cb_At3g16530_rev	TTGACCGGAGTTAGTTTGG	57,3	
SC_At4g12910_for	TTACGCCGGAGTTTATGTCC	57,3	243
SC_At4g12910_rev	TCGCACTCGAGTCCCTCTAT	59,4	
PX_At4g37530_for	AAGCTACCCAAACCGACCTT	57,3	220
PX_At4g37530_rev	GAGGACACGACGCTTTTAGC	59,4	
PX_At5g05340_for	TTACGTCGTCGAAGCACAAC	57,3	155
PX_At5g05340_rev	TGACAAAGCAATCGTGGAAG	55,3	
PX_At5g06720_for	ACGCTGGTCCGAATGTAAAC	57,3	234
PX_At5g06720_rev	TTTCGATGGGAGAAGGAATG	55,3	
Ga_At5g08370_for	TCTCTCCTCAAATGGGATGG	57,3	153
Ga_At5g08370_rev	TGAGTTCACCCCAACAATCA	55,3	
G1_At5g20630_for	CCTCAAAGCCCATCAGGTTA	57,3	236
G1_At5g20630_rev	ACCTCAGAAGCACCAGGATG	59,4	
Ch_At5g24090_for	CCAAAACGGAAACGAAGGTA	55,3	199
Ch_At5g24090_rev	AACCTTGATGCCACGAGACT	57,3	
Actin2R	TTCTCGATGGAAGAGCTGGT	57,3	190
Actin2L	TGCTGGACGTGACCTTACTG	59,4	

Die cDNA (siehe 3.6.3) und der Reaktionsmix (Abgene, Epsom, UK) wurden gemäß Tab. 3.10 auf eine Probenplatte (PCR 96er Well, Greiner bio-one, Frickenhausen) pipettiert, mit einer Abdeckfolie verschlossen und 3 min bei 1600 x g zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben im iCycler amplifiziert (Tab. 3.11) und mit dem MyiQ Single Color Real Time PCR Detection System analysiert. Um eine relative Quantifizierung zu ermöglichen, wurde das Referenzgen Actin ebenfalls in allen Proben gemessen. Die relative Expression der untersuchten Gene wurde mit dem Programm „Relative expression software tool (REST)“ berechnet und statistisch ausgewertet (Pfaffl, 2001; Pfaffl *et al.*, 2002).

Tab. 3.10: Zusammensetzung eines 25 µl real time PCR Ansatzes für eine Probe.

cDNA	2 µl
2 x ABgene-Mix	12,5 µl
Forward Primer 10 µM	1 µl
Reverse Primer 10 µM	1 µl
dd H ₂ O	8,5 µl

Tab. 3.11: Amplifikationsprotokoll für die quantitative real time PCR. Die Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer, da die verwendeten Primer (Tab. 3.9) ähnliche Schmelztemperaturen hatten, wurde die real time PCR standardmäßig bei 57 °C durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	15 min	45 x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	57 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Kühlung	4 °C		

3.6.5 Quantifizierung von *Verticillium*-DNA in inokulierten Pflanzen

Die Quantifizierung der *Verticillium*-DNA wurde im Department für Nutzpflanzenwissenschaften von der Arbeitsgruppe von P. Karlovsky in Göttingen durchgeführt. Das Pflanzenmaterial wurde zunächst unter flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen. Die DNA-Extraktion wurde mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen (Hilden, Deutschland) durchgeführt. Die Menge an Pilz-DNA im Probenmaterial wurde mit Hilfe von quantitativer real time PCR ermittelt. Dafür wurden folgende *Verticillium* spp. spezifischen Primer genutzt: 5'-CAGCGAAACGCGATATGTAG-3' und 5'-GGCTTGTAGGGGGTTTAGA-3' (P. Karlovsky, Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Göttingen). Für den Reaktionsansatz wurden BIOTaq DNA Polymerase (Bioline, Luckenwalde) in Standard Polymerase Puffer mit 0,01% (v/v) Tween-20 und 3 mM MgCl₂ verwendet. 10 nM Fluorescein (BioRad, Hercules, CA, USA) wurde als interner Fluoreszenz-Standard zugegeben. Die Fluoreszenz von SYBR Green I (100000 fach verdünnt; Invitrogen, Karlsruhe) wurde bei 490±10 nm angeregt und die Emission bei 530±15 nm gemessen. Die PCR bestand aus folgenden Schritten: 2 min Denaturierung bei 94 °C gefolgt von 36 Zyklen 20 s bei 94°C, 30 s bei 59°C and 40 s bei 72°C. Die Menge an *Verticillium* DNA wurde mit Hilfe einer Standardkurve aus gereinigter Pilz DNA ermittelt.

3.6.6 RNA-Gele

Zur Reinheitsüberprüfung wurde die RNA in 1,2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Dafür wurden 1,2 % (w/v) Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex, Nottingham) in 10 % des Gelvolumens MEA-Puffer (Tab. 3.12) und 70 % dd H₂O in der Mikrowelle ca. 3 min aufgeköcht und anschließend mit 20 % des Gelvolumens Formaldehyd vermischt. Vor dem

Probenauftrag wurde den Proben jeweils 1 Vol 2 x Ladepuffer (Tab. 3.13) zugesetzt und 10 min bei 70 °C inkubiert um Sekundärstrukturen der RNA zu zerstören. Als Größenstandard diente ein *Low Range* RNA-Marker (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Elektrophorese erfolgte bei 60 Volt in 1 x MEA-Puffer.

Tab. 3.12: Zusammensetzung des 10 x MEA-Puffers

MOPS	0,2 M
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM

Tab. 3.13: Zusammensetzung des 2 x RNA-Ladepuffers

Formamid	66 % (v/v)
Formaldehyd	0,3 % (v/v)
10 x MEA-Puffer	10 % (v/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
Ethidiumbromid	0,05 % (w/v)

3.7 Statistik

Für die statistischen Analysen wurden Mittelwerte und Standardfehler berechnet. Zur Überprüfung auf Signifikanz von zwei Varianten wurde der Student's T-Test mit $p \leq 0,05$ in Origin 6.0G verwendet. Wenn $p \leq 0,05$ war, wurden die Daten als signifikant unterschiedlich angesehen und mit einem Stern markiert. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen mehreren Varianten wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem „Multiple Range Test“ mithilfe des Programms Statgraphics Plus (Version 3, Manugistics, Rockville, USA) durchgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,05 wurden Unterschiede als signifikant angesehen und mit unterschiedlichen Buchstaben markiert.

4. ERGEBNISSE

4.1 Einfluss von *Verticillium longisporum* auf *Brassica napus*

4.1.1 Entwicklung von Krankheitssymptomen bei Raps

Zur Dokumentation der von *Verticillium* induzierten Schäden im Verlauf der Infektion wurden verschiedene Parameter erhoben. Die ersten äußerlich sichtbaren Krankheitssymptome bei Raps traten ca. 14 Tage nach Inokulation mit *V. longisporum* auf. Zu den sichtbaren Infektionssymptomen zählten Vergilbungen der unteren Blätter und eine Reduktion des Höhenwachstums. Bei Betrachtung des Sprossinneren konnte 21-28 Tage nach Inokulation im Hypokotyl eine braune Verfärbung der Leitgefäße beobachtet werden (Abb. 1.2).

Das Höhenwachstum von Raps wurde über den Infektionsverlauf bis 28 Tage nach Inokulation erfasst (Abb. 4.1A). Während die mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen 2 Tage nach Infektion noch gleich groß waren, zeigte sich bereits 14 Tage nach Pilzinokulation eine signifikante Minderung des Höhenwachstums, die sich bis 21 Tage nach Inokulation im Vergleich zu den mock-inokulierten Pflanzen noch deutlich verstärkte. Das Foto in Abbildung 4.1B zeigt exemplarisch den Phänotyp einer mock- und einer *Verticillium* inokulierte Pflanze 21 Tage nach Inokulation. Die Stauchung ist hier deutlich zu sehen, wobei nur die Höhe des Sprosses reduziert war, während die Größe und Anzahl der Blätter sich nicht unterschied.

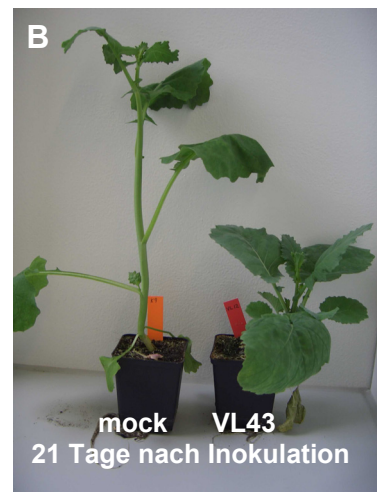
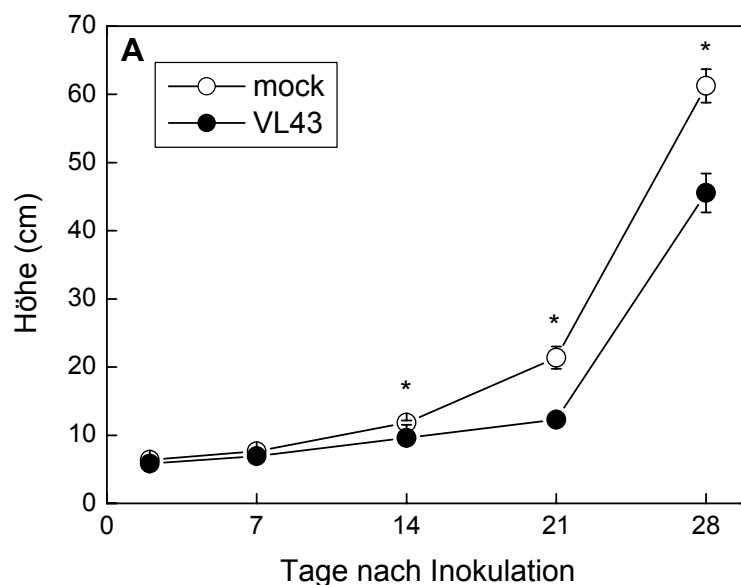


Abb. 4.1: (A) Sprosslänge von mock- und *Verticillium*-inokuliertem Raps im Infektionsverlauf. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 20 Pflanzen mit Standardfehler. Bei einigen Messzeitpunkten war der Standardfehler kleiner als das Symbol und ist daher in der Abbildung nicht zu sehen. Symbole mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* (VL43) inokuliertem Raps (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich. (B) Das Foto zeigt exemplarisch eine mock- und eine *V. longisporum* inokulierte Rapspflanze 21 Tage nach Inokulation.

Wöchentlich wurden Pflanzen geerntet und die Frischmasse von Blättern, Spross und Wurzeln bestimmt (Abb. 4.2). Obwohl die infizierten Pflanzen nach 14 Tagen eine signifikante Stauchung zeigten, wirkte sich das zu diesem Zeitpunkt nicht auf die Frischmasse der einzelnen Pflanzenteile aus. Erst 28 Tage nach Inokulation war die Frischmasse des Sprosses der *Verticillium* infizierten Pflanzen signifikant reduziert (Abb. 4.2B). Bei der Frischmasse der Blätter konnten zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen mock- und *Verticillium* inokulierten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 4.2A). Die Wurzelmasse der infizierten Pflanzen war 28 Tage nach Inokulation etwas erhöht, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 4.2C).

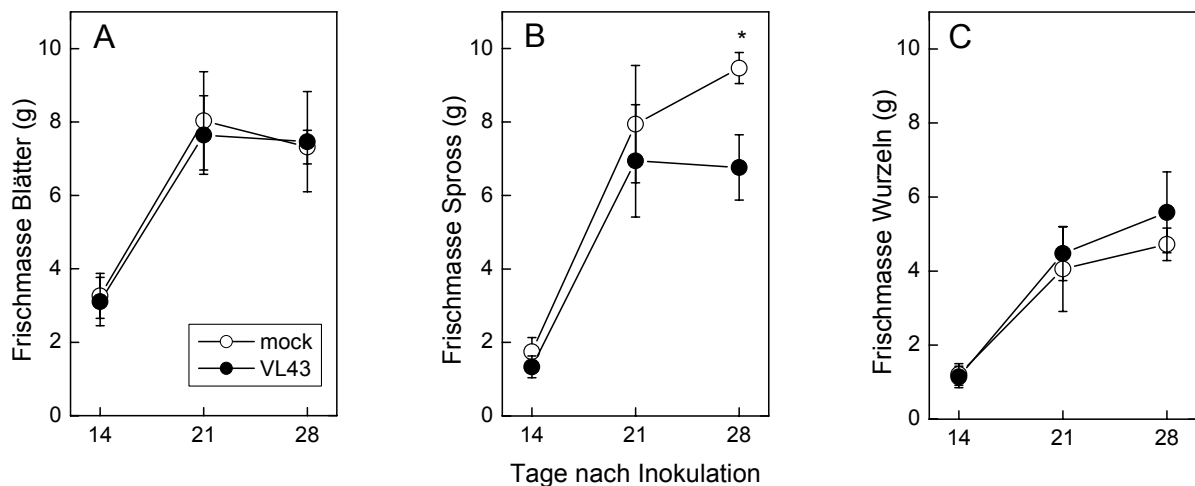


Abb. 4.2: Frischmasse von mock- und *V. longisporum* inokulierten Rapspflanzen. Blätter (A), Spross (B) und Wurzeln (C) jeweils einer Pflanze wurden getrennt gewogen. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 5 Pflanzen mit Standardfehler. Symbole mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* inokuliertem Raps (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

Weitere Parameter, die zur Dokumentation *Verticillium* induzierter Schäden untersucht wurden, waren Chlorophyllgehalt, Chlorophyllfluoreszenz, Photosynthese- und Transpirationsrate sowie Elektrolytleitfähigkeit zur Ermittlung von Membranschäden. Zum größten Teil wurden die folgenden Analysen 21 Tage nach Inokulation durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt deutliche Symptome wie Stauchung (Abb. 4.1) und Vergilbung (Abb. 4.3B) sichtbar waren, aber der Raps noch nicht blühte, was mit einem Verlust an Blättern einherging (Abb. 4.2A). Der Chlorophyllgehalt (siehe 3.3.4) war 21 Tage nach Inokulation bei *Verticillium*-inokulierten Pflanzen signifikant (um ca. 17 %) vermindert (Abb. 4.3A). Abbildung 4.3B zeigt exemplarisch die zugehörigen Blätter einer mock- und einer *Verticillium*-inokulierten Rapspflanze. Die unteren Blätter der infizierten Pflanzen (im Bild rechts) zeigen deutliche Vergilbungen im Vergleich zu den mock-Inokulierten. Zur Überprüfung des Einflusses der *Verticillium*-Infektion auf die Photosynthese von Raps, wurde über den Infektionsverlauf die Chlorophyllfluoreszenz (siehe 3.3.1) als Indikator für die Aktivität von Photosystems II gemessen (Abb. 4.3C). Die Messungen an den *Verticillium*-infizierten Pflanzen wiesen einen höheren Standardfehler auf als die mock-inokulierten. Zu allen

Messzeitpunkten war die Chlorophyllfluoreszenz der *Verticillium*-infizierten Pflanzen geringfügig aber signifikant erniedrigt. Diese Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis darauf, dass der Raps Stress ausgesetzt ist.

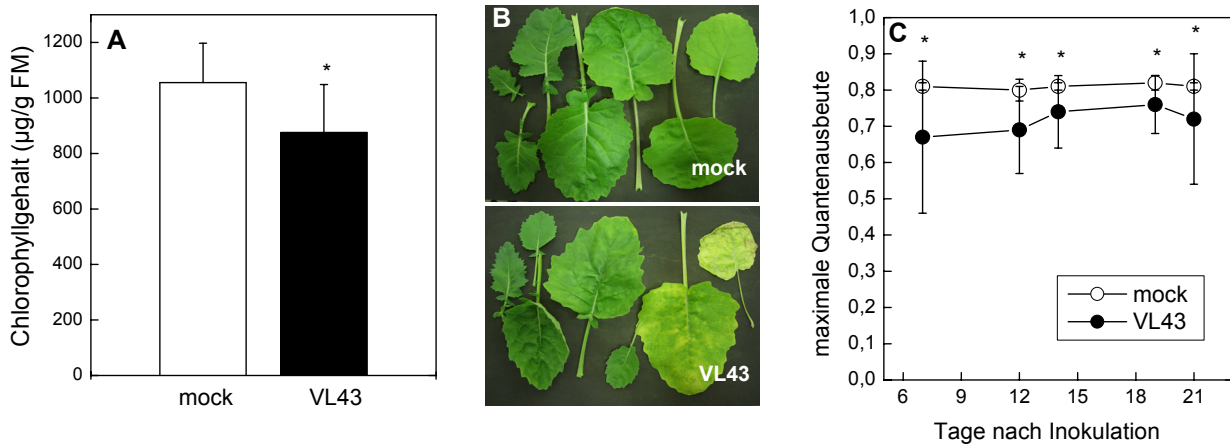


Abb. 4.3: Chlorophyllgehalt (A) von mock- und *Verticillium longisporum* (VL43)-inokulierten Pflanzen 21 Tage nach Infektion ($n = 9 \pm \text{SE}$). Der Chlorophyllgehalt wurde als Summe von Chlorophyll a und b dargestellt. Blätter jeweils einer mock- und einer *Verticillium*-inokulierten Rapspflanze (B). (C) Einfluss von *Verticillium* auf die Aktivität von Photosystem II. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde bei 20 °C und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit als maximale photosynthetische Quantenausbeute an dunkel-adaptierten Blättern über den Infektionsverlauf gemessen ($n = 20 \pm \text{SE}$). Signifikante Unterschiede im T-Test ($p \leq 0,05$) sind mit einem Stern markiert.

Zur Bestimmung der aktuellen Photosyntheserate (siehe 3.3.5) wurden zu drei Zeitpunkten Gaswechsellmessungen durchgeführt, wobei keine signifikante Änderung der Photosyntheserate durch *Verticillium*-Infektion festgestellt werden konnte (Abb. 4.4A). Aus der Messung konnte außerdem die Transpirationrate ermittelt werden, die aber ebenfalls keine signifikante Beeinflussung durch die *Verticillium*-Infektion zeigte (Abb. 4.4B).

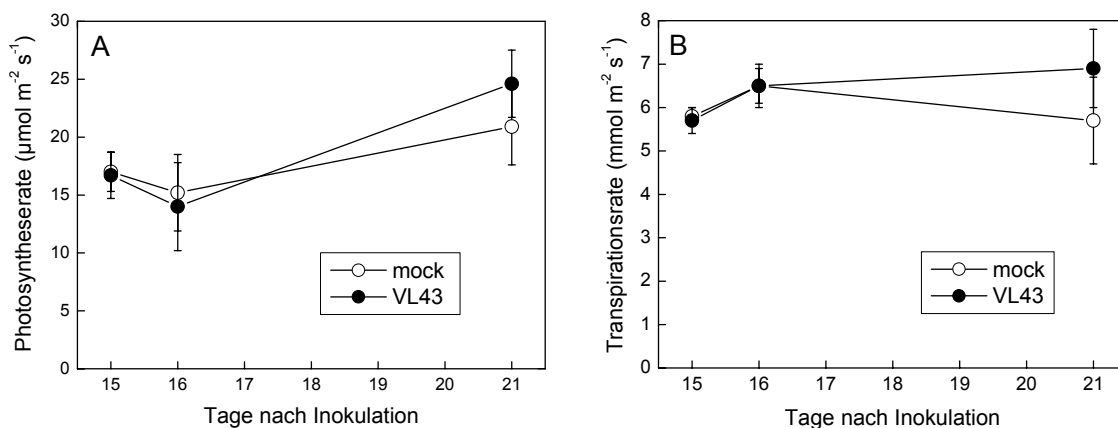


Abb. 4.4: Photosyntheserate (A) und Transpirationsrate (B) im Infektionsverlauf ($n = 8 \pm \text{SE}$). Weiße Symbole repräsentieren mock- und schwarze Symbole *V. longisporum* (VL43)-inokulierte Rapspflanzen. Die mikroklimatischen Bedingungen während der Messung betrug durchschnittlich 22 °C, 54 % relative Luftfeuchtigkeit und 1185 µmol/(m² s⁻¹) Lichtintensität.

Zur Überprüfung, ob *V. longisporum* Membranschäden in den Rapsblättern verursacht, wurden Elektrolytleitfähigkeitsmessungen durchgeführt (siehe 3.3.2). Da das Austreten von Cytoplasma (*leakage*) durch geschädigte Membranen zu einer höheren Leitfähigkeit in der Messflüssigkeit führt, kann die Leitfähigkeit in Relation zur Gesamtleitfähigkeit als Indikator für Membranschäden genutzt werden. Mögliche Schädigungen der Membranen durch die Infektion mit *Verticillium* konnten 21 und 28 Tage nach Inokulation nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.5). Es zeigte sich zwar bei der Messung 21 Tage nach Inokulation eine geringfügig erhöhte Elektrolytleitfähigkeit (um 2,4 %) bei den *Verticillium*-inokulierten Pflanzen; allerdings erwies sich diese als nicht signifikant.

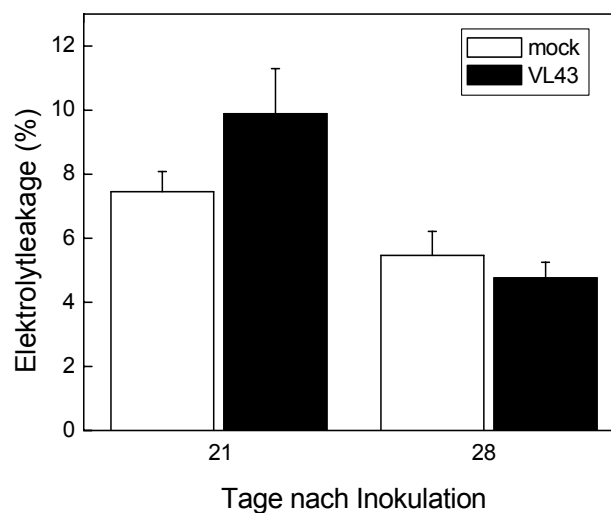


Abb. 4.5: Elektrolytleitfähigkeit von mock- und *Verticillium*-inokuliertem Raps 21 und 28 Tage nach Inokulation ($n = 5 \pm \text{SE}$). Die Messungen erfolgten nach 24-stündiger Inkubation von Blattscheiben in dd H₂O.

21 Tage nach Inokulation wurde außerdem überprüft, ob im unteren Stängelbereich der Rapspflanzen *Verticillium*-DNA mittels quantitativer real time PCR nachweisbar war. Dafür wurden jeweils 21 mock- und 21 *Verticillium*-infizierte Rapspflanzen analysiert. Die ermittelten Mittelwerte und Standardfehler für die gefundene *Verticillium*-DNA betragen für die mock-inokulierten Rapspflanzen $0,23 \pm 0,08$ ng/g Frischmasse und für die *Verticillium*-infizierten Pflanzen $0,32 \pm 0,22$ ng/g Frischmasse. Diese Werte waren im T-Test ($p \leq 0,05$) nicht signifikant unterschiedlich und lagen unterhalb des Detektionslimits für die PCR, das $0,5$ ng/g Frischmasse betrug. Da die Werte an der Nachweisgrenze Methode lagen, kann man aus dem Ergebnis schließen, dass der Pilz 21 Tage nach Inokulation noch nicht bis in den Stängel vorgedrungen war.

4.1.2 Charakterisierung von Proteinmustern unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum*

4.1.2.1 Kontaminationsbestimmung in der apoplastischen Waschflüssigkeit (AWF) von Raps

Da ein Schwerpunkt der Arbeit auf der Analyse von apoplastischen Proteinen lag, war es nötig das Ausmaß der Kontamination mit symplastischen Proteinen in der AWF zu ermitteln. Dafür wurde die Aktivität des Markerenzym Malatdehydrogenase (MDH), das nur im Zellinneren vorkommt, bestimmt (siehe 3.5.2.1). Die Extraktion der apoplastischen Waschflüssigkeiten wurde dahingehend optimiert (siehe 3.4.1 und 3.4.2), dass die Kontamination auf ein vernachlässigbares Maß reduziert war (Tab. 4.1). Die Aktivität des symplastischen Markerproteins war in der AWF der *Verticillium*-infizierten Pflanzen im Vergleich zu den mock-behandelten Pflanzen nicht signifikant erhöht. Dies spricht zusätzlich zu den Elektrolytleitfähigkeitsmessungen für intakte Plasmamembranen. Außerdem wurden die Proteingehalte in Gesamtblattextrakten und AWFs gemessen. Die Proteingehalte der Blattextrakte und der AWF lagen im Schnitt bei 13,5 mg/g Frischmasse und bei 0,015 mg Protein pro Gramm Frischmasse (Tab. 4.1). Zwischen mock-behandeltem und *Verticillium*-infiziertem Raps zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt.

Tab. 4.1: Kontaminationsbestimmung in den apoplastischen Waschflüssigkeiten aus mock- und *Verticillium*-infiziertem Raps mit Hilfe des Markerenzym Malatdehydrogenase (MDH). Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus fünf Messungen mit Standardfehler. Der P-Wert wurde mittels Student's T-Test berechnet. Zur Ermittlung der Kontamination wurde die MDH-Aktivität aus den AWF auf die jeweiligen MDH-Aktivitäten der Gesamtblattextrakte bezogen.

	Gesamtblattextrakte			AWF		
	mock	VL43	P-Wert	mock	VL43	P-Wert
Proteingehalt (mg/g FM)	13,7 ± 2,1	13,2 ± 1,6	0,8491	0,013 ± 0,001	0,017 ± 0,002	0,1142
MDH-Aktivität (nkat/g FM)	417,1 ± 31,7	444,4 ± 17,9	0,4742	0,015 ± 0,003	0,038 ± 0,022	0,3439
Kontamination (%)				0,004 ± 0,001	0,008 ± 0,005	0,3940

4.1.2.2 Vergleich von Proteinmustern in apoplastischen und Gesamtblattextrakten

Apoplastische Proteine und Proteine aus Gesamtblattextrakten wurden 7, 14 und 21 Tage nach Inokulation mit *Verticillium longisporum* aus Raps gewonnen (siehe 3.4.2 und 3.4.3). Dafür wurden pro Probe die Blätter von jeweils fünf Rapspflanzen geerntet und zusammen extrahiert, wobei nur voll ausgebildete, aber noch nicht stark vergilbte oder geschädigte Blätter verwendet wurden. Die Proteinextrakte wurden elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgradienten nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (siehe 3.5.5) und anschließend mit Silbernitrat gefärbt (siehe 3.5.8). Bei den Gesamtblattextrakten waren zu keinem der untersuchten Zeitpunkte Unterschiede im Proteinmuster von mock-inokulierten

Kontrollpflanzen (K) und *V. longisporum* inokulierten Pflanzen (V) zu sehen (Abb. 4.6). In der AWF dagegen zeigten sich deutliche Unterschiede im Bandenmuster von Proteinen aus Kontrollen und infiziertem Raps (Abb. 4.6). Zwar enthalten die Gesamtextrakte auch AWF-Proteine, aber da ihr Anteil an den Gesamtproteinen nur sehr gering ist (Tab. 4.1), sind sie in der Analyse der Gesamtextrakte nicht nachweisbar.

Die deutlichsten Unterschiede im Proteinmuster der AWF konnten 21 Tage nach Inokulation festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten sich stärker, aber auch schwächer auftretende Banden der AWF aus *Verticillium*-infizierten Pflanzen im Vergleich zu mock-inokulierten Kontrollen im Molekulargewichtsbereich von 14 bis 50 kDa. Die markantesten Unterschiede sind durch rote Pfeile markiert (Abb. 4.6).

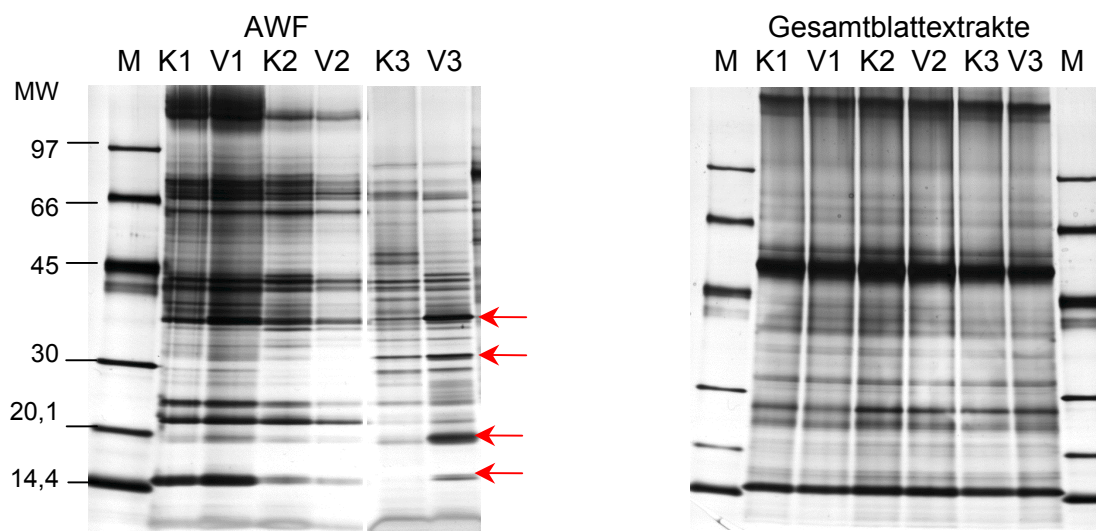


Abb. 4.6: Proteinmuster apoplastischer und Gesamtblattproteine von Raps in einem mit Sibernitrat gefärbten Gradientengel zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (Zeitpunkt 1: 7 Tage nach Inokulation, Zeitpunkt 2: 14 Tag nach Inokulation, Zeitpunkt 3: 21 Tage nach Inokulation; mock-inokulierte Kontrollpflanzen = K, *V. longisporum* inokulierte Pflanzen = V, Proteinstandard = M). Die Trennung der Proteine erfolgte in einem 7,5-20 % PAA-Gradienten; pro Spur wurden 1,8 µg Protein aufgetragen.

4.1.2.3 Vergleich von Proteinmustern und Proteinanalyse in AWF und Xylemsäften

Für weitere Analysen wurde der Zeitpunkt 21 Tage nach Inokulation gewählt. Dafür waren mehrere Gründe ausschlaggebend. Erstens traten 21 Tage nach Inokulation die deutlichsten Unterschiede im Proteinmuster von Kontrollen und infizierten Pflanzen in der AWF von Raps auf und zweitens waren die Pflanzen zu diesem Zeitpunkt groß genug, um zusätzlich zur apoplastischen Waschflüssigkeit auch noch Xylemsaft in ausreichender Menge für eine Proteinanalyse zu gewinnen. Spätere Zeitpunkte waren nicht geeignet, da der Raps dann anfang zu blühen und viele Blätter abwarf.

Zur Untersuchung von Proteinmustern wurden neben der AWF auch Xylemsäfte gewonnen und die Proteinkonzentration der Extrakte bestimmt. Der Xylemsaft enthielt nur geringe Mengen an Protein (ca. 35 µg/ml). Um für die Analysen ausreichende Proteinmengen zu erhalten, wurden ca. 15 ml Xylemsaft aus 15 Rapspflanzen gewonnen. Der Xylemsaft wurde aufkonzentriert und ebenso wie die AWF in einem PAA-Gradienten aufgetrennt (siehe 3.5.5). In Abbildung 4.7 sind die Coomassie-gefärbten Gele mit den Proteinmustern von Xylemsaft und apoplastischer Waschflüssigkeit zu sehen. Beim Vergleich von Xylemsaft und AWF zeigte sich, dass die Proteinzusammensetzung des Xylemsaftes sich deutlich von der der AWF unterschied. Weitere deutliche Unterschiede waren auch im Proteinmuster von mock-inokulierten und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen sichtbar. Beim Xylemsaft traten drei Banden (XVL1-3) unter *Verticillium*-Infektion neu auf bzw. wesentlich stärker hervor als bei mock-Inokulation. In der AWF zeigten sich bei den gleichen Molekulargewichten ebenfalls drei stärkere Banden (AVL1, 2 und 7) unter *Verticillium*-Einfluss. Zusätzlich traten zwei weitere Banden in der AWF von *Verticillium*-infizierten Pflanzen stärker hervor als in den Kontrollen (AVL5 und AVL9). Außerdem war in der AWF unter *Verticillium*-Einfluss eine Bande schwächer als in der Kontrolle (AK6).

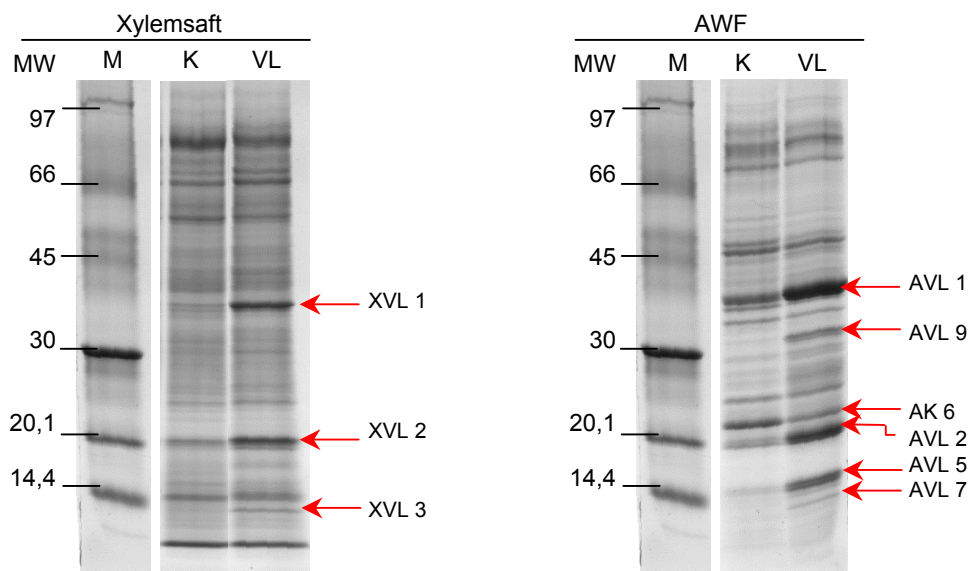


Abb. 4.7: Proteinmuster von Xylemsaft und AWF aus mock- und *Verticillium*-inokuliertem Raps. Pro Spur wurden 100 µg Xylemsaftproteine bzw. apoplastischen Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel (PAA-Gradient: 7,5-20 %) aufgetrennt und anschließend mit CBB gefärbt. Die roten Pfeile deuten auf Unterschiede im Proteinmuster von mock- (K) und *Verticillium*-inokulierten (VL) Pflanzen hin.

Die in den Gelbildern (Abb. 4.7) mit roten Pfeilen markierten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Trypsin verdaut (siehe 3.5.10). Mittels ESI-LC-Massenspektrometrie und anschließender Mascot-Suche in der NCBI-Datenbank wurden die Proteine identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Zwei der Xylemsaftproteine konnten identifiziert werden. Das Protein aus der Bande XVL1 wies eine starke Ähnlichkeit mit einer basischen Glucanase aus *Brassica juncea* (brauner Senf) und mit einer β -1,3-Glucanase (At3g57240) aus *Arabidopsis thaliana* auf. Das auf Basis von Sequenzdaten erwartete Molekulargewicht (MW) dieser Proteine lag laut NCBI-Angaben bei 31 kDa, wobei die Bande des ausgeschnittenen Proteins bei 37 kDa lag. Das andere identifizierte Protein mit der Bezeichnung XVL3 wies Ähnlichkeit mit einem *pathogen related* PR-4 Protein aus *Brassica rapa* auf. Hier lag das erwartete Molekulargewicht bei 16 kDa und das aus dem Gel, mittels einer Eichkurve der Markerproteinen berechnete (siehe 3.5.6) bei 14 kDa. Mit Hilfe des Programms *TargetP* (Server v1.01) wurde die Anwesenheit von möglichen Signalpeptiden überprüft (siehe 3.5.11). Für die basische Glucanase aus *Brassica juncea* bzw. β -1,3-Glucanase aus *Arabidopsis thaliana* und das PR-4 Protein aus *Brassica rapa* wurde mit einer sehr guten Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg gefunden.

Aus den Proteinbanden der apoplastischen Waschflüssigkeiten konnten fünf Proteine identifiziert werden (Tab. 4.2). AVL1 und AVL7 entsprachen den Proteinen XVL1 und XVL3, die im Xylemsaft identifiziert wurden. Das Protein AVL2 konnte als basische Endochitinase aus *Brassica napus* identifiziert werden, wobei eine Ähnlichkeit zu einer Chitinase aus *Brassica rapa* mit der gleichen Trefferwahrscheinlichkeit gefunden wurde. Beide Chitinasen hatten laut NCBI-Angaben ein Molekulargewicht von ungefähr 29 kDa, das aus dem Gel ermittelte lag nur bei 19 kDa. Die in NCBI angegebenen Molekulargewichte sind theoretisch berechnet und können von den tatsächlichen abweichen. Dafür können verschiedene Gründe verantwortlich sein, z.B. alternatives Splicing oder posttranslationale Modifikationen. Für *Brassica napus* allgemein und für die von uns verwendete *rapid cycle* Variation im Besonderen sind nur wenige Daten verfügbar, was eine Identifizierung von Proteinen erschwert. So war die Identifizierung der Chitinase mit einem Protein-Score von 58 auch nicht besonders eindeutig.

Die Proteinbande von AVL2 hatte das gleiche Molekulargewicht wie die Bande XVL2 aus dem Xylemsaft. Das Protein aus dem Xylemsaft konnte nicht identifiziert werden; möglicherweise handelt es sich hier aber auch um die in der AWF gefundene Chitinase. AVL5 konnte nicht identifiziert werden, aber AVL9 und AK6. Das Protein AVL9 wies starke Ähnlichkeit zu einer Peroxidase aus *Raphanus sativus* und zu einer Peroxidase aus *Brassica rapa* auf. Mit einer weniger guten Trefferwahrscheinlichkeit ergab sich auch eine Ähnlichkeit zu einer Peroxidase (At2g18150) aus *Arabidopsis thaliana*. Die Angaben für die Molekulargewichte dieser Peroxidasen liegen zwischen 31 und 38 kDa, in diesem Molekulargewichtsbereich liegt mit 31 kDa auch die Bande für das analysierte Protein. Die unter *Verticillium*-Einfluss in ihrer Intensität abgeschwächte Proteinbande AK6 konnte einem Germin-ähnlichen Protein aus *Arabidopsis thaliana* zugeordnet werden. Hierfür stimmten die Angaben für das erwartete Molekulargewicht von 22 kDa mit dem tatsächlichen von 21 kDa relativ genau überein. Für alle identifizierten Proteine, außer für die Peroxidase P7 aus

Brassica rapa, konnte ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg nachgewiesen werden (Tab. 4.2).

Tab. 4.2: AWF und Xylemsaftproteine, die unter *Verticillium*-Einfluss differentiell auftraten. Die Proteine wurden mittels massenspektrometrischer Analyse und Mascot-Suche in der NCBI Datenbank identifiziert. Angegeben sind die Nummer der Bande in Abb. 4.7, die NCBI-Nummer, die *Accession No* (*Acc. No*), der *Protein Score* und das laut NCBI-Angaben erwartete Molekulargewicht (MW) des Proteins. Die Anwesenheit von Signalpeptiden wurde mit *TargetP* überprüft, wobei C = Chloroplast und S = Sekretorischer Weg bedeutet. RC steht für *reliability class* und ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der Vorhersage, je kleiner der RC-Wert, desto sicherer die Vorhersage für das Signalpeptid.

Banden Nr.	Ähnlichkeit mit	Organismus	NCBI Nr.	Acc. No	Protein Score	MW	Signal-peptid
XVL 1	basische Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 118763538	ABC94638	510	30722	S (RC 1)
	β-1,3-Glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6735303	At3g57240	222	37632	S (RC 1)
XVL 2	nicht identifiziert						
XVL 3	PR4-Typ Protein	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	gi 73671284	AF528181	162	15950	S (RC 2)
AVL 1	basische Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 118763538	ABC94638	480	37906	S (RC 1)
	β-1,3-Glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6735303	At3g57240	201	30681	S (RC 1)
AVL 2	basische Endochitinase CHB4	<i>Brassica napus</i>	gi 584929	Q06209	58	29684	S (RC 1)
	Chitinase	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	gi 116267545	AB257452	58	29652	S (RC 1)
AVL 5	nicht identifiziert						
AVL 7	PR4-Typ Protein	<i>Brassica rapa subsp. pekinensis</i>	gi 73671284	AF528181	108	15950	S (RC 2)
AVL 9	koreanische Rettich-Isoperoxidase	<i>Raphanus sativus</i>	gi 1518388	X91172	200	33993	S (RC 3)
	Peroxidase P7 (TP7)	<i>Brassica rapa subsp. rapa</i>	gi 464365	P00434	200	31523	C (RC 4)
	Peroxidase, putative; Atperox P15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15224116	At2g18150	52	37626	S (RC 2)
AK 6	Germin (GER3; GLP 3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1755154	At5g20630	156	22020	S (RC 1)

4.1.2.4 Zweidimensionale Auftrennung apoplastischer Rapsproteine

Zusätzlich zur eindimensionalen wurden die apoplastischen Proteine auch zweidimensional nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrem Molekulargewicht (MW) aufgetrennt. Abbildung 4.8 zeigt die zweidimensionale Separation von je 80 µg apoplastischen Proteinen aus mock- und *Verticillium*-inokuliertem Raps.

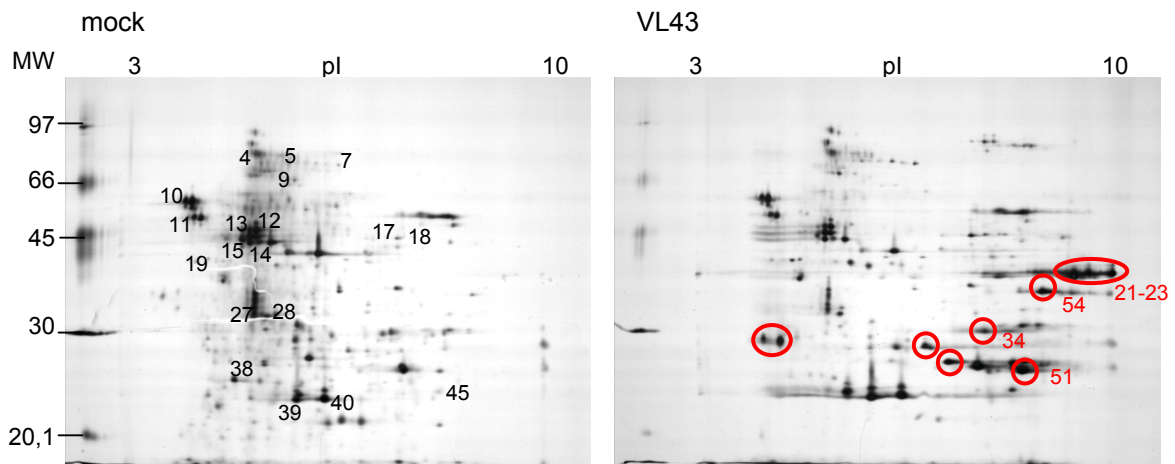


Abb. 4.8: Proteinmuster von mock- und *Verticillium* (VL43)-infiziertem Raps nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung von je 80 µg apoplastischen Proteinen. Es wurden fünf biologische Wiederholungen durchgeführt, von denen jeweils ein repräsentatives mit Silber gefärbtes Gel dargestellt ist. Die schwarzen Zahlen weisen auf Proteine hin, die in beiden Behandlungen vorkamen und identifiziert werden konnten. Die roten Kreise zeigen Proteine, die bei Analyse von jeweils fünf Gelen eine signifikant stärkere Expression in *Verticillium*-beeinflussten Proben aufwiesen. Nur Proteinspots, die mit Zahlen markiert sind, konnten identifiziert werden (Tab. 4.3 und 4.4).

Für eine statistische Auswertung wurden pro mock- bzw. *V. longisporum*-Behandlung fünf biologische Wiederholungen analysiert; dafür wurden die Gele mit Silber gefärbt. Bei den Silber-gefärbten Gelen wurden durchschnittlich 170 ± 9 Spots detektiert. Mit Hilfe der *Proteomweaver*-Software wurden die Gele von mock-inokulierten Kontrollpflanzen mit denen von *Verticillium*-inokulierten Pflanzen verglichen (siehe 3.5.9). So wurde nach Spots gesucht, die in mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen differentiell exprimiert waren. Gefunden wurden 10 Spots, die nach *Verticillium*-Infektion neu bzw. stärker auftraten. Von diesen Spots (in Abb. 4.8 durch rote Kreise gekennzeichnet), die aus einem Coomassie gefärbten Gel ausgestochen wurden, konnten sechs identifiziert werden (Tab. 4.3). Die Spots 21-23 zeigten, mit einem guten Protein-Score, Ähnlichkeit zu einer basischen Glucanase aus *Brassica juncea* und zu einer β -1,3-Glucanase aus *Arabidopsis thaliana*. Der Faktor mit dem die drei Spots signifikant ($p \leq 0,05$) unterschiedlich waren, betrug zwischen 3,1 und 4,8. Die Spots 34 und 51 wiesen Ähnlichkeit zu einer basischen Endochitinase (CHB4) aus Raps auf und wurden mit dem Faktor 7,2 bzw. 4,2 reguliert. Ein weiteres Protein, das signifikant um den Faktor 2,4 verändert war und identifiziert werden konnte, zeigte Ähnlichkeit zu einer Rettich-Peroxidase und mit dem gleichen Protein-Score zu einer Peroxidase aus *Arabidopsis*. Alle drei differentiell aufgetretenen Proteine Glucanase, Chitinase und Peroxidase waren ebenfalls aus dem eindimensionalen Gel als differentiell auftretend identifiziert worden (Abb. 4.7 und Tab. 4.2), so dass die vorherige Identifizierung bestätigt wurde. Die Überprüfung der identifizierten Proteine auf das Vorhandensein von Signalpeptiden ergab für alle Proteine laut Analyse mit *TargetP* eine hohe Wahrscheinlichkeit für ein sekretorisches Signalpeptid.

Tab. 4.3: Unter *Verticillium*-Einfluss differentiell exprimierte Proteine in der AWF von Raps. Die Identifizierung erfolgte mittels MS-Analyse und Mascot-Suche in der NCBI Datenbank. Angegeben sind die NCBI-Nummer, die *Accession No* (*Acc. No*), der *Protein Score* und das laut NCBI-Angaben erwartete Molekulargewicht (MW) des Proteins. Die Anwesenheit von Signalpeptiden wurde mit *TargetP* überprüft, wobei S = Sekretorischer Weg bedeutet. RC steht für *reliability class* und ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der Vorhersage, je kleiner der RC-Wert, desto sicherer die Vorhersage für das Signalpeptid. Außerdem ist der Faktor angegeben, mit dem die Proteine verändert auftraten und das Ergebnis des Students T-Test für jeden Spot, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

Spot Nr.	Ähnlichkeit mit	Organismus	NCBI Nr.	Acc. No	Protein Score	MW	Signal-peptid	Faktor	p-Wert
21	basische Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371164	ABC94638	223	30722	S (RC 1)	3,9	0,037
	β -1,3-Glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6735303	At3g57240	91	37632	S (RC 1)		
22	basische Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371164	ABC94638	405	30722	S (RC 1)	3,1	0,001
	β -1,3-Glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6735303	At3g57240	180	37632	S (RC 1)		
23	basische Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371164	ABC94638	453	30722	S (RC 1)	4,8	0,049
	β -1,3-Glucanase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 6735303	At3g57240	222	37632	S (RC 1)		
34	basische Endo-chitinase CHB4	<i>Brassica napus</i>	gi 584929	Q06209	95	29684	S (RC 1)	7,7	0,009
51	basische Endo-chitinase CHB4	<i>Brassica napus</i>	gi 584929	Q06209	159	29684	S (RC 1)	4,2	0,020
54	koreanische Rettich Isoperoxidase	<i>Raphanus sativus</i>	gi 1518388	X91172	94	33993	S (RC 3)	2,4	0,040
	Peroxidase, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15239075	At5g05340	94	34650	S (RC 1)		

Zusätzlich zu den differentiell exprimierten Spots, konnten noch 19 Proteine aus einem Coomassie-gefärbten Kontrollgel identifiziert werden (Tab. 4.4). Dabei handelte es sich um 11 unterschiedliche Proteine. Drei Spots (Nr. 4, 5, 7) wiesen Ähnlichkeit zu einer α -L-Arabinofuranosidase aus *Raphanus sativus* bzw. *Arabidopsis* auf, vier Spots zeigten Ähnlichkeit zu einer Glucanase aus *Brassica juncea* (Spot Nr. 12-15). Jeweils drei Spots zeigten Ähnlichkeit zu einer Protease aus der Aspartyl Familie (Spot Nr. 10, 17, 18) und zu einem Germin (GLP3; Nr. 39, 40, 45) aus *Arabidopsis*. Die Spots 27 und 28 wiesen Ähnlichkeit zu einer Klasse 4 Chitinase aus *Brassica napus* auf. Weiterhin wurden eine Peroxidase (Spot Nr. 11), eine Carboxylester Hydrolase (Spot Nr. 19) und ein unbekanntes Protein (Spot Nr. 38) aus *Arabidopsis* identifiziert. Ähnlichkeit wurde auch zu einem hypothetischen Protein aus *Brassica rapa* (Nr. 9) gefunden, das ein Signalpeptid für chloroplastidäre Lokalisation aufwies. Die α -L-Arabinofuranosidase aus *Raphanus sativus* besaß ein Signalpeptid für die Mitochondrien, allerdings mit einer geringen Vorhersagewahrscheinlichkeit (*Reliability class* 4). Ansonsten wiesen alle gefunden Proteine mit einer mehr oder weniger hohen Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg auf.

Tab. 4.4: Identifikation von Proteinspots aus Kontrollgelen der AWF von Raps mittels MS-Analyse und Mascot-Suche in der NCBI Datenbank. Zusätzlich zur NCBI-Nummer ist noch die *Accession No* und das erwartete Molekulargewicht der Proteine angegeben. Die Anwesenheit von Signalpeptiden wurde mit *TargetP* überprüft, wobei C = Chloroplast, M = Mitochondrium und S = Sekretorischer Weg bedeutet. RC steht für *reliability class* und ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der Vorhersage, je kleiner der RC-Wert, desto sicherer die Vorhersage für das Signalpeptid.

Spot Nr.	Ähnlichkeit mit	Organismus	NCBI-Nr.	Acc. No	Protein Score	MW	Signal-peptid
4	α -L-Arabinofuranosidase T7M13_18	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 13937191	At3g10740	113	75437	S (RC 2)
5	α -L-Arabinofuranosidase	<i>Raphanus sativus</i>	gi 74355968	BAE44362	76	84750	M (RC 4)
7	α -L-Arabinofuranosidase	<i>Raphanus sativus</i>	gi 74355968	BAE44362	195	84750	M (RC 4)
9	hypothetisches Protein	<i>Brassica rapa susp. pekinensis</i>	gi 72384433	homolog of At5g09770	84	60345	C (RC 1)
10	Pepsin A, Aspartyl Protease Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 22326716	At5g10770 bzw. At5g10760	46	50802	S (RC 5) S (RC 2)
11	Peroxidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15224116	At2g18150	44	37626	S (RC 2)
12	Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371166	ABC94639	75	38120	S (RC 1)
13	Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371166	ABC94639	51	38120	S (RC 1)
14	Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371166	ABC94639	76	38120	S (RC 1)
15	Glucanase	<i>Brassica juncea</i>	gi 86371166	ABC94639	57	38120	S (RC 1)
17	Pepsin A, Aspartyl Protease Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 22326716	At5g10770 bzw. At5g10760	58	50802	S (RC 5) S (RC 2)
18	Pepsin A, Aspartyl Protease Familie	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 22326716	At5g10770 bzw. At5g10760	49	50802	S (RC 5) S (RC 2)
19	Carboxylester Hydrolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15220512	At1g29660	87	40630	S (RC 2)
27	Chitinase Klasse 4-Protein	<i>Brassica napus</i>	gi 14486393	AAK62048	103	31219	S (RC 4)
28	Chitinase Klasse 4-Protein	<i>Brassica napus</i>	gi 14486393	AAK62048	90	31219	S (RC 4)
38	unbekanntes Protein (<i>plant basic secretory protein</i> (BSP))	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 15226060	At2g15130	81	25459	S (RC 1)
39	Germin (GER 3, GLP3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1755154	At5g20630	56	22020	S (RC 1)
40	Germin (GER 3, GLP3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1755154	At5g20630	98	22020	S (RC 1)
45	Germin (GER 3, GLP3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1755154	At5g20630	73	22020	S (RC 1)

4.1.3 Peroxidase Aktivitäten

Zwei der aus den Gelen identifizierten Apoplasten-Proteine wiesen Ähnlichkeit zu Peroxidasen auf. Eine der Peroxidasen war unter *Verticillium*-Einfluss hochreguliert, während die andere nicht differentiell reguliert war. Zur Überprüfung der Peroxidase-Aktivität wurden 21 Tage nach Inokulation, also zum gleichen Erntezeitpunkt, von dem auch Proteingele untersucht wurden, Aktivitätsmessungen mit dem unspezifischen Substrat Guajakol durchgeführt. Die Peroxidase Aktivität in der AWF war mit ca. 2 nkat/g Frischgewicht (FG) doppelt so hoch wie die Aktivität in den Gesamtblattextrakten (Abb. 4.9). Ein Veränderung der Peroxidase Aktivität in den *Verticillium*-inokulierten Rapspflanzen im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollpflanzen konnte aber weder in der AWF noch in den Gesamtblattextrakten beobachtet werden.

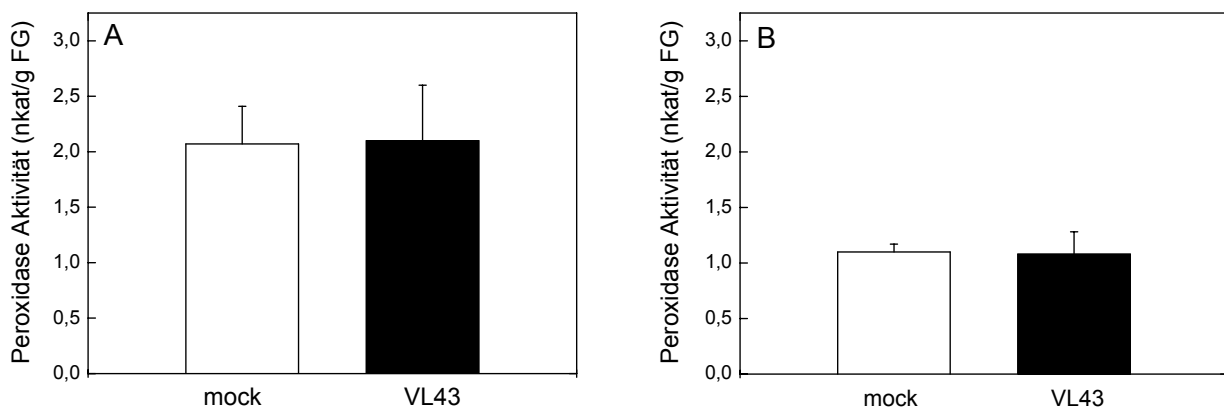


Abb. 4.9: Peroxidase Aktivität in der AWF (A) und in Gesamtblattextrakten (B) von mock- und *Verticillium*-inokulierten Rapspflanzen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte mit Standardfehler von $n = 8$ Proben für die AWF und $n = 5$ für die Gesamtblattextrakte. Die Aktivität wurde photometrisch mit Guajakol als Substrat bestimmt.

4.2 Einfluss von *Verticillium longisporum* auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

4.2.1 Ermittlung geeigneter Versuchsbedingungen

4.2.1.1 Vergleich der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia und Landsberg erecta

Verschiedene *Arabidopsis* Ökotypen reagieren unterschiedlich auf *Verticillium dahliae* Infektion (Veronese et al., 2003). Der Ökotyp Landsberg erecta war im Vergleich zum Ökotypen Columbia geringfügig empfindlicher für *V. dahliae*. Dies zeigte sich zum Beispiel durch eine etwas stärkere Vergilbung von Blättern (Veronese et al., 2003).

Ob solche Unterschiede auch für die Infektion mit *V. longisporum* bestehen, ist nicht bekannt. Um dies zu prüfen wurden die beiden Ökotypen unter *Verticillium longisporum* Einfluss untersucht. Als Parameter wurden die Rosettenfläche, das Frischgewicht und der Chlorophyllgehalt gewählt. Der Infektionsverlauf wurde durch digitale Photos der einzelnen Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation dokumentiert (Abb. 4.10A). Mit einer speziell entwickelten Software zur Blattflächenanalyse konnten die Bilder einzeln ausgewertet und die projizierte Rosettenfläche vermessen werden (siehe 3.3.6). In Abbildung 4.10A verdeutlichen exemplarische Photos zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation von mock und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* Ökotypen Columbia und Landsberg erecta Symptome, die durch die *Verticillium*-Infektion hervorgerufen wurden, wie die Beeinflussung der Rosettengröße und Vergilbung. Die Analyse des Rosettenwachstums über einen zeitlichen Verlauf von 3 bis 35 Tagen, zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Kontrollen der Ökotypen Columbia und Landsberg (Abb. 4.10B und C). Die Rosettenfläche der mock-inokulierten Landsberg-Pflanzen war zum Endzeitpunkt der Untersuchung mit durchschnittlich 50 cm² im Vergleich zu den mock-inokulierten Columbia Pflanzen mit durchschnittlich 76 cm² deutlich kleiner. Schon 14 Tage nach Inokulation war der Unterschied zwischen Rosettengrößen der Ökotypen Columbia und Landsberg signifikant.

In Abbildung 4.10B und 4.10C sind die Blattflächen der Rosetten von mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* im Vergleich dargestellt. Abbildung 4.10B zeigt den Einfluss von *Verticillium longisporum* auf die Rosettengröße des Ökotyps Columbia im Infektionsverlauf. Ab 21 Tage nach Inokulation waren die Unterschiede zwischen den Blattflächen der *Verticillium*-inokulierten und der mock-inokulierten Pflanzen signifikant unterschiedlich. Zum gleichen Zeitpunkt zeigte sich auch beim Ökotypen Landsberg eine signifikante Reduktion der Blattfläche von *Verticillium*-inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollpflanzen (Abb. 4.10C).

Um zu prüfen, ob die durch *V. longisporum* verursachte Stauchung im Vergleich zur Kontrollbehandlung bei den beiden Ökotypen unterschiedlich stark ausgeprägt war, wurde die relative Stauchung als Verhältnis von VL43/mock bestimmt (Abb. 4.11). Diese Analyse ergab keine durch die Infektion hervorgerufenen Unterschiede zwischen den beiden Ökotypen.

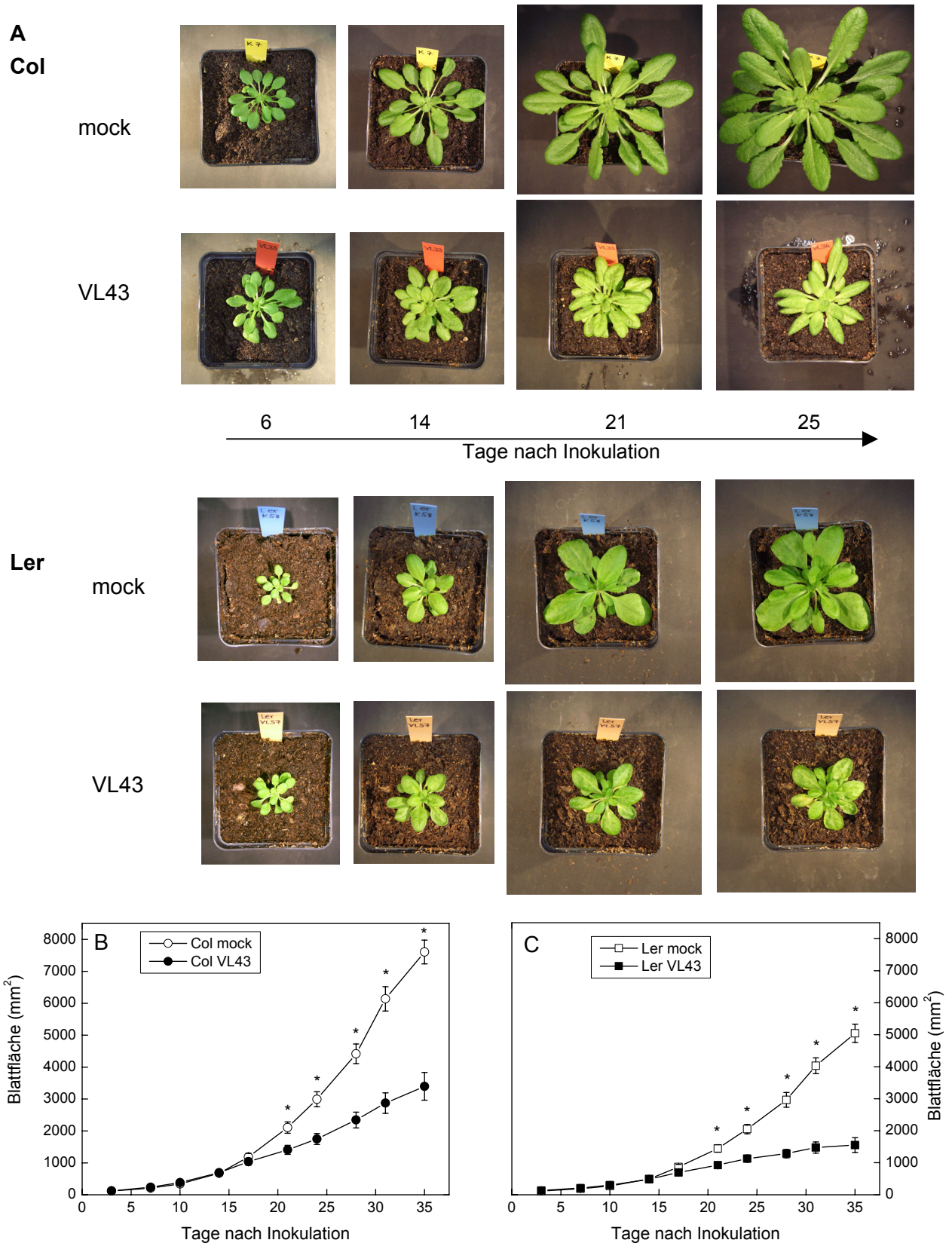


Abb. 4.10: Entwicklung der Rosettenfläche im Infektionsverlauf. (A) Repräsentative Bilder der mock- und *V. longisporum*-inokulierten *Arabidopsis* Ökotypen Columbia (Col) und Landsberg erecta (Ler) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation. Projizierte Blattfläche der Rosetten der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen (B) Columbia (Col) und (C) Landsberg erecta (Ler). Zu jedem Zeitpunkt wurden $n = 20$ Photos pro Variante analysiert (\pm SE). Werte mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* inokulierten *Arabidopsis* (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

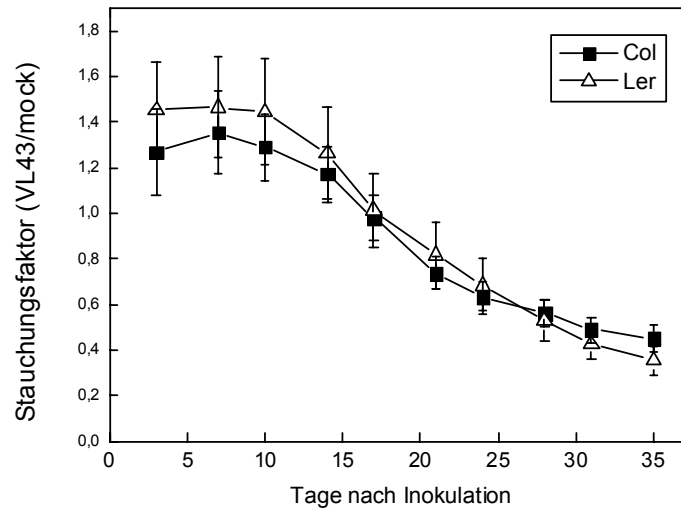


Abb. 4.11: Stauchungsfaktoren (VL43/mock) der *Arabidopsis* Ökotypen Columbia (Col) und Landsberg (Ler) unter Einfluss von *Verticillium longisporum* ($n = 20 \pm SE$).

Weniger deutlich als bei der projizierten Blattflächenanalyse waren die Unterschiede zwischen den Ökotypen Columbia und Landsberg bei der Rosettenfrischmasse (Abb. 4.12). Nach 35 Tagen Wachstum hatten die Rosetten von Columbia Kontrollpflanzen ein durchschnittliches Gewicht von 3,0 g und die von Landsberg 2,5 g. Dieser Unterschied war nicht signifikant.

Trotz früher eintretender Stauchung konnten erst am Versuchsende deutliche Veränderungen der Frischmasse nachgewiesen werden. Die Frischmasse der *Verticillium*-infizierten war im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen beim Ökotyp Columbia 35 Tage nach Inokulation um 42 % reduziert, beim Ökotyp Landsberg bei 56 %. Die beiden Ökotypen waren nicht signifikant verschieden.

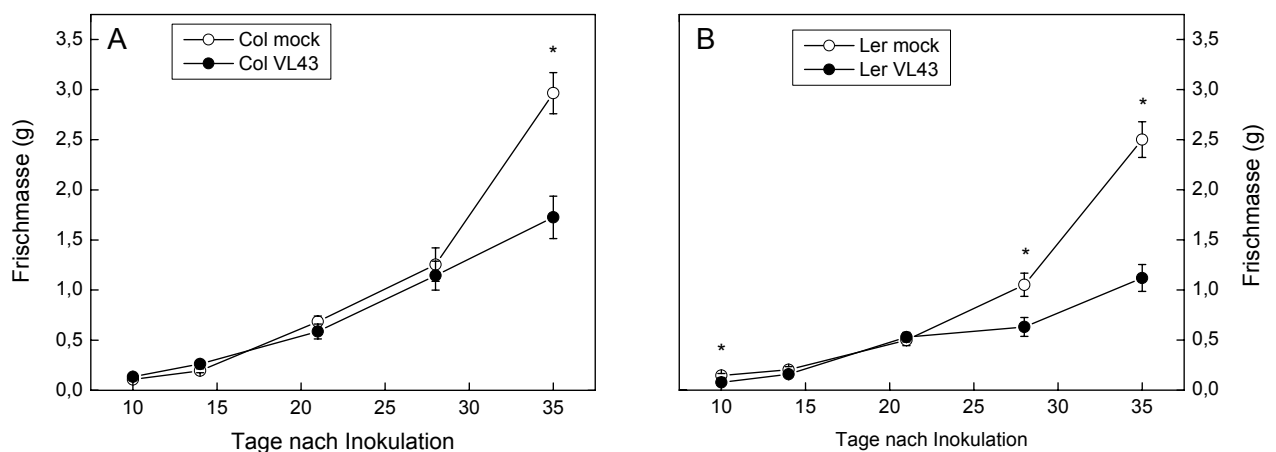


Abb. 4.12: Frischmasse der Rosetten im Infektionsverlauf. Die Rosettenfrischgewichte der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen (A) Columbia (Col) und (B) Landsberg erecta (Ler) wurden zwischen 10 und 35 Tagen nach Inokulation bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte von jeweils 20 Pflanzen ($\pm SE$), aus zwei unabhängigen Experimenten. Werte mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* inokulierten *Arabidopsis* (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

Als weiterer Parameter zur Analyse der Symptomentwicklung der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia und Landsberg unter *Verticillium longisporum* Einfluss diente der Chlorophyllgehalt. Die Messungen wurden über den gesamten Zeitraum bis 35 Tage nach Inokulation durchgeführt (Abb. 4.13). Ein Vergleich der mock-inokulierten Kontrollpflanzen der Ökotypen Landsberg und Columbia zeigte zunächst, dass die Chlorophyllgehalte der Kontrollen nicht verschieden waren, aber altersbedingt etwas abnahmen. Beide Ökotypen zeigten eine geringe, aber signifikante Abnahme des Chlorophyllgehalts in *Verticillium*-infizierten gegenüber mock-infizierten Pflanzen. 35 Tage nach Inokulation war der Chlorophyllgehalt des Ökotyps Columbia um 21 % und der des Ökotyps Landsberg erecta um 14 % gegenüber der jeweiligen Kontrolle gesunken.

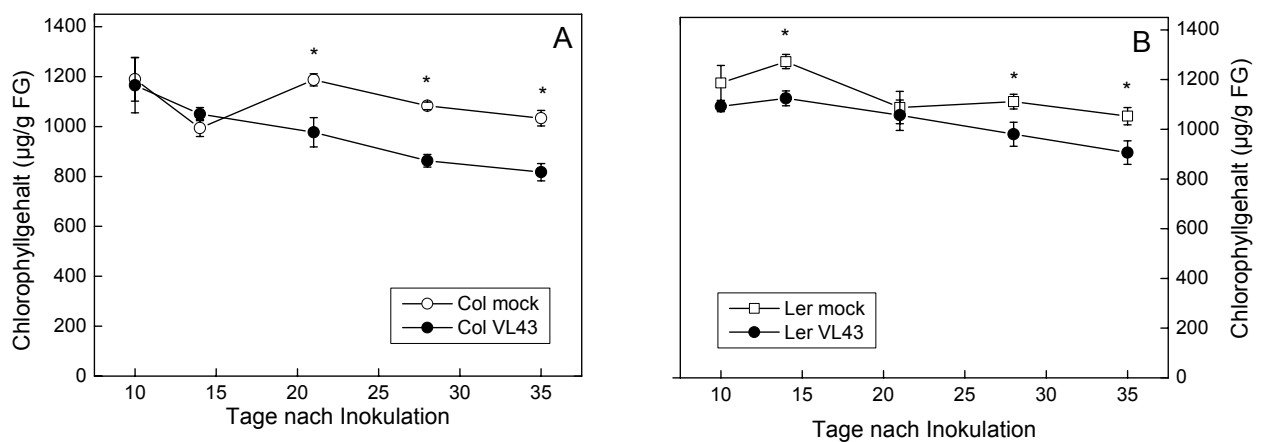


Abb. 4.13: Chlorophyllgehalt in Blättern von mock- und *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis thaliana* im Infektionsverlauf. Der Chlorophyllgehalt der Blätter der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen (A) Columbia (Col) und (B) Landsberg erecta (Ler) wurde spektrophotometrisch bestimmt und als Summe von Chlorophyll a und b dargestellt. Es wurden zwischen zwei und sieben Proben in Dreifachbestimmung analysiert (\pm SE). Werte mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* inokulierten *Arabidopsis* (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung, dass es zwar Unterschiede im Wachstum zwischen den beiden Ökotypen gab, aber im Hinblick auf *Verticillium longisporum* Infektion zeigte sich keiner der Ökotypen deutlich empfindlicher bzw. resistenter. Für weitere Experimente wurde der Ökotyp Columbia ausgewählt, da er bei gleicher Symptomausprägung mehr Biomasse bildete.

4.2.1.2 Untersuchung des *Arabidopsis thaliana* Ökotyps Columbia unter Lang- und Kurztagsbedingungen

Die meisten in der Literatur beschriebenen Untersuchungen mit *Verticillium*-Pilzen an *Arabidopsis thaliana* wurden unter Langtagsbedingungen, d.h. 16 h Licht/8 h Dunkel Zyklus, durchgeführt (Steventon et al., 2001; Veronese et al., 2003). Unter diesen Bedingungen bleiben die Pflanzen relativ klein, da sie schnell die Blühreife erreichen. Da für die geplanten

Untersuchungen des Apoplasten relativ viel Biomasse erforderlich war, wurde das Wachstum des Ökotyps Columbia unter Lang- und Kurztagsbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkel Zyklus) verglichen, um die optimalen Anzuchtbedingungen herauszufinden.

Die Analyse der projizierten Blattfläche über den Infektionsverlauf bis 27 Tage nach Inokulation zeigte eine deutliche Stauchung der Pflanzen unter *Verticillium*-Einfluss (Abb. 4.14). Diese Stauchung durch *Verticillium*-Infektion war unter Kurztagsbedingungen (Abb. 4.14A) wesentlich deutlicher als unter Langtagsbedingungen (Abb. 4.14B). Um zu prüfen, inwiefern die durch *V. longisporum* verursachte Stauchung relativ zur Kontrollbehandlung verändert war, wurde die Stauchung als Verhältnis von VL43/mock zum letzten Untersuchungszeitpunkt bestimmt. Unter Langtagsbedingungen betrug der Stauchungsfaktor 27 Tage nach Inokulation $0,64 \pm 0,09$ und unter Kurztagsbedingungen $0,26 \pm 0,06$. Dieser Unterschied war im T-Test signifikant ($p = 0,0018$).

Unter Langtagsbedingungen (Abb. 4.14B) zeigte sich in den ersten zwei Wochen nach Inokulation eine stärkere Zunahme der Blattfläche als unter Kurztagsbedingungen (Abb. 4.14A). Danach nahm die Blattfläche unter Langtagsbedingungen kaum noch zu und betrug bei den mock-inokulierten Kontrollen nach 27 Tagen im Schnitt 12 cm^2 (Abb. 4.14B). Die Blattfläche der mock- inokulierten *Arabidopsis* unter Kurztagsbedingungen nahm zwischen 10 und 27 Tagen Wachstum deutlich zu und betrug beim Versuchsende durchschnittlich 23 cm^2 (Abb. 4.14A).

Eine Bonitur der Pflanzen ergab, dass alle unter Langtagsbedingungen gewachsenen *Arabidopsis* 7 Tage nach Inokulation Blütenansätze gebildet hatten. Unter Kurztagsbedingungen gewachsene *Arabidopsis* zeigten im gesamten Untersuchungszeitraum keine Blütenbildung.

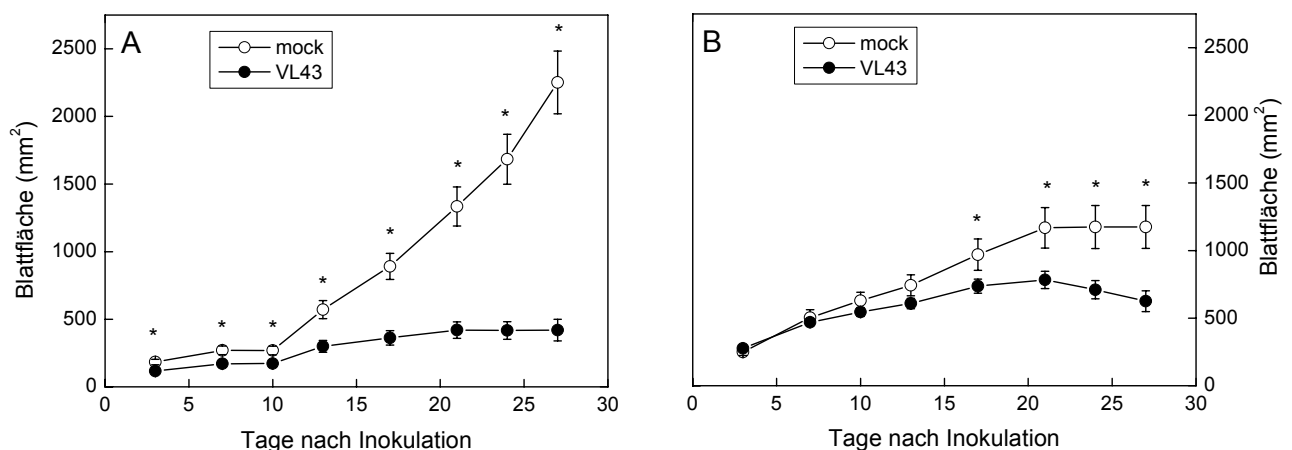


Abb. 4.14: Entwicklung der Rosettenfläche im Infektionsverlauf bei Anzucht von *Arabidopsis thaliana* unter Kurztagsbedingungen (A) oder unter Langtagsbedingungen (B). Dargestellt ist jeweils der Mittelwert der projizierten Blattfläche durch Auswertung von Photos ($n = 12$ bis $27 \pm \text{SE}$). Werte mit einem Stern waren beim Vergleich von mock (weiße Symbole) und *V. longisporum* inokulierten *Arabidopsis* (schwarze Symbole) im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

Am Versuchsende wurden die Pflanzen geerntet und ihre Frischmasse bestimmt. Dabei ergab sich sowohl unter Lang- als auch unter Kurztagsbedingungen eine signifikante Reduktion der Frischmasse unter *Verticillium*-Einfluss (Abb. 4.15). Diese war aber unter Kurztagsbedingungen wesentlich ausgeprägter.

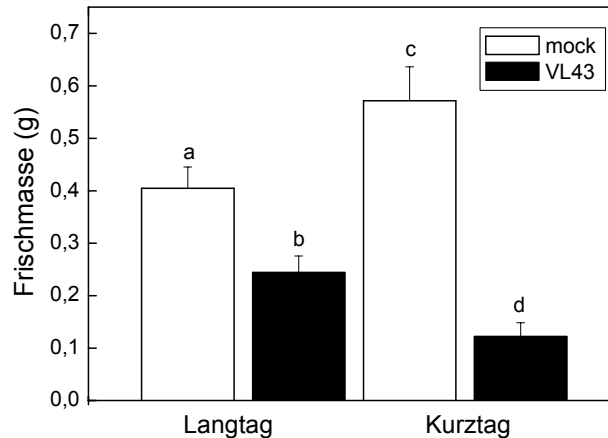


Abb. 4.15: Die Frischmasse der *Arabidopsis thaliana* Rosetten 28 Tage nach Inokulation. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte von 12 bis 27 Pflanzen (\pm SE). Die Pflanzen waren unter Lang- bzw. Kurztagsbedingungen gewachsen. Verschiedenen Buchstaben deuten auf signifikante Unterschiede hin.

Zusammenfassend gesehen, war die Biomasse unter Kurztagsbedingungen deutlich höher als unter Langtagsbedingungen. Die *Verticillium*-induzierte Reduktion der Rosettenfläche und der Frischmasse war unter Kurztagsbedingungen wesentlich stärker ausgeprägt als unter Langtagsbedingungen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für weiterführende Experimente Kurztagsbedingungen für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* gewählt.

4.2.2 Krankheitssymptome und Nährstoffversorgung von *Arabidopsis thaliana* im Infektionsverlauf

4.2.2.1 Einfluss von *Verticillium longisporum* auf den Phänotyp von *Arabidopsis*

Die ersten *Verticillium*-induzierten Krankheitssymptome an *Arabidopsis* zeigten sich im allgemeinen 10-14 Tage nach Inokulation. Zu den frühen Symptomen zählten gelbe Blattadern, verkürzte Blattstiele und eine veränderte Morphologie der Blätter (Abb. 4.10A). Die Blätter der *Verticillium*-infizierten Pflanzen waren kleiner als die der mock-inokulierten Kontrollen und wiesen häufig eine nach unten gewölbte Form auf. 25 Tage nach Inokulation zeigten ca. 90 % der Pflanzen Symptome. Die späten Symptome waren ein insgesamt verkümmertes, meist kugelförmiges Wachstum der Pflanzen und die zunehmende Vergilbung von Blättern (Abb. 4.10A). Ein häufig auftretendes Phänomen der *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* war ein asymmetrisches Wachstum, wobei eine Hälfte der Pflanze einen gestauchten Phänotyp zeigte, während die andere Hälfte weiterhin größere Blätter bildete (Abb. 4.16).

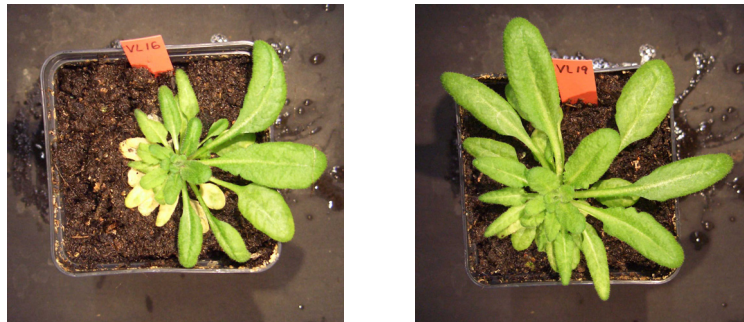


Abb. 4.16: Exemplarische Bilder von *Verticillium longisporum* infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen mit asymmetrischem Phänotyp 25 Tage nach Inokulation.

Zur genaueren Charakterisierung der Krankheitssymptome wurden weitere Parameter gemessen. Da zu den Symptomen auch Vergilbungen von Blättern zählten und bereits gezeigt wurde, dass die *Verticillium*-Infektion Einfluss auf den Chlorophyllgehalt (Abb. 4.13) hat, wurde zusätzlich die Photosynthese-Aktivität untersucht.

Um den Einfluss der *Verticillium*-Infektion auf die Chlorophyllfluoreszenz und damit die Aktivität von Photosystem II im zeitlichen Verlauf zu charakterisieren, wurden bis zu sieben Wochen nach Inokulation Messungen an licht- und dunkeladaptierten Pflanzen durchgeführt (siehe 3.3.1). Sowohl im Licht als auch im Dunkeln konnten geringe, aber teilweise signifikante Unterschiede zwischen mock und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen gemessen werden (Abb. 4.17). Signifikante Unterschiede zeigten sich bei den dunkeladaptierten Pflanzen vornehmlich zu den frühen Messzeitpunkten 14 bis 21 Tage nach Inokulation (Abb. 4.17A). Die Messung an den *Verticillium*-infizierten lichtadaptierten *Arabidopsis* zeigte über den gesamten Messzeitraum eine Reduktion der Quantenausbeute gegenüber den mock-inokulierten Kontrollpflanzen, wobei die Differenz zwischen mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen im Verlauf größer wurde. Die Messzeitpunkte 21, 30 und 33 Tage nach Inokulation waren im T-Test signifikant unterschiedlich (Abb. 4.17B).

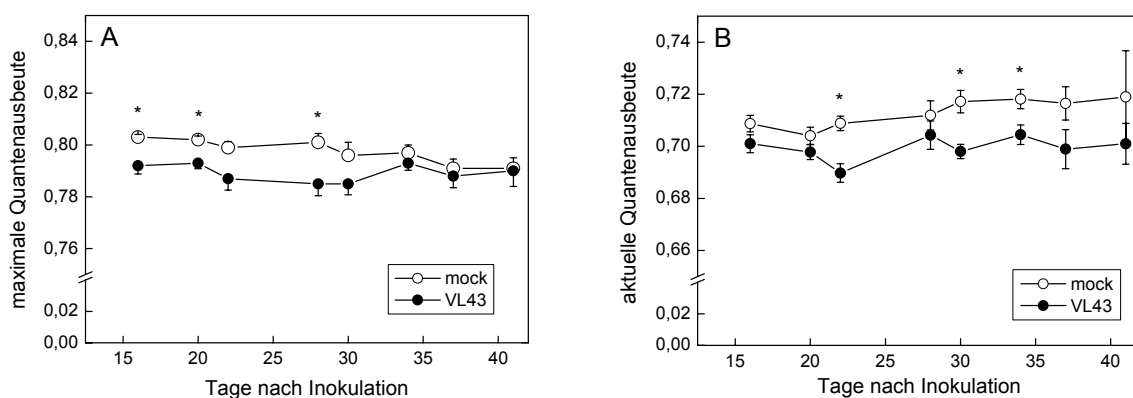


Abb. 4.17: Einfluss von *Verticillium longisporum* VL43 auf die Aktivität von Photosystem II. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde bei 20 °C und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit als maximale photosynthetische Quantenausbeute an dunkel-adaptierten Blättern (A) und als aktuelle photosynthetische Quantenausbeute im Licht bei 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B) gemessen. Vollständig entwickelte Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Inokulation untersucht. Die Anzahl der gemessenen Pflanzen reduzierte sich kontinuierlich von 40 Pflanzen zu Beginn der Messungen auf 6 Pflanzen zum Zeitpunkt 41 Tage nach Inokulation, da die Pflanzen für andere Analysen geerntet wurden. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

4.2.2.2 Einfluss von *Verticillium longisporum* auf die Nährelementsituation in *Arabidopsis thaliana* Blättern

Um zu prüfen, ob Nährstoffmangel an den Krankheitssymptomen beteiligt ist, wurde der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalt (siehe 3.3.7) der *Arabidopsis* Blätter im Verlauf der Infektion mit *Verticillium longisporum* untersucht. Bis 28 Tage nach Inokulation wurden keine Unterschiede zwischen mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen gemessen. Der Kohlenstoffgehalt zeigte 35 Tage nach Inokulation eine leichte, aber signifikante Reduktion im T-Test ($p \leq 0,05$) um 7,8 % in den Blättern der *Verticillium*-infizierten Pflanzen. Ebenfalls nur eine geringfügige, aber signifikante Reduktion um 2,3 % war beim Stickstoffgehalt 28 Tage nach Inokulation bei den *Verticillium*-infizierten Pflanzen nachzuweisen. Das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff blieb über den gesamten Messzeitraum stabil (Abb. 4.18C).

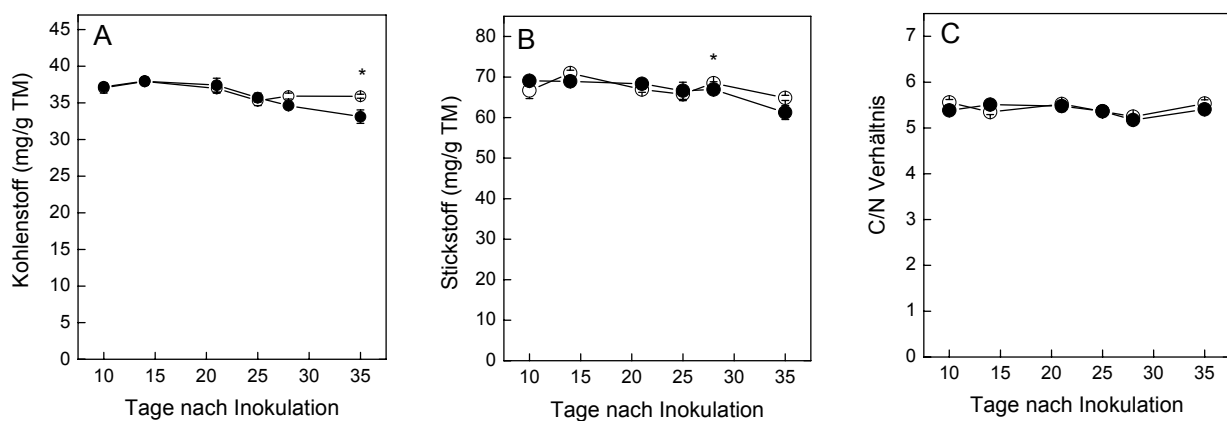


Abb. 4.18: Einfluss von *V. longisporum* auf den Kohlenstoff- (A) und den Stickstoffgehalt (B) und das Kohlenstoff/Stickstoff C/N Verhältnis (C) in *Arabidopsis thaliana* Blättern zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Inokulation. Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Proben mit Standardfehler. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

Um weitere Nährelemente zu untersuchen, wurden ICP-Analysen an Blattmaterial von mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* durchgeführt (siehe 3.3.8). Dabei wurde der Gehalt der Hauptnährelemente Phosphor, Schwefel, Calcium, Kalium und Magnesium bestimmt sowie der Spurenelemente Mangan und Eisen. Schwefel und Kalium zeigten zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen (Abb. 4.19A und B). Magnesium war bei den *Verticillium*-infizierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen zum Zeitpunkt 21 Tage nach Inokulation signifikant reduziert; allerdings setzte sich dieser Trend zu späteren Zeitpunkten nicht fort (Abb. 4.19C). Die beiden Elemente Phosphor und Calcium wiesen in den *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* ab 21 bzw. 28 Tage nach Inokulation eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollen auf (Abb. 4.19D und E). Bei den Spurenelementen gab es sowohl bei den mock- als auch bei den *Verticillium*-infizierten Pflanzen Schwankungen, es konnte aber über den Untersuchungszeitraum kein eindeutiger Unterschied zwischen mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 4.19F und G).

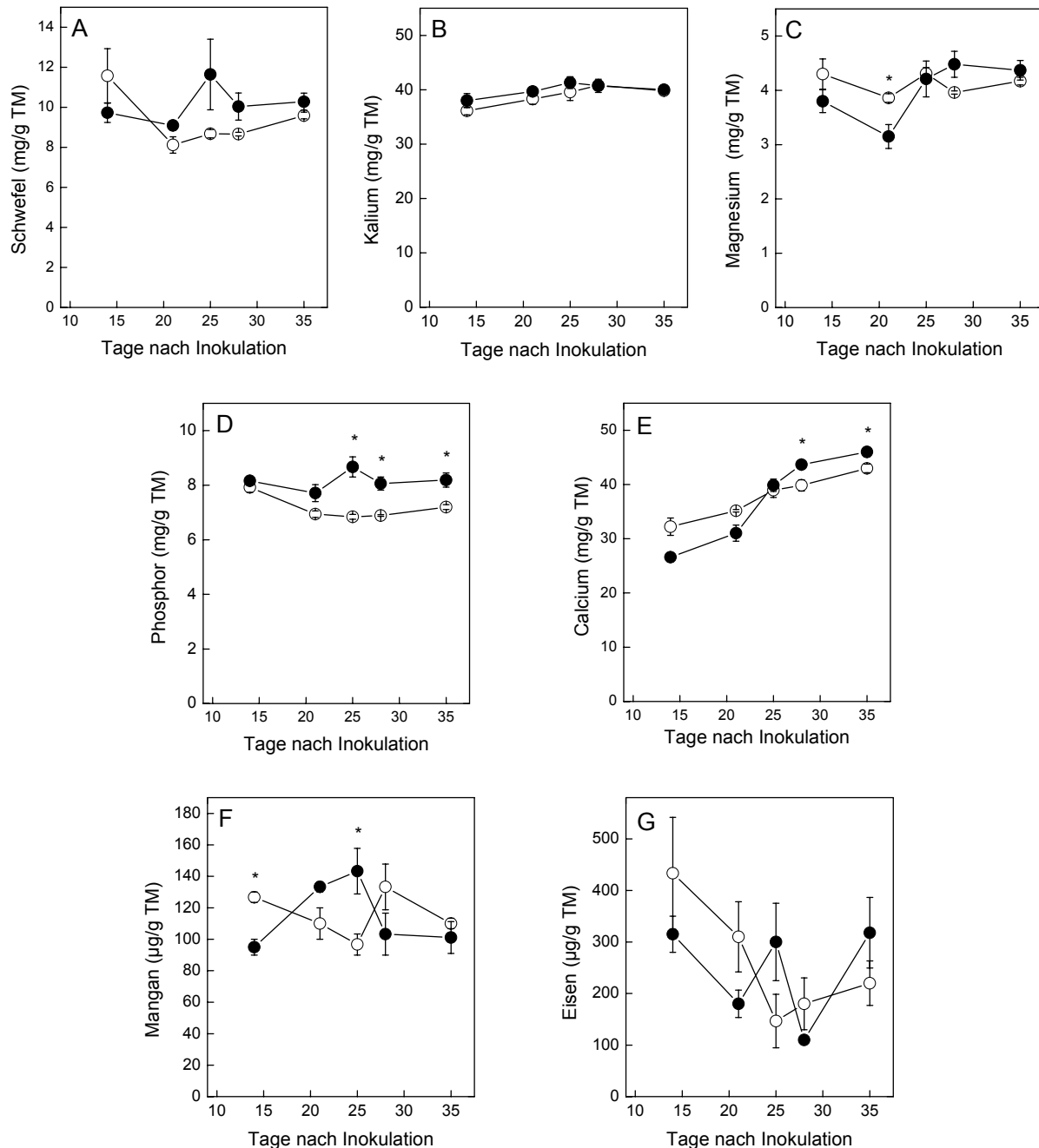


Abb. 4.19: Elementkonzentrationen von Schwefel (A), Kalium (B), Magnesium (C), Phosphor (D), Calcium (E), Mangan (F) und Eisen (G) in *V. longisporum* (schwarze Symbole) im Vergleich zu mock-inokulierten *Arabidopsis* (weiße Symbole). Die Werte repräsentieren Mittelwerte aus jeweils drei unabhängigen Proben (beim Zeitpunkt 35 Tage nach Inokulation acht Proben) mit Standardfehler. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

4.2.2.3 Infektionsnachweis mittels quantitativer PCR

Zur Überprüfung der Infektion, wurde eine quantitative *real time* PCR-Analyse durchgeführt. Mit dieser Methode konnte die Menge an *Verticillium*-DNA bestimmt werden. In Blättern *Verticillium*-infizierter *Arabidopsis* wurden zum Erntezeitpunkt nur sehr geringe Mengen *Verticillium*-DNA nachgewiesen (Abb. 4.20A). Im Mittel betrug die *Verticillium*-DNA Menge in den untersuchten *Arabidopsis*-Blätter 0,7 ng/g Frischmasse. In Blattstielen von *Verticillium*-

infierten *Arabidopsis* konnten 25 Tage nach Inokulation im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollen signifikante Mengen an *Verticillium*-DNA nachgewiesen werden (Abb. 4.20B). Im Mittel wurden 12 ng *Verticillium*-DNA pro Gramm Blattstängelmaterial in den *Verticillium*-infierten Pflanzen nachgewiesen. Die maximal nachgewiesene Menge an *Verticillium*-DNA betrug 107 ng pro Gramm Blattstängelmaterial. Die Ergebnisse zeigen, dass der Pilz 25 Tage nach Inokulation aus dem Wurzelxylem kommend, zum Teil bis in die Blattstängel, aber größtenteils noch nicht in das Mesophyll vorgedrungen ist. In Abbildung 4.20C ist die Pilzmenge in den Blattstängeln in Relation zur Rosettenfläche dargestellt. Es sollte geprüft werden, ob eine Korrelation zwischen Symptomentwicklung und Pilzmenge in der Pflanze bestand. Die mock-inokulierten Kontrollen wiesen Rosettengrößen im Bereich von 40 bis 110 cm² auf und enthielten keine signifikanten Mengen an Pilz-DNA. Die Rosettengrößen der *Verticillium*-infierten Pflanzen lagen zwischen 10 und 65 cm². Eine lineare Korrelation zwischen Pilzmenge und Rosettengröße konnte nicht beobachtet werden, aber eine Exponentialfunktion durch alle Punkte ergab eine schwache Korrelation (Abb. 4.20C). Erstaunlich war, dass auch in sehr kleinen verkümmerten Pflanzen teilweise wenig oder gar keine *Verticillium*-DNA nachweisbar war (Abb. 4.20C).

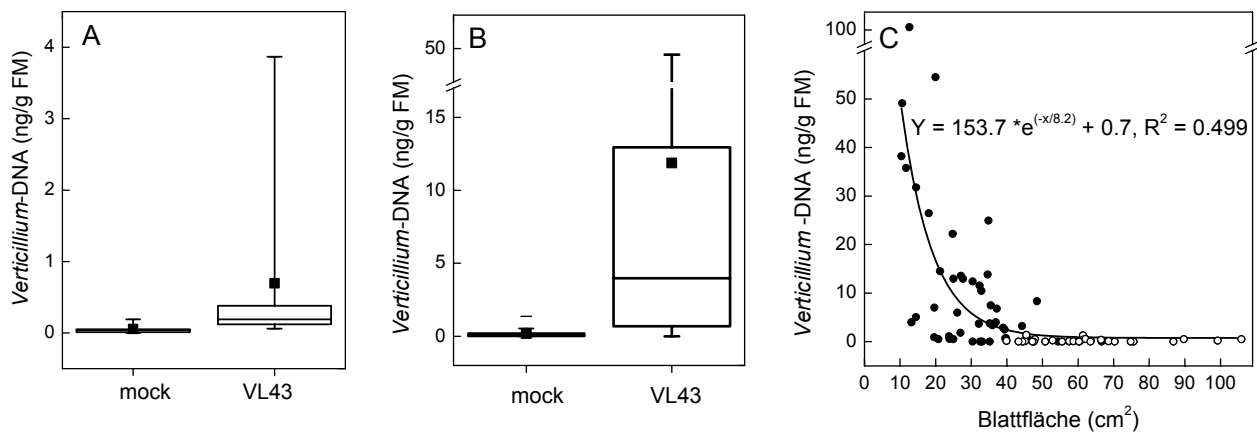


Abb. 4.20: Menge an *Verticillium*-DNA in Blättern (A) und in Blattstängeln (B) von mock- und *Verticillium* (VL43)-infierten *Arabidopsis*-Pflanzen. Da die Werte nicht normalverteilt waren, wurden die Ergebnisse in Form von Box-Plots dargestellt. Die Boxen repräsentieren (A) $n_{(\text{mock})} = 8$, $n_{(\text{VL43})} = 10$ und (B) $n_{(\text{mock})} = 36$, $n_{(\text{VL43})} = 48$ Messungen. Innerhalb einer Box liegen 50 % der Werte, die horizontale Linie stellt den Median-Wert und das schwarze Symbol den Mittelwert dar, die Gesamtverteilung wird durch die vertikalen Linien verdeutlicht. (C) Pilzmenge in Stängeln in Relation zur Blattfläche. Die Blattfläche von mock- (weiße Symbole) und *V. longisporum*-inokulierten *Arabidopsis* (schwarze Symbole) wurde 25 Tage nach Inokulation gemessen. Die Blattstiele der einzelnen Pflanzen ($n = 84$) wurden 25 Tage nach Inokulation geerntet und mittels quantitativer real time PCR die Menge an *Verticillium*-DNA bestimmt. Die Daten wurden durch eine abfallende Exponentialfunktion angepasst.

4.2.2.4 Ökophysiologische Charakterisierung *Verticillium longisporum* infizierter *Arabidopsis thaliana*

Für weiterführende Experimente wurde der Zeitpunkt 25 Tage nach Inokulation ausgewählt, da die *Arabidopsis* Pflanzen zu diesem Zeitpunkt genügend Blattmaterial gebildet hatten, gleichzeitig aber auch eindeutige Infektionssymptome aufwiesen. Außerdem fingen die Pflanzen 25 Tage nach Inokulation noch nicht an zu Blühen und die Kontrollen zeigten noch keine Seneszenzerscheinungen. In Tabelle 4.5 sind einige bereits erwähnte und einige weitere ökophysiologische Parameter aufgelistet, die 25 Tage nach Infektion zur Charakterisierung der Pflanzen gemessen wurden. Während die Rosettenfläche um mehr als die Hälfte vermindert war, betrug die Frischmassenreduktion nur ca. 40 %. Dieser Unterschied war eventuell darauf zurückzuführen, dass übereinanderliegende Blätter bei der Analyse der projizierten Blattfläche nicht erfasst wurden. Der relative Anteil der Trockenmasse der Rosetten, berechnet aus Frisch- und Trockenmasse betrug ungefähr 7 % und war bei mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen nicht signifikant verschieden. Der Wassergehalt der Blätter war also nicht unterschiedlich.

Neben dem Chlorophyllgehalt war auch der Carotinoidgehalt in den *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* signifikant niedriger (Tab. 4.5). Auch die Aktivität von Photosystem II war geringer. Zur Überprüfung, ob 25 Tage nach Infektion Membranen durch den Pilz geschädigt waren, wurde die Elektrolytleitfähigkeit aus gestanzten Blattscheiben gemessen (siehe 3.3.2). Dazu wurden die Blattscheiben 24 Stunden in ddH₂O inkubiert und anschließend wurde der Austritt von Elektrolyten gemessen. Da sich bei den *Verticillium*-infizierten Pflanzen keine erhöhte Leitfähigkeit ergab, wurde geschlossen, dass die Membranen 25 Tage nach Inokulation intakt waren. Der osmotische Druck in den *Verticillium*-infizierten Pflanzen war geringfügig niedriger im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollen.

Tab. 4.5: *Verticillium longisporum* induzierte Krankheitssymptome in *A. thaliana*. Die Messungen wurden 25±3 Tage nach Inokulation durchgeführt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte (± SE) der angegebenen Anzahl von Pflanzen (n). Werte mit $p \leq 0,05$ zeigen signifikante Unterschiede zwischen mock-inokulierten und *Verticillium longisporum* (VL43)-infizierten Pflanzen.

Parameter	n	mock	VL43	p-Wert
Rosettenfläche (mm ² /Pflanze)	30	6402 ± 276	2750 ± 181	≤ 0,0001
Frischmasse (g/Pflanze)	15	1,09 ± 0,08	0,66 ± 0,09	0,0018
Trockenmasse (%)	≥ 9	6,89 ± 0,33	7,33 ± 0,23	0,2807
Chlorophyllgehalt (µg/g FM)	18	1135 ± 21	1005 ± 28	0,0008
Carotinoidgehalt (µg/g FM)	18	271 ± 6	245 ± 6	0,0058
Φ (PSII), dunkel	≥ 25	0,801 ± 0,003	0,785 ± 0,005	0,0181
Elektrolytleitfähigkeit (%)	5	15,5 ± 0,9	16,2 ± 0,9	0,6367
Osmotischer Druck (MPa)	8	0,893 ± 0,014	0,843 ± 0,018	0,0461

4.2.2.5 Kontaminationsbestimmung in der AWF von *Arabidopsis thaliana*

Da es 25 Tage nach Inokulation keine Hinweise auf erhebliche Schäden durch *Verticillium* gab, wurde geprüft, ob dieser Zeitpunkt zur Gewinnung von apoplastischer Waschflüssigkeit (AWF) geeignet war. Dazu wurden AWF aus mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen mittels Infiltration und Zentrifugation gewonnen (siehe 3.4.1). Dabei kann es bei Beschädigung der Membranen zu Kontaminationen aus dem Symplasten kommen. Deshalb wurde die Aktivität des Enzyms Malatdehydrogenase (MDH) als Marker für symplastische Kontamination in den gewonnenen apoplastischen Extrakten bestimmt und mit der MDH-Aktivität in Gesamtblattextrakten verglichen.

In den apoplastischen Waschflüssigkeiten lag die MDH-Aktivität bei 0,007 nkat pro Gramm Frischmasse, in den Gesamtblattextrakten bei durchschnittlich 231 nkat pro Gramm Frischmasse, was einer Kontamination von 0,003 % entsprach und damit sehr gering war. Zwischen den ermittelten Kontaminationswerten für mock- und *Verticillium*-infizierte Pflanzen gab es keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,8481$).

Tab. 4.6: MDH-Aktivität in Gesamtblattextrakten und AWF aus Blättern von mock- und *Verticillium longisporum* VL43 inokulierten *Arabidopsis*. Die Pflanzen wurden 25 Tage nach Inokulation geerntet, für die AWF-Gewinnung wurden pro Probe Blätter von 10 *Arabidopsis* Pflanzen zusammengefasst. Pro Behandlung wurden fünf unabhängige Proben analysiert. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardfehler.

Behandlung	Extrakt	MDH Aktivität (nkat/g FM)	Kontamination %
mock	Gesamtblatt	242,1 ± 29,9	-
	AWF	0,007 ± 0,013	0,0030
VL43	Gesamtblatt	220,6 ± 59,7	-
	AWF	0,007 ± 0,004	0,0032

4.2.3 Charakterisierung extrazellulärer Proteinmuster

4.2.3.1 Vergleich von Proteinmustern in apoplastischen und Gesamtblattextrakten

25 Tage nach Inokulation wurden apoplastische Waschflüssigkeiten (AWF) und Gesamtblattextrakte aus mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* gewonnen, über Gelfiltration (siehe 3.4.4) gereinigt und der Proteingehalt bestimmt (Tab. 4.7). Jede Probe zur AWF-Gewinnung bestand aus einem Pool von Blättern von ca. 10 Pflanzen. Der Proteingehalt der Gesamtblattextrakte lag bei 12,5 mg pro Gramm Frischmasse und unterschied sich nicht zwischen mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen. In der AWF der betrug der Proteingehalt zwischen 17,2 µg und 21,0 µg pro Gramm Frischmasse und unterschied sich nicht zwischen mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis*.

Die Proteinextrakte wurden nach ihrem Molekulargewicht (MW) elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen mit einem Gradienten von 7,5-20 % Acrylamid aufgetrennt (siehe 3.5.5) und anschließend mit Silber gefärbt (siehe 3.5.8). Die Proteinmuster aus Gesamtblattextrakten von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen unterschieden sich nicht (Abb. 4.21). Der Vergleich der Bandenmuster der AWF von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen zeigte dagegen einige deutliche Unterschiede im Molekulargewichtsbereich unter 45 kDa (Abb. 4.21, rote Pfeile).

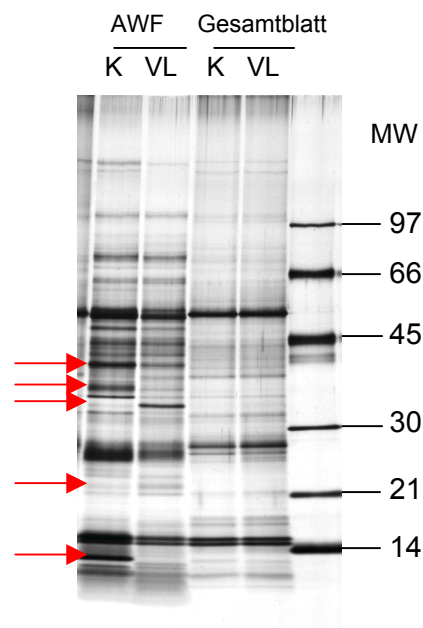


Abb. 4.21: Proteinmuster einer elektrophoretische Auftrennung von je 1,8 µg Proteinen aus AWF und Gesamtblattextrakten von mock-inokulierten Kontrollpflanzen (K) und *V. longisporum*-infizierten Pflanzen (VL) im PAA-Gradientengel. Die Extrakte wurden 25 Tage nach Inokulation gewonnen. Die Pfeile zeigen Proteinbanden, die sich in der AWF von mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen unterscheiden. Die Molekulargewichte (MW) des Proteinstandards sind neben dem Gelbild angegeben.

4.2.3.2 Zweidimensionale Auftrennung apoplastischer *Arabidopsis thaliana* Proteine

Nachdem die Auftrennung der apoplastischen Proteine im PAA-Gradientengel Unterschiede im Bandenmuster zwischen mock- und *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis* aufwies, wurden zweidimensionale Auftrennungen zur näheren Charakterisierung durchgeführt. Dabei wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und ihrem Molekulargewicht (MW) aufgetrennt. Abbildung 4.22 zeigt die zweidimensionale Separation von je 80 µg apoplastischen Proteinen aus mock- und *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis*. Pro Variante wurden sechs mit Silbernitrat gefärbte (siehe 3.5.8) Gele analysiert. Zusätzlich wurde jeweils ein präparatives Gel mit möglichst viel Protein geladen und für massenspektrometrische Analysen mit CBB gefärbt (siehe 3.5.8). Jeweils sechs Proben konnten parallel aufgetrennt werden, daher wurden zunächst jeweils drei unabhängige Proben von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen aus einem ersten Experiment untersucht. In einem zweiten Durchgang wurden dann noch einmal jeweils drei unabhängige Proben untersucht, die aus einem weiteren Experiment stammten. So ergaben sich pro Variante sechs biologische Wiederholungen für die statistische Auswertung. Der Vergleich aller silbergefärbten Gele mit der Proteomweaver Software (siehe 3.5.9) ergab eine durchschnittliche Anzahl von 217 Spots in den Silber-gefärbten Gelen. Die Anzahl der Spots unterschied sich nicht signifikant zwischen mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen (Tab. 4.7).

Tab. 4.7: Einfluss von *Verticillium longisporum* Infektion auf den Proteingehalt und die Anzahl von Proteinspots nach 2 D Separation von AWF. Die Pflanzen wurde für die Analysen 25 Tage nach Inokulation geerntet. Die Proteinspots wurden mittels Proteomweaver Software in silbergefärbten Gelen analysiert. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte mit Standardfehler.

Parameter	n	mock	VL43	p-Wert
Gesamtblattprotein (mg/g FG)	5	12,5 ± 1,2	12,3 ± 0,5	0,9192
AWF-Protein (µg/g FG)	5	17,2 ± 1,0	21,0 ± 2,4	0,1785
Proteinspots AWF (pro Gel)	6	214 ± 10	220 ± 11	0,7389

Abbildung 4.22 zeigt repräsentative Gele mit apoplastischen Proteinen von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen aus den beiden unabhängigen Experimenten. Zunächst wurde versucht, möglichst viele Spots aus den Kontrollgelen der mock-inokulierten *Arabidopsis* zu identifizieren (siehe 3.5.10). Spots, die aus den präparativen CBB-gefärbten Gelen identifiziert werden konnten, sind mit Nummern markiert und in den Tabellen 4.8 und 4.9 aufgelistet. Die Identifizierung gelang bei 39 von 101 im Coomassie-gefärbten Gel auftretenden Proteinspots (Tab. 4.8), von denen einige Isoformen der gleichen Proteine darstellten, so dass sich die Gesamtzahl unterschiedlicher identifizierter Proteine auf 30 reduzierte. Darunter waren proteolytische Enzyme wie die Subtilisin-ähnliche Serin- (At5g67360) und die Aspartylproteasen (At5g10760, At1g09750), sowie Proteine mit Homologie zu Lektin (At1g78830, At3g16530, At3g15356). Außerdem konnten

möglicherweise in Abwehrreaktionen involvierte Proteine wie ein Thaumatin ähnliche Protein PR5 (At1g75040), eine β -1,3-Glucanase (PR2; At3g57260), eine Chitinase (At2g43590), eine Peroxidase (At5g06720) und ein Endopeptidase Hemmer (At1g17860) identifiziert werden. Die genannten Proteine und noch einige weitere wiesen laut Überprüfung mit TargetP (siehe 3.5.11) mit einer sehr hohen Vorhersagewahrscheinlichkeit (RC1 oder RC2) ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg auf. Ebenfalls wurden zwei Proteine (At1g33640 und At3g08030) mit unbekannter Funktion nachgewiesen.

Bei den Proteinen Rubisco (AtCg00490), Sedoheptulose-bisphosphatase (At3g55800), Sauerstoffbindeprotein (At5g66570) und Sauerstoffbindeprotein 2 (PSBP, At1g06680), die normalerweise im Chloroplasten lokalisiert sind, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Kontaminationen, die zwar sehr gering waren, aber nicht vollständig vermieden werden konnten.

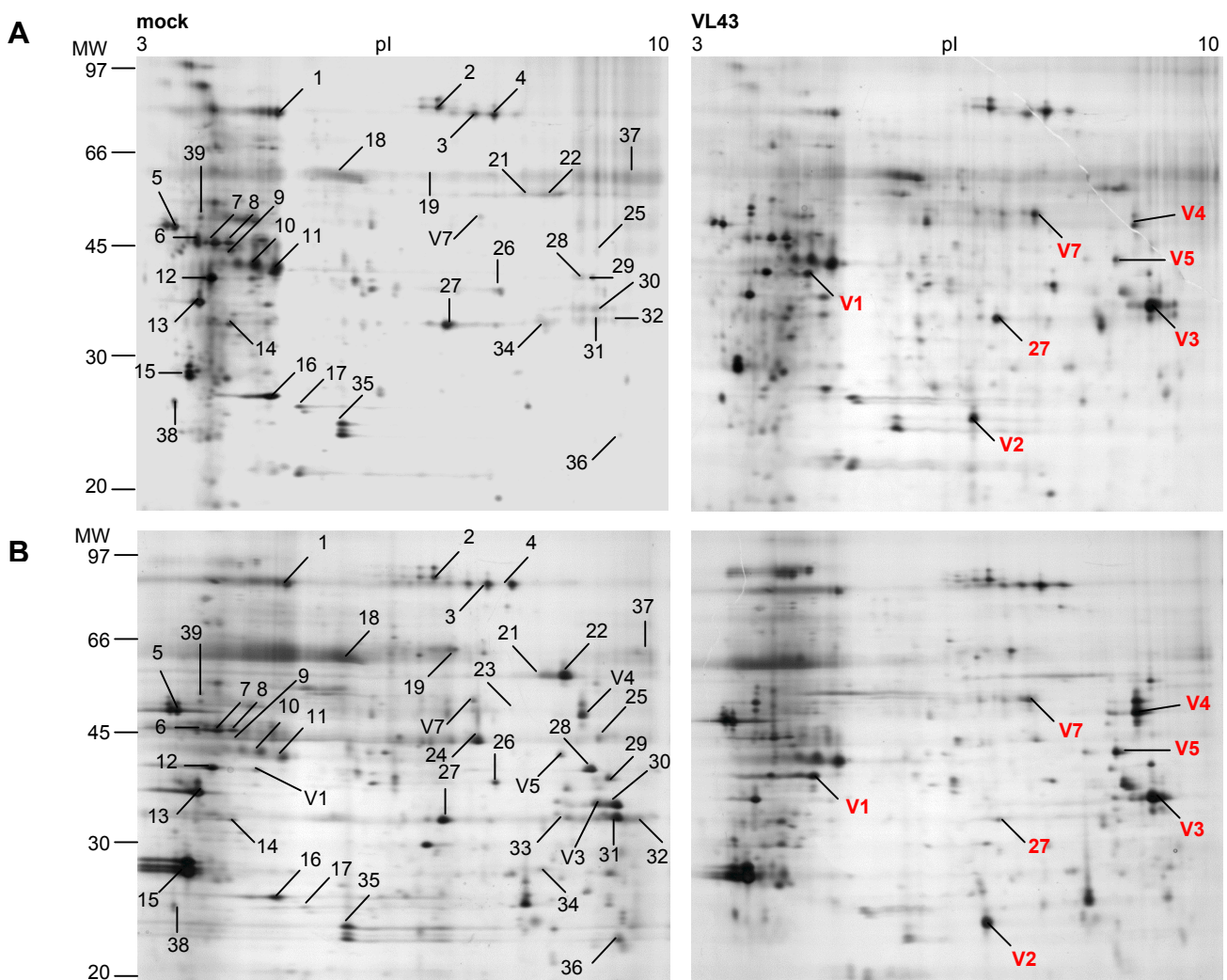


Abb. 4.22: Repräsentative Proteinmuster apoplastischer Extrakte aus *Arabidopsis thaliana* Blättern. Für die zweidimensionale Separation wurden je 80 μ g Protein, gewonnen aus einem Pool von ca. 10 Pflanzen, eingesetzt. Die Extrakte stammten aus zwei unabhängigen Experimenten (A und B) 25 Tage nach mock oder *V. longisporum* (VL43) Inokulation und wurden mit Silber gefärbt. Die Zahlen weisen auf Proteinspots hin, die mittels ESI-LC-MS aus einem präparativen Coomassie-Gel identifiziert wurden. Die eingezeichneten Molekulargewichte (MW) wurden durch einen mitgeführten Proteinstandard ermittelt, pI 3 und 10 markieren die Grenzen der isoelektrischen Fokussierung.

Tab. 4.8: Liste der in apoplastischen Waschflüssigkeiten von *Arabidopsis* Blättern identifizierten Proteine. AWF aus mock-inokulierten Pflanzen wurde durch 2 D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Die Spots wurden ausgestochen, mit Trypsin verdaut und mittels ESI-LC-MS mit anschließender Mascot-Suche in der NCBI-Datenbank identifiziert. Die identifizierten Proteine stammen alle aus *Arabidopsis thaliana*; je höher der Protein-Score desto sicherer die Identifizierung. Die Spotnummern beziehen sich auf die Zahlen in Abb. 4.22. Mit Hilfe von TargetP wurden die Aminosäuresequenzen auf Anwesenheit von Signalpeptiden überprüft. S, C, und M stehen für Lokalisation in den sekretorischen Weg, Chloroplasten und Mitochondrien, _ steht für anderer Weg. RC steht für *reliability class* und ist ein Maß für die Zuverlässigkeit der Vorhersage. Je kleiner die Zahl, desto sicherer ist die Vorhersage.

Spot Nr.	Ähnlichkeit mit	AGI Nummer	Protein Score	Molekulargewicht (Da)	Signalpeptid
1	Thioglukosidase	At5g26000	123	61664	S (RC 1)
2	Subtilisin-ähnliche Serinprotease	At5g67360	301	80050	S (RC 1)
3	Subtilisin-ähnliche Serinprotease	At5g67360	241	80050	S (RC 1)
4	β -1,4-Xylosidase	At3g19620	243	97359	S (RC 1)
5	Aspartylprotease	At5g10760	102	50411	S (RC 2)
6	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	At3g01480	62	48180	C (RC 1)
7	Pepsin A, Aspartylprotease	At3g18490	62	53942	C (RC 5)
8	Pepsin A, Aspartylprotease	At3g18500	63	53942	M (RC 4)
		At3g18490			C (RC 5)
		At3g18500			M (RC 4)
9	Sedoheptulose-bisphosphatase	At3g55800	168	42787	C (RC 1)
10	Curculin-ähnlich, Lektin-Familie	At1g78830	169	51007	S (RC 1)
11	Curculin-ähnlich, Lektin-Familie	At1g78830	203	51007	S (RC 1)
12	Carboxylische Ester Hydrolase	At1g29660	270	40630	S (RC 2)
13	β -1,3-Glucanase 2 (PR2)	At3g57260	389	37373	S (RC 1)
14	Sauerstoffbildungsprotein (<i>Oxygen-evolving</i>)	At5g66570	66	35285	C (RC 2)
15	PR5; Taumatin ähnliches Protein	At1g75040	576	26148	S (RC 1)
16	Chaperonin 10	At1g14980	101	26913	M (RC 3)
17	Sauerstoffbildungsprotein 2 (PSBP)	At1g06680	136	28249	C (RC 2)
18	Rubisco (große Untereinheit)	AtCg00490	113	53424	_ (RC2)
19	Serin Hydroxyl-methyltransferase (SHM 1)	At4g37930	44	57535	M (RC 4)
21	Pepsin A, Aspartylprotease	At1g09750	39	48429	S (RC 1)
22	Pepsin A, Aspartylprotease	At1g09750	104	48429	S (RC 1)
23	Carboxylische Ester Hydrolase	At2g46930	78	46827	S (RC 1)
24	Unbekanntes Protein	At3g08030	83	39326	_ (RC 2)
25	Protein Bindeprotein	At3g20820	54	40464	S (RC 2)
26	Pepsin A, Aspartylprotease	At1g09750	70	48429	S (RC 1)
27	Lektin ähnliches Protein	At3g16530	287	30547	S (RC 1)
28	β -1,3-Glucanase 2 (PR2)	At3g57260	359	37722	S (RC 1)
29	Carboxylische Ester Hydrolase	At1g29670	539	40417	S (RC 1)
30	Lektin ähnliches Protein	At3g15356	238	29650	S (RC 1)
31	Lektin ähnliches Protein	At3g15356	252	29650	S (RC 1)
32	Kohlenhydrat-Bindeprotein, Lektin-ähnlich	At5g03350	91	30200	S (RC 2)
33	MER15b; Hydrolase	At4g30270	177	30850	S (RC 1)
34	Chitinase	At2g43590	61	29304	S (RC 1)
35	Peptidylprolyl Isomerase (ROC4)	At3g62030	44	28532	C (RC 1)
36	Endopeptidase Hemmer	At1g17860	119	22410	S (RC 2)
37	Hypothetisches Protein	At1g33640	53	56113	S (RC 2)
38	β -1,3-Glucanase 2 (PR2)	At3g57260	140	37373	S (RC 1)
39	Peroxidase	At5g06720	69	32504	S (RC 2)

Die statistische Analyse (siehe 3.5.9) beim Vergleich von Gelen aus mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* ergab, dass neun Spots differentiell auftraten. Sieben davon traten unter *Verticillium*-Einfluss stärker und zwei schwächer hervor. Sechs der Proteine, die in den Gelen von *Verticillium*-inokulierten Pflanzen im Vergleich zu den mock-inokulierten Pflanzen signifikant ($p < 0,05$) stärker auftraten, konnten identifiziert werden. Bei den Proteinen handelte es sich um Oxido-Reduktasen wie das Germin-ähnliche Protein (At5g20630) und die drei Peroxidasen (At5g05340, At3g49120, At4g37530). Weitere unter *Verticillium* Einfluss signifikant hochregulierte Proteine waren eine Serin-Carboxypeptidase (At4g12910) und eine α -Galactosidase (At5g08370). Außerdem wurde ein Lektin ähnliches Protein (At3g16530) identifiziert, das bei *Verticillium*-Infektion um den Faktor 0,5 signifikant geringer vorkam als bei den Kontrollpflanzen. Für alle Proteine wurde mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Signalpeptid für den sekretorischen Weg gefunden. Der in Tab. 4.9 angegebene Protein-Score setzt sich aus dem Score der einzelnen gefundenen Peptide zusammen und zeigt wie sicher die Identifizierung der Proteine war. Je höher der Protein-Score, desto sicherer ist die Identifizierung. Bei den Proteinen mit einem Protein-Score über 100 war Identifizierung relativ sicher, wohingegen die Identifizierung der Spots V 4 und V 5 als die Peroxidasen At3g49120 und At4g37530 mit einem Protein-Score von 54 und 64 wesentlich unsicherer war.

Tab. 4.9: Durch *V. longisporum* Einfluss differentiell auftretende apoplastische Proteine. Es wurden Spots aus Gelen von sechs biologischen Wiederholungen pro Variante verglichen. Die AWF stammten aus zwei unabhängigen Experimenten. Weitere Details auch in Tabelle 4.8. Spot Identifikationsnummern gehören zu denen in Abbildung 4.22. Angegeben ist der Faktor mit dem Proteine durch *Verticillium*-Infektion hoch- oder herabreguliert waren, sowie das Resultat des T-Tests, wobei $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen wurde.

Spot Nr.	Ähnlichkeit mit	AGI Nummer	Protein Score	Molekulargewicht (Da)	Signalpeptid	Faktor	p-Wert
V 1	Serin Carboxypeptidase S10	At4g12910	214	56238	S (RC 1)	2,4	0,0002
V 2	Germin-ähnliches Protein (GER3, GLP3)	At5g20630	95	22020	S (RC 1)	3,1	0,0174
V 3	Peroxidase 52	At5g05340	373	34650	S (RC 1)	4,1	0,0004
V 4	Peroxidase 34 (Klasse III Peroxidase)	At3g49120	54	39440	S (RC 3)	2,3	0,0396
V 5	Peroxidase	At4g37530	64	36388	S (RC 1)	2,2	0,0491
V 7	α -Galactosidase	At5g08370	122	44465	S (RC 1)	2,2	0,0107
27	Lektin ähnliches Protein	At3g16530	287	30547	S (RC 1)	0,5	0,0241

4.2.3.3 Analyse der Hauptproteine in Gesamtblattextrakten von *Arabidopsis thaliana*

In den AWF von *Arabidopsis* wurden auch Proteine gefunden, für die Signalpeptide für Mitochondrien und Chloroplasten vorhergesagt wurden (Tab. 4.8), obwohl in der AWF durch Malatdehydrogenase-Messung nur eine sehr geringe Kontamination nachgewiesen werden konnte (Tab. 4.6). Um herauszufinden wie stark die Kontamination durch symplastische Proteine war, wurden acht dominante Proteine identifiziert. Es wurde erwartet, dass sich diese Proteine auch in der AWF wiederfinden lassen müssten. Um die relative Kontamination

abzuschätzen, wurden die relativen Intensitäten dieser Proteine in Gesamtblattextrakten analysiert (Abb. 4.23 und Tab. 4.10).

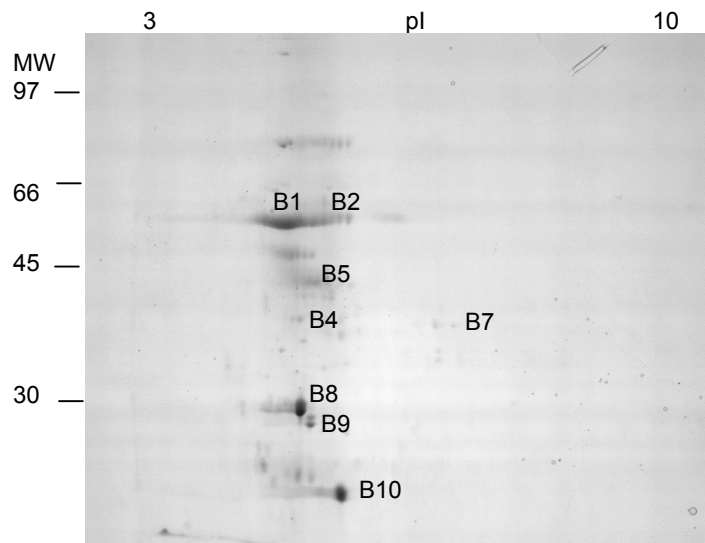


Abb. 4.23: Proteinmuster von Gesamtblattextrakten aus *Arabidopsis thaliana* 25 Tage nach Inokulation. Für die zweidimensionale Separation wurde ca. 1 mg Protein eingesetzt. Die Zahlen weisen auf Proteinspots hin, die mittels ESI-LC-MS aus dem CBB-gefärbten Gel identifiziert wurden.

Die Proteine Rubisco, Sauerstoffbindeprotein, PSBP, RCA, PSBO-2, Malatdehydrogenase und SBP wurden aus dem Gel identifiziert (Abb. 4.23; Tab 4.10). Aus den Intensitäten der Proteine im Gel wurde berechnet, dass die drei Proteine Rubisco (16,5 %), Sauerstoffbindeprotein (7,7 %) und PSBP (7,0 %) relativ zur Gesamtintensität aller Proteinspots zusammen 31,2 % ausmachten. In den AWF war der Beitrag dieser Proteine zur Gesamtfärbintensität 0,88 % (Rubisco), 0,32 % (Sauerstoffbindeprotein) und 0,38 % (PSBP). Dies entspricht Kontaminationsfaktoren von jeweils 0,053, 0,041 und 0,054. Zusammengenommen bestätigt diese Analyse, dass die Kontamination gering, aber nachweisbar war. Daher wurden andere Kriterien wie die Überprüfung von Signalpeptiden bei der Untersuchung berücksichtigt. Die untersuchten AWF kann man also nicht als völlig reine, aber stark angereicherte AWF bezeichnen.

Tab. 4.10: Proteine, die durch Massenspektrometrie in Gesamtblattextrakten von *Arabidopsis thaliana* aus einem CBB-gefärbten zweidimensionalen Gel (Abb. 4.23) identifiziert wurden. Die relative Intensität der Proteine, bezogen auf Rubisco, ist angegeben.

Spot Nr.	Ähnlichkeit mit	Accession number	Protein Score	Molekulargewicht (Da)	relative Intensität
B1	Rubisco	AtCg00490	209	53435	1
B2	ATP-Synthase CF1 β -Kette	AtCg00480	536	53957	0,07
B4	SBPase; Phosphor-Ester-Hydrolase	At3g55800	259	42787	0,02
B5	RCA; Rubisco Aktivase	At2g39730	120	52347	0,15
B7	Malatdehydrogenase	At1g04410	176	35890	0,03
B8	Sauerstoffbindeprotein	At5g66570	298	35285	0,47
B9	PSBO-2	At3g50820	229	35226	0,09
B10	PSBP (Sauerstoffbindeprotein 2)	At1g06680	221	28249	0,27

4.2.4 Peroxidase Aktivitäten

Da unter den differentiell regulierten Proteinen drei Peroxidasen waren, wurde die Aktivität von Peroxidasen in den apoplastischen Waschflüssigkeiten (AWF) und in Gesamtblattextrakten von mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen gemessen (siehe 3.5.2.2). Sowohl in den apoplastischen als auch in den Gesamtblattextrakten wurden Aktivitätsunterschiede zwischen den mock- und *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis* festgestellt (Abb. 4.24A und B). In der AWF der *Verticillium*-inokulierten Pflanzen war die Aktivität ca. 10-fach erhöht. Während die Aktivität der Kontrollen bei 11 nkat/mg Protein lag, wiesen die AWF der *Verticillium*-inokulierten Pflanzen durchschnittlich eine Aktivität von 102 nkat/mg Protein auf. In den Gesamtblattextrakten war die spezifische Aktivität insgesamt wesentlich geringer als in der AWF. Die *Verticillium*-Infektion führte hier zu einer dreifachen Erhöhung der Peroxidase-Aktivität.

Zusätzlich wurde noch eine Peroxidase-Aktivitätsfärbung im Gel durchgeführt (siehe 3.5.4). Dafür wurden die Peroxidasen aus den AWF von mock- und *Verticillium*-inokulierten Pflanzen nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt und anschließend mit Guajakol und H_2O_2 sichtbar gemacht (Abb. 4.24C). Während bei den mock-inokulierten Kontrollen keine Färbung zu sehen war, färbten sich bei den apoplastischen Extrakten aus *Verticillium*-inokulierten Pflanzen sowohl im sauren als auch im basischen Bereich Banden durch die Peroxidase-Aktivität deutlich an. Das Ergebnis zeigte, dass sowohl saure als auch basische Peroxidasen durch *Verticillium*-Einfluss eine erhöhte Aktivität aufwiesen, obwohl die drei Peroxidasen (At5g05340, At3g49120, At4g37530), die in den 2 D-Gelen eine stärkere Expression unter *Verticillium*-Einfluss aufwiesen, alle im basischen pH-Bereich zu finden waren. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass nicht alle durch *Verticillium*-Einfluss differentiell regulierten Proteine in den zweidimensionalen Gelen erfasst wurden.

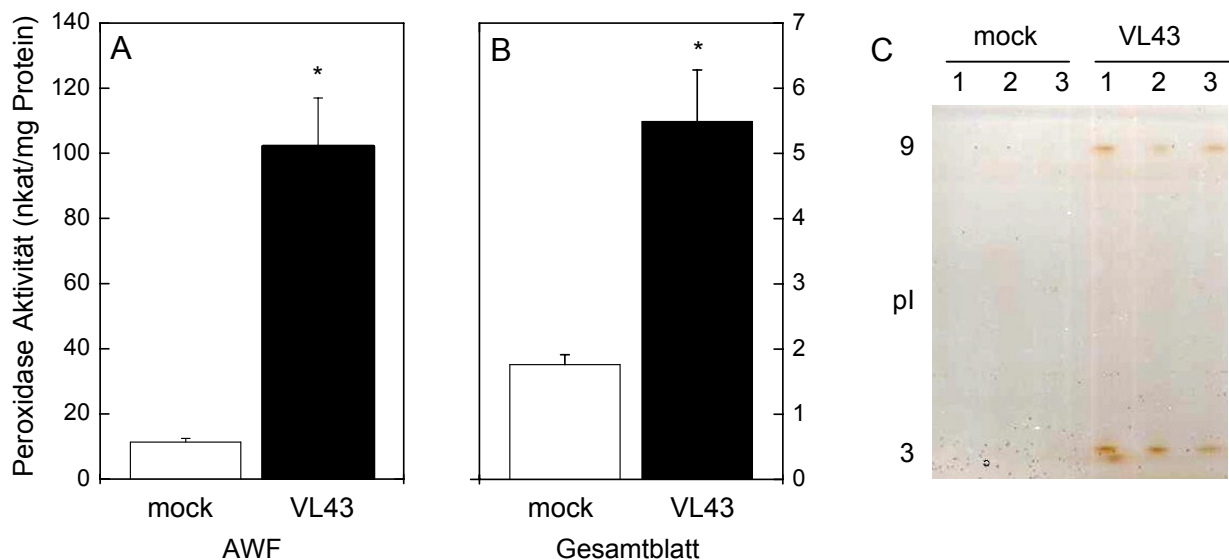


Abb. 4.24: (A) Peroxidase-Aktivität in AWF und (B) Gesamtblattextrakten von mock und *V. longisporum* inokulierten *Arabidopsis*-Pflanzen 25 Tage nach Inokulation. Die Säulen repräsentieren sechs Replikate aus zwei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich. (C) Peroxidase Aktivitätsfärbung nach isoelektrischer Fokussierung der AWF von mock- und VL43-inokulierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Jede Spur wurde mit 3,5 μ g Protein geladen. Jeweils drei Spuren des Gels, das einen pH-Wert von 3 bis 9 abdeckt, zeigen unabhängige Proben aus mock- und aus VL43-inokulierten Pflanzen.

4.2.5 Expressionsanalyse differentiell auftretender Proteine

Um zu untersuchen, ob sich die unter *Verticillium*-Einfluss im Proteingel differentielle Regulation der Proteine auch auf RNA-Ebene widerspiegelt, wurden die Transkriptmengen mittels quantitativer real time PCR untersucht (siehe 3.6.4). Dazu wurden zunächst durch Nutzung des Primer3-Servers (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) und dessen Standardeinstellungen spezifische Primer für die zu den Proteinen gehörenden Gensequenzen konstruiert. Um zu verhindern, dass ein Primer für eine der Peroxidasen auch an die anderen drei untersuchten Peroxidasen passte, wurde ein Sequenzabgleich mit ClustalW durchgeführt (siehe Anhang). Die Primer wurden dann so ausgewählt, dass sie spezifisch für jeweils eine der drei Peroxidase-Sequenzen waren. Zusätzlich zu den differentiell exprimierten Proteinen, wurde auch die Peroxidase (At5g06720) mit saurem pH-Wert, die im Vergleich der Proteingele von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen nicht differentiell auftrat, analysiert. Da durch die Peroxidase-Aktivitätsfärbung eine erhöhte Peroxidase-Aktivität auch im sauren pH-Bereich nachgewiesen wurde (Abb. 4.24), erschien eine nähere Untersuchung der einzigen im sauren pH-Bereich gefundenen Peroxidase angebracht.

Tabelle 4.11 zeigt einen Vergleich der untersuchten Gene auf Protein- und RNA-Ebene zum Zeitpunkt 25 Tage nach Inokulation. Die Gene, die durch *Verticillium*-Infektion auf Proteinebene hochreguliert waren, waren auch auf RNA-Ebene hochreguliert. Allerdings unterschieden sich die Faktoren auf RNA- und Protein-Level zum Teil stark. Während für die Peroxidase At5g05340 unter *Verticillium*-Infektion auf Proteinebene ein Faktor von 4,1 nachgewiesen werden konnte, lag der Faktor auf RNA-Ebene bei 40,6. Dagegen waren die RNA-Mengen für die Serin-Carboxypeptidase und die Peroxidase At3g49120 nur leicht erhöht und zum Zeitpunkt 25 Tage nach Inokulation war die Erhöhung nicht signifikant. Das Lektin-ähnliche Protein, auf Proteinebene signifikant herabreguliert, wies auf RNA-Ebene eine Reduktion um den gleichen Faktor auf. Die Peroxidase At5g06720 ohne signifikante Erhöhung auf Proteinebene, zeigte auch auf RNA-Ebene keine signifikante Erhöhung unter *Verticillium*-Einfluss.

Für die unterschiedlichen Faktoren auf Protein- und RNA-Ebene gibt es mehrere Erklärungen. Einige Schwankungen kamen sehr wahrscheinlich dadurch zustande, dass das auf Protein- und RNA-Ebene untersuchte Material aus zwei völlig unabhängigen Versuchen stammte. Auch technische Gründe kommen als Ursache für Unterschiede in Frage. So wurden möglicherweise bei der Gewinnung der AWF Proteine mehr oder weniger gut gelöst. Die Proportionalität zwischen Färbeintensität und Proteinkonzentration ist bei Silberfärbungen nicht so gut, so dass hier sicher keine absolut genauen Angaben möglich sind. Die Proportionalität von CBB-Färbungen ist zwar wesentlich besser, allerdings ist sie dafür wesentlich weniger sensitiv. Die Veränderung der Proteinmenge hängt auch davon ab, wie langlebig die Proteine sind bzw. wie schnell sie wieder abgebaut werden, so dass es auch daher zu Unterschieden zwischen Protein- und RNA-Level kommen kann. Auf RNA-Ebene wurden zum Teil hohe Standardabweichungen ermittelt, was darauf hindeutet, dass die Stärke der Reaktionen in den einzelnen Pflanzen schwankt. Nichtsdestotrotz zeigten die Ergebnisse, dass die im Proteingel differentiell auftretenden Proteine, auch auf RNA-Ebene verändert waren. Am Beispiel der zusätzlich untersuchten Peroxidase zeigte sich, dass ein

im Proteingel nicht signifikant verändert auftretendes Protein auch auf RNA-Ebene nicht signifikant verändert auftrat.

Tab. 4.11: Relative Protein- und mRNA-Mengen unter *Verticillium*-Einfluss in *Arabidopsis thaliana* zum Zeitpunkt 25 Tage nach *Verticillium*-Inokulation bezogen auf mock-inokulierte Kontrollpflanzen im Vergleich. Die Werte repräsentieren sechs Replikate auf Proteinebene und sechs Replikate in Doppelbestimmung auf RNA-Ebene. Das Probenmaterial für die Protein- und die RNA-Analyse stammte aus unterschiedlichen Versuchen. Werte mit $p \leq 0,05$ im T-Test wurden als signifikant unterschiedlich angesehen.

Protein	Faktor Protein	p-Wert Protein	Faktor RNA	p-Wert RNA
Serin-Carboxypeptidase	2,4	0,000	1,4	0,131
Germin-ähnliches Protein	3,1	0,017	1,9	0,021
Peroxidase (At5g05340)	4,1	0,000	40,6	0,001
Peroxidase (At3g49120)	2,3	0,040	1,3	0,344
Peroxidase (At4g37530)	2,2	0,049	3,1	0,001
α -Galactosidase	2,2	0,011	3,4	0,001
Lektin-ähnliches Protein	0,5	0,024	0,5	0,033
Peroxidase (At5g06720)	1,2	0,620	1,6	0,159

Da aus *Arabidopsis*-Pflanzen in früheren Krankheitsstadien nicht ausreichend apoplastische Waschflüssigkeiten für Proteomanalysen aus den Blättern gewonnen werden konnten, war es interessant, die Veränderung der Transkriptmengen über den Infektionsverlauf zu analysieren.

In Abbildung 4.25 und 4.26 ist die Regulation der Gene der *Verticillium*-infizierten Pflanzen bezogen auf die Kontrollpflanzen auf RNA-Ebene im Infektionsverlauf dargestellt. Die reduzierte Expression des Lektin-ähnlichen Proteins war über den gesamten Untersuchungszeitraum nachzuweisen. Die Serin-Carboxypeptidase zeigte auf RNA-Ebene über den gesamten Infektionsverlauf eine leicht erhöhte Expression, die sich aber nur zum Zeitpunkt 35 Tage nach Inokulation als signifikant erwies (Abb. 4.25B). Die Expression der α -Galactosidase stieg im Verlauf der Infektion bis zum Zeitpunkt 28 Tage nach Infektion immer mehr an und fiel danach wieder ab. Die relative RNA-Menge des Germin-ähnlichen Proteins war unter *Verticillium*-Einfluss zu den beiden Zeitpunkten 25 und 35 Tage nach Inokulation signifikant erhöht, während zu den anderen Zeitpunkten keine bzw. eine geringe Veränderung im Vergleich zu den mock-inokulierten Kontrollen vorlag (Abb. 4.25B).

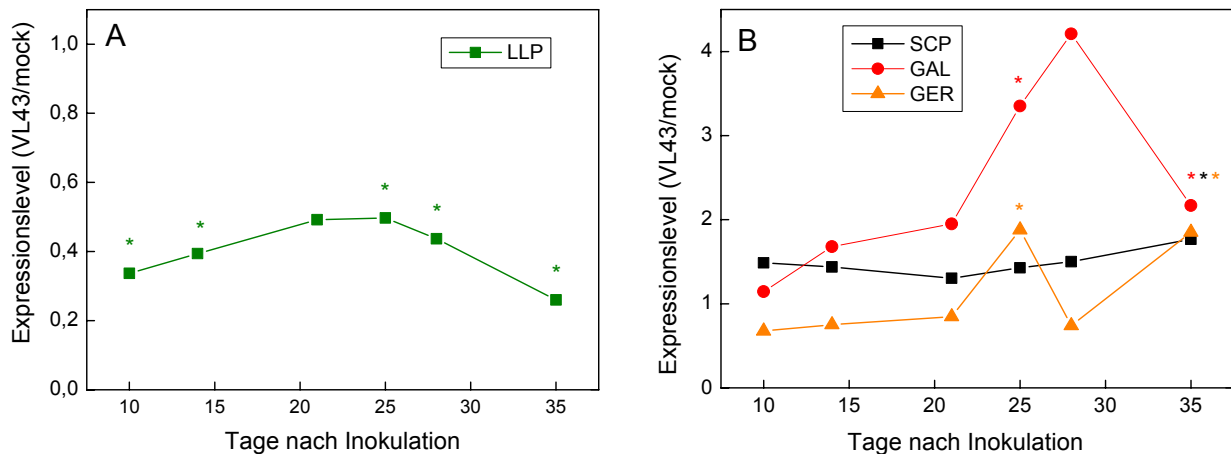


Abb. 4.25: Relative Genexpression in *Verticillium*-inokulierten im Vergleich zu mock-inokulierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Untersucht wurde die relative Expression der codierenden Gene für ein (A) Lektin-ähnliches Protein (LLP) und für (B) ein Germin-ähnliches Protein (GER), eine Serin-Carboxypeptidase (SCP) und eine α -Galactosidase (GAL) (Tab. 4.9). Die Symbole repräsentieren drei Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 10, 14 und 35 Tage nach Inokulation und sechs Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 21, 25 und 28 Tage nach Inokulation. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

In Abbildung 4.26 sind die relativen Expressionlevel der untersuchten Peroxidasen im Infektionsverlauf dargestellt. Die Peroxidase At5g05340 zeigte die stärkste relative Expression unter *Verticillium*-Einfluss, sie erreichte 21 Tage nach Inokulation ein Maximum einer 97-fachen Erhöhung im Vergleich zu den Kontrollpflanzen und nahm danach wieder ab (Abb. 4.26A). Die beiden Peroxidasen At4g37530 und At3g49120 zeigten eine weniger starke Zunahme der relativen Transkriptmenge durch *Verticillium*-Infektion (Abb. 4.26B). Während die Peroxidase At3g49120 ein Expressionsmaximum 14 Tage nach Infektion mit einem Faktor von 3,2 aufwies, lag das Maximum der Peroxidase At4g37530 (Faktor 3,1) 25 Tagen nach Inokulation. Die Erhöhung zu diesen beiden Zeitpunkte erwies sich im T-Test auch als signifikant ($p < 0,05$). Keine signifikante Expressionserhöhung unter *Verticillium*-Einfluss konnte auf RNA-Ebene für die Peroxidase At5g06720 ermittelt werden, die auch auf Proteinebene keine signifikant erhöhte Expression aufwies (Abb. 4.26C). Es lässt sich also zusammenfassend festhalten, dass die Ergebnisse aus der Proteinanalyse durch die RNA-Analyse untermauert wurden.

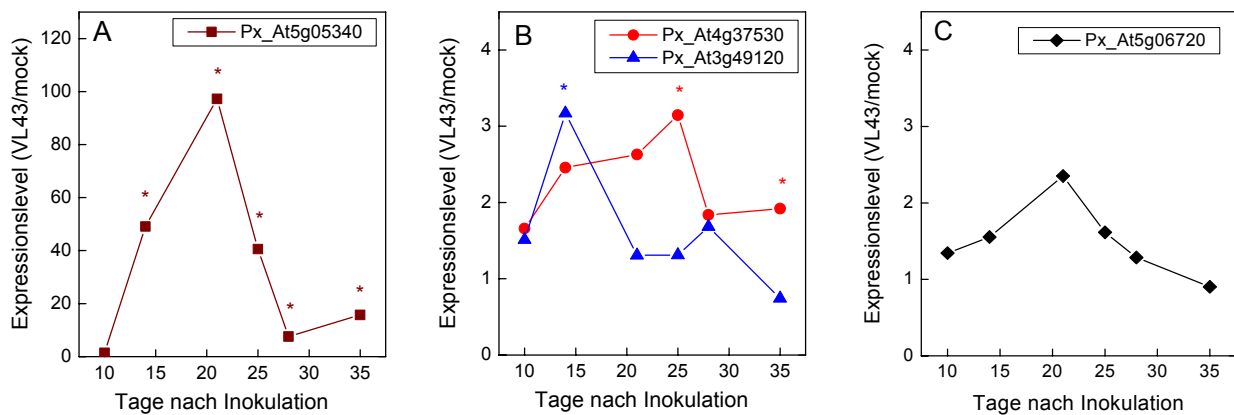


Abb. 4.26: Relative Genexpression in *Verticillium*-inokulierten im Vergleich zu mock-inokulierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen. Untersucht wurde die relative Expression der codierenden Gene für (A) die Peroxidase At5g05340, für (B) die Peroxidasen At4g37530 und At3g49120 und (C) die saure Peroxidase At5g06720. Die Symbole repräsentieren drei Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 10, 14 und 35 Tage nach Inokulation und sechs Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 21, 25 und 28 Tage nach Inokulation. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

4.2.6 In silico Analyse der Expressionslevel der differentiell regulierten Proteine unter diversen Stressbedingungen

Abbildung 4.27 zeigt eine Genevestigator-Analyse der Proteine, die unter *Verticillium*-Einfluss differentiell reguliert waren. Dabei wurden alle in diesem Programm (<https://www.genevestigator.ethz.ch/at/>) vorgegebenen Stressfaktoren einbezogen und als Basis war der 22 K *Chip* vorgegeben. Mit Hilfe dieser Software wurde ein „elektronischer Northern Blot“ durchgeführt, der zeigte wie die *Verticillium*-beeinflussten Gene unter biotischem, chemischem, hormonellem und abiotischem Stress, sowie unter Lichtstress und Nährstoffstress, reagierten. Bei näherer Betrachtung wird deutlich, dass unter keiner anderen Stressbedingung, dieselbe Kombination an Genen so verändert war wie unter *Verticillium*-Infektion. Die stärksten Gemeinsamkeiten traten bei biotischem Stress mit *Agrobacterium tumefaciens* und mit dem Pilz *Botrytis cinerea* auf und bei hormonellem Stress mit einer kombinierten Behandlung aus Brassinoliden und H_3BO_3 , da hier jeweils vier der sieben Gene wie unter *Verticillium*-Einfluss verändert waren. In diesen Fällen war aber jeweils das Germin-ähnliche Protein (At5g20630) nicht hochreguliert und das Lektin-ähnliche Protein (At3g16530) nicht herabreguliert wie unter *Verticillium*-Einfluss. Das Lektin-ähnliche Protein (At3g16530) wies in der Genevestigator-Analyse vor allem unter Lichtstress eine Verringerung auf, aber auch unter Hitze- bzw. Salzstress und durch Mykorrhiza und Nematoden-Einfluss. Das Germin-ähnliche Protein wies in der Genevestigator-Analyse z.B. unter Licht- und CO_2 -Stress und unter Einfluss von Mykorrhiza, Mehltau (*Erysiphe orontii*) und *Erysiphe cichoracearum* eine erhöhte RNA-Menge auf.

4.2.7 Untersuchungen zum Einfluss von *Verticillium longisporum* auf die Zellwandzusammensetzung von *Arabidopsis thaliana*

Peroxidasen können unterschiedliche Funktionen in Abwehr von Pathogenen wahrnehmen. Die Verstärkung der Zellwand als Barriere für das Eindringen von Pathogenen durch Suberisierung und Lignifizierung ist eine mögliche Funktion (Passardi *et al.*, 2004). Daher wurde der Einfluss von *V. longisporum* auf die Zellwand näher untersucht. Zunächst wurde der Anteil der Zellwandmasse, auch als strukturelle Biomasse bezeichnet, an der Frischmasse der Pflanze ermittelt (siehe 3.3.11). Der Anteil der strukturellen Biomasse an der Frischmasse der Pflanzen betrug bei den mock-inokulierten 3,3 % und war bei den *Verticillium*-inokulierten um 24 % erhöht, diese Erhöhung erwies sich im T-Test als signifikant ($p \leq 0,05$). Zur weiteren Analyse wurde eine Ligninbestimmung in Zellwandextrakten von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen durchgeführt (Abb. 4.28B). Unter *Verticillium*-Einfluss stieg der Ligningehalt von 39 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellwand bei den mock-inokulierten Pflanzen um rund 20 % auf 49 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Zellwand bei den *Verticillium*-infizierten Pflanzen.

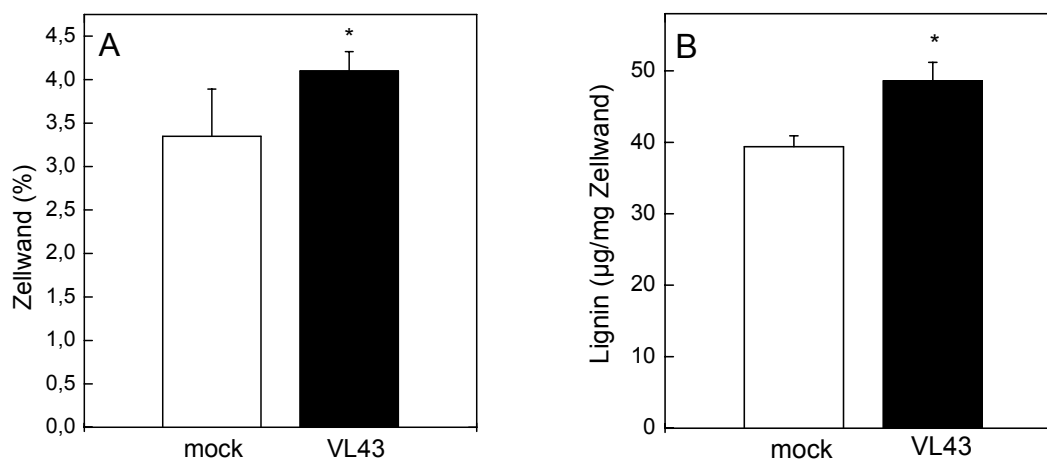


Abb. 4.28: (A) Strukturelle Biomasse und (B) Ligningehalt in Rosetten von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen im Vergleich. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler von $n = 9$ Pflanzen. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

4.2.8 FTIR-Analyse zur Ermittlung des chemischen Fingerprints *Verticillium longisporum* infizierter *Arabidopsis thaliana*

Um zu untersuchen, ob *Verticillium longisporum* Infektionen die Zusammensetzung der organischen Blattbestandteile verändern, wurden FTIR-Analysen durchgeführt (siehe 3.3.10). Dafür wurde Blattmaterial von mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* untersucht und zum Vergleich auch Pilzmaterial von *Verticillium longisporum* gemessen (Abb. 4.29). Die Hauptpeaks der *Arabidopsis* Blätter wurden nummeriert (Abb. 4.29A) und entsprechen vermutlich den Schwingungen von: (1) 1730 cm^{-1} C=O in Esterbindungen, (2 und 3) 1650 und 1550 cm^{-1} primären und sekundären Amiden (NH_2 und NH in Proteinen), (4 und 5) C-H Bindungen, wobei (5) CH_2 Bindungen in Cellulose zugeordnet wird, (6) 1230 cm^{-1}

tertiären Amidbindungen und (7-10) 1160-970 cm^{-1} C-O Bindungen im Rückgrat von Polysacchariden, wobei (7) 1150 cm^{-1} C-O-C in Cellulose bzw. Hemicellulose und (9 und 10) 1060 und 1037 cm^{-1} C-O-C und C-C Bindungen in Cellulose Zuckerringen (Chalmers & Griffiths 2002; Mouille et al., 2003; Naumann et al., 2005; Séné et al., 1994).

Da der Ligningehalt in *Arabidopsis* Blättern erhöht war (siehe 4.2.7), sollte versucht werden diese Mengenunterschiede auch mittels FTIR-Analyse zu detektieren. Die Wellenlängen für die aromatischen Schwingungen des Lignins liegen im Bereich 1530-1490 cm^{-1} und typische C=O Schwingungen des Lignins bei 1166 cm^{-1} (Faix et al., 1991; Naumann et al., 2005). Unterschiede im Ligningehalt konnten mit der FTIR-Analyse aber nicht erfasst werden, da der Ligningehalt in den *Arabidopsis*-Blättern insgesamt unterhalb des Detektionslimits lag. Jedoch zeigten die Spektren von mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen eine Reihe von Unterschieden. Die deutlichsten Unterschiede sind durch Pfeile gekennzeichnet (Abb. 4.29A) und befinden sich in den Wellenlängenbereichen 1650 bis 1550 cm^{-1} und um 1140 cm^{-1} , welche vermutlich für Proteine und Cellulose bzw. Kohlenhydrate spezifisch sind. Bei den Wellenlängen 1650 und 1550 cm^{-1} befinden sich zwei Peaks, bei denen jeweils die Absorption der mock-inokulierten Kontrollen über der Absorption der *Verticillium*-infizierten Pflanzen liegt. Dazwischen, im Bereich um 1600 cm^{-1} , fällt die Absorption sowohl der Kontrollen als auch der *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* ab, allerdings ist der Abfall beim Spektrum der *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* stärker. Im Wellenlängenbereich um 1140 cm^{-1} liegt die Absorption der *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* über der Absorption der Kontrollen. Diese Unterschiede wurden auch in einer Clusteranalyse von vektornormierten Spektren im Bereich 1800-800 cm^{-1} deutlich (Abb. 4.29B). Die Clusteranalyse ergab drei Hauptgruppen, die in Abbildung 4.29B durch die römische Zahlen I, II und III gekennzeichnet sind. Fünf der untersuchten mock-inokulierten *Arabidopsis* bilden die Gruppe I, während die Gruppe II noch in die Untergruppen IIa und IIb zerfällt. IIa wird aus jeweils drei mock- und drei *Verticillium* infizierten *Arabidopsis* gebildet; Cluster IIb beinhaltet fünf *Verticillium*-infizierte *Arabidopsis*. Die Gruppen I und IIb zeigen, dass die mock- und *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* unterscheidbar sind. Gruppe IIa scheint einen Übergangsbereich zu bilden und zerfällt in zwei Untergruppen zu jeweils drei mock- und drei *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis*.

Das ebenfalls untersuchte *Verticillium longisporum* Material wies ein deutlich anderes Spektrum auf als das Pflanzenmaterial (Abb. 4.29A) und bildete auch in der Clusteranalyse eine eigene weit vom Pflanzenmaterial entfernte Gruppe (Abb. 4.29B, Cluster III).

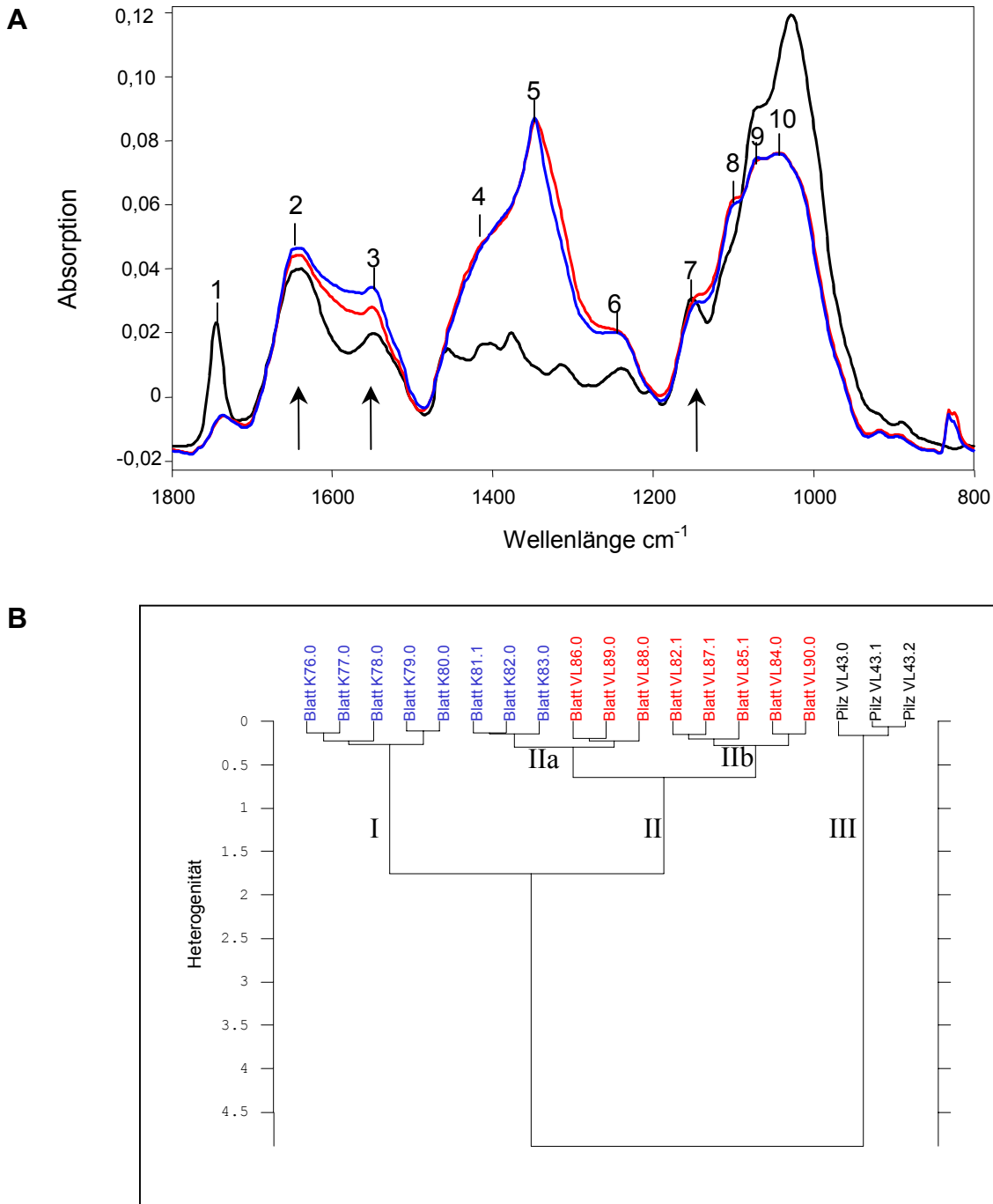


Abb. 4.29: (A) FTIR-ATR-Spektren von getrocknetem Blattmaterial im Bereich $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ von mock-inokulierten (blau), *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis thaliana* (rot) und zum Vergleich der Pilz (schwarz). Alle Spektren wurden Grundlinien korrigiert und Vektor normiert und repräsentieren Mittelwerte aus jeweils acht verschiedenen Pflanzen- bzw. drei Pilzproben. Den wesentlichen Peaks sind Nummern zugeordnet, die Pfeile deuten an, wo Schwingungen von Lignin auftreten können. (B) Clusteranalyse der mittels FTIR gemessenen mock-inokulierten Kontrollpflanzen (blau), *Verticillium*-inokulierten Pflanzen (rot) und wiederum zum Vergleich der Pilz (schwarz). Für die Clusteranalyse des Bereichs $800\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ wurden vektornormierte Spektren und die zweite Ableitung zugrunde gelegt und der Ward's Algorithmus verwendet.

4.3 Untersuchung des Einflusses von *Verticillium longisporum* auf eine *Arabidopsis thaliana* Chitinase

Chitinasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von β -1,4-glykosidischen Bindungen die hauptsächlich in Chitin vorhanden sind. In Pflanzen spielen Chitinasen eine Rolle in der Abwehr gegen pilzliche Pathogene (Kasprzewska, 2003). Da eine Aktivierung von Chitinasen schon häufiger in der Reaktion auf *Verticillium*-Infektionen nachgewiesen wurde, war das Fehlen von Chitinasen in der Proteomanalyse von *Arabidopsis* überraschend (siehe 4.2). Um zu prüfen, ob Chitinasen auch bei *Arabidopsis* auf *Verticillium longisporum* reagieren, wurde die Expression einer Chitinase (At5g24090) untersucht. Die transkribierte Sequenz für die saure Endochitinase (At5g24090) codiert für eine aktive sekretierte Klasse III Chitinase (Passarino und de Vries, 2002), die z.B. in die Pathogenantwort gegen *Rhizoctonia solani* beteiligt ist (Samac und Shah, 1991), aber ansonsten bislang nicht näher untersucht wurde.

4.3.1 Expression eines sauren Endochitinase-Gens (At5g24090) in *Verticillium longisporum* infizierten Wildtyp *Arabidopsis* Pflanzen

In *Arabidopsis* wurde untersucht, ob die Genexpression bei At5g24090 unter *Verticillium*-Einfluss verändert war. Abbildung 4.30 zeigt die mRNA-Gehalte über den Infektionsverlauf zu den Zeitpunkten 10, 14, 21, 25, 28 und 35 Tage nach Inokulation in *Verticillium*-infizierten Pflanzen im Verhältnis zu mock-infizierten Kontrollpflanzen. Die Expression des Chitinase-Gens in den *Verticillium*-infizierten Pflanzen stieg bis zu einem Maximum zum Zeitpunkt 25 Tage nach Inokulation an und fiel dann wieder ab. Im Vergleich zu den mock-inokulierten Pflanzen war die mRNA für die Chitinase bei den *Verticillium*-inokulierten Pflanzen, außer zum Zeitpunkt 10 Tage nach Inokulation, deutlich erhöht. 25 Tage nach Inokulation betrug die Expression des Chitinase-Gens in den *Verticillium*-infizierten Pflanzen das 17-fache der Expression in den mock-inokulierten Kontrollen. Die Hochregulierung zu den Zeitpunkten 25, 28 und 35 Tage nach Inokulation erwies sich im T-Test ($p \leq 0,05$) als signifikant.

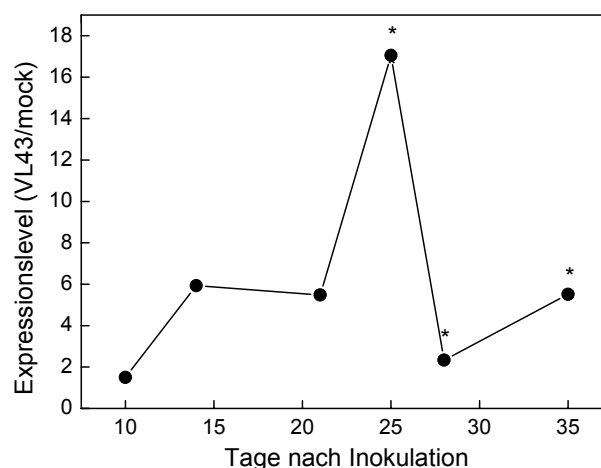


Abb. 4.30: Relative Genexpression der Endochitinase At5g24090 in *Verticillium*-inokulierten im Vergleich zu mock-inokulierten Pflanzen. Die Symbole repräsentieren drei Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 10, 14 und 35 Tage nach Inokulation und sechs Replikate in Doppelbestimmung zu den Zeitpunkten 21, 25 und 28 Tage nach Inokulation. Werte mit einem Stern waren im T-Test ($p \leq 0,05$) signifikant unterschiedlich.

4.3.2 Untersuchung einer *Arabidopsis thaliana* Chitinase-Mutante unter Einfluss von *Verticillium longisporum*

Um die Funktion der unter *V. longisporum* regulierten Chitinase näher zu charakterisieren, wurde die *Arabidopsis thaliana* T-DNA Insertionsmutante (SALK_095362) untersucht, bei der die T-DNA in die codierende Sequenz für die saure Endochitinase (At5g24090) inseriert war. Dies führt im allgemeinen zur Ausschaltung des Gens. Es sollte überprüft werden, ob diese Mutation die Empfindlichkeit für den Pilz *Verticillium longisporum* beeinflusst. Die Charakterisierung der Mutante erfolgte in der Arbeitsgruppe von Dr. T. Teichmann (Forstbotanik) und ist der Vollständigkeit halber im Anhang aufgeführt. Die Basisergebnisse werden hier nur kurz referiert.

Die Überprüfung der T-DNA Insertion in das Chitinase-Gen At5g24090 zeigte, dass die T-DNA homozygot in das Chitinase-Gen inseriert war (siehe Anhang, Abb. 8.1). In mock-inokulierten Wildtyp-Pflanzen war keine sichtbare Expression des Chitinase-Gens At5g24090 nachzuweisen. Die Behandlung mit *Verticillium* (VL43) führte bei den Wildtyp-Pflanzen zu einer verstärkten Expression. Bei der Chitinase-Mutante wurde erwartet, dass eine Insertion von T-DNA in ein Exon die Transkription des Gens verhindern würde. Stattdessen zeigte die T-DNA Insertionsmutante eine konstitutiv hochregulierte Expression, die durch *Verticillium*-Infektion nicht weiter beeinflusst wurde (siehe Anhang, Abb. 8.2).

4.3.2.1 Chitinase-Aktivitätsmessungen in mock- und *Verticillium*-infizierten Pflanzen

Um zu prüfen, ob eine erhöhte Expression auch zu einer erhöhten Enzymaktivität führt, wurde die Chitinase-Aktivität in Gesamtblattextrakten und apoplastischen Waschflüssigkeiten (AWF) aus Blättern von Wildtyp-Pflanzen und Pflanzen mit T-DNA Insertion in das Chitinase-Gen At5g24090 gemessen. Außerdem wurde der Einfluss von *Verticillium longisporum* auf die Chitinase-Aktivität überprüft. Abbildung 4.31A zeigt die Chitinase-Aktivität in den Gesamtblattextrakten. Die Wildtyp Kontrollpflanzen zeigten eine deutliche Chitinase-Aktivität von durchschnittlich 6,4 mU/µg Protein, die durch die Infektion mit *Verticillium longisporum* auf ca. das Doppelte anstieg. Die nicht-infizierte Chitinase T-DNA Insertionsmutante zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Aktivität, die der Aktivität der Wildtyp-Pflanzen nach *Verticillium*-Infektion entsprach. Aktivitätsmessungen von Gesamtblattextrakten *Verticillium*-infizierter Chitinase T-DNA Insertionsmutanten zeigten keine zusätzliche Aktivitätserhöhung. Die Aktivitätsmessungen in den apoplastischen Extrakten (Abb. 4.31B) zeigten ein anderes Bild als die Messungen in den Gesamtblattextrakten. Die Chitinase-Aktivität in den Wildtyp Pflanzen erhöhte sich durch *Verticillium*-Infektion deutlich von 0,6 auf 1,8 mU/µg Protein. In den Chitinase T-DNA Insertionsmutanten lag im Apoplasten im Gegensatz zu den Gesamtblattextrakten offenbar keine konstitutiv erhöhte Chitinase-Aktivität vor. Aus diesen Resultaten lässt sich schließen, dass die Insertionsmutante erhöhte Chitinase-Aktivität besitzt, aber vermutlich im Zellinneren und nicht im Apoplasten lokalisiert ist.

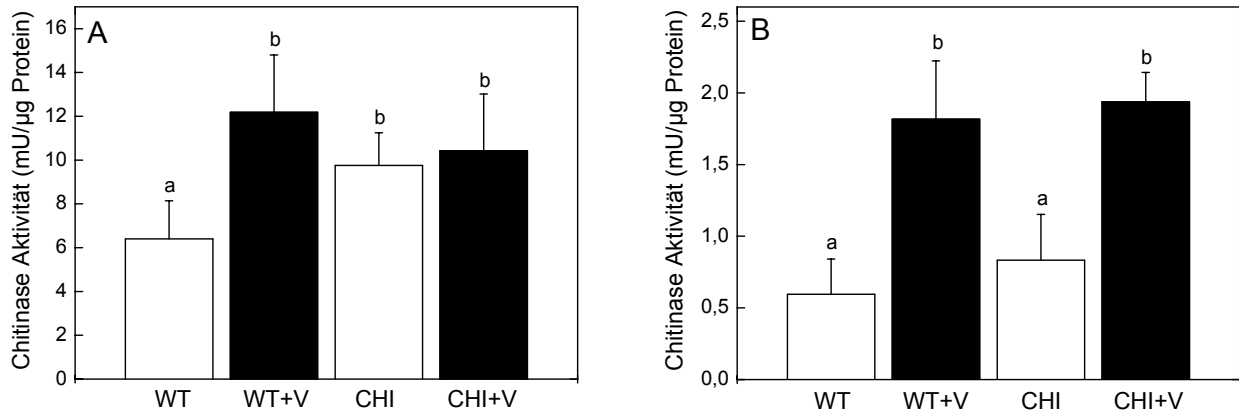


Abb. 4.31: Chitinase-Aktivität in (A) Gesamtblattextrakten und (B) apoplastischen Waschflüssigkeiten von *Arabidopsis thaliana* Blättern. Verglichen wurden Wildtyp Pflanzen (WT) und Chitinase Insertionsmutanten (CHI) unter Einfluss von *Verticillium longisporum* (+V). Die Pflanzen wurden 35 Tage nach Inokulation analysiert. Die Balken repräsentieren Mittelwerte aus n = 6 Pflanzen mit Standardfehler. Die verschiedenen Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede auf ($p \leq 0,05$).

4.3.2.2 Untersuchung der Chitinase Insertionsmutante im Hinblick auf die Symptomausprägung unter Einfluss von *Verticillium longisporum*

Um zu testen, ob die erhöhte Chitinase-Aktivität der T-DNA Insertionsmutante eine Schutzwirkung gegen *Verticillium longisporum* erzeugt, wurde diese im Hinblick auf die Symptomausprägung untersucht. Dazu wurden wie zuvor beschrieben (siehe 3.3.6), die projizierten Blattflächen bis 33 Tage nach Inokulation analysiert. Abbildung 4.32C zeigt exemplarisch Photos von mock- und *Verticillium*-inokulierten *Arabidopsis* 33 Tage nach Inokulation

Sowohl beim Wildtyp als auch bei der Chitinase-Mutante konnte beim Versuchende eine signifikante Reduktion der Rosettengröße in den *Verticillium*-inokulierten im Vergleich zu den mock-inokulierten Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 32A und B). Die Chitinase-Mutanten zeigten eine etwas stärkere Reduktion der Blattfläche durch *Verticillium*-Infektion als der Wildtyp. Diese Unterschiede erwiesen sich aber bei näherer Untersuchung als nicht signifikant ($p \leq 0,05$). Die mock-inokulierten Chitinase-Mutanten hatten durchschnittlich eine größere Rosettenfläche als die Wildtyp-Pflanzen, aber auch dieser Unterschied erwies sich im T-Test ($p \leq 0,05$) als nicht signifikant.

Zusammenfassend ließen sich also keine Unterschiede in der Symptomausprägung zwischen Wildtyp Pflanzen und der Chitinase Insertionsmutante feststellen. Es liegt offenbar keine Schutzwirkung durch eine erhöhte Expression und Aktivität der untersuchten Chitinase vor.

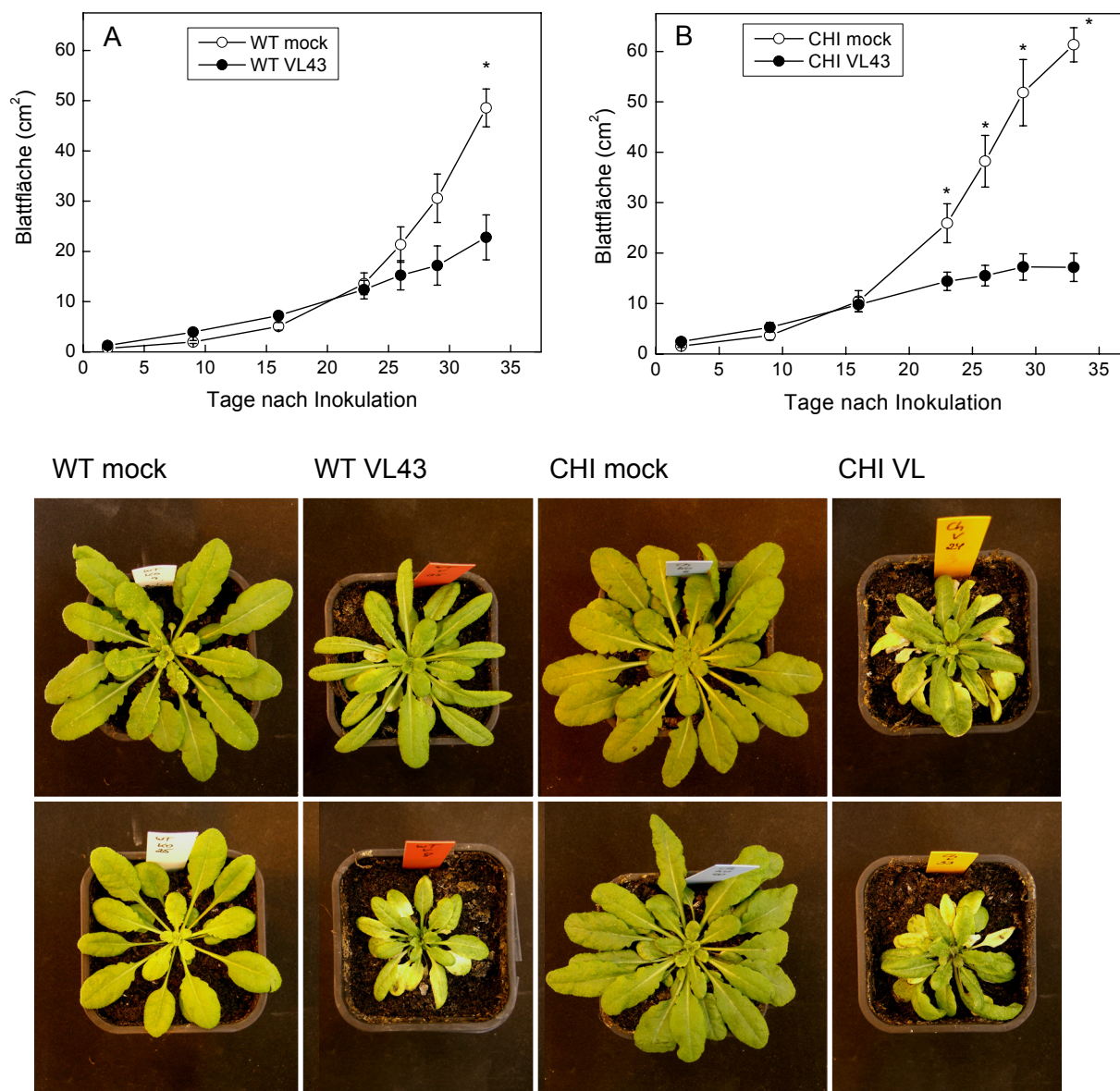


Abb. 4.32: Projizierte Blattfläche von mock- und *Verticillium*-inokulierten Wildtyp-Pflanzen (A) und Chitinase-Insertionsmutanten (B) im Infektionsverlauf. Es wurden jeweils 15-20 Pflanzen analysiert. Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede an ($p \leq 0,05$). (C) Repräsentative Bilder von *Verticillium longisporum* (VL43) inokulierten und mock-inokulierten *Arabidopsis thaliana* Wildtyp (WT) und Chitinase T-DNA Insertionsmutanten (CHI) 33 Tage nach Inokulation.

4.3.2.3 Infektionsnachweis mittels quantitativer PCR

Zur Überprüfung, ob die *Arabidopsis* Chitinase Insertionsmutante resistenter als der Wildtyp gegenüber *Verticillium longisporum* ist, wurde die Menge der Pilz-DNA in den Blättern mittels quantitativer real time PCR ermittelt. Abbildung 4.33 zeigt in einer Box-Plot Darstellung die Menge der *Verticillium*-DNA sowohl in *Verticillium*-infizierten als auch in mock-inokulierten *Arabidopsis* Wildtyp und Chitinase-Mutanten. Während die mock-inokulierten Pflanzen keine signifikanten Mengen an *Verticillium*-DNA aufwiesen, waren in den *Verticillium*-infizierten Pflanzen deutliche Mengen Pilz-DNA nachzuweisen. Ein signifikanter Unterschied im

Hinblick auf die Pilz-DNA Menge zwischen den Wildtyp-Pflanzen und den Chitinase-Insertionsmutanten konnte nicht nachgewiesen werden. Daraus wurde geschlossen, dass die erhöhte Chitinase-Aktivität der T-DNA Insertionsmutante keinen entscheidenden Schutz im Hinblick auf Anfälligkeit gegenüber *Verticillium longisporum* Infektion bewirkt.

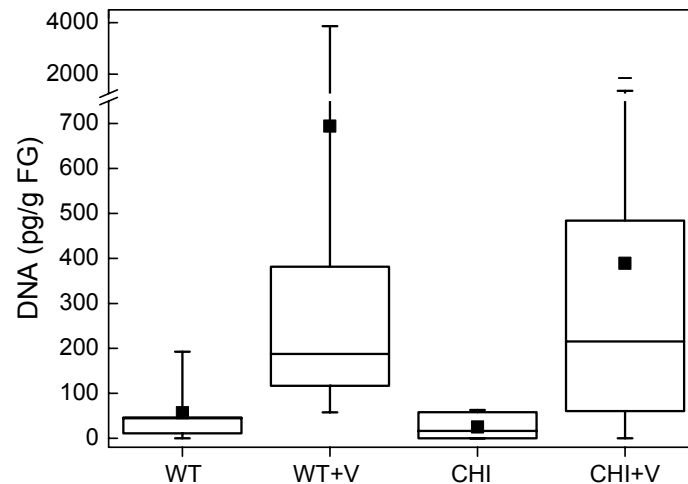


Abb. 4.33: *Verticillium*-DNA in Rosetten von mock- und *Verticillium* (+V)-infizierten *Arabidopsis* Wildtyp (WT) und Chitinase Insertionsmutanten (CHI). Die *Verticillium*-DNA Menge wurde mittels quantitativer real time PCR ermittelt. Die Boxen repräsentieren $n_{\text{Kontrollen}} = 8$, $n_{\text{WT+V}} = 10$, $n_{\text{CHI+V}} = 18$. Innerhalb einer Box liegen 50 % der Werte, die horizontale Linie stellt den Median-Wert und das schwarze Symbol den Mittelwert dar, die Gesamtverteilung wird durch die vertikalen Linien verdeutlicht.

5. DISKUSSION

5.1 *Verticillium*-induzierte Schäden an Raps und *Arabidopsis*

5.1.1 Wachstum und Photosynthese

Die beiden untersuchten *Brassicaceen* Raps und *Arabidopsis* wiesen einige Ähnlichkeiten bei der *Verticillium*-induzierten Symptomentwicklung auf. Die ersten sichtbaren Symptome traten bei beiden Pflanzenarten ca. 14 Tage nach Inokulation mit *Verticillium longisporum* auf. Das ausgeprägteste Infektionsmerkmal war die Stauchung, die bei Raps durch ein reduziertes Höhenwachstum, bei *Arabidopsis* durch eine geringere Rosettengröße gekennzeichnet war. Auswirkungen auf die Frischmassen der Pflanzen konnten erst zu einem späteren Zeitpunkt nachgewiesen werden. So waren bei *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* die Blätter kleiner und die Petiole kürzer, was sich 35 Tage nach Inokulation auch deutlich auf die Frischmasse der Rosetten auswirkte. Bei Raps war 28 Tage nach Inokulation eine geringere Stängelmasse nachzuweisen, während Wurzel- und Blattmasse gegenüber den Kontrollen nicht reduziert waren. Der Effekt der *Verticillium*-Infektion auf die Frischmasse war im Vergleich zur Stauchung vermutlich weniger deutlich, weil die Anzahl der Blätter sich nicht verringerte, sondern die Stauchung vor allem den Stängel bei Raps bzw. die Blattstängel und Blattgröße bei *Arabidopsis* betraf.

Der Chlorophyllgehalt von Pfefferpflanzen war ab 21 Tage nach Inokulation mit *V. dahliae* im Vergleich zu Kontrollpflanzen reduziert (Goicoechea *et al.*, 2001). In Raps und *Arabidopsis* konnten wir ebenfalls 21 Tage nach Inokulation eine geringfügige, aber signifikante Reduktion des Chlorophyllgehalts bei *Verticillium*-inokulierten im Vergleich zu den mock-inokulierten Pflanzen nachweisen. Vermutlich fiel die Erniedrigung deshalb so gering aus, weil nur einzelne Blätter, vor allem im unteren Bereich der Pflanze von Vergilbungen betroffen waren. Eine Mischprobe aus Blättern zur Messung des Chlorophyllgehaltes führte daher dazu, dass nur eine geringe Abnahme des Chlorophyllgehaltes beobachtet werden konnte. Die Einbußen im Chlorophyllgehalt legten die Frage nahe, ob die *Verticillium*-Infektion die Photosynthese beeinflusste. Ebenfalls an *V. dahliae* infizierten Pfefferpflanzen wurde beobachtet, dass die Photosyntheserate ab der ersten Woche nach Inokulation in den infizierten Pflanzen signifikant geringer war, während die Transpirationsrate pro Blattflächeneinheit 21 Tage nach Inokulation keine Reduzierung aufwies (Goicoechea *et al.*, 2001). Bei den *Verticillium*-inokulierten Rapspflanzen konnten wir 21 Tage nach Inokulation weder eine Reduktion der Photosynthese, noch eine Reduktion der Transpiration feststellen. Es zeigte sich aber ab der ersten Woche nach Inokulation bei Raps und bei *Arabidopsis* ein geringer Unterschied in der Chlorophyllfluoreszenz, die ein Indikator für die Aktivität des Photosystems II ist. Die Chlorophyllfluoreszenz-Messung erfolgte an einzelnen Blättern und da nicht alle Blätter von Symptomen betroffen waren, war bei diesen Messungen je nach ausgewähltem Blatt für die Messung die Schwankungsbreite sehr groß. Bei *Arabidopsis* erwies sich die Messung der Chlorophyllfluoreszenz als schwierig, da nur ausreichend große Blätter in die Halterung des Gerätes passten. Die an Rapsblättern durchgeführten Gaswechselfmessungen konnten bei *Arabidopsis* aufgrund der Gerätegröße nicht durchgeführt werden, aber die geringen Effekte auf die Chlorophyllfluoreszenz und die

Ergebnisse der Messungen an Raps lassen keine größeren Auswirkungen auf den photosynthetischen Gaswechsel erwarten.

Obgleich die Symptome an den *Verticillium*-inokulierten Rapspflanzen eine erfolgreiche Infektion mit *Verticillium* anzeigen, konnten 21 Tage nach Inokulation keine signifikanten Mengen an *Verticillium*-DNA in den Stängeln der infizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Das zeigt, dass zu diesem Zeitpunkt der Pilz noch nicht bis in den Stängel vorgedrungen war, sondern sich vermutlich im Wurzelxylem oder im Hypokotyl befand. Eynck *et al.* (2007) untersuchten die *Verticillium*-DNA Menge in Blättern und im Hypokotyl von Raps im Zeitraum zwischen 7 und 35 Tage nach Inokulation mit *V. longisporum*. In dieser Studie zeigte sich, dass der Pilz schon 7 Tage nach Inokulation im Hypokotyl und 21 Tage nach Inokulation in sehr geringen Mengen in Blättern nachweisbar war. Erst 35 Tage nach Inokulation wurden größere Mengen *V. longisporum* DNA in den Rapsblättern gefunden (Eynck *et al.*, 2007). Die Kolonisierung von *Arabidopsis* mit *V. dahliae* wurde von Veronese *et al.* (2003) anhand von *Verticillium*-Kolonien, die aus *Arabidopsis*-Sprossmaterial auf Agarplatten gewachsen waren, ermittelt. 14 Tage nach Inokulation waren einige wenige Kolonien gewachsen, aber ein deutlicher Anstieg der Kolonienzahl trat erst 35 Tage nach Inokulation ein (Veronese *et al.*, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden 25 Tage nach Inokulation *Verticillium longisporum* infizierte *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich der in Blättern und Blattstängeln enthaltenen *Verticillium*-DNA untersucht. Während zu diesem Zeitpunkt in den Blättern nur sehr geringe Mengen an *Verticillium*-DNA nachzuweisen waren, wurden im Hypokotyl und den Blattstängeln bereits signifikante Mengen *Verticillium*-DNA gefunden. Setzte man die Menge an Pilz-DNA in den Blattstängeln mit der Rosettengröße in Relation so zeigte sich nur eine sehr geringe Korrelation. Bei einigen der Pflanzen, die besonders stark ausgeprägte Symptome zeigten, war überhaupt keine Pilz-DNA in den Blattstängeln nachweisbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl bei Raps als auch bei *Arabidopsis* die Symptome nicht direkt durch den Pilz ausgelöst werden, sondern direkt oder indirekt durch Signale bzw. Toxine des in den Wurzeln befindlichen Pilzes.

5.1.2 Die Nährelementsituation in *Arabidopsis thaliana*

Über die Ursachen von Kümmerwuchs und Stauchung gibt es verschiedene Spekulationen. So könnte z.B. ein Nährstoffmangel durch eine Verstopfung von Gefäßen mit Pilzhyphen oder durch Thyllenbildung der Pflanzen hervorgerufen werden. Auch eine verfrühte Seneszenz im Zusammenhang mit *V. longisporum* Infektion könnte sich in verminderten Nährstoffen widerspiegeln. Bisher ist wenig über die Nährstoffsituation in *Verticillium*-infizierten Pflanzen bekannt. Mit einer Nährelementanalyse an Blättern *Verticillium*-infizierter *Arabidopsis* wurde überprüft, ob die beobachteten Symptome möglicherweise auf einen Nährstoffmangel zurückzuführen sind. Sowohl bei den Haupt- als auch bei den untersuchten Spurenelementen konnte in unserer Untersuchung keine wesentliche Reduktion durch die *Verticillium*-Infektion nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse sprechen dagegen, dass mögliche Verstopfungen der Gefäße zu Nährstofflimitierungen führen. Es handelt sich bei den durch *Verticillium* hervorgerufenen Symptomen also nicht um einen Mangel an Nährstoffen.

Interessanterweise war die Konzentration der Elemente Phosphat und Calcium ab 25 bzw. 28 Tage nach Inokulation bei den *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* deutlich höher als bei den Kontrollen. 35 Tage nach Inokulation war der Calciumgehalt in den *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis*-Blättern um 7 % erhöht, der Phosphatgehalt um 14 %. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Elemente, die nicht umverteilt werden wie z.B. Ca^{2+} akkumulieren und wegen einer geringeren Biomasse der Pflanzen eine höhere Konzentration erreichen.

Wenn auch wenig über die Nährstoffsituation in *Verticillium*-infizierten Pflanzen bekannt ist, so wurde doch der Einfluss von Nährstoffmangel oder -überschuss im Boden oder Medium auf *Verticillium* induzierte Symptome vielfach untersucht (Ashworth *et al.*, 1985; Burge & Simmons, 1982; Kudela & Pirkl, 1978; Sivaprakasam & Rajagopa, 1974; Walker *et al.*, 1954). Durch Kalken des Bodens konnte die Resistenz in *Medicago sativa* gegen *V. albo atrum* erhöht werden (Kudela & Pirkl, 1978). Bei Auberginen- bzw. Tomatenpflanzen führte die erhöhte Zugabe von Stickstoff, Kalium und Phosphor zu einer Verstärkung von *Verticillium*-induzierten Symptomen (Sivaprakasam & Rajagopa, 1974; Walker *et al.*, 1954). Ebenfalls bei Tomaten- und Auberginenpflanzen führte ein Eisenmangel in Nährmedium oder Erde zur Verstärkung *V. dahliae* induzierter Symptome (Macur *et al.*, 1991, Barash *et al.*, 1988). Der Einfluss von Kalium- und Phosphor auf *Verticillium*-infizierte Tomatenpflanzen wurde von Burge and Simmons (1982) untersucht. Hier zeigte sich eine erhöhte Resistenz der Pflanzen unter Kaliummangel, aber eine stärkere Empfindlichkeit bei Phosphormangel. Himmelblau und Amasino (2001) untersuchten die Blattseneszenz bei *Arabidopsis* und konnten zeigen, dass in seneszenten Blättern die Level an C, N, P, S, K, Fe, Cu, Cr und Zn um mehr als 40 % im Vergleich zu nicht-seneszenten Blättern sanken. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass während der Blattseneszenz die Nährstoffe in andere Pflanzenteile, wie z.B. Samen transportiert werden. Die Elemente C, N, P, S, K und Fe wurden bei unserer Analyse ebenfalls berücksichtigt und zeigten bis auf eine leichte Reduktion (unter 8 % zum Zeitpunkt 35 Tage nach Infektion) im Stickstoff und Kohlenstoffgehalt keine Absenkung. Eine frühzeitige Seneszenz der Blätter, hervorgerufen durch *Verticillium longisporum* Infektion scheint also, zumindest auf Ebene der Nährelemente, nicht vorzuliegen.

5.1.3 Der Wasserhaushalt in *Arabidopsis thaliana*

Eine Vermutung beinhaltet, dass Wassermangel eine Ursache für *Verticillium*-bedingte Welkeerscheinungen ist. Daher wurde der Wasserhaushalt der *Arabidopsis thaliana* Blätter in dieser Arbeit untersucht. Wie für den unter 5.1.2 diskutierten Nährstoffmangel könnte auch für einen Wassermangel die Verstopfung von Gefäßen durch Pilzhyphen oder durch Thyllenbildung der Pflanzen verantwortlich sein. Eynck *et al.* (2007) hatte an Rapspflanzen allerdings gezeigt, dass die *V. longisporum* Infektion nur einzelne Xylemelemente betraf, während benachbarte Gefäße völlig frei von Hyphen blieben. In einer Microarray-Analyse *V. longisporum* infizierter *Arabidopsis* wurden keine typischen Trockenstressgene gefunden, die verstärkt exprimiert waren (Tappe *et al.*, submitted). Eine von uns durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchung an Blattstängeln von *Arabidopsis* zeigte keine Hinweise auf Thyllenbildung und bei Betrachtung des Trockenmasseanteils der Blätter konnten wir keinen Unterschied zwischen *Verticillium*-infizierten und Kontrollpflanzen beobachten. Ebenfalls gegen einen Wassermangel sprach der osmotische Druck in den

Arabidopsis Blättern, der bei den infizierten Pflanzen sogar unter denen der Kontrollen lag. Bei Trockenstress würde man einen erhöhten osmotischen Druck erwarten. Daher sprechen diese Ergebnisse insgesamt dagegen, dass *V. longisporum* Wassermangel hervorruft.

5.2 Das extrazelluläre Proteom von *Arabidopsis thaliana* und Raps

5.2.1 Apoplasten-spezifische Proteine in *Arabidopsis thaliana*

In den letzten Jahren wurden mehrere Proteomanalysen über das extrazelluläre Proteom von *Arabidopsis* veröffentlicht (Basu *et al.*, 2006; Bayer *et al.*, 2006; Borderies *et al.*, 2003; Boudart *et al.*, 2005; Charmont *et al.*, 2005; Chivasa *et al.*, 2002; Haslam *et al.*, 2001). Die Methoden zur Gewinnung extrazellulärer Proteine unterscheiden sich dabei deutlich. Während für einige Proteomanalysen die Proteine aus pulverisierten und mehrfach gereinigten Zellwänden stammten (Bayer *et al.*, 2006; Chivasa *et al.*, 2002), wurden für anderen Proteomanalysen apoplastische Waschflüssigkeiten mittels einer Infiltrations-/Zentrifugationstechnik gewonnen (Boudart *et al.*, 2005; Haslam *et al.*, 2001). Extrazelluläre Proteine, die über mehrere Tage in ein flüssiges Kulturmedium sekretiert worden waren, wurden ebenfalls untersucht (Basu *et al.*, 2006; Charmont *et al.*, 2005).

Die in diesen Studien identifizierten Proteine überschneiden sich untereinander nur teilweise und es konnten zwischen 16 Proteinen (Haslam *et al.*, 2001) und 89 Proteinen (Bayer *et al.*, 2006) identifiziert werden (Tab. 5.1). Die vorliegende Arbeit nimmt mit 39 identifizierten Proteinen (plus sechs weiteren unter *Verticillium*-Infektion identifizierten Proteinen) eine mittlere Position ein. In Tabelle 5.1 sind die wichtigsten Studien aufgeführt und es ist die Anzahl der Proteine mit den zugehörigen AGI-Nummern angegeben, die auch in der von uns durchgeführten Untersuchung identifiziert wurden. Die größte Überschneidung ergab sich mit 16 Proteinen zwischen den Publikationen von Bayer *et al.* (2006) und Borderies *et al.* (2003), bei denen Zellwandproteine untersucht worden waren. Eine Erklärung dafür ist, dass bei den Untersuchungen der Zellwandproteine (Bayer *et al.*, 2006; Borderies *et al.*, 2003; Chivasa *et al.*, 2002) mit der Zellwand verbundene Proteine erfasst wurden, während bei den anderen Studien (Basu *et al.*, 2006; Boudart *et al.*, 2005; Charmont *et al.*, 2005) sowie bei unserer Untersuchung sekretierte bzw. sehr leicht aus der Zellwand lösliche Proteine gefunden wurden.

Insgesamt wurden 15 der in der vorliegenden Arbeit identifizierten Proteine auch in vorherigen Untersuchungen gefunden. Die größten Übereinstimmungen ergaben sich mit sechs Proteinen mit der Studie von Boudart *et al.* (2005), in der apoplastische Waschflüssigkeiten aus Rosetten untersucht wurden, wie mit sechs Proteinen, die von *Arabidopsis*-Keimlingen in das verwendete Kulturmedium sezerniert wurden (Charmont *et al.*, 2005). Weniger Übereinstimmungen (2-4 Proteine) zeigten sich im Vergleich mit den Studien, bei denen Zellwände isoliert worden waren (Bayer *et al.*, 2006; Borderies *et al.*, 2003; Chivasa *et al.*, 2002). Zwischen Zellwand Untersuchungen und Analysen von löslichen Proteinen ergaben sich also weniger Übereinstimmungen.

Es gab drei Proteine, die in vier Untersuchungen, diese eingeschlossen, gefunden wurden. Dazu gehören ein Thaumatin-ähnliches PR5 Protein (At1g75040), ein Curculin-ähnliches

Protein (At1g78830) und eine Serinprotease (At5g67360). Alle anderen Proteine tauchten weniger häufig auf. Die geringe Anzahl an Überlappungen zwischen den einzelnen Untersuchungen wirft die Frage auf, wie viele Proteine im extrazellulären Raum noch nicht identifiziert wurden. Die Annotation des *Arabidopsis* Genoms zeigte, dass ca. 17 % des Genoms, d.h. etwa 5000 Gene, für Proteine mit einem Signalpeptid für den sekretorischen Weg kodieren (Jamet *et al.*, 2006). Unter Berücksichtigung alternativen Splicings und posttranslationaler Modifikationen wurde das Zellwandproteom auf 1000-2000 verschiedene Proteine geschätzt (Jamet *et al.*, 2006). Davon wurden bisher insgesamt etwa 300 identifiziert. Dies deutet darauf hin, dass noch deutlich mehr extrazelluläre Proteine identifiziert werden können.

Tab. 5.1: Veröffentlichungen zum extrazellulären Proteom von *Arabidopsis thaliana* aus den letzten Jahren. Proteine, die sowohl in den Veröffentlichungen, als auch in unserer Untersuchung gefunden wurden, sind mit AGI-Nummern angegeben.

Publikation	Untersuchung	Anzahl identifizierter Proteine	Überlappung mit dieser Untersuchung	AGI-Nummern
Chivasa <i>et al.</i> 2002	Zellwandproteine	41	3	At1g78830; At3g08030; At4g30270
Bayer <i>et al.</i> 2006	Zellwandproteine	89	2	At1g78830; At5g08370
Borderies <i>et al.</i> 2003	Zellwandproteine	50	4	At1g78830; At3g15356; At5g05340; At3g49120
Boudart <i>et al.</i> 2005	AWF aus Rosetten	87	6	At5g67360; At3g57260; At1g75040; At1g09750; At1g17860; At5g20630
Charmont <i>et al.</i> 2005	sekretierte Proteine	44	6	At5g67360; At1g75040; At5g06720; At4g12910; At5g20630; At3g49120
Basu <i>et al.</i> 2006	Wurzelexudate	52	4	At5g67360; At3g57260; At1g75040; (AtCg00490)

Aus den zweidimensionalen Gelen der apoplastischen Waschflüssigkeiten (AWF) von *Arabidopsis* Blättern konnten wir 39 Proteinspots identifizieren (Tab. 4.8). Für eine Anzahl von Proteinen, wurde dasselbe Protein in mehreren Spots desselben Gels gefunden. Möglicherweise sind posttranslationale Modifikationen der Grund dafür. Die relative Position von Spots desselben Proteins in einem zwei dimensional Gel deutet darauf hin, dass posttranslationale Veränderungen den isoelektrischen Punkt oder das Molekulargewicht oder beides beeinflussen. Beispielsweise handelt es sich bei den Spots Nr. 10 und 11 (Abb. 4.22), um dasselbe Curculin-ähnliche Protein aus der Lektin-Familie, aber sie unterscheiden sich in ihrem isoelektrische Punkt und auch geringfügig im Molekulargewicht. Bekannte posttranslationale Modifikationen von Proteinen sind beispielsweise Phosphorylierungen, Hydroxylierungen und N- und O-Glycolysierungen. Diese Modifikationen beeinflussen die Struktur, Lokalisierung und Funktion von Proteinen (Jamet *et al.*, 2006). Eine speziell bei

extrazellulären Proteinen vorkommende postranslationale Modifikation betrifft Proteine, die mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker an die Plasmamembran gekoppelt sind. Der GPI-Anker befindet sich am C-Terminus und wird aus einer Peptidkette von 30-40 Aminosäuren gebildet. Der Phosphatidylinositol-Teil des Ankers kann durch spezifische Phospholipasen abgespalten werden, so dass GPI-Anker-Proteine als membrangebundene und als lösliche Form vorkommen können (Bayer *et al.*, 2006; Jamet *et al.*, 2006; Schultz *et al.*, 2004). Für die sekretorischen Proteine, die in der vorliegenden Arbeit identifiziert wurden, konnten mit Hilfe des Programms DGPI zur GPI-Anker-Vorhersage (http://129.194.185.165/dgpi/index_en.html) keine Hinweise auf GPI-Verankerungen gefunden werden.

In dieser Untersuchung wurden auch einige Proteine im Apoplasten gefunden, bei denen es sich vermutlich um intrazelluläre Kontaminationen handelt. Diese werden in Kapitel 5.2.3 näher betrachtet. Proteine, die mit hoher Wahrscheinlichkeit extrazellulär lokalisiert sind, wurden nach ihren Funktionen in verschiedene Gruppen eingeteilt (Tab. 5.2). Eine Gruppe bilden die proteolytischen Enzyme wie die Subtilisin-ähnliche Serinprotease (At5g67360) und die Aspartylproteasen (At5g10760, At3g18490, At1g09750). Weiterhin wurden an der Abwehr beteiligte Proteine gefunden, darunter das Thaumatin-ähnliche PR5 Protein (At1g75040), eine PR2 β -1,3-Glucanase (At3g57260), eine Chitinase (At2g43590) und ein Proteinase Inhibitor, der Endopeptidase Inhibitor (At1g17860). Darüber hinaus wurde ein Proteinbindeprotein (At3g20820) und eine Peroxidase (At5g06720) mit nicht näher untersuchter Funktion gefunden, die aber möglicherweise auch zu den Abwehrproteinen gezählt werden können. Zu den hydrolytischen Proteinen gehören die Hydrolase At4g30270 und die Carboxyester Hydrolasen At1g29660, At1g29670 und At2g46930. Es wurden auch Mitglieder der Glycosylhydrolase Familie gefunden und zwar eine Thioglucosidase (At5g26000) aus der Glycosylhydrolase Familie 1 und eine β -1,4-Xylosidase (At3g19620) aus der Glycosylhydrolase Familie 3. Vier Proteine At3g15356, At3g16530, At5g03350 und das Curculin-ähnliche Protein At1g78830 wurden als Mitglieder der Lektin-Familie identifiziert. Lektine sind zuckerbindende Proteine, die gebundene Kohlenhydrate aber nicht verändern und deren nähere Funktion häufig ungeklärt ist (Rüdiger & Gabius, 2001). Darüber hinaus wurden zwei Proteine (At3g08030 und At1g33640) mit völlig unbekannter Funktion gefunden.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Untersuchung zehn sekretorische Proteine identifiziert, die in keiner der anderen hier diskutierten Proteomanalysen gefunden wurden. Diese Proteine sind in Tabelle 5.2 mit einem Stern gekennzeichnet. Es handelt sich dabei vorwiegend um Lektin-ähnliche Proteine und Hydrolasen.

Tab. 5.2: Funktionseinteilung der identifizierten extrazellulär lokalisierten *Arabidopsis thaliana* Proteine. Proteine, die in keiner der anderen hier diskutierten Proteomanalysen gefunden wurden, sind mit einem Stern gekennzeichnet

Funktion	Protein	AGI-Nummer
Proteolyse	Serinprotease	At5g67360
	Aspartylprotease	At5g10760*, At3g18490, At1g09750
Abwehr	Thaumatin-ähnlich, PR5	At1g75040
	β -1,3-Glucanase, PR2	At3g57260
	Chitinase	At2g43590*
	Endopeptidase Inhibitor	At1g17860
Proteinbindung	Proteinbindeprotein	A3g20820
Peroxidase	Peroxidase	At5g06720
Hydrolyse	Hydrolase (MERI5b)	At4g30270
	Carboxyester Hydrolase	At1g29660*, At1g29670*, At2g46930*
	Thioglucosidase	At5g26000*
	β -1,4-Xylosidase	At3g19620*
Kohlenhydrat-Bindung	Lektin-ähnlich	At3g15356, At3g16530*, At5g03350*
	Curculin-ähnlich	At1g78830
Unbekannt	unbekanntes Protein	At3g08030, At1g33640*

5.2.2 Apoplasten-spezifische Proteine in Raps

Zur Proteinzusammensetzung im Xylemsaft von Raps liegen bereits umfassende Untersuchungen vor (Buhtz *et al.*, 2004; Kehr *et al.*, 2005). So konnten aus zweidimensionalen Gelen 69 der häufigsten Proteine identifiziert werden (Kehr *et al.*, 2005), darunter Peroxidasen, Proteasen, PR-Proteine, Lektin-ähnliche Proteine und Proteine, die möglicherweise an Zellwandmodifikationen beteiligt sind, d. h. offenbar ein ähnliches Spektrum wie hier im *Arabidopsis*-Apoplasten gefunden wurde (siehe 5.2.1). Dagegen wurde die Proteinzusammensetzung in apoplastischen Waschflüssigkeiten von Raps noch nicht näher untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die dominanten Proteine aus den apoplastischen Waschflüssigkeiten von Raps zu identifizieren. Aus einem zweidimensionalen Gel von apoplastischen Rapsproteinen konnten 18 Spots identifiziert werden (Tab. 4.4), die neun verschiedenen Proteinen zuzuordnen waren. Vermutlich liegen hier, wie bereits unter 5.2.1 beschrieben, posttranslationale Modifikationen der Proteine vor, die zu Verschiebungen im Molekulargewicht und beim isoelektrischen Punkt führen. So wiesen beispielsweise die Proteine aus drei Spots Ähnlichkeit zu einer α -Arabinofuranosidase aus *Arabidopsis* (ARAF; At3g10740) bzw. *Raphanus sativus* auf. Das Gen At3g10740 kodiert für eine bifunktionale α -Arabinofuranosidase/ β -D-Xylosidase, die zur Glycosylhydrolase Familie 51 gehört und möglicherweise am Zellwandumbau mitwirkt (Minic *et al.*, 2004). Bei der Untersuchung sekretierter *Arabidopsis* Proteine wurde diese α -Arabinofuranosidase ebenfalls gefunden (Charmont *et al.*, 2005), wobei sie in Raps

wesentlich dominanter vorzukommen scheint. Möglicherweise spielt das Protein in Raps eine wichtigere Rolle als in *Arabidopsis*.

Es wurden außerdem an der pflanzlichen Abwehr beteiligte Proteine gefunden, darunter eine Glucanase, eine Chitinase und eine Peroxidase (At2g18150). In den *Arabidopsis* Proteomstudien von Borderies *et al.* (2003) und Charmont *et al.* (2005) wurde die Peroxidase (At2g18150) ebenfalls identifiziert. Die im Blattapoplasten von Raps gefundene Aspartylprotease (At5g10760) und Carboxyl-Ester Hydrolase (At1g29660) wurden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls im Blattapoplasten von *Arabidopsis* identifiziert, aber in keiner der anderen erwähnten Analysen zu extrazellulären Proteomen. Das Ortholog des im extrazellulären Rapsproteom identifizierten Germins (At5g20630) wurde in *Arabidopsis* unter *Verticillium*-Einfluss verändert und konnte außerdem in den Studien von Boudart *et al.* (2005) und Charmont *et al.* (2005) identifiziert werden. Im Rapsapoplasten wurden darüber hinaus zwei Proteine mit unbekannter Funktion (At2g15130, At5g09770) gefunden, die in keiner der *Arabidopsis* Proteomanalysen oder den Xylemsaftanalysen in Raps gefunden wurden.

Fünf der im Rapsapoplasten dominant vorkommenden Proteine, waren auch bei *Arabidopsis* dominant vorhanden, ein Hinweis darauf, dass sich die extrazellulären Proteome von Raps und *Arabidopsis* stark ähneln.

5.2.3 Kontamination mit intrazellulären Proteinen

In den AWF von *Arabidopsis* wurden mehrere Proteine gefunden, für die Signalpeptide für einen Transport in die Mitochondrien oder Chloroplasten vorhergesagt wurden (Tab. 4.8). Daher könnte es sich bei diesen um symplastische Kontaminationen handeln. Jedoch ist die Vorhersage auch mit Unsicherheiten versehen. Im Gegensatz zu der apoplastischen Proteomanalyse in *Arabidopsis* konnten in den apoplastischen Waschflüssigkeiten von Raps keine eindeutigen symplastischen Kontaminationen wie z.B. mit Rubisco nachgewiesen werden. Es wurden lediglich Ähnlichkeiten zu zwei Proteinen aus *Brassica rapa* bzw. *Raphanus sativus* gefunden, die kein Signalpeptid für den sekretorischen Weg aufwiesen. Eine Analyse der Malatdehydrogenase Aktivitäten ergab für *Arabidopsis* im Schnitt 0,003 % (Tab. 4.6) Kontamination und für Raps 0,006 % (Tab. 4.1). Obwohl sich die Größenordnung der Kontamination bei der Analyse der beiden Pflanzenarten nicht unterschied, waren in den AWF von *Arabidopsis* im Gegensatz zu Raps eindeutige Kontaminationen vor allem durch das dominante intrazelluläre Protein Rubisco im Gel nachzuweisen. Um die Kontaminationen durch symplastische Proteine in den AWF von *Arabidopsis* näher zu untersuchen, wurden die relativen Intensitäten von 3 Hauptproteinen in Gesamtblattextrakten mit deren Intensitäten in den AWF verglichen (Abb. 4.23 und Tab. 4.10). Diese Kontaminationsanalyse ergab eine Kontamination von ca. 0,05 % was einer etwa 10fach höheren Kontamination entspricht, als aus den Malatdehydrogenase-Aktivitäten berechnet wurde.

Die Problematik völlig reine apoplastische Proteinextrakte zu erhalten, zeigte sich bereits in anderen extrazellulären Proteomstudien (Haslam *et al.*, 2003; Basu *et al.*, 2006). Haslam *et al.* (2003) verglichen zweidimensional aufgetrennte Proteine aus Gesamtblattextrakten mit apoplastischen Waschflüssigkeiten und hatten massive intrazelluläre Kontaminationen in ihren AWF, was vor allem am dominanten Spot für Rubisco im Apoplasten-Gel deutlich wurde. In der Studie von Basu *et al.* (2006) wurde sogar in Wurzelexudaten von *Arabidopsis*

Rubisco gefunden, ebenso wie einige andere Proteine mit Signalpeptiden zu nicht-sekretorischen Orten.

Bei einigen der in dieser Arbeit identifizierten Proteine ist die Vorhersage für das Signalpeptid ziemlich unsicher, besonders wenn die Sicherheit der Signalpeptidvorhersage mit einer *reliability class* von 3 bis 5 als gering eingestuft wurde. Dies trifft ebenfalls bei der Analyse von Basu *et al.* (2006) für mehrere Proteine zu. So weisen bei unserer Untersuchung beispielsweise die Proteine Serin-Hydroxymethyltransferase (SHM 1; At4g37930), Chaperonin 10 (At1g14980) und eine Aspartylprotease (At3g18490 bzw. At3g18500) unsichere Signalpeptidvorhersagen auf. Bei der Identifizierung der Aspartylprotease konnte nicht eindeutig zwischen den Aspartylproteasen At3g18490 und At3g18500 unterschieden werden. Die beiden Proteine weisen aber unterschiedliche Signalpeptide auf. Für At3g18490 wurde ein Signalpeptid für Chloroplasten (RC 5) vorhergesagt, für At3g18500 ein Signalpeptid für Mitochondrien (RC 4). Die Signalpeptidvorhersagen waren für beide Proteine unsicher. Außerdem weist die Aspartylprotease At3g18490 auch eine starke Homologie zu zwei weiteren Aspartylproteasen mit Signalpeptid für den sekretorischen Weg auf, und zwar mit den AGI-Nummern At1g25510 (RC 4) und At3g20015 (RC 2). In diesem Fall konnte durch unsere Analyse nicht abschließend geklärt werden, um welche der Aspartylproteasen es sich handelt.

Wie bereits erwähnt, wurden auch in anderen Untersuchungen des extrazellulären Proteoms Proteine ohne eindeutiges Signalpeptid gefunden, weshalb diskutiert wurde, ob diese Proteine über alternatives Gewebe-spezifisches Splicing oder einen alternativen Signalweg aus der Zelle geschleust werden (Basu *et al.*, 2006; Chivasa *et al.* 2002; Slabas *et al.*, 2004). Außerdem wurden Proteine gefunden, die verschiedene Funktionen in unterschiedlichen Kompartimenten haben. Ein klassisches Beispiel hierfür ist eine tierische Laktatdehydrogenase, die als glycolytisches Enzym im Cytosol und als Strukturprotein in den Linsen tierischer Augen vorkommt (Brunekreef *et al.*, 1996). Damit wurde gezeigt, dass ein Protein sowohl katalytische, als auch strukturelle Funktion in unterschiedlichen Kompartimenten haben kann. Slabas *et al.* (2004) diskutierten das Vorkommen des gleichen Proteins in unterschiedlichen Kompartimenten anhand einer mitochondrialen Citratsynthase und eines luminalen Bindeproteins aus dem Endoplasmatischen Retikulum, welche sie im Zellwandproteom von *Arabidopsis thaliana* gefunden hatten. Letztendlich bleibt für die Zukunft zu klären, über welche alternativen Wege Proteine möglicherweise aus der pflanzlichen Zelle in den extrazellulären Raum geschleust werden können.

5.3 Proteinantworten auf *V. longisporum* Infektion und mögliche Funktionen der differentiell auftretenden Proteine

5.3.1 Das extrazelluläre Proteom von *Arabidopsis* unter *Verticillium*-Einfluss

Unter *Verticillium*-Einfluss wurden im Blattapoplasten von *Arabidopsis* sieben differentiell auftretende Proteine durch Proteomanalyse identifiziert. Sechs davon traten durch *Verticillium*-Infektion verstärkt auf, ein Protein in geringerem Maß. Zusätzlich wurden in einer

Expressionsanalyse unter *Verticillium*-Einfluss erhöhte mRNA-Level für eine Chitinase beobachtet. Tappe *et al.* (submitted) wiesen in einer Microarray-Analyse 18 Tage nach *V. longisporum* Infektion 52 differentiell regulierte Gene nach, wovon 48 hoch- und 4 herabreguliert waren. Ein in der Microarray-Analyse hochreguliertes Gen (At4g37520 bzw. At4g37530) und ein herabreguliertes Gen (At3g16530) wurden in der vorliegenden Arbeit im Apoplasten ebenfalls als differentiell auftretende Proteine identifiziert. In der Proteomanalyse wurden nur apoplastische Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 97 kDa erfasst. Stark saure oder alkalische apoplastische Proteine wurden nicht erfasst, ebenso wie in geringer Kopienzahl auftretende Proteine wie die nur durch Expressionsanalyse erfasste Chitinase. Bezogen auf die Anzahl der in der Microarray-Analyse (Tappe *et al.*, submitted) differentiell exprimierten Gene ist die geringe Anzahl der im Apoplasten differentiell aufgetretenen Proteine also nicht verwunderlich. Allerdings scheint die Anzahl der durch *Verticillium*-Infektion differentiell regulierten Gene mit 52 generell niedrig zu liegen. Im Vergleich wurden beispielsweise bei Infektion mit dem nekrotrophischen Pilz *Botrytis cinerea* 621 hochregulierte Gene gefunden (AbuQamar *et al.*, 2006). Mittels Proteomanalyse wurden bei Behandlung von *Arabidopsis*-Zellkulturen mit pilzlichem Elicitor aus *Fusarium* 154 differentiell auftretende Proteine gefunden (ca. 10 % der insgesamt gefundenen Proteine), von denen 45 (3 % der insgesamt gefundenen Proteine) identifiziert werden konnten (Chivasa *et al.*, 2006). In unserer Untersuchung lag die Anzahl der differentiell auftretenden Proteine mit 9 von 220 bei 4,1 %, und mit 7 Proteinen konnten 3,2 % identifiziert werden. Möglicherweise ist die vorwiegende Lokalisation von *Verticillium* im Xylem der Grund für die weniger starke Pathogenantwort von *Arabidopsis* beispielsweise im Vergleich zu nekrotischen Pilzen.

Im Folgenden werden die in der Proteomanalyse des *Arabidopsis*-Apoplasten durch *V. longisporum* Infektion differentiell aufgetretenen Proteine einzeln diskutiert. Die wichtigsten Veröffentlichungen im Zusammenhang mit diesen Proteinen sind in Tabelle 5.3 zusammengestellt.

Unter den in der vorliegenden Proteomanalyse verstärkt auftretenden Proteinen befand sich ein Serin-Carboxypeptidase-ähnliches Protein (At4g12910). Die Serin-Carboxypeptidasen sind Mitglieder der α/β Hydrolase Familie, die eine Ser-Asp-His Abfolge zur Spaltung von carboxyterminalen Peptidbindungen ihrer Substrate nutzen (Liao & Remington, 1990; Ollis *et al.*, 1992). Eine bioinformatische Analyse der Serin-Carboxypeptidase ähnlichen Genfamilie aus *Arabidopsis* wurde von Fraser *et al.* (2005) veröffentlicht. Diese Autoren identifizierten insgesamt 51 Mitglieder von Serin-Carboxypeptidase ähnlichen Proteinen (SCLPs). Dabei zeigte eine phylogenetische Analyse, dass sich die Mehrheit der SCLPs in zwei Hauptgruppen einteilen ließ (Fraser *et al.*, 2005). Nach dieser Einteilung gehört die von uns identifizierte Serin-Carboxypeptidase der ersten Klasse an, wobei diese nach Fraser *et al.* (2005) in zwei Untergruppen zerfiel. Hierbei gehört die Serin-Carboxypeptidase At4g12910 in die Gruppe IB, in der sich nur die beiden Proteine At4g12910 und At3g25420 befinden. Die beiden Proteine weisen eine hohe Ähnlichkeit ihrer Aminosäuresequenzen von 62 % bzw. 66 % mit einem Wund- und Jasmonat-induzierbaren SCLP aus Tomate (Acc. No. AF242849) auf (Moura *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 2005). Die Ähnlichkeit der von uns unter *Verticillium* Stress als stärker exprimiert identifizierten SCLP At4g12910 zu der Wund- und Jasmonat

(JA)-induzierbaren SCLP aus Tomate spricht für eine Rolle von SCLP At4g12910 in der Abwehr von *Arabidopsis*. Ab 28 Tage nach Inokulation wurden erhöhte JA-Level in *V. longisporum* infizierten *Arabidopsis* nachgewiesen (Tappe *et al.*, submitted). Die unveränderten Krankheitssymptome bei *Arabidopsis* Mutanten, denen JA fehlte, deuteten aber darauf hin, dass JA für die *Arabidopsis/Verticillium* Interaktion nicht relevant ist (Tappe *et al.*, submitted). Laut Genevestigator Analyse war das Gen At4g12910 durch JA nicht induzierbar, aber durch eine Mischung aus Brassinoliden und H₃BO₃ und auch durch Abscisinsäure. Dies spricht dafür, dass das Gen SCLP At4g12910 in *Arabidopsis* anders reguliert wird als das SCLP AF242849 in Tomate. In der Genevestigator Analyse (Abb. 4.27) war der einzige biotische Stress unter der das Gen hochreguliert vorlag, die Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Botrytis cinerea*, während *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* und Mykorrhiza keine Auswirkung auf SCLP At4g12910 hatten und Nematoden, sowie der Oomycet *Phytophthora infestans* (Krautfäule) und der Pilz *Erysiphe persicae* (Mehltau) zu einer Herabregulation führten.

Ein weiteres durch *Verticillium*-Infektion in *Arabidopsis* verstärkt auftretendes Protein war eine α -Galactosidase (At5g08370). Das Protein wurde bei Proteomanalysen der Zellwand nachgewiesen und der Glycosylhydrolase Familie 27 zugeordnet (Bayer *et al.*, 2006). Die Lokalisation des Proteins in der Zellwand von *Arabidopsis* wurde von Chrost *et al.* (2007) mittels GUS-Reporter bestätigt. Heterozygote At5g08370 T-DNA Insertionsmutanten hatten eine größere Anzahl an Rosettenblättern mit einer gewellten Oberfläche. Daher wurde eine mögliche Rolle der α -Galactosidase (At5g08370) in der Blattformung durch Lockerung der Zellwand und Zellwandausdehnung diskutiert (Chrost *et al.*, 2007). Der Einfluss einer Überexpression dieses Gens auf die Blattformung wurde bisher noch nicht untersucht, aber die veränderte Blattformung, kleinere und gewölbte Blätter bei *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* in unserer Untersuchung, könnte möglicherweise im Zusammenhang mit der verstärkten Expression des Gens At5g08370 stehen.

Das hier verstärkt aufgetretene Germin-ähnliche Protein (At5g20630) wurde auch in anderen Proteomstudien als sekretiertes Protein gefunden (Boudart *et al.*, 2005; Charmont *et al.*, 2005). Die Expression des Gens At5g20630 war in *Arabidopsis* durch Inokulation mit dem pilzlichen *Brassicaceen* Schädling *Colletotrichum higginsianum* signifikant induziert (Narusaka *et al.*, 2004). Die Genevestigator Analyse (Abb. 4.27) zeigte vor allem eine Hochregulierung des Gens durch Lichtstress, aber auch durch biotischen Stress mit Mehltau (*Erysiphe orontii*). Von Carter *et al.* (1998) wurde die Funktion von Germin und Germin-ähnlichen Proteinen diskutiert. Germin wurden als Oxalatoxidasen beschrieben (Lane, 1994), die die Oxidation von Oxalat zu CO₂ und H₂O₂ katalysieren. Da die Produktion von H₂O₂ für die Peroxidase katalysierte Vernetzung von Zellwandkomponenten erforderlich ist, könnte Germin so zur Verstärkung von Zellwänden und zur Pathogenabwehr beitragen. Alternative Funktionen in der Pathogenabwehr wären die Produktion von H₂O₂ als antimikrobielle Substanz und als Signalgeber für Abwehrreaktionen wie z.B. Phytoalexinsynthese (Carter *et al.*, 1998). Bei dem in dieser Untersuchung gefundenen Germin-ähnlichen Protein handelt es sich um das GER3 Protein, das bereits von Membré *et al.* (2000) untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass GER3 nicht in die H₂O₂-Bildung

mit Oxalat als Substrat involviert ist (Membré *et al.*, 2000). Es ist aber nicht ausgeschlossen, dass andere Co-Substrate zur H₂O₂ Produktion verwendet werden können.

Es wurde auch ein Germin-artiges Protein mit Aktivität als Protease-Inhibitor im Blattapoplasten von Weizen nach Infektion mit *Septoria tritici* nachgewiesen (Segarra *et al.*, 2003). In dieser Studie inhibiert das Germin-ähnliche Protein die Aktivität einer Serinprotease im Apoplasten. Dagegen wurde in unserer Untersuchung eine verstärkt auftretende Serin-Carboxypeptidase gefunden. In einer Untersuchung von Staiger *et al.* (1999) wurde beobachtet, dass das GER3-Gen eine zyklisch-regulierte Transkription aufwies, wobei die höchste Expression zu Beginn der Dunkelphase lag.

Unter *Verticillium*-Infektion traten im Blattapoplasten von *Arabidopsis* drei Peroxidasen verstärkt auf. Durch Aktivitätsmessungen wurde zusätzlich gezeigt, dass die Peroxidase-Aktivität im Blattapoplasten von *Arabidopsis* stark erhöht war. Die klassischen Pflanzenperoxidasen gehören der Klasse III an und werden über das Endoplasmatische Reticulum aus der Zelle in die Zellwand oder in die Vakuole transportiert. Die Analyse des *Arabidopsis* Genoms ergab, dass dort 73 Gene für Vollängen Klasse III vorhanden sind (Welinder *et al.*, 2002). In zahlreichen Studien wurde die Funktion von Peroxidasen beschrieben, einige dieser Funktionen stehen im Zusammenhang mit der Abwehr von Pathogenen wie die Verstärkung von Zellwänden als physikalische Barrieren durch Lignifizierung und Suberinisierung, die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies als Signalübermittler bzw. antimikrobielle Substanzen und die erhöhte Produktion von Phytoalexinen (Hiraga *et al.*, 2001). Da Peroxidasen praktisch immer bei der Pathogenabwehr involviert sind, wurden sie als PR 9 Proteine klassifiziert (van Loon *et al.*, 1994). Unter Pathogeneinfluss werden Peroxidasen sezerniert und bei dem vaskulären Pathogen *Xanthomonas oryzae* akkumulierte eine kationischen Peroxidase im Apoplasten von Mesophyllzellen sowie in Zellwänden und Gefäßlumina von Xylemelementen (Young *et al.*, 1995). Laut Genevestigator Analyse (Abb. 4.27) werden alle drei in dieser Untersuchung unter *Verticillium*-Stress hochregulierten Peroxidasen auch bei biotischem Stress durch *Botrytis cinerea* und *Agrobacterium tumefaciens* hochreguliert. Die Peroxidase At5g05340 wurde außerdem im Zusammenhang mit Ozon-induziertem oxidativen Stress induziert (Ludwikow *et al.*, 2004). Die Peroxidase At3g49120 dagegen scheint in die Wurzelelongation involviert zu sein (Passardi *et al.*, 2006) und wurde mit der Pathogenantwort auf *Pseudomonas syringae* in Zusammenhang gebracht (Bindschedler *et al.*, 2006). Die Gensequenz der Peroxidase At4g37530 wies 92 % Homologie zu der Peroxidase At4g37520 auf (Yang *et al.*, 2005). Die in dieser Arbeit gefundenen Peptide könnten also sowohl zu der Peroxidase At4g37530 als auch zu At4g37520 gehören. Welche Funktionen, die drei unter *Verticillium*-Stress verstärkt auftretende Peroxidase-Proteine übernehmen ist noch offen. Der erhöhte Ligningehalt in *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* (Abb. 4.28) spricht für eine Funktion einer oder mehrerer verstärkt auftretender Peroxidasen, eventuell auch im Zusammenspiel mit dem Germin-ähnlichen Protein, in der Lignifizierung. Durch die Lignifizierung könnte die Ausdehnung der Zellen verhindert werden und so zu dem beobachteten reduzierten Wuchs führen. In früheren Untersuchungen wurde ebenfalls über die Rolle der Lignifizierung des Xylems als erste physikalische Barriere gegen eine Infektion mit *Verticillium dahliae* diskutiert (Smith & Dubery, 1997; Pomar *et al.*, 2004). An

Pfefferpflanzen zeigten Pomar *et al.* (2004), dass im gleichen Zeitraum in dem die Peroxidase-Aktivität nach Inokulation mit *Verticillium dahliae* anstieg der Gesamtigningehalt in den Stängeln signifikant erhöht wurde. Nach 28 Tagen betrug der Ligninanstieg sogar bis zu 40 % im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Dies könnte auf eine Schutzfunktion von Lignin hinweisen. So zeigten Debode *et al.* (2004), dass durch Lignin-reiche Substrate in der Erde die Anzahl der *Verticillium longisporum* Mikrosklerotien reduziert werden konnte.

Unter *Verticillium*-Einfluss trat ein Lectin-ähnliches Protein (At3g16530) weniger stark auf als in den Kontrollen. Dies war überraschend, da dieses Protein durch Behandlung mit Chitin-Oligomeren induziert wird (Zhang *et al.*, 2002; Ramonell *et al.*, 2005). Die beschriebene Induktion des Lectin-ähnlichen Proteins mit Chitin ließe erwarten, dass bei Infektion mit einem Pilz wie *Verticillium*, der Chitin in der Zellwand enthält (Pegg & Brady, 2002), das Protein vermehrt auftreten würde. Allerdings wurde die Induzierbarkeit mit Chitin-Oligomeren nach 30 min überprüft (Zhang *et al.*, 2002). Vielleicht tritt die verstärkte Expression des Gens At3g16530 nur zu sehr frühen Zeitpunkten vorübergehend auf. Die Genevestigator Analyse (Abb. 4.27) zeigt, dass das Gen At3g16530 bei den meisten biotischen und chemischen Stresssituationen stärker exprimiert wird, während eine Herabregulierung vor allem bei Licht- und Hitzestress erfolgt. Die beiden letztgenannten Stressfaktoren können hier mit Sicherheit ausgeschlossen werden da die Anzucht der *Arabidopsis* unter kontrollierten Licht- ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) und Temperaturbedingungen ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) in einem Klimaschrank zusammen mit den Kontrollpflanzen erfolgte. Die geringere Expression über den gesamten von uns untersuchten Verlauf von 10 bis 35 Tage nach Infektion ist verwunderlich und legt nahe, dass *V. longisporum* in der Lage ist die Expression dieses Gens zu unterdrücken. Ob dies für die erfolgreiche Besiedelung durch den Pilz von Bedeutung ist, bleibt zu untersuchen.

Eine erhöhte Chitinase-Aktivität als Antwort auf pilzliche Pathogene wurde vielfach beschrieben (Li *et al.*, 2003; Samac und Shah, 1991; Yun *et al.*, 1996). Die Akkumulation von Chitinasen nach Pathogeninfektion wurde von Joosten und De Wit (1989) und von Rep *et al.* (2002) beschrieben und auch bereits im Zusammenhang mit *Verticillium dahliae* diskutiert (Berg *et al.*, 2001; McFadden *et al.*, 2001). Bei einer Untersuchung der Proteine des Xylemsaftes von *Fusarium oxysporum* infizierten Tomaten war die Chitinase aufgrund geringer Expression nur mittels Immunodetektion nachzuweisen (Rep *et al.*, 2002). Auch die von uns untersuchte Chitinase At5g24090 wurde nur gering exprimiert, weshalb das Protein im Gel nicht nachzuweisen war. Mittels Genexpressionsanalyse konnten wir aber das erhöhte Vorkommen von RNA für diese Chitinase (At5g24090) in *Verticillium*-infizierten Pflanzen nachweisen. Das Gen für diese Endochitinase wurde ebenfalls durch Infektion mit dem Pathogen *Rhizoctonia solani* induziert (Samac & Shah, 1991).

Es wurde gezeigt, dass die Überexpression von Chitinasen das Pilzwachstum in transgenen Pflanzen hemmen kann (Broglie *et al.*, 1991; Jach *et al.*, 1995). Daher untersuchten wir die Chitinase T-DNA Insertionsmutante im Hinblick auf ihre Empfindlichkeit gegenüber dem Pilz *Verticillium longisporum*. Eine Überexpression des Chitinase-Gens At5g24090 in der Mutante eröffnete die Möglichkeit, dass die Mutante weniger empfindlich auf die Pilzinfektion reagiert. Allerdings konnte in der vorliegenden Untersuchung keine erhöhte Resistenz bei Infektion mit *Verticillium longisporum* durch die Überexpression der Chitinase At5g24090 im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

Die Chitinase-Aktivität in den Gesamtblattextrakten der T-DNA Insertionsmutante war deutlich erhöht gegenüber dem Wildtyp, dagegen war die Aktivität in der AWF nicht erhöht. Eventuell ist die Chitinase (At5g24090) also nicht im Apoplasten sondern in der Vakuole lokalisiert. Dagegen spricht allerdings, dass die meisten sauren Chitinasen in den Apoplasten sekretiert werden, während in der Vakuole vor allem basische Chitinasen zu finden sind (Kasprzewska, 2003). Eine andere Vermutung ist, dass die Chitinase durch die Insertion der T-DNA in das zugehörige Gen so verändert wurde, dass sie nicht mehr in den Apoplasten sekretiert werden konnte, sondern sich im Cytoplasma anreicherte. Abschließend bleibt auf jeden Fall festzuhalten, dass die Überexpression des Gens At5g24090 für die Chitinase keinen erkennbaren Schutz gegen die Infektion mit *Verticillium longisporum* bot.

Tab. 5.3: Zusammenstellung der Publikationen zu den unter *Verticillium*-Einfluss differentiell aufgetretenen Proteinen mit dem Namen des Erstautors und einer kurzen Beschreibung des hier relevanten Inhalts der Publikation.

Protein	AGI-Nummer	Autor	Inhalt
Serin-Carboxypeptidase	At4g12910	Fraser <i>et al.</i> 2005	Weist Ähnlichkeit zu einer Wund- und Jasmonat-induzierbaren Serin-Carboxypeptidase in Tomate auf
Germin-ähnliches Protein (GER 3)	At5g20630	Boudart <i>et al.</i> 2005	In AWF von <i>Arabidopsis thaliana</i> Rosetten gefunden
		Carter <i>et al.</i> 1998	Beschreibung von 12 Germin Proteinen
		Chamont <i>et al.</i> 2005	Unter sekretierten Proteinen gefunden
		Membré <i>et al.</i> 2000	Beschreibung von GER 1,2,3
		Narusaka <i>et al.</i> 2004	Induzierbar durch <i>Colletotrichum higginsianum</i>
		Segarra <i>et al.</i> 2003	Germin als Protease-Inhibitor im Blattapoplasten
		Staiger <i>et al.</i> 1999	Zyklische Regulation von GER3
Peroxidase 52	At5g05340	Ludwikow <i>et al.</i> 2004	Verstärktes Auftreten unter Ozon-induziertem oxidativen Stress
Peroxidase 34	At3g49120	Bindschedler <i>et al.</i> 2006	Untersuchung von Peroxidase-abhängigem oxidativem <i>burst</i> in <i>Arabidopsis</i>
		Passardi <i>et al.</i> 2006	Involviert in Wurzelstreckung
Peroxidase	At4g37530	Yang <i>et al.</i> 2005	Gensequenzen von At4g37520 und At4g37530 zu 92 % homolog
α -Galactosidase	At5g08370	Chrost <i>et al.</i> 2007	Funktion in der Blattentwicklung
		Bayer <i>et al.</i> 2006	Im Zellwandproteom gefunden
Chitinase	At5g24090	Passarinho & de Vries 2002	Identifikation von 24 Chitinasen in <i>Arabidopsis</i>
		Samac & Shah, 1991	Induktion durch <i>Rhizoctonia solani</i>
Lektin-ähnliches Protein	At3g16530	Ramonell <i>et al.</i> 2005	Chitin induzierbar
		Zhang <i>et al.</i> 2002	Chitin induzierbar

5.3.2 Das extrazelluläre Proteom von Raps unter *Verticillium*-Einfluss

In verschiedenen Pflanzen wurde nachgewiesen, dass die Infektion mit *V. dahliae* zu einer verstärkten Expression bzw. Aktivität von Glucanasen führt (McFadden *et al.*, 2001; Dubery & Slater, 1997). Im Xylemsaft und in der AWF von Raps konnten wir unter *Verticillium*-Einfluss ebenfalls ein Protein mit Ähnlichkeit zu einer basischen Glucanase aus *Brassica juncea* bzw. zu einer β -1,3-Glucanase (At3g57240) aus *Arabidopsis* identifizieren. Die Expression dieses Proteins war auch unter dem Einfluss von *Pseudomonas syringae* erhöht (Dong *et al.*, 1991). β -1,3-Glucanasen sind Mitglieder der PR-2 Proteine und werden durch Pathogen-Infektion induziert. Sie hydrolysieren β -1,3-Glucan, eine Hauptstrukturkomponente in pilzlichen Zellwänden (Doxey *et al.*, 2007). So konnten beispielsweise auch Rep *et al.* (2002) bei *Fusarium oxysporum* infizierten Tomaten das verstärkte Auftreten einer sauren und einer basischen Glucanase im Xylemsaft nachweisen.

Ein weiteres im Xylemsaft und Blattapoplasten von Raps unter *Verticillium*-Einfluss verstärkt vorkommendes Protein wies Ähnlichkeit zu einem PR-4 Protein (AF528181) aus *Brassica rapa* auf. In *Brassica rapa* wurde gezeigt, dass dieses PR-4 Protein durch Infektion mit *Pseudomonas syringae* induzierbar ist (Park *et al.*, 2005; Ryang *et al.*, 2002). Die Expression des kodierenden Gens für PR-4 wurde durch Ethephon, eine Ethylen-freisetzende Substanz induziert, aber nicht durch SA oder Methyljasmonat (Park *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005). Die genauere Funktion dieses PR-4 Proteins bleibt noch zu klären. Die verstärkte Expression eines PR-4 Proteins wurde außerdem von Fidantsef *et al.* (1999) bei pilzlicher und bakterieller Infektion sowie bei Insektenfraß an Tomaten beobachtet. In *Arabidopsis* zeigte Johansson *et al.* (2006), dass in *Verticillium*-infizierten Pflanzen 7 Tage nach Inokulation die Expression eines Ethylen-abhängigen PR-4 Proteins stark erhöht war. Eine umfassende Analyse von Raps-Xylemsäften wurde von Kehr *et al.* (2005) durchgeführt. Unter den dort identifizierten Proteinen befand sich ebenfalls die von uns identifizierte Glucanase (At3g57240), jedoch nicht das von uns identifizierte PR-4 Protein.

Im Rapsapoplasten konnten weitere differentiell auftretende Proteine identifiziert werden. Dabei handelte es sich um eine Peroxidase und eine basische Endochitinase. Möglicherweise handelt es sich bei der nicht-identifizierten Proteinbande im Xylemsaft mit einem Molekulargewicht von 19 kDa ebenfalls um die mit dem gleichen Molekulargewicht in der AWF auftretende Endochitinase (Abb. 4.2). In Höhe des Molekulargewichts des als Peroxidase im AWF identifizierten Proteins zeigte sich im Xylemsaft unter *Verticillium*-Infektion keine verstärkte Proteinbande.

Ein Protein, das bei Kontrollpflanzen eine weniger starke Bande bildete, wurde im Apoplasten *Verticillium*-infizierter Rapspflanzen aus einem eindimensionalen Gel identifiziert. Dieses Protein wies Ähnlichkeit zu einem hier in *Arabidopsis* gefundenen Germin-ähnlichen Protein auf (GER3, At5g20630; siehe auch Tab. 4.9). Für dieses Protein konnte im Xylemsaft keine Bande beobachtet werden. Auch in den zweidimensionalen Gelen der AWF wurde das Protein nicht als differentiell identifiziert. Wie bereits unter 5.3.1 erwähnt, unterliegt dieses GER3-Gen einer zyklisch-regulierten Transkription (Staiger *et al.*, 1999) mit einer hohen Expression zu Beginn der Dunkelphase. Alle Pflanzen in der vorliegenden Arbeit wurden zwar vormittags, während der Lichtphase geerntet, aber möglicherweise hat sich hier trotzdem ein leichter Effekt durch eine zyklisch-regulierte Transkription gezeigt.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung von Xylemsaft und AWF tauchte die Frage auf, inwiefern der Xylemsaft ein Kontinuum mit den Proteinen des Blattapoplasten bildet. Insgesamt betrachtet unterscheiden sich die Proteinmuster in den Gelen von Xylemsaft und AWF zwar deutlich (Abb. 4.7), was gegen ein absolutes Kontinuum von Xylemsaft- und AWF-Proteinen spricht, aber die *V. longisporum* induzierten Proteinantworten gehen, wie die Beispiele Glucanase und PR-4 Protein zeigen, zumindest zum Teil ineinander über.

5.3.3 *Verticillium*-induzierte Antworten in Raps und *Arabidopsis* im Vergleich

Bei der Untersuchung der beiden *Brassicaceen Arabidopsis* und Raps stellte sich die Frage, ob und inwiefern sich die Spezies in ihrer Reaktion auf *V. longisporum* unterscheiden. Im Hinblick auf die extrazelluläre Proteinantwort wurden sowohl Unterschiede wie auch Gemeinsamkeiten gefunden. In Tabelle 5.4 sind die unter *Verticillium*-Einfluss in *Arabidopsis* und Raps differentiell aufgetretenen Proteine im Vergleich dargestellt.

Tab. 5.4: Unter *Verticillium*-Einfluss in *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* differentiell aufgetretene Proteine im Vergleich. ↑ bedeutet, ein verstärktes Auftreten des Proteins durch *Verticillium*-Infektion, ↓ ein vermindertes Auftreten.

<i>Arabidopsis thaliana</i>		<i>Brassica napus</i>	
Serin Carboxypeptidase	↑	Glucanase	↑
α-Galactosidase	↑	PR-4 Protein	↑
Peroxidase (At5g05340)	↑	Chitinase	↑
Peroxidase (At3g49120)	↑	Peroxidase (At5g05340)	↑
Peroxidase (At4g37530)	↑		
Chitinase	↑		
Germin-ähnliches Protein (GER3)	↑		
Lektin-ähnliches Protein	↓		

In *Arabidopsis* konnten in der AWF als Reaktion auf *Verticillium* drei verstärkt auftretende Peroxidasen gefunden werden, im Rapsapoplasten wurde eine verstärkt auftretende Peroxidase identifiziert. Diese wies Ähnlichkeit zu der Peroxidase At5g05340 aus *Arabidopsis* auf, die auch in *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* als besonders stark hochreguliert identifiziert wurde. Die Peroxidase-Aktivität war in *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen stark erhöht, was bei Raps nicht nachgewiesen werden konnte. Das Germin-ähnliche Protein (At5g20630), das bei *Verticillium*-Infektion in *Arabidopsis* 25 Tage nach Inokulation verstärkt auftrat, trat dagegen in Raps nicht verstärkt auf. Bei Betrachtung der Expression des Gens At5g20630 in *Verticillium*-infizierten *Arabidopsis* im Infektionsverlauf (Abb. 4.25), wird allerdings deutlich, dass die Expression dieses Gens stark

schwankte und nur zu den Zeitpunkten 25 und 35 Tage nach Inokulation signifikant verstärkt auftrat. Auch andere Proteine, wie die Serin Carboxypeptidase, die α -Galactosidase und das Lektin-ähnliche Protein, die im Apoplasten von *Arabidopsis* unter *Verticillium*-Einfluss differentiell auftraten, zeigten sich in Raps nicht differentiell. Dagegen wurden die in Raps durch die Infektion am deutlichsten verstärkten Proteine, die Glucanase und das PR-4 Protein in *Arabidopsis* nicht als differentiell auftretende Proteine identifiziert. Die Reaktionen von *Arabidopsis* und Raps auf *Verticillium* zeigten demnach deutliche Unterschiede. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Infektion in Raps sich in einem anderen Stadium befand als in *Arabidopsis*. Ein Indiz für eine weniger fortgeschrittene Infektion bei Raps ist, dass noch keine Pilz-DNA in den Stängeln nachgewiesen werden konnte, während in den Blattstängeln von *Arabidopsis* zum Untersuchungszeitpunkt deutlich nachweisbare Mengen *Verticillium*-DNA vorhanden waren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Verticillium-Arten sind weltweit in gemäßigten und subtropischen Regionen verbreitete xylembesiedelnde Pilze, die viele ökonomisch bedeutsame Kulturpflanzen befallen. *Verticillium longisporum* ist vor allem auf *Brassicaceen*, wie z.B. Blumenkohl, Senf und Raps spezialisiert. Besonders mit der Intensivierung des Rapsanbaus in Europa wurde ein verstärktes Auftreten von *V. longisporum* zum Problem. Die Bekämpfung des Pilzes in der Landwirtschaft wird sowohl durch die lange Lebensdauer von *Verticillium*-Dauerformen im Boden, als auch durch seine Lebensweise im Xylem erschwert. Ein besseres Verständnis der Interaktionen zwischen *V. longisporum* und seinen Wirtspflanzen ist wichtig, um in Zukunft Strategien zu entwickeln, die eine weitere Verbreitung des Pilzes verhindern.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Beschreibung des extrazellulären Proteoms der *Brassicaceen* Raps (*Brassica napus*) und *Arabidopsis thaliana* unter Einfluss von *Verticillium longisporum*. Raps wurde dabei als Beispiel für eine landwirtschaftlich bedeutsame Pflanze herangezogen, während die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eine geeignete Plattform für molekulare Analysen bot. Methodisch musste für die extrazellulären Proteomanalysen zunächst die Gewinnung von apoplastischen Waschflüssigkeiten und von Xylemsäften optimiert werden. *V. longisporum* bedingte Schäden an den Pflanzen sollten umfassend mit Hilfe ökophysiologische Parameter charakterisiert und in Relation zur Infektionsdauer gesetzt werden. Dies sollte den Vergleich der *Arabidopsis thaliana* Ökotypen Columbia und Landsberg erecta hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber *Verticillium longisporum* ermöglichen und die Grundlage zur Etablierung geeigneter Anzuchtbedingungen für die späteren Proteomanalysen bilden.

Die beiden *Arabidopsis*-Ökotypen Columbia und Landsberg erecta zeigten eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber *V. longisporum*. Aufgrund einer größeren Biomasseproduktion wurde für weitere Analysen der Ökotyp Columbia bevorzugt. Zur Bildung großer Rosetten wurden die *Arabidopsis*-Pflanzen unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht) angezogen, im Gegensatz zu den sonst üblichen Langtagsbedingungen (16 h Licht). So konnten auch Interferenzen der Pilzinfektion mit einer vorzeitigen Blüte verhindert werden.

Zur Charakterisierung von Krankheitssymptomen an *V. longisporum* infizierten Raps- und *Arabidopsis*-Pflanzen wurden Chlorophyllgehalte, Chlorophyllfluoreszenz, Photosynthese, Frischmassen und Blattflächen bzw. Sprosshöhen der Pflanzen gemessen. Besonders deutlich war eine durch den Pilz hervorgerufene Reduktion der Rosettenfläche bei *Arabidopsis* und eine Reduktion der Sprosshöhe bei Raps, die im weiteren Infektionsverlauf auch als Frischmassenverlust nachweisbar war. Bei beiden Pflanzenarten waren durch die Infektion sowohl der Chlorophyllgehalt als auch die mittels Chlorophyllfluoreszenz gemessene maximale photosynthetische Quantenausbeute der Blätter reduziert. Anhand von Elektrolytleitfähigkeitsmessungen konnte gezeigt werden, dass die Zellmembranen der Blätter zum Untersuchungszeitpunkt durch den Pilz nicht geschädigt waren.

Eine Quantifizierung von *Verticillium*-DNA in den oberen Pflanzenteilen mittels quantitativer real time PCR zeigte, dass die Symptomausprägung in keinem direkten Zusammenhang mit der Pilzmenge stand. Dies ist ein Hinweis darauf, dass nicht der direkte Pilzkontakt sondern von *V. longisporum* ausgehende Signale, direkt oder indirekt über die Pflanze, die Symptome an den oberirdischen Pflanzenteilen auslösen. In *Arabidopsis thaliana* wurden zusätzlich der Wasserhaushalt und die Nährstoffsituation in den Blättern überprüft. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass ein möglicherweise durch den Pilz hervorgerufener Trockenstress oder Nährstoffmangel zur Symptomausprägung führt.

Die Anzucht- und Inokulationsbedingungen wurden sowohl für Raps als auch für *Arabidopsis* dahingehend optimiert, dass sich deutlich sichtbare Infektionssymptome zeigten, aber gleichzeitig zur Durchführung von Proteomanalysen genügend Material zur Verfügung stand. Zu einem geeigneten Zeitpunkt wurden apoplastische Waschflüssigkeiten (AWF) mit Hilfe einer Infiltrations-/Zentrifugationstechnik aus Blättern von Raps und *Arabidopsis* zur Charakterisierung und Identifizierung extrazellulärer Proteine gewonnen. Mittels einer Scholander-Druckbombe wurden Xylemsäfte aus Raps extrahiert, aus denen ebenfalls extrazelluläre Proteine identifiziert wurden. Kontaminationen mit symplastischen Proteinen konnten nicht vollständig vermieden werden, obwohl die Aktivität des Markerenzym Malatdehydrogenase in der AWF mit etwa 0,005 % der Aktivität aus Gesamtblattextrakten vergleichsweise gering war.

Da die Zusammensetzung der extrazellulären Proteome von Pflanzen noch nicht vollständig geklärt ist, wurden dominante apoplastische Proteine der nicht-infizierten Pflanzen aus zweidimensionalen Gelen identifiziert. Dieses gelang durch massenspektrometrische Analysen mit anschließender Recherche in der NCBI-Datenbank für 19 Raps- und 39 *Arabidopsis*-Proteine. Bei den identifizierten sekretorischen Proteinen handelte es sich vor allem um proteolytische, hydrolytische, Kohlenhydrat-bindende und an Abwehrreaktionen beteiligte Proteine.

Zur Identifizierung differentiell auftretender apoplastischer Proteine aus *V. longisporum*-infizierten Pflanzen und Kontrollpflanzen wurden jeweils sechs zweidimensionale Gele mittels Proteomweaver Software verglichen und statistisch ausgewertet. Im *Arabidopsis*-Apoplasten konnten durch massenspektrometrische Analysen und anschließende NCBI-Datenbank-Recherche sieben, durch *V. longisporum* Infektion differentiell auftretende Proteine, identifiziert werden. Verstärkt traten eine Serin Carboxypeptidase, eine α -Galactosidase, ein Germin-ähnliches Protein und drei Peroxidasen auf. Quantitative real time PCR Analysen untermauerten die Ergebnisse der Proteomanalyse. Durch Aktivitätsmessungen in den AWF aus infizierten Pflanzen konnten zehnfach erhöhte Peroxidase-Aktivitäten nachgewiesen werden. Ein erhöhter Ligningehalt in den Zellwänden infizierter *Arabidopsis* deutete auf eine Funktion der Peroxidasen in der Verstärkung von Zellwänden zum Schutz vor einem Eindringen des Pilzes hin. Ein Lektin-ähnliches, als Chitin induzierbar beschriebenes Protein, trat im *Arabidopsis*-Apoplasten unter *Verticillium*-Einfluss schwächer auf. Die geringere Expression dieses Gens über den gesamten untersuchten

Infektionsverlauf legte die Vermutung nahe, dass *V. longisporum* in der Lage ist, die Expression des Gens zu unterdrücken. Ob dies für die erfolgreiche Besiedelung durch den Pilz von Bedeutung ist, bleibt zu klären.

Der Raps-Apoplast wies unter *Verticillium*-Einfluss eine verstärkt auftretende Glucanase, eine Chitinase, eine Peroxidase und ein PR4-Protein auf. Im Xylemsaft der infizierten Rapspflanzen konnten die gleiche Glucanase und das gleiche PR4-Protein wie in der AWF als differentiell auftretende Proteine identifiziert werden.

Da Chitinasen häufig im Zusammenhang mit *Verticillium*-Infektionen beschrieben wurden, hier auch in Raps, war das Fehlen von verstärkt vorkommenden Chitinasen im Apoplasten von *Arabidopsis* unerwartet. Genexpressionsanalysen für eine saure Endochitinase mit der AGI-Nummer At5g24090 zeigten nach *Verticillium*-Inokulation eine deutlich erhöhte Expression. Die Überexpression dieses Chitinase-Gens in einer T-DNA Insertionsmutante führte aber im Vergleich zum Wildtyp zu keiner erhöhten Resistenz gegenüber *V. longisporum*.

Die Gesamtbetrachtung der Ergebnisse zeigte, dass eine Infektion mit *V. longisporum* bei Raps und *Arabidopsis* zu einer ähnlichen Symptomausprägung führte. Eine Symptomausprägung durch pilzlich bedingten Trockenstress oder Nährstoffmangel konnte ausgeschlossen werden. Ein direkter Pilzkontakt in den betreffenden Pflanzenteilen ist nach vorliegenden Erkenntnissen für die Symptomausprägung nicht erforderlich. Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass von *V. longisporum* ausgehende Signale, direkt oder indirekt die Symptomausprägung bewirken. Trotz ähnlicher Symptomausprägungen waren die extrazellulären Proteinantworten der beiden Pflanzenarten teilweise verschieden, was eventuell auf unterschiedliche Infektionsstadien zurückzuführen ist. Die nähere Funktion, der unter *Verticillium*-Einfluss differentiell auftretenden Proteine, muss nun funktionell untersucht werden. Für *Arabidopsis* deuten die vorliegenden Ergebnisse auf eine Funktion der Peroxidasen in der Verstärkung von Zellwänden hin.

7. LITERATUR

- Abeles, F. B., Dunn, L. J., Morgens, P., Callahan, A., Dinterman, R. E. & Schmidt, J. (1988). Induction of 33-kd and 60-kd peroxidases during ethylene-induced senescence of cucumber cotyledons. *Plant Physiology* 87, 609-615.
- AbuQamar, S., Chen, X., Dhawan, R., Bluhm, B., Salmeron, J., Lam, S., Dietrich, R. A. & Mengiste, T. (2006). Expression profiling and mutant analysis reveals complex regulatory networks involved in *Arabidopsis* response to *Botrytis* infection. *Plant Journal* 48, 28-44.
- Agrios G.N., (1997). Plant diseases caused by fungi: *Verticillium* wilts. In Agrios G.N. (ed.): *Plant Pathology* 346, Academic Press, San Diego.
- Amaya, I., Botella, M. A., de la Calle, M., Medina, M. I., Heredia, A., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M., Quesada, M. A. & Valpuesta, V. (1999). Improved germination under osmotic stress of tobacco plants overexpressing a cell wall peroxidase. *Febs Letters* 457, 80-84.
- Antoniw, J. F., Ritter, C. E., Pierpoint, W. S. & van Loon, L. C. (1980). Comparison of 3 pathogenesis-related proteins from plants of 2 cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47, 79-87.
- Ashworth, L. J., Gaona, S. A. & Surber, E. (1985). *Verticillium* wilt of pistachio - the influence of potassium nutrition on susceptibility to infection by *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 75, 1091-1093.
- Baker, C. J. & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33, 299-321.
- Barash, I., Zion, R., Krikun, J. & Nachmias, A. (1988). Effect of iron status on *Verticillium* wilt disease and on in vitro production of siderophores by *Verticillium dahliae*. *Journal of Plant Nutrition* 11, 893-905.
- Barbara, D. J. & Clewes, E. (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular Plant Pathology* 4, 297-305.
- Barbara, D. J., Morton, A. & Miller, N. J. (2005). Isolation of microsatellite markers from an interspecific hybrid isolate of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Molecular Ecology Notes* 5, 854-856.
- Basu, U., Francis, J. L., Whittal, R. M., Stephens, J. L., Wang, Y., Zaiane, O. R., Goebel, R., Muench, D. G., Good, A. G. & Taylor, G. J. (2006). Extracellular proteomes of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots: analysis and comparison by MudPIT and LC-MS/MS. *Plant and Soil* 286, 357-376.
- Bayer, E. M., Bottrill, A. R., Walshaw, J., Vigouroux, M., Naldrett, M. J., Thomas, C. L. & Maule, A. J. (2006). *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *Proteomics* 6, 301-311.
- Beckman, C.H. (1964). Host responses to vascular infection. *Annual Review of Phytopathology* 2: 231-252.
- Benhamou, N. (1995). Immunocytochemistry of plant defense mechanisms induced upon microbial attack. *Microsc. Res. Tech.* 31, 63-78.
- Berg, G., Fritze, A., Roskot, N. & Smalla, K. (2001). Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *Journal of Applied Microbiology* 91, 963-971.
- Bergmeyer, H. U. & Rozalskis, G. (1975). Km of malate dehydrogenase from pig heart with oxaloacetate as substrate. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 13, 509.
- Bhat, R. G. & Subbarao, K. V. (1999). Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathology* 89, 1218-1225.

- Blödner, C., Majcherczyk, A., Kües, U. & Polle, A. (2007). Mild drought stress affects the proteome of spruce needles. *Tree Physiology* 27, 1423–1431.
- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D. R., Ausubel, F. M. & Bolwell, G. P. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant Journal* 47, 851-863.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8, 93-99.
- Bohlmann, H. (1994). The role of thionins in plant-protection. *Critical Reviews in Plant Sciences* 13, 1-16.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. & Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367-1376.
- Borderies, G., Jamet, E., Lafitte, C., Rossignol, M., Jauneau, A., Boudart, G., Monsarrat, B., Esquerre-Tugaye, M. T., Boudet, A. & Pont-Lezica, R. (2003). Proteomics of loosely bound cell wall proteins of *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures: A critical analysis. *Electrophoresis* 24, 3421-3432.
- Boudart, G., Jamet, E., Rossignol, M., Lafitte, C., Borderies, G., Jauneau, A., Esquerre-Tugaye, M. T. & Pont-Lezica, R. (2005). Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5, 212-221.
- Bowers, J. H., Nameth, S. T., Riedel, R. M. & Rowe, R. C. (1996). Infection and colonization of potato roots by *Verticillium dahliae* as affected by *Pratylenchus penetrans* and *P. crenatus*. *Phytopathology* 86, 614-621.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. & Lamb, C. J. (1992). Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein - a novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30.
- Brinkmann, K., Blaschke, L. & Polle, A. (2002). Comparison of different methods for lignin determination as a basis for calibration of near-infrared reflectance spectroscopy and implications of lignoproteins. *Journal of Chemical Ecology* 28, 2483-2501.
- Broekaert, W. F. & Peumans, W. J. (1988). Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. *Physiologia Plantarum* 74, 740-744.
- Brogliè, K., Chet, I., Holliday, M., Cressman, R., Biddle, P., Knowlton, S., Mauvais, C. J. & Brogliè, R. (1991). Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Brunekreef, G. A., Kraft, H. J., Schoenmakers, J. G. G. & Lubsen, N. H. (1996). The mechanism of recruitment of the lactate dehydrogenase-B/epsilon-crystallin gene by the duck lens. *Journal of Molecular Biology* 262, 629-639.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B. & Legrand, M. (1998). Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant Journal* 14, 225-234.
- Buhtz, A., Kolasa, A., Arlt, K., Walz, C. & Kehr, J. (2004). Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* 219, 610-618.
- Burge, M. N. & Simmons, J. R. (1982). The influence of potassium and phosphorus in predisposition of tomato to *Verticillium* wilt, *Chemistry and Ecology*, 1:2, 83 – 92.
- Campos, P. S., Quartin, V., Ramalho, J. C. & Nunes, M. A. (2003). Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. *Journal of Plant Physiology* 160, 283-292.

- Carter, C., Graham, R. A. & Thornburg, R. W. (1998). *Arabidopsis thaliana* contains a large family of germin-like proteins: characterization of cDNA and genomic sequences encoding 12 unique family members. *Plant Molecular Biology* 38, 929-943.
- Chalmers, J.M. & Griffiths, P.R. (2002). *Handbook of vibrational spectroscopy*. Vol 1–5. Wiley, Chichester, UK.
- Chang S., Puryear J. & Cairney J. (1993): A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reports* 11: 113-116.
- Charmont, S., Jamet, E., Pont-Lezica, R. & Canut, H. (2005). Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66, 453-461.
- Chen, P., Lee, B. & Robb, J. (2004). Tolerance to a non-host isolate of *Verticillium dahliae* in tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64, 283-291.
- Chittoor, J. M., Leach, J. E. & White, F. F. (1997). Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10, 861-871.
- Chivasa, S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Robertson, D., Yu, X. L., Yu, X. L., Knox, J. P., Bolwell, P. & Slabas, A. R. (2002). Proteomic analysis of the *Arabidopsis thaliana* cell wall. *Electrophoresis* 23, 1754-1765.
- Chivasa, S., Hamilton, J. M., Pringle, R. S., Ndimba, B. K., Simon, W. J., Lindsey, K. & Slabas, A. R. (2006). Proteomic analysis of differentially expressed proteins in fungal elicitor-treated *Arabidopsis* cell cultures. *Journal of Experimental Botany* 57, 1553-1562.
- Chrost, B., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., & Krupinska, K. (2007). An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta* 225, 311-320.
- Cohen-Kupiec, R. & Chet, I. (1998). The molecular biology of chitin digestion. *Current Opinion in Biotechnology* 9, 270-277.
- Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U. & Vad, K. (1993). Plant chitinases. *Plant Journal* 3, 31-40.
- Collins, A., Okoli, C. A. N., Morton, A., Parry, D., Edwards, S. G. & Barbara, D. J. (2003). Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology* 93, 364-376.
- Cooper, R. M., Resende, M. L. V., Flood, J., Rowan, M. G., Beale, M. H. & Potter, U. (1996). Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease-resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* 379, 159-162.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A. & Geiger, J. P. (1997). Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103, 125-136.
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Debode, J., Claeys, D. & Höfte, M. (2004). Control of *Verticillium* wilt of cauliflower with crop residues, lignin and microbial antagonists. *IOBC WPRS Bull* 27, 41–45.
- De Boer, A. H. & Volkov, V. (2003). Logistics of water and salt transport through the plant: structure and functioning of the xylem. *Plant Cell and Environment* 26, 87-101.
- De Gara, L. (2004). Class III peroxidases and ascorbate metabolism in plants. *Phytochemistry Reviews* 3:195–205.

- Dempsey, D. A., Shah, J. & Klessig, D. F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 18, 547-575.
- Dietrich, A., Mayer, J. E. & Hahlbrock, K. (1990). Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein-phosphorylation in parsley cell-suspension cultures. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6360-6368.
- Dietz, K.J. (1997). Functions and responses of the leaf apoplast under stress. *Prog Bot* 58: 221–254.
- Dixelius, C., Happstadius, I. & Berg, G. (2005). *Verticillium* wilt on *Brassica* oilseed crops - A Swedish perspective. *Journal of Swedish Seed Association* 115:36-48.
- Dixon, R. A., Harrison, M. J. & Lamb, C. J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annual Review of Phytopathology* 32, 479-501.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843-847.
- Dong, X. N., Mindrinos, M., Davis, K. R. & 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.
- Doxey, A. C., Yaish, M. W. F., Moffatt, B. A., Griffith, M. & McConkey, B. J. (2007). Functional divergence in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1045–1055.
- Dubery, I. A. & Slater, V. (1997). Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 44, 1429-1434.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. & von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology* 300, 1005-1016.
- Epple, P., Apel, K. & Bohlmann, H. (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal-transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* 109, 813-820.
- Epple, P., Apel, K. & Bohlmann, H. (1997). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520.
- Espelie, K. E., Franceschi, V. R. & Kolattukudy, P. E. (1986). Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato-tuber tissue. *Plant Physiology* 81, 487-492.
- Eynck, C., Koopmann, B., Grunewaldt-Stoecker, G., Karlovsky, P. & von Tiedemann, A. (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* 118, 259-274.
- Fahleson, J., Lagercrantz, U., Hu, Q., Steventon, L. A. & Dixelius, C. (2003). Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109, 361-371.
- Faix, O. (1991). Condensation Indexes of Lignins Determined by FTIR-Spectroscopy. *Holz als Roh- und Werkstoff* 49, 356.
- Feys, B. J. & Parker, J. E. (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16, 449-455.
- Fradin, E. F. & Thomma, B. P. H. J. (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7, 71-86.

- Fraser, C. M., Rider, L. W. & Chapple, C. (2005). An expression and bioinformatics analysis of the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiology* 138, 1136-1148.
- Fry, S. C. (1986). In vivo formation of xyloglucan nonasaccharide - a possible biologically-active cell-wall fragment. *Planta* 169, 443-453.
- García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A. & Moreno, M. (1995). The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* 3: 72-74.
- Gelli, A., Higgins, V. J. & Blumwald, E. (1997). Activation of plant plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiology* 113, 269-279.
- Gerhardt, L. B. D., Magioli, C., Perez, A. B. U. C., Margis, R., Sachetto-Martins, G. & Margis-Pinheiro, M. (2004). AtchitIV gene expression is stimulated under abiotic stresses and is spatially and temporally regulated during embryo development. *Genetics and Molecular Biology* 27, 118-123.
- Goicoechea, N., Aguirreolea, J., Cenoz, S. & Garcia-Mina, J. M. (2001). Gas exchange and flowering in *Verticillium*-wilted pepper plants. *Journal of Phytopathology* 149, 281-286.
- Gold, J. & Robb, J. (1995). The role of the coating response in Craigella tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, race-1 and race-2. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47, 141-157.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. & Weiss, W. (2000). The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21, 1037-1053.
- Görg, A. & Weiss, W. (2000). Two-dimensional electrophoresis with Immobilized pH gradients. In: Proteom research: Two-dimensional gelelectrophoresis and identification methods. Rabilloud (ed.). Springer Verlag Berlin Heidelberg, pp 57-106.
- Green, T.R. & Ryan, C.A. (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* 175: 776-777.
- Grignon, C. & Sentenac, H. (1991). PH and ionic conditions in the apoplast. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 42, 103-128.
- Günzler, H. & Gremlich, H.-U. (2002). IR spectroscopy: An Introduction. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Hamel, F., Boivin, R., Tremblay, C. & Bellemare, G. (1997). Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. *Journal of Molecular Evolution* 44, 614-624.
- Hammond-Kosack, K. E. & Parker, J. E. (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 177-193.
- Harrison, S. J., Curtis, M. D., McIntyre, C. L., Maclean, D. J. & Manners, J. M. (1995). Differential expression of peroxidase isogenes during the early stages of infection of the tropical forage legume *Stylosanthes humilis* by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 8, 398-406.
- Haslam, R. P., Downie, A. L., Raveton, M., Gallardo, K., Job, D., Pallett, K. E., John, P., Parry, M. A. J. & Coleman, J. O. D. (2003). The assessment of enriched apoplastic extracts using proteomic approaches. *Annals of Applied Biology* 143, 81-91.
- Havlis, J., Thomas, H., Sebela, M. & Shevchenko, A. (2003). Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Analytical Chemistry* 75, 1300-1306.
- Heath, M. C. (1998). Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* 104, 117-124.

- Heinrichs, H., Brumsack, H.J., Lofffield, N. & König, N. (1986). Verbessertes Druckaufschlusssystem für biologische und anorganische Materialien. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde 149: 350-353.
- Heinz, R., Lee, S. W., Saparno, A., Nazar, R. N. & Robb, J. (1998). Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. Physiological and Molecular Plant Pathology 52, 385-396.
- Henrissat, B. (1991). A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid-sequence similarities. Biochemical Journal 280, 309-316.
- Himmelblau, E. & Amasino, R. M. (2001). Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. Journal of Plant Physiology 158, 1317-1323.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y. & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. Plant Cell Physiol. 42, 462-468.
- Hong, J. K., Jung, H. W., Kim, Y. J. & Hwang, B. K. (2000). Pepper gene encoding a basic class II chitinase is inducible by pathogen and ethephon. Plant Science 159, 39-49.
- Jabs, T., Dietrich, R. A. & Dangl, J. L. (1996). Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. Science 273, 1853-1856.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. & Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 4800-4805.
- Jach, G., Gornhardt, B., Mundy, J., Logemann, J., Pinsdorf, P., Leah, R., Schell, J. & Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. Plant Journal 8, 97-109.
- Jamet, E., Canut, H., Boudart, G. & Pont-Lezica, R. F. (2006). Cell wall proteins: a new insight through proteomics. Trends in Plant Science 11, 33-39.
- Johansson, A., Staal, J. & Dixelius C. (2006). Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on *NDR1*, *JA*- and *ET*-associated signals via cytosolic *NPR1* and *RFO1*. MPMI 19, 958-969.
- Joosten, M. H. A. J. & De Wit, P. J. G. M. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. Plant Physiology 89, 945-951.
- Jung, H. W. & Hwang, B. K. (2000). Pepper gene encoding a basic β -1,3-glucanase is differentially expressed in pepper tissues upon pathogen infection and ethephon or methyl jasmonate treatment. Plant Science 159, 97-106.
- Karapapa, V. K., Bainbridge, B. W. & Heale, J. B. (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. Mycological Research 101, 1281-1294.
- Kasprzewska, A. (2003). Plant chitinases - Regulation and function. Cellular & Molecular Biology Letters 8, 809-824.
- Kehr, J., Buhtz, A. & Giavalisco, P. (2005). Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. BMC Plant Biology 5.
- Kitajima, M. & Butler, W.L. (1975). Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. Biochim biophys Acta 376: 105-115.
- Kombrick, E., Schroder, M. & Hahlbrock, K. (1988). Several pathogenesis-related proteins in potato are β -1,3-glucanases and chitinases. Proc Natl Acad Sci USA 85:782-786.

- Kristensen, B. K., Bloch, H. & Rasmussen, S. K. (1999). Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology* 120, 501-512.
- Krüger, W. (1989). Untersuchungen zur Verbreitung von *Verticillium dahliae* Kleb. und anderen Krankheits- und Schaderregern bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes* 41, 49-56.
- Kruse, J., Hetzger, I., Mai, C., Polle, A. & Rennenberg, H. (2003). Elevated pCO₂ affects N-metabolism of young poplar plants (*Populus tremula* x *P. alba*) differently at deficient and sufficient N-supply. *New Phytologist* 157, 65-81.
- Kudela, V. & Pirkel, J. (1978). Influence of soil pH and calcium nutrition on resistance of alfalfa to bacterial and *Verticillium* wilt. *Zentralbibliothek Bakteriologische Naturwissenschaften* 133, 503-511.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagrimini, L. M., Burkhart, W., Moyer, M. & Rothstein, S. (1987). Molecular-cloning of complementary-DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco - Molecular analysis and tissue-specific expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 7542-7546.
- Lagrimini, L. M., Joly, R. J., Dunlap, J. R. & Liu, T. T. Y. (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant Molecular Biology* 33, 887-895.
- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 251-275.
- Lane, B. G. (1994). Oxalate, germin, and the extracellular-matrix of higher-plants. *FASEB Journal* 8, 294-301.
- Lay, F. T. & Anderson, M. A. (2005). Defensins - Components of the innate immune system in plants. *Current Protein & Peptide Science* 6, 85-101.
- Legrand, M., Kauffmann, S., Geoffroy, P. & Fritig, B. (1987). Biological function of pathogenesis-related proteins - 4 tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 6750-6754.
- Li, Y. C., Chang, C. T., Hsiao, E. S. L., Hsu, J. S. F., Huang, J. W. & Tzen, J. T. C. (2003). Purification and characterization of an antifungal chitinase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. *Plant Cell Physiol.* 44, 1162-1167.
- Liao, D. I. & Remington, S. J. (1990). Structure of wheat serine carboxypeptidase II at 3.5 Å resolution - A new class of serine proteinase. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6528-6531.
- Lichtenthaler, H.K. & Wellburn, A.R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 11: 591-592.
- Ludwikow, A., Gallois, P. & Sadowski, J. (2004). Ozone-induced oxidative stress response in *Arabidopsis*: Transcription profiling by microarray approach. *Cellular & Molecular Biology Letters* 9, 829-842.
- Macur, R. E., Mathre, D. E. & Olsen, R. A. (1991). Interactions between iron nutrition and *Verticillium* wilt resistance in tomato. *Plant and Soil* 134, 281-286.
- Mauch, F., Hadwiger, L. A., & Boller, T. (1984). Ethylene - Symptom, not signal for the induction of chitinase and β-1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiology* 76, 607-611.
- Mattsson, A. (1996). Predicting field performance using seedling quality assessment. *New Forests* 13: 223-248.

- Maxwell, K. & Johnson, G.N. (2000). Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51, 659-668.
- McFadden, H. G., Chapple, R., de Feyter, R. & Dennis, E. (2001). Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58, 119-131.
- McNabb, K. & Takahashi, E. (2000). Freeze damage to loblolly pine seedlings as indicated by conductivity measurements and outplanting survival. Auburn University Southern Forest Nursery Management Cooperative. Research Report 00-4.
- Melchers, L. S., Apotheker-de Groot, M., Vanderknaap, J., Ponstein, A. S., Selabuurlage, M. B., Bol, J. F., Cornelissen, B. J. C., Vandenzelen, P. J. M. & Linthorst, H. J. M. (1994). A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. *Plant Journal* 5, 469-480.
- Membré, N., Bernier, F., Staiger, D. & Berna, A. (2000). *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* 211, 345-354.
- Metraux, J. P., Streit, L. & Staub, T. (1988). A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 33, 1-9.
- Meyer, R., Slater, V. & Dubery, I. A. (1994). A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 35, 1449-1453.
- Minic, Z., Rihouey, C., Do, C. T., Lerouge, P. & Jouanin, L. (2004). Purification and characterization of enzymes exhibiting β -D-xylosidase activities in stem tissues of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 135, 867-878.
- Mol, L. & van Riessen, H. W. (1995). Effect of plant-roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 101, 673-678.
- Mol, L. (1995). Effect of plant-roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae* 2. Quantitative-analysis of the luring effect of crops. *European Journal of Plant Pathology* 101, 679-685.
- Mouille, G., Robin, S., Lecomte, M., Pagant, S. & Höfte, H. (2003). Classification and identification of *Arabidopsis* cell wall mutants using Fourier-Transform Infrared (FT-IR) microspectroscopy. *The Plant Journal* 35, 393-404.
- Moura, D. S., Bergey, D. R. & Ryan, C. A. (2001). Characterization and localization of a wound-inducible type I serine-carboxypeptidase from leaves of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Planta* 212, 222-230.
- Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Musgrave, M. E. (2000). Realizing the potential of rapid-cycling *Brassica* as a model system for use in plant biology research. *Journal of Plant Growth Regulation* 19, 314-325.
- Nachmias, A., Buchner, V., Tsrer, L., Burstein, Y. & Keen, N. (1987). Differential phytotoxicity of peptides from culture fluids of *Verticillium dahliae* races 1 and 2 and their relationship to pathogenicity of the fungi on tomato. *Phytopathology* 77, 506-510.
- Nachmias, A., Orenstein, J., Tal, M. & Goren, M. (1990). Reactions to a *Verticillium dahliae* phytotoxin in tissue-cultures derived from susceptible and tolerant potato. *Plant Science* 68, 123-130.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Park, P., Kubo, Y., Hirayama, T., Seki, M., Shiraishi, T., Ishida, J., Nakashima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Kobayashi, M. & Shinozaki, K. (2004). RCH1, a locus in *Arabidopsis* that confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17, 749-762.

- Naumann, A., Navarro-Gonzalez, M., Peddireddi, S., K ues, U. & Polle, A. (2005). Fourier transform infrared microscopy and imaging: Detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology* 42, 829-835.
- Neuhaus, J. M., Fritig, B., Linthorst, H. J. M., Meins, F., Mikkelsen, J. D., & Ryals, J. (1996). A revised nomenclature for chitinase genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 14, 102-104.
- Neuhoff, V. (1990). Colloid coomassie blue staining of proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 371, A10-A11.
- Okushima, Y., Koizumi, N., Kusano, T. & Sano, H. (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* 42, 479-488.
- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., Harel, M., Remington, S. J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J. L., Verschueren, K. H. G. & Goldman, A. (1992). The α/β -hydrolase fold. *Protein Engineering* 5, 197-211.
- Park, Y.-S. & Cho, T.-J. (2003). Isolation and characterization of methyl jasmonate-inducible genes in chinese cabbage. *Korean Journal of Biological Sciences* 7: 337-343.
- Park, Y.-S., Jeon, M. H., Lee, S.-H., Moon, J. S., Cha, J.-S., Kim H. Y. & Cho, T.-J. (2005). Activation of defense responses in chinese cabbage by a nonhost pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 38, 748-754.
- Passardi, F., Penel, C. & Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* 9, 534-540.
- Passardi, F., Cosio, C., Penel, C. & Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, 255-265.
- Passardi, F., Tognolli, M., De Meyer, M., Penel, C. & Dunand, C. (2006). Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation. *Planta* 223, 965-974.
- Passarinho, P.A. & de Vries, S.C. (2002). *Arabidopsis* chitinases: A genomic survey. In CR Somerville, EM Meyerowitz, eds, *The Arabidopsis Book*.
- Pegg, G. F. (1976). Response of ethylene-treated tomato plants to infection by *Verticillium albo atrum*. *Physiological Plant Pathology* 9, 215-872226.
- Pegg, G.F. & Brady, B.L. (2002). *Verticillium* wilts. Wallingford, UK: CABI Publishing.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29.
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST [®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30.
- Plochl, M., Lyons, T., Ollerenshaw, J. & Barnes, J. (2000). Simulating ozone detoxification in the leaf apoplast through the direct reaction with ascorbate. *Planta* 210, 454-467.
- Polle, A., Chakrabarti, K., Schurmann, W. & Rennenberg, H. (1990). Composition and properties of hydrogen-peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of norway spruce (*Picea-Abies* L, Karst). *Plant Physiology* 94, 312-319.
- Polle, A., Schwanz, P. & Rudolf, C. (2001). Developmental and seasonal changes of stress responsiveness in beech leaves (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Cell and Environment* 24, 821-829.

- Pomar, F., Novo, M., Bernal, M. A., Merino, F. & Barcelo, A. R. (2004). Changes in stem lignins (monomer composition and crosslinking) and peroxidase are related with the maintenance of leaf photosynthetic integrity during *Verticillium* wilt in *Capsicum annuum*. *New Phytologist* 163, 111-123.
- Pugin, A., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. & Guern, J. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9, 2077-2091.
- Pütter, J. (1970). Peroxidasen. *Methoden der enzymatischen Analyse*. 3rd ed. H. U. Bergmayer, ed. Chemie, Weinheim, Germany, 725-731.
- Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J. R., Edwards, H., Stacey, G. & Somerville, S. (2005). Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 138, 1027-1036.
- Rep, M., Dekker, H. L., Vossen, J. H., de Boer, A. D., Houterman, P. M., Speijer, D., Back, J. W., de Koster, C. G. & Cornelissen, B. J. C. (2002). Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiology* 130, 904-917.
- Rivera-Becerril, F., Metwally, A., Martin-Laurent, F., Van Tuinen, D., Dietz, K. J., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (2005). Molecular responses to cadmium in roots of *Pisum sativum* L. *Water Air and Soil Pollution* 168, 171-186.
- Rohacek, K. (2002). Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40, 13-29.
- Rüdiger, H. & Gabius, H. J. (2001). Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate Journal* 18, 589-613.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. & Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Ryang, S.-H., Chung, S.-Y., Lee, S.-H., Cha, J.-S., Kim, H. Y. & Cho, T.-J. (2002). Isolation of pathogen-induced chinese cabbage genes by subtractive hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299, 352-359.
- Samac, D. A. & Shah, D. M. (1991). Developmental and pathogen-induced activation of the *Arabidopsis* acidic chitinase promoter. *Plant Cell* 3, 1063-1072.
- Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 305-310.
- Scholander, P. F., Hammel, H. T., Bradstre, E. D. & Hemmings, E. A. (1965). Sap pressure in vascular plants - Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148, 339-346.
- Schraudner, M., Ernst, D., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1992). Biochemical-plant responses to ozone. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco-leaves. *Plant Physiology* 99, 1321-1328.
- Schreiber, L.R. & Green, R.J. (1969). Effect of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology* 53, 260-264.
- Schröder, M., Hahlbrock, K. & Kombrink, E. (1992). Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant Journal* 2, 161-172.
- Schultz, C. J., Ferguson, K. L., Lahnstein, J. & Bacic, A. (2004). Post-translational modifications of arabinogalactan-peptides of *Arabidopsis thaliana* - Endoplasmic reticulum and glycosylphosphatidylinositol-anchor signal cleavage sites and hydroxylation of proline. *Journal of Biological Chemistry* 279, 45503-45511.

- Segarra, C. I., Casalongue, C. A., Pinedo, M. L., Ronchi, V. P. & Conde, R. D. (2003). A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases. *Journal of Experimental Botany* 54, 1335-1341.
- Séné, C. F. B., McCann, M. C., Wilson, R. H. & Grinter, R. (1994). Fourier-transform raman and Fourier-transform infrared-spectroscopy - An Investigation of 5 higher-plant cell-walls and their components. *Plant Physiology* 106, 1623-1631.
- Showalter, A. M. (1993). Structure and Function of Plant-Cell Wall Proteins. *Plant Cell* 5, 9-23.
- Sivaprakasam, K. & Rajagopa, C. K. (1974). Effect of nitrogen on incidence of *Verticillium* wilt disease of egg plant caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant and Soil* 40, 217-220.
- Slabas, A. R., Ndimba, B., Simon, W. J. & Chivasa, S. (2004). Proteomic analysis of the *Arabidopsis* cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations. *Biochemical Society Transactions* 32, 524-528.
- Smit, F. & Dubery, I. A. (1997). Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry* 44, 811-815.
- Somerville, C. & Koornneef, M. (2002). Timeline - A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics* 3, 883-889.
- Somssich, I. E., Schmelzer, E., Bollmann, J. & Hahlbrock, K. (1986). Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding pathogenesis-related proteins in cultured parsley cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 2427-2430.
- Staiger, D., Apel, K. & Trepp, G. (1999). The Atger3 promoter confers circadian clock-regulated transcription with peak expression at the beginning of the night. *Plant Molecular Biology* 40, 873-882.
- Steventon, L. A., Okori, P. & Dixelius, C. (2001). An investigation of the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to isolates of two species of *Verticillium*. *Journal of Phytopathology* 149, 395-401.
- Steventon, L. A., Happstadius, I., Okori, P. & Dixelius, C. (2002). Development of a rapid technique for the evaluation of the response of *Brassica napus* to *Verticillium* wilt. *Plant Disease* 86, 854-858.
- Tappe, H., Floerl, S., Carsjens, J.G., Ratzinger, A., Dilcher, M., Karlovsky, P., Feussner, I., Polle, A. & Gatz, C. (submitted). Expression profiling of *Arabidopsis thaliana* plants after infection with the xylem-colonizing fungus *Verticillium longisporum*.
- Terras, F.R.G., Schoofs, H., De Bolle, M.F.C., Van Leuven, F., Rees, S.B., Vanderleyden, J., Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F. (1992). Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds. *J. Biol. Chem.* 267: 15301-15309.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z. G., Wei, Y. D. & Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11, 1187-1194.
- Tjamos, E. C. & Beckman, C. (1989). Problems and prospects in controlling *Verticillium* wilt. 441-456 in: *Vascular Wilt Diseases of Plants*. E. C. Tjamos and C. Beckman, eds. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Van Loon, L.C. (1982). Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In: *Active Defense Mechanisms in Plants* (R.K.S. Wood, ed.), pp. 247-273, Plenum Press, New York, USA.
- Van Loon, L. C., Pierpoint, W., Boller, T. & Conejero, V. (1994). Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12, 245-264.

- Van Loon, L. C., Rep, M. & Pieterse, C. M. J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135-162.
- Vera, P. & Conejero, V. (1988). Pathogenesis-related proteins of tomato - P-69 as an alkaline endoproteinase. *Plant Physiology* 87, 58-63.
- Veronese, P., Narasimhan, M. L., Stevenson, R. A., Zhu, J. K., Weller, S. C., Subbarao, K. V. & Bressan, R. A. (2003). Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 35, 574-587.
- Vitale, A. & Denecke, J. (1999). The endoplasmic reticulum - Gateway of the secretory pathway. *Plant Cell* 11, 615-628.
- Walker, J. C., Gallegly, M. E., Bloom, J. R. & Scheffer, R. P. (1954). Relation of plant nutrition to disease development. *Verticillium* wilt of tomato. *American Journal of Botany* 41, 760-762.
- Wei, Y. D., Zhang, Z. G., Andersen, C. H., Schmelzer, E., Gregersen, P. L., Collinge, D. B., Smedegaard-Petersen, V. & Thordal-Christensen, H. (1998). An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 36, 101-112.
- Weigel, R. R., Pfitzner, U. M. & Gatz, C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17, 1279-1291.
- Welinder, K. G. (1992). Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Current Opinion of Structural Biology* 2, 388-393.
- Welinder, K. G., Justesen, A. F., Kjaersgard, I. V. H., Jensen, R. B., Rasmussen, S. K., Jespersen, H. M., & Duroux, L. (2002). Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 269, 6063-6081.
- Whetten, R. W., MacKay, J. J. & Sederoff, R. R. (1998). Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49, 585-609.
- Wilhelm, S. (1955). Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. *Phytopathology* 45, 180-181.
- Wilkinson, S. & Davies, W. J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell and Environment* 25, 195-210.
- Williams, J. S., Hall, S. A., Hawkesford, M. J., Beale, M. H. & Cooper, R. M. (2002). Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. *Plant Physiology* 128, 150-159.
- Williams, P. H. & Hill, C. B. (1986). Rapid-cycling populations of *Brassica*. *Science* 232, 1385-1389.
- Yang, W., Jefferson, R. A., Huttner, E., Moore, J. M., Gagliano, W. B. & Grossniklaus, U. (2005). An egg apparatus-specific enhancer of *Arabidopsis*, identified by enhancer detection. *Plant Physiol.* 139, 1421-1432.
- Young, S. A., Guo, A., Guikema, J. A., White, F. F. & Leach, J. E. (1995). Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Plant Physiol.* 107, 1333-1341.
- Yun, D. J., Durzo, M. P., Abad, L., Takeda, S., Salzman, R., Chen, Z. T., Lee, H., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1996). Novel osmotically induced antifungal chitinases and bacterial expression of an active recombinant isoform. *Plant Physiology* 111, 1219-1225.
- Zeise, K. & von Tiedemann, A. (2002). Application of RAPD-PCR for virulence type analysis within *Verticillium dahliae* and *V. longisporum*. *Journal of Phytopathology* 150, 557-563.

Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S. & Stacey, G. (2002). Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15, 963-970.

Zhang, Z. G., Collinge, D. B. & Thordal-Christensen, H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal* 8, 139-145.

Zhou, Z. (2000). Untersuchungen zum Blatt- und Wurzelmetabolismus sowie zum Phloem- und Xylemtransport in Zusammenhang mit der Stickstoff-Effizienz bei Raps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, 48-92.

Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. & Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2751-2755.

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AGI	<i>Arabidopsis Genome Initiative</i>
<i>al.</i>	<i>altera</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AWF	apoplastische Waschflüssigkeit
BCA	<i>Bicinchoninic acid</i>
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfat
C/N	Kohlenstoff/Stickstoff
CTAB	Cetyltrimethylammoniumchlorid
dd H ₂ O	doppelt demineralisiertes Wasser
d. h.	das heißt
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ET	Ethylen
FM	Frischmasse
g	Gramm
GuPOD	Guajakolperoxidase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
JA	<i>jasmonic acid</i> , Jasmonsäure
kDa	Kilodalton
KPP	Kaliumphosphatpuffer (KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ -Puffer)
L	Liter
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie
M	Molar, mol/L
MDH	Malatdehydrogenase
mg	Milligramm
ml	Milliliter
MEA-Puffer	MOPS-EDTA-Natriumacetat Puffer
min	Minute
MOPS	3-N-Morpholino-propansulfonsäure
MPa	Megapascal

MW	Molekulargewicht
n	nano (10^{-9})
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	<i>pathogen related</i>
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
POX	Peroxidase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/-oxygenase
s	Sekunde
SA	<i>salicylic acid</i> , Salicylsäure
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SCLP	Serin Carboxypeptidase ähnliches Protein
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SSTE-Puffer	Natriumchlorid-SDS-Tris-EDTA-Puffer
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Trockenmasse
T_m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Triton X-100	Octylphenol-polyethylenglycol
U	Unit
v/v	Volumen pro Volumen
VL43	<i>Verticillium longisporum</i> Stamm 43
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
μ	mikro (10^{-6})

At4g37530	TTCTAGCGTCACAGGG AAGCTACCCAAACCGACCTT TGATCTCAACCAACTCA-ATGCAC	537
At5g06720	CGCCGGTGCAAATTTCGT CATTCCTTCTCCATCGAAA GCCTAAGCAACATCACATTTAA	690
At5g05340	AGCGGCAGCGAATAGTAACATTCGGGCACCGACTTCGAGTCTGAGCCAACCTCA-TTAGTA	591
At3g49120	GGAACTCGCTAATGCAAATCTTCCAGCTCCATTCCTTTACACTTCCACAACCTTA-AAGCCA	709
	* * * * *	
At4g37530	TTTTTCGCAGAAAACGGTCTTA--GCCCTAATGACATGATCGCTCTCTCCGGGGCACACA	594
At5g06720	ATTTT-CGGCTGTCCGGCTTA--ATACAAACGATCTGGTAGCCTTATCTGGTGCGCATA	746
At5g05340	GTTTCAGTGTCTGGACTC--TCCACCAGAGATATGGTTGCTCTCTCTGGCGCACACA	648
At3g49120	GCTTCAGAAATGTTGGTCTCGATCGTCTTCTGATCTCGTTGCTCTCTCCGGTGGTCACA	769
	** * * * * *	
At4g37530	CATTAGGATTTCGCGCATTGCACAAAAGTTTTCAATCGGCTATACAATTTCAACAAGACAA	654
At5g06720	CGTTCGGGCGTGTCTCGATGTGGAGTATTCAACAACAGACTATTTAACTTCAGCGGGACAG	806
At5g05340	CGATCGGACAAATCCCGTTGCACGAACTTCCGAGCGAGAATCTACAA-----CGAGACAA	702
At3g49120	CATTTGGTAAAAATCAATGTGAGTTTATTCTTGACAGATTATACAATTTTCAGCAACACAG	829
	* * * * *	
At4g37530	ATAACGTGGATCCACGATTAACAAAGATTACGTGACAGA GCTAAAAGCGTCGTCTCTC	714
At5g06720	GAAATCCCGATCCAACCTCTAAACTCAACGCTTCTGAGCACCTTCAACAGCTATGTCTCTC	866
At5g05340	ACAT--CAATGCCGCTTCCGCCACGACACGTCAACGAACCTGCCCTAGAGC--CTCCG	756
At3g49120	GTTTACCGACCCTACACTCAACTACTTACTCCAAACTCTTCGTGGACTATGCCCC	889
	* * * * *	
At4g37530	AAAACATAGATCCAAGAGTGGCTATTAACATGGATCCCAATACCCAAGACAATTCGACA	774
At5g06720	AAAACGGTAGCGCATCAACGATCAACCAATCTTGATTTGAGCACACCAGATGCGTTTCGATA	926
At5g05340	GTTCCGGCAGCGGAAA--CTTAGCTCCACTAGACGTCAACGAGCTCACCACGGCAGCTTCTTCGACA	813
At3g49120	TTAATGGCAATCGAAGTGCCCTGGTAGATTTTGATCTACGTACGCTACGGTTTTTCGACA	949
	* * * * *	
At4g37530	ACGTTTACTACAAAACTTGCAACAAGGGAAAGGATTGTTTCAGTCTGATCAAG--TCT	831
At5g06720	ACAATTACTTCGCCAACCTTCAGAGCAACGATGGACTTCTTCAGTCAAGACCAAGAGCTGT	986
At5g05340	ACAATACTTCAAGAATCTCATGACTCAGAGAGGGCTCCTCCATTCCGACCAAG--TGC	870
At3g49120	ACAAATACTACGTGAATCTCAAAGAGCGAAAAGGCTTATCCAGAGCGACCAAGAGTTGT	1009
	** * * * * *	
At4g37530	TATTCACCGATAGTCCGGTCAA--AGC-CAACCGTTG-----ACTTATGGGCTAATAATG	882
At5g06720	TCTCTACCACCGGTTTCATCCACCATCGCGATTGTTA-----CTTCGTTCCGAAGTAACC	1040
At5g05340	TCTTCAACGGCGGC--TCTACTGACTCCATCGTCC-----GTGGATAACGCAACAATC	921
At3g49120	TCTCTAGCCCAAT--GCCACTGACACAATCCCTTGGTGAGAGCATATGCTGATGGCA	1066
	* * * * *	
At4g37530	GACAGTTGTTTAATCAAGCTTTTATTAGCTCGATGATCAAGCTTGGTCTGTTGGTGTGTTA	942
At5g06720	AGACTCTGTTTTTTTCAGGCCTTTGACAGTCCATGATCAATATGGGGAATATTAGTCCCT	1100
At5g05340	CGTTCGAGCTTAACTCTGACTTCACGGCGGCGATGATAAAAAATGGGTGATATCAGCCCGT	981
At3g49120	CACAAACATTTCTCAATGCAATTTGTGGAGGCAATGAATAGGATGGGAAAACATTACACCAA	1126
	** * * * * *	
At4g37530	AAACTGGTAGTAATGGTAATATTCGTCTGATGTCGGGAGCTTTCAATT--AATTTAAATA	1000
At5g06720	TGACTGGGAGTAATGGAGAGATTAGGTTAGACTGTAAGAA--GGTT--AATGGAAGTT	1154
At5g05340	TGACTGGTAGTACGGTGAAATCCGCAAGGTTGCGGGAGGACCAACT--GATTCAGATC	1039
At3g49120	CTACAGGAACTCAAGGACAAATCAGATTGAACTGTAGAGTTGTGAACTCCAACCTC--TC	1183
	** * * * * *	
At4g37530	TATCTGTTTAAAGATATTGTTTATTGCACTCATTTGTATTGGGATTTGGGAATGGGATGG	1060
At5g06720	GATTTCCCTAAAGCTCATTTTCTTTGAAAAACAT-TGGCAAGCTTTGG--TTGAATAA	1210
At5g05340	TACTCCACGTCTTTTTTCTATTGGATTTACTTTTATTATTGAGTTGGTGTGATATAA	1099
At3g49120	TGCTCCATG-ATGTGGTGGATATCG--TTGAC--TTTGTAGCTCTAT--GTGAGAATTG	1236
	* * * * *	
At4g37530	GTCTCATGAAGCTGGTT-CAGCTAAAATGTA-ATAATTCTGGTT--TTGGGTTTTAGTT-	1115
At5g06720	TTTTTTGTTATCATAATCACATCAAATCTGTA-TGCACTTAAATCATTCTAAGCAAATT-	1268
At5g05340	TAAAGATTGATCTTCTCCAAAAAATTCGAAGGTCCTTTTCAATGTTTTTTTTTTGTTT	1159
At3g49120	TTTACCCAATATGTGGCTACAAGAATACATATATTAATGAATAAAACTCTCAAGAC--	1294
	** * * * * *	
At4g37530	---TGCTATATATCGCAAAACTAAATTGTAGATATGGAGTGGCAAAAAGGAAATAATATA	1172
At5g06720	---TATGATAAAT---GAAATTAATCAAAAC-----	1294
At5g05340	CTTTGCTTTGTGTTGAAGTGTGATTTCCGCATTAATAATCTAATGAAAATTTATTCATT	1219
At3g49120	-----GTTTACTTGAGAACATTTATTTTAGTT-----	1321
	* * * * *	
At4g37530	CATGATTAGTCCCAATGGGCAATGAC	1198
At5g06720	-----	
At5g05340	TTG-----	1222
At3g49120	-----	

9.2 Überprüfung der T-DNA Insertion in das Chitinase-Gen At5g24090

Die Länge der codierenden Sequenz des Chitinase-Gens beträgt 909 bp, wobei die T-DNA nach Basenpaar 846 bp inseriert ist. Mittels PCR-Analyse wurde die T-DNA Insertion in das Zielgen überprüft (Abb. 8.1). Mit den Gen-spezifischen Primern RP und dem T-DNA Primer LBb1 wurde ein 600 bp großes PCR-Produkt amplifiziert, welches zeigt, dass die untersuchten Pflanzen homozygot für die T-DNA Insertion in das Gen At5g24090 sind. Die Wildtyp (WT) Pflanzen dienten als Negativkontrolle, hier wurde kein PCR-Produkt im Gel sichtbar.

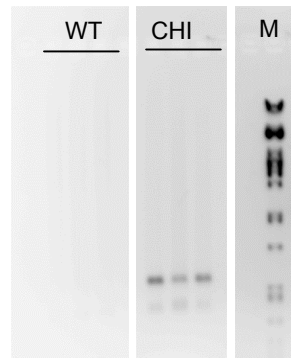


Abb. 8.1: Insertionsüberprüfung der T-DNA. Das Agarosegel zeigt Wildtyp (WT) *Arabidopsis* als negative Kontrolle und die Chitinase Mutante (CHI) mit inserierter T-DNA jeweils aus drei Blattproben von verschiedenen Pflanzen. Zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Teichmann.

9.3 Expressionsvergleich des Chitinase-Gens At5g24090 in Wildtyp- und Mutanten-Pflanzen

In Abbildung 8.2 ist die Expression des Chitinase-Gens At5g24090 unter Einfluss von *Verticillium longisporum* dargestellt. In mock-inokulierten Wildtyp-Pflanzen war keine sichtbare Expression nachzuweisen. Die Behandlung mit *Verticillium* (VL43) führte bei den Wildtyp-Pflanzen zu einer verstärkten Expression. Bei der Chitinase-Mutante wurde erwartet, dass eine Insertion von T-DNA in ein Exon die Transkription des Gens verhindern würde. Stattdessen zeigte die T-DNA Insertionsmutante eine konstitutiv hochregulierte Expression, die durch *Verticillium*-Infektion nicht noch stärker erhöht wurde.

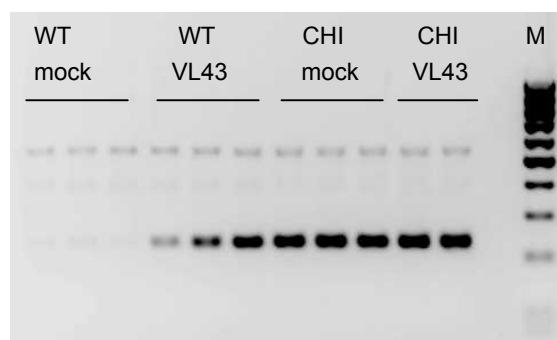


Abb. 8.2: Expressionsanalyse des Chitinase-Gens At5g24090 in mock- und *Verticillium longisporum* (VL43)-infizierten Wildtyp (WT) *Arabidopsis* und der Chitinase T-DNA Insertionsmutante (CHI) aus jeweils drei bzw. zwei unterschiedlichen Pflanzen. Zur Verfügung gestellt von Dr. Thomas Teichmann.

DANKSAGUNG

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Polle für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die damit verbundene Betreuung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich Ihr für die vielen hilfreichen Anregungen, sowohl während der experimentellen Arbeit, als auch beim Schreiben dieses Manuskripts. Für weitere Anregungen möchte ich mich vor allem bei der gesamten *Verticillium*-Forschergruppe in Göttingen bedanken. Die monatlichen Treffen haben immer viele neue Aspekte ans Licht gebracht. Besonders möchte ich mich hier bei Hella Tappe und Jan-Gerrit Carsjens für die nette Zusammenarbeit während der großen *Arabidopsis*-Versuche bedanken und natürlich bei Nadine Riediger für ihre Hilfe und ihre Tipps zur Anzucht von Raps, der an unserem Institut bis dahin „fremd“ war. Der Arbeitsgruppe von Prof. Karlovsky danke ich für die vielen *Verticillium* real time Analysen. Frau Prof. Gatz möchte ich hier außerdem für die Übernahme des Korreferats danken. Für die finanzielle Unterstützung meines Projekts innerhalb der *Verticillium*-Forschergruppe danke ich der DFG.

In der Forstbotanik bedanke ich mich besonders bei Monika Franke-Klein für viele kleine und große Hilfestellungen im Labor und bei Thomas Klein für die Hilfe bei den Expressionsanalysen, verbunden mit der Weitergabe vieler kleiner nützlicher Tricks. Andrzej Majcherczyk und Mojtaba Zomorodi danke ich für die massenspektrometrischen Analysen. Viele andere Mitarbeiter haben mich während meiner Arbeit unterstützt, denen ich hiermit allen Danke sagen möchte, vor allem aber Marianne Smiatasz für ihre ganzen „Heinzelmännchenarbeiten“ und Bernd Kopka für die Hilfe bei Computerproblemen und beim Drucken der Poster - und für den Kakao!

Allen Doktoranden und Mitarbeitern, die sich beinahe täglich mit mir auf den Weg in die Nordmensa gemacht haben, möchte ich für die vielen entspannten und oft spaßigen Mittagsstunden danken. Meinen Bürokollegen, insbesondere Rodica und Christine danke ich für die vielen hilfreichen Gespräche zu meiner Arbeit, aber natürlich auch zu Privatem. Für den nie versiegenden Kaffeestrom und die vielen lustigen Kaffeerunden danke ich Peter und Dennis - und natürlich Karl für eine „etwas andere Sicht auf die Dinge“, die immer viel Diskussionsstoff bot.

Meiner Familie, insbesondere Sebastian, aber auch allen meinen Freunden möchte ich für ihre Unterstützung danken und dafür, dass es neben *Verticillium* immer viel anderes Wichtiges und Schönes zu entdecken gibt.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname: Saskia Flörl
Geburts tag: 13.11.1975
Geburtsort: Bad Karlshafen
Staatsangehörigkeit: deutsch

SCHULBILDUNG

August 1982 bis Juli 1986 Grunds chule Lippoldsberg
August 1986 bis Juni 1992 Heinrich-Roth-Gesamts chule Bodenfelde
August 1992 bis Mai 1995 Gymnasium Uslar

WISSENSCHAFTLICHER BILDUNGSGANG

August 1995 bis Juli 1997 Ausbildung zur Biologisch-technischen-Assistentin an der Akademie für Umwelt und Technik in Hann. Münden
August 1997 bis April 1999 Anstellung als Biologisch-technische-Assistentin im Forschungslabor der Hautklinik in Göttingen
Oktober 1999 bis Juni 2004 Studium der Biologie an der Universität Göttingen mit Diplomprüfungen in den Fächern Genetik (Hauptfach), Mikrobiologie und Anthropologie
September 2003 bis Juni 2004 Diplomarbeit in der Abteilung für Molekulare Genetik am Institut für Mikrobiologie und Genetik in Göttingen unter Anleitung von Dr. S. Behrens mit dem Titel: „Mutationsanalyse des periplasmatischen Chaperons SurA aus *Escherichia coli* zur Identifizierung funktions-relevanter Aminosäuren“
Seit Oktober 2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Forstbotanik (Abt. Baumphysiologie) bei Prof. A. Polle in Göttingen zur Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum* in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*)“

WEITERE TÄTIGKEITEN

2000-2003 Anstellung als wissenschaftliche/studentische Hilfskraft am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen
März bis Juni 2003 Anstellung als studentische Hilfskraft am Institut für Zoologie und Anthropologie in Göttingen
September 2002 & Februar 2003 Anstellung als studentische Hilfskraft bei der iOnGen AG in Göttingen

SPRACHKENNTNISSE

Englisch und Französisch