

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

Lehrstuhl für Botanik

Programmierter Zelltod in *Arabidopsis*:  
Die Funktion der KDEL-Cystein-Endopeptidasen in  
Entwicklung und Pathogen-Abwehr

**Timo Höwing**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. Grill  
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. C. Gietl  
2. Univ.-Prof. Dr. R. Hüchelhoven

Die Dissertation wurde am 24.02.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.04.2016 angenommen.



*„Non scholae, sed vitae discimus“*



## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
Zusammenfassung .....	X
Abstract.....	XII
1. Einleitung .....	1
1.1. Programmierter Zelltod .....	1
1.1.1. Differenzierung des Programmierten Zelltods in Metazoen .....	1
1.1.2. Differenzierung des Programmierten Zelltods in Pflanzen .....	2
1.2. Im Entwicklungs-PCD und in der Pathogen-Abwehr involvierte Proteasen .....	4
1.2.1. Serin-Proteasen.....	4
1.2.2. Aspartat-Proteasen.....	6
1.2.3. Metalloproteasen .....	7
1.2.4. Cystein-Proteasen .....	8
1.2.4.1. Metacaspasen .....	8
1.2.4.2. „Vacuolar Processing Enzymes“ .....	10
1.2.4.3. Papain-ähnliche Cystein-Proteasen .....	12
1.3. Papain-ähnliche KDEL-Cystein-Endopeptidasen: Zelltod-spezifische Cystein-Proteasen .	13
1.3.1. Synthese und Maturierung .....	13
1.3.2. KDEL CysEP akzeptieren Proline und Hydroxproline neben ihrer Spaltstelle .....	14
1.3.3. Akkumulation von KDEL CysEP im sterbenden Gewebe .....	15
1.3.4. KDEL CysEP in <i>Arabidopsis</i> .....	16
1.4. Transport und Speicherung von Proteinen.....	18
1.4.1. Golgi-abhängiger Sekretionsweg .....	18
1.4.2. Golgi-unabhängiger Sekretionsweg .....	18
1.4.3. Transport und Speicherung von Papain-ähnlichen KDEL-Cystein-Endopeptidasen ...	19
1.5. Zellwand-Remodellierung.....	21
1.5.1. Aufbau der primären Zellwand .....	21
1.5.2. Zellwand-Remodellierung in der Elongationszone .....	22
1.5.3. Zellwand-Remodellierung während der Seitenwurzelbildung .....	23
1.6. Die pflanzliche Immunität .....	25
1.6.1. Nicht-Wirt-Resistenz .....	25
1.6.2. Basiskompatibilität .....	26
1.6.3. Rassenspezifische Resistenz .....	26
1.7. Abwehrmechanismen gegen direkt penetrierende Pathogene .....	27
1.7.1. Verstärkende Zellwandablagerungen.....	27
1.7.2. Hypersensitive Reaktion .....	28
1.7.3. „Pathogenesis related genes“: PR-Gene .....	28
1.8. Infektionsablauf in der kompatiblen Interaktion zwischen <i>Erysiphe cruciferarum</i> und der suszeptiblen Wirtspflanze <i>Arabidopsis</i> .....	30
1.9. Involvierung von Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen in der Pathogen-Abwehr.....	32

1.10. Zielsetzung der Arbeit .....	34
2. Ergebnisse .....	36
2.1. Erzeugung von Fusionsproteinen für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 mit einem dreifachen Hämagglutinin-tag und verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen unter der Kontrolle des respektiven endogenen Promotors.....	36
2.1.1. Klonierungsstrategien der funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3.....	36
2.1.2. Verifizierung der T-DNA Insertionslinien von <i>AtCEP1</i> , <i>AtCEP2</i> und <i>AtCEP3</i> als <i>Knockout</i> Mutanten .....	38
2.1.3. Erzeugung einer <i>triple-knockout/knockdown</i> -Mutante durch Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 und gleichzeitiger Herunterregulierung von <i>AtCEP2</i> .....	40
2.2. Funktion von AtCEP1 im Programmierten Zelltod zur Pathogen-Abwehr: Interaktion mit dem biotrophen Ascomycet <i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	41
2.2.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt zu einer Super-Suszeptibilität gegenüber <i>E. cruciferarum</i> .....	41
2.2.2. Komplementierung des Pathogenese-Phänotyps durch ein funktionelles AtCEP1 Reporterprotein .....	42
2.2.3. Zeitgleiche Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 mit dem Pathogenese-Phänotyp während der späten Interaktion.....	44
2.2.4. Das Pro-Enzym von AtCEP1 wird während der späten Interaktion mit <i>E. cruciferarum de novo</i> induziert: Akkumulation im ER und um die gebildeten Haustorien .....	46
2.2.5. Dreidimensionale Signal-Rekonstruktion des Pro-Enzyms von AtCEP1: Akkumulation um die Callose-Einkapselungen des haustorialen Komplexes und in der Callose-Einkapselung während der späten Interaktion mit <i>E. cruciferarum</i> .....	48
2.2.6. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt zu einer Reduktion des epidermalen Zelltods und gleichzeitig zu einer Zunahme an gebildeten Haustorien in der Interaktion mit <i>E. cruciferarum</i> .....	52
2.2.7. Deregulation der Expression von Pathogenese-assoziierten Stress-Genen <i>PR1</i> und <i>PDF1.2</i> bei Einfach-Verlust von AtCEP1 .....	54
2.3. Beteiligung von AtCEP im vom echten Mehltaupilz induzierten und AtCPR5-kontrollierten Programmierten Zelltod .....	56
2.3.1. AtCEP1 und AtCEP3 besitzen eine ähnliche Funktion in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens <i>E. cruciferarum</i> .....	56
2.3.2. AtCEP2 besitzt keine Funktion in der Pathogen-Abwehr gegenüber dem biotrophen Ascomycet <i>E. cruciferarum</i> .....	60
2.3.3. AtCEP Proteasen scheinen in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens <i>E. cruciferarum</i> zueinander nicht funktionell redundant zu wirken .....	62
2.3.4. Die spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von <i>AtCEP1</i> in einer <i>atcpr5</i> Mutante ist zeitlich und räumlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen und dem damit verbundenen PCD assoziiert.....	64
2.3.5. Konstitutive Resistenz von Pflanzen der <i>atcpr5</i> Mutante gegenüber <i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	68
2.3.6. AtCEP1 leistet einen Beitrag im vom echten Mehltaupilz induzierten PCD und unterstützt somit die Bildung nekrotischer Blattläsionen auf <i>atcpr5</i> Mutanten .....	70
2.4. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweichung für die Elongation sowie für die Zellseparation.....	72
2.4.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der Primärwurzel aufgrund verkürzter Zelllängen in der Elongationszone.....	73
2.4.1.1. Verkürzte Primärwurzeln in homozygoten <i>atcep2 ko</i> Pflanzen .....	73

2.4.1.2. Homozygote <i>atcep2 ko</i> Pflanzen zeigen eine Verkürzung der „lateral root cap“ aufgrund der Reduktion ihrer Zelllängen .....	76
2.4.1.3. Der Programmierter Zelltod findet in der „lateral root cap“ von homozygoten <i>atcep2 ko</i> Keimlingen statt.....	80
2.4.1.4. Verkürzung der Zelllänge und Abnahme der Zellbreite in der Elongationszone von homozygoten <i>atcep2 ko</i> Pflanzen .....	81
2.4.2. Keine verkürzten Primärwurzeln bei Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP3 sowie bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3.....	84
2.4.3. Die Restaktivität von AtCEP2 führt zu einer dosiert geringeren Verkürzung der Primärwurzel aufgrund der dosiert geringeren Reduktion der Zelllängen in der Elongationszone .....	85
2.4.3.1. Dosiert geringere Verkürzung der Primärwurzeln in homozygoten <i>atcep_triple-ko/kd</i> Pflanzen .....	85
2.4.3.2. Dosiert geringere Verkürzung der „lateral root cap“ aufgrund der dosiert geringeren Reduktion ihrer Zelllängen in homozygoten <i>atcep_triple-ko/kd</i> Pflanzen .....	86
2.4.3.3. Der Programmierter Zelltod findet in der „lateral root cap“ von homozygoten <i>atcep_triple-ko/kd</i> Keimlingen statt.....	87
2.4.3.4. Dosiert geringere Verkürzung der Zelllängen und dosiert geringere Abnahme der Zellbreite in der Elongationszone in homozygoten <i>atcep_triple-ko/kd</i> Pflanzen .....	88
2.4.4. Das Ansäuern des <i>ex vivo</i> isolierten Pro-Enzyms von AtCEP2 führt zur Maturierung von AtCEP2 und zur gleichzeitigen Abspaltung von mCherry .....	89
2.4.5. Akkumulierung von AtCEP2 und Speicherung als Pro-Enzym am oberen Ende der „lateral root cap“: Lokalisation im Cytoplasma-Saum und nicht in der Zellwand.....	92
2.4.6. Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in einer gebogenen Epidermiszelle an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums .....	94
2.4.7. Der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 bewirkt eine zeitliche Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten.....	97
2.5. Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in Organellen, die vom ER stammen .....	101
2.5.1. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten ER-Lumen-Markerlinie: Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen und in ER-bodies .....	101
2.5.2. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 bei Verlust von ER-bodies in der homozygoten <i>atnai1 x AtCEP2</i> Mutante: Rückstau von Pro-AtCEP2 im ER und keine Übernahme der Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung .....	106
2.6. Funktionelle Redundanz von AtCEP1 und AtCEP2 am Ende des Filaments trotz ihrer Gewebe-spezifischen Expressionen im Wildtyp .....	110
2.6.1. Akkumulierung von AtCEP1 und Speicherung als Pro-Enzym am Ende des Filaments .....	110
2.6.2. Funktionelle Redundanz: Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 am Ende des Filaments bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3.....	112
2.7. Funktion der AtCEP im Programmierter Zelltod: Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in Suspensor-Zellen, in denen der Programmierter Zelltod bevorsteht .....	114
3. Diskussion .....	116
3.1. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweicheung für die Elongation sowie für die Zellseparation .....	116
3.1.1. Ausschließlich AtCEP2 ist in der Elongation der Primärwurzel involviert .....	116

3.1.2. Lokalisation der enzymatisch aktiven Untereinheit von AtCEP2 in der Zellwand der Zellen in der „lateral root cap“ und in der Elongationszone .....	118
3.1.3. Funktion von AtCEP2 im Zuge der Gewebe-Remodellierung: Zellwanderweichung durch Spaltung der stabilisierenden Extensine .....	119
3.1.4. Mögliche Sekretionswege des Pro-Enzyms von AtCEP2 in die Zellwand der Zellen in der „lateral root cap“ und in der Elongationszone .....	122
3.1.5. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellseparation beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums .....	127
3.1.5.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 bewirkt eine zeitliche Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten .....	128
3.1.5.2. Funktionelle Redundanz der AtCEP sowie weiterer involvierter Zellwand Remodellierungs-Enzyme bewirken eine dosiert geringere Verzögerung beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums .....	132
3.2. Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in vom ER stammenden Organellen: ER-bodies und Ricinosomen-ähnliche Organellen .....	135
3.2.1. ER-Bodies und Ricinosomen-ähnliche Organellen sind Speicherkompartimente für das Pro-Enzym von AtCEP2 sowie für andere Proteine.....	135
3.2.2. Der Verlust von ER-bodies führt zu einem Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2 im ER: keine Übernahme der Speicherung in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung .....	138
3.3. Mögliche Beteiligung der AtCEP im Programmierten Zelltod in der „lateral root cap“ sowie im Suspensor.....	139
3.3.1. AtCEP2 scheint im PCD in der „lateral root cap“ involviert zu sein .....	139
3.3.2. AtCEP1 besitzt möglicherweise eine Funktion im Zelltod-assoziierten Gewebe des Suspensors .....	141
3.4. Funktion der AtCEP in der Pathogen-Abwehr während der kompatiblen Interaktion mit <i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	144
3.4.1. AtCEP1 ist in die basale Resistenz von <i>Arabidopsis</i> gegen <i>E. cruciferarum</i> involviert .....	144
3.4.2. AtCEP1 und AtCEP3 besitzen ähnliche Funktionen in der Beteiligung am Programmierten Zelltod zur Beeinträchtigung der Entwicklung von <i>E. cruciferarum</i> .....	145
3.4.3. AtCEP Proteasen sind in der kompatiblen Interaktion mit <i>E. cruciferarum</i> zueinander nicht funktionell redundant .....	149
3.4.4. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in der späten Interaktion mit <i>E. cruciferarum</i> : Akkumulation um die Callose-Einkapselungen des haustorialen Komplexes und in der Callose-Einkapselung .....	150
3.4.5. AtCEP1 leistet einen Beitrag im AtCPR5-kontrollierten Programmierten Zelltod während der Interaktion mit <i>E. cruciferarum</i> .....	154
4. Material und Methoden .....	156
4.1. Klonierungsstrategien der funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 .....	156
4.2. Verwendete Mutanten .....	158
4.2.1. T-DNA Insertionslinien für <i>AtCEP1</i> , <i>AtCEP2</i> und <i>AtCEP3</i> .....	158
4.2.2. Erzeugung einer <i>triple-knockout/knockdown</i> -Mutante durch Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 und gleichzeitiger Herunterregulierung von <i>AtCEP2</i> .....	160
4.2.3. Weitere Mutanten .....	161
4.3. Anzucht von Organismen.....	162



## Inhaltsverzeichnis

---

4.4. Molekularbiologische Methoden .....	164
4.4.1. Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA.....	164
4.4.2. Transformation elektrokompeter <i>A. tumefaciens</i> mit rekombinanter DNA .....	164
4.4.3. Agarose Gelelektrophorese.....	165
4.4.4. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	165
4.4.5. Restriktionsverdau von DNA .....	165
4.4.6. Ligation von DNA.....	166
4.4.7. Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> sowie <i>A. tumefaciens</i> .....	166
4.4.8. DNA-Isolation aus <i>Arabidopsis</i> .....	167
4.4.9. Polymerase chain reaction: PCR.....	168
4.4.10. Reverse transcription-PCR: RT-PCR .....	168
4.4.11. Real-time quantitative reverse transcription-PCR: qRT-PCR .....	169
4.4.12. Transformation von <i>A. thaliana</i> durch „floral dipping“ mit <i>A. tumefaciens</i> .....	170
4.4.13. Kreuzung von <i>A. thaliana</i> .....	170
4.4.14. Inokulation von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Erysiphe cruciferarum</i> .....	171
4.5. Biochemische Methoden .....	172
4.5.1. Denaturierender Protein-Rohextrakt.....	172
4.5.2. Immunpräzipitation .....	172
4.5.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	173
4.5.4. Coomassie-Färbung .....	174
4.5.5. Silberfärbung .....	175
4.5.6. Western Blot .....	175
4.5.7. Immunologische Detektion .....	176
4.5.8. Ermittlung optimaler Proteinexpressionsbedingungen in <i>E. coli</i> .....	177
4.5.9. Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	178
4.5.10. Proteinanreicherung mittels His-tag .....	178
4.6. Mikroskopie.....	179
4.6.1. Färbungen für die Mikroskopie .....	179
4.6.2. Fluoreszenz-Mikroskopie.....	181
4.6.2.1. Statistische Auswertung nekrotischer Blattflächen unter dem Infektionsstress des echten Mehltaupilzes .....	181
4.6.2.2. Statistische Auswertung von toten Zellen, Haustorien und Papillen pro Kolonie von <i>E. cruciferarum</i> .....	182
4.6.3. Confocale Laser Scanning Mikroskopie: CLSM .....	183
4.6.3.1. Statistische Auswertung von Primärwurzeln sowie deren Zelllängen und -breiten .....	184
4.6.3.2. Statistische Auswertung einer zeitlichen Verzögerung beim Austritt von Seitenwurzel-Primordia.....	185
4.6.3.3. „Whole Mount“ Immunlokalisierung .....	186
4.7. Chemikalien und Enzyme .....	187
4.8. Geräte.....	188
5. Literaturverzeichnis.....	189

6. Anhang.....	204
6.1. Erzeugung von Fusionsproteinen für AtCEP3 mit einem dreifachen Hämagglutinin-tag und verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen unter dem respektiven endogenen Promotor.....	204
6.1.1. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP3-KDEL$ .....	204
6.1.2. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-mTFP1-AtCEP3-KDEL$ .....	206
6.1.3. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-mCerulean-AtCEP3-KDEL$ .....	208
6.1.4. Klonierungsstrategie für das nicht funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-mCerulean-KDEL$ .....	210
6.2. Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der Epidermis an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums.....	212
6.3. Lokalisation von AtCEP2-Signalen mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers in der Zellwand von LRC-Zellen und in der Zellwand von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone.....	214
7. Appendix.....	217
7.1. Hierl et al., 2014.....	218
7.2. Höwing et al., 2014.....	246

## **Abkürzungsverzeichnis**

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
AGPs	hoch-glykosylierte Arabinogalactan Proteine
Anh.	Anhang
ARF	auxin response factors
AtCEP	KDEL CysEP in <i>Arabidopsis</i> : AtCEP1, AtCEP2, AtCEP3
AtCEP1	KDEL-Cystein-Endopeptidase1
AtCEP2	KDEL-Cystein-Endopeptidase2
AtCEP3	KDEL-Cystein-Endopeptidase3
AtCPR5	CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5 in <i>Arabidopsis</i>
AtMC	Metacaspasen in <i>Arabidopsis</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AVR	Avirulenzgen
AVR2	Avirulenzgen2 in <i>Cladosporium fulvum</i>
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CF-2	CLADOSPORIUM FULVUM RESISTANCE-2
CLSM	Confocale Laser Scanning Mikroskopie
cm	Zentimeter
<i>coi1</i>	<i>coronatine insensitive 1</i>
Col-0	Ökotyp Columbia-0
COP	coat protein
COPI	coat protein I
COPII	coat protein II
d	days, Tage
DAMPs	damage-associated molecular pattern
das	days after sowing, Tage nach Aussaat
DNA	deoxyribonucleic acid
dpi	days past inoculation, Tage nach Inokulation
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. cruciferarum</i>	<i>Erysiphe cruciferarum</i>
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
<i>ein2</i>	<i>ethylene insensitive2</i>
EPIC2B	EXTRACELLULAR PROTEASE INHIBITOR WITH CYSTATIN-LIKE DOMAIN 2B
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ET	Ethylen
ETI	effector triggered immunity
EtOH	Ethanol

## Abkürzungsverzeichnis

---

ETS	effector triggered susceptibility
EXT	moderat glykosylierte Extensine
fkt.	Funktionell
fw	forward
g	Erdbeschleunigung 9.81 m/s <sup>2</sup>
GLH17	Glycosyl-Hydrolase 17
h	hours, Stunden
H <sub>2</sub> O bidest.	bidestilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O mQ	milliQ-destilliertes Wasser
HA-tag	Hämagglutinin-tag
hpi	hours past inoculation, Stunden nach Inokulation
HR	hypersensitive response, Hypersensitive Reaktion
HRGP	Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine
H/PRPs	nicht-, gering- oder hoch-glykosylierte Hydroxyprolin-/Prolin-reiche Proteine
IAA	INDOLE ACETIC ACID
JA	Jasmonsäure
Kap.	Kapitel
<i>kd</i>	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KDEL CysEP	KDEL-Cystein-Endopeptidase/n
<i>ko</i>	<i>knock out</i>
KV	KDEL-Vesikel
l	Liter
LAX3	LIKE AUXIN1-3
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LR	lateral root, Seitenwurzel
LRC	lateral root cap, laterale Wurzelhaube
<i>Ird5</i>	<i>lateral root development 5</i>
M	Mol
mA	Milliampere
MAMPs	microbe-associated molecular patterns
MAPKs	mitogen-activated protein kinases
MEB1	MEMBRANE PROTEIN OF ENDOPLASMIC RETICULUM BODY1
MEB2	MEMBRANE PROTEIN OF ENDOPLASMIC RETICULUM BODY2
MeOH	Methanol
min	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mm	Millimeter
mM	Millimol
n. fkt.	Nicht funktionell
NPR1	NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED Genes1
P, P'	Position zur Spaltstelle
PAC	precursor-accumulating

## Abkürzungsverzeichnis

---

PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PB	protein bodies
PCD	programmed cell death, Programmierter Zelltod
PCR	polymerase chain reaction
<i>PDF1.2</i>	<i>PLANT DEFENSIN1.2</i>
PDI5	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE 5
PIP1	<i>PHYTOPHTHORA</i> INHIBITED PROTEASE-1
<i>PR</i> -Gene	<i>pathogenesis related</i> -Gene
PRRs	pattern recognition Rezeptoren
PSV	Protein-Speicher-Vakuole
PTI	PAMP triggered immunity
QC	quiescent center, ruhendes Zentrum
qRT-PCR	real-time quantitative reverse transcription-PCR
<i>R</i>	Resistenzgen
<i>RAY1</i>	<i>REDUCED ARABINOSE YARIV1</i>
RcCysEP	KDEL CysEP aus <i>Ricinus communis</i>
RCR3	REQUIRED FOR <i>CLADOSPORIUM</i> RESISTANCE-3
RD21	RESPONSIVE TO DESICCATION 21
RNA	Ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
R-Proteine	Resistenz Proteine
RPW8.2	RESISTANCE TO POWDERY MILDEW8.2
<i>rsh</i>	<i>root-, shoot-, hypocotyl-defectiv</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcription-PCR
rv	reverse
s.	siehe
SA	salicylic acid, Salicylsäure
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SH-EP	SULFHYDRYL-ENDOPEPTIDASE aus <i>Vigna mungo</i>
SLR1	SOLITARYROOT1
SMB	ANAC033/SOMBRERO
SNAREs	soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors
Tab.	Tabelle
UTR	untranslated region
V	Volt
VPE	Vacuolar Processing Enzymes
WT	Wildtyp
XEG113	Xyloglucotransferase113
XTH	Xyloglucan-Endotransglucosylasen/hydrolasen

## **Zusammenfassung**

Der Programmierte Zelltod (PCD) stellt in Pflanzen einen wichtigen Prozess in der Entwicklung, während der Seneszenz, unter Stress und in der Pathogen-Abwehr dar. Spezifisch für diesen pflanzlichen PCD sind KDEL-Cystein-Endopeptidasen (KDEL CysEP). KDEL CysEP sind eine Untergruppe innerhalb der Familie der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen, die durch ein C-terminales Endoplasmatisches Retikulum (ER) Rückhaltesignal charakterisiert werden. In *Arabidopsis* kodieren drei Gene für funktionale KDEL CysEP: *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3*.

AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweicheung für die Elongation sowie für die Zellseparation. Zudem sind AtCEP im PCD in der Abwehr gegen biotrophe Pathogene involviert. Dies ist eine neue Funktion für AtCEP im PCD zur bereits belegten Funktion im Entwicklungs-PCD.

AtCEP2 besitzt eine Funktion in der Elongation der Primärwurzel. Die enzymatisch aktive Untereinheit von AtCEP2 ist in den Zellwänden von „lateral root cap (LRC)“-Zellen sowie in den Zellwänden von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone lokalisiert. In beiden Zell-Typen ist AtCEP2 in der Zellwanderweicheung für die Zellstreckung involviert. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Abnahme der Trichoblasten-Zelllänge und daraus resultierend zu einer Reduktion der Primärwurzellänge. Ebenso bewirkt der Einfach-Verlust von AtCEP2 eine Abnahme der Zelllänge der LRC-Zellen. Diese hat jedoch keine Auswirkung auf die Verkürzung der Primärwurzellänge. Die Restaktivität von AtCEP2 führt in *atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi*) Keimlingen zu einer dosiert geringeren Verkürzung der LRC-Zellen sowie der Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone. Weder AtCEP1 noch AtCEP3 scheinen eine Funktion in dieser Zellwanderweicheung während der Elongation der Primärwurzel zu besitzen.

AtCEP besitzen im Zuge der Zellseparation beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums eine Funktion in der Zellwanderweicheung: Der jeweilige Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 sowie AtCEP3 führt zu einer zeitlichen Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten. Die Pro-Enzyme von AtCEP1 und AtCEP2 sind in den Epidermiszellen akkumuliert, die an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums auseinanderweichen müssen.

KDEL CysEP sind als enzymatisch inaktive Pro-Enzyme in 1 µm großen Ricinosomen gespeichert. Ricinosomen wurden beispielsweise in seneszierenden Endospermzellen in keimenden Samen sowie in Nucellus-Zellen reifender Samen von *Ricinus communis* identifiziert. Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist in der Columella, in der LRC und an der Basis junger Blätter in 1 µm großen Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert. Im

Hypokotyl akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP2 in 1x10 µm großen Spindel-förmigen ER-bodies. Durch Kreuzung mit einer ER-Lumen-Markerlinie konnte gezeigt werden, dass sowohl Ricinosomen-ähnliche Organellen als auch ER-bodies Speicherkompartimente für AtCEP2 und gleichzeitig für weitere Proteine, wie beispielsweise β-Glucosidasen, darstellen.

Der PCD ist als Bestandteil der Hypersensitiven Reaktion für Pflanzen ein wichtiger Abwehrmechanismus gegen obligat biotrophe Pathogene, da diese sich vom lebenden Gewebe der Wirtspflanze ernähren. AtCEP1 ist in die basale Resistenz gegen den obligat biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum* involviert. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 bewirkt den Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum*. Dieser Pathogenese-Phänotyp kann mit Hilfe eines funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukts ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) komplementiert werden. AtCEP1 besitzt eine Funktion im PCD zur Beeinträchtigung der Entwicklung von *E. cruciferarum*: Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt zu einer signifikanten Reduktion des epidermalen Zelltods. In der späten kompatiblen Interaktion mit *E. cruciferarum* ist eine zeitlich-räumliche Akkumulierung von AtCEP1 feststellbar: Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist um und innerhalb der Callose-Einkapselung, die den haustorialen Komplex umschließt, akkumuliert.

AtCEP3 ist ein weiterer Faktor zur Beeinträchtigung der Entwicklung von *E. cruciferarum*. Dagegen ist keine Beteiligung von AtCEP2 in der basalen Resistenz von *Arabidopsis* gegen *E. cruciferarum* festzustellen.

AtCPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5) ist ein negativer Regulator der Expression von Pathogenese-assoziierten Genen. Der Verlust von AtCPR5 führt zu spontanen nekrotischen Blattläsionen auf Rosettenblättern. Mit dem Auftreten dieser Blattläsionen ist die Hochregulierung von *AtCEP1* zeitlich direkt assoziiert. Zur Visualisierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* wurden Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante, die zusätzlich ein nicht funktionelles AtCEP1-Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) exprimieren, untersucht: *AtCEP1* ist spezifisch in den Epidermiszellen, die in direkter Nachbarschaft zu sichtbaren nekrotischen Blattläsionen liegen und in denen PCD stattfindet, hochreguliert.

Pflanzen der *atcpr5* Mutante weisen in der kompatiblen Interaktion eine konstitutive Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* auf. Der Verlust von AtCEP1 hat auf diese Resistenz keinen sichtbaren Einfluss. Pflanzen der *atcpr5* Mutante zeigen unter dem Infektionsstress des echten Mehltaupilzes signifikant größere nekrotische Läsionsflächen als Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante. Somit leistet AtCEP1 im AtCPR5-kontrollierten PCD bei gleichzeitigem Stress durch die Interaktion mit *E. cruciferarum* einen Beitrag.

## **Abstract**

In plants, programmed cell death (PCD) occurs during development, under stress conditions, during senescence and in response to pathogen infection. Specific for plant PCD is a unique subgroup of papain-type cysteine endopeptidases characterized by a C-terminal KDEL endoplasmic reticulum (ER) retention signal (KDEL CysEP). In *Arabidopsis*, three KDEL CysEP are expressed: *AtCEP1*, *AtCEP2* and *AtCEP3*.

*AtCEP* exhibit functions in tissue remodeling by loosening the cell wall for extension and for cell separation. Furthermore, *AtCEP* are involved in PCD in defense against biotrophic pathogens. This is a new function for *AtCEP* in PCD in addition to the known function in developmental PCD.

*AtCEP2* exhibits a function in the elongation of the primary root. The enzymatically active *AtCEP2* mature subunit is localized in the cell wall of lateral root cap (LRC) cells and in the cell wall of epidermal cells of the starting elongation zone. In both cell types, *AtCEP2* is involved in loosening the cell wall for extension. Loss of *AtCEP2* results in shortened primary roots due to reduced cell length of trichoblasts in the elongation zone. Additionally, loss of *AtCEP2* leads to a decrease of the cell length of the LRC cells, but does not take effect on the primary root length.

*atcep\_triple-ko/kd (atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi)* mutant plants also exhibit shortened LRC cells and shortened epidermal cells of the starting elongation zone, but the cell lengths are already longer compared to *atcep2* mutant plants. Hence, the remaining activity of *AtCEP2* in *atcep\_triple-ko/kd (atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi)* lines causes a small extension of these two cell types.

By contrast, *AtCEP1* and *AtCEP3* seem not to be involved in loosening the cell wall in the course of elongation of the primary root.

*AtCEP* exhibit a function in tissue remodeling by loosening the cell wall for cell separation in the course of the endogenous emergence of the lateral root. Loss of *AtCEP1*, *AtCEP2* or *AtCEP3* lead to a delayed emergence of the lateral root primordia. The pro-enzymes of *AtCEP1* and *AtCEP2* are expressed in root epidermis cells that are separated in the course of lateral root formation.

KDEL CysEP are stored in 1 µm sized ricinosomes as the enzymatically inactive pro-enzymes. Among other localizations, ricinosomes were found in the senescing endosperm of germinating seeds and in the nucellus cells of maturing seeds of *Ricinus communis*. The pro-enzyme of *AtCEP2* is stored in 1 µm sized ricinosome-like organelles in the columella, in the LRC and at the base of young leaves. The pro-enzyme of *AtCEP2* is also expressed in the hypocotyl in ER-bodies with their characteristic 1x10 µm long



spindle-shaped appearance. Co-localization with an ER lumen marker shows that not only AtCEP2 but also other proteins, such as  $\beta$ -glucosidases, are stored in ricinosome-like organelles and in ER-bodies.

PCD is an integral part of the hypersensitive response, which restricts growth of biotrophic pathogens as they depend on living host tissue to feed from. AtCEP1 is a factor of basal resistance to powdery mildew caused by the biotrophic ascomycete *Erysiphe cruciferarum*. *atcep1* mutant plants exhibit super-susceptibility to the fungus *E. cruciferarum*. *atcep1* mutant plants harboring a functional reporter ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) complement the pathogenesis phenotype of *atcep1* mutant plants. AtCEP1 exhibit a function in PCD by restricting the development of the biotrophic fungus *E. cruciferarum*: Loss of AtCEP1 leads to a significant decrease of dead epidermal cells. AtCEP1 is expressed in spatiotemporal association with the late fungal development on *Arabidopsis* leaves: The pro-enzyme of AtCEP1 accumulates around and within the callosic encasement, which is surrounding the haustorial complex.

AtCEP3 is another factor restricting development of *E. cruciferarum* symptoms.

By contrast, AtCEP2 appears not to contribute to basal resistance to powdery mildew.

AtCPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5) is a negative regulator of expression of pathogenesis related genes. Loss of *AtCPR5* results in spontaneous expression of chlorotic lesions that are associated with enhanced expression of *AtCEP1*. *atcep1xatcpr5* double mutant plants harboring a non-functional reporter ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) were used for visualization of *AtCEP1* promoter activity: *AtCEP1* is specifically upregulated in leaf cells in direct proximity of spreading chlorotic leaf lesions thus likely representing cells undergoing PCD.

*atcpr5* mutant plants exhibit a strong resistance to infection with *E. cruciferarum*. Loss of *AtCEP1* has no obvious influence on the strong resistance of *atcpr5* mutant plants to the infection with *E. cruciferarum*. The area of necrotic leaf lesions associated with *E. cruciferarum* colonies is significantly larger in *atcpr5* as compared to *atcep1xatcpr5* double mutant plants. The presence of AtCEP1 thus contributes to AtCPR5-controlled PCD at the sites of powdery mildew infection.



## **1. Einleitung**

### **1.1. Programmierter Zelltod**

Der programmierte Zelltod (programmed cell death, PCD) ist ein essentieller Prozess und Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklung in mehrzelligen Eukaryoten. Er ist als ein genetisch kodiertes und aktiv kontrolliertes zelluläres Selbstmord-Programm definiert (Wang and Bayles, 2013). Für Metazoen und Pflanzen sind verschiedene PCD-Prozesse in der Entwicklung und in der Immunantwort bei Pathogen-Befall zu beobachten.

#### **1.1.1. Differenzierung des programmierten Zelltods in Metazoen**

In Metazoen wird der PCD aufgrund der sich ändernden Zellmorphologie in drei verschiedene PCD-Typen eingeteilt: Apoptose, Autophagozytose und Nekrose/nicht-lysosomaler PCD (Kroemer et al., 2009).

Die Apoptose zeichnet sich durch die Abnahme des Zellvolumens, Chromatin-Kondensation und Zellkern-Fragmentierung aus. Als Folge der Fragmentierung der Zelle bilden sich entweder apoptotische Bodies oder Bläschen-ähnliche Ausstülpungen auf der Zelloberfläche, in die der zerkleinerte Zellinhalt „neu verpackt“ wird. Diese Bläschen-ähnlichen Ausstülpungen oder apoptotischen Bodies werden entweder mittels Phagozytose von benachbarten Zellen aufgenommen und in diesen zersetzt oder mittels Makrophagen abgebaut (Elmore, 2007; Yang and Klionsky, 2010).

Die Autophagozytose findet in den Zellen statt, in denen keine apoptotischen Prozesse ablaufen. Sie ist charakterisiert durch die Anwesenheit von Autophagosomen und kleinen lytischen Vakuolen, die einerseits die Zellkomponenten vor dem Zelltod zerkleinern. Andererseits werden die Zellkomponenten auch zur Bereitstellung neuer Materialien für die Synthese in der Zelle abgebaut. Teilweise dient der Verdau der Zellkomponenten sogar zur Energiegewinnung, was zur Folge hat, dass der PCD verzögert oder völlig verhindert wird. Somit wird die Autophagozytose in einigen Fällen als Gegenteil der Apoptose klassifiziert (Klionsky and Emr, 2000; Kroemer and Levine, 2008; Kroemer et al., 2009).

Der nicht-lysosomale PCD bzw. der nekrotische PCD ist durch die Zunahme des Zellvolumens, der Schwellung der Zell-Organellen, wie beispielsweise den Mitochondrien, und dem Zerreißen der Plasmamembran definiert. Das Zerreißen der Plasmamembran führt schließlich zum Verlust der Zellkomponenten. Im Vergleich zur Apoptose und Autophagozytose ist die Nekrose in nur wenigen metazoischen Zellen zu beobachten (Zhong and Thompson, 2006; Galluzzi and Kroemer, 2008; Kroemer et al., 2009).

### **1.1.2. Differenzierung des Programmierten Zelltods in Pflanzen**

In Pflanzen wird der PCD ebenfalls aufgrund der sich ändernden Zellmorphologie klassifiziert und in zwei verschiedene PCD-Typen unterteilt, dem autolytischen und dem nicht-autolytischen PCD. Der autolytische PCD in Pflanzen ist vergleichbar mit der Autophagozytose in Metazoen, der pflanzliche nicht-autolytische PCD wird dem metazoischen nekrotischen/nicht-lysosomalen PCD zugeordnet. Apoptotische Prozesse hingegen, wie beispielsweise die Fragmentierung der ganzen Zelle und das darauffolgende „neu Verpacken“ in apoptotische Bodies, sind in Pflanzen nicht beschrieben (van Doorn, 2011).

Beim autolytischen PCD nimmt die Größe der kleinen Vakuolen im Cytoplasma zu, die in Folge dessen letztlich zu einer großen Vakuole fusionieren. Gleichzeitig sinkt das Volumen des Cytoplasmas. In den finalen Stufen des autolytischen PCD zerreißt der Tonoplast, die selektivpermeable Membran, die die Vakuole umgibt, und setzt einerseits Hydrolasen frei, die unmittelbar die vorhandenen Zellkomponenten abbauen (van Doorn et al., 2011). Andererseits bewirkt das Zerreißen der Vakuole das Ansäuern des Cytoplasmas, was die proteolytische Aktivierung der im PCD involvierten Proteasen zur Folge hat. Es platzen beispielsweise die vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) stammenden Vesikel und ER-Bodies aufgrund des Ansäuerns des Cytoplasmas und die darin enthaltenen enzymatisch inaktiven Pro-Formen der Proteasen werden freigesetzt. Diese enzymatisch inaktiven Pro-Formen maturieren nun autokatalytisch durch den vorliegenden sauren pH-Wert in die entsprechenden enzymatisch aktiven reifen Untereinheiten. Prominente Beispiele hierfür sind die Papain-artigen Cystein-Endopeptidasen in *Ricinus* und *Arabidopsis*, die in den finalen Stufen des PCD involviert sind (Schmid et al., 2001; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Neben dem Verdau der Zellkomponenten werden, ähnlich der Autophagozytose in Tieren, die Zellkomponenten zudem zur Remobilisierung von Nährstoffen abgebaut. Hierbei werden Makromoleküle wie DNA, RNA, Lipide, Kohlenhydrate und Proteine zu Saccharose, Aminosäuren und Amiden hydrolysiert und vom seneszierenden Gewebe zum lebenden Gewebe der Pflanze transportiert. In Gerste und Weizen werden die abgebauten Nährstoffe beispielsweise von seneszierenden Blättern durch das Phloem vorwiegend zum reifenden Samen transportiert (Gregersen et al., 2008).

Da der autolytische PCD in allen Entwicklungsstufen von der Befruchtung der Ovule bis zum Sterben der kompletten Pflanze stattfindet, wird er auch als Entwicklungs-PCD bezeichnet (van Doorn and Woltering, 2005; van Doorn, 2011).

Der nicht-autolytische PCD ist durch das Schrumpfen des Cytoplasmas und durch das Fehlen des sofortigen Abbaus der Zellkomponenten im Cytoplasma charakterisiert. Ein Platzen der Vakuole durch Zerreißen des Tonoplasten wird nur selten beobachtet und falls

dies der Fall ist, dann findet meist kein sofortiger und/oder kein vollständiger Abbau der Zellkomponenten statt. Somit stellt das Platzen der Vakuole und die damit verbundene Freisetzung der Hydrolasen, nicht den einleitenden und darüber hinaus auch manchmal keinen notwendigen Schritt für das Stattfinden des nicht-autolytischen PCD dar (van Doorn and Woltering, 2005; van Doorn, 2011).

Generell ist der nicht-autolytische PCD in drei pflanzlichen Szenarien zu beobachten: in der Hypersensitiven Reaktion (hypersensitive response, HR; s. Kap. 1.7.2.), im PCD, der durch nekrotrophe Pathogene induziert wird und in den Programmierten Zelltodabläufen im reifenden Endosperm in *Poaceae*.

Nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis cinerea* (Botrydial und Oxalsäure) und *Fusarium moliniforme* (Fumonisin B1) sekretieren toxische Moleküle, die den PCD einleiten. *Botrytis cinerea* beispielsweise induziert einen „oxidative burst“, der wahrscheinlich durch Lipid-Peroxidation und Abbau von Antioxidantien den Grund für den beginnenden PCD darstellt. In diesem ist die Fragmentierung des Zellkerns und DNA-Abbau beobachtbar, die Plasmamembran und der Tonoplast hingegen bleiben intakt (van Baarlen et al., 2004; Gevech et al., 2006).

Einen besonderen PCD-Fall stellt das Endosperm in *Poaceae* dar. Üblicherweise stirbt das Endosperm zur Mobilisierung von Speicherstoffen in allen höheren Pflanzen zeitlich synchron mit der beginnenden Samenkeimung ab. Im Gegensatz dazu ist das Endosperm in *Poaceae* bereits vor der beginnenden Samenkeimung abgestorben. Es stellt somit ein totes Speichergewebe dar. Bei den PCD-Vorgängen im reifenden Endosperm in *Poaceae* sind ein Anstieg der Expressionen von Cystein-Proteasen, RNAsen und DNAsen zu beobachten. Des Weiteren sind ebenfalls intakte Plasmamembranen und Vakuolen festzustellen (Young and Gallie, 2000; DeBono and Greenwood, 2006).

## **1.2. Im Entwicklungs-PCD und in der Pathogen-Abwehr involvierte Proteasen**

Cystein-Proteasen sowie Serin-Proteasen, Metalloproteasen und Aspartat-Proteasen sind im Entwicklungs-PCD und in der Pathogen-Abwehr involviert. Sie stellen die vier größten und wahrscheinlich bedeutendsten Klassen der Proteasen dar. Die meisten Proteasen aus dieser Klasse sind Endopeptidasen, nur wenige Exopeptidasen. Darüber hinaus werden fast alle Proteasen aus dieser Klasse als sogenannte „Precursor“-Proteine mit einem N- und/oder C-terminalen Pro-Peptid synthetisiert. Die Type II Metacaspasen aus der Klasse der Cystein-Proteasen bilden keine „Precursor“-Proteine und stellen eine der wenigen Ausnahmen dar (Schaller, 2004; Beers et al., 2004; Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database).

### **1.2.1. Serin-Proteasen**

Die Serin-Proteasen stellen die größte Klasse an Proteasen in Pflanzen dar. Die hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen von Proteinen erfolgt im aktiven Zentrum über eine katalytische Triade, die aus den Aminosäuren Asparaginsäure, Histidin und Serin besteht. In *Arabidopsis* stammen mehr als die Hälfte der Serin-Proteasen aus der Familie der Serin-Carboxypeptidasen und aus der Familie der Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen (Schaller, 2004; Beers et al., 2004).

#### **Serin-Carboxypeptidasen**

Eine wichtige Funktion von Serin-Carboxypeptidasen besteht in der Mobilisierung von Stickstoff-Quellen während der Samenkeimung. In *Vigna radiata* sind zwei Serin-Carboxypeptidasen (CP) CPI und CPII in den Kotyledonen, die als Speichergewebe in der Familie der *Fabaceae* dienen, lokalisiert (Granat et al., 2003). In *Triticum aestivum* akkumuliert die Serin-Carboxypeptidase CPIII in der Aleuronschicht, um die Speicherproteine im angrenzenden Endosperm abzubauen (Domínguez et al., 2002).

Neben der Funktion in der Mobilisierung von Stickstoff-Quellen, sind Serin-Carboxypeptidasen *in planta* im PCD involviert. In *Triticum aestivum* ist die Serin-Carboxypeptidase CPIII 2-3 Tage nach dem vollständigen Aufsaugen des mobilisierten Endosperms durch das Scutellum im scutellaren Leitgewebe exprimiert. Darüber hinaus akkumuliert CPIII im sich differenzierendem Leitgewebe im Spross und in der Wurzel von Keimlingen. Mittels der TUNEL-Methode (*terminal desoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling*) wurde gezeigt, dass CPIII jeweils in den Zellen dieser drei Gewebe lokalisiert ist, die eine DNA Fragmentierung aufweisen und in denen demzufolge PCD stattfindet (Domínguez et al., 2002).

In *Pisum sativum* ist die Serin-Carboxypeptidase PsCP in der Samenentwicklung beteiligt. PsCP ist im Pericarp und im Samen akkumuliert, vor allem im Nucellus am chalazalen Ende des Embryosacks. Des Weiteren ist PsCP im sich entwickelnden Keimling mit Ausnahme der Kotyledonen ubiquitär exprimiert. Aufgrund der Lokalisation von PsCP wird eine Funktion zur Mobilisierung von Nährstoffen ausgeschlossen und eine Funktion im PCD vermutet (Cercós et al., 2003).

### Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen

Die pflanzlichen Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen sind nach dem Leitprotein Subtilisin benannt, das aus *Bacillus licheniformis* isoliert wurde (Schaller, 2004). In *Arabidopsis* sind gegenwärtig 55 Gene identifiziert, die für funktionale Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen kodieren (Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database).

Trotz der weiten Verbreitung von Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen ist wenig über ihre Funktion *in planta* bekannt. Da einige Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen eine breite Substratspezifität zeigen, wird jedoch eine Beteiligung im PCD vermutet. In *Avena sativa* wurden zwei Subtilisin-ähnliche Serin-Proteasen Saspase-1 (SAS-1) und Saspase-2 (SAS-2) isoliert. Der Befall des nekrotrophen Pathogens *Cochliobolus victoriae* (Erreger der Viktoriafäule) löst eine Victorin-induzierte Immunantwort aus, die eine proteolytische Kaskade für den PCD einleitet. In dieser proteolytischen Kaskade sind beide Saspasen involviert (Coffeen and Wolpert, 2004).

Darüber hinaus sind in *Arabidopsis* generell die biologischen Funktionen von erst zwei Subtilisin-ähnlichen Serin-Proteasen geklärt. Die Subtilisin-ähnliche Serin-Protease SDD1 (STOMATAL DENSITY and DISTRIBUTION1) reguliert die Dichte und Verteilung der Stomata innerhalb der Epidermis. Ein Verlust von SDD1 führt zu einer Vervierfachung der Anzahl an Stomata (Berger and Altmann, 2000). Die zweite erforschte Subtilisin-ähnliche Serin-Protease ALE1 (ABNORMAL LEAF SHAPE1) ist für die Entwicklung der Kutikula während der Embryogenese verantwortlich: *ale1* Keimlinge zeigen abnormale schrumpelige Blätter und sterben innerhalb weniger Tage aufgrund der permanenten Wasserverdunstung, die über die Blattoberfläche stattfindet (Tanaka et al., 2001).

Eine weitere Subtilisin-ähnliche Serin-Protease XSP1 (XYLEM SERINE PEPTIDASE1) scheint in *Arabidopsis* im PCD in der Differenzierung der Tracheen-Elemente des Xylems involviert zu sein. Zuerst werden die Tracheen-Elemente durch Cellulose-, Hemicellulose- und Lignin-Ablagerungen verstärkt. Anschließend findet in den Tracheen-Elementen PCD statt, was zum vollständigen Abbau der Zellkomponenten und letztlich zum Verlust des Protoplasten führt. Darüber hinaus kommt es zu einer partiellen Auflösung der primären Zellwand und damit verbunden zur Ausbildung eines zusammenhängenden

Röhrensystems für den ungehinderten Wassertransport *in planta* (Zhao et al., 2000; Escamez and Tuominen, 2014).

### **1.2.2. Aspartat-Proteasen**

Aspartat-Proteasen verfügen im aktiven Zentrum über eine katalytische Diade, die aus zwei Aminosäuren Asparaginsäure besteht (van der Hoorn, 2008). Eine bedeutsame Familie der Aspartat-Proteasen ist die Familie der Präseniline. Der Defekt der Präsenilin-Gene ist entscheidend an der Ausbildung der Alzheimer-Krankheit im Menschen beteiligt (Schaller 2004). In der Pflanze sind die Pepsin-ähnlichen Proteasen eine wichtige Familie der Aspartat-Proteasen (Schaller, 2004; Beers et al., 2004). In *Arabidopsis* sind gegenwärtig 71 Gene identifiziert, die für funktionale Pepsin-ähnliche Proteasen kodieren (Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database).

#### Pepsin-ähnliche Proteasen

Pepsin-ähnliche Proteasen zeigen verschiedene Funktionen in der Pflanze, unter anderem sind sie am PCD beteiligt. In *Oryza sativa* wird der PCD in den Tapetum-Zellen der Reisantheren von zwei Pepsin-ähnlichen Proteasen OsAP25 und OsAP37 induziert (Niu et al., 2013). Im Gegensatz dazu scheint die Pepsin-ähnliche Protease PCS1 (PROMOTION OF CELL SURVIVAL 1) eine blockierende Funktion auf den PCD in *Arabidopsis* zu besitzen. Pflanzen, in denen das Gen *PCS1* überexprimiert wurde, zeigen eine verhinderte Antheren-Dehiscenz, so dass der Pollen nicht aus den sich in den Antheren befindlichen Pollensäcken freigesetzt werden kann. Der Grund hierfür ist, dass kein PCD im Stomium, die „Nahtstelle“ zwischen den Pollensäcken, und in den interloculären Septumzellen stattfindet und somit ein Zerreißen der Pollensäcke verhindert wird (Ge et al., 2005).

Des Weiteren weisen Pepsin-ähnliche Proteasen eine Funktion in der Immunantwort bei Pathogen-Befall auf. In *Arabidopsis* ist die Pepsin-ähnliche Protease CDR1 (CONSTITUTIVE DISEASE RESISTANCE 1) in der Pathogen-Abwehr involviert. Überexpressionslinien von CDR1 zeigen eine verminderte Suszeptibilität gegenüber dem virulenten Stamm des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000. Damit kongruierend weisen *cdr1-knockout* Pflanzen eine erhöhte Suszeptibilität auf. Während der Pathogen-Abwehr akkumuliert die Pepsin-ähnliche Protease CDR1 im Apoplasten und leitet die Immunantwort ein, indem es im Apoplasten möglicherweise kleine Peptide freisetzt, die eine Hochregulierung der Expression der Pathogenese-assoziierten Stress-Gene induzieren (Xi et al., 2004).



### 1.2.3. Metalloproteasen

Die Aktivität von Metalloproteasen hängt von zweiwertigen Metall-Kationen ab, die ihrerseits an den Seitenresten von Aminosäuren, beispielsweise Glutaminsäure und Histidin, der Metalloproteasen stabilisiert werden. Die zweiwertigen Metall-Kationen, in den meisten Fällen Zink, aber auch Kobalt oder Mangan, aktivieren das Wassermolekül für den nukleophilen Angriff und die daraus resultierende hydrolytische Spaltung der Peptidbindungen (Schaller, 2004; van der Hoorn, 2008). In *Arabidopsis* sind gegenwärtig 81 Gene identifiziert, die für funktionale Metalloproteasen kodieren (Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database). Die Matrix-Metalloproteinasen, die entweder eine katalytische Zink-Bindedomäne oder eine katalytische Calcium-Bindedomäne aufweisen, sind eine bedeutsame Familie der Metalloproteasen *in planta* (Marino and Funk, 2012).

#### Matrix-Metalloproteinasen

Matrix-Metalloproteinasen sind im Apoplasten der pflanzlichen Zelle lokalisiert und über eine Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI) Ankerverbindung in der Plasmamembran befestigt (Flinn, 2008). Des Weiteren wurde mittels GFP-Konstrukten gezeigt, dass Matrix-Metalloproteinasen aus *Nicotiana tabacum* NtMMP1-GFP und aus *Glycine max* Slti114-smGFP direkt in der Plasmamembran lokalisiert sind (Schiermeyer et al., 2009; Cho et al., 2009).

Die Matrix-Metalloproteinase Cs1-MMP, die eine katalytische Zink-Bindedomäne aufweist, ist in den Kotyledonen von *Cucumis sativus* lokalisiert. In diesen ist eine Akkumulation von Cs1-MMP im Übergang der späten Seneszenz zum beginnenden PCD zu beobachten. Somit ist Cs1-MMP wahrscheinlich nicht in der Remobilisierung der Nährstoffe während der Seneszenz involviert, sondern besitzt eine Funktion im beginnenden frühen PCD (Delorme et al., 2000).

Im Gegensatz dazu zeigt die Matrix-Metalloproteinase At2-MMP, die eine katalytische Zink-Bindedomäne aufweist, eine verzögernde Funktion auf den PCD in *Arabidopsis*. Pflanzen der T-DNA Insertionslinie *at2-mmp-1* zeigen eine verfrühte Seneszenz und einen verfrühten PCD der Rosettenblätter und der Hochblätter (Golldack et al., 2001).

Des Weiteren besitzen Matrix-Metalloproteinasen eine Funktion in der Immunantwort bei Pathogen-Befall. In *Solanum lycopersicum* ist die Matrix-Metalloproteinase SI3-MMP in der Pathogen-Abwehr involviert. Tomatenpflanzen, in denen das Gen *SI3-MMP* „gesilenced“ wurde, zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea* und gegenüber dem virulenten Stamm des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000. Transiente Überexpressionen des Gens *SI3-MMP* in *Nicotiana benthamiana* führen zu einer verminderten Suszeptibilität gegen den nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea*. Somit ist

die Matrix-Metalloproteinase Sl3-MMP möglicherweise an der Regulation der Abwehr-Reaktion in Pflanzen gegen Pathogene beteiligt (Li et al., 2015).

#### **1.2.4. Cystein-Proteasen**

Cystein-Proteasen gelten als die wichtigste Klasse der Proteasen *in planta*. Allein in *Arabidopsis* sind gegenwärtig 106 Gene identifiziert, die für funktionale Cystein-Proteasen kodieren (Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database). In der Pflanze sind Cystein-Proteasen maßgeblich an essentiellen Entwicklungsprozessen beteiligt, indem sie entscheidend sowohl in der Stickstoff-Mobilisierung während der Samenreifung und der Seneszenz als auch im PCD involviert sind. Sie verfügen im aktiven Zentrum über eine katalytische Diade, die aus den Aminosäuren Histidin und Cystein besteht. Metacaspasen, „Vacuolar Processing Enzymes“ (VPEs) und Papain-ähnliche Cystein-Proteasen sind drei sehr wichtige Familien innerhalb der Klasse der Cystein-Proteasen (Schaller, 2004; Beers et al., 2004; van der Hoorn 2008; Hierl et al., 2012).

##### **1.2.4.1. Metacaspasen**

Metacaspasen stellen *in planta* die Orthologe zu metazoischen Caspasen dar, da sie eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz aufweisen. Darüber hinaus besitzen Metacaspasen die für metazoische Caspasen typische hochkonservierte Caspase-Hemoglobinase Bindetasche. Trotz der Konservierung der strukturellen Charakteristika, spalten Metacaspasen Peptidbindungen C-terminal zu Arginin- und Lysin-Resten. Caspasen hingegen spalten Peptidbindungen nach Asparaginsäure-Resten spezifisch in P1-Position (Aravind and V. Koonin, 2002; Vercammen et al., 2004; Tsiatisiani et al., 2011). Somit wurde die Hypothese, dass Metacaspasen direkt für Caspase-ähnliche Aktivitäten *in planta* verantwortlich sind, widerlegt. Vielmehr scheint eine Beteiligung von Metacaspasen „upstream“ zu Proteasen, die Asparaginsäure-spezifisch spalten, plausibel (Meslin et al., 2011).

In der Pflanze werden Metacaspasen in zwei Typen unterteilt. Type I Metacaspasen weisen eine N-terminale Pro-Domäne auf, die sich durch ein Prolin-reiches repetitives Element und ein Zink-Finger Motiv charakterisiert. In Metacaspasen der Type II fehlen diese N-terminalen Pro-Domänen. Stattdessen sind Type II Metacaspasen durch eine Linker-Region gekennzeichnet, die zwischen ihren putativen großen und kleinen Untereinheiten liegt (Vercammen et al., 2004; Tsiatisiani et al., 2011; Bollhörner et al., 2013). Generell maturieren fast alle Metacaspasen autokatalytisch von der enzymatisch inaktiven Form in die entsprechende enzymatisch aktive Form (Vercammen et al., 2004; Tsiatisiani et al., 2011). In manchen Fällen (beispielsweise Metacaspase4 aus

*Arabidopsis*) ist allerdings keine Prozessierung für die proteolytische Aktivität erforderlich (Watanabe and Lam, 2011).

Metacaspasen sind entscheidend für die exakte Ausführung des PCD *in planta*. In *Picea abies* ist die Type II Metacaspase mclI-Pa im Suspensor lokalisiert und „Gen-Silencing“ von mclI-Pa führt zu einer Unterdrückung des PCD im Suspensor. Interessanterweise translokalisiert mclI-Pa während des PCD der Suspensor-Zellen vom Cytoplasma in den Nucleus. Möglicherweise initiiert mclI-Pa den PCD, indem mclI-Pa nukleare Strukturproteine abbaut und dies somit zu einer Auflösung der Kernmembran führt. Die Auflösung der Kernmembran wiederum ermöglicht den Eintritt von Nucleasen, die eine DNA-Fragmentierung initiieren (Suarez et al., 2004; Bozhkov et al., 2004; Bozhkov et al., 2005).

In *Arabidopsis* kodieren neun Gene für funktionale Metacaspasen, wobei die Metacaspasen AtMC1, AtMC2 und AtMC3 Type I Metacaspasen sind. AtMC4 bis AtMC9 weisen dagegen keine N-terminale Pro-Domäne auf und sind als Type II Metacaspasen klassifiziert (Tsiatsiani et al., 2011; Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database). Die immense Bedeutung von AtMC1 und AtMC2 auf den HR-vermittelten PCD konnte durch Experimente mit dem Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis* und dem avirulenten Stamm des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 *avrRpm1* gezeigt werden. AtMC1 ist ein positiver Regulator des HR-vermittelten PCD, wohingegen AtMC2 antagonistisch als ein negativer Regulator des HR-vermittelten PCD agiert. Erstaunlicherweise ist die proteolytische Funktion von AtMC2 unabhängig von ihren putativen katalytischen Aminosäuren Histidin und Cystein. Im Gegensatz dazu sind die putativen katalytischen Aminosäuren Histidin und Cystein für die proteolytische Funktion von AtMC1 essentiell. Ein Doppel-Verlust von AtMC1 und AtMC2 führt zu einem fast vollständigen Verschwinden des HR-vermittelten PCD und gleichzeitig jedoch zu keiner erweiterten Suszeptibilität gegenüber diesen Pathogenen (Coll et al., 2010).

Die Type II Metacaspase AtMC9 ist die einzige Metacaspase in *Arabidopsis*, die einen sauren pH-Wert zur autokatalytischen Prozessierung benötigt. Dies ist von besonderem Interesse, da Proteasen, die im pflanzlichen PCD involviert sind, sehr oft ein pH-Optimum im sauren Bereich besitzen, was auf das Ansäuern des Cytoplasmas durch das Platzen der Vakuole in den finalen Stufen des PCD zurückzuführen ist (Vercammen et al., 2004; Tsiatsiani et al., 2011; Tsiatsiani et al., 2013). AtMC9 ist sehr Gewebe-spezifisch in den Zellen der lateralen Wurzelhaube und im Xylem der Wurzeldifferenzierungszone, des Hypokotyls und der Kotyledonen, nicht jedoch im Xylem von jungen Rosettenblättern von Keimlingen exprimiert. Darüber hinaus ist AtMC9 in den Petalen vermehrt an der „Abscission zone“ und in den Antheren im Konnektivgewebe akkumuliert. In allen aufgeführten Geweben findet Entwicklungs-PCD statt (Vercammen et al., 2006; Bollhörn

et al., 2013; Tsiatsiani et al., 2013). Die Funktion von AtMC9 im PCD während der Differenzierung der Tracheen-Elemente des Xylems wurde näher untersucht. In der T-DNA Insertionsmutante *atmc9-2* kann im Vergleich zum Wildtyp keine Verzögerung des Zerplatzens der Vakuole infolge des beginnenden PCD im Protoxylem festgestellt werden. Dagegen ist die Dauer des vollständigen Zersetzens der Zellkomponenten, das nach dem Zerplatzen der Vakuole erfolgt, in der T-DNA Insertionsmutante *atmc9-2* stark verlangsamt. Somit besitzt AtMC9 eine *post mortem* Funktion im PCD und ist nicht an dessen Initiierung beteiligt (Bollhörner et al., 2013; Tsiatsiani et al., 2013).

### 1.2.4.2. „Vacuolar Processing Enzymes“

„Vacuolar Processing Enzymes“ (VPEs) sind Asparaginy-Endopeptidasen, die Peptidbindungen C-terminal zu Asparagin- und Asparaginsäure-Resten spalten (Hara-Nishimura et al., 1998). Obwohl nur eine geringe Homologie in der Aminosäuresequenz zwischen VPEs und metazoischen Caspasen besteht, zeigen ihre jeweiligen dreidimensionalen Strukturen, dass die entscheidenden Aminosäuren ( $\gamma$ VPE: Arg74, His177, Cys219, Ser247; Caspase1: Arg341, His237, Cys285, Ser339) für die Substratbindetasche hochkonserviert sind. Somit können VPEs als funktionelle Analoga zu Caspasen angesehen werden. Allerdings sind VPEs in der Vakuole und Caspasen cytosolisch lokalisiert (Stennicke and Salvesen, 1998; Hara-Nishimura et al., 2005; Hatsugai et al., 2015). VPEs werden im ER als enzymatisch inaktive Pro-Proteine ohne ER-Rückhaltesignal synthetisiert und anschließend zur Vakuole transportiert. Durch den in der Vakuole vorliegenden sauren pH-Wert maturiert die enzymatisch inaktive Pro-Form der VPEs pH-abhängig autokatalytisch in die enzymatisch aktive Form (Kuroyanagi et al., 2002; Yamada et al., 2005).

Die Entdeckung der VPEs erfolgte in den Protein-Speichervakuolen von reifenden Kürbissamen, in denen die VPEs in der Akkumulierung und am Abbau von Speicherproteinen beteiligt sind (Hara-Nishimura and Nishimura, 1987).

Im pflanzlichen PCD sind VPEs sowohl in der Entwicklung als auch in der Pathogen-Abwehr involviert (Hara-Nishimura et al., 2005). Durch das Platzen der Vakuole, eines der entscheidenden Abläufe in den finalen Stufen des PCD, werden VPEs ins Cytoplasma freigesetzt. Diese Freisetzung der VPEs gilt als eines der wichtigsten Stufen in der Ausführung des PCD (Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011). Beispielsweise ist VPE1 im Entwicklungs-PCD in *Solanum tuberosum* beteiligt. Im apikalen Knospenmeristem der Kartoffel-Sprossknolle, in dem PCD-Vorgänge in Form von DNA-Fragmentierungen nachgewiesen wurden, ist eine PCD-induzierte Genexpression von *VPE1* feststellbar (Teper-Bamnlker et al., 2012). In der Abwehr-Reaktion gegenüber

dem pathogenen Bakterium *Erwinia amylovora* (Erreger der Feuerbrandkrankheit) in *Malus domestica* zeigt VPE ebenfalls eine Beteiligung in der HR. In den Blättern der resistenten Kulturform „Free Redstar“ ist eine Hochregulierung des Gens *VPE* nach Inokulation mit *Erwinia amylovora* detektierbar, in den Blättern der suszeptiblen Kulturform „Idared“ ist dagegen keine Hochregulierung feststellbar (Iakimova et al., 2013).

In *Arabidopsis* umfasst die VPE-Gen-Familie vier Mitglieder:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$ VPE. Während der Samenentwicklung ist  $\delta$ VPE in den toten Zellen von zwei der drei inneren Integumente der Samenschale lokalisiert. Die Samenschale besteht aus fünf Zellschichten, drei innere Integumente und zwei äußere Integumente, in denen während der Samenentwicklung PCD stattfindet. Das mittlere innere Integument und das äußere innere Integument, das ans innere äußere Integument anschließt, sind die zwei Zellschichten, in denen zuerst und ab dem Torpedo-Stadium der Embryogenese Prozesse des PCD in Form von aufreißenden Vakuolen zu beobachten sind. In diesen zwei Integumenten ist  $\delta$ VPE in den toten Zellen, die aufgeplatzte Vakuolen aufweisen, akkumuliert. In Samen von Pflanzen der T-DNA Insertionslinie  $\delta vpe$  ist der PCD dagegen während der Samenentwicklung verzögert (Nakaune et al., 2005).

$\gamma$ VPE ist in der Pathogen-Abwehr involviert. Nach der Infektion mit verschiedenen Pathogenen (*Pseudomonas syringae avrRpm1*; *Botrytis cinerea*; „turnip-mosaic“ Virus) ist eine Hochregulierung des Gens  $\gamma$ VPE festzustellen. Darüber hinaus zeigen  $\gamma vpe$ -knockout Pflanzen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber diesen Pathogenen (Rojo et al., 2004).

Die immense Bedeutung der VPEs für den pflanzlichen Zelltod wurde durch „VPE-silencing“ und durch die Analyse einer *Arabidopsis vpe*-Null Quadruple-Mutante deutlich. Der durch das Tabak-Mosaik Virus induzierte PCD äußert sich durch das Zerplatzen der Vakuole und der Ausbildung von Läsionen auf Blättern von *Nicotiana benthamiana*. „VPE-silencing“ von *Nicotiana benthamiana* Pflanzen führte zum vollständigen Verlust der Blattläsionen (Hatsugai et al., 2006). Durch das Mykotoxin Fumonisin B1 werden ebenfalls das Zerplatzen der Vakuole und die Ausbildung von Blattläsionen induziert. Blätter der *Arabidopsis vpe*-Null Quadruple-Mutante sind insensitiv gegenüber dem von Fumonisin B1 induzierten PCD und zeigen keine Blattläsionen. Von den T-DNA Insertionslinien der jeweiligen Einzelmutanten zeigen interessanterweise nur die Blätter der  $\gamma vpe$ -Mutante einen verzögerten PCD in Form von weniger Blattläsionen. Die Blätter der anderen Einzelmutanten  $\alpha vpe$ ,  $\beta vpe$  und  $\delta vpe$  weisen eine ähnliche nekrotische Läsionsfläche wie die Blätter des Wildtyps auf. Darüber hinaus ließ sich mittels RT-PCR zeigen, dass in den Einzelmutanten  $\alpha vpe$ ,  $\beta vpe$  und  $\delta vpe$  und im Wildtyp ausschließlich das Transkript von  $\gamma$ VPE vorhanden ist. Dies bedeutet, dass die VPEs einerseits zueinander funktionell redundant wirken. Andererseits jedoch scheint  $\gamma$ VPE die wichtigste Protease innerhalb der VPE-Familie zu sein (Kuroyanagi et al., 2005).

Des Weiteren scheinen VPEs in der PCD-Initiierung involviert zu sein. VPEs maturieren und aktivieren möglicherweise im Zuge des PCD andere vakuoläre Enzyme, die in Folge dessen den Tonoplast der Vakuole abbauen und somit für das Platzen der Vakuole und der damit verbundenen Freisetzung der in der Vakuole enthaltenen Hydrolasen verantwortlich sind (Hara-Nishimura et al., 2005).

### 1.2.4.3. Papain-ähnliche Cystein-Proteasen

Diese Familie ist nach der ersten entdeckten Cystein-Protease Papain aus *Carica papaya* benannt (Drenth et al., 1968). Fast alle Proteasen dieser Familie (zwei Ausnahmen: Protein-Identifikation AAK44008 und AAK63991) weisen eine N-terminale Pro-Domäne mit dem sogenannten „ERFNIN-Motiv“ (Glu/Asp-Arg-Phe/Tyr/Leu-Asn-Ile/Ala/Val-Asn/Gln) auf. Die Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen besitzen in der Pflanze Funktionen in der Remobilisierung von Nährstoffen und sind im PCD involviert (Beers et al., 2004; Hierl et al., 2012)

In *Arabidopsis* weist die Papain-ähnliche Cystein-Protease RD21 (RESPONSIVE TO DESICCATION 21) verschiedene Funktionen auf. RD21 besitzt kein C-terminales ER-Rückhaltesignal, sondern stattdessen eine C-terminale Cystein-reiche Granulin-ähnliche Domäne, die möglicherweise der Regulierung der Löslichkeit dient und/oder eine Funktion in der Protein-Sekretion besitzt (Yamada et al., 2001). Einerseits steigt das Expressionslevel von *RD21* bei Trockenstress und unter hohen Salzkonzentrationen, was bedeutet, dass die Expression vom Gen *RD21* möglicherweise *in planta* bei Änderungen des osmotischen Potentials induziert wird (Koizumi et al, 1993; Hayashi et al., 2011). Andererseits ist RD21 am Abbau von zellulären Proteinen während der Blattseneszenz und möglicherweise am Abbau von Speicherproteinen in der Samenkeimung beteiligt (Yamada et al., 2001).

Darüber hinaus ist RD21 in der Pathogen-Abwehr involviert. Ein Verlust von RD21 führt in *rd21*-Pflanzen zu einer erhöhten Suszeptibilität für den nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea*. Gegenüber dem pathogenen Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis* und dem virulenten Stamm des pathogenen Bakteriums *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 zeigen *rd21*-Pflanzen eine unveränderte Suszeptibilität (Shindo et al., 2012).

Weitere Beispiele für eine Beteiligung an der Seneszenz und am PCD der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen sind BoCP5 in *Brassica oleracea* und XCP1 und XCP2 (XYLEM CYSTEINE PEPTIDASE 1/2) in *Arabidopsis*. BoCP5 akkumuliert innerhalb von sechs Stunden nach der Ernte in den Blättern sowie in den Röschen des Brokkolis und induziert eine Ernte-abhängige Seneszenz (Eason et al., 2005). In *Arabidopsis* sind die Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen XCP1 und XCP2 in den Vakuolen der Tracheen lokalisiert und im PCD während der Differenzierung der Tracheen-Elemente des Xylems

involviert (Zhao et al., 2000; Funk et al., 2002; van Hautegeem et al., 2014). Die zu XCP1 und XCP2 homologe Papain-ähnliche Cystein-Protease Tr-CP14 aus *Trifolium repens* ist ebenfalls während der Differenzierung der Tracheen-Elemente des Xylems im PCD involviert. Im Gegensatz zu XCP1 und XCP2 ist Tr-CP14 nicht vakuolär, sondern cytoplasmatisch lokalisiert und nach dem Platzen der Vakuole ist eine starke Akkumulierung von Tr-CP14 festzustellen (Mulisch et al., 2013)

### **1.3. Papain-ähnliche KDEL-Cystein-Endopeptidasen: Zelltod-spezifische Cystein-Proteasen**

#### **1.3.1. Synthese und Maturierung**

Die Papain-ähnlichen KDEL-Cystein-Endopeptidasen (KDEL CysEP) sind eine Untergruppe innerhalb der Familie der Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen und nur in Pflanzen vertreten. Sie werden als Proteine mit einer N-terminalen Pre-Pro-Domäne und mit einem C-terminalen ER-Rückhaltesignal (meist KDEL; selten: HDEL, RDEL, SDEL, TDEL oder KDEM) synthetisiert. Dieses Pre-Pro-Enzym wird cotranslational in das Lumen des ER transferiert, wobei beim Eintritt ins ER die Pre-Domäne abgespalten wird. Das enzymatisch inaktive Pro-Enzym wird vom ER in vom ER stammenden Organellen ins Cytoplasma transportiert. Durch Ansäuern des Cytoplasmas aufgrund des Zerplatzens der Vakuole in den finalen Stufen des PCD, zerreißen die vom ER stammenden Organellen und die darin enthaltenen enzymatisch inaktiven Pro-Formen der Proteasen werden freigesetzt. Diese enzymatisch inaktiven Pro-Formen maturieren nun autokatalytisch durch den vorliegenden sauren pH-Wert in die entsprechenden enzymatisch aktiven reifen Untereinheiten, indem die N-terminalen Pro-Domänen und die C-terminalen ER-Rückhaltesignale posttranslational abgespalten werden (Schaller, 2004; Beers et al., 2004; van der Hoorn, 2008; Hierl et al., 2012).

### **1.3.2. KDEL CysEP akzeptieren Proline und Hydroxyproline neben ihrer Spaltstelle**

Beispielhaft für diese Untergruppe ist die KDEL CysEP aus *Ricinus communis* (RcCysEP). In seneszierenden Zellen des Endosperms von *R. communis* wurde ein vom ER stammendes kugelförmiges Organell entdeckt. Dieses Organell ist von einer mit Ribosomen-besetzten Membran umgeben und besitzt einen Durchmesser von 1 µm. Es wurde „dilated cisternae“ bzw. Ricinosom genannt (Vigil, 1970; Mollenhauer, 1970). Die RcCysEP wurde als das Marker-Enzym in den Ricinosomen von seneszierenden Zellen des Endosperms in keimenden Samen und in Nucellus-Zellen von reifenden Samen von *R. communis* identifiziert (Schmid et al., 1999; Schmid et al., 2001; Greenwood et al., 2005). Die Kristallisation der gereinigten RcCysEP ergab eine für Papain-ähnliche Cystein-Proteasen typische Struktur. RcCysEP ist, unterteilt durch die Substratbindetasche mit dem aktiven Zentrum, in zwei Domänen gefaltet, die eine ähnliche Größe aufweisen. Die linke L-Domäne weist fast ausschließlich helikale Strukturen ( $\alpha$ 1- $\alpha$ 4) auf und die rechte R-Domäne besteht größtenteils aus antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen ( $\beta$ 2- $\beta$ 6). Die Faltung der RcCysEP wird zudem durch drei Disulfidbindungen stabilisiert (Than et al., 2004). Die kristallisierte Struktur von RcCysEP ist der kristallisierten Struktur der Papain-ähnlichen Cystein-Protease GP-II (GINGER PROTEASE-II) aus *Zingiber officinale*, die in P2 Position zur Spaltstelle die Aminosäure Prolin akzeptiert, sehr ähnlich (Choi et al., 1999). Die Substratbindetasche von RcCysEP ist verglichen mit den Substratbindetaschen von GP-II und Papain größer bzw. „weiter offen“. In der Substratbindetasche befindet sich die katalytische Tasche, die aus der katalytischen Diade (Cys26 und His162) und den Aminosäuren Glutamin (Gln20) und Asparagin (Asn183) besteht. Die Substratbindetasche wird von den Aminosäuren Leucin (Leu69), Methionin (Met70) und Alanin (136) und einer Leucin-Glycin-Schleife (Leu160-Gly163) geformt. Die offenere Substratbindetasche von RcCysEP gegenüber GP-II und Papain hängt von der relativ kleinen Aminosäure Leu69 ab. In GP-II und Papain befinden sich hier dagegen große aromatische Aminosäuren (GP-II: Trp69; Papain: Tyr67), die in den freien Raum hineinragen und wahrscheinlich große Aminosäuren wie Prolin sterisch am Eindringen hindern (Choi et al., 1999; Than et al., 2004). In einem  $\beta$ -Casein Verdau konnte gezeigt werden, dass RcCysEP die Aminosäure Prolin in P1 und P1' Position zur Spaltstelle akzeptiert, was äußerst ungewöhnlich in der Familie der Endopeptidasen ist (Cunningham and O'Connor, 1997; Than et al., 2004). Die Spaltstellen von RcCysEP im maturierten P1-Typ Extensin von Tabak wurden durch Aminosäuren-Sequenzierung identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass RcCysEP Proline, Hydroxyproline und hoch glykolysierte Hydroxyproline in P2 und P2' Position zur Spaltstelle akzeptiert (Helm et al., 2008).



Grundsätzlich weisen die pflanzenspezifischen KDEL CysEP innerhalb ihrer Familie eine hohe Homologie in ihrer Aminosäuresequenz auf. Darüber hinaus sind die Aminosäuren (Leu69, Met70, Ala136, Leu160-Gly163 Schleife), die für die breitere bzw. offenere Substratbindetasche entscheidend sind, zusammen mit den Aminosäuren der katalytischen Tasche (Gln20, Cys26, His162, Asn183) in allen bekannten KDEL CysEP hoch konserviert. Somit besitzen vermutlich alle bekannten KDEL CysEP diese ungewöhnlich breite Substratspezifität (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012).

### **1.3.3. Akkumulation von KDEL CysEP im sterbenden Gewebe**

Generell sind KDEL CysEP in den pflanzlichen Geweben akkumuliert, in denen der PCD bevorsteht, gerade initiiert wird oder die finalen Stufen des PCD in Form des Zellkollapses bereits stattfindet. Aufgrund ihrer für Endopeptidasen sehr ungewöhnlich breiten Substratspezifität spalten KDEL CysEP unspezifisch Zellkomponenten und gelten daher als „late-acting“ Proteasen (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012).

Das Endosperm stellt nach der Mobilisierung der Speicherstoffe im Zuge der Keimung ein seneszierendes Gewebe dar, in dem darauffolgend PCD stattfindet. In *Ricinus communis* ist RcCysEP und in *Solanum lycopersicum* ist SiCysEP in den seneszierenden Zellen des Endosperms akkumuliert (Schmid et al., 1999; Schmid et al., 2001; Trobacher et al., 2013). Des Weiteren ergaben ultrastrukturelle Untersuchungen von sich entwickelnden und aufplatzenden Antheren von *Solanum lycopersicum*, dass die Zellen des interloculären Septums, des Konnektiv-Gewebes, des Endotheciums sowie die Epidermiszellen, die das Stomium umschließen, Charakteristika für einen stattfindenden PCD aufweisen. In allen aufgeführten Zelltypen der Anthere ist SiCysEP lokalisiert und gilt als ein Indikator für den beginnenden PCD (Senatore et al., 2009).

In *Lilium longiflorum* ist die KDEL CysEP LICYP an der Seneszenz der Tepalen beteiligt. In Überexpressionslinien, die das Protein LICYP-KDEL mit einem C-terminalen ER-Rückhaltesignal „KDEL“ im *Arabidopsis*-Hintergrund exprimieren, sind wie im Wildtyp keine PCD-Abläufe in den Rosettenblättern zu beobachten. Dagegen weisen Überexpressionslinien, die das Protein LICYP ohne ein C-terminales ER-Rückhaltesignal „KDEL“ im *Arabidopsis*-Hintergrund exprimieren, eine sterbende Blattrosette auf. Mittels Immunogold-verknüpften Antikörpern konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass LICYP in den Tepalen von *Lilium longiflorum*, in denen noch keine Seneszenz stattfindet, im ER lokalisiert ist. In Tepalen, in denen der PCD unmittelbar bevorsteht, ist LICYP dagegen in der Vakuole akkumuliert. Erstaunlicherweise ist keine Speicherung in Ricinosomen festzustellen (Battelli et al., 2014).

Als weitere Beispiele für die Beteiligung von KDEL CysEP im pflanzlichen PCD bzw. ihrer Lokalisation in sterbendem Gewebe, sind das äußere Integument in der

Samenentwicklung von *Phalaenopsis* (Nadeau et al., 1996), die seneszierenden Petalen von *Hemerocallis* (Valpuesta et al., 1995) und von *Sandersonia aurantiaca* (O'Donoghue et al., 2002), die reifenden Hülsen von *Phaseolus vulgaris* (Tanaka et al., 1991), die unbefruchteten Ovarien von *Pisum sativum* (Cercós et al., 1999), die hypogäischen Kotyledonen von *Vicia sativa* (Becker et al., 1997) und die epigäischen Kotyledonen von *Vigna mungo* (Toyooka et al., 2000) zu nennen.

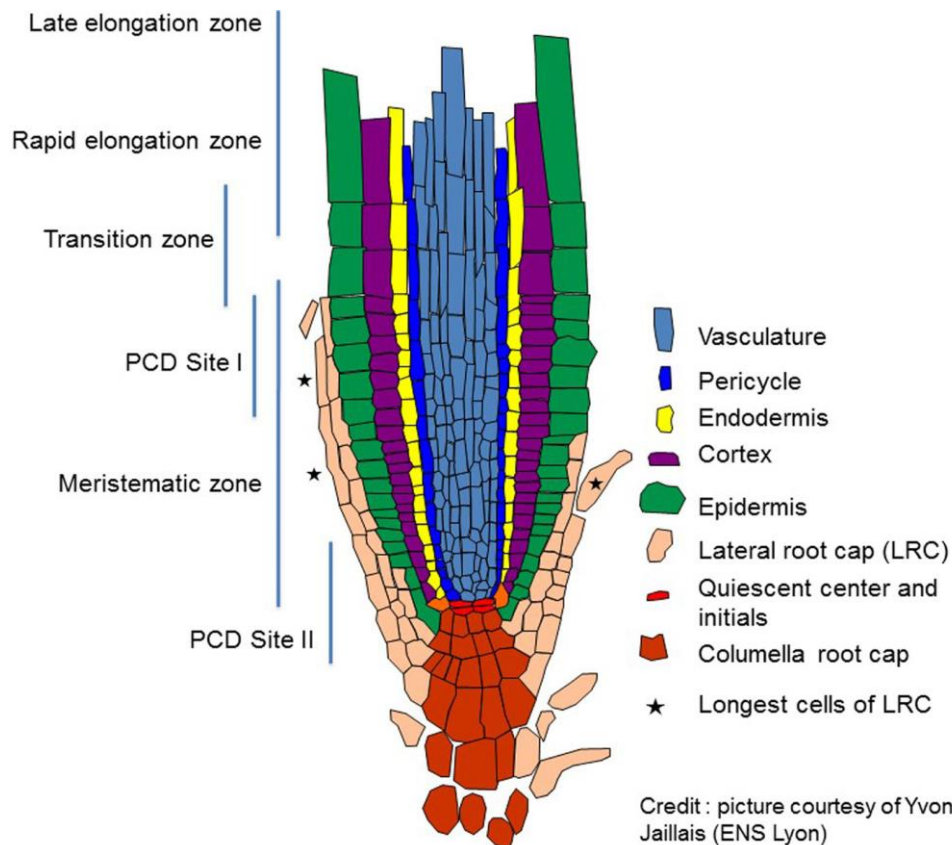
Neben ihrer wichtigen Funktion im pflanzlichen PCD, scheinen KDEL CysEP möglicherweise in der Gewebe-Remodellierung involviert zu sein. Aufgrund der Fähigkeit Extensine, Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine (HRGP) der pflanzlichen Primär-Zellwand, verdauen zu können, ist eine Beteiligung an der Zellwandstreckung aufgrund einer Zellwunderweichung denkbar. Zudem scheint eine Involvierung im Auseinanderweichen von Gewebe infolge einer Zellwunderweichung, beispielsweise beim endogenen Austritt einer neugebildeten Seitenwurzel, möglich (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Dagegen ist über eine mögliche Funktion von KDEL CysEP in der Pathogen-Abwehr bisher nichts bekannt.

### **1.3.4. KDEL CysEP in *Arabidopsis***

In *Arabidopsis* kodieren drei Gene für funktionale KDEL CysEP: *AtCEP1* (At5g50260), *AtCEP2* (At3g48340) und *AtCEP3* (At3g48350) (Rawlings et al., 2014: MEROPS Peptidase Database). Sie sind sowohl im vegetativen als auch im generativen Gewebe Gewebe- und Organ-spezifisch, teilweise sogar Zell-spezifisch exprimiert. AtCEP sind in Geweben, in denen PCD stattfindet, lokalisiert. AtCEP1 ist im generativen Gewebe in der „Abscission zone“, in unbefruchteten Ovulen, im Tapetum, in seneszierenden Petalen und im seneszierenden Endosperm nach der Speicherstoffmobilisierung während der Samenkeimung exprimiert (Helm et al., 2008; Zhang et al., 2014; Olvera-Carrillo et al., 2015). Zudem sind AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 im vegetativen Gewebe in der Wurzel lokalisiert. AtCEP3 scheint in der Wurzel ubiquitär in der Endodermis zu akkumulieren (Helm et al., 2008). AtCEP1 und AtCEP2 sind in der zentralen Wurzelhaube, der Columella, sowie in der lateralen Wurzelhaube lokalisiert (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.); Olvera-Carrillo et al., 2015). AtCEP2 ist in den Columella-Zellen exprimiert, in denen der PCD kurz bevorsteht (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). In der lateralen Wurzelhaube ist einerseits eine Beteiligung von AtCEP im PCD denkbar, da für die exakte und saubere Abschilferung der Zellen der lateralen Wurzelhaube diese vorher absterben müssen. Aus diesem Grund finden sich in der lateralen Wurzelhaube zwei distinkte Regionen, in der der PCD stattfindet: am oberen Ende die „PCD Site I“ und an der Wurzelspitze am unteren Ende die „PCD Site II“ (Abb. 1; Fendrych et al., 2014). Andererseits wäre auch eine

Funktion in der Gewebe-Remodellierung denkbar, da die Zellen der lateralen Wurzelhaube elongieren und somit die Zellwände aufgrund der Zellwandstreckung vorher erweichen müssen (Campilho et al., 2006). Zudem ist eine *AtCEP1::GUS* Expression um die endogene Austrittsstelle der Seitenwurzel aus der Primärwurzel zu finden. Somit scheint *AtCEP1* in der Gewebe-Remodellierung involviert zu sein (Helm et al., 2008).

### Morphologischer Aufbau der Wurzelspitze von *Arabidopsis*



**Abbildung 1: Übersicht des morphologischen Aufbaus der Wurzelspitze von *Arabidopsis*.** Am oberen Ende der LRC (PCD Site I) und am unteren Ende der LRC (PCD Site II) findet PCD statt. Kurz vor der Abschilferung der LRC-Zellen erreichen diese am oberen Ende der LRC ihre maximale Länge (Stern). Geänderte Darstellung der Übersicht, die freundlicherweise von Yvon Jaillais (Hochschule ENS Lyon, yvon.jaillais@ens-lyon.fr) zur Verfügung gestellt wurde.

Des Weiteren ist *AtCEP2* im Hypokotyl akkumuliert. Im Hypokotyl ist die Epidermis in zwei verschiedene Zellreihen aufgeteilt: nicht hervorstehende Zellreihen (non-protruding cell files) mit Stomata und hervorstehende Zellreihen (protruding cell files) ohne Stomata (Gendreau et al., 1997). *AtCEP2* ist in der Epidermis der „non-protruding cell files“, nicht jedoch in den Stomata selbst lokalisiert (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Darüber hinaus ist *AtCEP2* an der Basis junger Blätter epidermal und *AtCEP3* in den Trichomen von Primärblättern zu finden (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

## **1.4. Transport und Speicherung von Proteinen**

In der pflanzlichen Zelle werden Proteine am rauen ER synthetisiert und in Vesikeln vom ER entlassen. Für diesen Vesikeltransport gibt es zwei Möglichkeiten der Sekretion vom ER: den Golgi-abhängigen und den Golgi-unabhängigen Sekretionsweg.

### **1.4.1. Golgi-abhängiger Sekretionsweg**

Im Golgi-abhängigen Sekretionsweg werden die synthetisierten Proteine vom ER in 50-90 nm großen „coat protein II (COPII)“ Vesikeln zur Cis-Seite des Golgi-Apparates transportiert und in diesen freigelassen. Der Golgi-Apparat besteht aus bis zu einigen hundert Dictyosomen, dessen Hohlräume als Zisternen bezeichnet werden. Im Golgi-Apparat wandern die freigesetzten Proteine entweder in den Zisternen von der dem ER-zugewandten Cis-Seite zur ER-abgewandten Trans-Seite. Eine zweite Möglichkeit ist, dass die freigesetzten Proteine für den Transport durch den Golgi-Apparat in 50-100 nm große „coat protein I (COPI)“ Vesikel verpackt und an der Trans-Seite wieder freigelassen werden. Während des Transportes im Golgi-Apparat werden die Proteine beispielsweise durch Glykosylierungen, die in komplexen Glycanen resultieren, modifiziert. An der Trans-Seite knospen die Membranen des Trans-Golgi-Netzwerks ab und die Proteine werden in 50-100 nm großen „clathrin-coated“ Vesikeln oder in sekretorischen „coat protein“ (COP) Vesikeln ins Cytoplasma entlassen (Barlowe et al., 1994; Herman and Schmidt, 2004; Tamura et al., 2004; Szul and Sztul, 2011; Day et al., 2013).

Beispielsweise werden Hordeine, die Speicherproteine Prolamine in *Hordeum vulgare*, an den Polysomen des ER synthetisiert, cotranslational in das Lumen des ER transferiert und durch den Golgi-Apparat in die Protein-Speicher-Vakuole (PSV) transportiert. In der PSV akkumulieren sie mit anderen Proteinen zu „protein bodies (PB)“ (Herman and Schmidt, 2004; von Wettstein, 2007).

### **1.4.2. Golgi-unabhängiger Sekretionsweg**

Im Golgi-unabhängigen Sekretionsweg werden die synthetisierten Proteine im ER in spezifische Vesikel bzw. Organellen verpackt. Diese knospen vom ER ab und werden ohne den Golgi-Apparat zu durchlaufen direkt ins Cytoplasma entlassen.

PB können auch direkt vom ER stammen. Die Prolamine in Reis (*Oryza*) und Mais (Zein) akkumulieren während der Samenentwicklung im Lumen des rauen ER im Endosperm, um schließlich vom ER in PB abzuknospen und direkt in diesen zu den PSV transportiert zu werden (Li et al., 1993; Herman and Larkins, 1999).

Die Pro-Enzyme der zwei Speicherproteine von *Cucurbita*, 11S Globulin und 2S Albumin, akkumulieren in den Kotyledonen während der Samenreifung im Lumen des rauen ER. Sie knospen verpackt in 200-400 nm große „precursor-accumulating (PAC)“ Vesikeln vom

ER ab und werden zur PSV transportiert. Die PAC Vesikel fusionieren mit der PSV und geben ihren Inhalt in diese frei, in denen die Speicherproteine beispielsweise durch VPEs maturiert werden (Hara-Nishimura et al., 1998).

ER-bodies sind weitere vom ER stammende Organellen, die im Gegensatz zu PB und PAC Vesikeln, zur direkten Speicherung von Proteinen dienen und nicht den Transport zu den PSV vermitteln. Sie finden sich ausschließlich in Pflanzen der Ordnung *Brassicales* und weisen eine charakteristische Spindel-förmige Gestalt mit einer Länge von 10 µm und einer Breite von 1 µm auf. In *A. thaliana* akkumulieren ER-bodies große Mengen der β-Glucosidase PYK10, auch BGLU23 (BETA GLUCOSIDASE 23) genannt, die wie KDEL CysEP ein C-terminales ER-Rückhaltesignal „KDEL“ trägt. ER-bodies finden sich ubiquitär in Keimlingen und in Wurzeln, jedoch selten in Rosettenblättern. Darüber hinaus sind ER-bodies wahrscheinlich in pflanzlichen Abwehrmechanismen involviert, vorwiegend gegen Herbivore, da sowohl nach der Behandlung mit Jasmonsäure als auch nach Verwundung *de novo* die Bildung von ER-bodies in Rosettenblättern induziert wird (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2003; Nakano et al., 2014).

### **1.4.3. Transport und Speicherung von Papain-ähnlichen KDEL-Cystein-Endopeptidasen**

Für KDEL CysEP sind ausschließlich Golgi-unabhängige Sekretionswege bekannt. Einerseits fungieren die vom ER stammenden Organellen als Transportmittel zu den speichernden Kompartimenten, andererseits dienen die Organellen selbst als Speicherkompartiment.

In den Kotyledonen von keimenden *Vigna mungo* Samen wird das enzymatisch inaktive Pro-Enzym der KDEL CysEP SH-EP (SULFHYDRYL-ENDOPEPTIDASE) im ER in 200-500 nm große KDEL-Vesikel (KV) verpackt. Diese KV dienen dem Massentransport: Sie knospen vom ER ab und transportieren die Pro-Form von SH-EP Golgi-unabhängig auf direktem Weg zur PSV. Nach Fusion mit der PSV-Membran, maturieren die Pro-Formen der SH-EP in der PSV zu den enzymatisch aktiven Enzymen, die die Speicherproteine zur Mobilisierung abbauen. Somit fungieren die KV ausschließlich als ein Transportmittel (Toyooka et al., 2000; Okamoto et al., 2003).

Dagegen stellen die 1 µm großen Ricinosomen ein temporäres Speicherkompartiment für die enzymatisch inaktiven Pro-Enzyme der KDEL CysEP dar. Die Ricinosomen knospen vom ER ab und werden ebenfalls direkt ins Cytoplasma entlassen. Nach Ansäuern des Cytoplasmas, verursacht durch das Zerreißen der Vakuole beim beginnenden PCD, platzen die Ricinosomen auf und die enzymatisch inaktiven Pro-Enzyme der KDEL CysEP werden freigesetzt. Diese maturieren daraufhin unmittelbar pH-abhängig autokatalytisch

in die entsprechende enzymatisch aktive Untereinheit. Aufgrund ihrer ungewöhnlich breiten Substratspezifität spalten diese unspezifisch Zellkompartimente der seneszierenden Gewebe. Somit werden die Ricinosomen als „Suizid-Bomben“ angesehen und ihr Vorhandensein gilt im pflanzlichen Gewebe als Indikator für den beginnenden PCD (Schmid et al., 1999; Than et al., 2004; Schaller, 2004; Helm et al., 2008; Senatore et al., 2009; Hierl et al., 2012; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Ricinosomen wurden in seneszierenden Endospermzellen in keimenden Samen und in Nucellus-Zellen der reifenden Samen von *R. communis* identifiziert (Schmid et al., 1999; Schmid et al., 2001; Greenwood et al., 2005). Des Weiteren sind Ricinosomen in den seneszierenden Zellen des Endosperms von *Solanum lycopersicum* (Trobacher et al., 2013), in den seneszierenden Petalen von *Hemerocallis* (Schmid et al., 1999), in den unbefruchteten Ovarien von *Pisum sativum* (Cercós et al., 1999) und in den hypogäischen Kotyledonen von *Vicia sativa* (Becker et al., 1997) nachgewiesen worden. In *Chenopodium quinoa* wurden Ricinosomen im seneszierenden Endosperm und im Suspensor während der Samenkeimung lokalisiert (López-Fernández and Maldonado, 2013).

### Speicherung von AtCEP2 in ER-bodies und in Ricinosomen-ähnlichen Organellen

In *Arabidopsis* konnte die Speicherung der KDEL CysEP AtCEP2 in ER-bodies und in Ricinosomen-ähnlichen Organellen nachgewiesen werden. Hierfür wurden Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) für AtCEP2 (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.); s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, mit Pflanzen einer ER-Membranmarker-Linie, die ein translationales Fusionsprotein von GFP mit einem ER-Membranprotein exprimiert (Cutler et al., 2000), gekreuzt. Somit konnte man die vom ER stammenden Organellen am CLSM visualisieren. Das Pro-Enzym von AtCEP2 akkumuliert in zwei verschiedenen, vom ER stammenden Organellen: in ER-bodies und in Ricinosomen-ähnlichen Organellen, die nach den Ricinosomen benannt worden sind.

In den „non-protruding cell files“ des Hypokotyl ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in ER-bodies mit ihrer charakteristischen  $1 \times 10 \mu\text{m}$  großen Spindel-förmigen Gestalt akkumuliert. Im Gegensatz dazu ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in der Columella, in der lateralen Wurzelhaube und an der Basis junger Blätter in runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihren charakteristischen Durchmesser von  $1 \mu\text{m}$ , lokalisiert. Die Ricinosomen-ähnlichen Organellen scheinen auch in *Arabidopsis* als „Suizid-Bomben“ zu fungieren, da das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Columella-Zellen exprimiert ist, in denen der PCD kurz bevorsteht (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

## **1.5. Zellwand-Remodellierung**

### **1.5.1. Aufbau der primären Zellwand**

Das Gerüst der primären Zellwände besteht bei allen höheren Pflanzen vorwiegend aus Cellulose, 1,4- $\beta$ -glykosidisch verknüpften Glucanketten. Die einzelnen Cellulose-Stränge wiederum sind zu Cellulose-Mikrofibrillen gewunden. Diese fibrillären Komponenten sind in eine hoch hydratisierte Pektin-Matrix eingebettet, die vorwiegend aus Homogalacturonan, Rhamnogalacturonan-I und Rhamnogalacturonan-II besteht und sich über Calciumbrücken stabilisiert. Für die Verknüpfungen der einzelnen Cellulose-Mikrofibrillen sind Hemicellulosen, vorwiegend Xyloglucane, die über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden, verantwortlich (Cosgrove, 2000a). Generell sind neben Polysacchariden zudem Proteine wichtige strukturgebende Bestandteile der primären Zellwand. Diese Proteine sind in der Familie der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (HRGP) eingegliedert und in drei Kategorien klassifiziert: moderat glykosylierte Extensine (EXT), hoch-glykosylierte Arabinogalactan Proteine (AGPs) und nicht-, gering- oder hoch-glykosylierte Hydroxyprolin-/Prolin-reiche Proteine (H/PRPs). HRGP werden nach ihrer Synthese entscheidend posttranslational modifiziert: Prolin-Reste werden zu Hydroxyprolinen hydroxyliert; diese Hydroxyproline sowie Serine werden darauffolgend O-glykosyliert. Die so entstandenen glykosylierten Aminosäuren formen in der primären Zellwand aufgrund ihrer starken Assoziationstendenz durch intermolekulare Verlinkungen ein dreidimensionales Netzwerk. Dieses wird zusätzlich durch Quervernetzungen aufgrund kovalenter Bindungen der in den HRGP enthaltenen Tyrosine stabilisiert. Zusammen stellt dies in der Zellwandmatrix ein verfestigendes und strukturgebendes Netzwerk dar, das für die Selbstorganisation der pflanzlichen Zellwand notwendig ist. Des Weiteren scheinen HRGP auch für den Pektin-Komplex in der Zellwand eine stabilisierende Funktion zu besitzen. Sie verknüpfen die Reste der Seitenketten der Pektine Rhamnogalacturonan-I und Rhamnogalacturonan-II, indem sie an beide Pektine kovalent binden und somit eine Verbindungsbrücke darstellen (Cannon et al., 2008; Lamport et al., 2011; Velasquez et al., 2012; Hijazi et al., 2014).

### **1.5.2. Zellwand-Remodellierung in der Elongationszone**

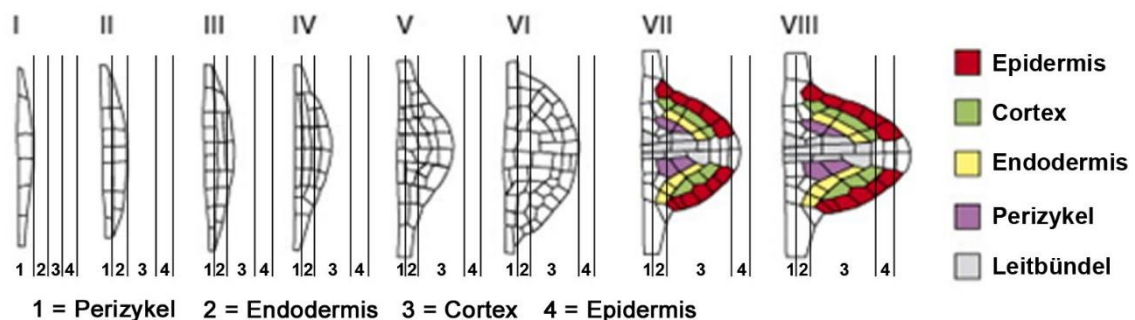
Die pflanzliche Primär-Zellwand besteht aus einem starren Strukturgerüst, das aber durch die Spaltung der tragenden Verknüpfungen irreversibel elongieren kann. Nach der postulierten Säure-Wachstums-Theorie bewirkt das Auxin Indol-3-Essigsäure das Ansäuern des Apoplasten, indem unter ATP Verbrauch mittels der Protonenpumpen ATPasen Protonen  $H^+$  vom Cytoplasma durch die Plasmamembran in den Apoplasten gepumpt werden. Durch den abgesenkten pH-Wert werden im Apoplasten befindliche Proteine, wie beispielsweise Expansine, aktiviert und sind entscheidend an der Zellwandreicherung beteiligt. Diese Zellwandreicherung bewirkt eine Abnahme des Zellwanddruckes und damit zusammenhängend eine Abnahme des Wasserpotentials im Protoplasten. Diese Senkung des Wasserpotentials wiederum bedingt einen Wassereinstrom in das Cytoplasma bzw. vorwiegend in die Vakuolen. Der sich aufbauende Turgor verursacht infolge des mechanischen Stresses eine Verschiebung der gelockerten Zellwandkomponenten. Die Turgor-induzierte Ausdehnung des gelockerten polymeren Netzwerkes führt schlussendlich zur Elongation der gesamten Zelle (Rayle and Cleland, 1992; Cosgrove, 2000a and b).

Expansine gehören zu den Proteinen, die entscheidend in der Zellwandreicherung involviert sind, da sie die stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Xyloglucanen und den Cellulose-Mikrofibrillen lösen. Somit können die einzelnen Cellulose-Mikrofibrillen Turgor-bedingt verschoben werden (Cosgrove, 2000a and b). Des Weiteren sind Xyloglucan-Endotransglucosylasen in der Zellexpansion beteiligt, indem sie die quervernetzenden Xyloglucan-Ketten „endo“ spalten. Zusätzlich bilden sie Xyloglucan-Protein Intermediate, um diese zu dem nicht reduzierenden Ende einer anderen Xyloglucan-Kette zu transferieren und dort Xyloglucan-Fragmente neu zu verbinden. Insofern besitzen Xyloglucan-Endotransglucosylasen eine hervorzuhebende Funktion, da sie die Xyloglucan-Ketten nicht nur lösen, sondern auch wieder verknüpfen. Dies stellt die Ausdehnung der Zellwand ohne Strukturverlust sicher (Cosgrove, 2000b; van Sandt et al., 2007). Zudem lockern Pektinmethylesterasen die hoch hydratisierte Pektin-Matrix, indem sie die Calciumbrücken zwischen Pektinen durch Veresterung der Carboxygruppen spalten (Micheli, 2001).



### 1.5.3. Zellwand-Remodellierung während der Seitenwurzelbildung

Die Bildung der Seitenwurzel erfolgt in allen Pflanzen endogen. In *Arabidopsis* stammt die Seitenwurzel von den sogenannten Perizykel-Gründerzellen. Das Perizykel stellt eine einschichtige Zellschicht dar, die aus abgegrenzten Phloem-poligen und meristematischen Xylem-poligen Zellen besteht. Der Start der Bildung der Seitenwurzel wird durch asymmetrische antikline Zellteilungen von jeweils drei benachbarten Xylem-poligen Gründerzellen initiiert, die ein einschichtiges, aus bis zu zehn Zellen bestehendes Seitenwurzel-Primordium bilden (Abb. 2 Stadium I). Durch eine anschließende perikline Zellteilung entsteht ein zweischichtiges Seitenwurzel-Primordium, mit einer inneren und einer äußeren Zellschicht, das in die Endodermis vordringt (Abb. 2 Stadium II). Durch weitere perikline Zellteilungen in den Entwicklungsstadien III, IV und VI sowie durch antikline Zellteilungen in den Entwicklungsstadien V und VII bildet sich im Stadium VII ein Kuppel-förmiges Seitenwurzel-Primordium (Abb. 2). Im Entwicklungsstadium III-VI ist das Seitenwurzel-Primordium im Cortex und im Stadium VII in der Epidermis lokalisiert. Das Seitenwurzel-Primordium ist im Stadium VII bereits in Leitbündel, Perizykel, Endodermis, Cortex und Epidermis differenziert und zeigt das charakteristische Zellmuster 8-8-8. Die linke Seite, die Spitze und die rechte Seite der Epidermis des Seitenwurzel-Primordiums bestehen aus jeweils acht Zellen. Im Entwicklungsstadium VIII tritt das Seitenwurzel-Primordium durch Auseinanderweichen der Epidermis der Primärwurzel hervor (Abb. 2). Ab dem charakteristischen Zellmuster 10-16-10 (linke und rechte Seite der Epidermis bestehen aus jeweils zehn Zellen; Spitze der Epidermis wird aus 16 Zellen gebildet) wird das Seitenwurzel-Primordium als adulte Seitenwurzel bezeichnet (Malamy and Benfey, 1997; Péret et al., 2009a; Vermeer and Geldner, 2015).



**Abbildung 2: Übersicht der Entwicklungsstadien I-VIII beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums durch die überlagernden Schichten (Endodermis, Cortex, Epidermis) in *Arabidopsis*.** Geänderte Darstellung der Übersicht nach Péret et al., 2009a.

Alle Entwicklungsstufen der Seitenwurzelbildung sind durch Auxin-Signal Module kontrolliert: beginnend mit der zyklischen Pre-Initiierung der Xylem-poligen Perizykelzellen in der sogenannten Oszillierungszone, weiterführend mit der Polarisierung der Gründerzellen und der damit verbundenen Initiierung der Seitenwurzelbildung, bis hin zur Zellseparation, die final den endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums ermöglicht. Im Entwicklungsstadium V und VI steht das Seitenwurzel-Primordium kurz vor dem Eintritt in die epidermale Zellschicht. Auxin, das von der Spitze des Seitenwurzel-Primordiums stammt, leitet in den direkt überlagernden Epidermiszellen die Degradierung des Inhibitors IAA14/SLR1 (INDOLE ACETIC ACID14/SOLITARY-ROOT1) ein. Dies führt zur Aktivierung des Gens *LAX3* (*LIKE AUXIN1-3*) durch die „auxin response factors“ ARF7/ARF19. Der Auxin-Influx Transporter *LAX3* bewirkt wiederum, dass mehr Auxin in die direkt überlagernden Epidermiszellen eintreten kann. In diesen direkt überlagernden Epidermiszellen wird die Expression vieler Zellwand Remodellierungs-Gene durch Auxin induziert. Somit agiert das vom Seitenwurzel-Primordium stammende Auxin als ein lokales induktives Signal für eine direkt gesteuerte Zellseparation der unmittelbar überlagernden Nachbarzellen (Péret et al., 2009a; Lavenus et al., 2013; Vilches-Barro and Maizel, 2015; Vermeer and Geldner, 2015).

In *Arabidopsis* muss das Seitenwurzel-Primordium drei überlagernde Zellschichten (Endodermis, Cortex, Epidermis) durchdringen. Die exakte zeitliche und räumliche Ausführung der Zellseparation zur Vermeidung mechanischer Hindernisse ist daher von entscheidender Bedeutung. Hierbei sind keine PCD-Abläufe feststellbar, es ist ausschließlich ein Auseinanderweichen der Zellen, veranlasst durch Zellwand Remodellierungs-Enzyme, beobachtbar (Péret et al., 2009b).

In dieser Zellseparation sind wie in der Zellelongation die Enzyme Expansine (Exp1, Exp17), Xyloglucan-Endotransglucosylase (XTR6) und Pektinmethylesterasen (PME1) involviert (Cosgrove 2000b; Laskowski et al., 2006; van Sandt et al., 2007; Swarup et al., 2008). Des Weiteren ist das Enzym Polygalacturonase (PG) an der Spaltung des Pektins und das Enzym Glycosyl-Hydrolase (GLH17) bei der Zellseparation beteiligt (Swarup et al., 2008).

Zudem scheint die KDEL CysEP *AtCEP1* in der Gewebe-Remodellierung involviert zu sein, da eine *AtCEP1::GUS* Expression um die endogene Austrittsstelle der Seitenwurzel aus der Primärwurzel detektierbar ist (Helm et al., 2008).

## **1.6. Die pflanzliche Immunität**

Die pflanzliche Immunität ist eine hochkomplexe und effiziente Abwehrmaschinerie gegenüber vielen pathogenen Organismen. Pflanzen besitzen gegenüber Pathogenen eine Grundimmunität, die als Basisresistenz bzw. als Nicht-Wirt-Resistenz bezeichnet wird. Einerseits hängt diese Nicht-Wirt-Resistenz vom Pathogen selbst ab, indem dieser die Pflanze nicht als Wirt erkennt. Andererseits wird der Pathogen-Befall durch induzierbare Abwehrmechanismen seitens der Pflanze abgeblockt (Thordal-Christensen, 2003; Dodds and Rathjen, 2010).

Vor diesen induzierbaren Abwehrmechanismen dienen der Pflanze konstitutiv vorhandene präformierte Abwehrmechanismen als erste Abwehrbarriere. Zum einen besitzen diese Epikutikularwachse und Zellwand als physikalische Barrieren. Zum anderen weisen Pflanzen chemische Barrieren auf, indem sie antimikrobiell wirksame Phytoanticipine produzieren (VanEtten et al., 1994; Thordal-Christensen, 2003).

### **1.6.1. Nicht-Wirt-Resistenz**

Nachdem der pathogene Organismus die präformierten Barrieren erfolgreich überwunden hat, entscheidet das rechtzeitige Erkennen der Anwesenheit potentieller Pathogene über Resistenz oder Suszeptibilität seitens der Pflanze. Die Erkennung der Pathogene erfolgt über nicht-wirtsspezifische exogene Elizitoren, den sogenannten „pathogen/microbe-associated molecular patterns“ (PAMPs/MAMPs) (Boller and Felix, 2009). Diese sind hochkonservierte Strukturen oder Moleküle, die nicht in der pflanzlichen Wirtszelle vorhanden sind. Sowohl die Hauptkomponente der pilzlichen Zellwand Chitin als auch die Hauptkomponente bakterieller Flagellen Flagellin stellen überaus potente PAMPs dar (Nürnberg and Lipka, 2005). Die Erkennung der exogenen Elizitoren erfolgt durch auf der Zelloberfläche befindliche „pattern recognition“ Rezeptoren (PRRs), die entweder Rezeptor-ähnliche Kinasen oder Rezeptor-ähnliche Proteine sind (Macho and Zipfel, 2014). Des Weiteren existieren pflanzeigene, durch Verwundung freigesetzte endogene Elizitoren „damage-associated molecular pattern“ (DAMPs), deren Erkennung nach einem ähnlichen Mechanismus wie die Erkennung exogener Elizitoren abläuft (Boller and Felix, 2009).

Die Erkennung von PAMPs bzw. MAMPs durch PRRs lösen in der Pflanze spezifische Abwehrreaktionen aus (PAMP „triggered immunity“, PTI), die eine erfolgreiche Kolonisierung durch nicht speziell an den Wirt angepasste Pathogene verhindern (Jones and Dangl, 2006). Die PTI initiiert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, Veränderungen des Calciumkationen-Gehalts im Cytoplasma sowie die Expression von „*pathogenesis-related (PR)*“ Genen und die Induktion von „mitogen-activated protein kinases“ (MAPKs) (Hückelhoven, 2007a; Boller and Felix, 2009).

### **1.6.2. Basiskompatibilität**

In Folge der Evolution hat sich eine Basiskompatibilität der Pathogene gegenüber ihren Wirtspflanzen entwickelt, d.h. sie umgehen oder unterdrücken die induzierbaren Abwehrmechanismen der PTI und etablieren mittels Effektoren eine Virulenz gegenüber dem Wirt. Somit können speziell an ihren Wirt angepasste Pathogene aufgrund einer „effector triggered susceptibility“ (ETS) kompatibel mit der Wirtspflanze interagieren (Jones and Dangl, 2006).

### **1.6.3. Rassenspezifische Resistenz**

Um der ETS entgegenzuwirken, etablierten die Pflanzen im Zuge der Evolution in Form der „effector triggered immunity“ (ETI) einen zweiten Mechanismus der Pathogenerkennung. Im Cytoplasma lokalisierte Resistenz (R) Proteine erkennen rassenspezifisch Effektoren der Pathogene oder zelluläre Veränderungen, die durch diese Effektoren induziert worden sind (Jones and Dangl, 2006). Die Gen-für-Gen Hypothese beschreibt, dass die Wirtspflanze ein spezifizierendes dominantes Resistenzgen (*R*) besitzt, das mit einem spezifizierenden dominanten Avirulenzgen (*AVR*) des Pathogens korrespondiert (Wit, 1992). Für die Erkennung der Avirulenzprodukte gibt es zwei verschiedene Modelle. Das erste Modell beschreibt ein R-Protein, das direkt das entsprechende AVR-Protein erkennt (Martin et al., 2003). Das zweite, sogenannte Wächter-Modell stellt dagegen die indirekte Erkennung der Pathogen-Effektoren dar, indem das R-Protein als Wächter fungiert. Im Wirt existieren sogenannte Virulenz- oder Effektor-Targets, an die AVR-Proteine zunächst binden. Durch Konformationsänderungen wirken diese Effektor-Target-AVR-Komplexe nun als Elizitoren, die von den R-Proteinen erkannt werden (Martin et al., 2003; Dangl and Jones, 2001). Sowohl die direkte als auch die indirekte Erkennung durch R-Proteine führen schließlich zur Hypersensitiven Reaktion (HR), die vor allem gegen biotrophe Pathogene wirksam ist. Die ETI löst eine stärkere Abwehrreaktion als die PTI aus (Dodds and Rathjen, 2010).

Die ausgebildete ETI seitens der Wirtspflanze führt dazu, dass Pathogene zur erneuten Umgehung der ETI ihre Effektoren modifizieren oder neu ausbilden. Dies wiederum bewirkt, dass die Wirtspflanze neue R-Proteine für die Erkennung der neuen bzw. modifizierten Effektoren evolviert, die erneut ETI induzieren. Diese Co-Evolution zwischen Wirtspflanzen und Pathogenen ist im sogenannten „zigzag“ Modell beschrieben (Jones and Dangl, 2006).

## **1.7. Abwehrmechanismen gegen direkt penetrierende Pathogene**

Die erfolgreiche Penetration der ersten Epidermiszellen ist für das Überleben vieler pilzlicher Pathogene entscheidend. Im Gegensatz dazu ist es für die Wirtspflanze essentiell, frühe Abwehrreaktionen gegen das Penetrieren des Pathogens und der daraus resultierenden Kolonisierung einzuleiten (Hückelhoven and Panstruga, 2011).

### **1.7.1. Verstärkende Zellwandablagerungen**

Die Wirtspflanze bildet an der Penetrationsstelle des Pilzes innerhalb von Stunden Zellwandablagerungen, sogenannte Papillen, als pre-invasive Abwehrreaktion. Diese Zellwandablagerungen bestehen vorwiegend aus dem  $\beta$ -1,3-glykosidisch verknüpften Glucan Callose sowie aus anderen Polysacchariden, phenolischen Verbindungen, Wasserstoffperoxid und antimikrobiell wirksamen Proteinen. Die daraus resultierende verstärkte Zellwand dient vermutlich als physikalische Barriere gegen den hydrolytischen und osmotischen Druck, der durch das Appressorium des penetrierenden Pilzes verursacht wird. Eine verzögerte Zellwandverstärkung hingegen führt zu einer leichteren Infektion durch den Pilz (Hückelhoven, 2005; Hückelhoven, 2007a). Generell erfolgt die Papillenbildung an dem Bereich der Innenseite der epidermalen Zellwand, an dem der Pilz von außen mittels des Appressoriums zu penetrieren versucht. In der Zelle sind an der Penetrationsstelle Fokussierungen von Mikrotubuli und Aktinfilamenten zu beobachten, die an dieser zur Akkumulation von Zellkern, Golgi-Apparat und ER führen. Somit können Enzyme Papillen-Komponenten direkt am Ort des Geschehens synthetisieren (Hückelhoven, 2007a and b; Eichmann and Hückelhoven, 2008). Des Weiteren werden die für die Papillen-Bildung benötigten Komponenten von zellulären Vesikeln und Vesikel-ähnlichen Strukturen exocytotisch in den Apoplasten freigesetzt (Hückelhoven, 2007b). Wasserstoffperoxid ist beispielsweise an der Lignifizierung und der Vernetzung der Prolin-reichen Zellwandproteine HRGP, die in einem verfestigenden Zellwandnetzwerk resultieren, beteiligt. Die Bedeutung von Wasserstoffperoxid in der pre-invasiven Abwehrreaktion wird dadurch aufgezeigt, dass vorwiegend in nicht-penetrierten Papillen eine Wasserstoffperoxid-Akkumulation festzustellen ist (Bradley et al., 1992; Hückelhoven, 2007a).

### **1.7.2. Hypersensitive Reaktion**

Nachdem der Pilz durch die Penetration der Papillen die pre-invasive Abwehrbarriere überwinden konnte, stellt die Hypersensitive Reaktion (HR) einen weiteren Abwehrmechanismus seitens der Pflanze dar. Die HR wird rassenspezifisch, als Folge der durch die R-Proteine vermittelte ETI eingeleitet und führt zur Inkompatibilität (Dodds and Rathjen, 2010; Jones and Dangl, 2006).

Generell ist die HR als ein nicht-autolytischer PCD definiert (van Doorn and Woltering, 2005; van Doorn, 2011). Dieser HR-vermittelte PCD ist ein schnell eintretender Zelltod, der lokal auf eine oder wenige Zellen an der Infektionsstelle des Pathogens beschränkt ist. Der Abwehrmechanismus der HR beinhaltet einen „oxidative burst“, was zur Freisetzung von Salicylsäure, Stickstoffmonoxiden und reaktiven Sauerstoffspezies wie dem Hydroperoxid-Anion sowie Wasserstoffperoxid führt. Des Weiteren wird der Influx von Calciumkationen in das Cytoplasma und die Aktivierung von MAPKs Signalkaskaden beobachtet. Die daraus resultierenden folgenden PCD-Reaktionen sind Lipid-Peroxidation, Abbau von Antioxidantien, Schrumpfen des Cytoplasmas und DNA-Fragmentierung. Darüber hinaus findet vereinzelt eine Zersetzung der Plasmamembran und das Zerreißen des Tonoplasten statt (Hong et al., 2008; Coll et al., 2011; van Doorn, 2011).

Gegen obligat biotrophe Pathogene stellt die HR eine entscheidende Abwehrreaktion dar, da diese Pathogene lebendes Gewebe benötigen. Nekrotrophe Pathogene können dagegen selbst einen „oxidative burst“ induzieren, um sich vom abgestorbenen Gewebe zu ernähren (van Kan, 2006).

### **1.7.3. „Pathogenesis related genes“: PR-Gene**

Viele Pflanzen initiieren nach Pathogen-Befall die Expression der „*pathogenesis related*“ (*PR*) Gene, um die jeweils geeigneten Abwehrreaktionen einzuleiten. Die *PR*-Gene sind durch Signalwege, in denen Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und das dazugehörige Methylderivat Methyljasmonat sowie Ethylen (ET) als Schlüsselmoleküle fungieren, reguliert. SA abhängige *PR*-Gene sind beispielsweise *PR-1* und *PR-5*. JA und ET dagegen co-regulieren gemeinsam *PR*-Gene wie *PR-3*, *PR-4* und *PR-12*, das auch als *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*) bezeichnet wird (Reymond and Farmer, 1998; Glazebrook, 2001). Eine entscheidende Funktion besitzt hierbei das Protein NPR1 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED Genes1). Im SA-Signalweg bindet NPR1 „downstream“ von SA an TGA1 Transkriptionsfaktoren und aktiviert somit SA-abhängige Elemente in den Promotoren der *PR*-Gene, die den Start der Expressionen einleiten. Darüber hinaus fungiert das durch SA aktivierte NPR1 als negativer Regulator des JA-Signalwegs (Glazebrook, 2001; Pieterse and Van Loon., 2004). Die *npr1* Mutanten von *Arabidopsis*

weisen Defekte im SA-abhängigen Signalweg auf und zeigen gegenüber biotrophen Pathogenen eine erhöhte Suszeptibilität. Im Gegensatz dazu sind *npr1* Mutanten bei Befall von nekrotrophen Pathogenen nicht suszeptibler. Damit übereinstimmend, zeigen Mutanten, die einen Defekt im JA- oder ET-Signalweg besitzen, wie beispielsweise *ein2* (*ethylene insensitive2*) und *coi1* (*coronatine insensitive1*), eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber nekrotrophen Pathogenen und keine erhöhte Suszeptibilität im Vergleich zu biotrophen Pathogenen. Somit scheint der SA-abhängige Signalweg für die Abwehrreaktion gegen biotrophe sowie hemibiotrophe Pathogene und der JA- und ET-abhängige Signalweg einzig gegen nekrotrophe Pathogene verantwortlich zu sein (Thomma et al., 2001; Pieterse and Van Loon., 2004).

AtCPR5 (CONSTITUTIVE EXPRESSION OF PR GENES 5; At5g64930) ist ein negativer Regulator der durch die ETI ausgelöste HR und des damit verbundenen PCD, indem es mit Zellzyklus-abhängigen Kinase-Inhibitoren interagiert und somit den Zellzyklus kontrolliert (Wang et al., 2014). Darüber hinaus ist AtCPR5 in der Entwicklung bei der Blatt-Seneszenz und in der Trichombildung involviert (Kirik et al., 2001). AtCPR5 ist ein Membranprotein, das im Zellkern lokalisiert ist (Yoshida et al., 2002). In *atcpr5* Mutanten führt der Verlust von AtCPR5 zu einer konstitutiven Expression der SA-, JA- und ET-abhängigen *PR*-Gene. Somit zeigen *atcpr5* Pflanzen eine konstitutive Resistenz gegenüber dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* und dem biotrophen Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis*. Des Weiteren besitzen *atcpr5* Mutanten reduzierte Trichom-Verzweigungen. Darüber hinaus weisen *atcpr5* Mutanten neben Zwergwuchs, eine verfrühte Kotyledonen-Seneszenz auf und junge Rosettenblätter zeigen Bereiche spontaner nekrotischer Blattläsionen (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 2000; Brininstool et al., 2008).

### **1.8. Infektionsablauf in der kompatiblen Interaktion zwischen *Erysiphe cruciferarum* und der suszeptiblen Wirtspflanze *Arabidopsis***

Echte Mehltaupilze infizieren alle über der Erde befindlichen Organe höherer Pflanzen. Sie sind obligat biotrophe Pathogene, die epiphytisch auf der Wirtspflanze leben. Ausschließlich ihr spezielles Ernährungsorgan, das Haustorium, penetriert zur Nahrungsaufnahme in die epidermalen Wirtszellen (Hückelhoven, 2005).

Die echten Mehltaupilze sind Ascomyceten und in der Ordnung *Erysiphales* eingegliedert. Diese Ordnung beinhaltet ausschließlich eine Familie, die *Erysiphaceae*, die in fünf Tribus unterteilt ist: *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*, *Cystotheceae*, *Phyllactiniaceae* und *Blumeriaceae*. Aus diesen fünf Tribus können vier echte Mehltaupilze *Arabidopsis* als Wirtspflanze besiedeln: *Golovinomyces cichoracearum*, *Golovinomyces orontii*, *Oidium neolycopersici* und *Erysiphe cruciferarum* (Braun et al., 2002).

Die kompatible Interaktion zwischen dem obligat biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum* und der suszeptiblen Wirtspflanze *Arabidopsis* beginnt mit der Landung der asexuellen Konidiospore auf der Blattoberfläche (Eichmann and Hückelhoven, 2008). Die Konidiospore ist von ellipsoider bis zylindrischer Form und besitzt eine gezahnte Oberfläche. Innerhalb weniger Stunden keimt diese an einem Ende aus: Es bildet sich ein mehrlappiger appressorialer Keimschlauch (Adam et al., 1999; Micali et al., 2008). Dieser appressoriale Keimschlauch schwillt an seiner Spitze an und formt das spezialisierte Penetrationsorgan, das Appressorium. Mit Hilfe von mechanischem Druck und Zellwand-lytischen Enzymen penetriert das Appressorium durch die Kutikula und die Zellwand der Wirtspflanze. Die Wirtspflanze hingegen reagiert ihrerseits mittels der Bildung von Zellwand-verstärkenden Papillen, die eine chemische und physikalische Barriere darstellen (Hückelhoven, 2005; Hückelhoven, 2007; Micali et al., 2008). Kann *E. cruciferarum* diese Zellwandbarriere durchbrechen und somit erfolgreich penetrieren, entwickelt dieser ein eiförmiges, längliches Ernährungsorgan, das Haustorium (Adam et al., 1999). Die Plasmamembran der Wirtszelle wird nach innen eingestülpt und umhüllt das Haustorium. Durch diese Invagination bildet sich eine extrahaustoriale Membran mit einer extrahaustorialen Matrix aus, die das Haustorium vollständig umschließt und vom Cytoplasma der Wirtszelle trennt (Koh et al., 2005; Micali et al., 2008). Somit bleibt die Wirtszelle intakt, was essentiell für den obligat biotrophen Pathogen ist. Über das Haustorium werden Nährstoffe, wie Aminosäuren und Kohlenhydrate, aus der Pflanze aufgenommen (Hückelhoven, 2005). Des Weiteren scheint das Haustorium Effektoren freizusetzen, um die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu unterdrücken (Micali et al., 2008). Generell beschränkt sich die Penetration von *E. cruciferarum* auf die epidermale Zellschicht. Darunterliegende Zellschichten wie das Mesophyll werden nicht invasiert



(Eichmann and Hückelhoven, 2008). Nach der Ausbildung des Haustoriums, wächst der Pathogen epiphytisch, indem er sekundäre Hyphen ausbildet, die im Falle von *E. cruciferarum* einen Verzweigungsgrad von weniger als 45 Grad aufweisen. Entlang der sekundären Hyphen werden erneut Appressorien zur wiederholten Penetration gebildet. Der asexuelle Lebenszyklus von *E. cruciferarum* endet mit der Bildung von Konidiophoren, aus denen ein bis zwei Konidiosporen abknospen. Die anemochore Verbreitung komplettiert die vegetative Vermehrung (Adam et al., 1999; Micali et al., 2008).

## **1.9. Involvierung von Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen in der Pathogen-Abwehr**

Für einige Proteasen konnte bereits eine Beteiligung in der Pathogen-Abwehr gezeigt werden, vor allem für Serin-, Aspartat-, Metallo- und Cystein-Proteasen, die für die Ausführung des PCD bedeutende Funktionen besitzen (s. Kap. 1.2., 1.3.). Dies erscheint logisch, da beispielsweise die HR in Form eines schnellen PCD gegen obligat biotrophe Pathogene eine entscheidende Abwehrreaktion der Pflanze ist. Das lokal begrenzte Absterben der pflanzlichen Zellen entzieht dem obligat biotrophen Pathogen die nötige Nahrungsversorgung und sichert gleichzeitig das Überleben der Pflanze.

Die Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen RCR3 (REQUIRED FOR CLADOSPORIUM RESISTANCE-3) und PIP1 (PHYTOPHTHORA INHIBITED PROTEASE-1) werden in der Kulturform der Tomate *Lycopersicon esculentum* während des Pathogen-Befalls in den Apoplasten sekretiert und akkumulieren dort zur Pathogen-Abwehr. Beide Proteasen werden durch von Pathogen-stammende Inhibitoren gehemmt (Krüger et al., 2002; Thian et al., 2007). PIP1 wird während der Infektion mit dem biotrophen Oomycet *Phytophthora infestans*, der für die Braunfäule verantwortlich ist, durch dessen Cystatin-ähnlichen Protease-Inhibitor EPIC2B (EXTRACELLULAR PROTEASE INHIBITOR WITH CYSTATIN-LIKE DOMAIN 2B) inhibiert (Tian et al., 2007).

Dagegen trägt der biotrophe Blattpilz und Erreger der Samtfleckenkrankheit *Cladosporium fulvum* das Avirulenzgen AVR2, das für ein Cystein-reiches Protein AVR2 kodiert. Während der Infektion mit *C. fulvum* wird RCR3 von AVR2 inhibiert und es bildet sich ein RCR3-AVR2 Komplex. RCR3 fungiert nicht als Effektor-Target, sondern als Köder, um das eigentliche Target PIP1 vor dem pathogenen Effektor-Protein AVR2 zu schützen. Der gebildete RCR3-AVR2 Komplex wirkt nun als Elizitor und wird von dem R-Protein CF-2 (CLADOSPORIUM FULVUM RESISTANCE-2) erkannt, das infolgedessen die HR auslöst. Somit gewährleistet CF-2 die AVR2-abhängige Resistenz gegen den biotrophen Blattpilz *Cladosporium fulvum* (Krüger et al., 2002; Rooney et al., 2005; Lozano-Torres et al., 2012).

In *Arabidopsis* ist die Papain-ähnliche Cystein-Protease RD21 in der Pathogen-Abwehr involviert, da ein Verlust von RD21 in *rd21* Mutanten zu einer erhöhten Suszeptibilität für den nekrotrophen Pathogen *Botrytis cinerea* führt (Shindo et al., 2012; s. Kap. 1.2.4.3.).

Über eine mögliche Funktion der KDEL CysEP in der Pathogen-Abwehr ist hingegen bisher nichts bekannt. Allerdings wird für die KDEL CysEP AtCEP1 eine Beteiligung in der Pathogen-Abwehr in *Arabidopsis* vermutet, da Pflanzen der *atcpr5* Mutante gegenüber dem pathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* und dem biotrophen Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis* eine konstitutive Resistenz aufweisen (Bowling et al.,

1997; Clarke et al., 2000). Die Genexpressions-Daten dieser *Arabidopsis* Mutante *atcpr5* (GEO accession GSE5745) aus der Datenbank für Genexpressionen (Genevestigator: Zimmermann et al., 2004), zeigen eine signifikante Hochregulierung des *AtCEP1* Transkripts in zwei Wochen alten *atcpr5* Mutanten im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen.

### **1.10. Zielsetzung der Arbeit**

KDEL CysEP besitzen aufgrund ihrer für Endopeptidasen ungewöhnlich breiten Substratspezifität wichtige Funktionen in den finalen Stufen des Zellkollapses im Entwicklungs-PCD (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012). Diese breite Substratspezifität führt dazu, dass beispielsweise RcCysEP das maturierte P1-Typ Extensin von Tabak spalten kann, indem es Proline, Hydroxyproline und hoch glykolysierte Hydroxyproline in P2 und P2' Position zur Spaltstelle akzeptiert (Helm et al., 2008). Die für die breitere Substratbindetasche verantwortlichen Aminosäuren sind in allen bekannten KDEL CysEP hoch konserviert. Somit besitzen vermutlich alle bekannten KDEL CysEP diese ungewöhnlich breite Substratspezifität und können Extensine verdauen (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012). Extensine sind Proteine aus der Familie der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine und ihre intakte molekulare Struktur hat große Bedeutung für die Stabilität der pflanzlichen Primär-Zellwand (Cannon et al., 2008; Gille et al., 2009; Velasquez et al., 2011). Demzufolge könnten KDEL CysEP eine Funktion in der Zellwunderweichung im Zuge der Gewebe-Remodellierung besitzen.

Ziel dieser Arbeit ist es, die Funktion der KDEL CysEP in *Arabidopsis* in der Gewebe-Remodellierung sowie im PCD während der Entwicklung und in der Pathogen-Abwehr zu analysieren.

Es wird die Funktion von AtCEP im PCD zur Pathogen-Abwehr während der kompatiblen Interaktion des biotrophen Ascomyceten *Erysiphe cruciferarum* untersucht. Hierfür werden epidermale Zelltod-Ereignisse bei Einfach-Verlust von AtCEP1 sowie AtCEP3 und bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mikroskopisch ausgewertet. Transgene Reporterlinien von AtCEP1 werden biochemisch und mikroskopisch subzellulär analysiert. Zudem soll geklärt werden, ob AtCEP1 einen Beitrag im AtCPR5-kontrollierten PCD während der Interaktion mit *E. cruciferarum* leistet.

Für eine Beteiligung der AtCEP im Zuge der Gewebe-Remodellierung wird in *Arabidopsis* die Entwicklung der Wurzel als ein Modellsystem für die Zellwunderweichung analysiert. In der Elongationszone ist dies Voraussetzung für die Streckung der Zellen.

Hierfür werden Probidiumiodid-gefärbte Wurzeln bei Einfach-Verlust von AtCEP2 sowie bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitiger Herunterregulierung von *AtCEP2* mikroskopisch analysiert. Diese werden dahingehend untersucht, ob die Verkürzung der Primärwurzel durch die Reduktion der Zelllängen in der „lateral root cap“ (LRC) und/oder in der Elongationszone verursacht wird oder ob diese Verkürzung der Primärwurzel durch einen Verlust des PCD in der LRC bedingt ist.

Der endogene Austritt des Seitenwurzel-Primordium wird durch die Separation der Zellen infolge der Zellwunderweichung gewährleistet. Es wird untersucht, ob AtCEP eine Funktion in dieser Gewebe-Remodellierung besitzen. Hierzu werden die

Entwicklungsstadien der Seitenwurzel-Primordia bei entsprechendem Einfach-Verlust sowie bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 als auch bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitiger Herunterregulierung von *AtCEP2* mikroskopisch ausgewertet.

Es wird die subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 durch Kreuzung einer transgenen AtCEP2-Reporterlinie mit einer fluoreszenzmarkierten ER-Lumen-Markerlinie analysiert. Hierbei soll herausgefunden werden, ob die vom ER stammenden Organellen ausschließlich als Speicherkompartimente für AtCEP fungieren bzw. ob ein Verlust der ER-bodies eine Neubildung von Ricinosomen-ähnlichen Organellen zur Speicherübernahme induziert.

Für eine Beteiligung von AtCEP im Entwicklungs-PCD werden transgene Reporterlinien von AtCEP1 und AtCEP2 hinsichtlich einer Lokalisation in Zelltod-assoziierten Gewebe mikroskopisch analysiert.

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Erzeugung von Fusionsproteinen für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 mit einem dreifachen Hämaggglutinin-tag und verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen unter der Kontrolle des respektiven endogenen Promotors

#### 2.1.1. Klonierungsstrategien der funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3

Für die biochemische Analyse und zur mikroskopischen Lokalisation der drei KDEL-Cystein-Endopeptidasen in *Arabidopsis* AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 wurden transgene funktionelle und nicht funktionelle Reporterkonstrukte konzipiert. Diese funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte wurden unter der Kontrolle des jeweiligen respektiven endogenen Promotors zur Expression translationaler Fusionsproteine von AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 kloniert. Die Sequenzen für die jeweiligen respektiven endogenen Promotoren bestehen aus ca. 2000 Basenpaare, die „upstream“ zum Startcodon „ATG“ liegen. Diese Sequenzen hatten sich bereits bei der Klonierung der *Promotor::GUS* Konstrukte für AtCEP bewährt (Helm et al., 2008).

Funktionelle Reporterkonstrukte:

*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL* (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.))

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.1.)

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mTFP1-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.2.)

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mCerulean-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.3.)

Nicht funktionelle Reporterkonstrukte:

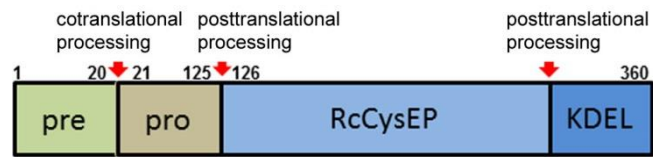
*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL* (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.))

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mCerulean-KDEL* (s. Anh. 6.1.4.)

Die funktionellen Reporterkonstrukte enthalten die kodierenden Sequenzen für den dreifachen Hämaggglutinin-tag (HA-tag) und das jeweilige Fluoreszenzprotein zwischen der Pre-Pro-Sequenz und der jeweiligen Untereinheit. Um die Spaltstelle intakt zu halten, wurden darüber hinaus die drei N-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Untereinheit C-terminal zur Pro-Sequenz direkt vor dem dreifachen HA-tag platziert (Abb. 3).

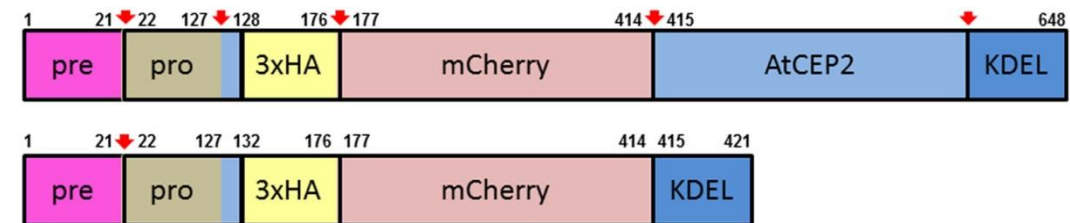
## Ergebnisse



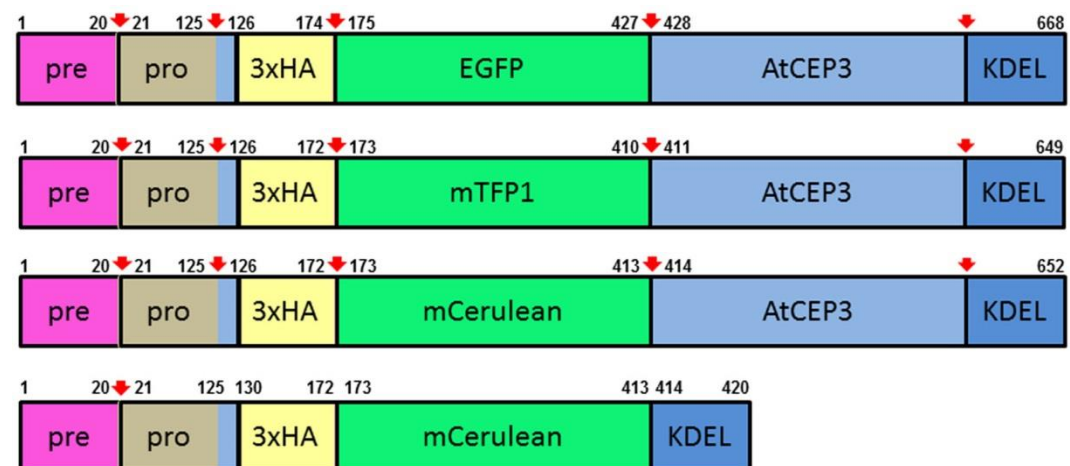
### Funktionelles und nicht funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1:



### Funktionelles und nicht funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2:



### Funktionelles und nicht funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP3:



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 unter dem jeweiligen respektiven endogenen Promotor. Zum Vergleich ist Pre-pro-RcCysEP dargestellt. Rote Pfeile stellen die bewiesenen und die zu erwartenden Spaltstellen dar.**

Zusätzlich wurden transgene nicht funktionelle Reporterkonstrukte kloniert. Bei diesen wurden anstelle der jeweiligen Untereinheit ausschließlich die acht C-terminalen Aminosäuren für AtCEP1 bzw. die sieben C-terminalen Aminosäuren für AtCEP2 und AtCEP3 inklusive des ER-Rückhaltesignals „KDEL“ der jeweiligen Untereinheit zur Klonierung verwendet. Davon N-terminal wurden die kodierenden Sequenzen für den dreifachen HA-tag und das jeweilige Fluoreszenzprotein C-terminal zur Pre-Pro-Sequenz eingefügt. Um die Spaltstelle intakt zu halten, wurden wiederum die drei N-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Untereinheit C-terminal zur Pro-Sequenz direkt vor dem dreifachen HA-tag platziert (Abb. 3).

Die so erhaltenen funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 wurden in Col-0 Wildtyppflanzen transformiert. Zusätzlich wurde das funktionelle und nicht funktionelle Reporterkonstrukt für AtCEP1 in homozygote *atcep1 ko* Pflanzen (SAIL\_158\_B06) transformiert.

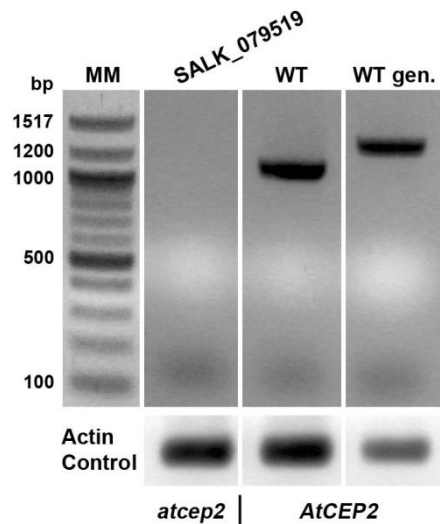
Bei den funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukten für AtCEP1 bzw. AtCEP2 sind die Fluoreszenzsignale von EGFP bzw. mCherry am CLSM visualisierbar. Dagegen sind bei den funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukten für AtCEP3 keine Signale der Fluoreszenzproteine EGFP, mTFP1 und mCerulean detektierbar. Somit werden im Zuge dieser Arbeit ausschließlich die funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1 und AtCEP2 untersucht.

### **2.1.2. Verifizierung der T-DNA Insertionslinien von AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 als Knockout Mutanten**

Die homozygote *AtCEP1* Insertionslinie (SAIL\_158\_B06), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion im dritten Exon. Der *Knockout* von *AtCEP1* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen, da kein entsprechendes Transkript in Keimlingen der *atcep1 ko* amplifiziert werden kann (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.)).

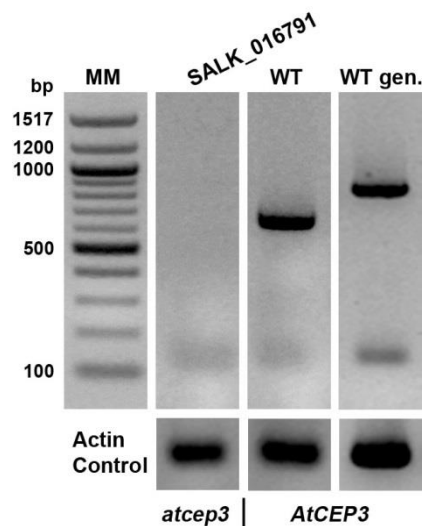
Die homozygote *AtCEP2* Insertionslinie (SALK\_079519), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion im zweiten Exon. Der *Knockout* von *AtCEP2* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen. Hierbei wird kein Transkript für *AtCEP2* in Keimlingen der *atcep2 ko* nachgewiesen (Abb. 4).





**Abbildung 4:** Die homozygote *AtCEP2* Insertionslinie (SALK\_079519), die eine T-DNA Insertion im zweiten Exon besitzt, ist eine *Knockout* Mutante. Es kann kein Transkript für *AtCEP2* in 7 Tage alten Keimlingen der *atcep2 ko* mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die verwendeten Primer umspannen die kodierende Region des Gens inklusive der T-DNA Insertion. WT, RT-PCR durchgeführt mit cDNA von Col-0. WT gen., RT-PCR durchgeführt mit genomischer DNA von Col-0. Actin Control, RT-PCR durchgeführt mit Aktinprimern als Kontrolle.

Die homozygote *AtCEP3* Insertionslinie (SALK\_016791), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion in der 5'UTR 18 Basenpaare N-terminal zum Startcodon „ATG“. Der *Knockout* von *AtCEP3* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region mit der 5'UTR des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen, da kein entsprechendes Transkript in Keimlingen der *atcep3 ko* amplifiziert werden kann (Abb. 5).

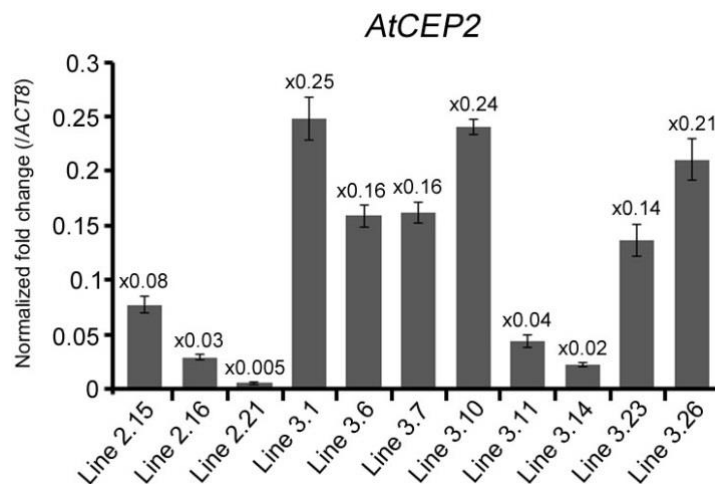


**Abbildung 5:** Die homozygote *AtCEP3* Insertionslinie (SALK\_016791), die eine T-DNA Insertion in der 5'UTR 18 Basenpaare N-terminal zum Startcodon „ATG“ besitzt, ist eine *Knockout* Mutante. Es kann kein Transkript für *AtCEP3* in 7 Tage alten Keimlingen der *atcep3 ko* mittels RT-PCR nachgewiesen werden. Die verwendeten Primer umspannen die kodierende Region mit der 5'UTR des Gens inklusive der T-DNA Insertion. WT, RT-PCR durchgeführt mit cDNA von Col-0. WT gen., RT-PCR durchgeführt mit genomischer DNA von Col-0. Actin Control, RT-PCR durchgeführt mit Aktinprimern als Kontrolle.

Aus den homozygoten Single-Mutanten *atcep3 ko* (SALK\_016791) und *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) wurde durch Kreuzung die Doppel-Mutante *atcep3 x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) generiert. Der *Knockout* von *AtCEP3* und *AtCEP1* wird, wie bereits beschrieben, erneut mittels RT-PCR bestätigt und somit die damit verbundene Homozygotie bewiesen.

### **2.1.3. Erzeugung einer *triple-knockout/knockdown*-Mutante durch Doppel-Verlust von *AtCEP1* und *AtCEP3* und gleichzeitiger Herunterregulierung von *AtCEP2***

Eine Triple-Mutante *atcep\_triple-ko* mit Insertionen in allen drei *AtCEP* Genen ist schwer durch Kreuzung zu generieren, da *AtCEP2* und *AtCEP3* „in tandem“ auf Chromosom 3 liegen. Aus diesem Grund wurde die homozygote Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) mit *AtCEP2*-RNAi-Konstrukten und gleichzeitig mit dem nicht funktionellen *AtCEP2* Reporterkonstrukt ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL$ ; s. Abb. 3; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)) transformiert. Aus dieser Transformation erhielt man zwei homozygote *atcep\_triple-ko/kd* Linien mit einer Herunterregulierung der *AtCEP2*-Expression auf durchschnittlich 0.5 % (Linie 2.21) und 2 % (Linie 3.14) (Abb. 6). Das nicht funktionelle Reporterkonstrukt für *AtCEP2* war ebenfalls herunterreguliert, sodass kein Signal des Fluoreszenzproteins mCherry am CLSM nachweisbar war. Dies beweist überdies die Funktionalität der *AtCEP2*-RNAi-Konstrukte und den damit verbundenen „Knockdown“ von *AtCEP2*.



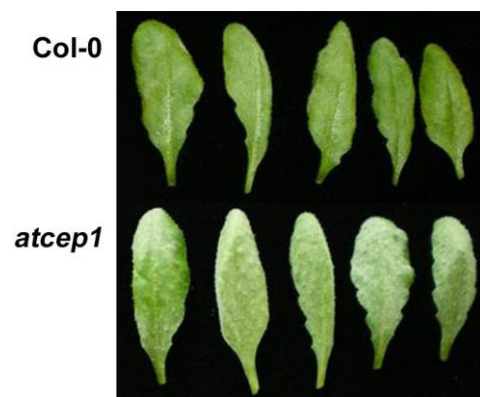
**Abbildung 6: *AtCEP2* Expression in den unabhängigen homozygoten Linien der *atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3 x atcep1 ko* + *AtCEP2*-RNAi): Linie 2.21 und Linie 3.14 zeigen mit durchschnittlich 0.5 % und 2 % die stärkste Herunterregulierung der *AtCEP2* Expression.** Die Genexpression von *AtCEP2* wird in 7 Tage alten Keimlingen der homozygoten Linien der *atcep\_triple-ko/kd* per qRT-PCR mittels genspezifischer *AtCEP2* Primer gemessen. Das Expressionslevel wird gegen das „housekeeping“ Gen *ACT8* normalisiert und das Expressionslevel wird im Wildtyp Col-0 gleich 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren das durchschnittliche *AtCEP2* Expressionslevel aus zwei technischen Replikaten der jeweiligen Linien und dieses ist oberhalb der Säulen angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken den Standardfehler. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt (biologisches Replikat).

## **2.2. Funktion von AtCEP1 im Programmierten Zelltod zur Pathogen-Abwehr: Interaktion mit dem biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum***

### **2.2.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt zu einer Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum***

Für die makroskopische Analyse eines Pathogenese-Phänotyps werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen des Wildtyps Col-0 und der homozygoten *atcep1 ko* mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. An dem Zeitpunkt 11 Tage nach Inokulation (days post inoculation, dpi) werden die Rosettenblätter von Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit Rosettenblättern von Col-0 Wildtyppflanzen visuell verglichen. Die Rosettenblätter der homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen zeigen im Vergleich zu Rosettenblättern von Col-0 Wildtyppflanzen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum*. Dies ist daran zu erkennen, dass die Rosettenblätter der homozygoten *atcep1 ko* weißer erscheinen, was durch die deutlich höhere Dichte an Kolonien des echten Mehltaupilzes hervorgerufen wird. Im Gegensatz dazu ist auf den Rosettenblättern von Col-0 Wildtyppflanzen nur eine leichte Weißfärbung zu erkennen, was bedeutet, dass auf diesen eine niedrigere Dichte an Kolonien des echten Mehltaupilzes vorhanden ist (Abb. 7).

Somit führt der Einfach-Verlust von AtCEP1 in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen zu einem Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen.



**Abbildung 7: Homozygote *atcep1 ko* Pflanzen zeigen den Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber dem biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum*: Die Rosettenblätter der *atcep1 ko* Pflanzen (unten) erscheinen im Vergleich zu den Rosettenblättern von Col-0 Wildtyppflanzen (oben) aufgrund der höheren Dichte an Kolonien des echten Mehltaupilzes weißer. Die gezeigten Rosettenblätter stammen von ca. 5 Wochen alten Pflanzen und wurden 11 Tage nach Inokulation fotografiert. Geänderte Darstellung aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.).**

### **2.2.2. Komplementierung des Pathogenese-Phänotyps durch ein funktionelles AtCEP1 Reporterprotein**

Der Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen wird nun quantitativ ausgewertet. Des Weiteren werden einerseits homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), quantitativ untersucht. Zum anderen werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), ebenfalls quantitativ analysiert.

Hierzu werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen der vier Genotypen Col-0, homozygote *atcep1 ko*, homozygote *atcep1 ko* mit funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt und homozygote *atcep1 ko* mit nicht funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Bei der Inokulation wird darauf geachtet, dass die Pflanzen mit einer geringen Dichte an Konidien von ca. 5-7 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert werden, um einen quantitativen Pathogenese-Phänotyp erkennen zu können. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen vier Genotypen an den Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Bei dieser sogenannten Bonitierung werden die befallenen Pflanzen in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (Abb. 8A).

Am Zeitpunkt 9 dpi ist zu erkennen, dass *atcep1 ko* signifikant weniger Pflanzen mit weniger als 30 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen aufweist. Damit übereinstimmend zeigt *atcep1 ko* zusätzlich signifikant mehr Pflanzen mit mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche als der Wildtyp Col-0. Bei der Kategorie 30-60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche gibt es keinen signifikanten Unterschied in der Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* zwischen *atcep1 ko* Pflanzen und Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 8B oben).

An den Zeitpunkten 11 und 13 dpi zeigt sich eindeutig der Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Die homozygote *atcep1 ko* weist einerseits signifikant weniger Pflanzen mit 30-60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche und andererseits signifikant mehr Pflanzen mit mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen auf (Abb. 8B Mitte und unten).

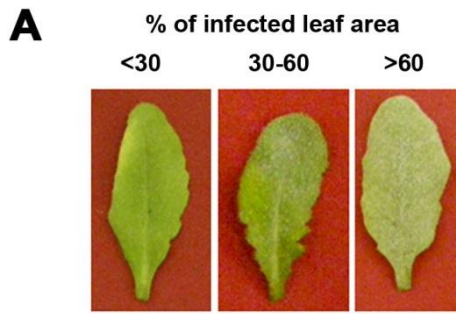
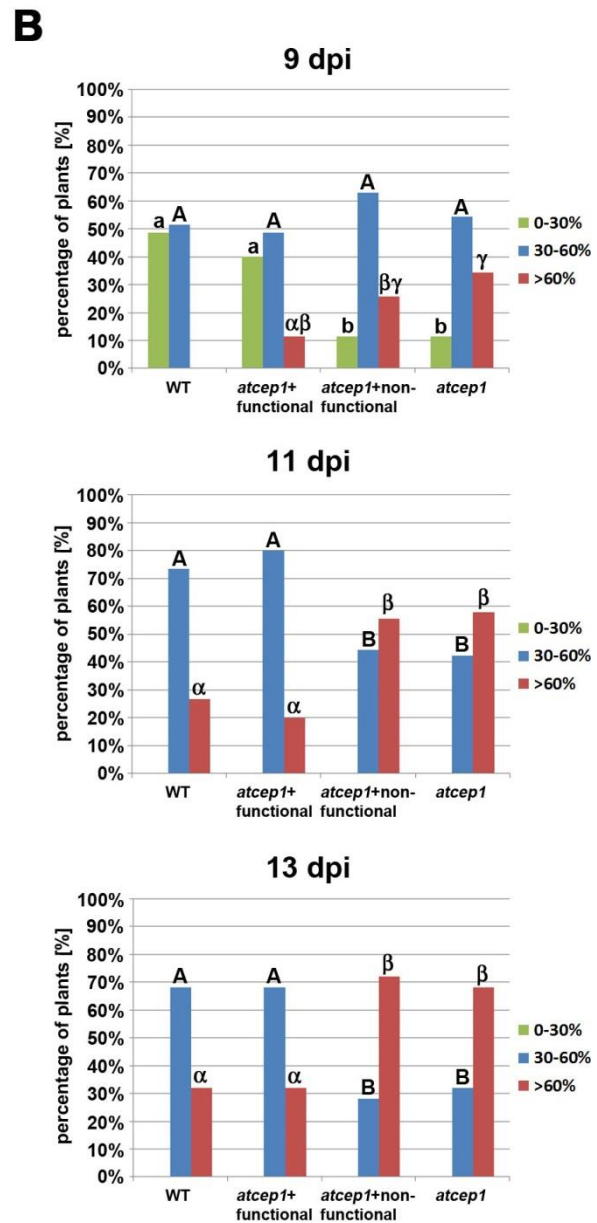


Abbildung 8: Vergleich der Befallsdichte mit *E. cruciferarum* der gesamten Pflanze von Col-0, *atcep1 ko*, *atcep1 ko* mit funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt und *atcep1 ko* mit nicht funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt nach Inokulation mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* 9, 11 und 13 dpi. (A) Die befallenen Blätter werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt. (B) Die Pflanzen der *atcep1 ko* zeigen eindeutig ab dem Zeitpunkt 11 dpi den Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum*. Die *atcep1 ko* Pflanzen mit einem funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt komplementieren diesen Pathogenese-Phänotyp.

(A) Repräsentative Blätter werden 11 dpi fotografiert. (B) WT = Col-0; *atcep1 + functional* = *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL*) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind. *atcep1 + non-functional* = *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL*) transformiert wurden und vergleichbar mit *atcep1 ko* Pflanzen sind. Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen Befall mit *E. cruciferarum* von Pflanzen der jeweiligen Genotypen aus sieben Experimenten mit voneinander unabhängigen Inokulationen, wobei jedes Experiment aus fünf Pflanzen je Genotyp besteht. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p < 0.05$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p > 0.05$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen. Geänderte Darstellung aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.).



Die Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit einem funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt zeigen an allen drei ausgewerteten Zeitpunkten die gleiche Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* wie Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 8B). Somit besitzen die Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit einem funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukt die gleiche basale Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* wie Pflanzen des Wildtyps Col-0. Darüber hinaus beweist diese gleiche basale Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* die Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins, da der

Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* der homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen komplementiert wird.

Dagegen weisen Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 an allen drei Zeitpunkten die gleichen Symptome des Befalls mit *E. cruciferarum* wie Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* auf (Abb. 8B). Daher besitzen Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 den gleichen Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität wie Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko*.

### **2.2.3. Zeitgleiche Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 mit dem Pathogenese-Phänotyp während der späten Interaktion**

Es werden Rohextrakte von infizierten Rosettenblättern, die mit *E. cruciferarum* inokuliert worden sind, mittels Western-Blot Analyse durch Dekorierung mit  $\alpha$ -HA Antikörper untersucht. Hierfür werden einerseits Rohextrakte von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), analysiert. Diese Pflanzen sind aufgrund der Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins vergleichbar mit Col-0 Pflanzen (s. Abb. 8). Andererseits werden zur Untersuchung der Rohextrakte homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), verwendet. Diese Pflanzen sind wiederum mit *atcep1 ko* Pflanzen vergleichbar, da sie den gleichen Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* zeigen (s. Abb. 8).

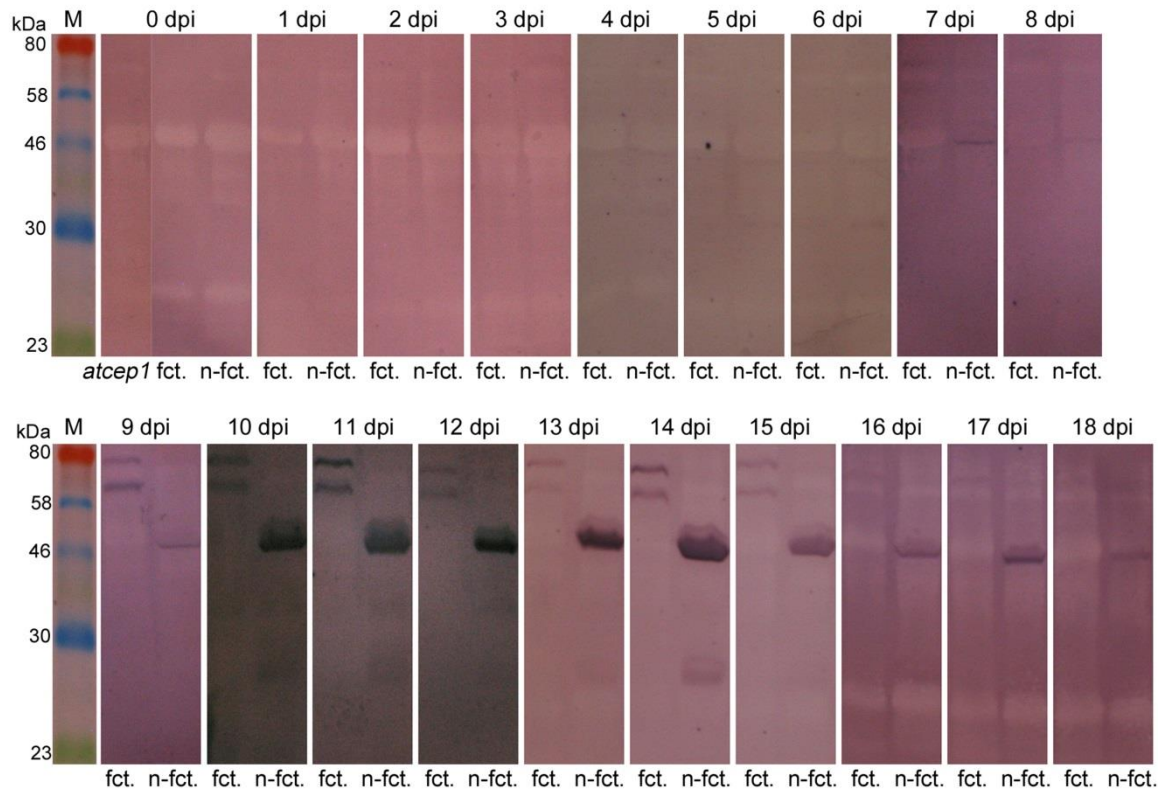
Das Pro-Enzym von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL ist ab dem Zeitpunkt 9 dpi bis 15 dpi in Form von zwei distinkten Proteinbanden mit einem Molekulargewicht zwischen ca. 58 und 80 kDa detektierbar (Abb. 9 fct.). Diese stellen wahrscheinlich die intakte Pro-Form von AtCEP1 mit dem C-terminalen KDEL-Motiv pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL mit einer kalkulierten Molekularmasse von 72.0 kDa in vermutlich zwei verschiedenen Konformationen dar. In ähnlicher Weise wurden bereits zwei distinkte Proteinbanden entsprechend für das Pro-Enzym von AtCEP2 pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL detektiert (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Bei dem nicht funktionellen Reporterprotein ohne die Untereinheit von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-KDEL ist ab dem Zeitpunkt 7 dpi bis 18 dpi eine Proteinbande, die ein Molekulargewicht von ca. 46 kDa aufweist, zu erkennen (Abb. 9 n-fct.). Diese

## Ergebnisse

Proteinbande stellt vermutlich das intakte Pro-Enzym pro-3xHA-EGFP-KDEL mit einer kalkulierten Molekularmasse von 47.3 kDa dar.

Somit korrelieren die Expressionen der Pro-Enzyme pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL und pro-3xHA-EGFP-KDEL zeitgleich mit dem Auftreten des Pathogenese-Phänotyps der Super-Suszeptibilität von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum*.



**Abbildung 9: Das Pro-Enzym pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL ist ab dem Zeitpunkt 9 dpi und das Pro-Enzym pro-3xHA-EGFP-KDEL ist ab 7 dpi mit *E. cruciferarum* exprimiert: Die Expression korreliert zeitgleich mit dem Auftreten des Pathogenese-Phänotyps der Super-Suszeptibilität von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum*.** Es werden Rohextrakte von Rosettenblättern vor der Inokulation mit *E. cruciferarum* (0 dpi) und von infizierten Rosettenblättern mit *E. cruciferarum* (1 dpi-18 dpi) mittels Western-Blot Analyse durch Dekorierung mit  $\alpha$ -HA Antikörper untersucht. *atcep1* = *atcep1 ko* Pflanzen; fct = *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind; n-fct. = *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) transformiert wurden und vergleichbar mit *atcep1 ko* Pflanzen sind; M = Molmarker; kDa = Kilodalton. Diese Abbildung wurde aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.) entnommen.

#### **2.2.4. Das Pro-Enzym von AtCEP1 wird während der späten Interaktion mit *E. cruciferarum de novo* induziert: Akkumulation im ER und um die gebildeten Haustorien**

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* während der Interaktion mit dem biotrophen Ascomycet *E. cruciferarum*, werden infizierte Rosettenblätter von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), am Zeitpunkt 12 dpi am CLSM analysiert. Diese Pflanzen sind aufgrund der Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins vergleichbar mit Col-0 Pflanzen (s. Abb. 8).

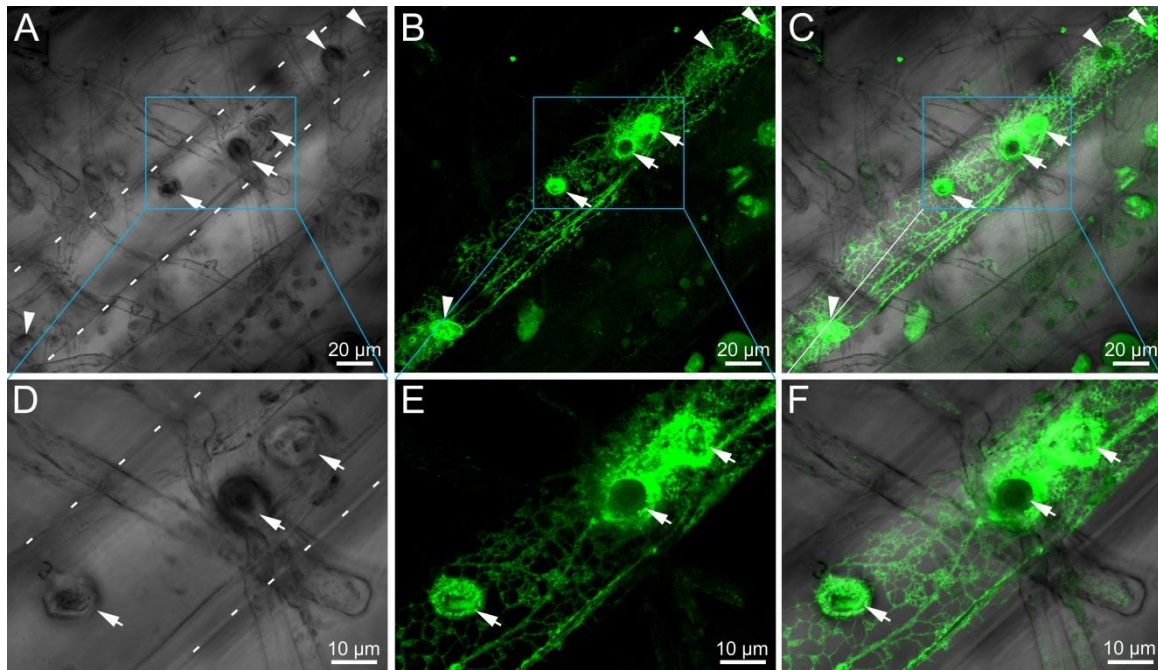
Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* kann am CLSM wahrscheinlich ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL und nicht die maturierte Form von AtCEP1 visualisiert werden. Dies liegt daran, dass bei der Maturierung von AtCEP1, entsprechend der Maturierung von AtCEP2 (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)), wahrscheinlich auch das Fluoreszenzprotein EGFP von der maturierten Untereinheit abgespalten wird.

Das Pro-Enzym von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL ist im gesamten Netzwerk des ER von einer Epidermiszelle, die erfolgreich von *E. cruciferarum* penetriert worden ist, lokalisiert (Abb. 10A-C). In der Epidermiszelle sind die für das ER typischen kortikalen netzartigen Strukturen erkennbar (Abb. 10B, C, E, F). Besonders um die sechs gebildeten Haustorien ist eine sehr starke Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 detektierbar (Abb. 10B, C, E, F; Pfeile und Pfeilspitzen markieren Haustorien). Zusätzlich scheint das Netzwerk des ER auch in der Ebene der Haustorien sehr dicht zu sein (Abb. 10E, F).

Somit ist die Expression von AtCEP1 auch räumlich mit dem Auftreten des Pathogenese-Phänotyps der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* bedingt durch den Einfach-Verlust von AtCEP1 assoziiert.

Ohne Inokulation mit *E. cruciferarum* ist keine Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL in Epidermiszellen von Rosettenblättern, die dasselbe Alter aufweisen wie die Rosettenblätter am Zeitpunkt 12 dpi, am CLSM erkennbar (nicht dargestellt).





**Abbildung 10:** (A-C) Das Pro-Enzym von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL ist im gesamten Netzwerk des ER von einer Epidermiszelle, die erfolgreich vom biotrophen Pathogen *E. cruciferarum* penetriert worden ist, lokalisiert. (B, C, E, F) Besonders um die sechs gebildeten Haustorien (Pfeile und Pfeilspitzen) ist eine sehr starke Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 erkennbar. (E, F) Zusätzlich scheint das Netzwerk des ER auch in der Ebene der Haustorien sehr dicht zu sein. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* während der Interaktion mit dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum*, werden Rosettenblätter von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind, am Zeitpunkt 12 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum* am CLSM analysiert. Dargestellt sind Epidermiszellen nahe dem Leitbündel auf der Oberseite der Rosettenblätter. Die infizierte Epidermiszelle ist mit Hilfe von weißen Strichen markiert (A). Dargestellt sind 600-fache Vergrößerungen (A-C) und 1500-Vergrößerungen der in A-C blau umrandeten Rechtecke (D-F), die mittels CLSM aufgenommen wurden. Die EGFP-Signale wurden durch Lambda-Scans verifiziert. Diese Abbildung wurde aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.) entnommen.

### **2.2.5. Dreidimensionale Signal-Rekonstruktion des Pro-Enzyms von AtCEP1: Akkumulation um die Callose-Einkapselungen des haustorialen Komplexes und in der Callose-Einkapselung während der späten Interaktion mit *E. cruciferarum***

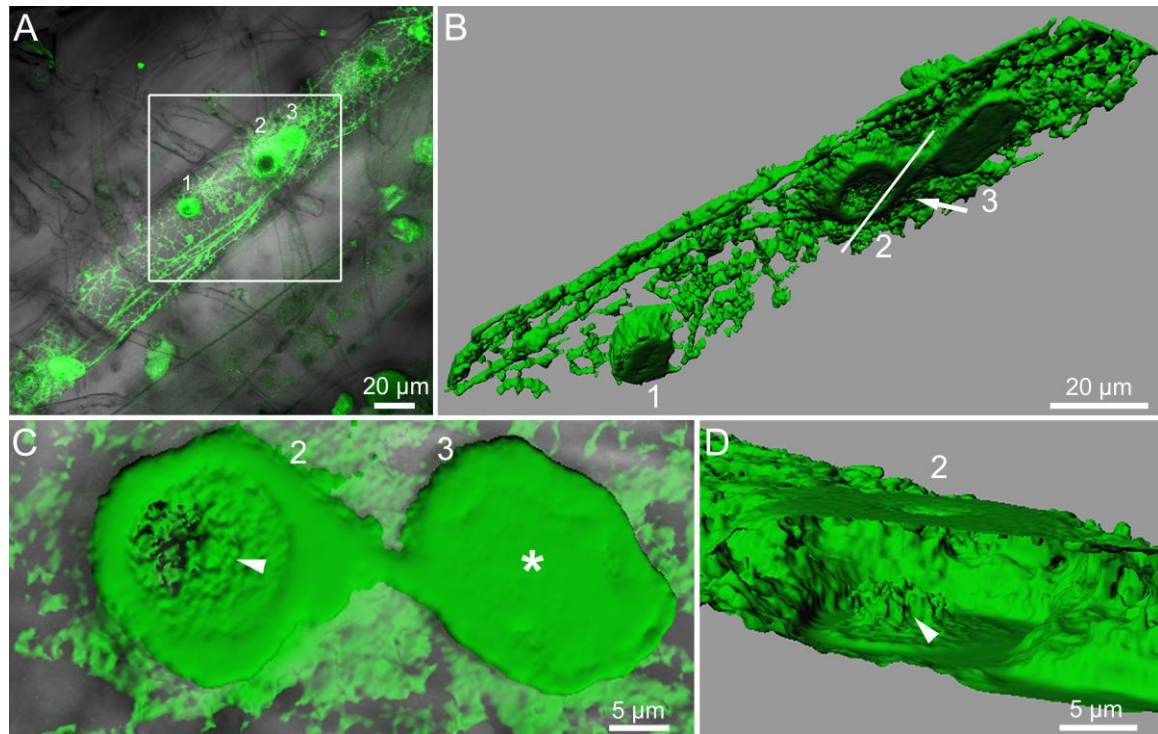
Das EGFP-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL wird nun mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane) dreidimensional rekonstruiert. Hierzu wird die Aufnahme aus Abbildung 10 verwendet (Abb. 11A).

Das EGFP-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL ist im gesamten Netzwerk des ER einer Epidermiszelle, die erfolgreich vom biotrophen Pathogen *E. cruciferarum* penetriert worden ist, lokalisiert, was an den typischen kortikalen netzartigen Strukturen erkennbar ist (Abb. 11A, B). Darüber hinaus ist das Pro-Enzym von AtCEP1 sowohl an der Zelloberfläche als auch weiter im Zellinneren um die gebildeten Haustorien akkumuliert (Abb. 11B).

Der Eindruck, dass die Haustorien 1 und 3 im Zellinneren vollständig von EGFP-Signalen des Pro-AtCEP1 umgeben sind, ist artifiziell, da diese bei der verwendeten Aufnahme in der tiefsten Scan-Ebene noch nicht vollständig erfasst sind. Die Imaris Software (Bitplane) erweitert automatisch aufgrund der starken EGFP-Signale die tiefste Scan-Ebene im Zellinneren mit künstlichem EGFP-Signalen. Aus diesem Grund erscheinen die Flächen der EGFP-Signale um die Haustorien 1 und 3 im Zellinneren glatt (Abb. 11B, C Blick von unten auf Haustorium 3: Asterisk). Im Gegensatz dazu ist das EGFP-Signal um das Haustorium 2 in der tiefsten Scan-Ebene im Zellinneren vollständig erfasst und nicht mittels Imaris Software (Bitplane) durch künstliche EGFP-Signale erweitert worden. Dies ist daran zu erkennen, dass die Fläche des EGFP-Signals um Haustorium 2 im Zellinneren nicht glatt, sondern eine unebene und wellige Struktur aufweist (Abb. 11B, C Blick von unten auf Haustorium 2: Pfeilspitze).

Nach Aufschneiden des 3D-rekonstruierten EGFP-Signals, das das Haustorium 2 vollständig umgibt, ist im Inneren ebenfalls ein 3D-rekonstruiertes EGFP-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP1 zu erkennen (Abb. 11D Pfeilspitze). Es ist eine distinkte Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1, die vom Zellinneren und nicht von der Zelloberfläche ausgeht, erkennbar. Diese konzentriert sich zudem mittig vom Zellinneren aus und ähnelt einer Einstülpung.

Es kann keine Aussage darüber getätigt werden, ob die Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 beispielsweise außerhalb der Callose-Einkapselung, die den haustorialen Komplex umgibt, oder zwischen der Callose-Einkapselung und dem haustorialen Komplex lokalisiert ist.



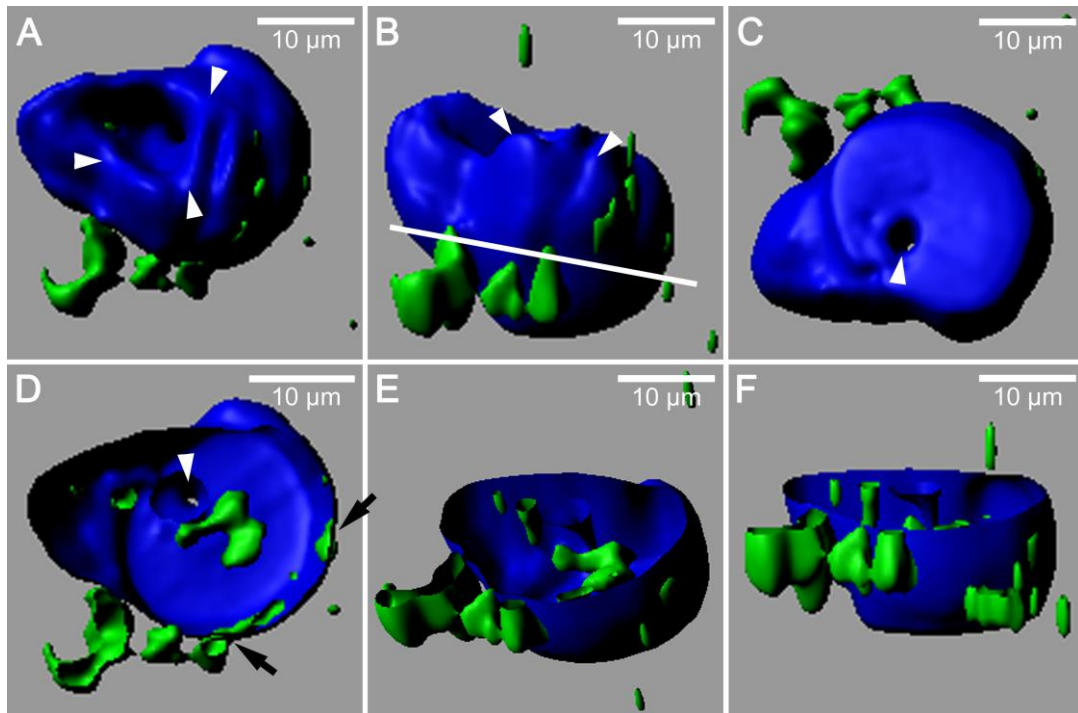
**Abbildung 11: Dreidimensionale Rekonstruktion des Pro-Enzyms von AtCEP1 in einer Epidermiszelle während der späten Interaktion mit *E. cruciferarum*.** (A, B) Akkumulation des Pro-Enzym von AtCEP1 im gesamten Netzwerk des ER (s. Abb. 10). (B) Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist sowohl an der Zelloberfläche als auch weiter im Zellinneren um die gebildeten Haustorien akkumuliert. (C, Blick von unten) Haustorium 2 zeigt im Zellinneren eine wellige Struktur (Pfeilspitze) des EGFP-Signals von Pro-AtCEP1, das dieses umgibt. Somit ist diese Scan-Ebene nicht durch künstliche EGFP-Signale erweitert worden, was bedeutet, dass das EGFP-Signal von Pro-AtCEP1 das Haustorium 2 im Zellinneren vollständig umschließt. Im Gegensatz dazu ist die Fläche des EGFP-Signals von Pro-AtCEP1, das das Haustorium 3 umgibt, glatt (Asterisk). Somit ist diese Scan-Ebene durch künstliche EGFP-Signale erweitert worden. (D, Pfeilspitze) Im Inneren des EGFP-Signals ist mittig eine distinkte Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 erkennbar, die einer Einstülpung ähnelt. Für die dreidimensionale Rekonstruktion des EGFP-Signals des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL wird die Software Imaris (Bitplane) verwendet. Hierzu wird die Aufnahme aus Abbildung 10 analysiert. Für diese sind Rosettenblätter von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL*) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind, am Zeitpunkt 12 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum* am CLSM analysiert worden. Dargestellt ist eine 600-fache Vergrößerung (A). Der weiß umrandete Ausschnitt (A) mit den drei nummerierten Haustorien wurde dreidimensional rekonstruiert. Zusätzlich wurde dieser mit der Software Imaris (Bitplane) auf eine ca. 1500 fache Vergrößerung eingestellt (B). Die Blickrichtung ist im Gegensatz von oben auf die Zelloberfläche in (A) nun von schräg unten aus dem Zellinneren in (B). Diese dreidimensionale Rekonstruktion wurde am Haustorium Nummer 2 aufgeschnitten (schräge weiße Linie in B markiert Schnittfläche) und mit Blickrichtung von rechts schräg unten dargestellt (Pfeil zeigt Blickrichtung an) (D). Zusätzlich wurde sie mit der Software Imaris (Bitplane) auf eine ca. 4800 fache Vergrößerung eingestellt. (C) Blick von unten aus dem Zellinneren auf Haustorium 2 und 3 mit einer 3800 fachen Vergrößerung.

Zur weiteren Analyse der Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 werden erneut Rosettenblätter von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind, am Zeitpunkt 11 dpi mit *E. cruciferarum* am CLSM mikroskopiert. Diese infizierten Rosettenblätter werden vor dem Mikroskopieren mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Methylblau inkubiert, um die Callose-angereicherten Einkapselungen, die die haustorialen Komplexe des echten Mehлтаupilzes umschließen, detektieren zu können. Die Aufnahme, die am CLSM getätigt wurde, wird daraufhin mit Hilfe der Imaris Software (Bitplane) dreidimensional rekonstruiert. Darüber hinaus wird darauf geachtet, dass die höchste Scan-Ebene über dem Beginn des haustorialen Komplexes an der Zelloberfläche und die tiefste Scan-Ebene nach dem Ende des haustorialen Komplexes im Zellinneren liegt, sodass die gesamte Struktur des haustorialen Komplexes und dessen Callose-Einkapselung vollständig dreidimensional erfasst wird.

Man erkennt deutlich, dass das EGFP-Signal (Abb. 12 grün) des Pro-Enzyms von AtCEP1 im Zellinneren um die Callose-Einkapselung (Abb.12 blau), die den haustorialen Komplex umschließt, lokalisiert ist (Abb. 12). Bei dieser Callose-Einkapselung scheint an der Zelloberfläche kein Pro-AtCEP1 zu akkumulieren (Abb. 12A und B Pfeilspitzen). Auch im Zellinneren ist an der Oberfläche der Callose-Umhüllung des eingekapselten haustorialen Komplexes kein Pro-Enzym von AtCEP1 detektierbar (Abb. 12C, Blick von unten). Somit ist das Pro-Enzym von AtCEP1 ausschließlich seitlich im Zellinneren um die Callose-Einkapselung lokalisiert und umgibt diese nicht vollständig.

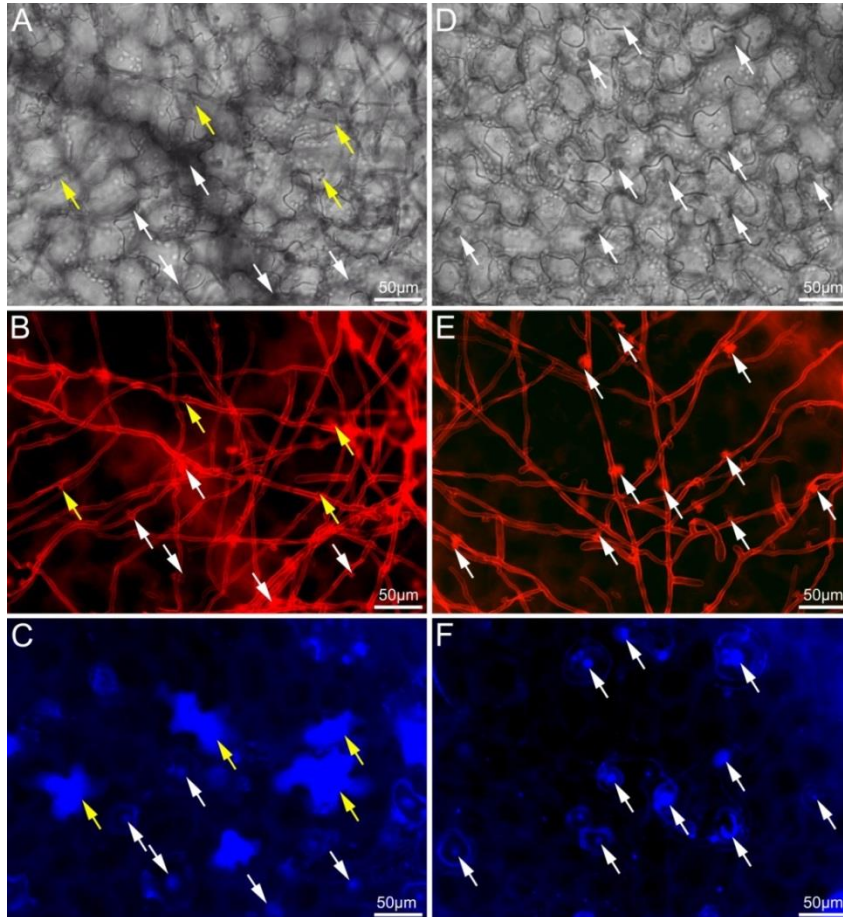
Diese vollständige dreidimensionale Rekonstruktion wird mit Blickrichtung von der Zelloberfläche aus aufgeschnitten (Abb. 12B weiße Linie). Das Pro-Enzym von AtCEP1 akkumuliert zusätzlich innerhalb der Callose-Einkapselung (Abb. 12D-F). Diese Akkumulation ist nicht uniform innerhalb der Einkapselung lokalisiert, sondern hauptsächlich an der Stelle, an der unten in der Callose-Umhüllung eine deutliche Öffnung vom Zellinneren aus erkennbar ist (Abb. 12C und D Pfeilspitzen). Es kann nicht festgestellt werden, ob diese Akkumulation von Pro-AtCEP1 ausschließlich zwischen der Callose-Einkapselung und dem haustorialen Komplex oder zusätzlich innerhalb des haustorialen Komplexes lokalisiert ist.

Des Weiteren ist das Pro-Enzym von AtCEP1 nicht nur seitlich um die Callose-Einkapselung lokalisiert, sondern scheint auch seitlich von außen die Callose-Einkapselung zu durchdringen (Abb. 12D Pfeile).



**Abbildung 12: Dreidimensionale Rekonstruktion des Pro-Enzyms von AtCEP1 (grün) und der Callose-Einkapselung (blau) in einer Epidermiszelle während der späten Interaktion mit *E. cruciferarum*.** (A-C) Akkumulation des Pro-Enzym von AtCEP1 seitlich im Zellinneren um die Callose-Einkapselung. An der Zelloberfläche (A, B Pfeilspitzen) und im Zellinneren an der Oberfläche der Callose-Einkapselung (C, Blick von unten) ist kein Pro-Enzym von AtCEP1 exprimiert. (D-F) Das Pro-Enzym von AtCEP1 akkumuliert zusätzlich innerhalb der Callose-Einkapselung vorwiegend an der Stelle, an der unten in der Callose-Umhüllung eine deutliche Öffnung vom Zellinneren aus erkennbar ist (C, D Pfeilspitzen). Darüber hinaus scheint das Pro-Enzym von AtCEP1 auch seitlich von außen die Callose-Einkapselung zu durchdringen (D Pfeile). Für die dreidimensionale Rekonstruktion des EGFP-Signals des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL wird die Software Imaris (Bitplane) verwendet. Für diese sind Rosettenblätter von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden und vergleichbar mit Col-0 Pflanzen sind, am Zeitpunkt 11 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum* am CLSM analysiert worden. Diese werden vor dem Mikroskopieren mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Methylblau inkubiert, um die Callose-angereicherten Umhüllungen der Haustorien des echten Mehltaupilzes detektieren zu können. Darüber hinaus wird darauf geachtet, dass die höchste Scan-Ebene über dem Beginn des haustorialen Komplexes an der Zelloberfläche und die tiefste Scan-Ebene nach dem Ende des haustorialen Komplexes im Zellinneren liegt, sodass die gesamte Struktur des haustorialen Komplexes und dessen Callose-Einkapselung vollständig dreidimensional erfasst wird. A: Blickrichtung von oben auf die Zelloberfläche; B: Blickrichtung von schräg oben auf die Zelloberfläche; C: Blickrichtung von unten aus dem Zellinneren. Diese vollständige dreidimensionale Rekonstruktion wird zusätzlich mit Blickrichtung von der Zelloberfläche aus aufgeschnitten (B: weiße Linie) dargestellt. D: Blickrichtung von oben in die Callose-Einkapselung; E: Blickrichtung von schräg oben in die Callose-Einkapselung; F: Blickrichtung seitlich auf die Callose-Einkapselung. Die Aufnahme wurde am CLSM mit einer 600-fachen Vergrößerung getätigt und mit Hilfe der Software Imaris (Bitplane) auf eine ca. 3000 fache Vergrößerung eingestellt.

**2.2.6. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt zu einer Reduktion des epidermalen Zelltods und gleichzeitig zu einer Zunahme an gebildeten Haustorien in der Interaktion mit *E. cruciferarum***



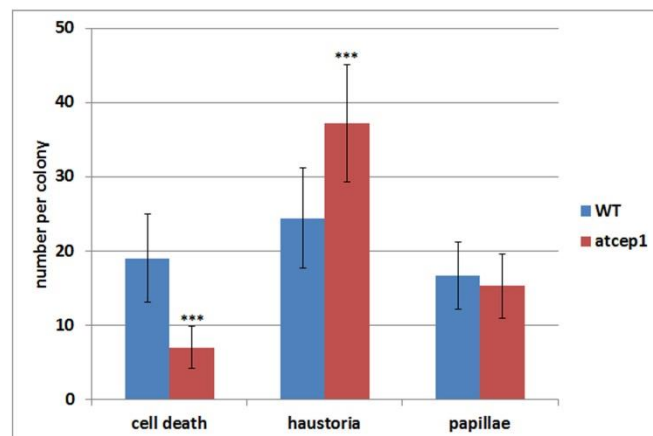
**Abbildung 13:** Das Fehlen von AtCEP1 bewirkt, dass homozygote *atcep1 ko* Pflanzen (D-F) am Zeitpunkt 5 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum* keine toten Epidermiszellen (gelbe Pfeile) und mehr gebildete Haustorien (weiße Pfeile) im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (A-C) aufweisen. Dargestellt sind 200-fache Vergrößerungen von jeweils einem repräsentativen Rosettenblatt von *atcep1 ko* und von Col-0, das sowohl mit dem rot fluoreszierenden „wheat germ agglutinin“ (B,E) als auch mit dem blau fluoreszierenden Methylblau gefärbt wurde (C,F). Das Lektin „wheat germ agglutinin“ färbt das Chitin des echten Mehltaupilzes und der Farbstoff Methylblau detektiert Callose-angereicherte Strukturen, wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum* (weiße Pfeile). Darüber hinaus werden ganze Zellen gefärbt, die im Zuge eines epidermalen Zelltods am Sterben oder bereits gestorben sind (gelbe Pfeile). (A) und (D) sind mikroskopische „brightfield“ Aufnahmen. Alle Aufnahmen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop getätigt. Diese Abbildung wurde aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.) entnommen.

Die makroskopische visuelle Auswertung der gesamten Pflanze der homozygoten *atcep1 ko* und von Col-0 Wildtyppflanzen zeigt den Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* bei Einfach-Verlust von AtCEP1 (s. Abb. 8). Somit kann eine Rolle von AtCEP1 in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens *E. cruciferarum* suggeriert werden. Um den Pathogenese-Phänotyp bei Einfach-Verlust von AtCEP1 mikroskopisch analysieren zu können, werden

Rosettenblätter von *atcep1 ko* Pflanzen und von Col-0 Wildtyppflanzen am Zeitpunkt 5 dpi sowohl mit dem rot fluoreszierenden „wheat germ agglutinin“ als auch mit dem blau fluoreszierenden Methylblau gefärbt. Das Lektin „wheat germ agglutinin“ färbt das Chitin des echten Mehltaupilzes und der Farbstoff Methylblau detektiert Callose-angereicherte Strukturen, wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum*. Darüber hinaus werden ganze Zellen gefärbt, die im Zuge eines epidermalen Zelltods am Sterben oder bereits gestorben sind.

Die homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen (Abb. 13D-F) zeigen am Zeitpunkt 5 dpi keine toten Epidermiszellen (gelbe Pfeile) und mehr gebildete Haustorien (weiße Pfeile) als Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 13A-C).

Bei der quantitativen Auswertung der Zelltod-Ereignisse erkennt man, dass homozygote *atcep1 ko* Pflanzen mit 7 toten Zellen signifikant weniger tote Epidermiszellen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes als Pflanzen des Wildtyps Col-0 mit durchschnittlich 19 toten Zellen aufweisen (Abb. 14 cell death). Im Gegensatz dazu bestehen die Kolonien des echten Mehltaupilzes auf homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen aus durchschnittlich 37 gebildeten Haustorien. Dies ist signifikant mehr als auf Col-0 Wildtyppflanzen, auf denen die Kolonien von *E. cruciferarum* durchschnittlich 24 gebildete Haustorien enthalten (Abb. 14 haustoria). Die durchschnittliche Anzahl der Zellwand-verstärkenden Papillen ohne sichtbare gebildete Haustorien ist bei homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen mit 15 und bei Col-0 Wildtyppflanzen mit 17 nicht signifikant verschieden (Abb. 14 papillae).



**Abbildung 14: Signifikante Reduktion des epidermalen Zelltods und gleichzeitige Zunahme an gebildeten Haustorien pro Kolonie des echten Mehltaupilzes auf Rosettenblättern von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen (rot) im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (blau) 5 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum*.** Der Stichprobenumfang umfasst 54 Kolonien von *E. cruciferarum* auf jeweils 3 Rosettenblättern pro Genotyp. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl an epidermalen Zelltod-Ereignissen (cell death), an gebildeten Haustorien (haustoria) und an Papillen (papillae) pro Kolonie des echten Mehltaupilzes. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Säulen, die mit \*\*\* bezeichnet sind, weisen entsprechend dem zweiseitigen Student's *t*-Test ( $p < 0.001$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Die Ergebnisse wurden in einem zweiten unabhängigen Experiment mit 48 Kolonien von *E. cruciferarum* auf jeweils 3 Rosettenblättern pro Genotyp bestätigt (biologisches Replikat). Diese Abbildung wurde aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.) entnommen.

### **2.2.7. Deregulation der Expression von Pathogenese-assoziierten Stress-Genen PR1 und PDF1.2 bei Einfach-Verlust von AtCEP1**

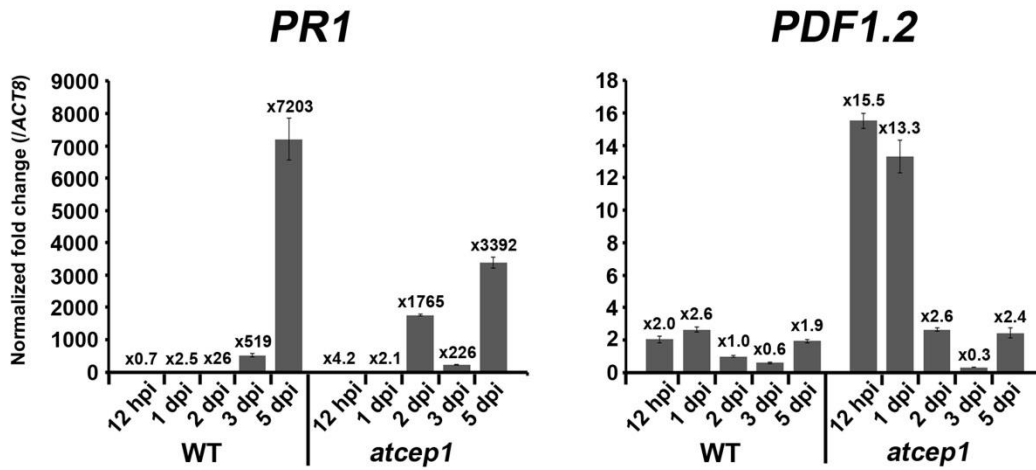
Der Einfach-Verlust von AtCEP1 führt am Zeitpunkt 5 dpi zu einer signifikanten Reduktion des epidermalen Zelltods und zu einer gleichzeitigen signifikanten Zunahme an gebildeten Haustorien auf Rosettenblättern der homozygoten *atcep1 ko*. Dagegen kann bei 1 dpi kein Unterschied in der Entwicklung des echten Mehltaupilzes auf Rosettenblättern zwischen der homozygoten *atcep1 ko* und Col-0 Wildtyppflanzen festgestellt werden (nicht dargestellt). Es wird überprüft, wie die Pathogenese-assoziierten Stress-Gene *PR1* und *PDF1.2* (Reymond und Farmer, 1998) in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen exprimiert sind. Die Expressionen werden 12 Stunden nach Inokulation (hours past inoculation, hpi), 1, 2, 3 und 5 mit *E. cruciferarum* mittels qRT-PCR analysiert, wobei das Expressionslevel gegen das „housekeeping“ Gen *ACT8* normalisiert und das Expressionslevel im Wildtyp Col-0 gleich 1 gesetzt wird.

Die Expression von *PR1* nimmt in Col-0 Wildtyppflanzen am Zeitpunkt 3 dpi leicht und am Zeitpunkt 5 dpi stark zu. In homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen steigt die Expression von *PR1* beim Zeitpunkt 2 dpi an und nimmt beim Zeitpunkt 3 dpi wieder ab. Am Zeitpunkt 5 dpi steigt die Expression von *PR1* wiederum, aber nur etwa zur Hälfte gegenüber der Expression von *PR1* in Col-0 Pflanzen (Abb. 15 links). Dies stimmt mit der Abnahme des epidermalen Zelltods zu diesem Zeitpunkt überein (s. Abb. 14).

Im Gegensatz dazu ist die Expression von *PDF1.2* in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen an den Zeitpunkten 12 hpi und 1 dpi stärker als in Col-0 Wildtyppflanzen. An den Zeitpunkten 2 dpi, 3 dpi und 5 dpi ist die Expression von *PDF1.2* in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen und Col-0 Wildtyppflanzen ähnlich gering (Abb. 15 rechts).

Somit ist die Expression der *PR* Gene *PR1* und *PDF1.2* bei Verlust von AtCEP1 dereguliert.





**Abbildung 15: Dereglung der Expression von Pathogenese-assoziierten Stress-Genen *PR1* und *PDF1.2* in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen.** Die Genexpression wird 12 hpi, 1, 2, 3 und 5 dpi mit *E. cruciferarum* mittels qRT-PCR analysiert. Hierzu werden genspezifische Primer für *PR1* und *PDF1.2* verwendet. Das Expressionslevel wird gegen das „housekeeping“ Gen *ACT8* normalisiert und das Expressionslevel wird im Wildtyp Col-0 gleich 1 gesetzt. Die Säulen repräsentieren das durchschnittliche Expressionslevel aus zwei technischen Replikaten und dieses ist oberhalb der Säulen angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken den Standardfehler. Die Ergebnisse wurden in drei weiteren unabhängigen Experimenten mit unabhängigen Inokulationen reproduziert (biologische Replika). Diese Abbildung wurde aus Höwing et al., 2014 (s. 7.2.) entnommen.

### 2.3. Beteiligung von AtCEP im vom echten Mehltaupilz induzierten und AtCPR5-kontrollierten Programmierten Zelltod

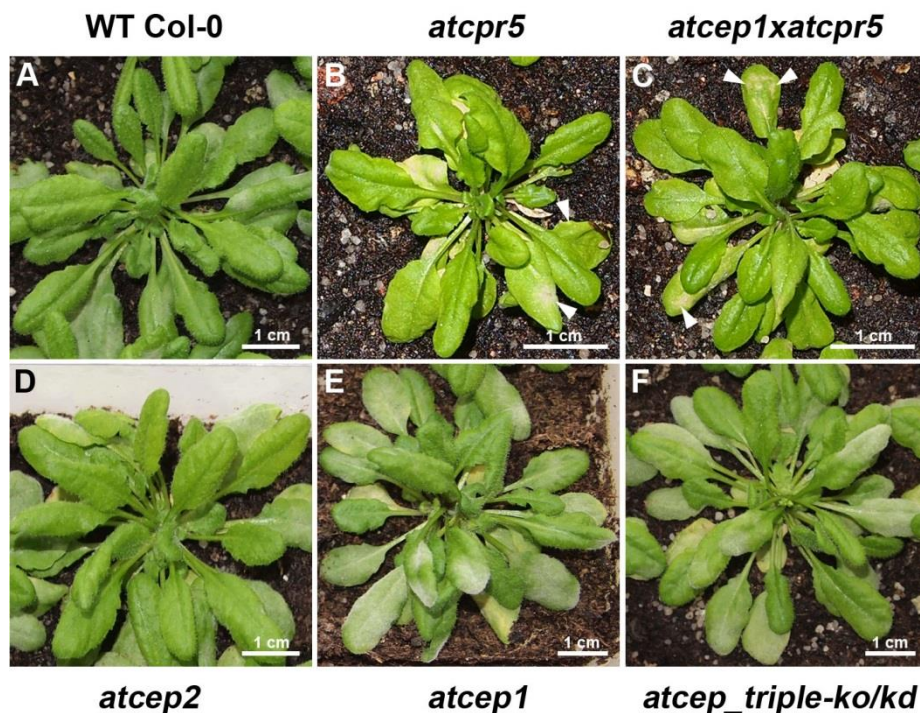


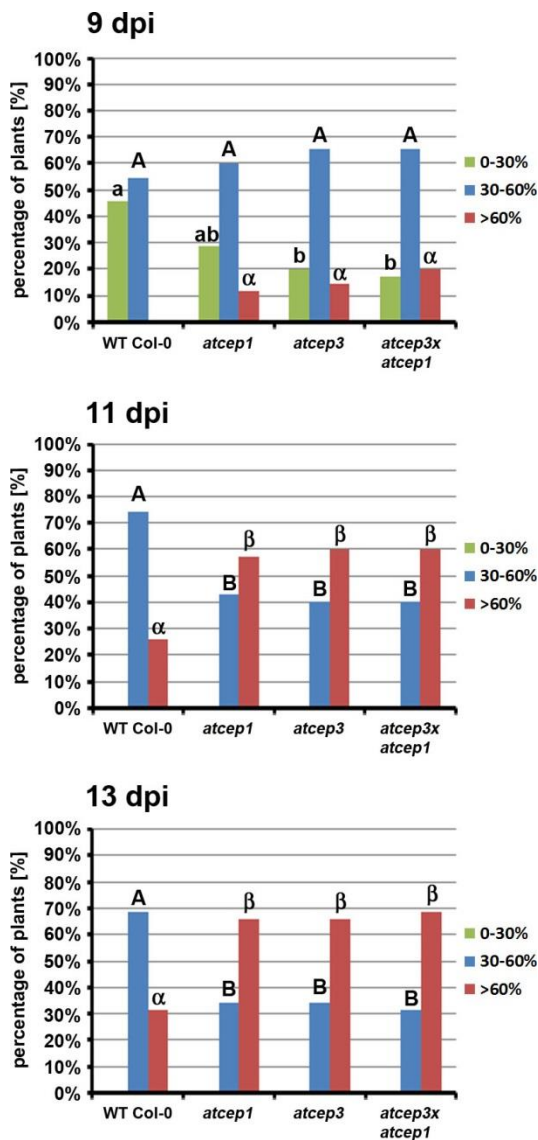
Abbildung 16: Übersicht der Krankheitssymptome auf der gesamten Pflanze, die durch den biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum* verursacht worden sind. Col-0 Wildtyppflanzen (A) und *atcep2* Pflanzen (D) zeigen die gleiche Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum*. Pflanzen der *atcep1* ko (E), *atcep\_triple-ko/kd* (F), *atcep3* ko (nicht dargestellt) und *atcep3 x atcep1* ko (nicht dargestellt) zeigen den gleichen Pathogenese-Phänotyp der erhöhten Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Im Gegensatz dazu sind die Pflanzen der *atcpr5* Mutante (B) und der Doppelmutante *atcep1 x atcpr5* (C) konstitutiv resistent gegenüber *E. cruciferarum*. Die gezeigten Pflanzen sind im Alter von ca. 5 Wochen mit *E. cruciferarum* inokuliert worden und wurden 11 Tage nach Inokulation fotografiert. Besonders zu beachten ist der Zwergwuchs der Pflanzen der *atcpr5* Mutante (B) und der Doppelmutante *atcep1 x atcpr5* (s. Maßstab) sowie deren nekrotische Läsionen (weiße Pfeilspitzen).

#### 2.3.1. AtCEP1 und AtCEP3 besitzen eine ähnliche Funktion in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens *E. cruciferarum*

Die makroskopische visuelle Auswertung der gesamten Pflanze von homozygoten *atcep1* ko zeigt den Pathogenese-Phänotyp der erhöhten Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (s. Kap. 2.1.2.).

Um einen Effekt von AtCEP3 auf die basale Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* zu analysieren, werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen der homozygoten *atcep3* ko und der homozygoten *atcep3 x atcep1* ko mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Zum Vergleich werden suszeptible Col-0 Wildtyppflanzen und super-suszeptible homozygote *atcep1* ko Pflanzen ebenfalls inokuliert. Bei der Inokulation wird darauf geachtet, dass die Pflanzen mit einer geringen Konidien-Dichte von

ca. 5-7 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert werden, um einen quantitativen Pathogenese-Phänotyp erkennen zu können. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen vier Genotypen an den Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Die befallenen Pflanzen werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (Abb. 8A).



**Abbildung 17: Vergleich der Befallsdichte mit *E. cruciferarum* der gesamten Pflanze von Col-0, *atcep1 ko*, *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* nach Inokulation mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* 9, 11 und 13 dpi. Pflanzen der *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* zeigen eindeutig ab dem Zeitpunkt 11 dpi den Pathogenese-Phänotyp einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum*. Ihre Super-Suszeptibilität ist identisch mit der Super-Suszeptibilität von *atcep1 ko* Pflanzen im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Die befallenen Blätter werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 % (grün), 30-60 % (blau) und mehr als 60 % (rot) mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (s. Abb. 8A). Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen Befall mit *E. cruciferarum* der Pflanzen der jeweiligen Genotypen aus sieben Experimenten mit voneinander unabhängigen Inokulationen, wobei jedes Experiment aus fünf Pflanzen je Genotyp besteht. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p < 0.05$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p > 0.05$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

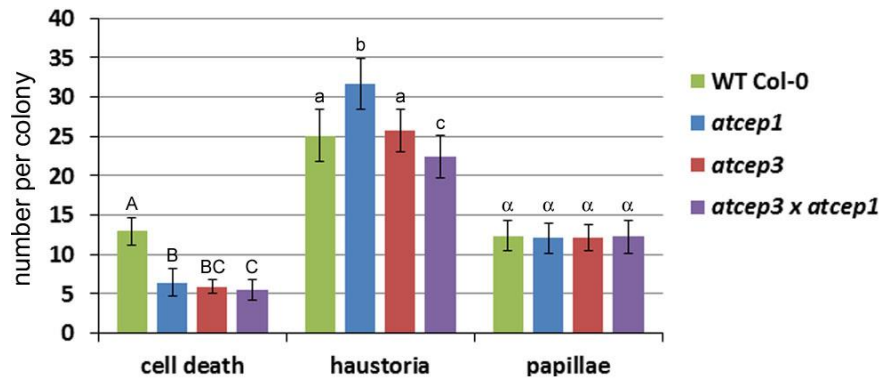
Am Zeitpunkt 9 dpi ist zu erkennen, dass *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* signifikant weniger Pflanzen mit weniger als 30 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche als Col-0 aufweisen. Damit übereinstimmend zeigen *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* zusätzlich signifikant mehr Pflanzen mit mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche als Col-0. Gegenüber *atcep1 ko* sind beide Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Bei der Kategorie 30-60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche gibt es keinen

signifikanten Unterschied in der Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* zwischen Pflanzen der *atcep3 ko*, *atcep3 x atcep1 ko*, *atcep1 ko* und Col-0 (Abb. 17 oben).

An den Zeitpunkten 11 und 13 dpi zeigt sich eindeutig der Pathogenese-Phänotyp der erhöhten Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* von homozygoten Pflanzen der *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* weisen einerseits in der Kategorie 30-60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche signifikant weniger Pflanzen im Vergleich zu Col-0 auf. Andererseits besitzen beide Genotypen in der Kategorie mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche signifikant mehr Pflanzen als Col-0 (Abb. 17 Mitte und unten).

Gegenüber *atcep1 ko* sind beide Genotypen in den Kategorien 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche nicht signifikant unterschiedlich. Somit sind *atcep3 ko* Pflanzen und *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen gleich super-suszeptibel wie Pflanzen der *atcep1 ko*. Dies bedeutet, dass es keinen Unterschied im Pathogenese-Phänotyp der erhöhten Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* zwischen dem Einfach-Verlust von AtCEP1, dem Einfach-Verlust von AtCEP3 sowie dem Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 gibt. Demzufolge ist der Pathogenese-Phänotyp der jeweiligen Single-Mutanten *atcep1 ko* und *atcep3 ko* nicht additiv (Abb. 17).

Für die mikroskopische Analyse werden Rosettenblätter von Pflanzen der *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* am Zeitpunkt 6 dpi mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Methylblau inkubiert. Da die homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen im Vergleich zu Col-0 eine signifikante Reduktion des epidermalen Zelltods und der gebildeten Haustorien pro Kolonie des echten Mehltäupilzes zeigen (s. Kap. 2.2.6.), werden zum Vergleich Rosettenblätter von Col-0 Wildtyppflanzen und von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen ebenfalls 6 dpi mit Methylblau gefärbt (s. Kap. 2.2.6.). Der Farbstoff Methylblau detektiert Callose-angereicherte Strukturen, wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum*. Darüber hinaus werden Zellen, die beispielsweise im Zuge eines epidermalen PCD am Sterben oder bereits gestorben sind, vollständig gefärbt (s. Abb.13C und F).



**Abbildung 18: Signifikante Reduktion des epidermalen Zelltods pro Kolonie des echten Mehltaupilzes auf Rosettenblättern von homozygoten Pflanzen der *atcep1 ko* (blau), *atcep3 ko* (rot) und *atcep3 x atcep1 ko* (lila) im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (grün) 6 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum*. Der epidermale Zelltod in *atcep3 x atcep1 ko* scheint unabhängig von AtCEP1 und AtCEP3 stattzufinden. Der Stichprobenumfang für jeden Genotyp umfasst 42 Kolonien von *E. cruciferarum*, die auf jeweils 2 Rosettenblättern pro Genotyp ausgewertet wurden. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Experiment mit dem gleichen Stichprobenumfang mit einer unabhängigen Inokulation bestätigt (Biologisches Replikat). Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl an epidermalen Zelltod (cell death), an gebildeten Haustorien (haustoria) und an Papillen (papillae) pro Kolonie des echten Mehltaupilzes. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem zweiseitigen Student's *t*-Test ( $p < 0.001$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem zweiseitigen Student's *t*-Test ( $p > 0.001$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

Der epidermale Zelltod ist in homozygoten Pflanzen der *atcep1 ko*, *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen supprimiert. Die drei Genotypen zeigen mit ca. 5-6 toten Zellen signifikant weniger tote Epidermiszellen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes als Col-0 mit durchschnittlich 13 toten Zellen (Abb. 18 cell death).

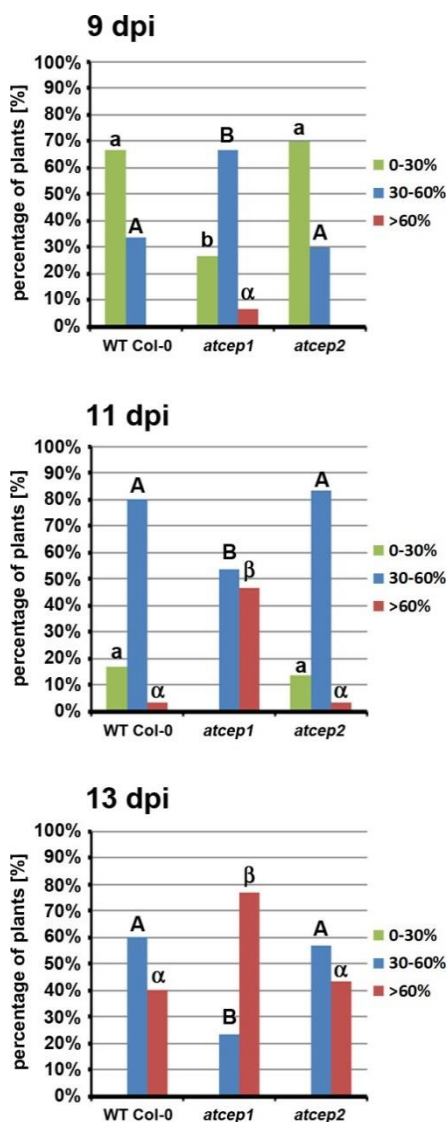
Die Suppression des epidermalen Zelltods ist allerdings in homozygoten *atcep3 ko* Pflanzen nicht gleichzeitig mit mehr gebildeten Haustorien pro Kolonie von *E. cruciferarum* verbunden, wie es bei den homozygoten Pflanzen der *atcep1 ko* im Vergleich zu Col-0 der Fall ist. Die Kolonien des echten Mehltaupilzes auf homozygoten *atcep3 ko* Pflanzen bestehen aus durchschnittlich 25 gebildeten Haustorien und sind somit nicht signifikant verschieden zu der Anzahl an 25 gebildeten Haustorien auf Col-0. Im Gegensatz dazu weisen *atcep1 ko* Pflanzen mit durchschnittlich 32 signifikant mehr gebildete Haustorien pro Kolonie des echten Mehltaupilzes auf. Die Kolonien von *E. cruciferarum* der homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen bestehen aus durchschnittlich 23 gebildeten Haustorien (Abb. 18 haustoria).

Die durchschnittliche Anzahl der Papillen ohne sichtbare gebildete Haustorien ist bei allen vier untersuchten Genotypen mit 13 nicht signifikant verschieden (Abb. 18 papillae).

Somit kann als Fazit für die mikroskopische Analyse festgehalten werden, dass sowohl AtCEP1 als auch AtCEP3 für den epidermalen Zelltod, der durch *E. cruciferarum* induziert wird, verantwortlich sind.

### 2.3.2. AtCEP2 besitzt keine Funktion in der Pathogen-Abwehr gegenüber dem biotrophen Ascomycet *E. cruciferarum*

Nun wird überprüft, ob auch der Einfach-Verlust von AtCEP2 den Pathogenese-Phänotyp der erhöhten Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 bewirkt. Hierfür werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* und zum Vergleich suszeptible Col-0 Wildtyppflanzen und super-suszeptible homozygote *atcep1 ko* Pflanzen mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Bei der Inokulation wird darauf geachtet, dass die Pflanzen mit einer geringen Konidien-Dichte von ca. 5-7 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert werden, um einen quantitativen Pathogenese-Phänotyp erkennen zu können. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen drei Genotypen an den Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Die befallenen Pflanzen werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (Abb. 8A).



**Abbildung 19: Vergleich der Befallsdichte mit *E. cruciferarum* der gesamten Pflanze von Col-0, *atcep1 ko* und *atcep2 ko* nach Inokulation mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* 9, 11 und 13 dpi. Pflanzen der *atcep2 ko* zeigen dieselbe Suszeptibilität wie Col-0 Wildtyppflanzen gegenüber *E. cruciferarum* und keine erhöhte Super-Suszeptibilität wie *atcep1 ko* Pflanzen. Die befallenen Blätter werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 % (grün), 30-60 % (blau) und mehr als 60 % (rot) mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (s. Abb. 8A). Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen Befall mit *E. cruciferarum* der Pflanzen der jeweiligen Genotypen aus sechs Experimenten mit voneinander unabhängigen Inokulationen, wobei jedes Experiment aus fünf Pflanzen je Genotyp besteht. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p < 0.05$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p > 0.05$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

An allen drei Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi ist zu erkennen, dass Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* in allen drei Kategorien der Suszeptibilität nicht signifikant verschieden zu Col-0 Wildtyppflanzen sind (Abb. 19). Die homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen weisen dagegen die bereits beschriebene Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* auf (Abb. 19; s. Abb. 8). Somit zeigen die Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* die gleiche Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* wie Col-0 Wildtyppflanzen und keine erhöhte Super-Suszeptibilität wie homozygote *atcep1 ko* Pflanzen (s. Abb. 16).

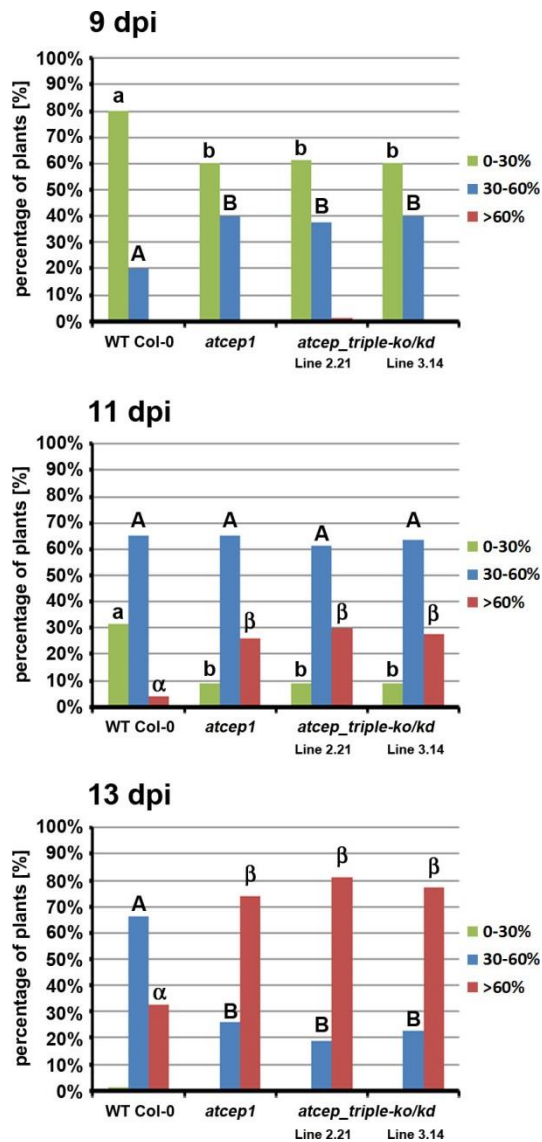
### **2.3.3. AtCEP Proteasen scheinen in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens *E. cruciferarum* zueinander nicht funktionell redundant zu wirken**

Abschließen bleibt zu klären, ob die drei AtCEP Proteasen in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens *E. cruciferarum* zueinander funktional redundant wirken. Dies würde mit einer Triple-Mutante *atcep\_triple-ko* beantwortet werden können. Eine Triple-Mutante *atcep\_triple-ko* mit Insertionen in allen drei *AtCEP* Genen ist kaum durch Kreuzung zu generieren, da *AtCEP2* und *AtCEP3* „in tandem“ auf Chromosom 3 liegen. Aus diesem Grund wurde die homozygote *atcep3 x atcep1 ko* mit *AtCEP2*-RNAi-Konstrukten transformiert. Aus dieser Transformation erhielt man zwei homozygote *atcep\_triple-ko/kd* Linien mit einer *AtCEP2*-Expression von 0.5 % (Linie 2.21) und 2 % (Linie 3.14) (s. Kap. 2.1.3.).

Es werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 sowie zum Vergleich suszeptible Col-0 Wildtyppflanzen und super-suszeptible homozygote *atcep1 ko* Pflanzen mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Bei der Inokulation wird darauf geachtet, dass die Pflanzen mit einer geringen Konidien-Dichte von ca. 5-7 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert werden, um einen quantitativen Pathogenese-Phänotyp erkennen zu können. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen vier Genotypen an den Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Die befallenen Pflanzen werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (Abb. 8A).

An allen drei Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi ist zu erkennen, dass Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 in allen drei Kategorien der Suszeptibilität nicht signifikant verschieden zu homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen sind (Abb. 20). Dies bedeutet, dass ein zusätzlicher „Knockdown“ von *AtCEP2* neben dem *Knockout* von *AtCEP3* in der *atcep\_triple-ko/kd* dieselbe Super-Suszeptibilität wie *atcep1 ko* Pflanzen und jedoch keine noch erweiterte Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* bewirkt (s. Abb. 16). Somit scheinen die drei AtCEP Proteasen in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Pathogens *E. cruciferarum* zueinander nicht funktional redundant zu wirken.





**Abbildung 20: Vergleich der Befallsdichte mit *E. cruciferarum* der gesamten Pflanze von Col-0, *atcep1 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 nach Inokulation mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* 9, 11 und 13 dpi. Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* zeigen dieselbe Super-Suszeptibilität wie *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum*, jedoch keine noch erweiterte Super-Suszeptibilität. Die befallenen Blätter werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 % (grün), 30-60 % (blau) und mehr als 60 % (rot) mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (s. Abb. 8A). Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen Befall mit *E. cruciferarum* der Pflanzen der jeweiligen Genotypen aus zehn Experimenten mit voneinander unabhängigen Inokulationen, wobei jedes Experiment aus fünf Pflanzen je Genotyp besteht. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p < 0.05$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p > 0.05$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

**2.3.4. Die spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* in einer *atcpr5* Mutante ist zeitlich und räumlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen und dem damit verbundenen PCD assoziiert**

Die Genexpressions-Daten der *Arabidopsis* Mutante *atcpr5* (GEO accession GSE5745) aus der Datenbank für Genexpressionen (Genevestigator: Zimmermann et al., 2004), zeigen eine signifikante Hochregulierung des *AtCEP1* Transkripts in zwei Wochen alten *atcpr5* Mutanten im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Die analysierte *atcpr5-2* Mutante (NASC stock code N3770) besitzt im vierten Exon eine Punktmutation, die zu einem Stopcodon führt (Trp477stop) (Boch et al., 1998; Bowling et al., 1994). Diese *atcpr5-2* Punktmutante wird im folgenden Text als *atcpr5* Mutante bezeichnet.

Es werden die Genexpressionen von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* in 7 Tage (days, d) alten Keimlingen und in Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante mittels qRT-PCR quantifiziert. Grundsätzlich sind bei 7 d alten Keimlingen die verfrühte Kotyledonen-Seneszenz, aber mit bloßem Auge keine nekrotischen Blattläsionen auf jungen Primärblättern zu erkennen. Auf Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante hingegen sind mit bloßem Auge nekrotische Blattläsionen sichtbar.

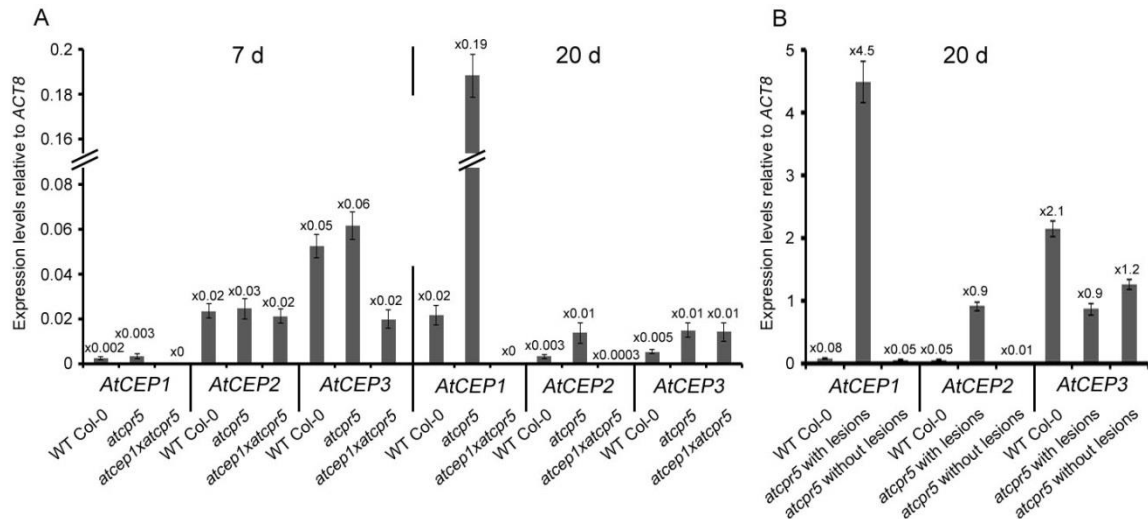
7 d alte Keimlinge der *atcpr5* Mutante weisen im Vergleich zu Col-0 keine Hochregulierung von *AtCEP1* auf (Abb. 21A links). Im Gegensatz dazu ist in Rosettenblättern von 20 d alten *atcpr5* Mutanten, bei denen nekrotische Läsionen sichtbar sind, eine fast 10-fache Hochregulierung des *AtCEP1* Transkripts verglichen mit Col-0 Wildtyppflanzen vorhanden (Abb. 21A rechts). Die Expressionen von *AtCEP2* und *AtCEP3* sind dagegen sowohl in 7 d alten Keimlingen (Abb. 21A links) als auch in Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen der *atcpr5* Mutante (Abb. 21A rechts) gegenüber Col-0 nicht wesentlich hochreguliert.

Des Weiteren werden nun die Rosettenblätter von 20 d alten *atcpr5* Mutanten in Rosettenblätter mit sichtbaren nekrotischen Blattläsionen und in Rosettenblätter ohne sichtbare nekrotische Blattläsionen separiert. In diesen werden die Genexpressionen von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* mittels qRT-PCR analysiert.

Rosettenblätter mit sichtbaren nekrotischen Blattläsionen zeigen eine über 50-fache Hochregulierung des *AtCEP1* Transkripts im Vergleich zu Col-0 Pflanzen. Rosettenblätter ohne sichtbare nekrotische Blattläsionen besitzen ein ähnliches Genexpressionslevel von *AtCEP1* wie 20 d alte Col-0 Wildtyppflanzen. Weiterhin weisen die Expressionen von *AtCEP2* und *AtCEP3* sowohl in Rosettenblättern mit sichtbaren nekrotischen Blattläsionen als auch in Rosettenblättern ohne sichtbare nekrotische Blattläsionen keine wesentliche Hochregulierung gegenüber Col-0 auf (Abb. 21B).

Somit hängt die Hochregulierung von *AtCEP1* in *atcpr5* Mutanten zeitlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen auf Rosettenblättern zusammen.

## Ergebnisse

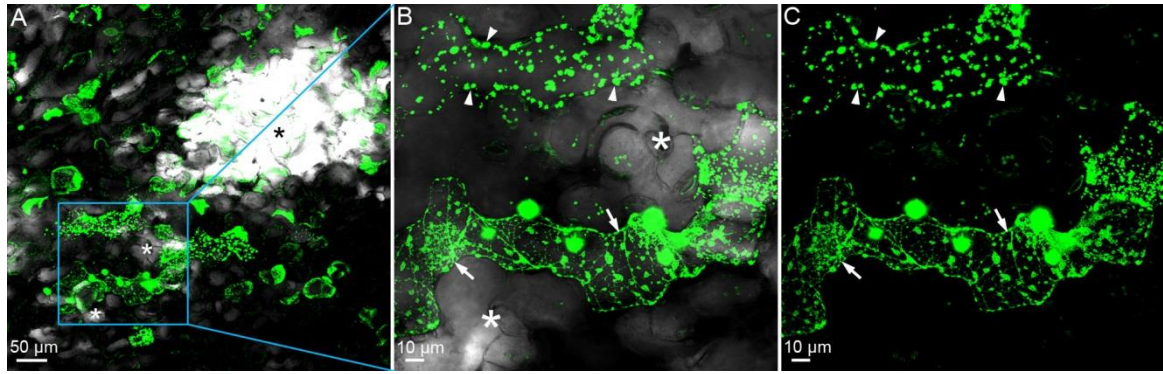


**Abbildung 21: Die Hochregulierung von *AtCEP1* in *atcpr5* Mutanten hängt zeitlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen auf den Rosettenblättern zusammen. (A) *AtCEP1* ist in Rosettenblättern von 20 d alten *atcpr5* Mutanten 10-fach hochreguliert. Die Doppelmutante *atcep1 x atcpr5* zeigt keine *AtCEP1* Expression. (B) Werden die Rosettenblätter in Blätter mit sichtbaren und ohne sichtbare nekrotische Blattläsionen unterteilt, zeigt *AtCEP1* in Rosettenblättern mit sichtbaren nekrotischen Blattläsionen eine mehr als 50-fache Hochregulierung. Die relativen Genexpressionen von *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* werden in 7 d alten Keimlingen und in Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen von Col-0, *atcpr5* Mutanten und *atcep1xatcpr5* Doppelmutanten quantifiziert. Für die qRT-PCR werden genspezifische Primer für *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3* verwendet. Das Expressionslevel wird gegen das „housekeeping“ Gen *ACT8* in Relation gesetzt. Die Säulen repräsentieren das relative Expressionslevel und dieses ist oberhalb der Säulen angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung aus drei technischen Replikaten an. Die Ergebnisse wurden für die *atcep1xatcpr5* Doppelmutante mit einer zweiten unabhängigen Linie bestätigt. Alle Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Experiment reproduziert (Biologisches Replikat).**

Weiterführend wird nun mikroskopisch am CLSM überprüft, ob darüber hinaus auch ein direkter raum-zeitlicher Zusammenhang zwischen der Hochregulierung von *AtCEP1* in *atcpr5* Mutanten besteht. Hierfür werden Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko*, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von *AtCEP1* (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL*) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), mit Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante gekreuzt. Diese homozygote Doppelmutante *atcep1 x atcpr5* zeigt in der qRT-PCR sowohl in 7 d alten Keimlingen (Abb. 21A links) als auch in Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen (Abb. 21A rechts) keine *AtCEP1* Expression. Dies bestätigt den „Knockout“ von *AtCEP1* bestätigt. Darüber hinaus sind die Expressionen von *AtCEP2* und *AtCEP3* weder in 7 d alten Keimlingen (Abb. 21A links) noch in Rosettenblättern von 20 d alten Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* (Abb. 21A rechts) gegenüber Col-0 wesentlich hoch- oder herunterreguliert.

Es werden nekrotische Blattläsionen auf Rosettenblättern von 20 d alten *atcep1 x atcpr5* Pflanzen am CLSM analysiert. Die Promotoraktivität von *AtCEP1* ist spezifisch in Epidermiszellen, die einerseits benachbart zu einer großen, im CLSM sehr hellen, nekrotischen Blattläsion (Abb. 22A schwarzer Asterisk) liegen, hochreguliert (Abb. 22). In dieser großen nekrotischen Blattläsion sind aufgrund des schon stattgefundenen Programmierten Zelltods keine Zellstrukturen mehr erkennbar. Andererseits liegen die Epidermiszellen, in denen eine spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* festzustellen ist, direkt angrenzend an Epidermiszellen, die im CLSM heller bzw. grau erscheinen (Abb. 22A und B weiße Asteriske). In diesen Epidermiszellen hat der Programmierte Zelltod wahrscheinlich bereits zum Großteil stattgefunden und es wurde unter anderem das Chlorophyll im Zuge der Chlorose abgebaut. Daher erscheinen diese Epidermiszellen heller. In den Epidermiszellen, in denen die Promotoraktivität von *AtCEP1* spezifisch hochreguliert ist, findet dagegen der Programmierte Zelltod gerade statt oder steht bevor. Das EGFP Signal des Pro-Enzyms pro-3xHA-EGFP-KDEL zeigt einerseits die für das Endoplasmatische Retikulum typischen kortikalen netzartigen Strukturen (Abb. 22B und C weiße Pfeile). Andererseits ist zusätzlich ein punktiertes Signalmuster des Fluoreszenzproteins EGFP erkennbar, das auf einen Abbau des Endomembransystems im Zuge des Programmierten Zelltods hindeutet (Abb. 22B und C weiße Pfeilspitzen).

Somit ist die spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* in *atcpr5* Mutanten zeitlich und räumlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen auf den Rosettenblättern und dem damit verbundenen Programmierten Zelltod assoziiert.



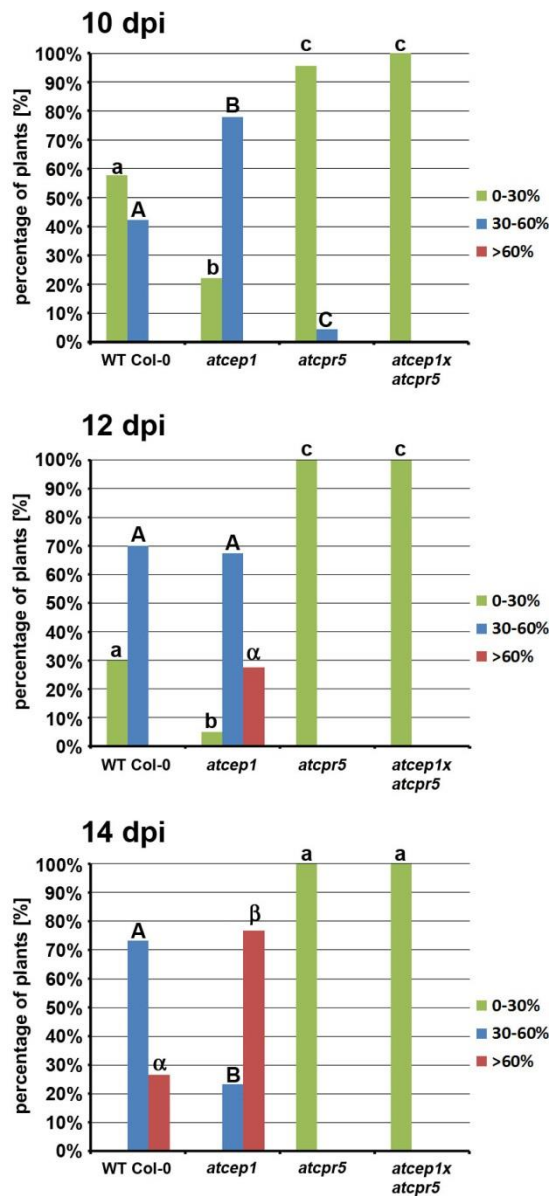
**Abbildung 22: Spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* in Epidermiszellen, in denen PCD stattfindet. Diese liegen benachbart zu einer nekrotischen Blattläsion (A schwarzer Asterisk) und direkt angrenzend an Epidermiszellen, in denen der PCD wahrscheinlich bereits zum Großteil stattgefunden hat (A, B weiße Asteriske). Das EGFP Signal zeigt einerseits die für das ER typischen kortikalen netzartigen Strukturen (B, C weiße Pfeile). Andererseits ist zusätzlich ein punktiertes Signalmuster erkennbar, das auf einen Abbau des Endomembransystems im Zuge des PCD hindeutet (B, C weiße Pfeilspitzen). Für die Untersuchung der Promotoraktivität von *AtCEP1* *in vivo*, werden nekrotische Blattläsionen auf der Oberseite von Rosettenblättern von 20 d alten *atcep1 x atcpr5* Pflanzen, die zusätzlich ein nicht funktionelles Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von *AtCEP1* (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL*) exprimieren, am CLSM analysiert. Dargestellt sind eine 200-fache Vergrößerung (A) und 600-fache Vergrößerungen des in A blau umrandeten Rechtecks (B, C). Die EGFP-Signale wurden durch Lambda-Scans verifiziert.**

### **2.3.5. Konstitutive Resistenz von Pflanzen der *atcpr5* Mutante gegenüber *Erysiphe cruciferarum***

Es werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante und der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante sowie zum Vergleich suszeptible Col-0 Wildtyppflanzen und super-suszeptible homozygote *atcep1 ko* Pflanzen mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Bei der Inokulation wird darauf geachtet, dass die Pflanzen mit einer geringen Konidien-Dichte von ca. 5-7 Konidien pro mm<sup>2</sup> inokuliert werden, um einen quantitativen Pathogenese-Phänotyp erkennen zu können. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen vier Genotypen an den Zeitpunkten 10, 12 und 14 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Die befallenen Pflanzen werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (Abb. 8A).

An allen drei Zeitpunkten 10, 12 und 14 sind die bereits beschriebenen Symptome der Suszeptibilität von Col-0 Pflanzen und der Super-Suszeptibilität der *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum* zu erkennen (Abb. 23).

Im markanten Gegensatz dazu zeigen Pflanzen der *atcpr5* Mutante an allen drei Zeitpunkten 10, 12 und 14 eine starke Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* (Abb. 23, s. Abb. 16). Am Zeitpunkt 10 dpi ist zu erkennen, dass die homozygote *atcpr5* Mutante signifikant mehr Pflanzen mit weniger als 30 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche als Col-0 aufweist. Damit übereinstimmend zeigt die homozygote *atcpr5* Mutante zusätzlich signifikant weniger Pflanzen mit 30-60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche als Col-0. An den Zeitpunkten 12 und 14 dpi weist die *atcpr5* Mutante ausschließlich Pflanzen mit weniger als 30 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche auf (Abb. 23).



**Abbildung 23: Vergleich der Befallsdichte mit *E. cruciferarum* der gesamten Pflanze von Col-0, *atcep1 ko*, *atcpr5* Mutante und *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante nach Inokulation mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* 10, 12 und 14 dpi. Pflanzen der *atcpr5* Mutante und *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante sind gegenüber *E. cruciferarum* resistent. Die befallenen Blätter werden in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 % (grün), 30-60 % (blau) und mehr als 60 % (rot) mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (s. Abb. 8A). Die Säulen repräsentieren den durchschnittlichen Befall mit *E. cruciferarum* der Pflanzen der jeweiligen Genotypen aus acht Experimenten mit voneinander unabhängigen Inokulationen, wobei jedes Experiment aus fünf Pflanzen je Genotyp besteht. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p < 0.05$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test ( $p > 0.05$ ) statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

### **2.3.6. AtCEP1 leistet einen Beitrag im vom echten Mehltaupilz induzierten PCD und unterstützt somit die Bildung nekrotischer Blattläsionen auf *atcpr5* Mutanten**

Bei der makroskopischen visuellen Auswertung der gesamten Pflanze zeigen *atcpr5* Mutanten eine starke Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* (s. Abb. 23). Die homozygoten Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante werden unter den beschriebenen Bedingungen ebenfalls 10, 12 und 14 dpi analysiert (s. Kap. 2.3.5.).

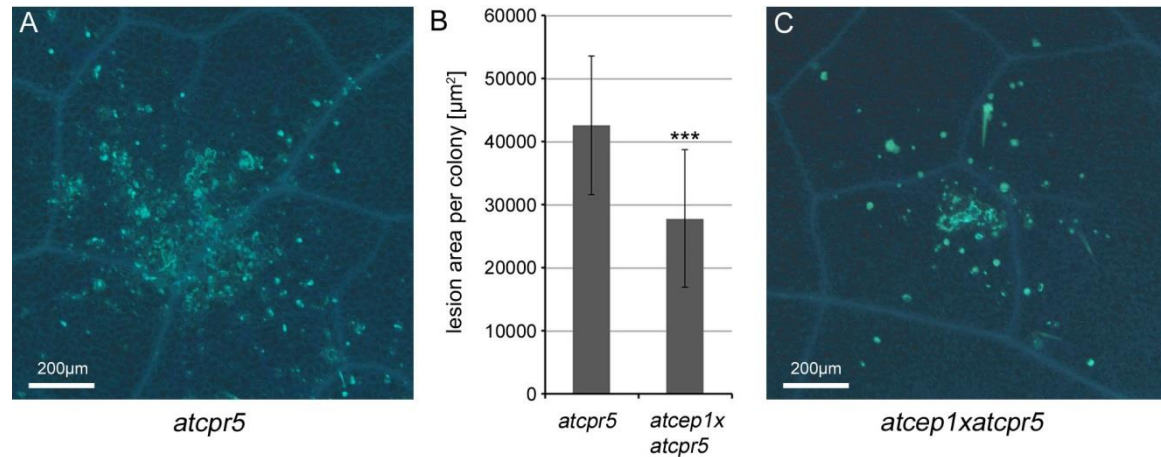
An allen drei Zeitpunkten weist die homozygote *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante ausschließlich Pflanzen mit weniger als 30 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche auf (s. Abb. 23). Somit zeigen Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante trotz des nun vorhandenen Einfach-Verlusts von AtCEP1, wie Pflanzen der *atcpr5* Mutante, eine starke Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* und sind nicht wie *atcep1 ko* Pflanzen supersuszeptibel (s. Abb. 16). Der Phänotyp der *atcpr5* Mutante scheint somit epistatisch über dem Phänotyp der *atcep1 ko* zu stehen.

Bei der mikroskopischen Analyse von homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutanten am CLSM erkennt man, dass die spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von AtCEP1 zeitlich und räumlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen auf den Rosettenblättern und dem damit verbundenen programmierten Zelltod assoziiert ist (s. Kap. 2.3.4. und Abb. 22). Daher wird nun überprüft, ob ein Einfach-Verlust von AtCEP1 in der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante zu einer Abnahme der nekrotischen Läsionsfläche führt, ähnlich der signifikanten Reduktion des epidermalen Zelltods in *atcep1 ko* Pflanzen (s. Kap. 2.2.6.). Unter dem Infektionsstress des echten Mehltaupilzes sollte ein etwaiger quantitativer Phänotyp deutlicher erkennbar sein. Es werden Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante und *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante erneut mit Konidien des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert. Am Zeitpunkt 5 dpi werden für die mikroskopische Analyse Rosettenblätter von *atcpr5* Mutanten und *atcep1 x atcpr5* Doppelmutanten mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff Methylblau inkubiert. Der Farbstoff Methylblau detektiert nekrotische Zellen sowie Callose-angereicherte Strukturen, wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum* (s. Abb. 13C, F). Die fluoreszierende Fläche der nekrotischen Blattläsionen wird mittels des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* graphical analysis software (Rasband, 1997-2014) quantifiziert.

Die Fläche der nekrotischen Blattläsionen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes ist auf Rosettenblättern der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante mit ca. 28000  $\mu\text{m}^2$  signifikant kleiner (Abb. 24B, C) als die Fläche der nekrotischen Blattläsionen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes auf Rosettenblättern von homozygoten *atcpr5* Mutanten mit ca. 43000  $\mu\text{m}^2$  (Abb. 24A, B).

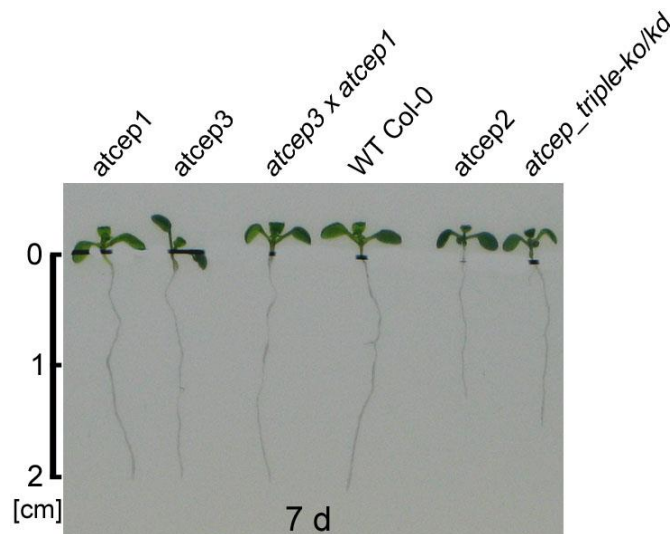


Somit führt der Einfach-Verlust von AtCEP1 in der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante zu einer signifikanten Reduktion der nekrotischen Läsionsfläche unter dem Infektionsstress von *E. cruciferarum*. Dies bedeutet, dass das Vorhandensein von AtCEP1 einen Beitrag zum Programmierten Zelltod, der durch *E. cruciferarum* induziert wird, leistet. Somit wird die Bildung nekrotischer Blattläsionen auf Rosettenblättern von *atcpr5* Mutanten unterstützt.



**Abbildung 24: (A, B) AtCEP1 leistet einen Beitrag zum vom echten Mehltaupilz induzierten Programmierten Zelltod und unterstützt somit die Bildung nekrotischer Blattläsionen auf *atcpr5* Mutanten. (B, C) Der Einfach-Verlust von AtCEP1 in der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante führt zu einer signifikanten Reduktion der nekrotischen Läsionsfläche.** Dargestellt sind 40-fache Vergrößerungen von repräsentativen nekrotischen Blattläsionen auf Rosettenblättern der homozygoten *atcpr5* Mutante (A) und der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante (C). Vergleich der Fläche von nekrotischen Blattläsionen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes auf Rosettenblättern von *atcpr5* Mutanten mit *atcep1 x atcpr5* Doppelmutanten (B). Der Stichprobenumfang für jeden Genotyp umfasst 65 Blattläsionen auf 19 Rosettenblättern. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Fläche der nekrotischen Blattläsionen pro Kolonie des echten Mehltaupilzes 5 Tage nach Inokulation mit *E. cruciferarum*. Die fluoreszierenden Flächen der nekrotischen Blattläsionen werden mittels des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* graphical analysis software (Rasband, 1997-2014) quantifiziert. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Säulen, die mit \*\*\* bezeichnet sind, weisen entsprechend dem zweiseitigen Student's *t*-Test ( $p < 0.001$ ) auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin.

## 2.4. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweichung für die Elongation sowie für die Zellseparation



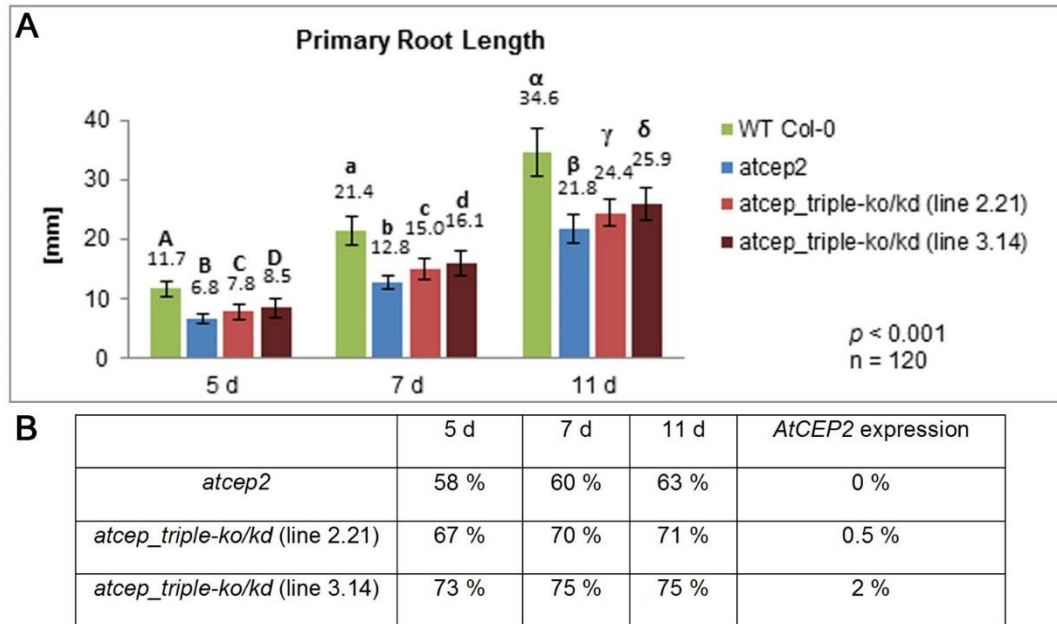
**Abbildung 25: Vergleich der Primärwurzellängen 7 Tage alter Keimlinge von homozygoten Mutanten der *atcep1 ko*, *atcep3 ko*, *atcep3 x atcep1 ko*, *atcep2 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* mit Col-0: Homozygote Keimlinge der *atcep2 ko* zeigen ein verkürztes Primärwurzelwachstum, wohingegen homozygote Keimlinge der *atcep\_triple-ko/kd* eine dosiert geringere Verkürzung aufweisen. Der Balken auf der linken Seite der Abbildung stellt die Primärwurzellänge in Zentimeter (cm) dar.**

Die homozygote Single-Mutante *atcep2 ko* zeigt beim Vergleich der Primärwurzellängen 7 Tage (days, d) alter Keimlinge den Entwicklungs-Phänotyp einer deutlich verkürzten Primärwurzel im Vergleich zu Col-0 (Abb. 25). Dagegen weisen die homozygoten Single-Mutanten *atcep1 ko* und *atcep3 ko* keinen Entwicklungs-Phänotyp bezüglich der Primärwurzellänge gegenüber Col-0 auf (Abb. 25). Auch die homozygote Doppel-Mutante *atcep3 x atcep1 ko* besitzt die gleiche Primärwurzellänge wie Col-0 (Abb. 25). Eine Triple-Mutante *atcep\_triple-ko* mit Insertionen in allen drei *AtCEP* Genen ist kaum durch Kreuzung zu generieren, da *AtCEP2* und *AtCEP3* „in tandem“ auf Chromosom 3 liegen. Aus diesem Grund wurde die homozygote *atcep3 x atcep1 ko* mit *AtCEP2*-RNAi-Konstrukten transformiert. Aus dieser Transformation erhielt man zwei homozygote *atcep\_triple-ko/kd* Linien mit einer *AtCEP2*-Expression von 0.5 % (Linie 2.21) und 2 % (Linie 3.14) (s. Kap. 2.1.3.). Diese *atcep\_triple-ko/kd* Linien zeigen beim Vergleich der Primärwurzellängen 7 d alter Keimlinge den Entwicklungs-Phänotyp einer deutlich verkürzten Primärwurzel im Vergleich zu Col-0. Allerdings weist die Primärwurzel von *atcep\_triple-ko/kd* verglichen mit der Primärwurzel von *atcep2-ko* gegenüber Col-0 aufgrund der Restaktivität von *AtCEP2* eine dosiert geringere Verkürzung auf (Abb. 25).

**2.4.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der Primärwurzel aufgrund verkürzter Zelllängen in der Elongationszone**

**2.4.1.1. Verkürzte Primärwurzeln in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen**

7 d alte Keimlinge der homozygoten *atcep2 ko*, weisen in der RT-PCR kein *AtCEP2* Transkript auf (s. Kap. 2.1.2.). Sie zeigen den quantitativen Entwicklungs-Phänotyp einer deutlich verkürzten Primärwurzel im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 25).



**Abbildung 26: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der Primärwurzellänge. Die Restaktivität von AtCEP2 bewirkt dagegen eine dosiert geringere Verkürzung. (A) Vergleich der Primärwurzellängen 5, 7 und 11 Tage alter Keimlinge von Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Primärwurzellänge sowie der *AtCEP2* Expression in homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). Der Stichprobenumfang für jeden Genotyp umfasst 120 ausgemessene Primärwurzeln. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge der Primärwurzeln und diese ist oberhalb der Säulen in Millimeter (mm) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Säulen, die mit unterschiedlichen Buchstaben bezeichnet sind, weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt (biologisches Replikat).**

Die statistische Auswertung zeigt, dass die homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen bei 5, 7 und 11 d eine signifikant kürzere Primärwurzel als Col-0 Wildtyppflanzen aufweisen. Die Länge der Primärwurzel von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen beträgt bei 5 d 6.8 mm, bei 7 d 12.8 mm und bei 11 d 21.8 mm gegenüber den Primärwurzellängen von Col-0 Keimlingen mit 11.7 mm, 21.4 mm und 34.6 mm. Generell entspricht die Länge der Primärwurzel von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen an allen drei gemessenen Zeitpunkten ca. 60 % der Primärwurzellänge von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 26).

Für die mikroskopische Analyse des quantitativen Entwicklungs-Phänotyps werden die Primärwurzeln von 7 d alten homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko*, *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 sowie von Col-0 Wildtyppflanzen mit Probidiumiodid gefärbt. Somit können einerseits die Zellwand und andererseits Zellen, in denen neben der Zellwand auch der Zellkern Probidiumiodid-gefärbt ist, visualisiert werden. Die Färbung des Zellkerns bedeutet, dass aufgrund des beginnenden Zelltods die Zellmembranen dieser Zellen perforiert sind und demzufolge PCD stattfindet. Die Regionen der „lateral root cap“ (LRC), in der der PCD stattfindet, werden am oberen Ende der LRC als „PCD Site I“ und an der Wurzelspitze am unteren Ende der LRC als „PCD Site II“ bezeichnet (Abb. 27 PCD-Site I und II).

Es wird die sowohl die Länge als auch die Breite der LRC ausgemessen. Die Länge der LRC wird als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur „PCD Site I“ definiert und die Breite der LRC wird auf Höhe der „PCD Site I“ gemessen (Abb. 27).

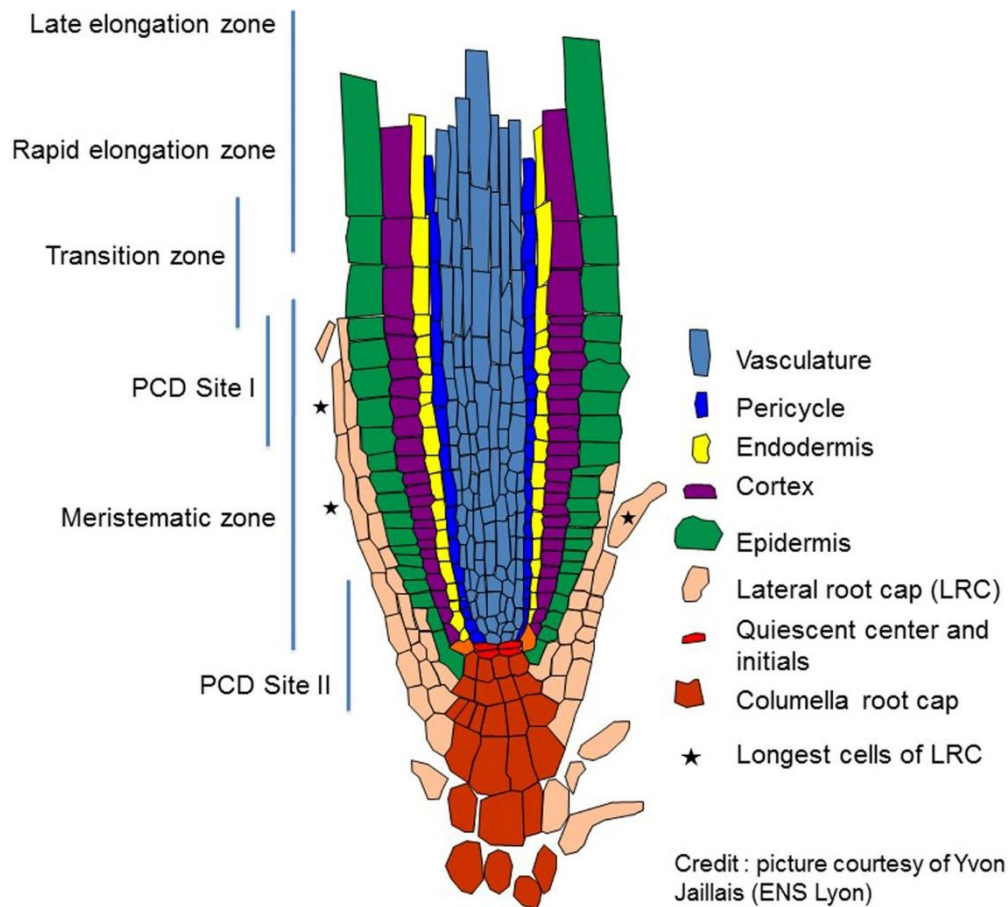
In der „PCD Site I“ am oberen Ende der LRC finden sich die längsten LRC-Zellen (Abb. 27 Stern). An dieser Position wird die Zelllänge der 3-5 längsten LRC-Zellen sowie deren Zellbreite ermittelt.

Des Weiteren wird die Länge der meristematischen Zone, die als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur ersten elongierten Epidermiszelle definiert wird, analysiert (Abb. 27).

In der Elongationszone werden die Zelllänge und -breite der drei längsten Trichoblasten (elongierte Zellen, die Wurzelhaare ausbilden) am Übergang der „rapid elongation zone“, in der eine sehr schnelle Zellelongation stattfindet, zur „late elongation zone“, in der die Zellelongation nicht mehr zunimmt, ausgemessen (Abb. 27). Mikroskopisch ist diese Zone daran zu erkennen, dass die ersten Ausbuchtungen von Wurzelhaaren in den Trichoblasten erkennbar sind.

Die Auswertung der Breite der Elongationszone wird auf Höhe dieser längsten Trichoblasten analysiert.

**Morphologischer Aufbau der Wurzelspitze von *Arabidopsis***

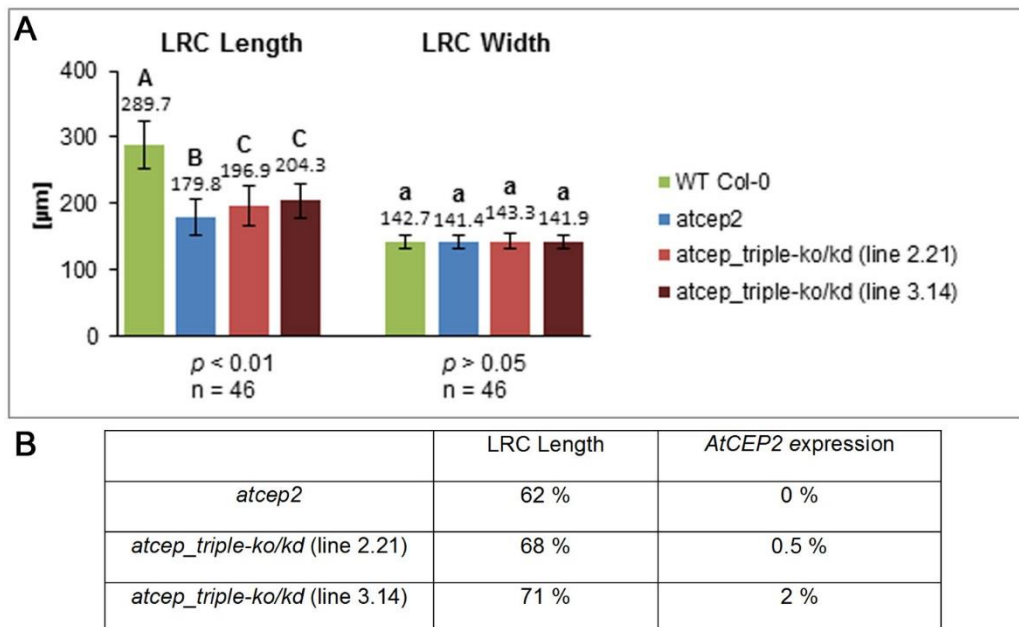


**Abbildung 27** (entspricht Abb. 1 und ist an dieser Stelle zur Erleichterung des Lesers noch einmal eingefügt): **Übersicht des morphologischen Aufbaus der Wurzelspitze von *Arabidopsis*.** Am oberen Ende der LRC (PCD Site I) und am unteren Ende der LRC (PCD Site II) findet PCD statt. Kurz vor der Abschilferung der LRC-Zellen erreichen diese am oberen Ende der LRC ihre maximale Länge (Stern). Geänderte Darstellung der Übersicht, die freundlicherweise von Yvon Jaillais (Hochschule ENS Lyon, yvon.jaillais@ens-lyon.fr) zur Verfügung gestellt wurde.

2.4.1.2. Homozygote *atcep2 ko* Pflanzen zeigen eine Verkürzung der „lateral root cap“ aufgrund der Reduktion ihrer Zelllängen

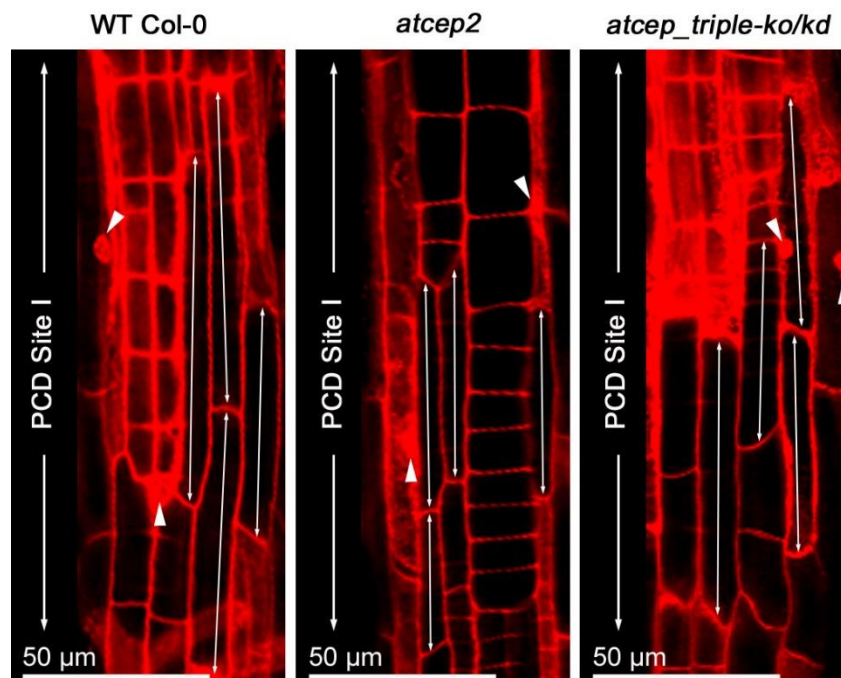
Die statistische Auswertung zeigt, dass Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* mit 179.8 µm gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 289.7 µm die signifikant kürzeste Länge der LRC aufweisen (Abb. 28A linkes Diagramm). Die Länge der LRC wird als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur „PCD Site I“ definiert (Abb. 27). Prozentual gesehen entspricht die Länge der LRC von homozygoten *atcep2 ko* Keimlingen 62 % der Länge der LRC von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 28B).

Beim Vergleich der Breite der LRC, die auf Höhe der „PCD Site I“ gemessen wird (Abb. 27), sind homozygote *atcep2 ko* Pflanzen mit 141.4 µm und Col-0 Wildtyppflanzen mit 142.7 µm nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 28A rechtes Diagramm).



**Abbildung 28: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der LRC-Länge. Die Restaktivität von AtCEP2 bewirkt dagegen eine dosiert geringere Verkürzung. (A) Vergleich der Länge (links) und der Breite (rechts) der LRC von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Länge der LRC sowie der *AtCEP2* Expression von homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). „n“ zeigt den gesamten Stichprobenumfang, der für jeden Genotyp bei der jeweiligen Auswertung identisch ist. Dieser setzt sich aus der Summe der Stichprobenumfänge aus drei unabhängigen Experimenten (biologische Replika) zusammen: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 15, in Experiment 2 = 15 und in Experiment 3 = 16. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge bzw. Breite und diese sind oberhalb der Säulen in Mikrometer (µm) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen. LRC = laterale Wurzelhaube, lateral root cap.**

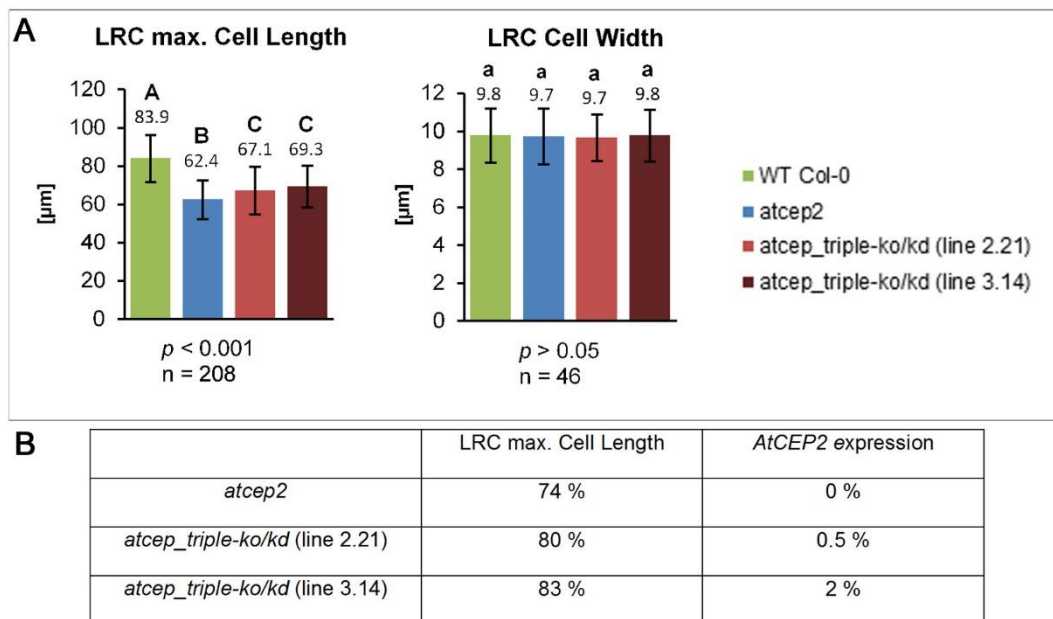
Beim Vergleich der Zelllänge der längsten Zellen am oberen Ende der LRC auf Höhe der „PCD Site I“ Probidiumiodid-gefärbter Primärwurzeln erkennt man, dass in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen die längsten Zellen mit ca. 50-65  $\mu\text{m}$  Länge deutlich kürzer sind als in Col-0 Wildtyppflanzen mit ca. 75-90  $\mu\text{m}$  Länge (Abb. 29 Doppelpfeile). Darüber hinaus sind in Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* genau wie in Col-0 Wildtyppflanzen auf Höhe der „PCD Site I“ Probidiumiodid-gefärbte Zellkerne erkennbar, da aufgrund des beginnenden Zelltods die Zellmembranen dieser Zellen perforiert sind (Abb. 29 Pfeilspitzen). Diese Färbungen der Zellkerne bedeuten, dass der PCD in der „PCD Site I“ von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen stattfindet und nicht gestört ist.



**Abbildung 29:** Vergleich der Zelllängen der längsten Zellen (Doppelpfeile) in der LRC auf Höhe der „PCD Site I“ von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (links), homozygoten *atcep2 ko* (Mitte) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* (rechts): Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu deutlich kürzeren Zelllängen, wohingegen die Restaktivität von AtCEP2 in der *atcep\_triple-ko/kd* eine dosiert geringere Verkürzung der Zelllängen bewirkt. Pfeilspitzen markieren den Zellkern von Zellen, bei denen neben der Zellwand auch dieser gefärbt ist, was den beginnenden Zelltod andeutet: Der PCD findet in der „PCD Site I“ von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* statt und ist nicht gestört. Dargestellt sind Einzelaufnahmen, Probidiumiodid-gefärbter Wurzeln (400-fache Vergrößerung), die am CLSM aufgenommen wurden.

## Ergebnisse

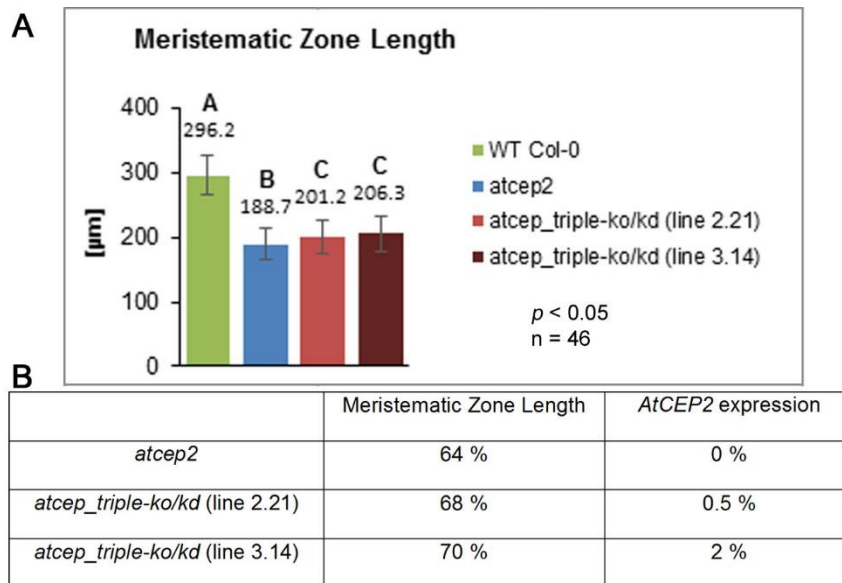
Die statistische Auswertung der Zelllänge der 3-5 längsten Zellen am oberen Ende der LRC zeigt, dass in Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* die Zelllänge mit 62.4  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 83.9  $\mu\text{m}$  signifikant kürzer ist (Abb. 30A linkes Diagramm). Die Zellbreite der 3-5 längsten Zellen in der LRC in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen ist dagegen mit 9.7  $\mu\text{m}$  nicht signifikant verschieden zu 9.8  $\mu\text{m}$  in Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 30A rechtes Diagramm). Prozentual gesehen entspricht die Zelllänge der 3-5 längsten Zellen in der LRC von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen 74 % der Zelllänge der 3-5 längsten LRC-Zellen von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 30B).



**Abbildung 30: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Reduktion der Zelllänge in der LRC. Die Restaktivität von AtCEP2 bewirkt dagegen eine dosiert geringere Verkürzung. (A) Vergleich der Zelllänge der 3-5 längsten LRC-Zellen (links) und deren Zellbreite (rechts) von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Zelllänge der 3-5 längsten Zellen in der LRC sowie der *AtCEP2* Expression in homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). „n“ zeigt den gesamten Stichprobenumfang, der für jeden Genotyp bei der jeweiligen Auswertung identisch ist. Dieser setzt sich aus der Summe der Stichprobenumfänge aus drei unabhängigen Experimenten (biologische Replika) zusammen: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 15, in Experiment 2 = 15 und in Experiment 3 = 16. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge bzw. Breite und diese sind oberhalb der Säulen in Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen. LRC = laterale Wurzelhaube, lateral root cap.**



Für die statistische Auswertung werden die Längen der meristematischen Zone, die als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur ersten elongierten Epidermiszelle definiert wird (Abb. 27), analysiert. Diese sind in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen mit 188.7  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 296.2  $\mu\text{m}$  signifikant kürzer (Abb. 31A). Die Länge der meristematischen Zone von Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* entspricht 64 % der Länge der meristematischen Zone von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 31B).

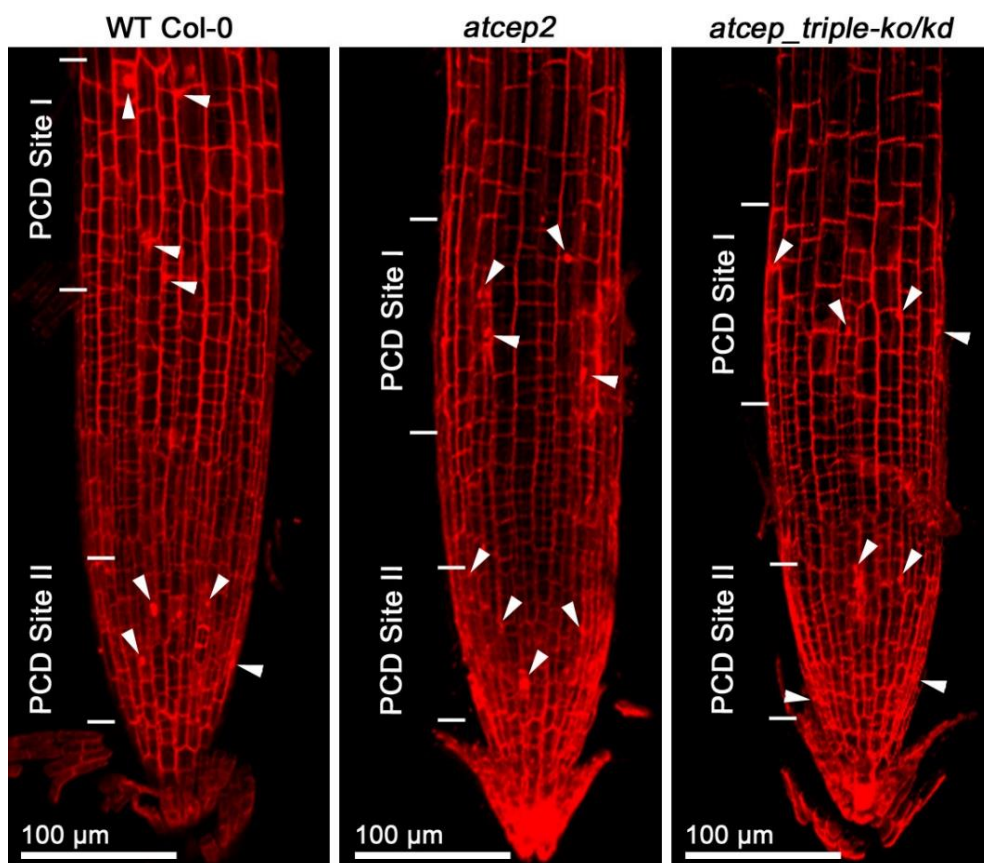


**Abbildung 31: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der Länge der meristematischen Zone. Die Restaktivität von AtCEP2 bewirkt dagegen eine dosiert geringere Verkürzung. (A) Vergleich der Länge der meristematischen Zone von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Länge der meristematischen Zone sowie der *AtCEP2* Expression in homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). „n“ zeigt den gesamten Stichprobenumfang, der für jeden Genotyp bei der jeweiligen Auswertung identisch ist. Dieser setzt sich aus der Summe der Stichprobenumfänge aus drei unabhängigen Experimenten (biologische Replika) zusammen: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 15, in Experiment 2 = 15 und in Experiment 3 = 16. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge und diese ist oberhalb der Säulen in Mikrometer ( $\mu\text{m}$ ) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

### 2.4.1.3. Der Programmierte Zelltod findet in der „lateral root cap“ von homozygoten *atcep2 ko* Keimlingen statt

Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* zeigen keine Störung des PCD und eine normale Entwicklung der LRC. Dies ist daran zu erkennen, dass erstens sowohl die „PCD Site I“ als auch die „PCD Site II“ in Col-0 Wildtyppflanzen und homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen jeweils ungefähr gleich lang sind (Abb. 32). Zweitens sind beide „PCD Sites“ in beiden Genotypen als klare Zonen mit Zellen, in denen neben der Zellwand auch der Zellkern Probidiumiodid-gefärbt ist, erkennbar. Dies bedeutet, dass aufgrund des beginnenden Zelltods die Zellmembranen dieser Zellen perforiert sind und somit der PCD stattfindet und nicht gestört ist (Abb. 32 Pfeilspitzen).

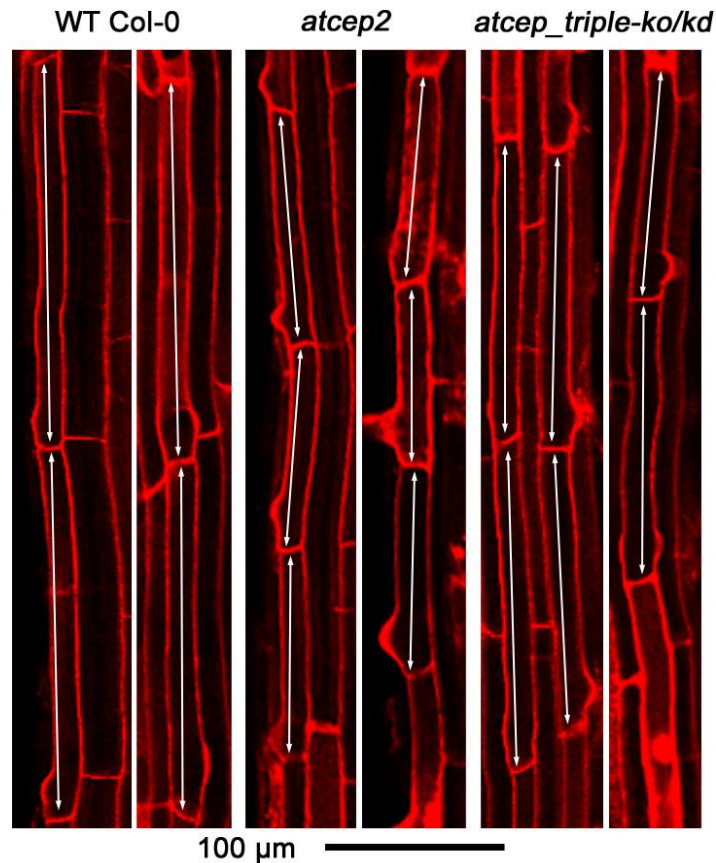
Die „PCD Site I“ ist in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen lediglich in Richtung Wurzelspitze verschoben (Abb. 32). Diese Verschiebung ist durch die Verkürzung der LRC aufgrund reduzierter Zelllängen bedingt.



**Abbildung 32: Vergleich der Positionen von „PCD Site I“ und „PCD Site II“ in 7 Tage alten Keimlingen von Col-0 (links) zu homozygoten *atcep2 ko* (Mitte) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* (rechts): Es ist eine Verschiebung der „PCD Site I“ in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen und in homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Pflanzen in Richtung Wurzelspitze erkennbar. Der PCD ist in allen drei Genotypen nicht gestört und in definierte Zonen mit Zellen, in denen neben der Zellwand auch der Zellkern gefärbt ist, unterscheidbar (Pfeilspitzen). Dargestellt sind 200-fache Vergrößerungen von Probidiumiodid-gefärbten Wurzelspitzen, die am CLSM aufgenommen wurden. Es sind jeweils 14 Einzelaufnahmen übereinander gelagert.**

2.4.1.4. Verkürzung der Zelllänge und Abnahme der Zellbreite in der Elongationszone von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen

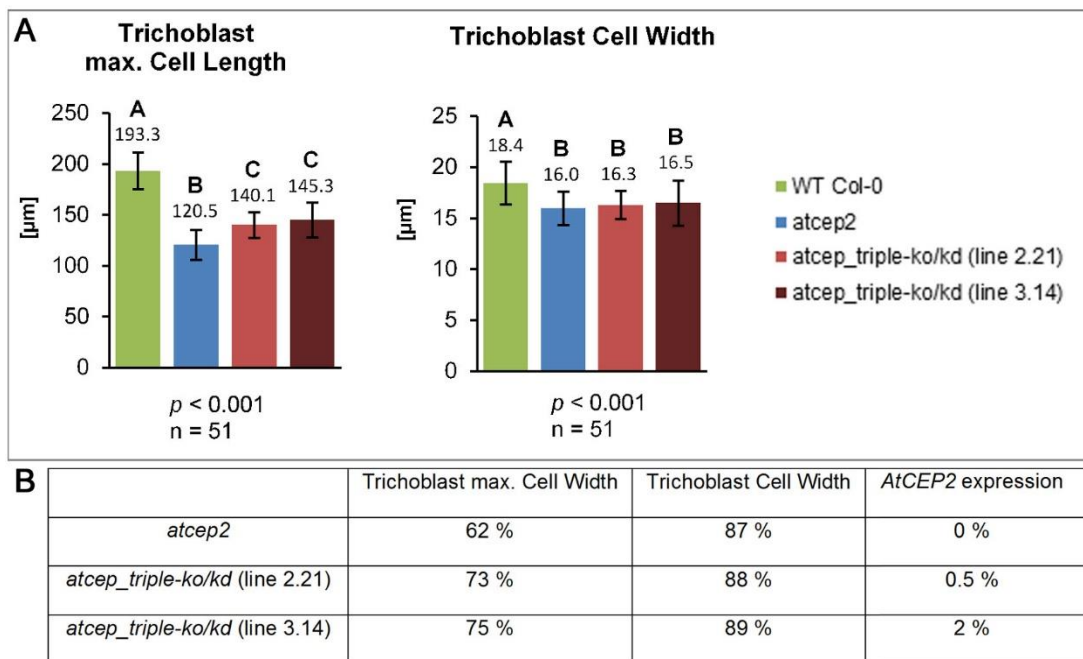
Es werden die Zelllängen der längsten Trichoblasten (elongierte Zellen, die Wurzelhaare ausbilden) in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ Probidiumiodid-gefärbter Primärwurzeln verglichen. In homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen sind die längsten Trichoblasten mit ca. 110-130 µm Länge deutlich kürzer als in Col-0 Wildtyppflanzen mit ca. 180-200 µm Länge (Abb. 33 Doppelpfeile).



**Abbildung 33:** Vergleich der Zelllängen der längsten Trichoblasten (Doppelpfeile) in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ von 7 Tage alten Keimlingen von Col-0 (links) sowie von homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* (Mitte) und *atcep\_triple-ko/kd* (rechts): Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu deutlich kürzeren Zelllängen der längsten Trichoblasten, wohingegen die Restaktivität von AtCEP2 in der *atcep\_triple-ko/kd* eine dosiert geringere Verkürzung der Zelllängen bewirkt. Dargestellt sind Einzelaufnahmen von jeweils zwei Probidiumiodid-gefärbten Wurzeln je Genotyp (200-fache Vergrößerung), die bei der statistischen Auswertung der Zelllänge der längsten Trichoblasten verwendet wurden. Die Aufnahmen wurden am CLSM aufgenommen.

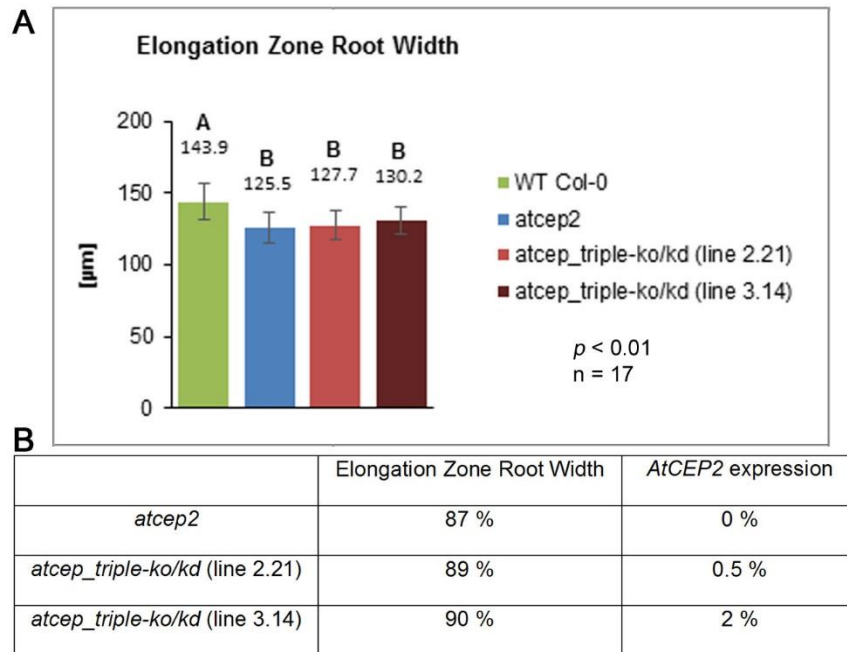
Die statistische Auswertung zeigt, dass die Zelllänge der drei längsten Trichoblasten in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen mit 120.5 µm im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 193.3 µm signifikant kürzer ist (Abb. 34A linkes Diagramm). Prozentual gesehen entspricht die Zelllänge der drei längsten Trichoblasten in Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* 62 % der Zelllänge der drei längsten Trichoblasten von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 34B).

Darüber hinaus ist die Zellbreite der drei längsten Trichoblasten in der Elongationszone in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen mit 16.0 µm signifikant schmaler gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 18.4 µm (Abb. 34A rechtes Diagramm). Die Zellbreite der drei längsten Trichoblasten in Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* entspricht 87 % der Zellbreite der drei längsten Trichoblasten von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 34B).



**Abbildung 34: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Verkürzung der Zelllänge und einer Abnahme der Zellbreite in der Elongationszone. Die Restaktivität von AtCEP2 bewirkt dagegen eine dosiert geringere Verkürzung der Zelllänge. (A) Vergleich der Zelllänge der drei längsten Trichoblasten (links) und deren Zellbreite (rechts) in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) sowie homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Zelllänge der drei längsten Trichoblasten und deren Zellbreite sowie der *AtCEP2* Expression in homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). „n“ zeigt den gesamten Stichprobenumfang, der für jeden Genotyp bei der jeweiligen Auswertung identisch ist. Dieser setzt sich aus der Summe der Stichprobenumfänge aus zwei unabhängigen Experimenten (biologische Replika) zusammen: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 8, in Experiment 2 = 9. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge bzw. Breite und diese sind oberhalb der Säulen in Mikrometer (µm) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

Für die statistische Auswertung der Breite der Elongationszone wird auf Höhe der längsten Trichoblasten gemessen. Homozygote *atcep2 ko* Pflanzen weisen mit 125.5 µm Breite gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 143.9 µm Breite eine signifikant schmalere Elongationszone auf (Abb. 35A). Prozentual gesehen entspricht die Breite der Elongationszone von homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen 87 % der Breite der Elongationszone von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 35 B).

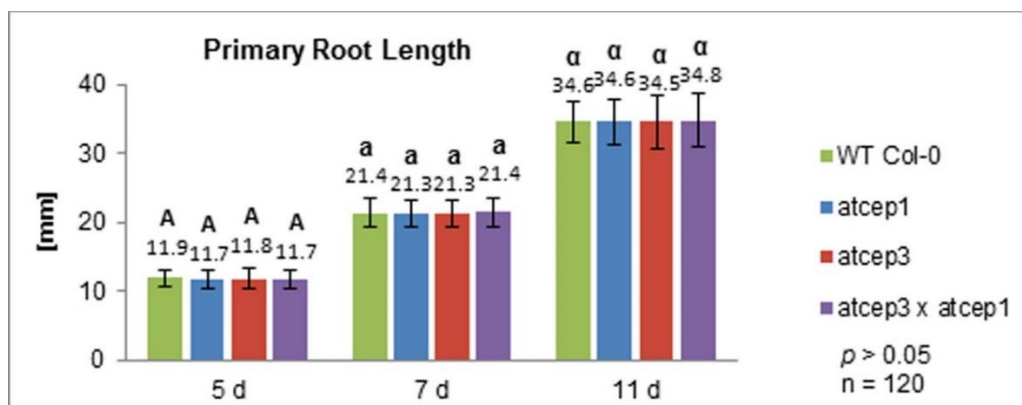


**Abbildung 35: Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Abnahme der Breite der Elongationszone. (A) Vergleich der Breite der Elongationszone von 7 Tage alten Keimlingen in Col-0 (grün), homozygoten *atcep2 ko* (blau) und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 (hellrot) und Linie 3.14 (dunkelrot). (B) Prozentualer Vergleich der Breite der Elongationszone sowie der *AtCEP2* Expression in homozygoten *atcep2 ko* und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 gegenüber Col-0 (=100%). „n“ zeigt den gesamten Stichprobenumfang, der für jeden Genotyp bei der jeweiligen Auswertung identisch ist. Dieser setzt sich aus der Summe der Stichprobenumfänge aus zwei unabhängigen Experimenten (biologische Replika) zusammen: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 8, in Experiment 2 = 9. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Breite und diese ist oberhalb der Säulen in Mikrometer (µm) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen.**

### **2.4.2. Keine verkürzten Primärwurzeln bei Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP3 sowie bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3**

7 d alte Keimlinge der homozygoten Single-Mutanten *atcep1 ko* und *atcep3 ko* zeigen keinen Entwicklungs-Phänotyp einer verkürzten Primärwurzel im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 25). Darüber hinaus weisen zudem 7 d alte Keimlinge der homozygoten Doppel-Mutante *atcep3 x atcep1 ko* die gleiche Primärwurzellänge wie Col-0 Wildtyppflanzen auf (Abb. 25).

Eine statistische Auswertung der Primärwurzellänge zeigt, dass homozygote Pflanzen der *atcep1 ko*, *atcep3 ko* und *atcep3 x atcep1 ko* an den Zeitpunkten 5, 7 und 11 d zueinander und gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen keinen signifikanten Unterschied aufweisen (Abb. 36). Die Längen der Primärwurzeln von homozygoten Pflanzen der *atcep1 ko* und *atcep3 ko* betragen bei 5 d 11.7 mm und 11.8 mm, bei 7 d 21.3 mm und bei 11 d 34.6 mm und 34.5 mm gegenüber der Primärwurzellänge von Col-0 Wildtyppflanzen mit 11.9 mm, 21.4 mm und 34.6 mm. Die Länge der Primärwurzel von homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen ist bei 5 d 11.7 mm, bei 7 d 21.4 mm und bei 11 d 34.8 mm (Abb. 36).



**Abbildung 36:** Der Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP3 sowie der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 bewirken keine Verkürzung der Primärwurzellänge. Vergleich der Primärwurzellängen 5, 7 und 11 Tage alter Keimlinge von Col-0 (grün), homozygoten *atcep1 ko* (blau), homozygoten *atcep3 ko* (rot) und homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* (lila). Der Stichprobenumfang für jeden Genotyp umfasst 120 ausgemessene Primärwurzeln. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Länge der Primärwurzeln und diese ist oberhalb der Säulen in Millimeter (mm) angegeben. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung. Dieselben Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen hin. Die Ergebnisse wurden in einem weiteren unabhängigen Experiment bestätigt (biologisches Replikat).

### **2.4.3. Die Restaktivität von AtCEP2 führt zu einer dosiert geringeren Verkürzung der Primärwurzel aufgrund der dosiert geringeren Reduktion der Zelllängen in der Elongationszone**

#### 2.4.3.1. Dosierte geringere Verkürzung der Primärwurzeln in homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Pflanzen

Die homozygoten Pflanzen der zwei unabhängigen Linien *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 weisen in der qRT-PCR eine *AtCEP2* Expression von 0.5 % (Linie 2.21) bzw. 2 % (Linie 3.14) gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen auf (s. Kap. 2.1.3.).

Beim Vergleich der Primärwurzellängen zeigen die 7 d alten Keimlinge der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linien den Entwicklungs-Phänotyp einer deutlich verkürzten Primärwurzel im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Allerdings weist die Primärwurzel von homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Keimlingen verglichen mit der Primärwurzel von homozygoten *atcep2 ko* Keimlingen eine dosiert geringere Verkürzung gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen auf (Abb. 25).

Die statistische Auswertung zeigt, dass die homozygote *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 bei 5, 7 und 11 d alten Keimlingen eine signifikant kürzere Primärwurzel als Col-0 Wildtyppflanzen aufweisen. Die Länge der Primärwurzel von homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 beträgt bei 5 d 7.8 mm, bei 7 d 15.0 mm und bei 11 d 24.4 mm gegenüber der Primärwurzellänge von Col-0 Wildtyppflanzen mit 11.7 mm, 21.4 mm und 34.6 mm. Die Länge der Primärwurzel von homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 3.14 ist bei 5 d 8.5 mm, bei 7 d 16.1 mm und bei 11 d 25.9 mm. Beide homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linien sind darüber hinaus bei allen drei gemessenen Zeitpunkten auch zueinander in der Länge ihrer Primärwurzel signifikant verschieden (Abb. 26A).

Generell entspricht die Länge der Primärwurzel von homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 ca. 70 % und von der Linie 3.14 ca. 75 % der Primärwurzellänge von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 26B).

### 2.4.3.2. Dosierte geringere Verkürzung der „lateral root cap“ aufgrund der dosiert geringeren Reduktion ihrer Zelllängen in homozygoten *atcep triple-ko/kd* Pflanzen

Die statistische Auswertung zeigt, dass die homozygoten Keimlinge der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 mit 196.9  $\mu\text{m}$  und 204.3  $\mu\text{m}$  gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 289.7  $\mu\text{m}$  eine signifikant kürzere Länge der LRC aufweisen (Abb. 28A linkes Diagramm). Die Länge der LRC wird als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur „PCD Site I“ definiert (Abb. 27). Prozentual gesehen entsprechen die Längen der LRC von homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 68 % und von der Linie 3.14 71 % gegenüber der LRC-Länge von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 28B).

Beim Vergleich der Breite der LRC, die auf Höhe der „PCD Site I“ gemessen wird (Abb. 27), sind die Pflanzen der homozygoten *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und der Linie 3.14 mit 143.3  $\mu\text{m}$  und 141.9  $\mu\text{m}$  zueinander und gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 142.7  $\mu\text{m}$  nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 28A rechtes Diagramm).

Beim Vergleich der Zelllänge der längsten Zellen am oberen Ende der LRC auf Höhe der „PCD Site I“ Probidiumiodid-gefärbter Primärwurzeln erkennt man, dass in homozygoten *atcep triple-ko/kd* Pflanzen die längsten Zellen mit ca. 60-75  $\mu\text{m}$  Länge kürzer sind als in Col-0 Wildtyppflanzen mit ca. 75-90  $\mu\text{m}$  Länge (Abb. 29 Doppelpfeile). Im Vergleich zur Verkürzung der Zelllängen in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen ist diese jedoch dosiert geringer. Darüber hinaus sind in Pflanzen der homozygoten *atcep triple-ko/kd* ebenso wie in Col-0 Wildtyppflanzen auf Höhe der „PCD Site I“ Probidiumiodid-gefärbte Zellkerne erkennbar, da aufgrund des beginnenden Zelltods die Zellmembranen dieser Zellen perforiert sind (Abb. 29 Pfeilspitzen). Diese Färbungen der Zellkerne bedeuten, dass der PCD in der „PCD Site I“ von homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* stattfindet und nicht gestört ist.

Die statistische Auswertung der Zelllängen der 3-5 längsten Zellen am oberen Ende der LRC zeigt, dass in den Pflanzen der homozygoten *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 die Zelllängen mit 67.1  $\mu\text{m}$  und 69.3  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 83.9  $\mu\text{m}$  signifikant kürzer sind (Abb. 30A linkes Diagramm).

Die Zellbreiten der 3-5 längsten Zellen in der LRC in homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 sind dagegen mit 9.7  $\mu\text{m}$  und 9.8  $\mu\text{m}$  nicht signifikant verschieden zu 9.8  $\mu\text{m}$  in Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 30A rechtes Diagramm). Prozentual gesehen entsprechen die Zelllängen der 3-5 längsten Zellen in der LRC von homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 80 % und von der Linie 3.14 83 % gegenüber der Zelllänge der 3-5 längsten Zellen in der LRC von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 30B).



Für die statistische Auswertung werden die Längen der meristematischen Zone, die als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur ersten elongierten Epidermiszelle definiert wird (Abb. 27), analysiert. Diese sind in homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 mit 201.2  $\mu\text{m}$  und 206.3  $\mu\text{m}$  im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 296.2  $\mu\text{m}$  signifikant kürzer (Abb. 31A). Die Längen der meristematischen Zone von homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 entsprechen 68 % und 70 % der Länge der meristematischen Zone von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 31B).

### 2.4.3.3. Der Programmierte Zelltod findet in der „lateral root cap“ von homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Keimlingen statt

Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* zeigen keine Störung des PCD und eine normale Entwicklung der LRC. Dies ist daran zu erkennen, dass erstens sowohl die „PCD Site I“ als auch die „PCD Site II“ in Col-0 Wildtyppflanzen und in Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* jeweils ungefähr gleich lang sind (Abb 32). Zweitens sind beide „PCD Sites“ in beiden Genotypen als klare Zonen mit Zellen, in denen neben der Zellwand auch der Zellkern Probidiumiodid-gefärbt ist, erkennbar. Dies bedeutet, dass aufgrund des beginnenden Zelltods die Zellmembranen dieser Zellen perforiert sind und somit der PCD stattfindet und nicht gestört ist (Abb. 32 Pfeilspitzen).

Die „PCD Site I“ ist in homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* lediglich in Richtung Wurzelspitze verschoben (Abb. 32). Diese Verschiebung ist durch die Verkürzung der LRC aufgrund reduzierter Zelllängen bedingt.

2.4.3.4. Dosierte geringere Verkürzung der Zelllängen und dosiert geringere Abnahme der Zellbreite in der Elongationszone in homozygoten *atcep triple-ko/kd* Pflanzen

Es werden die Zelllängen der längsten Trichoblasten (elongierte Zellen, die Wurzelhaare ausbilden) in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ Probidiumiodid-gefärbter Primärwurzeln ausgewertet. Es fällt auf, dass die längsten Trichoblasten in homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* mit ca. 135-155 µm Länge deutlich kürzer sind als in Col-0 Wildtyppflanzen mit ca. 180-200 µm Länge (Abb. 33 Doppelpfeile). Im Vergleich zur Verkürzung der Zelllängen in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen ist diese jedoch dosiert geringer.

Die statistische Auswertung zeigt, dass die Zelllängen der drei längsten Trichoblasten in der Elongationszone am Übergang der „rapid elongation zone“ zur „late elongation zone“ in homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 mit 140.1 µm und 145.3 µm im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen mit 193.3 µm signifikant kürzer sind (Abb. 34A linkes Diagramm). Prozentual gesehen entsprechen die Zelllängen der drei längsten Trichoblasten in homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 73 % und in der Linie 3.14 75 % gegenüber der Zelllänge der drei längsten Trichoblasten in Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 34B).

Zudem sind die Zellbreiten der drei längsten Trichoblasten in der Elongationszone von homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 mit 16.3 µm und 16.5 µm signifikant schmaler gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 18.4 µm (Abb. 34A rechtes Diagramm). Die Zellbreiten der drei längsten Trichoblasten in den Pflanzen der homozygoten *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 entsprechen 88 % und 89 % der Zellbreite der drei längsten Trichoblasten in Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 34B).

Für die statistische Auswertung der Breite der Elongationszone wird auf Höhe der längsten Trichoblasten gemessen. Hier weisen homozygote Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 mit 127.7 µm und 130.2 µm gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen mit 143.9 µm signifikant schmalere Elongationszonen auf (Abb. 35A). Prozentual gesehen entsprechen die Breiten der Elongationszone in den homozygoten Pflanzen der *atcep triple-ko/kd* Linie 2.21 89 % und in der Linie 3.14 90 % der Breite der Elongationszone von Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 35B).

#### **2.4.4. Das Ansäuern des ex vivo isolierten Pro-Enzyms von AtCEP2 führt zur Maturierung von AtCEP2 und zur gleichzeitigen Abspaltung von mCherry**

In früheren Arbeiten der AG Gietl konnte bereits gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivierung von AtCEP2 pH-abhängig ist. Das enzymatisch inaktive Pro-Enzym von AtCEP2 maturiert bei einem pH-Wert von 6.5 oder saurer in die entsprechende enzymatisch aktive reife Untereinheit (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Daraus ergibt sich die Frage, ob im Zuge dieser pH-abhängigen Maturierung bei einem funktionellen AtCEP2-Reporterprotein (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) eine gleichzeitige Abspaltung des Fluoreszenzproteins mCherry stattfindet oder ob die Spaltstelle N-terminal zu mCherry sitzt. Eine gleichzeitige Abspaltung des Fluoreszenzproteins mCherry würde bedeuten, dass keine Visualisierung der maturierten Untereinheit von AtCEP2 am CLSM möglich ist.

Hierfür wird ein Proteinextrakt von 7 d alten Keimlingen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, mit Hilfe einer  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix immunpräzipitiert und anschließend bei einem pH-Wert von 7.5 sowie 4.0 inkubiert. Nach der Aufarbeitung werden die entsprechenden  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrizes und deren Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels Western-Blot Analyse durch Dekorierung mit verschiedenen Antikörpern analysiert. Der Antikörper  $\alpha$ -HA (Abb. 37A) erkennt den dreifachen Hämagglutinin-Tag des Fusionsproteins pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL, der Antikörper  $\alpha$ -RFP (Abb. 37B) detektiert das Fluoreszenzprotein mCherry und der Antikörper  $\alpha$ -AtCEP mature subunit (Abb. 37C) ist gegen die maturierte Untereinheit von AtCEP2 gerichtet. Zusätzlich wird nach der SDS-PAGE eine Silberfärbung durchgeführt (Abb. 37D).

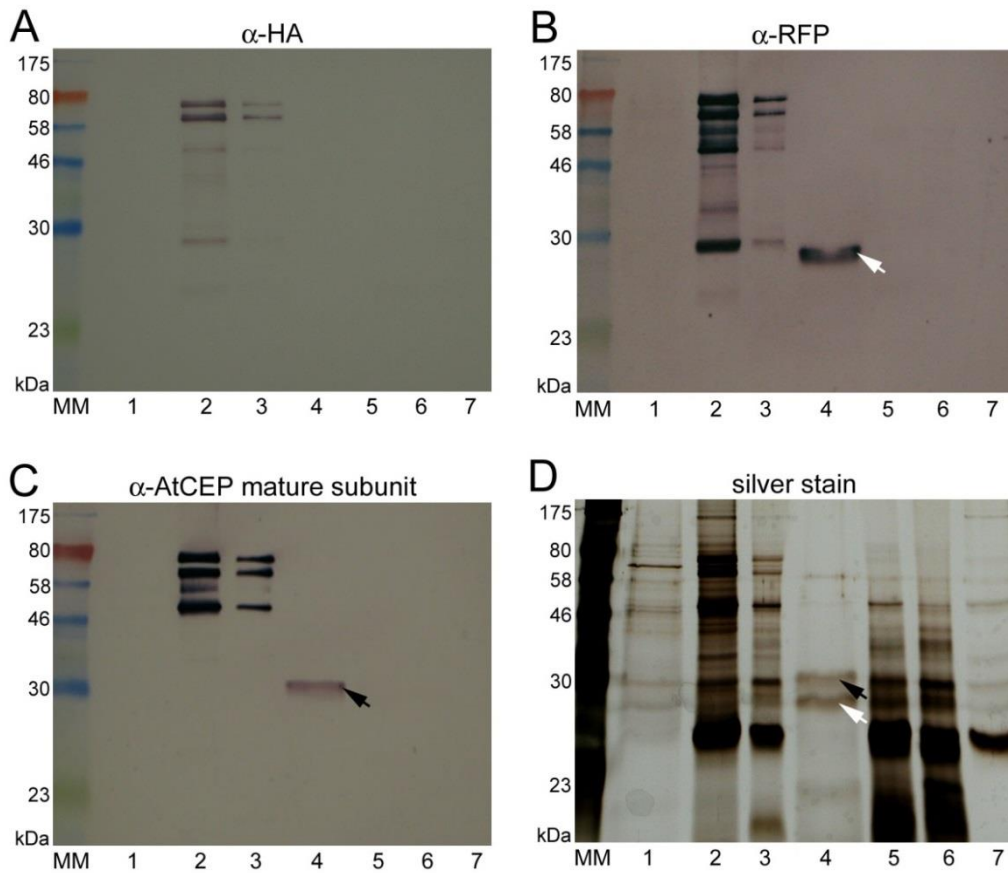
Alle verwendeten Antikörper detektieren im Überstand der Immunpräzipitation bei einem pH-Wert von 7.5 kein Protein. Dies bedeutet, dass das Protein vollständig an der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix bindet (Abb. 37A-C Reihe 1). Nach der Inkubation der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix bei 95 °C werden dagegen von allen drei Antikörpern zwei distinkte Proteinbanden mit einem Molekulargewicht zwischen 58 und 80 kDa erkannt (Abb. 37A-C Reihe 2). Diese stellen das Pro-Enzym von AtCEP2 pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL mit einer kalkulierten Molekularmasse von 70.5 kDa in vermutlich zwei verschiedenen Konformationen dar. Somit ist das Pro-Enzym von AtCEP2 von der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix gelöst worden und in den Überstand übergegangen. Darüber hinaus werden von den Antikörpern  $\alpha$ -RFP und  $\alpha$ -AtCEP mature subunit zwei weitere Proteinbanden mit einem Molekulargewicht zwischen 46 und 58 kDa erkannt. In diesem Bereich wird nur eine Proteinbande vom Antikörper  $\alpha$ -HA detektiert (Abb. 37A-C Reihe 2). Diese stellen möglicherweise das 3xHA-mCherry-AtCEP2 Protein ohne die Pro-Sequenz und dem

ER-Rückhaltesignal „KDEL“ mit einer kalkulierten Molekularmasse von 57.2 kDa in vermutlich zwei verschiedenen Konformationen dar. Dass diese zwei Proteinbanden von  $\alpha$ -RFP und  $\alpha$ -AtCEP mature subunit sehr stark und von  $\alpha$ -HA nur eine Proteinbande sehr schwach detektiert wird, deutet darauf hin, dass vom 3xHA-mCherry-AtCEP2 Protein eventuell auch der Hauptteil des dreifachen Hämagglutinin-Tags abgespalten wurde.

Die Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa wird vom Antikörper  $\alpha$ -HA schwach, vom Antikörper  $\alpha$ -RFP stark und vom Antikörper  $\alpha$ -AtCEP mature subunit nicht detektiert. Diese stellt vermutlich das 3xHA-mCherry Protein mit einer kalkulierten Molekularmasse von 32.8 kDa dar (Abb. 37A-C Reihe 2). Geringe Mengen dieser drei Hämagglutinin-markierten Proteine konnten nicht gelöst werden und bleiben an der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix hängen (Abb. 37A-D Reihe 3). Die maturierte Form von AtCEP2 wird bei einem pH-Wert von 7.5 vom Antikörper  $\alpha$ -AtCEP mature subunit nicht detektiert.

Im Gegensatz dazu sind bei der Immunpräzipitation mit einem pH-Wert von 4.0 insgesamt nur zwei Proteinbanden mit den verwendeten Antikörpern detektierbar (Abb. 37A-C Reihe 4-6). Die detektierten Proteine befinden sich ausschließlich im Überstand (Abb. 37A-C Reihe 4). Eine Proteinbande, die ein Molekulargewicht von ca. 30 kDa aufweist, wird vom Antikörper  $\alpha$ -AtCEP mature subunit erkannt und stellt die maturierte Untereinheit von AtCEP2 dar (Abb. 37C, D Reihe 4 schwarzer Pfeil). Die andere Proteinbande, die ein Molekulargewicht von etwas weniger als 30 kDa besitzt, wird vom Antikörper  $\alpha$ -RFP detektiert. Diese Proteinbande ist das im Zuge der Maturierung abgespaltene Fluoreszenzprotein mCherry (Abb. 37B, D Reihe 4 weißer Pfeil). Vom Antikörper  $\alpha$ -HA werden dagegen keine Proteinbanden erfasst (Abb. 37A Reihe 4-6). Dies bedeutet, dass bei einem pH-Wert von 4.0 das Fusionsprotein pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL maturiert, indem es sich durch Selbstspaltung von der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix löst und in Folge dessen in den Überstand übergeht. Hierbei wird auch das Fluoreszenzprotein mCherry (Abb. 37B, D Reihe 4 weißer Pfeil) von der maturierten AtCEP2-Untereinheit (Abb. 37C, D Reihe 4 schwarzer Pfeil) durch Ansäuern abgespalten. Diese Spaltung bei pH 4.0 zwischen dem Fluoreszenzprotein mCherry und der maturierten AtCEP2-Untereinheit kann zusätzlich durch eine Silberfärbung gezeigt werden (Abb. 37 D Reihe 4 schwarzer und weißer Pfeil).

Aufgrund der Tatsache, dass bei der Maturierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 auch das Fluoreszenzprotein mCherry abgespalten wird, ist eine Visualisierung der maturierten Form von AtCEP2 am CLSM nicht möglich. Somit kann ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL am CLSM untersucht werden. Die Abspaltung des Fluoreszenzproteins mCherry könnte hingegen der Grund für die Funktionalität des AtCEP2-Reporterproteins sein.



**Abbildung 37: Maturierung des Fusionsprotein pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL durch Ansäuern führt zur Abspaltung der Pro-Sequenz und zur Spaltung zwischen dem Fluoreszenzprotein mCherry (weißer Pfeil) und der maturierten Untereinheit von AtCEP2 (schwarzer Pfeil).** Pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL wird mittels einer  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix bei einem pH Wert von 7.5 aus einem Proteinextrakt von 7 d alten Keimlingen immunpräzipitiert. Nach dem Waschen der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix, wird diese mit einem Puffer bei pH 7.5 (Reihe 1-3) oder pH 4.0 (Reihe 4-6) bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand anschließend abzentrifugiert (Reihe 1, 4). Die  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix wird daraufhin bei 95 °C inkubiert und der Überstand (Reihe 3, 5) erneut von der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix (Reihe 4, 6) abzentrifugiert. Als Kontrolle wird zusätzlich die  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix ohne Proteinextrakt nur mit Puffer bei pH 4.0 inkubiert (Reihe 7). Die  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix und die Überstände werden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse durch verschiedene Antikörper detektiert (A-C). Zusätzlich wird nach der SDS-PAGE eine Silberfärbung durchgeführt (D). MM = Molmarker; kDa = Kilodalton. Geänderte Darstellung aus Hierl et al., 2014 (s. 7.1.).

#### **2.4.5. Akkumulierung von AtCEP2 und Speicherung als Pro-Enzym am oberen Ende der „lateral root cap“: Lokalisation im Cytoplasma-Saum und nicht in der Zellwand**

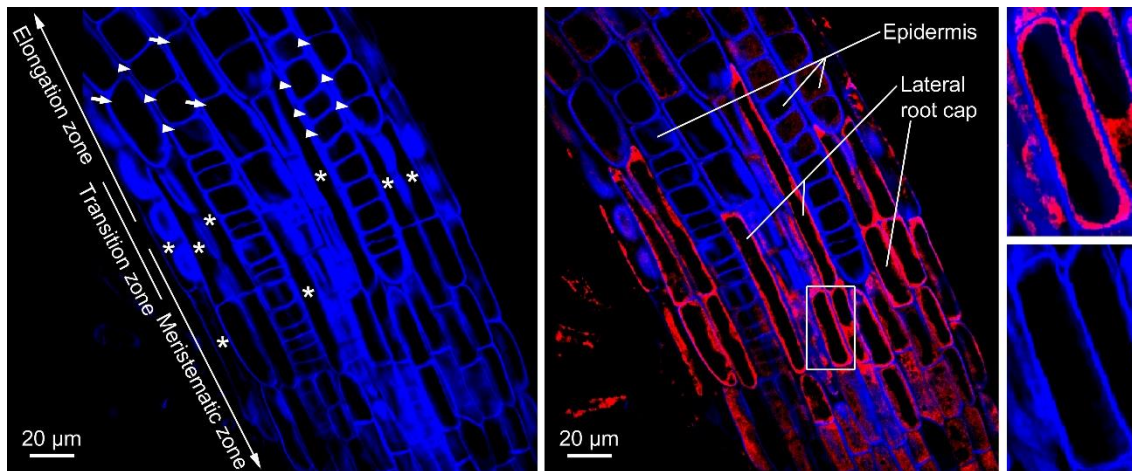
7 d alte Keimlinge, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, zeigen im vegetativen Gewebe unter anderem in der Wurzelspitze eine sehr starke und distinkte Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 in Form eines „two band patterns“ in der Columella sowie am unteren und oberen Ende der LRC (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Es werden die Wurzeln von 7 d alten Keimlingen dieser Reporterpflanzen am oberen Ende der LRC am CLSM untersucht, um die intrazelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 zu analysieren. Hierfür werden die 7 d alten Keimlingen zur Visualisierung der Zellwand mit Calcofluor gefärbt (Abb. 38 blau).

Im Bereich der „Transition zone“ sind sowohl nicht elongierte isodiametrische Epidermiszellen aus der meristematischen Zone (Abb. 38 links Pfeilspitzen) als auch beginnende elongierende Epidermiszellen (Abb. 38 links Pfeile), die den Anfang der Elongationszone definieren, erkennbar. Zudem sind schmale langgestreckte Zellen sichtbar (Abb. 38 links Asteriske). Dies sind kollabierende Zellen am oberen Ende der LRC auf Höhe der „PCD Site I“, die im Moment noch an der darunterliegenden Epidermis anhaften und in Kürze von dieser abschilfern werden.

Am oberen Ende der LRC ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in allen LRC-Zellen akkumuliert. Hierbei ist das Pro-Enzym von AtCEP2 ausschließlich im Cytoplasma-Saum, der die Vakuole umgibt, und nicht in der Zellwand lokalisiert (Abb. 38 Mitte und rechts: rot).

In der Epidermis der meristematischen Zone, der „Transition zone“ und der Elongationszone ist dagegen kein mCherry-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP2 sichtbar. Möglicherweise liegt die Expression des Pro-Enzym von AtCEP2 unterhalb der Nachweisgrenze (Abb. 38).

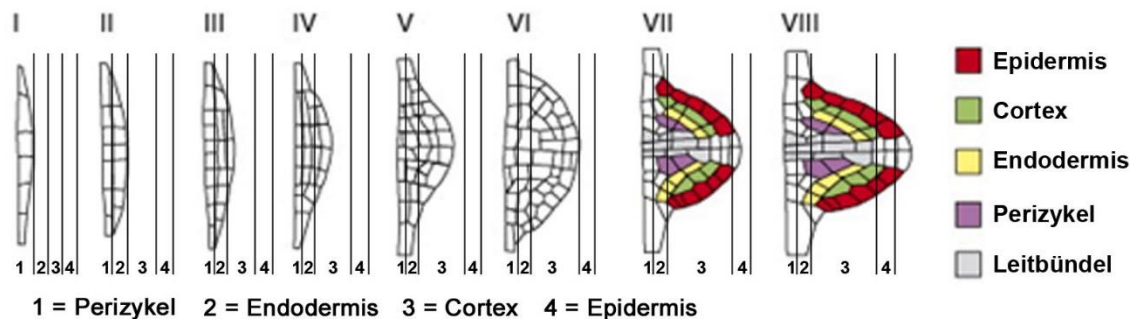


**Abbildung 38:** Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in LRC-Zellen am oberen Ende der LRC in der Wurzel 7 Tage alter Keimlinge. In den Zellen der LRC ist das Pro-Enzym von AtCEP2 im Cytoplasma-Saum und nicht in der Zellwand gespeichert. In der Epidermis der meristematischen Zone, der „Transition zone“ und der Elongationszone ist keine Expression des Pro-Enzym von AtCEP2 detektierbar. Links: Detektion der mit Calcofluor gefärbten Zellwände (blau). Im Bereich der „Transition zone“ sind sowohl nicht elongierte isodiametrische Epidermiszellen aus der meristematischen Zone (Pfeilspitzen) als auch beginnende elongierende Epidermiszellen (Pfeile) zu erkennen. Zudem sind die kollabierenden Zellen am oberen Ende der LRC als schmale langgestreckte Zellen sichtbar (Asteriske). Mitte: Überlagerung der Expression von pro-mCherry-AtCEP2-KDEL (rot) und der Detektion der Zellwände (blau). Rechts: Vergrößerung des im mittleren Bild weiß umrandeten Bereiches. Dargestellt sind 600-fache Vergrößerungen von Calcofluor-gefärbten Wurzelspitzen, die am CLSM aufgenommen wurden. Es sind jeweils 4 Bilder übereinander gelagert worden.

Die subzelluläre Lokalisation von AtCEP2 kann mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers gegen die reife Untereinheit von AtCEP2 in einer „Whole Mount“ Immunlokalisierung untersucht werden. Diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung und die anschließende Mikroskopie wurde in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller) durchgeführt (s. Anh. 6.3.).

In der Wurzelspitze sind AtCEP2-Signale in verschiedenen Zellwänden detektierbar (s. Abb. 50). Einerseits sind AtCEP2-Signale in der Zellwand von LRC-Zellen am oberen Ende der LRC kurz vor dem Übergang zur Elongationszone lokalisiert (s. Abb. 50A, D-F). Andererseits sind zudem AtCEP2-Signale in der Zellwand der Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone, der „rapid elongation zone“, detektierbar (s. Abb. 50A-D).

### 2.4.6. Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in einer gebogenen Epidermiszelle an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurz-Primordiums



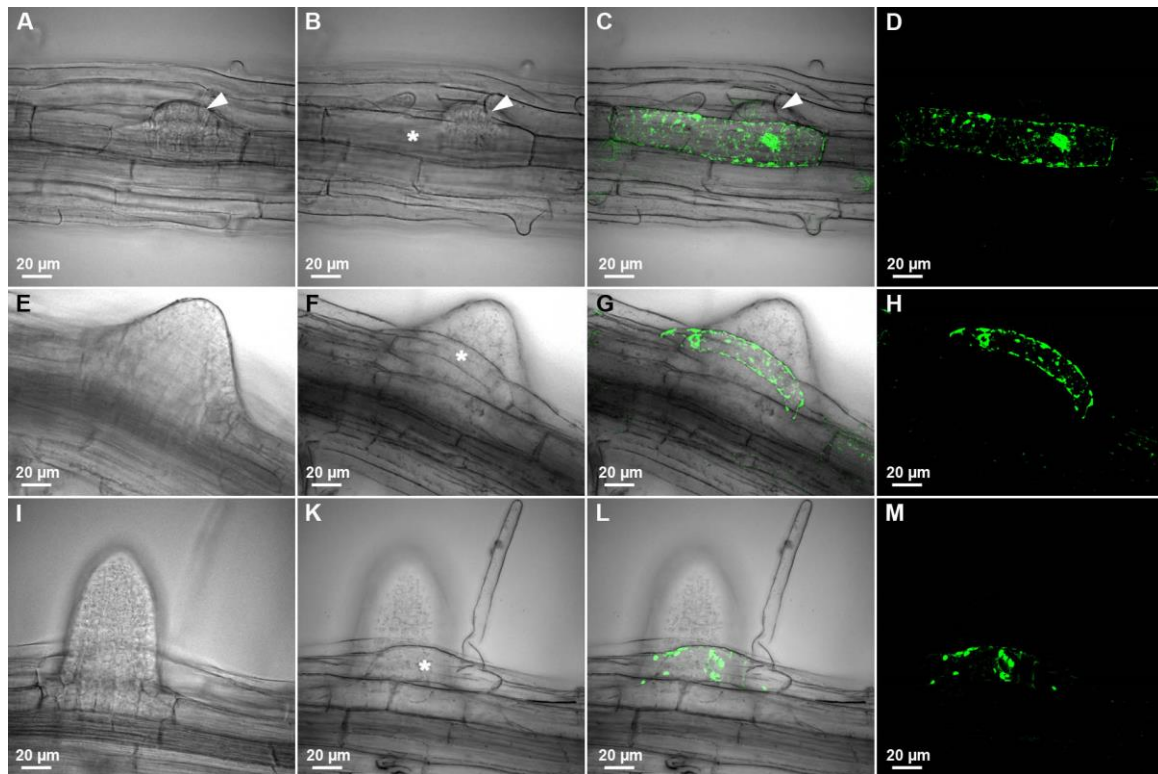
**Abbildung 39** (entspricht Abb. 2 und ist an dieser Stelle zur Erleichterung des Lesers noch einmal eingefügt): **Übersicht der Entwicklungsstadien I-VIII beim endogenen Austritt des Seitenwurz-Primordiums durch die überlagernden Schichten (Endodermis, Cortex, Epidermis) in *Arabidopsis*.** Im Stadium I entsteht durch antikline Zellteilung ein 1-schichtiges Seitenwurz-Primordium. Durch eine anschließende perikline Zellteilung entwickelt sich ein 2-schichtiges Seitenwurz-Primordium, mit einer inneren und einer äußeren Zellschicht (Stadium II). Durch weitere perikline Zellteilungen (Stadium III, IV und VI) und antikline Zellteilungen (Stadium V und VII) entsteht im Stadium VII ein Kuppel-förmiges Seitenwurz-Primordium. Dieses ist bereits in Leitbündel (grau), Perizykel (lila), Endodermis (gelb), Cortex (grün) und Epidermis (rot) differenziert. Im Stadium VIII tritt das Seitenwurz-Primordium durch Auseinanderweichen der Epidermis hervor (Malamy and Benfey, 1997). Geänderte Darstellung der Übersicht nach Péret et al., 2009a.

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* im vegetativen Gewebe werden 10 d alte homozygote *atcep1 ko* Keimlinge, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) exprimieren (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), analysiert. Diese homozygote transgene Reporterlinie ist aufgrund der Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins vergleichbar mit Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 8). Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* kann am CLSM wahrscheinlich ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL und nicht die maturierte Form von AtCEP1 visualisiert werden. Dies liegt daran, dass im Zuge der Maturierung von AtCEP1, entsprechend der Maturierung von AtCEP2 (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)), wahrscheinlich auch das Fluoreszenzprotein EGFP von der maturierten Untereinheit abgespalten wird.

Vor dem Entwicklungsstadium VII ist keine Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in der Epidermis festzustellen (nicht dargestellt). Ab dem Entwicklungsstadium VII ist das Pro-Enzym von AtCEP1 in der Wurzel sehr distinkt in einer Epidermiszelle lokalisiert. Genau neben dieser Epidermiszelle tritt das neugebildete Seitenwurz-Primordium endogen aus (Abb. 40). Im Stadium VII der Seitenwurzentwicklung befindet sich das neugebildete Seitenwurz-Primordium in der Epidermis und ihr Austritt durch diese steht unmittelbar bevor (Abb. 40A, B, C: weiße Pfeilspitzen; s. Abb. 39). In dieser



Epidermiszelle, die für den endogenen Austritt des Seitenwurz-Primordiums auseinanderweichen muss, ist das Pro-Enzym von AtCEP1 akkumuliert (Abb. 40B weißer Asterisk; C, D). Auch nach dem endogenen Austritt des Seitenwurz-Primordiums durch die Epidermis zeigt die auseinandergewichene Epidermiszelle eine konsistente Expression von Pro-AtCEP1 sowohl im Entwicklungsstadium VIII (Abb. 40E-H; s. Abb. 39) als auch im Stadium LR der Seitenwurzentwicklung (Abb. 40I-M; s. Abb. 39), in dem das Seitenwurz-Primordium bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten ist und als adulte Seitenwurz definiert wird. Hierbei ist zu erkennen, dass das Pro-Enzym von AtCEP1 in einer stark gebogenen Epidermiszelle lokalisiert ist. Diese Biegung ist durch die mechanischen Kräfte während der Zellseparation im Zuge der Gewebe-Remodellierung entstanden.



**Abbildung 40: Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in einer (weiße Asteriske) Epidermiszelle, die für den endogenen Austritt des Seitenwurz-Primordiums auseinanderweichen muss, im Entwicklungsstadium VII (A-D) und VIII (E-H) sowie im Entwicklungsstadium LR (I-M).** Dargestellt sind neugebildete Seitenwurz-Primordia von verschiedenen 10 Tage alten homozygoten *atcep1 ko* Keimlingen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL*) exprimieren. Es sind 600-fache Vergrößerungen dargestellt. Die Aufnahmen wurden am CLSM getätigt. Weiße Pfeilspitzen in A-C markieren das neugebildete Seitenwurz-Primordium unmittelbar vor dem Austritt durch die Epidermis. Weiße Asteriske in B, F und K zeigen die Epidermiszelle (teilweise stark gebogen), in der Pro-AtCEP1 akkumuliert und die für den endogenen Austritt des neugebildeten Seitenwurz-Primordiums weichen muss. In A, E und I ist die Ebene des Seitenwurz-Primordiums fokussiert. In B-D, F-H und K-M ist die Ebene der Epidermis fokussiert. Für die entsprechenden Entwicklungsstadien der Seitenwurz-Primordia siehe Abb. 39. Entwicklungsstadium LR: Das Seitenwurz-Primordium ist bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten und wird als adulte Seitenwurz (lateral root, LR) bezeichnet. Es weist das charakteristische Zellmuster 10-16-10 (linke und rechte Seite der Epidermis bestehen aus jeweils zehn Zellen; Spitze der Epidermis wird aus 16 Zellen gebildet) auf (Malamy and Benfey, 1997).

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP2 *in vivo* im vegetativen Gewebe werden 10 d alte homozygote Keimlinge, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, analysiert (s. Kap. 2.1.1.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Mit dem verwendeten CLSM Fluoview FV 1000 kann keine Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums nachgewiesen werden. In Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) kann dagegen eine epidermale Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP2 an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums gezeigt werden. Diese Mikroskopie führte Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) am CLSM Leica SP8 durch (s. Anh. 6.2.).

#### **2.4.7. Der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 bewirkt eine zeitliche Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten**

Aufgrund der Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 und AtCEP2 wird darauffolgend untersucht, ob AtCEP eine Funktion während des endogenen Austritts des Seitenwurzel-Primordiums besitzen.

Dies wird in einem sogenannten „bending assay“ analysiert. Hierbei wird durch Drehung der entsprechenden 7-10 d alten Keimlinge um 90 Grad die synchrone Bildung eines neuen Seitenwurzel-Primordiums induziert. Somit weisen alle analysierten Seitenwurzel-Primordia dasselbe Alter auf. Es wird nach 49 Stunden quantitativ ausgewertet, in welcher Zellschicht sich das Seitenwurzel-Primordium befindet (s. Abb. 39). Nach dieser Zeit sind die meisten Seitenwurzel-Primordia gerade am Austritt durch die Epidermis (Abb. 41 Stadium VII) oder bereits gerade ausgetreten (Abb. 41 Stadium VIII). Alle Seitenwurzel-Primordia, die noch nicht in die Epidermis eingedrungen sind und sich in früheren Entwicklungsstadien befinden werden zusammengefasst (Abb. 41 Stadium I-VI). Des Weiteren werden alle Seitenwurzel-Primordia, die bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten sind ebenfalls zusammengefasst und als adulte Seitenwurzeln (lateral root, LR) definiert (Abb. 41 Stadium LR). Ein Seitenwurzel-Primordium wird als adulte Seitenwurzel bezeichnet, wenn es das charakteristische Zellmuster 10-16-10 (linke und rechte Seite der Epidermis bestehen aus jeweils zehn Zellen; Spitze der Epidermis wird aus 16 Zellen gebildet) aufweist (Malamy and Benfey, 1997).

Die Entwicklung der Seitenwurzel-Primordia werden in den homozygoten Pflanzen der entsprechenden Single-Mutanten von *atcep1 ko*, *atcep2 ko* und *atcep3 ko* analysiert. Darüber hinaus werden homozygoten Pflanzen der *atcep3 x atcep1 ko* sowie der *atcep\_triple-ko/kd* untersucht. Als Vergleich werden Col-0 Wildtyppflanzen verwendet.

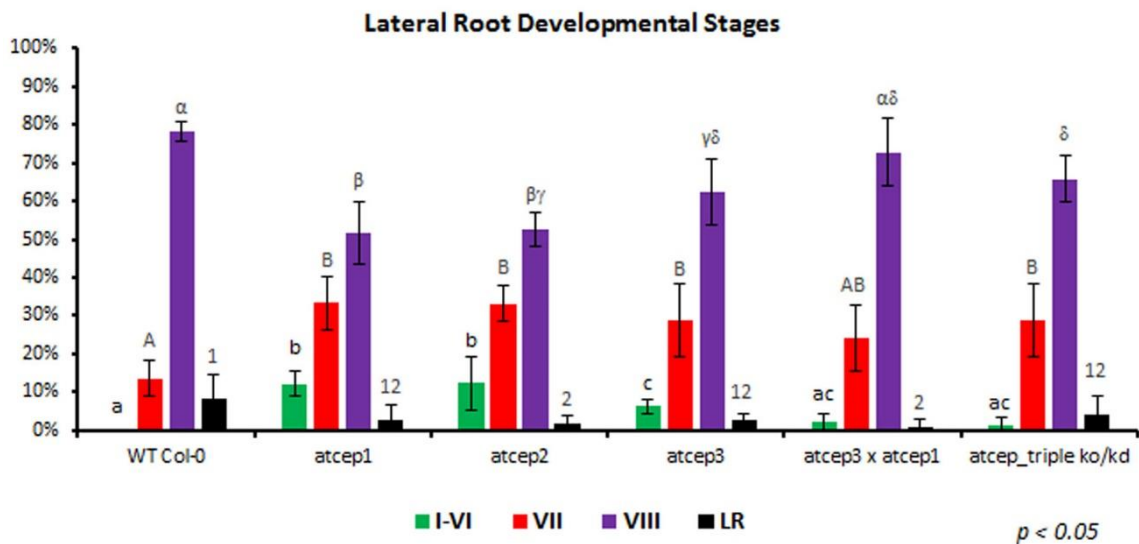
Der jeweilige Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 führt zum quantitativen Entwicklungs-Phänotyp der stärksten zeitlichen Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen (Abb. 41).

Der Doppelverlust von AtCEP1 und AtCEP3 bewirkt ebenfalls einen verlangsamten Austritt des Seitenwurzel-Primordiums. Dieser verlangsamte Austritt scheint im Vergleich zu den entsprechenden Single-Mutanten von AtCEP jedoch schneller zu sein und sich der Austrittsgeschwindigkeit in Col-0 Wildtyppflanzen anzunähern.

Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* (*atcep\_triple-ko/kd*) verursacht ebenso einen verlangsamten Austritt des Seitenwurzel-Primordiums. Dieser verlangsamte Austritt scheint im Vergleich zu den entsprechenden

Single-Mutanten von AtCEP etwas schneller, im Vergleich zur Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* jedoch etwas langsamer zu verlaufen.

Somit führen weder der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 noch der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* zu einem additiven Entwicklungs-Phänotyp, der sich in einem noch langsameren Austritt der Seitenwurzel-Primordia als bei einem Einfach-Verlust von AtCEP äußert. Im Gegenteil, der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* bewirkt einen schnelleren verlangsamtten Austritt. Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 führt zu einem noch schnelleren verlangsamtten Austritt der Seitenwurzel-Primordia, der sich bereits der Austrittsgeschwindigkeit in Col-0 Wildtyppflanzen anzunähern scheint.



**Abbildung 41: Vergleich der Entwicklungsstadien der Seitenwurzel-Primordia, in welcher Zellschicht diese lokalisiert sind: Der jeweilige Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 führt zum quantitativen Entwicklungs-Phänotyp der stärksten zeitlichen Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten. Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* bewirkt einen schnelleren verlangsamtten Austritt. Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 führt zu einem noch schnelleren verlangsamtten Austritt der Seitenwurzel-Primordia, der sich bereits der Austrittsgeschwindigkeit in Col-0 Wildtyppflanzen anzunähern scheint.** Es werden homozygote Pflanzen der *atcep1 ko*, *atcep2 ko*, *atcep3 ko*, *atcep3 x atcep1 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* in einem „bending assay“ analysiert. In diesem wird durch Drehung der entsprechenden 7-10 d alten Keimlinge um 90 Grad die synchrone Bildung eines neuen Seitenwurzel-Primordiums induziert. Die Säulen repräsentieren die durchschnittliche Anzahl an Seitenwurzel-Primordia aus vier unabhängigen Experimenten (biologische Replika) im jeweiligen Entwicklungsstadium in Prozent. Stichprobenumfang der vier unabhängigen Experimente: WT Col-0: 15, 20, 18, 20; *atcep1 ko*: 26, 24, 30, 27; *atcep2 ko*: 25, 29, 26, 28; *atcep3 ko*: 26, 30, 29, 28; *atcep3 x atcep1 ko*: 22, 22, 27, 26; *atcep\_triple-ko/kd*: 21, 24, 22, 26. Des Weiteren zeigen die Fehlerbalken die Standardabweichung an. Unterschiedliche Buchstaben oberhalb der Säulen weisen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test auf statistisch signifikant unterschiedliche Gruppen hin. Dieselben Buchstaben dagegen zeigen entsprechend dem ANOVA- und Duncan Test statistisch nicht signifikant verschiedene Gruppen. Entwicklungsstadium I-VI: Zusammenfassung aller Seitenwurzel-Primordia, die noch nicht in die Epidermis eingedrungen sind. Entwicklungsstadium VII: Seitenwurzel-Primordium tritt gerade durch die Epidermis aus. Entwicklungsstadium VIII: Seitenwurzel-Primordium ist gerade bereits durch die Epidermis ausgetreten. Entwicklungsstadium LR: Zusammenfassung aller Seitenwurzel-Primordia, die bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten sind. Ab dem charakteristischen Zellmuster 10-16-10 (linke und rechte Seite der Epidermis bestehen aus jeweils zehn Zellen; Spitze der Epidermis wird aus 16 Zellen gebildet) werden diese als adulte Seitenwurzeln (lateral root, LR) bezeichnet (Malamy and Benfey, 1997). Siehe hierfür auch Abb. 39.

### Entwicklungsstadium I-VI (s. Abb. 41 grün): Perizykel, Endodermis und Cortex

Col-0 Wildtyppflanzen besitzen in diesem Stadium keine Seitenwurzel-Primordia. Dagegen bewirkt der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 in den entsprechenden homozygoten Single-Mutanten, dass diese mit 6-12 % signifikant mehr Seitenwurzel-Primordia aufweisen als Col-0 Wildtyppflanzen. Homozygote Pflanzen der *atcep3 x atcep1 ko* zeigen mit 2-3 % keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl der Seitenwurzel-Primordia gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen und homozygoten *atcep3 ko* Pflanzen. Ebenso besitzen homozygote Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* mit 1-2 % fast keine Seitenwurzel-Primordia. Sie sind in ihrer Entwicklung nicht signifikant verschieden zu Col-0 Wildtyppflanzen sowie zu homozygoten Pflanzen der *atcep3 ko* und der *atcep3 x atcep1 ko*.

### Entwicklungsstadium VII (s. Abb. 41 rot): Epidermis

Col-0 Wildtyppflanzen zeigen in diesem Stadium 14 % Seitenwurzel-Primordia. Der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 bewirkt in den entsprechenden homozygoten Single-Mutanten, dass diese mit 29-34 % signifikant mehr Seitenwurzel-Primordia als Col-0 Wildtyppflanzen aufweisen. Somit führt der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 zu der doppelten Anzahl an Seitenwurzel-Primordia in der epidermalen Zellschicht. Ebenso zeigen homozygote Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* mit 29 % signifikant mehr Seitenwurzel-Primordia als Col-0 Wildtyppflanzen. Homozygote Pflanzen der *atcep3 x atcep1 ko* weisen mit 24 % keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl an Seitenwurzel-Primordia gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen auf. Diese Doppelmutante ist ebenso gegenüber den homozygoten Pflanzen der drei Single-Mutanten und gegenüber den homozygoten Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* nicht signifikant verschieden in ihrer Anzahl an Seitenwurzel-Primordia.

### Entwicklungsstadium VIII (s. Abb. 41 lila): Austritt aus der Epidermis

In Col-0 Wildtyppflanzen sind 78 % der Seitenwurzel-Primordia bereits aus der Epidermis ausgetreten. Im Gegensatz dazu führt der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 in den entsprechenden homozygoten Single-Mutanten dazu, dass diese mit 52-63 % signifikant weniger Seitenwurzel-Primordia als Col-0 Wildtyppflanzen aufweisen. Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 bewirkt in homozygoten Pflanzen der *atcep3 x atcep1 ko*, dass diese eine Anzahl von 73 % an Seitenwurzel-Primordia in diesem Stadium zeigen. Diese homozygoten Pflanzen der Doppel-Mutante sind gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen, homozygoten Pflanzen der *atcep3 ko* sowie der *atcep\_triple-ko/kd* nicht signifikant verschieden. Homozygote Pflanzen der

*atcep\_triple-ko/kd* sind mit 66 % an Seitenwurzel-Primordia darüber hinaus nicht signifikant different zu homozygoten *atcep3 ko* Pflanzen.

### Entwicklungsstadium LR (s. Abb. 41 schwarz): adulte Seitenwurzel

Col-0 Wildtyppflanzen weisen in diesem Stadium 8 % Seitenwurzel-Primordia auf. Homozygote Pflanzen der *atcep2 ko* sowie der *atcep3 x atcep1 ko* sind mit 2 % bzw. 1 % Seitenwurzel-Primordia signifikant verschieden zu Col-0 Wildtyppflanzen. Homozygote Pflanzen der *atcep1 ko* (3 %), *atcep3 ko* (2 %) und *atcep\_triple-ko/kd* (4 %) sind weder zu Col-0 Wildtyppflanzen noch zu homozygoten Pflanzen der *atcep2 ko* sowie *atcep3 x atcep1 ko* signifikant different.

## **2.5. Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in Organellen, die vom ER stammen**

### **2.5.1. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 mit Hilfe einer fluoreszenzmarkierten ER-Lumen-Markerlinie: Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen und in ER-bodies**

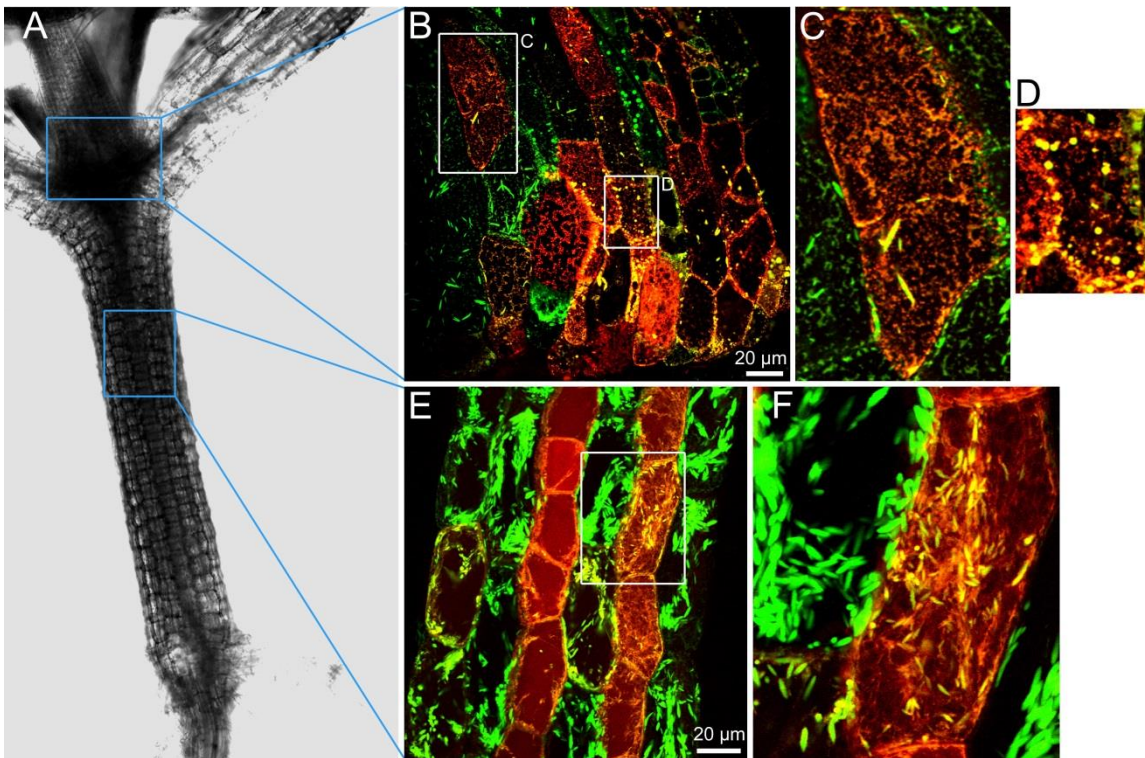
In früheren Arbeiten der AG Gietl konnte bereits in *Arabidopsis* Keimlingen gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in der Columella, in der lateralen Wurzelhaube und an der Basis junger Blätter in runden, 1 µm großen Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert ist. Des Weiteren akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP2 in den „non-protruding cell files“ des Hypokotyls in ER-bodies mit ihrer charakteristischen 1x10 µm großen Spindel-förmigen Gestalt (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Im Hypokotyl ist die Epidermis in zwei verschiedene Zellreihen aufgeteilt: nicht hervorstehende Zellreihen (non-protruding cell files) mit Stomata und hervorstehende Zellreihen (protruding cell files) ohne Stomata (Gendreau et al., 1997). Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist in der Epidermis der „non-protruding cell files“, nicht jedoch in den Stomata selbst lokalisiert (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Grundsätzlich speichern ER-bodies große Mengen an β-Glucosidasen mit C-terminalen ER-Rückhaltesignalen wie das Protein PYK10, das als Hauptbestandteil in ER-bodies identifiziert worden ist (Matsushima et al., 2003; Nakano et al., 2014).

Somit wird im Zuge dieser Arbeit analysiert, ob in Ricinosomen-ähnlichen Organellen und in ER-bodies, die beide das Pro-Enzym von AtCEP2 enthalten, zusätzlich auch andere Proteine wie β-Glucosidasen gespeichert werden. Des Weiteren, ob es Ricinosomen-ähnliche Organellen und ER-bodies gibt, die ausschließlich andere Proteine und kein Pro-Enzym von AtCEP2 speichern.

Hierfür werden Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) für AtCEP2 (s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, mit Pflanzen einer ER-Lumen-Markerlinie, die das Fluoreszenzprotein GFP mit dem ER-Rückhaltesignal „HDEL“ exprimiert (GFP-HDEL) (Nelson et al., 2007), gekreuzt. Somit sind die vom ER stammenden Organellen in 7 d alten Keimlingen am CLSM visualisierbar:

- grüne Ricinosomen-ähnliche Organellen speichern kein Pro-Enzym von AtCEP2, jedoch neben GFP-HDEL womöglich noch andere Proteine
- grüne ER-bodies speichern kein Pro-Enzym von AtCEP2, jedoch neben GFP-HDEL zusätzlich  $\beta$ -Glucosidasen und womöglich noch andere Proteine
- gelbe Ricinosomen-ähnliche Organellen speichern das Pro-Enzym von AtCEP2 und neben GFP-HDEL womöglich noch andere Proteine
- gelbe ER-bodies speichern das Pro-Enzym von AtCEP2 und neben GFP-HDEL zusätzlich  $\beta$ -Glucosidasen und womöglich noch andere Proteine.



**Abbildung 42:** Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist in Keimlingen in Ricinosomen-ähnlichen Organellen sowie in ER-bodies gespeichert. (B-D) In den Epidermiszellen an der Basis junger Blätter finden sich Zellen, in denen das Pro-Enzym von AtCEP2 sowohl in ER-bodies als auch in Ricinosomen-ähnlichen Organellen zusammen mit anderen Proteinen gespeichert ist (gelb). Daneben finden sich Zellen, in denen ausschließlich GFP-HDEL und womöglich noch andere Proteine wie  $\beta$ -Glucosidasen in vom ER stammenden Organellen akkumulieren (grün). (E, F) In der Epidermis des Hypokotyls ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in ER-bodies zusammen mit GFP-HDEL und womöglich noch anderen Proteinen wie  $\beta$ -Glucosidasen ausschließlich in den „non-protruding cell files“ lokalisiert (rot). In den „protruding cell files“ ist kein Pro-AtCEP2 in den ER-bodies gespeichert (grün). (B-F) Die rot-gefärbten ER-Strukturen, die ein kortikales netzartiges Muster ergeben, könnten auf naszierendes pro-3xHAmCherry-AtCEP2-KDEL im ER hindeuten. Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 werden Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHAmCherry-AtCEP2-KDEL*) für AtCEP2 (s. Kap.2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, mit Pflanzen einer ER-Lumen-Markerlinie, die das Fluoreszenzprotein GFP mit dem ER-Rückhaltesignal „HDEL“ exprimiert (GFP-HDEL) (Nelson et al., 2007), gekreuzt. 7 Tage alte Keimlinge dieser neu generierten Linie werden am CLSM analysiert. Dargestellt ist eine lichtmikroskopische Aufnahme zur Übersicht eines *Arabidopsis* Keimlings (A). Des Weiteren sind 600-fache Vergrößerungen (B und E), die mittels CLSM aufgenommen wurden, abgebildet. Die in B und E weiß umrandeten Rechtecke sind vergrößert dargestellt (C, D und F).



In den epidermalen Zellen an der Basis junger Blätter ist zu erkennen, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 grundsätzlich nicht nur in Ricinosomen-ähnlichen Organellen, sondern auch in ER-bodies gespeichert ist (Abb. 42B). Es sind grüne und gelbe Ricinosomen-ähnliche Organellen sowie grüne und gelbe ER-bodies zu erkennen. In jeder Zelle sind immer entweder Ricinosomen-ähnliche Organellen oder ER-bodies vorhanden. Es ist keine Epidermiszelle erkennbar, in der die zwei verschiedenen, vom ER stammenden Organellen gleichzeitig akkumuliert sind (Abb. 42B). Darüber hinaus ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Zellen, in denen es lokalisiert ist, in allen vom ER stammenden Organellen gespeichert und anscheinend sogar im ER-Lumen selbst akkumuliert (Abb. 42C, D). Die Lokalisation im ER-Lumen selbst könnte auf naszierendes pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL hindeuten, bei dem erst das pro-3xHA-mCherry translatiert wurde und die Translation von -AtCEP2-KDEL noch bevorsteht. Aus diesem Grund hat noch keine Speicherung in den vom ER stammenden Organellen stattgefunden und das ER-Lumen erscheint rot (Abb. 42C, D).

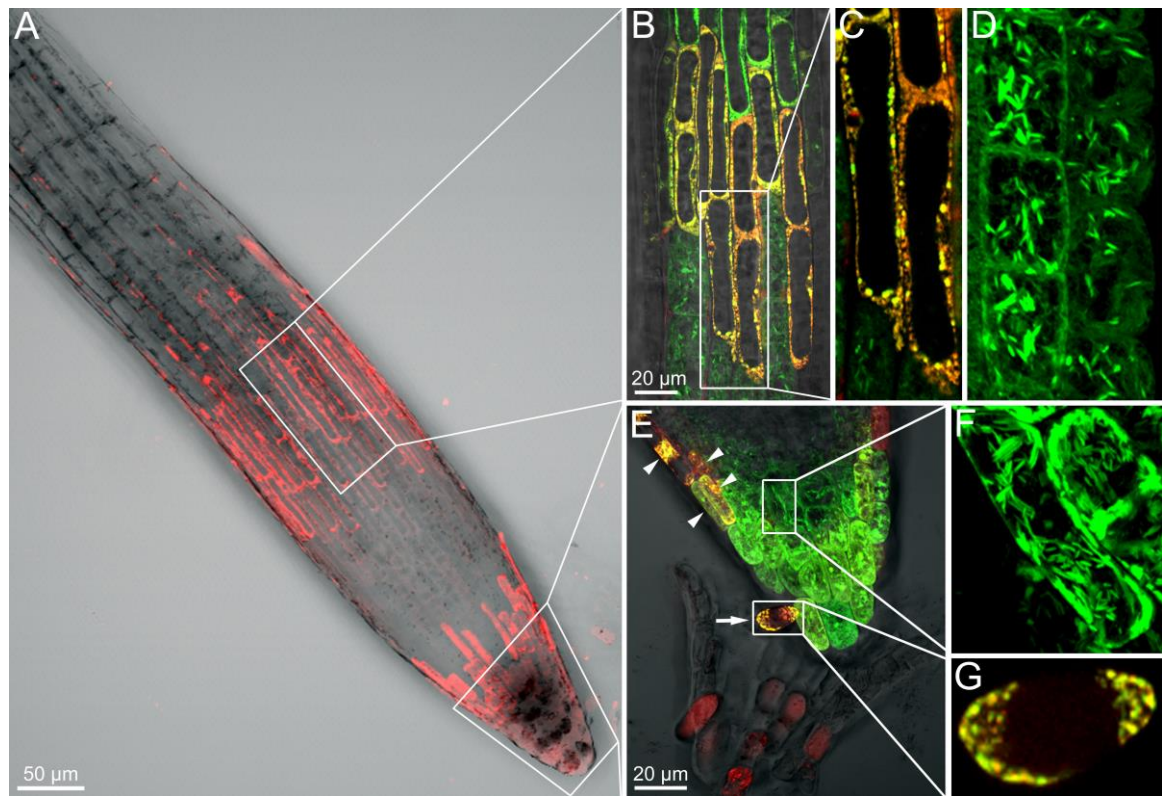
Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist in der Epidermis der „non-protruding cell files“, nicht jedoch in den Stomata selbst lokalisiert (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Bei der subzellulären Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 im Hypokotyl sind in den Epidermiszellen der „non-protruding cell files“ ausschließlich gelbe ER-bodies zu erkennen. Somit sind in jedem ER-body das Pro-Enzym von AtCEP2 und neben GFP-HDEL womöglich zusätzlich  $\beta$ -Glucosidasen und noch andere Proteine gespeichert. In den „protruding cell files“ sind ausschließlich grüne ER-bodies ohne Pro-AtCEP2 zu detektieren. Generell sind in der Epidermis des Hypokotyls keine Ricinosomen-ähnlichen Organellen vorhanden (Abb. 42E, F).

In der Wurzelspitze akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP2 in Form eines sehr distinkten „two band patterns“ in der zentralen Wurzelhaube, der Columella, sowie in den Zellen am unteren und oberen Ende der LRC (Abb. 43A; Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Am oberen Ende der LRC sind einerseits Zellen der LRC mit gelben Ricinosomen-ähnlichen Organellen, die das Pro-Enzym von AtCEP2 speichern, zu erkennen (Abb. 43B, C). Andererseits sind LRC-Zellen mit grünen Ricinosomen-ähnlichen Organellen zu detektieren (Abb. 43B). In diesen ist kein Pro-Enzym von AtCEP2 akkumuliert.

In der Wurzelspitze ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in der zentralen Columella (Abb. 43E Pfeil, G) und am unteren Ende der LRC (Abb. 43E Pfeilspitzen) in gelben Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (Abb. 43E, G).

In jeder Zelle der LRC und der zentralen Columella, in der das Pro-Enzym von AtCEP2 gespeichert ist, ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in allen Ricinosomen-ähnlichen Organellen akkumuliert (Abb. 43C, G). In der jeweils darunterliegenden Epidermis sind ausschließlich Zellen mit grünen ER-bodies ohne dem Pro-Enzym von AtCEP2 vorhanden (Abb. 43D, F).

In der Epidermis von Kotyledonen sowie an der Spreite junger Blätter finden sich grüne ER-bodies, jedoch keine vom ER stammenden Organellen, die das Pro-Enzym von AtCEP2 speichern (nicht dargestellt).



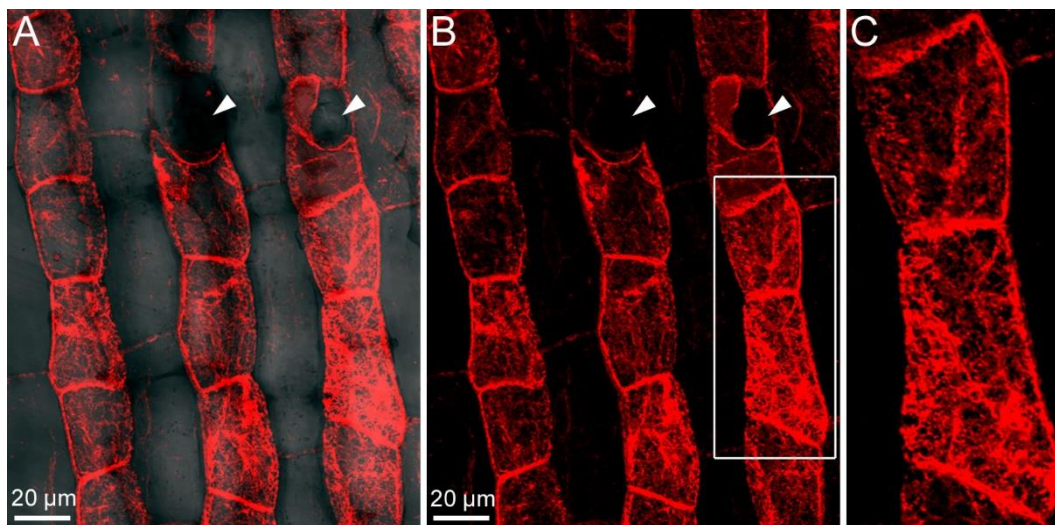
**Abbildung 43:** (A) In der Wurzelspitze akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP2 (rot) in Form eines sehr distinkten „two band patterns“ in der Columella sowie in den Zellen am unteren und oberen Ende der LRC. (B, C) Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist am oberen Ende der LRC in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (gelb). (E, G) In der Wurzelspitze ist das Pro-Enzym von AtCEP2 in der zentralen Columella (Pfeil) und in der LRC (Pfeilspitzen) ebenfalls in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (gelb). (D, F) In der jeweils darunterliegenden Epidermis sind ausschließlich Zellen mit ER-bodies ohne Pro-AtCEP2 vorhanden (grün). Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 werden Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) für AtCEP2 (s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, mit Pflanzen einer ER-Lumen-Markerlinie, die das Fluoreszenzprotein GFP mit dem ER-Rückhaltesignal „HDEL“ exprimiert (GFP-HDEL) (Nelson et al., 2007), gekreuzt. 7 Tage alte Keimlinge dieser neu generierten Linie werden am CLSM analysiert. Dargestellt sind eine 200-fache Vergrößerung (A) und 600-fache Vergrößerungen (B, E). Die in B und E vergrößert dargestellten Aufnahmen, sind aus den Bereichen, die in A beispielhaft weiß umrandet sind. Die in B und E weiß umrandeten Rechtecke sind vergrößert dargestellt (C, D, F, G). In C ist die Ebene der Zellen der LRC, in G ist die Ebene der zentralen Columella-Zellen und in D und F ist die Ebene der jeweils darunterliegenden Epidermiszellen abgebildet.

### **2.5.2. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 bei Verlust von ER-bodies in der homozygoten *atnai1* x *AtCEP2* Mutante: Rückstau von Pro-AtCEP2 im ER und keine Übernahme der Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung**

Es stellt sich nun die Frage, ob der Verlust von ER-Bodies eine Neubildung von anderen vom ER stammenden Organellen, wie beispielsweise den Ricinosomen-ähnlichen Organellen, induziert. Des Weiteren, ob diese neugebildeten vom ER stammenden Organellen die Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 übernehmen.

Hierfür wird die T-DNA Insertionsmutante *atnai1*, bei der sich die Insertionsstelle in der 5'UTR 67 Basenpaare N-terminal zum Startcodon „ATG“ befindet, verwendet. Das Gen *AtNAI1* kodiert für den Transkriptionsfaktor AtNAI1, der alleine für die Bildung von ER-bodies in *Arabidopsis* verantwortlich ist (Matsushima et al., 2004).

Es werden homozygote *atnai1* Pflanzen (GK-136G06-012754) mit Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) (s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, gekreuzt. Von dieser *atnai1* x *AtCEP2* Linie werden 7 d alte Keimlinge am CLSM analysiert.



**Abbildung 44: Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2 bei Verlust von ER-bodies im ER und keine Übernahme der Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung.** Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist bei Verlust von ER-bodies im Hypokotyl in den „non-protruding cell files“ (weiße Pfeilspitzen markieren Stomata) nicht in Ricinosomen-ähnlichen Organellen exprimiert, sondern es sind rote kortikale netzartige Strukturen, die für das ER charakteristisch sind, erkennbar. Es werden homozygote *atnai1* Pflanzen (GK-136G06-012754) mit Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) für AtCEP2 (s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, gekreuzt. Von dieser *atnai1* x *AtCEP2* Linie werden 7 d alte Keimlinge am CLSM analysiert. Dargestellt sind 600-fache Vergrößerungen des Hypokotyls (A und B). Das in B weiß umrandete Rechteck ist vergrößert dargestellt (C).

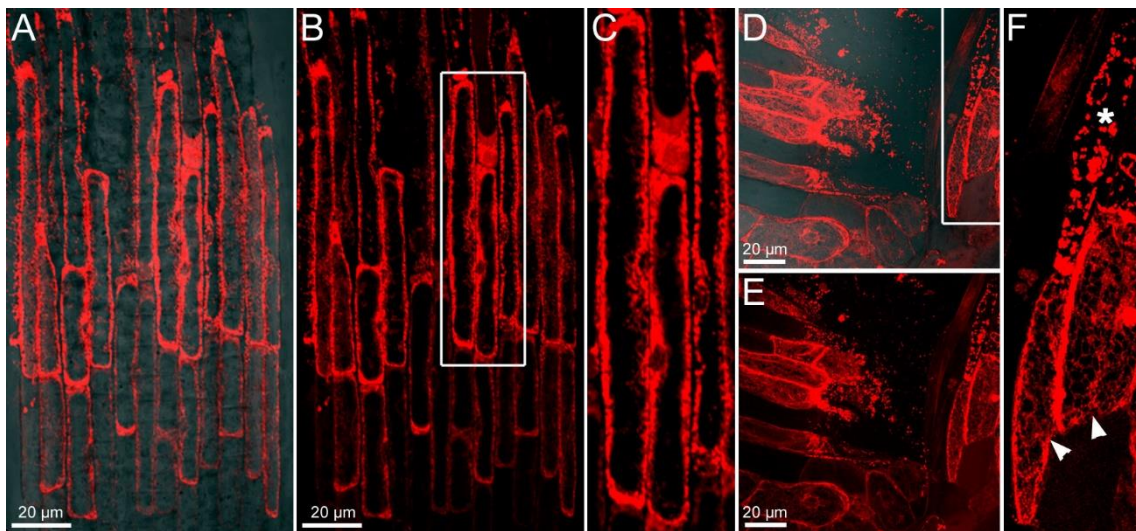
Bei Vorhandensein des Transkriptionsfaktors AtNAI1 wird das Pro-Enzym von AtCEP2 im Hypokotyl in den Epidermiszellen der „non-protruding cell files“ ausschließlich in ER-bodies gespeichert (s. Kap. 2.5.1.). Bei Verlust von AtNAI1 finden sich in den Epidermiszellen der „non-protruding cell files“ keine roten ER-bodies, in denen das Pro-Enzym von AtCEP2 gespeichert ist. Darüber hinaus findet zudem keine Neubildung von runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ , statt, um die Speicherung von Pro-AtCEP2 zu übernehmen. Dagegen sind rote kortikale netzartige Strukturen, die für das ER charakteristisch sind, zu erkennen (Abb. 44). Somit führt der Verlust von ER-bodies zu einem Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2 im Netzwerk des ER und es findet keine Übernahme der Speicherung von Pro-AtCEP2 in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung statt.

Daraus ergibt sich die Frage, ob der Transkriptionsfaktor AtNAI1 auch für die Bildung von Ricinosomen-ähnlichen Organellen verantwortlich ist.

Hierzu werden die epidermalen Zellen an der Basis junger Blätter und die Zellen am oberen Ende der LRC analysiert, da in diesen das Pro-Enzym von AtCEP2 unter anderem in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert wird (s. Kap. 2.5.1.).

In den Zellen am oberen Ende der LRC ist zu erkennen, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 auch bei Verlust von AtNAI1 nach wie vor in roten runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ , gespeichert wird (Abb. 45A-C).

An der Basis junger Blätter finden sich bei Verlust von AtNAI1 einerseits Epidermiszellen, in denen das Pro-Enzym von AtCEP2 in roten runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert ist (Abb. 45D-F, Asterisk). Andererseits sind darüber hinaus Epidermiszellen sichtbar, in denen rote kortikale netzartige Strukturen vorhanden sind, die für das ER charakteristisch sind (Abb. 45D-F, Pfeilspitzen). Dies sind die Epidermiszellen, in denen bei Vorhandensein von AtNAI1, das Pro-Enzym von AtCEP2 in ER-bodies gespeichert wird (s. Abb. 42B). Der Verlust der ER-bodies führt im ER nun zu einem Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2.



**Abbildung 45:** (A-C) Das Pro-Enzym von AtCEP2 akkumuliert auch bei Verlust von AtNAI1 in den Zellen am oberen Ende der LRC in roten runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen. (D-F) An der Basis junger Blätter ist das Pro-Enzym von AtCEP2 bei Verlust von AtNAI1 in Epidermiszellen einerseits in roten runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (Asterisk). Andererseits sind Epidermiszellen sichtbar, in denen rote kortikale netzartige Strukturen vorhanden sind, die für das ER charakteristisch sind (Pfeilspitzen). Dies sind die Epidermiszellen, in denen bei Vorhandensein von AtNAI1, das Pro-Enzym von AtCEP2 in ER-bodies gespeichert wird und sich nun bei Verlust von ER-bodies im ER ein Rückstau an Pro-AtCEP2 bildet (D-F). Es werden homozygote *atnai1* Pflanzen (GK-136G06-012754) mit Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) für AtCEP2 (s. Kap. 2.1.1.) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, gekreuzt. Von dieser *atnai1* x *AtCEP2* Linie werden 7 d alte Keimlinge am CLSM analysiert. Dargestellt sind 600-fache Vergrößerungen von Zellen am oberen Ende der LRC (A und B) und 600-fache Vergrößerungen von Epidermiszellen an der Basis junger Blätter (D und E). Das in B bzw. in D weiß umrandete Rechteck ist in C bzw. in F vergrößert dargestellt.

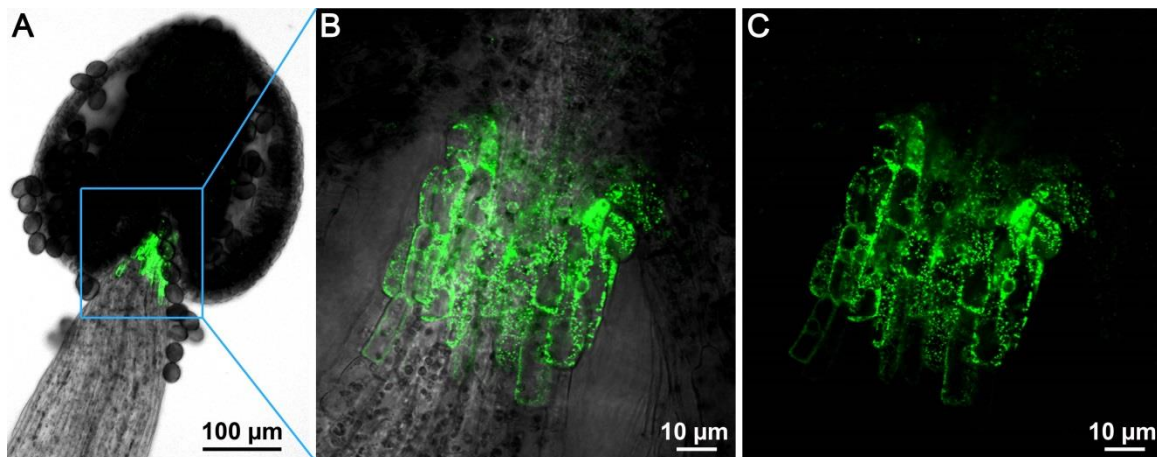
Somit ist der von *AtNAI1* kodierte Transkriptionsfaktor vermutlich ausschließlich für die Bildung der ER-bodies, nicht jedoch für die Bildung der Ricinosomen-ähnlichen Organellen verantwortlich. Darüber hinaus bildet das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Zellen, in denen es bei Vorhandensein von AtNAI1 in ER-bodies akkumuliert, bei Verlust von AtNAI1 einen Rückstau im ER, da keine Neubildung von Ricinosomen-ähnlichen Organellen, in denen Pro-AtCEP2 gespeichert werden kann, stattfindet.

## 2.6. Funktionelle Redundanz von AtCEP1 und AtCEP2 am Ende des Filaments trotz ihrer Gewebe-spezifischen Expressionen im Wildtyp

### 2.6.1. Akkumulierung von AtCEP1 und Speicherung als Pro-Enzym am Ende des Filaments

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* werden homozygote transgene Reporterlinien mit dem Fluoreszenzprotein EGFP am CLSM analysiert. Hierfür werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), verwendet. Die Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins ist in Pathogen-Versuchen bestätigt worden. Somit ist diese homozygote transgene Reporterlinie vergleichbar mit Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 8).

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* kann am CLSM wahrscheinlich ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL und nicht die maturierte Form von AtCEP1 visualisiert werden. Dies liegt daran, dass bei der Maturierung von AtCEP1, entsprechend der Maturierung von AtCEP2 (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)), wahrscheinlich auch das Fluoreszenzprotein EGFP von der maturierten Untereinheit abgespalten wird.



**Abbildung 46:** Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist in der Epidermis am Ende des Filaments und nicht weiter oben an der Ansatzstelle der Antheren lokalisiert. Die Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 erfolgt höchstwahrscheinlich in den vom ER stammenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1 µm (B und C). Dargestellt ist ein Stamen im Blütenentwicklungsstadium 15 nach Bowman (s. Tab. 1) von *atcep1 ko* Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) exprimieren. Es sind eine 200-fache Vergrößerung (A) und eine 1600-fache Vergrößerung (B und C), des in A blau umrandeten Rechtecks dargestellt. Die Aufnahmen wurden am CLSM getätigt.



Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist im generativen Gewebe am Ende des Filaments in der Epidermis lokalisiert (s. Abb. 46). Es ist deutlich zu erkennen, dass das Pro-Enzym von AtCEP1 ausschließlich am Ende des Filaments und nicht weiter oben an der Ansatzstelle der Antheren akkumuliert (Abb. 46B). Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist darüber hinaus ausschließlich in epidermalen Zellen lokalisiert. In jeder Epidermiszelle, in der das Pro-Enzym von AtCEP1 exprimiert wird, sind deutlich punktierte, sehr distinkte EGFP-Signale mit einer Größe von ca. 1 µm zu erkennen (s. Abb. 46B, C). Diese stellen höchstwahrscheinlich die vom ER stammenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1 µm, dar, in denen das Pro-Enzym von AtCEP1 gespeichert ist.

Zeitlich gesehen ist das Pro-Enzym von AtCEP1 am Ende des Filaments bereits in sehr jungen, noch geschlossenen Blüten ab dem Blütenentwicklungsstadium 12 nach Bowman (s. Tab. 1) lokalisiert. Diese Lokalisation ist bis zum Blütenentwicklungsstadium 17 (s. Tab. 1) nach Bowman, bei dem alle Organe von der grünen Schote abfallen, konsistent zu detektieren.

Stadium	Ereignis zu Beginn des Stadiums	Dauer	Alter am Ende des Stadiums
11	Petalen und lange Stamina werden eingebettet	30 h	11.5 d
12	Papillen der Narbe sind erkennbar	42 h	13.25 d
Neue Zeitzählung des Alters am Ende des Stadiums			
13	Knospe öffnet sich, Petalen sind sichtbar, Anthese	6 h	0.5 d
14	Lange Antheren überragen Narbe	18 h	1 d
15	Narbe überragt lange Antheren	24 h	2 d
16	Petalen und Sepalen welken	12 h	2.5 d
17	Alle Organe fallen von der grünen Schote ab	192 h	10.5 d
18	Schoten werden gelb	36 h	12 d
19	Schotenwände trennen sich von der trockenen Schote	bis zu 24 h	13 d
20	Samen fallen		

**Tabelle 1: Auszugsweise Übersicht der Blütenentwicklungsstadien in *Arabidopsis thaliana*. Es sind die Ereignisse aufgezählt, die den Beginn des jeweiligen Stadiums der Blütenentwicklung definieren und deren ungefähre Dauer, sowie das Alter der Blüte am Ende des jeweiligen Blütenentwicklungsstadiums (Bowman, 1993).**

### **2.6.2. Funktionelle Redundanz: Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 am Ende des Filaments bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3**

Für die Untersuchung der Funktion von AtCEP1 im Zuge der Entwicklung werden die Stamina von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen und homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Pflanzen der Linie 2.21 und Linie 3.14 (s. Kap. 2.1.3.) untersucht. In Col-0 Wildtyppflanzen ist das Pro-Enzym von AtCEP1 im Stamen am Ende des Filaments in der Epidermis lokalisiert (s. Abb. 46). Es ist kein offensichtlicher Phänotyp von homozygoten Pflanzen der *atcep1 ko*, *atcep3 x atcep1 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* (Linie 2.21 und 3.14) im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen feststellbar: Die untersuchten Pflanzen weisen keine offensichtlichen Veränderungen in ihrer Zellmorphologie der Epidermis am Ende des Filaments ab dem Blütenentwicklungsstadium 12-17 nach Bowman (s. Tab. 1) auf (nicht dargestellt). Damit übereinstimmend zeigen die untersuchten Pflanzen in diesen Blütenentwicklungsstadien keine Veränderungen gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen: Die Stamina zeigen ein normales Streckungswachstum, sodass diese die Narbe im Blütenentwicklungsstadium 15 überragen (nicht dargestellt); Ebenso findet in den untersuchten Pflanzen PCD statt, sodass bei allen im Blütenentwicklungsstadium 17 alle Organe von der grünen Schote abfallen (nicht dargestellt).

Um in diesem Zusammenhang eine etwaige funktionelle Redundanz innerhalb der AtCEP zu ermitteln werden verschiedene transgene Reporterlinien am CLSM untersucht. Einerseits werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), analysiert.

Andererseits werden homozygote *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen, die ebenfalls mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), untersucht.

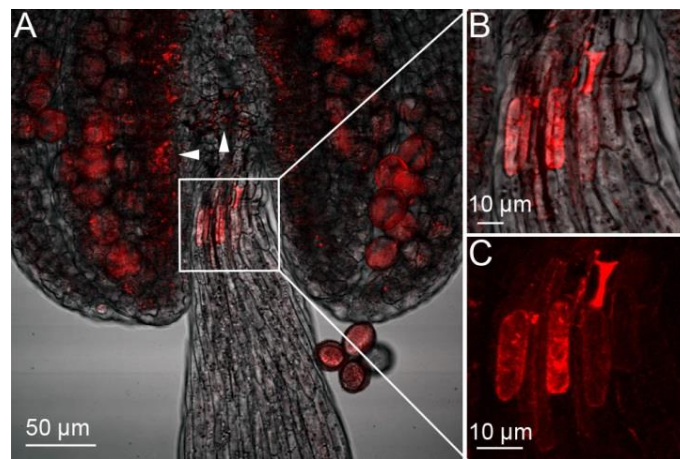
Die *atcep\_triple-ko/kd* Linien enthalten ein nicht funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL$ ), das aber wie AtCEP2 ebenfalls in diesen Linien herunterreguliert ist. Dies führt dazu, dass kein Signal des Fluoreszenzproteins mCherry am CLSM nachweisbar ist (s. Kap. 2.1.3.). Somit können die Pflanzen der *atcep\_triple-ko/kd* Linie 2.21 und Linie 3.14 in diesem Zusammenhang nicht am CLSM analysiert werden.

Generell ist am Ende des Filaments ausschließlich das Pro-Enzym von AtCEP1 (s. Abb. 46) und kein Pro-Enzym von AtCEP2 in Col-0 Wildtyppflanzen lokalisiert. Die Stamina der homozygoten Single-Mutante *atcep1 ko* mit einem funktionellen AtCEP2 Reporterkonstrukt zeigen am Ende des Filaments kein mCherry-Signal des Pro-Enzym von AtCEP2 (nicht dargestellt). Dagegen ist bei Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3

eine Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der homozygoten Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* mit einem funktionellen AtCEP2 Reporterkonstrukt am Ende des Filaments zu detektieren (Abb. 47).

Es handelt sich um ein sehr distinktes mCherry-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP2 in einigen wenigen epidermalen Zellen. Das Pro-Enzym von AtCEP2 scheint bei Doppelverlust von AtCEP1 und AtCEP3 in weniger Epidermiszellen zu akkumulieren als das Pro-Enzym von AtCEP1 in Col-0 Wildtyppflanzen. Zudem scheint diese Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 schwächer als die ursprüngliche Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in diesen Zellen zu sein (Abb. 47; s. Abb. 46).

Somit weisen AtCEP1 und AtCEP2 am Ende des Filaments eine funktionelle Redundanz trotz ihrer Gewebe-spezifischen Expressionen in Col-0 Wildtyppflanzen auf.

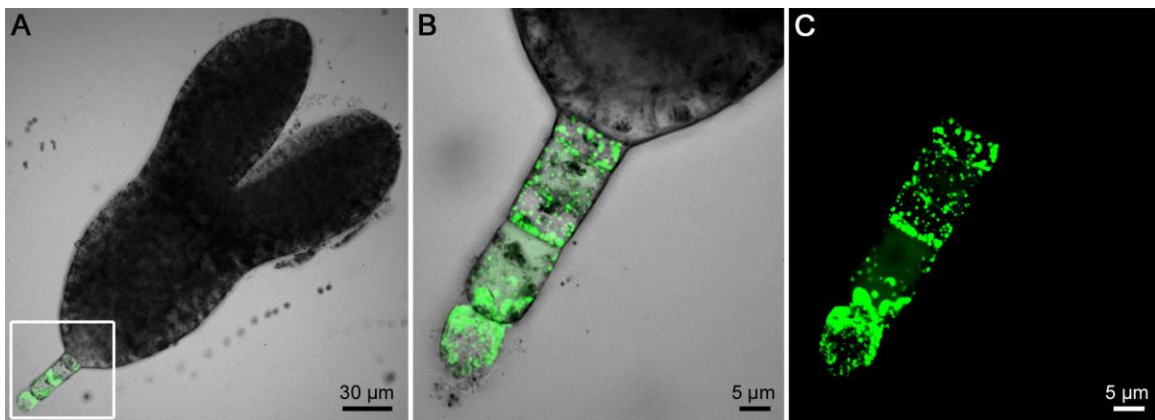


**Abbildung 47: (A) Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der Epidermis am Ende des Filaments in homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen mit einem funktionellen AtCEP2 Reporterkonstrukt. An dieser Stelle ist in Col-0 Wildtyppflanzen das Pro-Enzym von AtCEP1 akkumuliert. (B, C) Die Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der Doppelmutante erscheint im Vergleich zum Pro-Enzym von AtCEP1 in Col-0 Wildtyppflanzen schwächer und ist in weniger Epidermiszellen festzustellen (s. Abb. 46). Dargestellt ist ein Stamen von homozygoten *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) exprimieren (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3). Es ist eine 400-fache Vergrößerung (A) dargestellt, die am CLSM getätigt wurde. Das weiß umrandete Rechteck in A ist in B und C manuell auf eine ca. 1000-fache Vergrößerung vergrößert. Die weißen Pfeilspitzen in A markieren autofluoreszierende unspezifische Signale. Die mCherry-Signale wurden durch Lambda-Scans verifiziert.**

## **2.7. Funktion der AtCEP im Programmierten Zelltod: Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in Suspensor-Zellen, in denen der Programmierter Zelltod bevorsteht**

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* werden homozygote transgene Reporterlinien mit dem Fluoreszenzprotein EGFP am CLSM analysiert. Hierfür werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), verwendet. Die Funktionalität des AtCEP1 Reporterproteins ist in Pathogen-Versuchen bestätigt worden. Somit ist diese homozygote transgene Reporterlinie vergleichbar mit Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 8).

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP1 *in vivo* kann am CLSM wahrscheinlich ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP1 pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL und nicht die maturierte Form von AtCEP1 visualisiert werden. Dies liegt daran, dass im Zuge der Maturierung von AtCEP1, entsprechend der Maturierung von AtCEP2 (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)), wahrscheinlich auch das Fluoreszenzprotein EGFP von der maturierten Untereinheit abgespalten wird.



**Abbildung 48:** Das Pro-Enzym von AtCEP1 akkumuliert in allen Suspensor-Zellen des *Arabidopsis* Embryos im Torpedo-Stadium. Die Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 erfolgt höchstwahrscheinlich in den vom ER stammenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1 µm (B und C). Dargestellt ist ein *Arabidopsis* Embryo im Torpedo-Stadium von *atcep1 ko* Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) exprimieren. Es sind eine 400-fache Vergrößerung (A) und eine 1500-fache Vergrößerung (B und C), des in A weiß umrandeten Rechtecks dargestellt. Die Aufnahmen wurden am CLSM getätigt.

Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist im generativen Gewebe in den Suspensor-Zellen lokalisiert. Im Torpedo-Stadium der Embryonalentwicklung ist in allen Zellen des Suspensors ein sehr starkes und distinktes EGFP-Signal des Pro-Enzyms von AtCEP1 zu detektieren (Abb. 48). In jeder Suspensor-Zelle sind deutlich punktierte, distinkte EGFP-Signale mit einer Größe von ca. 1 µm zu erkennen (Abb. 48B, C). Diese stellen höchstwahrscheinlich die vom ER stammenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen, mit ihrem charakteristischen Durchmesser von 1 µm, dar, in denen das Pro-Enzym von AtCEP1 gespeichert ist. Des Weiteren scheint das Pro-Enzym von AtCEP1 im Cytoplasma-Saum und nicht in der Zellwand der Suspensor-Zellen lokalisiert zu sein.

Darüber hinaus ist eine Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 nicht nur im Torpedo-Stadium, sondern auch in den weiteren Stadien der Embryonalentwicklung, Herz-Stadium und „upturned-Stadium“, in allen Suspensor-Zellen festzustellen (nicht dargestellt). Eine Aussage über die Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in Suspensor-Zellen während früherer embryonaler Entwicklungsstadien, wie beispielsweise dem Oktanten-Stadium oder dem Globular-Stadium, kann nicht getätigt werden. Dies liegt daran, dass keine Präparation eines Embryos mit intakten Suspensor-Zellen in diesen frühen Stadien der Embryonalentwicklung gelang.

Des Weiteren werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) transformiert wurden (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), analysiert. Diese homozygote transgene Reporterlinie besitzt kein funktionales AtCEP1-Protein und ist vergleichbar mit homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen (s. Abb. 8). Im Torpedo-Stadium der Embryonalentwicklung ist ebenfalls eine spezifische Hochregulierung der Promotoraktivität von *AtCEP1* in allen Suspensor-Zellen am CLSM zu detektieren (nicht dargestellt). Darüber hinaus ist kein offensichtlicher Phänotyp, wie beispielsweise eine Veränderung der Zellmorphologie der Suspensor-Zellen gegenüber homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 exprimieren, festzustellen.

### **3. Diskussion**

#### **3.1. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweicheung für die Elongation sowie für die Zellseparation**

KDEL CysEP besitzen aufgrund ihrer ungewöhnlich breiten Substratspezifität wichtige Funktionen in den finalen Stufen des Zellkollapses im Entwicklungs-PCD (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012). Darüber hinaus wird vermutet, dass KDEL CysEP eine Funktion in der Gewebe-Remodellierung aufweisen (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Hierfür wurde in *Arabidopsis* die Entwicklung der Wurzel als ein Modellsystem im Zuge der Gewebe-Remodellierung analysiert. In der Elongationszone ist die Zellwanderweicheung Voraussetzung für die Streckung der Zellen, während des endogenen Austritts des Seitenwurzel-Primordiums hingegen bedingt die Zellwanderweicheung die Separation der Zellen.

##### **3.1.1. Ausschließlich AtCEP2 ist in der Elongation der Primärwurzel involviert**

Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer verkürzten Primärwurzellänge. Eine Restaktivität von AtCEP2 in den zwei unabhängigen Linien der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* bewirkt bereits eine dosiert geringere Verkürzung der Länge der Primärwurzel (s. Abb. 25, 26). Im Gegensatz dazu verursacht weder der Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP3 noch der Doppelverlust von AtCEP1 und AtCEP3 eine verkürzte Primärwurzel (s. Abb. 25, 36). Somit ist ausschließlich der Einzel-Verlust von AtCEP2 für den quantitativen Entwicklungs-Phänotyp der verkürzten Primärwurzel verantwortlich.

Die verkürzten Primärwurzellängen sind in homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* durch die Reduktionen ihrer jeweiligen Trichoblasten-Zelllängen bedingt. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 bewirkt die kürzesten Zelllängen der Trichoblasten (s. Abb. 33, 34).

Die durchschnittliche Zelllänge der Trichoblasten entspricht in homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* 62 % gegenüber der Länge der Trichoblasten von Col-0 Wildtyppflanzen. Diese 62 % stimmen mit der Länge der Primärwurzeln der *atcep2 ko* von 58-63 % im Vergleich zu Primärwurzeln von Col-0 Wildtyppflanzen überein (s. Abb. 26, 34).

Die Restaktivität von AtCEP2 führt bereits in den zwei unabhängigen Linien der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* zu einer Verlängerung bzw. zu einer dosiert geringeren Verkürzung der Zelllängen der Trichoblasten (s. Abb. 33, 34). Diese entsprechen 73 % bzw. 75 % gegenüber der Länge der Trichoblasten von Col-0 Wildtyppflanzen. Auch diese 73 % bzw. 75 % in den zwei unabhängigen Linien der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd*

stimmen mit der Reduktion von der Länge ihrer Primärwurzeln von 67-71 % bzw. 73-75 % im Vergleich zu Primärwurzeln von Col-0 Wildtyppflanzen überein (s. Abb. 26, 34).

Zudem ist eine Verkürzung der Länge der „lateral root cap“ (LRC) in homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* zu beobachten (s. Abb. 28). Diese ist durch die Reduktion ihrer jeweiligen Zelllängen in der LRC bedingt (s. Abb. 29, 30). Wiederum führt der Einfach-Verlust von AtCEP2 zu den kürzesten Zelllängen in der LRC (74 % im Vergleich zu Col-0) und somit zur größten Abnahme der Gesamtlänge der LRC (62 % im Vergleich zu Col-0). Die Restaktivität von AtCEP2 in homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linien bewirkt erneut eine Verlängerung bzw. eine dosiert geringere Verkürzung der Zelllängen in der LRC (80-83 % im Vergleich zu Col-0) und daraus resultierend eine dosiert geringere Reduktion der Gesamtlänge der LRC (68-71 % im Vergleich zu Col-0).

Somit stimmen interessanterweise ebenso wie die Verkürzungen der Trichoblasten auch die Abnahmen der Gesamtlängen der LRC in homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* und *atcep\_triple-ko/kd* mit der Reduktion ihrer Primärwurzellänge überein.

In *Arabidopsis* ist die Primärwurzellänge ausschließlich von einer reibungslos ablaufenden Zellstreckung in der Elongationszone abhängig (Fendrych et al., 2014; Wilson et al., 2015). Eine verkürzte LRC kann diese Zellelongation und somit die Primärwurzellänge beeinflussen. Die Zellen der LRC sondern einen Gel-artigen Schleim ab, um die Reibung der Wurzelspitze im Substrat zu reduzieren. Eine zu kurze LRC verursacht eine Reibungszunahme für die wachsende Wurzel, die eine Abnahme der Primärwurzellänge sowie gleichzeitig eine Stauchung und daraus resultierend eine Zunahme des Durchmessers der Wurzel veranlasst (Arnaud et al., 2010; Bennett et al., 2010; Driouich et al., 2010).

Der Einfach-Verlust von AtCEP2 bewirkt eine Abnahme der Zellbreite der Trichoblasten um 13 % und damit verbunden eine um 13 % schmalere Elongationszone im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Ebenso führt die Restaktivität von AtCEP2 in Linien der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* zu einer 10-11 % schmaleren Elongationszone aufgrund der Reduktion der Zellbreite der Trichoblasten um 11-12 % gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 34, 35). Somit zeigen beide Genotypen eine Abnahme des Durchmessers ihrer Primärwurzel und keine Stauchung.

Die Verkürzung der LRC scheint demzufolge keinen Einfluss auf die Primärwurzellänge zu besitzen. Der quantitative Entwicklungs-Phänotyp der verkürzten Primärwurzel resultiert ausschließlich aus der Reduktion der Zelllängen der Trichoblasten.

### **3.1.2. Lokalisation der enzymatisch aktiven Untereinheit von AtCEP2 in der Zellwand der Zellen in der „lateral root cap“ und in der Elongationszone**

Für eine direkte Beteiligung von AtCEP2 in der Gewebe-Remodellierung muss das Protein in der Zellwand lokalisiert sein und gleichzeitig in einer enzymatisch aktiven Form vorliegen.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Säure-abhängige Maturierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 eine Abspaltung des Fluoreszenzproteins mCherry bedingt (s. Abb. 37). Dies bedeutet, dass eine Visualisierung der maturierten Form von AtCEP2 am CLSM nicht möglich ist und ausschließlich das Pro-Enzym von AtCEP2 (pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL) am CLSM detektiert werden kann.

Grundsätzlich konnte bereits in *Arabidopsis* Keimlingen gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in der Wurzelspitze in Form eines „two band patterns“ detektierbar ist (s. Abb. 43; Helm et al., 2008; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist am oberen Ende der LRC allein in den Zellen der LRC akkumuliert. Mit Hilfe des Zellwand-färbenden Calcofluors konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 ausschließlich im Cytoplasma-Saum und nicht in der Zellwand lokalisiert ist (s. Abb. 38, 43). Eine Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 ist weder in der darunterliegenden Epidermis der meristematischen Zone noch in der folgenden Epidermis der Elongationszone festzustellen.

Mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers gegen die reife Untereinheit von AtCEP2 konnten AtCEP2-Signale in der Zellwand der LRC-Zellen nachgewiesen werden. Zudem sind AtCEP2-Signale in der Zellwand von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone detektierbar (s. Anh. 6.3.; Kollaboration mit Universität Regensburg, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller).

Es stellt sich die Frage, ob es sich bei den detektierten AtCEP2-Signalen in den Zellwänden um das enzymatisch inaktive Pro-Enzym von AtCEP2 und/oder um die enzymatisch aktive reife Untereinheit von AtCEP2 handelt.

Grundsätzlich wird für die Maturierung des enzymatisch inaktiven Pro-Enzyms von AtCEP2 in die enzymatisch aktive reife Untereinheit ein pH-Wert von 6.5 oder saurer benötigt (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Im Zuge dieser Maturierung wird unter anderem das Fluoreszenzprotein mCherry abgespalten (s. Abb. 37). Die Aktivität der reifen Untereinheit von AtCEP2 ist nach der pH-abhängigen Maturierung pH-unabhängig (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). In *Arabidopsis* beträgt der apoplastische pH-Wert in der LRC 5.3-5.5 und in der Elongationszone 4.8-4.9 (Felle et al., 2001). Bei diesem vorliegenden pH-Wert ist die relative Enzymaktivität der maturierten AtCEP2 bereits nach einer Minute eindeutig messbar (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Dies bedeutet wiederum, dass sich die in der Zellwand lokalisierten Pro-Enzyme von AtCEP2 bei dem vorliegenden apoplastischen



pH-Wert in kürzester Zeit autokatalytisch in die enzymatisch aktive reife Untereinheit maturieren. Demzufolge stellen die AtCEP2-Signale, die vom Peptid-Antikörper in den Zellwänden der LRC-Zellen sowie in den epidermalen Zellwänden der beginnenden Elongationszone detektiert werden, wahrscheinlich ausschließlich die maturierte Untereinheit von AtCEP2 dar. Dies würde zudem erklären, dass mittels CLSM kein Pro-Enzym von AtCEP2 in diesen Zellwänden detektiert werden konnte (s. Abb. 38, 43). Somit kann AtCEP2 direkt eine Funktion in der Gewebe-Remodellierung ausüben, da es in der Zellwand lokalisiert ist und gleichzeitig in einer enzymatisch aktiven Form vorliegt.

### **3.1.3. Funktion von AtCEP2 im Zuge der Gewebe-Remodellierung: Zellwanderweichung durch Spaltung der stabilisierenden Extensine**

Nun stellt sich die Frage, welche Funktion AtCEP2 in der Zellwand ausübt, sodass ihr Verlust eine drastische Verkürzung der Zelllänge der Trichoblasten bewirkt, die zu einer Reduktion der Primärwurzellänge führt.

Durch Kristallisation der RcCysEP konnte gezeigt werden, dass diese eine breitere Substratbindetasche im Vergleich zu anderen Papain-ähnlichen Proteasen besitzt (Than et al., 2004). Diese breitere Substratbindetasche führt zu einer ungewöhnlich breiten Substratspezifität, sodass RcCysEP sogar das P1-Typ Extensin von Tabak verdauen kann. RcCysEP akzeptiert hierbei Proline, Hydroxyproline und hoch glykolytierte Hydroxyproline in P2 und P2' Position zur Spaltstelle (Helm et al., 2008). In einem  $\beta$ -Casein Verdau konnte gezeigt werden, dass AtCEP2 Prolin in P2, P1, P1' und P2' zur Spaltstelle akzeptiert und somit sowohl N-terminal als auch C-terminal spalten kann (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Diese Akzeptanz nahe der Spaltstelle ist sehr ungewöhnlich für Endopeptidasen (Cunningham and O'Connor, 1997). Grundsätzlich sind die für die breitere Substratbindetasche verantwortlichen Aminosäuren in allen bekannten KDEL CysEP hoch konserviert. Somit besitzen vermutlich alle KDEL CysEP diese ungewöhnlich breite Substratspezifität und können Extensine verdauen (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012).

Für die pflanzliche Primär-Zellwand sind sowohl Polysaccharide als auch Proteine wichtige strukturelle Bestandteile. Die moderat glykosylierten Extensine aus der Familie der Hydroxyprolin-reichen Glykoproteine (HRGP) sind wahrscheinlich die wichtigsten und häufigsten Strukturproteine der primären Zellwand (Cannon et al., 2008). In *Arabidopsis* kodieren allein 59 Gene für funktionelle Extensine. Extensine weisen ein repetitives Ser-(Hyp)<sub>3-4</sub> Element auf, das sowohl an der Aminosäure Serin als auch an der Aminosäure Hydroxyprolin posttranslational mit Arabinose O-glykosyliert wird. Generell

formen HRGP aufgrund ihrer starken Assoziationstendenz durch intermolekulare Verknüpfungen und kovalente Quervernetzungen ein dreidimensionales Netzwerk. Dieses stellt ein verfestigendes und strukturgebendes Gerüst für die Zellwandmatrix dar (Cannon et al., 2008; Lampion et al., 2011; Velasquez et al., 2012; Hijazi et al., 2014). Im Allgemeinen ist wenig über die exakte Funktion der HRGP und über ihre Koordination während der pflanzlichen Entwicklungsprozesse bekannt.

In *Arabidopsis* führt der Verlust des Extensins AtEXT3 in der homozygoten *rsh* Mutante (*root-*, *shoot-*, *hypocotyl-defectiv*) zur Embryo-Letalität. Der Embryo von *rsh* Mutanten zeigt „schwimmende Zellwände“ ohne jegliche Verknüpfung zu benachbarten Zellwänden. Darüber hinaus bestehen die Embryonen aus „hängenden Zellwänden“, die ausschließlich an einem Ende mit anderen Zellwänden verbunden sind, und aus „Zellwand-Stumpfen“, die als Reste an anderen Zellwänden hervorstehen (Cannon et al., 2008). Somit konnte die immense Bedeutung der Extensine als strukturgebende Komponente in der Zellwand bewiesen werden. Des Weiteren wurde die Wichtigkeit von Extensinen in der Zellstreckung als verfestigender Zellwandbestandteil dargelegt. Die Einzel-Verluste von AtEXT6, AtEXT7, AtEXT10, AtEXT11 sowie AtEXT12 bewirken in der jeweiligen Single-Mutante eine Reduktion der Länge von Wurzelhaaren um 75-85 % gegenüber Wildtyppflanzen (Velasquez et al., 2011).

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, welche Auswirkungen der Verlust einer Protease, die vermutlich Extensine spalten kann, und das damit verbundene Nicht-Erweichen der Zellwand auf die Elongation der Zellen besitzt. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 führt zu einer Abnahme der Trichoblasten-Zelllänge und daraus resultierend zu einer Reduktion der Primärwurzellänge.

In der Wurzel von *Arabidopsis* sind Extensine ubiquitär in den Zellwänden der LRC-Zellen sowie in allen epidermalen und corticalen Zellwänden von der Wurzelspitze bis zur Differenzierungs-/Wurzelhaarzone lokalisiert. Der Gehalt an Extensinen ist in den jeweiligen Zellwänden der Wurzel allerdings unterschiedlich. Extensine sind vorwiegend in den Zellwänden der Epidermis und des Cortex ab der „rapid elongation zone“ sowie weiter wurzelaufwärts lokalisiert und nur geringere Anteile an Extensinen sind in den Zellwänden der LRC-Zellen enthalten (Wilson et al., 2015). In *Arabidopsis* ist die Primärwurzellänge ausschließlich von einer reibungslos ablaufenden Zellelongation abhängig (Fendrych et al., 2014; Wilson et al., 2015). Die Elongationszone wird in zwei Bereiche untergliedert: die „rapid elongation zone“ und die „late elongation zone“. In der „rapid elongation zone“ findet eine sehr schnelle Zellelongation mit einer Zunahme der Zelllänge von bis zu 300 % in weniger als 3 h statt (Verbelen et al., 2006). Für diese Elongation ist eine vorherige Remodellierung der Zellwand, die die Auflockerung des starren Struktur-Gerüsts bewirkt, zwingend notwendig. Hierbei sind Zellwand

Remodellierungs-Enzyme entscheidend involviert (Cosgrove, 2000a and b; van Sandt et al., 2007). In der „late elongation zone“ hingegen sind die entsprechenden Zellen bereits fast vollständig elongiert und erreichen ihre maximale Länge. In der Elongationszone findet die Streckung der Zellen fast ausschließlich in länglicher Richtung statt (Verbelen et al., 2006).

Die enzymatisch aktive Untereinheit von AtCEP2 ist exakt vor und am Beginn dieser „rapid elongation zone“ in den epidermalen Zellwänden lokalisiert und demzufolge anscheinend direkt in der Zellwandreifung für die Zellstreckung involviert.

Des Weiteren ist AtCEP2 in den Zellwänden der LRC-Zellen lokalisiert (s. Anh. 6.3.; Kollaboration mit Universität Regensburg, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller). In *Arabidopsis* finden in der LRC grundsätzlich sowohl PCD-Abläufe als auch Zellelongationen statt (Campilho et al., 2006; Fendrych et al., 2014). Somit besitzt AtCEP2 möglicherweise wie in der beginnenden Elongationszone auch in der LRC eine Funktion in der Gewebe-Remodellierung.

Erstaunlicherweise spiegelt sich der differente Extensin-Gehalt der Zellwände der LRC sowie der Epidermiszellen der Elongationszone vermutlich auch in der Reduktion der jeweiligen Zelllängen bei Einfach-Verlust von AtCEP2 wider. Die Zelllänge der LRC-Zellen beträgt in Keimlingen der homozygoten *atcep2 ko* 74 % gegenüber Col-0 Keimlingen (s. Abb. 30). Dagegen weisen die vollständig elongierten Trichoblasten in Keimlingen der homozygoten *atcep2 ko* eine Zelllänge von 62 % gegenüber Col-0 Keimlingen auf (s. Abb. 34).

Neben Extensinen besitzen Hemicellulosen, vorwiegend Xyloglucane, verfestigende Funktionen für die pflanzliche Zellwand, indem sie die einzelnen Cellulose-Mikrofibrillen verknüpfen (Cosgrove, 2000a). Diese quervernetzenden Xyloglucane werden im Zuge der Elongation durch Xyloglucan-Endotransglucosylasen/hydrolasen (XTH) gespalten (van Sandt et al., 2007). In *Arabidopsis* ist XTH19 in der Wurzelspitze und darüber hinaus sind XTH17, XTH18 und XTH19 in der Elongationszone der Wurzel lokalisiert (Vissenberg et al., 2005). Die jeweiligen Einfach-Verluste dieser drei XTH führen in den entsprechenden Single-Mutanten zu einer Abnahme der Primärwurzellänge von 10-15 % im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Die jeweiligen Doppel-Verluste bewirken weitere Abnahmen der Primärwurzellängen bis maximal 27 % in *xth17 x xth18* Mutanten (Wilson et al., 2015). Somit werden für XTH im Zuge der Gewebe-Remodellierung eine hohe funktionelle Redundanz zueinander angenommen. Darüber hinaus sind die Funktionen für viele der 33 XTH aus *Arabidopsis* unerforscht, wobei davon ausgegangen wird, dass weitere XTH in der Elongationszone an der Gewebe-Remodellierung beteiligt sind (Vissenberg et al., 2005; Wilson et al., 2015).

Im Gegensatz dazu weisen AtCEP in der Gewebe-Remodellierung in LRC-Zellen und in Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone keine funktionelle Redundanz auf. Ausschließlich der Einfach-Verlust von AtCEP2 ist für die Verkürzung der Zelllängen in der LRC und in der Elongationszone verantwortlich. Die Restaktivität von AtCEP2 führt in homozygoten Keimlingen der *atcep\_triple-ko/kd* bereits zu einer Verlängerung dieser Zellen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass AtCEP2 die Zellelongation aktiv unterstützt, indem es vermutlich die Zellwände durch Spaltung der strukturgebenden und verfestigenden Zellwandproteine Extensine erweicht. Somit besitzen AtCEP2 bzw. KDEL CysEP neben der Unterstützung des Zellkollapses in den finalen Stufen des PCD, eine zweite wichtige Funktion in der Gewebe-Remodellierung.

#### **3.1.4. Mögliche Sekretionswege des Pro-Enzyms von AtCEP2 in die Zellwand der Zellen in der „lateral root cap“ und in der Elongationszone**

Es ergibt sich die Fragestellung, wie das Pro-Enzym von AtCEP2 im Zuge der Gewebe-Remodellierung in die Zellwand transportiert wird.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Zellen der LRC lokalisiert und in diesen in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert ist. Eine Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der darunterliegenden Epidermis sowie wurzelaufwärts in der Epidermis der beginnenden Elongationszone war nicht nachweisbar (s. Abb. 38, 43; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Das Fehlen eines Signals des Pro-Enzyms von AtCEP2 in vom ER stammenden Organellen in der Epidermis der beginnenden Elongationszone kann möglicherweise über eine sehr geringe Menge an Pro-AtCEP2, die unter der Nachweisgrenze des verwendeten CLSM Fluoview FV 1000 liegt, erklärt werden. Die Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in vom ER stammenden Organellen in der Epidermis der beginnenden Elongationszone kann möglicherweise durch ein sensitiveres CLSM nachgewiesen werden. Das in der Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller) verwendete CLSM Leica SP8 scheint eine sensitivere Detektion als das CLSM Fluoview FV 1000 zu besitzen (s. Kap. 3.1.5.). Grundsätzlich erscheint es logisch, dass eine nur sehr geringe Menge des Pro-Enzyms von AtCEP2 in den Apoplasten der Zellwand dieser epidermalen Zellen freigelassen wird, da eine zu große Menge an AtCEP2 aufgrund ihrer ungewöhnlich breiten Substratspezifität zu unkontrolliert Zellkomponenten der Zellwand abbauen und der Zellwandstruktur schaden würde. Die maturierte Untereinheit von AtCEP2 ist sowohl in der Zellwand der LRC-Zellen als auch in der Zellwand von Epidermiszellen der

beginnenden Elongationszone nachweisbar (s. Anh. 6.3.; Kollaboration mit Universität Regensburg, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller).

Im Allgemeinen durchlaufen Proteine, die letztlich in den Apoplasten bzw. in die Zellwand sekretiert werden, einen Golgi-abhängigen Sekretionsweg. In diesem werden die synthetisierten Proteine in „coat protein II (COPII)“ Vesikeln vom ER zur Cis-Seite des Golgi-Apparates transportiert und durchwandern den Golgi-Apparat unter anderem in COPI Vesikeln. Hierbei werden die Proteine beispielsweise durch Glykosylierungen, die in komplexen Glycanen resultieren, modifiziert. An der Trans-Seite knospen die Proteine verpackt in „clathrin-coated“ Vesikeln oder in sekretorischen COP Vesikeln vom Golgi-Apparat ab und werden ins Cytoplasma entlassen. COP Vesikel vermitteln vorwiegend den Transport zu Protein-Speicher-Vakuolen (PSV), wohingegen „clathrin coated“ Vesikel meist für endo- und exocytotische Vorgänge verantwortlich sind (Barlowe et al., 1994; Herman and Schmidt, 2004; Tamura et al., 2004; Szul and Sztul, 2011; Day et al., 2013). In der Hülle beider vom Golgi-Apparat stammenden Vesikeln sind verschiedene Proteine bzw. Proteinkomplexe lokalisiert. Diese sind für das Andocken, die Fixierung und die Fusion der Vesikel mit den entsprechenden Membranen verantwortlich. In diesem Prozessablauf besitzen SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors) entscheidende Funktionen. Generell werden SNAREs in zwei Typen unterteilt: v-SNAREs sind auf der Vesikelhülle lokalisiert und t-SNAREs sitzen auf der Ziel-Membran. Erreicht ein vom Golgi-Apparat stammendes Vesikel den Zielbereich der entsprechenden Membran wird dieses mit Hilfe von „Halte-Komplexen“ fixiert und es bildet sich durch die Interaktion dieser beiden SNARE-Typen ein sogenannter trans-SNARE Komplex. Dieser leitet die Fusion des Vesikels mit der entsprechenden Membran ein, woraufhin der Vesikel-Inhalt sekretiert wird (Szul and Sztul, 2011; Kim and Brandizzi, 2012; Day et al., 2013; Kim and Brandizzi, 2015).

Grundsätzlich wird dieser Golgi-abhängige Sekretionsweg für alle Zellwand Remodellierungs-Proteine angenommen. Dies wurde beispielsweise für die Pektin-abbauenden Enzyme Pektinmethylesterasen und Polygalacturonase und darüber hinaus für das in der Zellexpansion beteiligte Enzym XTH nachgewiesen (Campbell and Braam, 1999; Micheli, 2001; Nakashima et al., 2004).

Für die in Ricinosomen gespeicherte RcCysEP konnte durch Kristallisation gezeigt werden, dass diese nicht glykosyliert ist (Than et al., 2004). Aufgrund des Fehlens einer Glykosylierung und durch Vorhandensein eines C-terminalen ER-Rückhaltesignals werden für RcCysEP bzw. KDEL CysEP ausschließlich Golgi-unabhängige Sekretionswege postuliert (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Im Allgemeinen sind für Proteine durchaus Golgi-unabhängige Sekretionswege, die in einer Membran-Fusion resultieren, bekannt. Beispielsweise werden die Pro-Enzyme der zwei Speicherproteine von *Cucurbita*, 11S Globulin und 2S Albumin, in 200-400 nm großen „precursor-accumulating (PAC)“ Vesikeln vom ER direkt zur PSV transportiert. Es findet eine Fusion der PAC Vesikel mit dem Tonoplast statt, sodass der Inhalt der PAC Vesikel in die PSV freigesetzt wird (Hara-Nishimura et al., 1998).

Zudem existieren für KDEL CysEP ähnliche Sekretionswege. In den Kotyledonen von keimenden *Vigna mungo* Samen wird das enzymatisch inaktive Pro-Enzym der KDEL CysEP SH-EP (SULFHYDRYL-ENDOPEPTIDASE) im ER in 200-500 nm große KDEL-Vesikel (KV) verpackt. Diese KV dienen dem Massentransport: Sie knospen vom ER ab und transportieren das Pro-Enzym von SH-EP Golgi-unabhängig auf direktem Weg zur PSV, um mit dieser zu fusionieren. Das sekretierte enzymatisch inaktive Pro-Enzym von SH-EP reift in der PSV aufgrund des vorliegenden pH-Werts in die entsprechende enzymatisch aktive reife Untereinheit. Diese Säure-abhängige Reifung des Pro-Enzyms von SH-EP kann zusätzlich von der Asparaginyl-Endopeptidase VmPE-1 (*Vigna mungo* PROCESSING ENZYME-1) unterstützt werden. Diese wird wiederum zeitgleich, aber räumlich getrennt vom Pro-Enzym von SH-EP in einem Golgi-abhängigen Sekretionsweg zur PSV transportiert (Toyooka et al., 2000; Okamoto et al., 2003).

Das C-terminale ER-Rückhaltesignal „KDEL“ scheint eine entscheidende Funktion in der Bildung der KV zu besitzen. Transgene Tabakpflanzen, die ein SH-EP Konstrukt ohne „KDEL“ exprimieren, zeigen keine Bildung von KV. Dennoch kann eine Lokalisation dieser Deletions-Enzyme in der PSV nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise sind diese Deletions-Enzyme darüber hinaus im Apoplasten lokalisiert. Des Weiteren wird mittels transgener *Arabidopsis* Linien, die ebenfalls ein SH-EP Konstrukt ohne „KDEL“ exprimieren, gezeigt, wie sich der unterschiedliche Gehalt an diesen Deletions-Enzymen auf die Entwicklung der Pflanze auswirkt. Transgene Linien mit einem geringen Gehalt an diesem Deletions-Enzym zeigen ein normales Wachstum wie *Arabidopsis* Wildtyppflanzen. Dagegen sind transgene Pflanzen mit einem mittleren Gehalt an diesem Deletions-Enzym in ihrer Entwicklung eingeschränkt und weisen eine sehr kleine Blattrosette auf. Bei einem hohen Gehalt an diesem Deletions-Enzym stirbt die entsprechende transgene Pflanze nach Ausbildung weniger Rosettenblätter. Im Gegensatz dazu zeigen transgene *Arabidopsis* Linien, die ein SH-EP-Konstrukt mit „KDEL“ exprimieren, die gleiche Entwicklung wie *Arabidopsis* Wildtyppflanzen. Übereinstimmend damit kann gezeigt werden, dass der Austausch des katalytischen Cysteins durch Glycin im SH-EP Konstrukt ohne „KDEL“ in den entsprechenden Pflanzen zur Rettung des Phänotyps führt und diese ebenfalls die gleiche Entwicklung wie

*Arabidopsis* Wildtyppflanzen aufweisen. Somit konnte bestätigt werden, dass der Verlust des ER-Rückhaltesignals „KDEL“ keinen Einfluss auf die Maturierung in die entsprechende reife Untereinheit besitzt. In den transgenen *Arabidopsis* Linien, die ein SH-EP Konstrukt ohne „KDEL“ exprimieren, sind diese Deletions-Enzyme ausschließlich im Apoplasten nachweisbar (Okamoto et al., 2003).

Unabhängig hiervon, zeigen transgene *Arabidopsis* Linien, die die KDEL CysEP LICYP ohne „KDEL“ aus *Lilium longiflorum* exprimieren, ebenfalls neben der „normalen“ vakuolären Lokalisation zusätzlich eine apoplastische Lokalisation des Deletions-Enzyms. Darüber hinaus ist bei diesen transgenen Pflanzen eine verfrühte Blattseneszenz, die zu einer verzögerten Entwicklung der Blattrosette führt, festzustellen. Ebenso zeigen transgene *Arabidopsis* Linien, die das LICYP-Konstrukt mit „KDEL“ exprimieren, die gleiche Entwicklung wie *Arabidopsis* Wildtyppflanzen. In diesen ist LICYP ausschließlich in der PSV lokalisiert. Hierfür wird ebenfalls ein Golgi-unabhängiger Transport vermutet (Battelli et al., 2014).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass das Fehlen des C-terminalen ER-Rückhaltesignals „KDEL“ einen Verlust der vom ER stammenden Organellen verursachen kann. Dies führt dazu, dass diese Deletions-Enzyme neben ihrem ursprünglichen Speicherort zusätzlich im Apoplasten akkumulieren. Wie diese Sekretion in den Apoplasten vermittelt wird, ob beispielsweise durch einen Golgi-abhängigen „default pathway“ oder in einem anderen möglicherweise unbekanntem neuen Sekretionsweg, ist unklar. Des Weiteren wird gezeigt, dass eine zu hohe Menge der Deletions-Enzyme ohne das „KDEL“ Motiv aufgrund ihrer ungewöhnlich breiten Substratspezifität in der Zellwand anscheinend die Zellkomponenten unkontrolliert abbaut und dies zur Letalität führen kann.

Im Zuge dieser Arbeit konnte mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers die maturierte Untereinheit von AtCEP2 in der Zellwand der LRC-Zellen sowie in der Zellwand von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone nachgewiesen werden. Der Einfach-Verlust von AtCEP2 bewirkt einen quantitativen Entwicklungs-Phänotyp: Die Primärwurzellänge ist in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen um ca. 40 % gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen reduziert (s. Abb. 26).

Ein Verlust des C-terminalen ER-Rückhaltesignals „KDEL“ würde analog der Deletions-Enzyme der KDEL CysEP SH-EP und LICYP wahrscheinlich auch in *Arabidopsis* einen apoplastischen Sekretionsweg für AtCEP vermitteln sowie in einem Verlust der vom ER stammenden Organellen resultieren. In den Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone sind zwar keine vom ER stammenden Organellen zu erkennen, was aber an dem geringen Gehalt an AtCEP2 in diesen Zellen liegen dürfte. Diese befinden sich unter der Nachweisgrenze des verwendeten CLSM Fluoview FV 1000. Des Weiteren kann *in vivo* eine autokatalytische Prozessierung des Pro-Enzyms von AtCEP2, die unter

anderem zur posttranslationalen Abspaltung des „KDEL“ Motivs führt, im ER-Lumen ausgeschlossen werden. Der Grund hierfür ist der im ER vorliegende pH-Wert von 7.7 (Martinière et al., 2013). Für die autokatalytische Prozessierung des enzymatisch inaktiven Pro-Enzyms von AtCEP2 und somit auch für die Abspaltung des ER-Rückhaltesignals „KDEL“ wird ein pH-Wert von 6.5 oder saurer benötigt (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Vielmehr erscheint es plausibel, dass Ricinosomen und Ricinosomen-ähnliche Organellen auf der einen Seite als „Suizid Bomben“ Speicherkompartimente für den PCD darstellen. Auf der anderen Seite könnten diese zusätzlich, wie PAC Vesikel und die für die KDEL CysEP typischen KV, ein Transportmittel zu Membranen darstellen, um mit diesen zu fusionieren.

Für ER-bodies wurde eine Funktion neben der Speicherung von Proteinen im Transport nachgewiesen. Einerseits ist unter Salzstress eine Fusion der ER-bodies mit Vakuolen zu beobachten (Hayashi et al., 2001). Andererseits fusionieren ER-bodies während der Pathogen-Abwehr und unter Metallstress mit der Plasmamembran und sekretieren ihren Inhalt in den Apoplasten (Watanabe et al., 2013; Nakano et al., 2014).

Außerdem scheint es möglich, dass das Pro-Enzym vorwiegend zwar Golgi-unabhängig, aber eine geringe Menge ebenso Golgi-abhängig sekretiert werden kann. Somit könnte das Pro-Enzym von AtCEP2 beispielsweise in „clathrin coated“ Vesikeln zur Plasmamembran transportiert und dort exocytotisch in den Apoplasten freigesetzt werden. Ebenso existieren in *Arabidopsis* für dasselbe Protein verschiedene Sekretionswege zu demselben Kompartiment. Die Pro-Enzyme der Papain-ähnlichen Cystein-Protease RD21 (RESPONSIVE TO DESICCATION 21) akkumulieren in gesunden Keimlingen in ER-bodies ubiquitär in allen epidermalen Zellen. Unter Salzstress fusionieren diese ER-bodies untereinander und darüber hinaus mit Vakuolen. In der Vakuole maturieren die enzymatisch inaktiven Pro-Enzyme von RD21 in die entsprechenden enzymatisch aktiven Untereinheiten und sind entscheidend am PCD beteiligt (Yamada et al., 2001; Hayashi et al., 2001). Somit werden die Pro-Enzyme von RD21 Stress-induziert in einem Golgi-unabhängigen Sekretionsweg in die Vakuolen freigesetzt. Des Weiteren wird RD21 im Zuge des PCD in einem Golgi-abhängigen Weg sekretiert (Ondzighi et al., 2008): In Endothelium-Zellen wird RD21 vom ER über den Golgi-Apparat in die Vakuolen transportiert. Das Endothelium ist die innerste Schicht der Integumente im sich entwickelnden Samen und umgibt die Endospermzellen des Embryosacks. Bei diesem Transport wird RD21 von PDI5 (PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE 5) begleitet, das sowohl als Chaperon für RD21 fungiert als auch die vorzeitige enzymatische Aktivierung von RD21 inhibiert. Der Verlust von PDI5 führt während der Embryo-Entwicklung zu einem vorzeitigen PCD der Endothelium-Zellen und zu einer Reduzierung der lebensfähigen Samen (Ondzighi et al., 2008).



### **3.1.5. AtCEP besitzen im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellseparation beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums**

Ebenso wie in der Elongationszone scheinen AtCEP im Zuge der Gewebe-Remodellierung während der Seitenwurzelentwicklung involviert zu sein: Sie unterstützen die Zellseparation beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums.

In *Arabidopsis* ist das endogene Hervortreten des Seitenwurzel-Primordiums ausschließlich durch Zellseparationen, die durch Zellwand Remodellierungs-Enzyme ausgeführt werden, bedingt. Hierbei durchdringt das Seitenwurzel-Primordium die überlagernden Zellschichten (Endodermis, Cortex, Epidermis), wobei bei diesem Prozess keine PCD-Abläufe feststellbar sind. Dieser Prozess ist zeitlich und räumlich exakt abgestimmt, um vorwiegend mechanische Hindernisse zu vermeiden (Péret et al., 2009b). Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Pro-Enzyme von AtCEP1 und AtCEP2 in den epidermalen Zellen, die direkt an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums liegen, akkumuliert sind.

Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist deutlich vor dem Entwicklungsstadium VII durchgehend bis das Seitenwurzel-Primordium die epidermale Zellschicht durchdrungen hat in einer bzw. zwei Epidermiszellen lokalisiert (s. Anh. 6.2.; Kollaboration mit Universität Regensburg, Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller). Über eine konsistente epidermale Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 bis ins Entwicklungsstadium LR, in dem das Seitenwurzel-Primordium bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten ist und als adulte Seitenwurzel definiert wird, kann keine Aussage getroffen werden, da dieses Stadium nicht untersucht wurde.

Die Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 ist ab dem Entwicklungsstadium VII durchgehend bis ins Entwicklungsstadium LR nachweisbar (s. Abb. 40). Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist genau in einer Epidermiszelle lokalisiert, die aufgrund der mechanischen Kräfte bei der Zellseparation für den Austritt des Seitenwurzel-Primordiums stark gebogen ist.

Mit dem verwendeten CLSM Fluoview FV 1000, das der AG Gietl für die Mikroskopie zur Verfügung stand, ist keine Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 vor dem Entwicklungsstadium VII nachweisbar. Des Weiteren kann mit dem verwendeten CLSM Fluoview FV 1000 keine Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums nachgewiesen werden. Mit dem in der Kollaboration der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes, Benedikt Müller) verwendeten CLSM Leica SP8 ist dagegen eine epidermale Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums detektierbar. Das CLSM Leica SP8 scheint eine sensitivere Detektion als das CLSM Fluoview FV 1000 zu besitzen. Demzufolge ist

möglicherweise mit dem CLSM Leica SP8 auch eine Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 vor dem Entwicklungsstadium VII an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums nachweisbar.

Für das Pro-Enzym von AtCEP3 konnten im Zuge dieser Arbeit keine subzellulären Daten erarbeitet werden. Mit Hilfe einer *AtCEP3::GUS* Expression wurde jedoch bereits eine Lokalisation in der Endodermis der Wurzel festgestellt (Helm et al., 2008).

#### 3.1.5.1. Der Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 bewirkt eine zeitliche Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten

Ob AtCEP eine Funktion in der Zellseparation während der Seitenwurzelentwicklung besitzt, wurde in einem sogenannten „bending assay“ analysiert. Hierbei wird durch Drehung der entsprechenden 7-10 d alten Keimlinge um 90 Grad die synchrone Bildung eines neuen Seitenwurzel-Primordiums induziert.

Der jeweilige Einfach-Verlust von AtCEP1, AtCEP2 oder AtCEP3 führt zu einer zeitlichen Verzögerung beim Durchdringen der Seitenwurzel-Primordia durch die überlagernden Zellschichten. Die jeweiligen Single-Mutanten zeigen mehr verzögerte Seitenwurzel-Primordia in der endodermalen, corticalen und epidermalen Zellschicht im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen. Übereinstimmend damit weisen die jeweiligen Single-Mutanten weniger bereits aus der Epidermis ausgetretene Seitenwurzel-Primordia als Col-0 Wildtyppflanzen auf (s. Abb. 41). Diese zeitliche Verzögerung ist beispielsweise aufgrund der verlangsamten Zellseparation der Epidermis bedingt durch den Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP2 verursacht. Der quantitative Entwicklungs-Phänotyp beim Einfach-Verlust von AtCEP3 ist wahrscheinlich durch die verlangsamte Trennung der endodermalen Zellschicht ausgelöst. Somit sind AtCEP in entscheidenden Funktionen der Zellseparation im Zuge der Gewebe-Remodellierung beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums involviert.

Generell sind bei dieser Zellseparation die gleichen Enzyme mit denselben Funktionen wie in der Zellelongation involviert (s. Kap. 1.5.). Die einzige Ausnahme stellen die Pektinmethylesterasen (PME) dar. Diese besitzen interessanterweise in diesen beiden Gewebe-Remodellierungen gegensätzliche Funktionen: In der Elongationszone lockern PME die hoch hydratisierte Pektin-Matrix, indem sie die Calciumbrücken zwischen Pektinen durch Veresterung der Carboxygruppen spalten (Micheli, 2001). In der Zellseparation während der Seitenwurzelentwicklung hingegen katalysiert PME1 die Demethylierung des in der Mittellamelle befindlichen Pektins durch Spaltung der Esterbindungen. Diese demethylierten Pektine werden von Pektin-Lyasen (PLA1, PLA2)

vorwiegend abgebaut. Es wird davon ausgegangen, dass diese Demethylierung der Grund für das Phänomen ist, dass ausschließlich die Zellwände der überlagernden Zellschichten für die Zellseparation erweicht werden. In den Zellwänden des Seitenwurzel-Primordiums weisen die Pektine der Mittellamellen einen hohen Anteil an Methylestern auf und werden deswegen nicht von Pektin-Lyasen abgebaut. Generell besitzen Pektin-abbauende Enzyme in der Zellseparation eine entscheidende Funktion, da die Mittellamelle der benachbarten Zellen vollständig voneinander getrennt werden muss. Im Gegensatz zur Zellelongation, bei der die Mittellamelle lediglich aufgeweicht werden muss (Marín-Rodríguez et al., 2002; Laskowski et al., 2006; Swarup et al., 2008; Vilches-Barro and Maizel, 2015).

Um eine Funktion in der Zellseparation ausüben zu können, müssen AtCEP in der Zellwand lokalisiert sein. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Lokalisation der enzymatisch aktiven maturierten Untereinheit von AtCEP2 in der Zellwand bei der Beteiligung an der Zellelongation gezeigt. Somit kann analog dazu vermutet werden, dass die entsprechenden reifen Untereinheiten von AtCEP in der Zellseparation ebenfalls in der Zellwand lokalisiert sind. Die enzymatisch aktiven Untereinheiten von AtCEP1 und AtCEP2 wären hierbei in der Zellwand der Epidermis (s. Abb. 40; Anh. 6.2.) und die enzymatisch aktive Untereinheit von AtCEP3 in der Zellwand der Endodermis lokalisiert (Helm et al., 2008).

In der Zellwand besitzen AtCEP im Zuge der Zellseparation beim endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums möglicherweise zwei wichtige Funktionen. Zum einen lockern sie die Zellwandstruktur, indem sie vermutlich die strukturgebenden und verfestigenden Extensine aufgrund ihrer ungewöhnlich breiten Substratspezifität abbauen. Dies führt zu einer erhöhten Flexibilität der Zellwand, sodass die entsprechenden Zellen im Zuge der Zellseparation verformbar werden. Zum anderen können AtCEP vermutlich auch im Auseinanderweichen der Zellen direkt involviert sein. Der Grund hierfür ist, dass HRGP, zu deren Familie Extensine als die wahrscheinlich wichtigsten und häufigsten Strukturproteine der primären Zellwand gehören, möglicherweise auch für den Pektin-Komplex in der Zellwand eine stabilisierende Funktion besitzen. Sie verknüpfen die Reste der Seitenketten der Pektine Rhamnogalacturonan-I und Rhamnogalacturonan-II, indem sie an beide Pektine kovalent binden und somit eine Verbindungsbrücke darstellen (Velasquez et al., 2012; Hijazi et al., 2014). Diese Verbindung könnte von AtCEP gespalten werden. Somit würden AtCEP eine direkte Funktion in der Trennung der Mittellamelle, die den wichtigsten Schritt für die Zellseparation darstellt, besitzen.

In *Arabidopsis* ist nur ein weiterer Entwicklungs-Phänotyp für ein Zellwand Remodellierungs-Enzym beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums bekannt. Der

Verlust der Glycosyl-Hydrolase GLH17 führt, ebenso wie der Verlust der AtCEP, zu einer Verzögerung beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums (Swarup et al., 2008).

Interessanterweise wird seit kurzem davon ausgegangen, dass der Austritt des Seitenwurzel-Primordiums nicht primär von den vorhandenen Zellwand Remodellierungs-Enzymen, sondern wahrscheinlich vorwiegend von den angeborenen Eigenschaften der Zellwand selbst abhängt (Roycewicz and Malamy, 2014): In einem groß angelegten Screen von Mutanten zeigten einige von diesen einen verfrühten Austritt des Seitenwurzel-Primordiums. Alle analysierten Mutanten wiesen Defekte in der Zusammensetzung ihrer primären Zellwand auf (Roycewicz and Malamy, 2014). Daraufhin wurde die Mutante *Ird5* (*lateral root development 5*) näher untersucht. *Ird5* trägt einen Defekt im Gen *XEG113*, das für die Xyloglucotransferase113 kodiert. In Extensinen ist dieses Enzym für die posttranslationale O-Glykosylierung der repetitiven Ser-(Hyp)<sub>3-4</sub> Elemente mit Arabinose verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass die Extensine dieser Mutante nur einfach oder doppelt mit Arabinose an den entsprechenden Hydroxyprolinen glykosyliert sind. Im Gegensatz dazu sind die Extensine in Wildtyppflanzen an den entsprechenden Hydroxyprolinen mit bis zu fünf Arabinose-Monomeren glykosyliert (Gille et al., 2009; Velasquez et al., 2011). Der geringere Gehalt an Arabinose führt zu einer Abnahme der Stabilität des strukturgebenden Extensin-Netzwerkes in der pflanzlichen Zellwand. Somit führt der Einfach-Verlust von LRD5/XEG113 dazu, dass einerseits die Länge von Wurzelhaaren aufgrund der fehlenden Stabilität der Zellwand reduziert ist (Velasquez et al., 2011). Andererseits begünstigt die fehlende Stabilität der Zellwand die Prozesse der Elongation. Diese Mutante zeigt ein elongiertes Hypokotyl und längere Petiolen der Rosettenblätter (Gille et al., 2009). Interessanterweise führt der Einfach-Verlust von LRD5/XEG113 zu keiner verlängerten Primärwurzel. Bei der Analyse der Seitenwurzelentwicklung konnte gezeigt werden, dass die Seitenwurzel-Primordia in *Ird5* Mutanten signifikant schneller alle überlagernden Zellschichten durchdringen als in Wildtyppflanzen. In *Ird5* Mutanten treten bei der gleichen Anzahl an Seitenwurzel-Primordia über fünfmal mehr Seitenwurzel-Primordia aus der parentalen Primärwurzel aus als in Wildtyppflanzen. Erstaunlicherweise ist LRD5/XEG113 vorwiegend in den epidermalen Trichoblasten an der Wurzelspitze lokalisiert. In den älteren Geweben der Wurzel ist nur eine schwache Akkumulierung von LRD5/XEG113 zu detektieren. In den Zellen um die endogene Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums ist sogar überhaupt keine Lokalisation von LRD5/XEG113 festzustellen. Dies bedeutet, dass das Gen *XEG113* eine Funktion in der frühen Formation der Zellwand besitzt und diese sich erst später während des Austritts des Seitenwurzel-Primordiums drastisch auswirkt. So konnte gezeigt werden, dass der Austritt des Seitenwurzel-Primordiums

maßgeblich von den angeborenen Eigenschaften der strukturgebenden Extensine in der Zellwand abhängt (Roycewicz and Malamy, 2014).

Die immense Bedeutung der HRGP für die Stabilität der Zellwand und somit für den Austritt der Seitenwurzel-Primordia wurde weiterführend analysiert. Das Gen *RAY1* (*REDUCED ARABINOSE YARIV1*) kodiert ebenso wie das Gen *XEG113* für eine Glycosyl-Transferase. *RAY1* ist für die posttranslationale O-Glykosylierung mit Arabinose für hoch-glykosylierte Arabinogalactan Proteine (AGPs) und nicht für Extensine verantwortlich (Gille et al., 2013). Der Einfach-Verlust von *RAY1* führt zu der höchsten Rate an verfrüht ausgetretenen Seitenwurzel-Primordia aller untersuchten Single-Mutanten mit Zellwand-Defiziten. Weiterführend bewirkt der Doppel-Verlust von *RAY1* und *LRD5/XEG113* eine noch höhere Rate an verfrüht ausgetretenen Seitenwurzel-Primordia und somit einen additiven Phänotyp (Roycewicz and Malamy, 2014). Somit wurde bewiesen, welche immense Bedeutung intakte HRGP auf die Stabilität der Zellwand besitzen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde das erste Mal für Extensin-abbauende Proteine gezeigt, dass ihr Verlust zu einem quantitativen Entwicklungs-Phänotyp in der Seitenwurzelbildung führt. Darüber hinaus ist grundsätzlich nur für ein weiteres Zellwand Remodellierungs-Enzym *GLH17* ein solcher Entwicklungs-Phänotyp überhaupt beschrieben. Es wäre weiterführend von Interesse, ob ein zusätzlicher Verlust von *AtCEP* im genetischen Hintergrund von *GLH17* Mutanten in einem additiven Phänotyp resultiert. Ebenso wäre es von Interesse, wie sich ein zusätzlicher Verlust von *AtCEP* im genetischen Hintergrund von *XEG113* Mutanten auf die verschiedenen Phänotypen bei Verlust von *LRD5/XEG113* auswirkt.

### 3.1.5.2. Funktionelle Redundanz der AtCEP sowie weiterer involvierter Zellwand Remodellierungs-Enzyme bewirken eine dosiert geringere Verzögerung beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums

Interessanterweise führt der Doppelverlust von AtCEP1 und AtCEP3 zwar zu einem verlangsamten Austritt des Seitenwurzel-Primordiums gegenüber Col-0 Wildtyppflanzen. Dieser verlangsamte Austritt scheint im Vergleich zu den entsprechenden Single-Mutanten von AtCEP jedoch schneller zu sein und sich der Austrittsgeschwindigkeit in Col-0 Wildtyppflanzen anzunähern. Darüber hinaus bewirkt der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* in Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* ebenso einen verlangsamten Austritt des Seitenwurzel-Primordiums. Dieser verlangsamte Austritt scheint im Vergleich zu den entsprechenden Single-Mutanten von AtCEP etwas schneller, im Vergleich zur Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* jedoch etwas langsamer zu verlaufen (s. Abb. 41).

Somit führen weder der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 noch der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* zu einem additiven Entwicklungs-Phänotyp, der sich in einem noch langsameren Austritt der Seitenwurzel-Primordia als bei einem Einfach-Verlust von AtCEP äußert. Dies kann einerseits durch funktionelle Redundanz der AtCEP zueinander erklärt werden. Andererseits könnten darüber hinaus zudem beispielsweise Cystein-Proteasen wie Metacaspasen gegenüber AtCEP funktionell redundant wirken.

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine funktionelle Redundanz der AtCEP zueinander zwar vorliegt, diese aber scheinbar erst nach dem Doppel-Verlust zweier AtCEP eintritt. Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist in den epidermalen Zellen am Ende des Filaments lokalisiert und höchstwahrscheinlich in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (s. Abb. 46). In diesen Zellen ist in Col-0 Wildtyppflanzen kein Pro-Enzym von AtCEP2 zu detektieren. Ein Einfach-Verlust von AtCEP1 bewirkt keine Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 in den epidermalen Zellen am Ende des Filaments. Ein Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 hingegen führt zu einer Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in wenigen Epidermiszellen am Ende des Filaments. Diese Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 erscheint zudem schwächer als die ursprüngliche Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in diesen Zellen (s. Abb. 47). Somit weisen AtCEP1 und AtCEP2 am Ende des Filaments eine funktionelle Redundanz trotz ihrer Gewebe-spezifischen Expressionen in Col-0 Wildtyppflanzen auf.

Eine funktionelle Redundanz von AtCEP2 beim Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 scheint auch während der Seitenwurzelentwicklung vorzuliegen. Hierbei würde beispielsweise in der Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* die in der Epidermis lokalisierte AtCEP2 teilweise die Funktion von AtCEP3, das in der Endodermis lokalisiert ist (Helm et

al., 2008), übernehmen. Allerdings kann die Zuhilfenahme von AtCEP2 nicht der alleinige Grund für den abgeschwächten quantitativen Entwicklungs-Phänotyp darstellen. Wenn dies der Fall wäre, müsste der quantitative Entwicklungs-Phänotyp in homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Pflanzen stärker sein. Diese Pflanzen müssten einen noch langsameren Austritt des Seitenwurzel-Primordiums als die entsprechenden Single-Mutanten der AtCEP zeigen. Stattdessen weisen die Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* einen verlangsamen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums auf, der im Vergleich zu den entsprechenden Single-Mutanten von AtCEP etwas schneller und im Vergleich zur Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* jedoch etwas langsamer zu verlaufen scheint (s. Abb. 41).

Grundsätzlich wird beim Verlust von Zellwand Remodellierungs-Enzymen von einer sehr hohen funktionellen Redundanz zueinander ausgegangen. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass erst ein einziger Entwicklungs-Phänotyp für das Zellwand Remodellierungs-Enzym GLH17 beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums entdeckt wurde (Swarup et al., 2008).

Neben ihren wichtigen Funktionen im Entwicklungs-PCD scheinen Cystein-Proteasen wie Metacaspasen (AtMC) zudem in der Gewebe-Remodellierung involviert zu sein (Tsiatsiani et al., 2013). AtMC sind in Geweben der Wurzel stark akkumuliert: AtMC5 ist ubiquitär in allen Zellschichten ab der Elongationszone wurzelaufwärts und AtMC4 sogar in der gesamten Wurzel akkumuliert. Darüber hinaus ist AtMC6 in corticalen sowie in endodermalen Zellen und AtMC8 in einigen wenigen Epidermiszellen lokalisiert (Bollhörner et al., 2013). Für AtMC9 wurde bereits die apoplastische Lokalisierung nachgewiesen und für alle weiteren Type II Metacaspasen wird diese vermutet (Vercammen et al., 2006; Tsiatsiani et al., 2013). Somit ist eine Beteiligung von Metacaspasen an der Zellseparation beim Austritt des Seitenwurzel-Primordiums aufgrund der nachgewiesenen bzw. vermuteten apoplastischen Lokalisation möglich.

Darüber hinaus scheint eine funktionelle Redundanz innerhalb der Klasse der Cystein-Proteasen denkbar. Demzufolge könnten Metacaspasen beim Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 bzw. beim Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* Funktionen der AtCEP während der Seitenwurzelentwicklung übernehmen. Es wäre deshalb von Interesse die Genexpressionen der in der Zellseparation involvierten Enzyme, wie beispielsweise Metacaspasen, in den jeweiligen AtCEP-Mutanten zu analysieren.

Zusammenfassend scheint es, dass aufgrund der immensen Bedeutung von intakten Extensinen für die Stabilität der Zellwand und der Fähigkeit von AtCEP bzw. KDEL CysEP diese abzubauen, bereits ein Einfach-Verlust von AtCEP den Entwicklungs-Phänotyp des verlangsamen Austritts des Seitenwurzel-Primordiums bewirkt. Der Doppel-Verlust von

AtCEP1 und AtCEP3 sowie der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* führt wahrscheinlich zu einer massiven funktionellen Redundanz innerhalb der involvierten Zellwand Remodellierungs-Enzyme.



### **3.2. Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in vom ER stammenden Organellen: ER-bodies und Ricinosomen-ähnliche Organellen**

In früheren Arbeiten der AG Gietl konnte bereits in *Arabidopsis* Keimlingen gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in der Columella, in der lateralen Wurzelhaube und an der Basis junger Blätter in runden Ricinosomen-ähnlichen Organellen lokalisiert ist. Des Weiteren akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP2 in den „non-protruding cell files“ des Hypokotyls in ER-bodies, nicht jedoch in den Stomata (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 an der Basis junger Blätter in den epidermalen Zellen nicht nur in Ricinosomen-ähnlichen Organellen, sondern zudem zusätzlich in ER-bodies gespeichert wird (s. Abb. 42).

#### **3.2.1. ER-Bodies und Ricinosomen-ähnliche Organellen sind Speicherkompartimente für das Pro-Enzym von AtCEP2 sowie für andere Proteine**

Durch Kreuzung mit einer ER-Lumen-Markerlinie konnte analysiert werden, dass in den vom ER stammenden Organellen, in denen das Pro-Enzym von AtCEP2 gespeichert ist, immer zusätzlich auch andere Proteine wie beispielsweise  $\beta$ -Glucosidasen akkumulieren. Darüber hinaus sind in den Zellen der LRC und in der Epidermis an der Basis junger Blätter auch Zellen zu beobachten, in denen es vom ER stammende Organellen gibt, die ausschließlich andere Proteine und kein Pro-Enzym von AtCEP2 speichern. In der Epidermis des Hypokotyls dagegen scheint Pro-AtCEP2 in jeder Zelle der „non-protruding cell files“ lokalisiert zu sein. Grundsätzlich sind in der Epidermis des Hypokotyls ausschließlich ER-bodies und in den Zellen der LRC einzig Ricinosomen-ähnliche Organellen als Speicherkompartimente vorhanden. In den epidermalen Zellen an der Basis junger Blätter finden sich dagegen beide vom ER stammenden Speicherorganellen. In jeder Epidermiszelle sind immer entweder Ricinosomen-ähnliche Organellen oder ER-bodies vorhanden. Interessanterweise gilt immer: Wenn Pro-AtCEP2 in einer Zelle in vom ER stammenden Organellen gespeichert ist, dann ist Pro-AtCEP2 in dieser Zelle in allen vom ER stammenden Organellen gespeichert (s. Abb. 42, 43).

Zusammenfassend bedeutet das, dass sowohl Ricinosomen-ähnliche Organellen als auch ER-bodies Speicherkompartimente für AtCEP2 bzw. AtCEP Proteasen sowie gleichzeitig zusätzlich für andere Proteine darstellen.

In der Pflanze stellen die 1  $\mu$ m großen, kugelförmigen Ricisomen im Allgemeinen ein temporäres Speicherkompartiment für die enzymatisch inaktiven Pro-Enzyme der KDEL CysEP dar und ihr Vorhandensein gilt im pflanzlichen Gewebe als Indikator für den beginnenden PCD. Daher werden die Ricinosomen auch als „Suizid-Bomben“ angesehen (Schmid et al., 1999; Than et al., 2004; Schaller, 2004; Helm et al., 2008; Senatore et al.,

2009; Hierl et al., 2012). In *Arabidopsis* scheinen die Ricinosomen-ähnlichen Organellen ebenfalls als „Suizid-Bomben“ zu fungieren, da das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Columella-Zellen exprimiert ist, in denen der PCD bevorsteht (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Des Weiteren besitzen Ricinosomen-ähnliche Organellen möglicherweise eine zweite Funktion als Transportmittel. Es konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Zellen der LRC in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert ist (s. Kap. 2.5.). In diesen Zellen ist AtCEP2 unter anderem während der Gewebe-Remodellierung in ihrer Elongation involviert (s. Kap. 2.4.). Eine Beteiligung von AtCEP2 in der Gewebe-Remodellierung an der Basis junger Blätter, an der eine flexible Gewebestruktur für die sich neu entwickelnden Primär- und Rosettenblätter zwingend notwendig ist, scheint ebenfalls plausibel.

In *R. communis* fungieren Ricinosomen im seneszierenden Endosperm von keimenden Samen vorwiegend als Speicherorganellen für KDEL CysEP (Schmid et al., 2001). In Nucellus-Zellen der reifenden Samen von *R. communis* ist dagegen in Ricinosomen zusätzlich ein diverses Spektrum an weiteren Proteinen enthalten (Greenwood et al., 2005).

ER-bodies hingegen gelten als Speicherkompartiment ausschließlich für  $\beta$ -Glucosidasen und sind darüber hinaus zudem nur in Pflanzen der Ordnung *Brassicales* zu finden. Sie bestehen aus einer mit Ribosomen-besetzten Membran, die eine charakteristische Spindel-förmige Gestalt mit einer Länge von 10  $\mu\text{m}$  und einer Breite von 1  $\mu\text{m}$  aufweist. ER-bodies sind die größten vom ER stammenden pflanzlichen Organellen. In *A. thaliana* finden sich ER-bodies ubiquitär in Keimlingen und in Wurzeln, jedoch selten in Rosettenblättern. Darüber hinaus werden sowohl nach der Behandlung mit Jasmonsäure als auch nach Verwundung *de novo* ER-bodies in Rosettenblättern gebildet. Somit scheinen ER-bodies auch in pflanzlichen Abwehrmechanismen involviert zu sein, wahrscheinlich vorwiegend gegen Herbivore. Grundsätzlich sind ER-bodies ausschließlich in den epidermalen Zellen der Pflanze akkumuliert (Hayashi et al., 2001; Matsushima et al., 2003; Nakano et al., 2014).

Die Bildung der ER-bodies wird über das Gen *NAI1* („nai“ bedeutet auf Japanisch: fehlen) reguliert, das für den Transkriptionsfaktor NAI1 kodiert. NAI1 stellt das Schlüsselprotein in der Bildung der ER-bodies dar, da es die Bildung von NAI2 stimuliert. NAI2 wiederum ist für die Bildung der ER-bodies verantwortlich und akkumuliert ausschließlich in diesen und nicht im ER (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2008). Des Weiteren ist NAI2 für die Organisation von ER-body Membranproteinen zuständig. Die Membranproteine MEB1 und MEB2 (MEMBRANE PROTEIN OF ENDOPLASMIC RETICULUM BODY1/2) agieren als Metalltransporter für Eisen und Mangan. Somit sind ER-bodies möglicherweise in

Abwehrreaktion gegen durch Metallionen induzierten oxidativen Stress oder gegen Pathogene involviert (Yamada et al., 2013)

ER-bodies gelten als Speicherkompartiment ausschließlich für  $\beta$ -Glucosidasen. Sie akkumulieren in großer Menge  $\beta$ -Glucosidasen mit C-terminalen ER-Rückhaltesignalen wie das Protein PYK10, auch BGLU23 (BETA GLUCOSIDASE 23) genannt, das als Hauptbestandteil identifiziert worden ist. Neben PYK10 sind noch sieben weitere  $\beta$ -Glucosidasen (BGLU18-25) mit C-terminalen ER-Rückhaltesignalen in geringer Menge in ER-bodies gespeichert (Nakano et al., 2014).

Es konnte gezeigt werden, dass im Hypokotyl und an der Basis junger Blätter in den konstitutiv vorhanden ER-bodies neben  $\beta$ -Glucosidasen auch AtCEP2 gespeichert werden. Somit stellen ER-bodies nicht nur für  $\beta$ -Glucosidasen, sondern auch für KDEL CysEP Speicherorganellen dar.

Interessanterweise fungieren ER-bodies unter anormalen Bedingungen nicht nur als Speicherkompartiment, sondern auch als Transportmittel. Unter Salzstress ist einerseits die Fusion von ER-bodies untereinander zu beobachten. Andererseits fusioniert die Single-Membran der ER-bodies mit dem Tonoplast und der gespeicherte Inhalt wird in die Vakuole sekretiert. Beide Fusionen sind begleitet von PCD (Hayashi et al., 2001). Eine Sekretion des Pro-Enzyms von AtCEP2 in die Vakuole würde aufgrund des vorliegenden pH-Werts unmittelbar in der autokatalytischen Prozessierung zur entsprechenden enzymatisch aktiven reifen Untereinheit resultieren (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Somit könnte AtCEP2 aktiv den stattfindenden PCD unterstützen. Des Weiteren fusionieren ER-bodies während der Pathogen-Abwehr und unter Metall-Stress mit der Plasmamembran und sekretieren ihren Inhalt in den Apoplasten (Watanabe et al., 2013; Nakano et al., 2014). Auch hier würde aufgrund des vorliegenden pH-Werts unmittelbar eine autokatalytische Prozessierung des Pro-Enzyms in die enzymatisch aktive reife Untereinheit von AtCEP2 stattfinden. Grundsätzlich ist eine Beteiligung von AtCEP2 bzw. AtCEP in der Pathogen-Abwehr durchaus denkbar. In der kompatiblen Interaktion mit *E. cruciferarum* wurde diese bereits für AtCEP1 und AtCEP3 gezeigt. AtCEP2 hingegen ist in dieser Interaktion nicht involviert (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.); s. Kap. 2.2., 2.3.). Das Pro-Enzym von AtCEP1 ist in der Pathogen-Abwehr allerdings nicht in vom ER stammenden Organellen gespeichert, sondern scheint ausschließlich im Netzwerk des ER akkumuliert zu sein (s. Abb. 10).

### **3.2.2. Der Verlust von ER-bodies führt zu einem Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2 im ER: keine Übernahme der Speicherung in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung**

Weiterführend wurde untersucht, ob der Verlust von ER-bodies eine Neubildung von Ricinosomen-ähnlichen Organellen induziert und ob diese die Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 übernehmen. Hierfür wurden Pflanzen der homozygoten *atnai1* (GK-136G06-012754) mit Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) für AtCEP2 im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, gekreuzt. Generell führt sowohl der Einfach-Verlust von NAI1 als auch der Einfach-Verlust von NAI2 zu einem vollständigen Fehlen der ER-bodies als Speicherorganellen (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2008).

Der Verlust von ER-bodies führt zu einem Rückstau des Pro-Enzyms von AtCEP2 im Netzwerk des ER. Es findet keine Übernahme der Speicherung in Ricinosomen-ähnlichen Organellen durch deren Neubildung statt (s. Abb. 44, 45). Des Weiteren bewirkt der Verlust von ER-bodies zugleich einen Rückstau der  $\beta$ -Glucosidase PYK10 im gesamten Netzwerk des ER (Yamada et al., 2008). In den Zellen der LRC und in den Epidermiszellen an der Basis junger Blätter sind nach wie vor Ricinosomen-ähnliche Organellen vorhanden (s. Abb. 44, 45). Somit ist der von *AtNAI1* kodierte Transkriptionsfaktor nicht für die Bildung Ricinosomen-ähnlicher Organellen, sondern vermutlich ausschließlich für die Bildung von ER-bodies verantwortlich.

Interessanterweise ist die Bildung der ER-bodies nicht zwingend von NAI1 abhängig. Nach Verwundung wird *de novo* die Bildung von ER-bodies trotz Fehlen des Transkriptionsfaktors NAI1 induziert. Allerdings sind diese neugebildeten ER-bodies von abnormer, elongierter Form. In diesen akkumuliert vorwiegend die  $\beta$ -Glucosidase BGLU18 und nicht die  $\beta$ -Glucosidase PYK10, die als Hauptbestandteil in den konstitutiv vorhandenen ER-bodies identifiziert worden ist (Nakano et al., 2014). Dies bedeutet, dass für die Neubildung der ER-bodies nach Verwundung ein anderer, noch unerforschter Transkriptionsfaktor als für die konstitutiv vorhandenen ER-bodies, deren Bildung von NAI1 abhängig ist, verantwortlich ist (Matsushima et al., 2004; Yamada et al., 2009; Ogasawara et al., 2009).

### **3.3. Mögliche Beteiligung der AtCEP im Programmierten Zelltod in der „lateral root cap“ sowie im Suspensor**

Neben ihrer gezeigten Beteiligung an der Gewebe-Remodellierung sind KDEL CysEP in den pflanzlichen Geweben akkumuliert, in denen der PCD bevorsteht, gerade initiiert wird oder die finalen Stufen des PCD in Form des Zellkollapses bereits stattfinden. Aufgrund ihrer für Endopeptidasen sehr ungewöhnlich breiten Substratspezifität spalten KDEL CysEP unspezifisch Zellkomponenten und gelten daher als „late-acting“ Proteasen (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012).

#### **3.3.1. AtCEP2 scheint im PCD in der „lateral root cap“ involviert zu sein**

In *Arabidopsis* Keimlingen konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 in der Wurzelspitze in Form eines „two band patterns“ detektierbar ist. Das Pro-Enzym von AtCEP2 wird in den Zellen der LRC sowie in der Columella in Ricinosomen-ähnlichen Organellen gespeichert (s. Abb. 43; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Generell gilt das Auftreten von Ricinosomen im pflanzlichen Gewebe als Indikator für den beginnenden PCD. Daher werden die Ricinosomen auch als „Suizid-Bomben“ angesehen (Schmid et al., 1999; Than et al., 2004; Schaller, 2004; Helm et al., 2008; Senatore et al., 2009; Hierl et al., 2012). In *Arabidopsis* scheinen darüber hinaus Ricinosomen-ähnliche Organellen ebenfalls als „Suizid-Bomben“ zu fungieren, da das Pro-Enzym von AtCEP2 in den Columella-Zellen exprimiert ist, in denen der PCD bevorsteht (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Die exakte zeitliche Ausführung des PCD ist in der Wurzelspitze entscheidend für die Länge der Primärwurzel (Fendrych et al., 2014). Generell besteht die LRC aus fünf Zellschichten, wobei die innerste Zellschicht nahe dem ruhenden Zentrum als die erste Zellschicht definiert ist und die jüngste darstellt. Die äußerste Zellschicht hingegen an der Wurzelspitze auf Höhe der „PCD Site II“ (s. Abb. 27) wird als fünfte Zellschicht festgelegt und ist die älteste. Der PCD wird in den Zellen der mittleren Zellschicht Nummer drei auf Höhe der Mitte der meristematischen Zone initiiert. Diese Zone wird „PCD buildup zone“ genannt. Der PCD selbst findet schließlich am Ende der meristematischen Zone fern der Wurzelspitze in der mittleren Zellschicht Nummer drei statt. Diese Zone wird wiederum als „PCD Site I“ (s. Abb. 27) bezeichnet. Der PCD gewährleistet hier am Ende der LRC eine fortdauernde Abschilferung der LRC-Zellen, sodass die beginnende Elongation der Zellschichten wurzelaufwärts gesichert ist. Der PCD wandert in dieser Zellschicht Nummer drei von Zelle zu Zelle in Richtung Wurzelspitze, um an dieser letzten Endes die „PCD Site II“ zu bilden. Hier schilfern die letzten Zellen der Zellschicht Nummer drei der LRC ab. Dieser Vorgang wird immer wieder in der nächst jüngeren Zellschicht in derselben

Art und Weise wiederholt (Wenzel und Rost, 2001; Rost, 2011; Fendrych et al., 2014; Yadyv und Helariutta, 2014).

AtCEP bzw. AtCEP2 scheinen in diesem PCD in der LRC nicht entscheidend involviert zu sein, da der Einfach-Verlust von AtCEP2 keine Störung des PCD bewirkt. In Keimlingen der homozygoten *atcep2 ko* findet der PCD nach wie vor statt und ist in den zwei distinkten Zonen der „PCD Site I“ (oberes Ende LRC) und der „PCD Site II“ (unteres Ende LRC) erkennbar. Darüber hinaus zeigen beide Zonen eine ähnliche Größe wie in Keimlingen des Col-0 Wildtyps (s. Abb. 32). Des Weiteren kann zudem eine funktionelle Redundanz der AtCEP untereinander in der LRC ausgeschlossen werden. Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitiger Herunterregulierung von *AtCEP2* bewirkt in Keimlingen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* ebenso keinen Verlust des PCD in der LRC. Es sind wiederum zwei distinkte Zonen der „PCD Site I“ und der „PCD Site II“ mit einer ähnlichen Größe wie in Keimlingen des Col-0 Wildtyps zu erkennen (s. Abb. 32). Somit zeigen sowohl homozygote Keimlinge der *atcep2 ko* als auch der *atcep\_triple-ko/kd* eine intakte Entwicklung der LRC. In beiden Genotypen ist lediglich die Verschiebung der jeweiligen „PCD Site I“ in Richtung Wurzelspitze zu erkennen. Diese resultiert aus der Verkürzung der LRC-Zelllängen und der damit verbundenen Reduktion der Länge der LRC (s. Abb. 28, 29, 30).

In *Arabidopsis* besitzt der PCD für die Entwicklung der LRC eine immense Bedeutung, da die exakte zeitliche Ausführung des PCD entscheidenden Einfluss auf das Abschilfern der LRC-Zellen und somit auf die Primärwurzellänge hat. Dieser PCD wird durch den Transkriptionsfaktor SMB (ANAC033/SOMBRERO) kontrolliert. SMB stellt hierbei den entscheidenden Regulator dar, da dieser zwingend für die Vorbereitung und für die Ausführung des PCD in der LRC erforderlich ist (Bennett et al., 2010; Fendrych et al., 2014). In *Arabidopsis* Wildtyppflanzen sind die Zelltod-assoziierten Proteasen Nuclease BFN1 (BIFUNCTIONAL NUCLEASE 1) und Aspartat-Protease PASPA3 (PUTATIVE ASPARTIC PROTEINASE A3) in beiden „PCD Sites“ in der LRC lokalisiert. Der Verlust von SMB resultiert in einer starken Abnahme der Expressionen von *BFN1* und *PASPA3*. Damit übereinstimmend führt der Verlust von SMB zu einem verzögerten PCD, der bewirkt, dass die LRC-Zellen am Ende der LRC nicht abschilfern können, sondern sich als lebende, intakte Zellen über die Epidermis der Elongationszone legen. Somit werden die epidermalen Zellen in der Elongationszone mechanisch in ihrer Elongation beeinträchtigt, was wiederum eine Verkürzung der Primärwurzellänge verursacht. Die LRC-Zellen hingegen werden passiv durch die Epidermiszellen zu einer abnormalen Länge elongiert, bis diese schließlich aufgrund der wirkenden physikalischen Kräfte zerreißen. Sie sterben dementsprechend in einem sogenannten Nicht-Programmierten Zelltod auf passive Art und Weise (Fendrych et al., 2014).

Interessanterweise führt der Einfach-Verlust von BFN1 zu einem sichtbaren PCD-Phänotyp, der sich in einer verzögerten Degradierung von DNA und RNA äußert. Der Einfach-Verlust von PASPA3 hingegen bewirkt keinen sichtbaren PCD-Phänotyp. Dies deutet daraufhin, dass der PCD in der LRC aus einem komplexen Zusammenspiel von einer Vielzahl an Proteasen besteht (Fendrych et al., 2014). Demzufolge ist eine partielle Involvierung von AtCEP2 im LRC-PCD trotz intakter „PCD sites“ und keinem sichtbaren PCD-Phänotyp denkbar. Dies würde zudem die massive Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der LRC in den als „Suizid-Bomben“ geltenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen erklären. Einen Rückschluss auf eine etwaige Beteiligung von AtCEP2 im LRC-PCD könnte eine Analyse der Genexpression von *AtCEP2* im genetischen Hintergrund von *AtSMB* Mutanten geben, da der Transkriptionsfaktor SMB als der Regulator für den PCD in der LRC gilt.

### **3.3.2. AtCEP1 besitzt möglicherweise eine Funktion im Zelltod-assoziierten Gewebe des Suspensors**

Neben AtCEP2 scheint zudem AtCEP1 eine Funktion im PCD in *Arabidopsis* zu besitzen. Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Pro-Enzym von AtCEP1 in allen Suspensor-Zellen während der Embryonalentwicklung ab dem Herz-Stadium bis zum „upturned-Stadium“ lokalisiert ist (s. Abb. 48). Über eine Lokalisierung in früheren Stadien der Embryonalentwicklung kann aufgrund der schwierigen Präparation keine Aussage getroffen werden.

Grundsätzlich stellen die Suspensor-Zellen ein pflanzliches Gewebe dar, das während der Embryonalentwicklung je nach Pflanze früher oder später immer stirbt. Der Suspensor variiert in allen Pflanzen in Gestalt und Größe von wenigen Zellen in *Arabidopsis* bis zu tausend Zellen in *Picea abies* (Kawashima and Goldberg, 2009).

Nach dem Start der Embryogenese in *Arabidopsis* durch Befruchtung der Eizelle, elongiert die Zygote bis zur dreifachen Länge ihrer ursprünglichen Größe. Danach teilt sich diese asymmetrisch, wobei die kleinere apikale Zelle die Gründerzelle für den „embryo proper“ und den späteren Keimling darstellt. Die größere basale Zelle hingegen entwickelt sich zu einer sogenannten extraembryonalen Hilfsstruktur, dem Suspensor. Der Suspensor besitzt nach einigen wenigen transversalen Zellteilungen mit anschließender Elongation eine Halm-ähnliche Form bestehend aus einer Zellreihe. Das Wachstum des Suspensor endet im Herzstadium des Embryos (Babu et al., 2013; Van Hautegeem et al., 2014). Die Aufgabe des Suspensors besteht generell darin, den Embryo in das Lumen des Samens zu drücken, sodass dieser vom Endosperm umgeben ist. Darüber hinaus vermittelt der

Suspensor in einigen Pflanzen möglicherweise den Transport von Nährstoffen und Hormonen (Kawashima and Goldberg, 2009).

In *Arabidopsis* stirbt der Suspensor spätestens im „upturned-Stadium“ der Embryonalentwicklung ab (Blanvillain et al., 2011). Der PCD in den Suspensor-Zellen wird hierbei beispielsweise von dem 25 Aminosäure großen Signalpeptid KOD (KISS OF DEATH) initiiert. KOD ist cytosolisch lokalisiert und leitet die Depolarisierung der mitochondrialen Membran ein (Blanvillain et al., 2011). Diese Depolarisation ist ein wichtiger Schritt im beginnenden PCD, der vor dem Zerplatzen der Vakuole stattfindet (Yu et al., 2002). Des Weiteren initiiert KOD Caspase-ähnliche Aktivitäten in den frühen Stufen des PCD im Suspensor. Im „upturned-Stadium“ des Embryos weisen Wildtyppflanzen lediglich noch 5 % Suspensoren mit völlig intakten Zellen auf. Der Verlust von KOD führt zu einem sechsfachen Anstieg an Suspensoren mit gänzlich intakten Zellen und somit zu einer Verzögerung der Initiierung des PCD in diesen Zellen. Die Überexpression von KOD wirkt sich sogar bis auf die Entwicklung der Keimlinge aus. Diese zeigen bei Überexpression von KOD nekrotische Regionen auf Kotyledonen und Primärblättern. Des Weiteren sind die Keimlinge zudem drastisch in ihrer Entwicklung eingeschränkt und nur bedingt lebensfähig (Blanvillain et al., 2011).

Interessanterweise verursacht der Verlust des PCD in Suspensor-Zellen in *Arabidopsis* keine sichtbaren Folgen für die Entwicklung des Embryos und des Keimlings (Blanvillain et al., 2011). In *Picea abies* dagegen besteht der Suspensor aus bis zu tausend Zellen und mehreren Zellreihen. Der Verlust des PCD in diesen Zellen führt dazu, dass sich die embryonalen Zellmassen nicht separieren können und verklumpen. Dies verursacht einen sehr kurzen Suspensor und führt letztlich zum Tod des Embryos (Bozhkov et al., 2004).

Neben dem PCD besitzt die Gewebe-Remodellierung eine weitere wichtige Funktion in der Ausbildung des Suspensors. In *Arabidopsis* enden die wenigen transversalen Zellteilungen mit anschließender Elongation im Herzstadium des Embryos. Das Gen *NIMNA/NMA* (alt-indisches Wort für „versunken“) kodiert für eine Pektin-abbauende Polygalacturonase NMA, die im Apoplasten der Suspensor-Zellen lokalisiert ist (Babu et al., 2013). Pektin stabilisiert das Zellwand-Gerüst und ist Hauptbestandteil der Mittellamelle (Peaucelle et al., 2012). Der Verlust von NMA führt zu einer reduzierten Elongation und zur Stauchung der Zellen im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Die Anzahl der Zellen dagegen bleibt unverändert. Darüber hinaus ist zudem die Elongation der embryonalen Zellen eingeschränkt. Interessanterweise elongieren diese aber ab dem Herz-Stadium des Embryos wieder und zwar in demselben Maße wie die embryonalen Zellen des Wildtyps. Somit führt der Verlust von NMA auf der einen Seite zu einer Verkürzung des Suspensors und zu einer zeitlichen Verzögerung der embryonalen



Entwicklung. Auf der anderen Seite zeigen die adulten Pflanzen jedoch keine Unterschiede in ihrer Entwicklung gegenüber Wildtyppflanzen (Babu et al., 2013).

AtCEP1 könnte im Zuge der Suspensor-Entwicklung sowohl im PCD als auch in der Gewebe-Remodellierung involviert sein. Für eine Beteiligung in der Zellelongation müsste das Pro-Enzym von AtCEP1 in den frühen Stadien der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Allerdings kann das Pro-Enzym von AtCEP1 aufgrund der schwierigen Präparation erst ab dem Herz-Stadium in Suspensor-Zellen analysiert werden. In diesem Stadium ist die Zellelongation bereits vollständig abgeschlossen (Babu et al., 2013). Darüber hinaus müsste die maturierte Untereinheit von AtCEP1 mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers in der Zellwand während der frühen Stadien der Embryonalentwicklung nachgewiesen werden. Grundsätzlich scheint es, dass AtCEP1 in dieser Gewebe-Remodellierung allenfalls sehr gering involviert ist. Hierfür wurden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen, die ein nicht funktionelles Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) exprimieren (s. Kap. 2.1.1., Abb. 3), analysiert. Diese zeigen keinen offensichtlichen Phänotyp in der Zellmorphologie, wie beispielsweise eine Stauchung der Suspensor-Zellen.

Generell ist der PCD des Suspendors in Col-0 Wildtyppflanzen im „upturned-Stadium“ weit fortgeschritten, sodass lediglich 5 % der Suspendoren völlig intakte Zellen aufweisen (Blanvillain et al., 2011). Eine Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in allen Suspensor-Zellen ist ab dem Herz-Stadium bis zum „upturned-Stadium“ des Embryos festzustellen. Das bedeutet, dass eine massive Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 bis in die Stadien der Embryonalentwicklung vorliegt, in denen der PCD unmittelbar bevorsteht. Zu diesem Zeitpunkt ist die Gewebe-Remodellierung bereits vollständig abgeschlossen. Darüber hinaus scheint es, dass Pro-Enzym von AtCEP1 in den vom ER stammenden 1  $\mu$ m großen Ricinosomen-ähnlichen Organellen im Cytoplasma gespeichert ist (s. Abb. 48). Ricinosomen bzw. Ricinosomen-ähnliche Organellen fungieren als „Suizid-Bomben“ in den finalen Stufen des PCD: Sie zerplatzen bedingt durch das Ansäuern des Cytoplasmas, das durch das Zerreißen der Vakuole verursacht wird, und sekretieren ihren Inhalt ins Cytoplasma. Demzufolge gilt ihr Vorhandensein im pflanzlichen Gewebe als Indikator für den beginnenden PCD (Schmid et al., 1999; Than et al., 2004; Schaller, 2004; Helm et al., 2008; Senatore et al., 2009; Hierl et al., 2012; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Diese dauerhafte Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP1 bis zum „upturned-Stadium“ des Embryos und das gleichzeitige Auftreten der als „Suizid-Bomben“ fungierenden Ricinosomen-ähnlichen Organellen belegen, dass AtCEP1 in den Suspensor-Zellen hauptsächlich bzw. wahrscheinlich ausschließlich eine Funktion im PCD zu besitzen scheint.

### **3.4. Funktion der AtCEP1 in der Pathogen-Abwehr während der kompatiblen Interaktion mit *Erysiphe cruciferarum***

Es konnte gezeigt werden, dass AtCEP1 neben ihren wichtigen Funktionen im Zuge der Entwicklung in der Gewebe-Remodellierung sowie im PCD zusätzlich eine Funktion in der Pathogen-Abwehr während der späten kompatiblen Interaktion gegen *Erysiphe cruciferarum* besitzen.

#### **3.4.1. AtCEP1 ist in die basale Resistenz von *Arabidopsis* gegen *E. cruciferarum* involviert**

Der Einfach-Verlust von AtCEP1 in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen (SAIL\_158\_B06) bewirkt den Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 7, 8, 16, 17). Des Weiteren sind zudem homozygote Pflanzen einer zweiten *atcep1 ko* (SALK\_013036) super-suszeptibel gegenüber *E. cruciferarum* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.)). Dieser Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität kann mit Hilfe eines funktionellen AtCEP1 Reporterkonstrukts ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) im *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) Hintergrund komplementiert werden. Dies führt dazu, dass diese komplementierten *atcep1 ko* Pflanzen die gleiche basale Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* wie Col-0 Wildtyppflanzen zeigen (s. Abb. 8). Darüber hinaus wird die basale Resistenz von *Arabidopsis* in Pflanzen der homozygoten *atcep1 ko* mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) nicht wiederhergestellt (s. Abb. 8). Des Weiteren kann eine Akkumulierung von AtCEP1 in der späten kompatiblen Interaktion mit *E. cruciferarum* festgestellt werden. Die Expressionen der Pro-Enzyme der funktionellen und nicht funktionellen AtCEP1-Reporterkonstrukte im *atcep1 ko* Hintergrund sind ab 7 dpi detektierbar (s. Abb. 9). Diese Akkumulierung von AtCEP1 korreliert mit dem Zeitpunkt des beginnenden Pathogenese-Phänotyps der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* bedingt durch den Verlust von AtCEP1. Neben dieser zeitlichen Assoziation besteht zudem eine räumliche Korrelation der Expression von AtCEP1. Die Penetration von *E. cruciferarum* induziert in einer Epidermiszelle *de novo* die Expression von AtCEP1 im gesamten ER während der späten Interaktion. Besonders um die gebildeten Haustorien ist eine sehr starke Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 im ER detektierbar (s. Abb. 10).

Zusammenfassend zeigen die Komplementierung des Pathogenese-Phänotyps mittels AtCEP1 und die zeitlich-räumliche Akkumulierung von AtCEP1 ab dem Zeitpunkt des beginnenden Pathogenese-Phänotyps bei Verlust von AtCEP1, dass AtCEP1 in die basale Resistenz von *Arabidopsis* gegen *E. cruciferarum* involviert ist.

### **3.4.2. AtCEP1 und AtCEP3 besitzen ähnliche Funktionen in der Beteiligung am Programmierten Zelltod zur Beeinträchtigung der Entwicklung von *E. cruciferarum***

Neben AtCEP1 besitzt zudem AtCEP3 eine Funktion in der Beeinträchtigung der Entwicklung von *E. cruciferarum*. Der Einfach-Verlust von AtCEP3 führt in homozygoten *atcep3 ko* Pflanzen ebenfalls zu einer Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 17). Dass dieser Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität durch Einfach-Verlust von AtCEP3 bewirkt wird, kann in zukünftigen Arbeiten durch zwei Möglichkeiten bestätigt werden: Mit einem funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP3 komplementierte Pflanzen der analysierten *atcep3 ko* müssen den gleichen Pathogenese-Phänotyp der Suszeptibilität wie Col-0 Wildtyppflanzen zeigen. Homozygote Pflanzen einer zweiten *atcep3 ko* müssen den gleichen Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität wie Pflanzen der bereits untersuchten *atcep3 ko* aufweisen.

Die Funktionen von AtCEP1 und AtCEP3 in der Beeinträchtigung der Entwicklung von *E. cruciferarum* liegen in ihrer Beteiligung am PCD. Der Einfach-Verlust von AtCEP1 bzw. AtCEP3 führt in den Pflanzen der jeweiligen Single-Mutante zu einer signifikanten Reduktion des epidermalen Zelltods während der späten Interaktion mit dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum*. Dies bedeutet, dass AtCEP1 und AtCEP3 für den in der späten Interaktion stattfindenden PCD erforderlich sind. Darüber hinaus schränkt AtCEP1 als weitere Abwehrreaktion in der späten Interaktion die vermehrte Bildung an Haustorien ein. AtCEP3 dagegen scheint keine Funktion in der Begrenzung der Haustorienbildung zu besitzen (s. Abb. 13, 14, 18).

Haustorien stellen wahrscheinlich die Zellen des erfolgreich penetrierten Pilzes dar, von denen Effektoren zur Suppression pflanzlicher Abwehrreaktionen, wie beispielsweise dem durch die „effector triggered immunity“ (ETI) ausgelösten PCD, freigesetzt werden (Jones and Dangl, 2006). Da AtCEP1 in der späten Interaktion räumlich und zeitlich direkt assoziiert ist, könnte AtCEP1 diese haustoriale Freisetzung an Effektoren einschränken und somit beispielsweise die Unterdrückung des PCD durch *E. cruciferarum* beeinträchtigen. Dies scheint plausibel, da bei Verlust von AtCEP1 die Abnahme der epidermalen PCD-Ereignisse gleichzeitig von einem Anstieg an gebildeten Haustorien begleitet ist. Grundsätzlich zeigen fast alle toten Epidermiszellen bei Vorhandensein von AtCEP1 in Wildtyppflanzen gleichzeitig auch gebildete Haustorien in derselben Zelle, die ein Indikator für die erfolgreiche Penetration des Pilzes sind (s. Abb. 13). Somit hängt die Super-Suszeptibilität von homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen gegenüber *E. cruciferarum* direkt mit der Reduktion des PCD und dem damit verbundenen Anstieg an Haustorien zusammen.

Die Funktion von AtCEP3 dagegen ist eher unklar. Einerseits unterstützt AtCEP3 wie AtCEP1 den epidermalen PCD in der späten Interaktion mit *E. cruciferarum*. Andererseits führt der Einfach-Verlust von AtCEP3 neben der Abnahme des epidermalen PCD nicht gleichzeitig zu einem Anstieg an gebildeten Haustorien (s. Abb. 18). Daher kann das erweiterte Pilzwachstum auf den super-suszeptiblen *atcep3 ko* Pflanzen nicht durch den Anstieg der gebildeten Haustorien erklärt werden. Dieselbe Anzahl an gebildeten Haustorien sowohl bei Vorhandensein als auch bei Verlust von AtCEP3 könnte bedeuten, dass AtCEP3 selbst direkt eine Funktion gegen den echten Mehltaupilz ausübt, indem es die Funktionalität der Haustorien einschränkt. Somit müsste die Anzahl der gebildeten Haustorien durch AtCEP3 nicht reduziert werden. Darüber hinaus wäre es denkbar, dass der Verlust von AtCEP3 generell eine Abnahme der basalen Resistenz bewirken könnte. Dies würde sich in einer reduzierten Menge an antimikrobiellen Proteinen und Phytoalexinen widerspiegeln. Demzufolge wäre eine vermehrte Bildung an Haustorien für ein erweitertes Pilzwachstum auf den super-suszeptiblen *atcep3 ko* Pflanzen nicht erforderlich.

AtCEP1 und AtCEP3 könnten auch direkt im Zuge des PCD agieren. Generell gelten KDEL CysEP wie AtCEP1 und AtCEP3 als „late-acting“ Proteasen, da sie aufgrund ihrer für Endopeptidasen sehr ungewöhnlich breiten Substratspezifität Zellkomponenten in den finalen Stufen des PCD unspezifisch verdauen können (Than et al., 2004; Hierl et al., 2012). Allerdings würde eine Funktion von AtCEP1 und AtCEP3 einzig im Ausführen des PCD nicht die Beeinträchtigung des Pilzwachstums erklären. Logischer wäre die Initiierung des epidermalen PCD durch AtCEP1 und AtCEP3, da dies das rechtzeitige Absterben des lebenden Gewebes garantieren würde. Hiermit wäre das Pilzwachstum beeinträchtigt, da das für den obligat biotrophen Pathogen zwingend benötigte lebende Gewebe nicht mehr vorhanden wäre (van Kan, 2006).

Generell ist der epidermale PCD erst spät in der kompatiblen Interaktion zwischen dem obligat biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum* und der suszeptiblen Wirtspflanze *Arabidopsis* zu beobachten. Dies unterscheidet diesen PCD von der „normalen“ Hypersensitiven Reaktion (HR), die früh rassenspezifisch, als Folge der durch die R-Proteine vermittelte ETI eingeleitet wird (Dangl and Jones, 2001; Martin et al., 2003; Dodds and Rathjen, 2010). Ob dieser epidermale Zelltod eher eine HR oder sogar einen neuen PCD-Type widerspiegelt, könnte durch Analyse der Zellkomponenten während des PCD-Vorgangs herausgefunden werden. Die HR ist als ein nicht-autolytischer PCD definiert. Dieser unterscheidet sich vom autolytischen bzw. Entwicklungs-PCD dahingehend, dass ein Platzen der Vakuole durch Zerreißen des Tonoplasten nur selten zu beobachten ist und falls dies der Fall ist, dann findet meist kein sofortiger und/oder kein

vollständiger Abbau der Zellkomponenten statt (van Doorn and Woltering, 2005; van Doorn, 2011).

Die Expression der *PR* Gene *PR1* und *PDF1.2* ist bei Einfach-Verlust von AtCEP1 dereguliert. Beispielsweise ist *PR1* in homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen beim Zeitpunkt 5 dpi im Vergleich zu Col-0 Wildtyppflanzen nur etwa zur Hälfte exprimiert (s. Abb. 15). Diese geringere Expression ist zeitlich direkt mit der Reduktion des epidermalen Zelltods in den homozygoten *atcep1 ko* Pflanzen korreliert. Somit könnte dies auf eine Funktion von AtCEP1 in der Kommunikation zwischen ER und Nucleus in der Expression der *PR* Gene hindeuten.

Generell ist über die Funktion von pflanzlichen Abwehrreaktionen und ihrer damit verbundenen Wirksamkeit in kompatiblen Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen wenig bekannt. Der epidermale PCD in der späten Interaktion könnte einerseits auf ein „absichtliches“ Scheitern des Pilzes für die Erhaltung der kompatiblen Interaktion über einen längeren Zeitraum hindeuten. Andererseits könnte der späte epidermale PCD eine effektive basale Abwehrreaktion seitens der suszeptiblen Wirtspflanze darstellen. Die aufgeführten Analyse-Ergebnisse zeigen, dass dieser epidermale PCD unter der genetischen Kontrolle der Wirtspflanze steht und dass dieser das Pilzwachstum in den späten Stufen der kompatiblen Interaktion partiell beeinträchtigt. Papain-ähnliche Cystein-Proteasen sind in Abwehrreaktionen während der Interaktion zwischen Wirtspflanze und Pathogen involviert. Sie werden in Folge des biotischen Stresses als Reaktion auf Pathogene exprimiert und fungieren oftmals als direkte oder indirekte Effektor-Targets für pathogene Effektor-Proteine. Im Allgemeinen wird davon ausgegangen, dass in einer kompatiblen Interaktion viele Abwehrmechanismen der suszeptiblen Wirtspflanzen durch pathogene Effektor-Proteine erfolgreich unterdrückt werden (Shindo and Van der Hoorn, 2008). Die Papain-ähnliche Cystein-Protease PIP1 (*PHYTOPHTHORA* *INHIBITED* *PROTEASE-1*) akkumuliert zur Pathogen-Abwehr gegen den biotrophen Oomycet *Phytophthora infestans* im Apoplasten und wird durch dessen Cystatin-ähnlichen Protease-Inhibitor EPIC2B gehemmt (Tian et al., 2007; s. Kap. 1.9.). Die große Bedeutung von Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen in der Pathogen-Abwehr wird dadurch deutlich, dass beispielsweise der biotrophe Oomycet *Phytophthora infestans* verschiedene Strategien entwickelt hat, den Papain-ähnlichen Cystein-Proteasen entgegenzuwirken. Das pathogene Avirulenzgen *AVRblb2*, das für ein RXLR-ähnliches Effektor-Protein kodiert, wird in der frühen Interaktion stark hochreguliert. Das AVRblb2 Effektor-Protein wird in die Wirtspflanze transloziert und ist daraufhin in der pflanzlichen Plasmamembran, vor allem um die gebildeten Haustorien, akkumuliert. Um das Haustorium verhindert AVRblb2 die Sekretion der Papain-ähnlichen Cystein-Protease C14 aus Kartoffel, ein Ortholog der RD21 aus *Arabidopsis*, in den Apoplasten.

Infolgedessen verringert sich der Proteingehalt an C14 im Apoplasten und es entsteht ein Rückstau, der in einem Anstieg von C14 im Cytoplasma resultiert. Dies bewirkt eine erhöhte Suszeptibilität der Wirtspflanze gegenüber dem Pathogen. Die Überexpression von C14 führt dagegen zu einer reduzierten Suszeptibilität gegenüber *P. infestans*. Die gleichzeitige Überexpression von AVRblb2 und C14 bewirkt erneut die ursprüngliche Suszeptibilität (Bozkurt et al., 2011).

Neben der späten Akkumulation von AtCEP1 in der kompatiblen Interaktion, könnte auch eine partielle Inhibierung von AtCEP1 durch Protease-Inhibitoren von *E. cruciferarum* erklären, dass kein qualitativer, sondern lediglich ein quantitativer Pathogenese-Phänotyp bei Einfach-Verlust von AtCEP1 zu finden ist. Ebenso ist für AtCEP3 eine partielle Inhibierung denkbar. Des Weiteren deutet die Expression von AtCEP1 in der späten Interaktion möglicherweise auf eine Hormonregulation des Proteins hin. Derselbe Wirkmechanismus scheint ebenfalls für AtCEP3 plausibel zu sein. Eine Beteiligung an der „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) hingegen, die hauptsächlich in der frühen Immunantwort ausgelöst wird, ist eher unwahrscheinlich, da AtCEP1 erst in der späten Interaktion mit dem biotrophen Pathogen *E. cruciferarum* involviert ist.

### **3.4.3. AtCEP Proteasen sind in der kompatiblen Interaktion mit *E. cruciferarum* zueinander nicht funktionell redundant**

Im Gegensatz zu AtCEP1 und AtCEP3 ist AtCEP2 nicht in der basalen Resistenz von *Arabidopsis* gegen *E. cruciferarum* beteiligt. Ein Einfach-Verlust von AtCEP2 in homozygoten *atcep2 ko* Pflanzen bewirkt keinen Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum*. Stattdessen zeigen Pflanzen der homozygoten *atcep2 ko* die gleiche Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum* wie Col-0 Wildtyppflanzen (s. Abb. 16, 19).

Ein Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 resultiert in dem gleichen Pathogenese-Phänotyp der Super-Suszeptibilität wie der Einfach-Verlust von AtCEP1 oder AtCEP3 (s. Abb. 17). Damit übereinstimmend zeigen homozygote *atcep3 x atcep1 ko* Pflanzen die gleiche Reduktion an epidermalen Zelltod-Ereignissen in der späten Interaktion wie die jeweiligen Single-Mutanten (s. Abb. 18). Dies bedeutet, dass die Phänotypen der jeweiligen Single-Mutanten nicht additiv sind. Zudem scheinen die verbliebenen PCD-Ereignisse unabhängig von AtCEP1 und AtCEP3 zu sein. Darüber hinaus zeigt es möglicherweise, dass AtCEP1 und AtCEP3 in demselben Reaktionsweg, aber in verschiedenen Stufen agieren.

Der Doppel-Verlust von AtCEP1 und AtCEP3 mit gleichzeitigem „Knockdown“ von *AtCEP2* veranlasst in Pflanzen der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* ebenso keine erweiterte Super-Suszeptibilität (s. Abb. 20). Somit scheinen die drei AtCEP Proteasen in der Pathogen-Abwehr in der Beeinträchtigung der Entwicklung des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* zueinander nicht funktionell redundant zu wirken.

Grundsätzlich ist der Col-0 Hintergrund, den alle analysierten Mutanten aufweisen, überaus suszeptibel gegenüber *E. cruciferarum*, da beinahe 80 % der Penetrationen in einem gebildeten Haustorium der kompatiblen Interaktion resultieren (Huesmann et al., 2011). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein noch suszeptiblerer genetischer Hintergrund der Doppel- und Triple-Mutante für diese einen Pathogenese-Phänotyp der noch erweiterten Super-Suszeptibilität bewirken würde.

#### **3.4.4. Subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in der späten Interaktion mit *E. cruciferarum*: Akkumulation um die Callose-Einkapselungen des haustorialen Komplexes und in der Callose-Einkapselung**

Während der späten Interaktion mit *E. cruciferarum* wird die Expression von AtCEP1 in Rosettenblättern *de novo* induziert. In einer Epidermiszelle akkumuliert das Pro-Enzym von AtCEP1 im gesamten Netzwerk des ER, vor allem um die gebildeten Haustorien (s. Abb. 10). Interessanterweise ist keine Speicherung des Pro-Enzyms von AtCEP1 in vom ER stammenden Organellen erkennbar. In der Entwicklung sind AtCEP1 und AtCEP2 üblicherweise in den vom ER stammenden Speicherkompartimenten, den ER bodies und den Ricinosomen-ähnlichen Organellen, gespeichert (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.); s. Kap. 2.5., 2.6., 2.7.). Dagegen scheint es, dass AtCEP1 in der Pathogen-Abwehr direkt vom ER freigesetzt werden könnte. Der Grund hierfür könnte die zeitliche Dringlichkeit sein, sodass AtCEP1 in der späten Pathogen-Abwehr unmittelbar benötigt wird und die Speicherung in vom ER stammenden Organellen entfallen kann.

In Pflanzen existiert neben dem vorwiegend stattfindenden Golgi-abhängigen, zusätzlich der Golgi-unabhängige Sekretionsweg. Darüber hinaus gibt es in Pflanzen für Proteine weitere „unkonventionelle“ Sekretionswege (Ding et al., 2012). Beispielsweise wird eine cytoplasmatisch lokalisierte Mannitol-Dehydrogenase zur Pathogen-Abwehr Salicylat-abhängig in einem Golgi-unabhängigen Sekretionsweg in den Apoplasten freigesetzt (Cheng et al., 2009; Drakakaki and Dandekar, 2013). Für KDEL CysEP bzw. AtCEP werden ausschließlich Golgi-unabhängige Sekretionswege postuliert (Than et al., 2004; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Im Zuge der Pathogen-Abwehr wäre eine direkte Sekretion des Pro-Enzyms von AtCEP1 in den Apoplasten oder beispielsweise in die extrahaustoriale Matrix aufgrund eines „undichten“ ER denkbar. Erneute Inokulation mit *E. cruciferarum* von ER-Markerlinien, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP1 (*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL*) exprimieren, könnten darüber Aufschluss geben.

In der späten Interaktion ist das Pro-Enzym von AtCEP1 im gesamten Netzwerk des ER und besonders um die Haustorien akkumuliert (s. Abb. 10). Dieses Phänomen ist üblicherweise in der frühen Interaktion zu beobachten, bei der an der Papille Fokussierungen von Mikrotubuli und Aktinfilamenten zu beobachten sind, die an dieser zur Akkumulation von Zellkern, Golgi-Apparat und ER führen. Somit können Enzyme Papillen-Komponenten direkt am Ort des Geschehens synthetisieren (Hückelhoven, 2007a and b; Eichmann and Hückelhoven, 2008).

Während der frühen Interaktion mit *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* akkumuliert das ER um die Penetrationsstelle in Epidermiszellen von *Arabidopsis* (Takemoto et al., 2006). Ebenso ist in der frühen Interaktion zwischen *Hordeum vulgare* und *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* eine Konzentrierung des ER unterhalb des Appressoriums in Epidermiszellen



festzustellen, wobei das ER den unreifen haustorialen Komplex umhüllt (Eichmann and Hückelhoven, 2008). In der frühen Interaktion zwischen *Golovinomyces cichoracearum* und *Arabidopsis* ist in infizierten Epidermiszellen ein dichtes Netzwerk des ER um die Penetrationsstelle zu beobachten, das den sich entwickelnden haustorialen Komplex eng umhüllt. Die Akkumulation des ER konzentriert sich vorwiegend am Hals des haustorialen Komplexes (Koh et al., 2005). In der kompatiblen Interaktion zwischen *Pisum sativum* und *Erysiphe pisi* akkumuliert das ER in infizierten Epidermiszellen ebenfalls um den haustorialen Komplex. Interessanterweise ist diese Re-Organisation des ER nicht nur in der frühen Interaktion, sondern durchgehend auch in der späten Interaktion festzustellen (Lecki et al., 1995).

Die subzelluläre Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 in penetrierten Epidermiszellen in der späten Interaktion mit *E. cruciferarum* konnte mit Hilfe von zwei verschiedenen dreidimensionalen Signal-Rekonstruktionen gezeigt werden.

In der ersten Rekonstruktion ist das Pro-Enzym von AtCEP1 sowohl an der Zelloberfläche als auch weiter im Zellinneren um die gebildeten Haustorien akkumuliert (s. Abb. 11). Darüber hinaus ist das Pro-Enzym von AtCEP1 im Inneren des Haustoriums akkumuliert und das EGFP-Signal von Pro-AtCEP1 ähnelt einer Einstülpung (s. Abb. 11).

In der zweiten Rekonstruktion ist das Pro-Enzym von AtCEP1 ausschließlich im Zellinneren seitlich um die Callose-Einkapselung, die den haustorialen Komplex umschließt, und nicht an der Zelloberfläche lokalisiert (s. Abb. 12). Zudem scheint es, dass das Pro-Enzym von AtCEP1 seitlich von außen durch die Callose-Einkapselung dringt (s. Abb. 12). Zusätzlich ist eine Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 innerhalb der Callose-Einkapselung festzustellen (s. Abb. 12). Diese ist nicht uniform innerhalb der Einkapselung lokalisiert, sondern hauptsächlich an der Stelle, an der unten in der Callose-Umhüllung eine deutliche Öffnung vom Zellinneren aus erkennbar ist. Ob diese Öffnung in der Callose-Einkapselung durch AtCEP1 oder durch andere Proteine verursacht wurde, kann nicht geklärt werden. Wahrscheinlicher ist, dass es sich bei dieser Öffnung um Lücken in der unvollständigen Callose-Einkapselung handelt.

Aufgrund der subzellulären Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP1 scheint es, dass AtCEP1 eine direkte Funktion in der Abwehr gegen Haustorien besitzt. Dies ist durchaus plausibel, da der Verlust von AtCEP1 zu einem signifikanten Anstieg an gebildeten Haustorien in der späten Interaktion mit *E. cruciferarum* führt (s. Abb. 14).

Die Lokalisation eines im ER lokalisierten Proteins um die Penetrationsstelle und damit verbunden eine direkte Beteiligung in der Pathogen-Abwehr ist in der frühen Interaktion zwischen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* und *Hordeum vulgare* festgestellt worden (Eichmann et al., 2006). Der Suszeptibilitätsfaktor BI-1 (BAX INHIBITOR-1) ist ein konserviertes Zelltodinhistor-Protein und in der ER-Membran lokalisiert. In der frühen

Interaktion akkumuliert BI-1 in den Epidermiszellen unterhalb des appressorialen Keimschlauches in der unmittelbaren Nachbarschaft zu gebildeten Papillen. Diese Lokalisation deutet auf eine direkte Beteiligung in Abwehrmechanismen, die eine Penetrationsresistenz gewährleisten, hin. Damit übereinstimmend, führt die Überexpression von BI-1 zu einer geringeren Wasserstoffperoxid-Akkumulation an der versuchten Penetrationsstelle und zu einer erhöhten Suszeptibilität (Eichmann et al., 2006).

Im Falle einer erfolgreichen Penetration akkumuliert BI-1 ebenfalls um die penetrierten Papillen, wobei eine starke Expression von BI-1 um den haustorialen Hals zu beobachten ist. Zusätzlich ist BI-1 in geringerem Maße um den haustorialen Komplex lokalisiert: Es co-lokalisiert mit einem Membran-umhüllten Kompartiment, das den haustorialen Körper umgibt. Bei diesem Kompartiment handelt es sich vermutlich um einen Teil des haustorialen Komplexes, da dieses keine für das ER typische netzartige Strukturen aufweist (Eichmann et al., 2006).

Mittels der durchgeführten dreidimensionalen Signal-Rekonstruktionen kann nicht differenziert werden, ob die Akkumulation des Pro-Enzyms von AtCEP1 innerhalb der Callose-Einkapselung ausschließlich zwischen der Callose-Einkapselung und dem haustorialen Komplex oder zusätzlich innerhalb des haustorialen Komplexes lokalisiert ist. In der kompatiblen Interaktion zwischen *Pisum sativum* und *Erysiphe pisi* ist in den infizierten Epidermiszellen die stärkste Re-Organisation des ER nahe der extrahaustorialen Membran zu beobachten. Diese Konzentrierung des ER ist nicht nur in der frühen Interaktion, sondern durchgehend auch in der späten Interaktion festzustellen. Es wird vermutet, dass das ER während der Interaktion möglicherweise physikalisch mit der extrahaustorialen Membran verbunden ist, beispielsweise durch Verankerungen an unterschiedlichen Stellen. Somit ist die Re-Organisation des ER möglicherweise in der Exocytose von neuen Membran- und Matrixmaterialien für den wachsenden haustorialen Komplex involviert (Lecki et al., 1995).

Wenn in der späten Interaktion zwischen *E. cruciferarum* und *Arabidopsis* ebenfalls eine Verschmelzung des ER mit der extrahaustorialen Membran stattfindet, könnte AtCEP1 aus dem „undichten ER“ in die extrahaustoriale Membran und extrahaustoriale Matrix sekretiert werden. AtCEP1 könnte aufgrund der ungewöhnlich breiten Substratspezifität der KDEL CysEP unspezifisch Proteinbestandteile der extrahaustorialen Matrix oder der haustorialen Zellwand des echten Mehltaupilzes abbauen und somit dessen Wachstum einschränken.

Die Lokalisation eines Wirt-Proteins in der extrahaustorialen Membran ist überaus selten. Bislang konnte ausschließlich für das als R-Protein klassifizierte RPW8.2 (RESISTANCE TO POWDERY MILDEW8.2) eine Lokalisation in der extrahaustorialen Membran

nachgewiesen werden. RPW8.2 akkumuliert in *Arabidopsis* in dieser Membran während der frühen Interaktion mit *Golovinomyces cichoracearum*. Hierbei initiiert RPW8.2 lokal sowohl die Bildung zur erweiterten Einkapselung des haustorialen Komplexes als auch die Akkumulation von Wasserstoffperoxid zur Hemmung des Haustoriums (Wang et al., 2009). Die Herkunft der extrahaustorialen Membran ist nach wie vor ungeklärt. Sie umschließt das Haustorium vollständig und trennt dieses vom Cytoplasma der Wirtszelle (Micali et al., 2008). In ihrer Struktur unterscheidet sich die extrahaustoriale Membran von der Plasmamembran der Wirtspflanze, da einige Plasmamembran-Proteine nicht in der extrahaustorialen Membran lokalisiert sind. Es werden zwei Modelle für die Bildung der extrahaustorialen Membran während der Entwicklung des haustorialen Komplexes angenommen. Im ersten Modell wird beschrieben, dass sich die extrahaustoriale Membran aus der Invagination der Plasmamembran bildet, wobei das haustoriale Halsband möglicherweise Proteine der invaginierenden Plasmamembran selektioniert. Dies würde die unterschiedlichen Proteinzusammensetzungen beider Membranen erklären. Das zweite Modell geht von einer *de novo* Synthese der extrahaustorialen Membran aus (Koh et al., 2005).

### **3.4.5. AtCEP1 leistet einen Beitrag im AtCPR5-kontrollierten Programmierten Zelltod während der Interaktion mit *E. cruciferarum***

Die öffentlichen Genexpressions-Daten der *Arabidopsis* Mutante *atcpr5* (GEO accession GSE5745; Genevestigator: Zimmermann et al., 2004) zeigen eine signifikante Hochregulierung des *AtCEP1* Transkripts. Der Verlust von AtCPR5 führt unter anderem zu einem deregulierten PCD, der sich in der Bildung spontaner nekrotischer Blattläsionen auf jungen Rosettenblättern äußert (Bowling et al., 1997; Brininstool et al., 2008).

Im Zuge dieser Arbeit konnte mit Hilfe einer Transkript-Analyse von *AtCEP1* in der *atcpr5* Mutante belegt werden, dass die Hochregulierung von *AtCEP1* zeitlich direkt mit dem Auftreten von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen übereinstimmt. Kongruierend damit, ist *AtCEP1* in asymptotischen Rosettenblättern nicht überexprimiert (s. Abb. 21). Dies könnte bedeuten, dass AtCPR5 möglicherweise einen Regulator von AtCEP1 darstellt und darüber hinaus AtCEP1 den vom AtCPR5-kontrollierten PCD unterstützt.

Generell agiert AtCPR5 in der Pathogen-Abwehr als ein negativer Regulator der durch die ETI ausgelöste HR und dem damit verbundenen PCD (Wang et al., 2014). Der Verlust von AtCPR5 bewirkt eine konstitutive Expression der SA-, JA- und ET-abhängigen *PR*-Gene und damit zusammenhängend eine konstitutive Resistenz gegenüber vielen biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 2000; Orjuela et al., 2013; Wang et al., 2014). Im Zuge dieser Arbeit konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der Verlust von AtCPR5 in den Pflanzen der homozygoten *atcpr5* Mutante zudem zu einer vollständigen Resistenz gegenüber *E. cruciferarum* führt (s. Abb. 23). Somit agiert AtCPR5 in der Pathogen-Abwehr in entgegengesetzter Wirkweise zu AtCEP1. Der Verlust von AtCPR5 resultiert in einer konstitutiven Resistenz und in einem vermehrt stattfindenden PCD, wohingegen der Verlust von AtCEP1 die Suszeptibilität erhöht und die epidermalen PCD-Ereignisse reduziert.

Darauffolgend wurde untersucht, ob die Hochregulierung von *AtCEP1* die Ursache für die konstitutive Resistenz der *atcpr5* Mutante gegenüber Pathogenen ist. Der Verlust von AtCEP1 führt in Pflanzen der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante zu keiner aufkommenden Suszeptibilität gegenüber *E. cruciferarum*. Pflanzen der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante zeigen die gleiche konstitutive Resistenz wie Pflanzen der *atcpr5* Mutante (s. Abb. 23). Somit bewirkt der Verlust von AtCEP1 auf makroskopischer Ebene keinen Einfluss auf den Pathogenese-Phänotyp der *atcpr5* Mutante. Dies bedeutet, dass der Pathogenese-Phänotyp der *atcpr5* Mutante epistatisch über dem Pathogenese-Phänotyp der *atcep1 ko* steht.

Dagegen zeigt die mikroskopische Analyse, dass AtCEP1 im AtCPR5-kontrollierten PCD bei gleichzeitigem Stress durch die Interaktion mit *E. cruciferarum* einen Beitrag leistet. Hierfür wurden *atcep1 x atcpr5* Doppelmutanten, die zusätzlich ein nicht funktionelles

AtCEP1-Reporterkonstrukt ohne die Untereinheit von AtCEP1 ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) exprimieren, untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivität von *AtCEP1* zeitlich und räumlich direkt mit dem PCD, der in Form von sichtbaren nekrotischen Blattläsionen auf Rosettenblättern zu erkennen ist, assoziiert ist (s. Abb. 22). Der Verlust von AtCEP1 führt in der *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante unter dem Infektionsstress des echten Mehлтаupilzes zu einer signifikanten Reduktion der nekrotischen Läsionsfläche bevor diese Läsionen mit bloßem Auge zu erkennen sind (s. Abb. 24).

Diese räumlich-zeitliche Assoziation von AtCEP1 einerseits im AtCPR5-kontrollierten PCD und andererseits in der späten Interaktion mit *E. cruciferarum* könnte im Kontext mit anderen Genen, die ebenfalls räumlich und/oder zeitlich mit dem PCD in der Pathogen-Abwehr assoziiert sind, interessant sein. Beispielsweise vermitteln die im Nucleus lokalisierten Salicylsäure-Rezeptoren NPR3 und NPR4 (NON-EXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED Genes3/4) die Degradierung von NPR1 durch das Proteasom. Dies geschieht räumlich-zeitlich abhängig vom vorliegenden zellulären Salicylsäure-Gradienten. In der Pathogen-Abwehr erhöht sich der Salicylsäure-Gehalt ausgelöst als Folge der ETI in der infizierten Zelle und nimmt aber in den benachbarten Zellen zur Infektionsstelle ab. Bei einem hohen Salicylsäure-Gehalt wird NPR1 degradiert und leitet den PCD ein. Dagegen findet in den benachbarten Zellen eine Akkumulation von NPR1 statt, die zur Limitierung des PCD und gleichzeitig zur Etablierung der systemisch erworbenen Resistenz führt (Fu et al., 2012). Es wäre von Interesse, Funktionen der AtCEP im genetischen Hintergrund von *NPR*-Mutanten zu analysieren.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die drei KDEL-Cystein-Endopeptidasen in *Arabidopsis* im Zuge der Gewebe-Remodellierung Funktionen in der Zellwanderweichung für die Elongation sowie für die Zellseparation besitzen. Zudem sind AtCEP im Programmierten Zelltod in der Abwehr gegen den obligat biotrophen Ascomycet *Erysiphe cruciferarum* involviert. Dies ist eine neue Funktion für AtCEP im Programmierten Zelltod zur bereits belegten Funktion im Entwicklungs-PCD.

Aufgrund der ungewöhnlich breiten Substratspezifität der KDEL CysEP wäre es zukünftig von Interesse, wie die Auswahl der Substrate, die in einer enzymatischen Reaktion von diesen umgesetzt werden, seitens der Pflanze reguliert ist. Ebenso ist die weitere Erforschung der Regulierung von KDEL CysEP interessant, ob diese neben der bekannten pH-abhängigen autokatalytischen Prozessierung beispielsweise direkt durch Hormone reguliert werden.

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Klonierungsstrategien der funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3**

Für die biochemische Analyse und zur mikroskopischen Lokalisation der drei KDEL-Cystein-Endopeptidasen in *Arabidopsis* AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 werden transgene funktionelle und nicht funktionelle Reporterkonstrukte konzipiert. Diese funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte werden unter der Kontrolle des jeweiligen respektiven endogenen Promotors zur Expression translationaler Fusionsproteine von AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 kloniert. Die Sequenzen für die jeweiligen respektiven endogenen Promotoren bestehen aus ca. 2000 Basenpaare (bp), die „upstream“ zum Startcodon „ATG“ liegen. Diese Sequenzen hatten sich bereits bei der Klonierung der *Promotor::GUS* Konstrukte für AtCEP bewährt (Helm et al., 2008). Die jeweiligen Promotoren mit der benachbarten 5'UTR sowie die kodierenden Regionen der Pre-Pro-Sequenzen und die jeweiligen Untereinheiten mit den benachbarten 3'UTR werden von genomischer Wildtyp Col-0 DNA (isoliert mittels CTAB) amplifiziert. Der dreifache Hämagglutinin-tag (HA-tag) wird vom Vektor pNigel18 amplifiziert (Geldner et al., 2009). Die entsprechenden Fluoreszenzproteine werden von folgenden Vektoren amplifiziert: EGFP aus pESZ-CL (Cutler et al., 2000), mCherry aus pNigel17 (Geldner et al., 2009), mTFP1 aus pNigel19 (Geldner et al., 2009) und mCerulean aus pNigel18 (Geldner et al., 2009). Die jeweiligen amplifizierten PCR-Produkte werden in folgende Vektoren kloniert: AtCEP1-Reporterkonstrukte in pGreen 0029 (Kanamycin Resistenz), AtCEP2-Reporterkonstrukte in pGreen 0179 (Hygromycin Resistenz) und AtCEP3-Reporterkonstrukte in pGreen 0229 (Basta Resistenz) (Hellens et al., 2000).

Funktionelle Reporterkonstrukte:

*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL* (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.))

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.1.)

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mTFP1-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.2.)

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mCerulean-AtCEP3-KDEL* (s. Anh. 6.1.3.)

Nicht funktionelle Reporterkonstrukte:

*P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL* (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.))

*P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mCerulean-KDEL* (s. Anh. 6.1.4.)

Die funktionellen Reporterkonstrukte enthalten die kodierenden Sequenzen für den dreifachen HA-tag und das jeweilige Fluoreszenzprotein zwischen der Pre-Pro-Sequenz und der jeweiligen Untereinheit. Um die Spaltstelle intakt zu halten, werden darüber hinaus die drei N-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Untereinheit C-terminal zur Pro-Sequenz direkt vor dem dreifachen HA-tag platziert (s. Abb. 3; Für Sequenzen und verwendete Primer s. Anh. 6.1., 7.1., 7.2.).

Zusätzlich werden transgene nicht funktionelle Reporterkonstrukte kloniert. Bei diesen werden anstelle der jeweiligen Untereinheit ausschließlich die acht C-terminalen Aminosäuren für AtCEP1 bzw. die sieben C-terminalen Aminosäuren für AtCEP2 und AtCEP3 inklusive des ER-Rückhaltesignals „KDEL“ der jeweiligen Untereinheit zur Klonierung verwendet. Davon N-terminal werden die kodierenden Sequenzen für den dreifachen HA-tag und das jeweilige Fluoreszenzprotein C-terminal zur Pre-Pro-Sequenz eingefügt. Um die Spaltstelle intakt zu halten, werden wiederum die drei N-terminalen Aminosäuren der jeweiligen Untereinheit C-terminal zur Pro-Sequenz direkt vor dem dreifachen HA-tag platziert (s. Abb. 3; Für Sequenzen und verwendete Primer s. Anh. 6.1., 7.1., 7.2.).

Alle Plasmide werden sequenziert und anschließend durch Elektroporation (s. Kap. 4.4.2.) in den elektrokompetenten Agrobakterienstamm C58 pGV3101 (Van Larebeke et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (bakterielle Resistenzmarker gegen Antibiotika Rifampicin und Gentamycin) (Koncz and Schell, 1986; Ferrando et al., 2000) transformiert.

Die so erhaltenen funktionellen und nicht funktionellen Reporterkonstrukte für AtCEP1, AtCEP2 und AtCEP3 werden nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998) (s. Kap. 4.4.12.) in Col-0 Wildtyppflanzen transformiert. Zusätzlich wird das funktionelle und nicht funktionelle Reporterkonstrukt für AtCEP1 mittels „floral dipping“ in homozygote *atcep1 ko* Pflanzen (SAIL\_158\_B06) transformiert.

Alle erhaltenen Reporterpflanzen werden auf den entsprechenden Antibiotika selektioniert. Es werden jeweils acht homozygote Transformanten bezüglich ihrer Expressionsstärke am CLSM (für Anregung und Emission der jeweiligen Fluorochrome s. Kap. 4.6.3.) analysiert. Die drei homozygoten Transformanten, mit der höchsten Expression werden für die weitere Analyse verwendet.

## **4.2. Verwendete Mutanten**

### **4.2.1. T-DNA Insertionslinien für *AtCEP1*, *AtCEP2* und *AtCEP3***

#### *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06)

Die homozygote *AtCEP1* Insertionslinie (SAIL\_158\_B06), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion zu Beginn des dritten Exons. Der *Knockout* von *AtCEP1* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen, da kein entsprechendes Transkript in Keimlingen der *atcep1 ko* amplifiziert werden kann (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.)).

Verwendete Primer:

fw: GCGCTTTGCATGCTTATGGTTC (bindet 21 bp „downstream“ zum Startcodon)

rv: CCACAAAGTCCTTCTTTATGACG (bindet 88 bp „upstream“ zum Stopcodon)

Zur mikroskopischen Analyse der Redundanz von AtCEP werden homozygote *atcep1 ko* Pflanzen (SAIL\_158\_B06) mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL*) nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998) (s. Kap. 4.4.12.) transformiert.

#### *atcep2 ko* (SALK\_079519)

Die homozygote *AtCEP2* Insertionslinie (SALK\_079519), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion im zweiten Exon. Der *Knockout* von *AtCEP2* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen. Hierbei wird kein Transkript für *AtCEP2* in Keimlingen der *atcep2 ko* nachgewiesen (s. Abb. 4).

Verwendete Primer:

fw: GATATTTCTCTTTTCTCTTGTC (bindet 17 bp „downstream“ zum Startcodon)

rv: CTAGAGCTCATCTTTGACATCACC (bindet am Stopcodon)

Homozygote *atcep2 ko* Pflanzen (SALK\_079519) werden zweimal mit Col-0 Wildtyppflanzen reziprok gekreuzt, um etwaige andere Mutationen im Genom zu entfernen.



*atcep3 ko* (SALK\_016791)

Die homozygote *AtCEP3* Insertionslinie (SALK\_016791), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine T-DNA Insertion in der 5'UTR 18 Basenpaare N-terminal zum Startcodon „ATG“. Der *Knockout* von *AtCEP3* wird mittels einer RT-PCR, bei der Primer verwendet werden, die die kodierende Region mit der 5'UTR des Gens inklusive der T-DNA Insertion umspannen, bewiesen, da kein entsprechendes Transkript in Keimlingen der *atcep3 ko* amplifiziert werden kann (s. Abb. 5).

Verwendete Primer:

fw: CCTCAATCATATACCATAAAAGGC (bindet 75 bp „upstream“ zum Startcodon)

rv: GCAGGTTCCATGAGACCTCCTGC (bindet im zweiten Exon)

Homozygote *atcep3 ko* Pflanzen (SALK\_016791) werden zweimal mit Col-0 Wildtyppflanzen reziprok gekreuzt, um etwaige andere Mutationen im Genom zu entfernen.

*atcep3 ko x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06)

Aus den homozygoten Single-Mutanten *atcep3 ko* (SALK\_016791) (zweimal zurückgekreuzt) und *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) wird durch Kreuzung die Doppel-Mutante *atcep3 x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) generiert. Der *Knockout* von *AtCEP3* und *AtCEP1* wird mit den bereits beschriebenen Primern erneut mittels RT-PCR bestätigt und somit die damit verbundene Homozygotie bewiesen.

Zur mikroskopischen Analyse der Redundanz von AtCEP werden Pflanzen der homozygoten Doppelmutante *atcep3 ko x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) mit einem nicht funktionellen Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL*) nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998) (s. Kap. 4.4.12.) transformiert.

#### **4.2.2. Erzeugung einer *triple-knockout/knockdown*-Mutante durch Doppel-Verlust von *AtCEP1* und *AtCEP3* und gleichzeitiger Herunterregulierung von *AtCEP2***

Eine Triple-Mutante *atcep\_triple-ko* mit Insertionen in allen drei *AtCEP* Genen ist schwer durch Kreuzung zu generieren, da *AtCEP2* und *AtCEP3* „in tandem“ auf Chromosom 3 liegen. Aus diesem Grund wird die homozygote Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) mit *AtCEP2*-RNAi-Konstrukten transformiert. Zur Unterdrückung der Expression von *AtCEP2* wird der Vektor pHANNIBAL sowie der Vektor pART27, der das NotI-Fragment von pHANNIBAL akzeptiert (CSIRO Plant Industry, CANBERRA ACT 2601, Australia), verwendet. Es wird ein repräsentatives Produkt für *AtCEP2* aus der 3'UTR, das 134 bp umfasst, von TAMU-BAC T29H11 als BamHI/XhoI-Fragment und als ClaI/KpnI-Fragment amplifiziert. Hierfür werden folgende Primer verwendet:

fw: AACGGATCCTCGAGAGACTTTAAGTCATTGAAAAC TG  
 rv: TGGATCGATGGTACCTGCTGGCCAATATTACAAGGAG

Dieses PCR-Produkt wird als ein BamHI-ClaI- und XhoI-KpnI-Fragment in den Vektor pHANNIBAL kloniert. Das daraus resultierende Plasmid wird als NotI-Fragment in den Vektor pART27 kloniert. Dieses finale Plasmid wird in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm pGV3010::PMP90 elektroporiert.

Pflanzen der homozygoten Doppelmutante *atcep3 x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06) werden mit diesen *AtCEP2*-RNAi-Konstrukten und gleichzeitig mit dem nicht funktionellen *AtCEP2* Reporterkonstrukt (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL*; s. Abb. 3; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)) nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998) (s. Kap. 4.4.12.) transformiert.

Aus dieser Transformation erhält man elf homozygote *atcep\_triple-ko/kd* Linien, die bezüglich ihrer *AtCEP2* Expression mittels qRT-PCR (s. Kap. 4.4.11.) analysiert werden. Die zwei Linien mit der stärksten Herunterregulierung der *AtCEP2*-Expression sind die Linie 2.21 auf durchschnittlich 0.5 % und die Linie 3.14 auf durchschnittlich 2 % (s. Abb. 6). Das nicht funktionelle Reporterkonstrukt für *AtCEP2* ist ebenfalls herunterreguliert, sodass kein Signal des Fluoreszenzproteins mCherry am CLSM nachweisbar ist. Dies beweist überdies die Funktionalität der *AtCEP2*-RNAi-Konstrukte und den damit verbundenen „Knockdown“ von *AtCEP2*.

### **4.2.3. Weitere Mutanten**

#### *atcpr5-2* Punktmutante (NASC stock code N3770)

Die analysierte *atcpr5-2* Mutante (NASC stock code N3770), die einen Col-0 Hintergrund aufweist, besitzt eine Punktmutation im vierten Exon, die zu einem Stopcodon führt (Trp477stop) (Boch et al., 1998; Bowling et al., 1994). Diese *atcpr5-2* Punktmutante wird im folgenden Text als *atcpr5* Mutante bezeichnet.

Junge Pflanzen der *atcpr5* Mutanten zeigen neben Zwergwuchs, eine verfrühte Kotyledonen-Seneszenz und junge Rosettenblätter weisen Bereiche spontaner nekrotischer Blattläsionen auf (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 2000; Brininstool et al., 2008).

Es wird eine visuelle Vorauswahl von 2-3 Wochen alten Pflanzen der *atcpr5* Mutanten getroffen: Die kleinsten Pflanzen mit den deutlichsten Blattläsionen werden zur Genotypisierung mittels PCR verwendet. Es wird ein 653 bp langes Fragment, das die Hälfte des vierten Exons inklusive dem Stopcodon und 6 bp der 3'UTR umspannt, mit folgenden Primern amplifiziert:

fw: GGCTCCTCGTAAGTGTCTTCAGC  
rv: GGTCTGACTATGCTTGAGACGAG

Das amplifizierte PCR-Produkt wird mit folgenden Primern sequenziert und die homozygote Punktmutation bestätigt:

fw: CGATCATCAGGTACGAAGC  
rv: GTCACGTTTATAGGACCG

#### *atcep1 x atcpr5* (SAIL\_158\_B06 x NASC stock code N3770)

Aus den homozygoten Single-Mutanten *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) und *atcpr5* (NASC stock code N3770) wird durch Kreuzung die Doppel-Mutante *atcep1 x atcpr5* (SAIL\_158\_B06 x NASC stock code N3770) generiert.

Die Homozygotie der *atcep1 ko* wird durch die beschriebenen Primer (s. Kap. 4.2.1.) und die Punktmutation der *atcpr5* Mutante durch erneutes Sequenzieren bestätigt.

### *atnai1* (GK-136G06-012754)

Zur Untersuchung der vom ER stammenden Organellen wird die T-DNA Insertionsmutante *atnai1* (GK-136G06-012754; Col-0 Hintergrund; Matsushima et al., 2004), bei der sich die Insertionsstelle in der 5'UTR 67 Basenpaare N-terminal zum Startcodon „ATG“ befindet, verwendet. Das Gen *AtNAI1* kodiert für den Transkriptionsfaktor AtNAI1, der alleine für die Bildung von ER-bodies in *Arabidopsis* verantwortlich ist (Matsushima et al., 2004). Diese sind ausschließlich in den epidermalen Zellen akkumuliert (Hayashi et al., 2001).

Die Keimlinge von *atnai1* werden mittels PCR mit folgenden Primern auf Homozygotie genotypisiert:

fw: CACTCGACCACATTACATAAC (bindet 161 bp „upstream“ zum Startcodon)

rv: CTTCAAGAACTGTTGCCTTGTC (bindet zu Beginn des zweiten Exons)

Die homozygoten *atnai1* Pflanzen (GK-136G06-012754) werden mit Pflanzen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, gekreuzt. Von dieser *atnai1* x *AtCEP2* Linie werden 7 d alte Keimlinge zur Untersuchung der vom ER stammenden Organellen am CLSM analysiert.

Der *Knockout* von *AtNAI1* kann in dieser gekreuzten Linie am CLSM bestätigt werden: Es sind keine ER-bodies in den epidermalen Zellen von *Arabidopsis* akkumuliert.

## **4.3. Anzucht von Organismen**

### Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit werden ausschließlich *Arabidopsis thaliana* Pflanzen des Ökotyps Col-0 verwendet.

Die entsprechenden Samen werden in 80 % EtOH mit 0.1 % Triton-x-100 für 30-40 min unter Schütteln sterilisiert. Die Samen werden sedimentiert, der Überstand wird steril abgenommen und mit sterilem H<sub>2</sub>O mQ wieder aufgenommen. Die Samen werden erneut fünf Minuten geschüttelt und anschließend sedimentiert. Dieser Vorgang wird fünfmal wiederholt.

Die entsprechenden Samen werden auf MS-Agarplatten (gegebenenfalls mit Antibiotika) einzeln ausgebracht und zur Stratifizierung für etwa 48 h bei 4°C gelagert. Die Keimung erfolgt bei 22°C und Dauerlicht (250 µE/m<sup>2</sup>s). Nach zehn bis zwölf Tagen werden die Keimlinge in Pflanzentöpfe mit Einheitserde und einer Bodenschicht aus Perlit pikiert. Das weitere Wachstum findet in Phytokammern (Convion, Kanada) unter

Langtagbedingungen (16 h Licht, 65% rel. Luftfeuchte, 22°C und 8 h Dunkelheit, 75% rel. Luftfeuchte, 18°C) statt.

MS-Medium (pro Liter):        2.5 ml 400x Mikrosalze  
   100 ml 10x Makrosalze  
   10 g Saccharose  
   1 g MES  
   pH-Wert auf 5.8 mit KOH einstellen  
   9 g Agar (wenn Platten gegossen werden)  
   Antibiotika werden nach dem Autoklavieren dem  
   handwarmen Medium steril zugegeben

Mikrosalze (pro Liter):        27.8 mg  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 37.2 mg  $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
   0.75 mg KI, 10 mg  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 3 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  
   2 mg  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.25 mg  $\text{Na}_2\text{MoSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ ,  
   0.025 mg  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 0.025 mg  $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$

Makrosalze (pro Liter):        16.5 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 19 g  $\text{KNO}_3$ , 1.7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  
   4.4 g  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , 3.7 g  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

Erde: Fruhstorfer Einheitserde Typ T

#### Anzucht von *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgt bei 37°C über Nacht mit den entsprechenden Antibiotika entweder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten.

LB-Medium (pro Liter):        10 g Trypton  
   5 g Hefeextrakt  
   10 g NaCl  
   pH-Wert mit NaOH auf 7.0 einstellen  
   18 g Agar (wenn Platten gegossen werden)  
   Antibiotika werden nach dem Autoklavieren dem  
   handwarmen Medium steril zugegeben

#### Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgt bei 28°C für 2-3 d mit den entsprechenden Antibiotika entweder in LB-Flüssigmedium im Schüttler bei 200 rpm oder auf LB-Agarplatten.

#### **4.4. Molekularbiologische Methoden**

##### **4.4.1. Transformation chemisch kompetenter *E. coli* mit rekombinanter DNA**

Für diese Transformation werden 10-20 µl eines Ligationansatzes (s. Kap. 4.4.6.) oder 1 µl Plasmid-DNA mit 80 µl auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten Zellen (XL1-blue, Tetracyclin, Stratagene, Heidelberg) in einem 2 ml Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Daraufhin wird dieser Ansatz für 30 Sekunden in einem Wasserbad bei 42°C inkubiert. Anschließend wird der Reaktionsansatz für 2 min auf Eis gekühlt. Es werden 900 µl SOC-Medium zugegeben und unter Schütteln für 1 h inkubiert. Im Anschluss wird dieser Transformationsansatz auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

SOC-Medium (pro Liter):     5 g Hefeextrakt  
                                  10 g Pepton  
                                  10 g NaCl  
                                  20 mM Glucose  
                                  10 mM MgSO<sub>4</sub>  
                                  10 mM MgCl<sub>2</sub>

##### **4.4.2. Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens* mit rekombinanter DNA**

Die Transformation elektrokompetenter *A. tumefaciens* erfolgt in einem Elektroporator (Parameter: U= 2000 V, R= 700Ω, C= 25 µF, T=17.5 ms). Verwendet wurde der elektrokompetente Agrobakterienstamm C58 pGV3101 (Van Larebeke et al., 1974) mit Ti-Plasmid pMP90 (bakterielle Resistenzmarker gegen Antibiotika Rifampicin und Gentamycin) (Koncz and Schell, 1986; Ferrando et al., 2000).

Die elektrokompetenten Agrobakterien werden langsam auf Eis aufgetaut. 80 µl dieser kompetenten Zellen werden mit 1 µl Plasmid-DNA in einer Elektroporationsküvette gemischt und unter den oben genannten Parametern elektroporiert. Anschließend werden die Zellen mit 600 µl LB-Medium versetzt und für ca. 1 h bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach Sedimentation dieses Reaktionsansatzes wird der Überstand abgenommen und das Pellet in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Dieses resuspendierte Pellet wird auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und für 2-3 d bei 28°C inkubiert.



#### **4.4.6. Ligation von DNA**

Die entsprechenden komplementären Enden des verdauten Vektors werden vor der Ligation dephosphoryliert, um die Re-Ligation der linearisierten DNA-Fragmente zu minimieren. Einem 20 µl Ansatz eines Restriktionsverdau werden 1 µl alkalische Phosphatase (NEB) sowie 2.5 µl 10x Puffer und 1.5 µl H<sub>2</sub>O mQ zugegeben. Die Dephosphorylierung erfolgt bei 37°C für ca. 30 min. Anschließend wird das Enzym denaturiert, indem der Reaktionsansatz 20 min bei 65°C inkubiert wird.

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wird der linearisierte, dephosphorylierte Vektor und das Insert in einem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:3 bis 1:5 eingesetzt, je nach Fragmentlänge der DNA-Fragmente: Je größer die Fragmentlänge des Inserts desto mehr Insert pro Vektor wird eingesetzt. Die Ligation erfolgt in einem Ansatz mit einem Volumen von 10 µl, wobei 1µl T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) und 1 µl des vom Hersteller bereitgestellten Puffers enthalten sind. Der Reaktionsansatz wird 1 h bei 22°C bzw. über Nacht bei 16°C inkubiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Zellen transformiert.

#### **4.4.7. Plasmid-Präparation aus *E. coli* sowie *A. tumefaciens***

Zur Sequenzierung werden Plasmide mittels dem NucleoSpin® Plasmid Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) isoliert. Für die übrigen analytischen und präparativen Anwendungen wird nach dem Protokoll von Hattori (Hattori and Sakaki, 1986) aufgearbeitet.

Es werden in einem 2 ml Reaktionsgefäß in zwei Zentrifugationsschritten (14000 rpm, 2 min) insgesamt 4 ml einer Übernachtskultur pelletiert und anschließend in 100 µl der Lösung I resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT werden 200 µl der Lösung II zugegeben und vorsichtig mehrmals invertiert. Nach Inkubation auf Eis für 5 min folgt die Zugabe von 150 µl Lösung III. Nach erneutem vorsichtigem Invertieren wird der Reaktionsansatz erneut für 5 min auf Eis gestellt. Nach anschließender Zentrifugation bei 14000 rpm für 10 min wird der Überstand mit 500 µl Phenol gemischt und nach 2 min Inkubationszeit bei RT 200 µl Chloroform zugegeben. Die Probe wird gemischt und für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Überführen der wässrigen Phase in 1 ml 96 % EtOH wird der Reaktionsansatz ca. 20 min bei RT inkubiert. Im Anschluss wird die Probe bei 14000 rpm für 10 min zentrifugiert und das so erhaltene Pellet in 500 µl 70 % EtOH gewaschen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet getrocknet, in 50 µl TE-RNase aufgenommen und bei 37°C für 1 h inkubiert.



Lösung I:	50 mM Glucose 10 mM EDTA 25 mM Tris/HCl	pH 8.0
Lösung II:	0.2 M NaOH 1 % SDS (w/v)	
Lösung III:	3 M K-Acetat 11.5 % Eisessig (v/v)	
TE-RNase:	1 mM EDTA 10 mM Tris/HCl 100 µg/ml RNase	pH 8.0

#### **4.4.8. DNA-Isolation aus *Arabidopsis***

##### Phire plant direct PCR-Kit (Biozym, Hamburg, Deutschland):

Für die DNA-Isolation wird ca. die Hälfte einer Kotyledone vom Keimling abgeschnitten und in 20-100 µl des mitgelieferten Puffers aufgenommen. Aus dieser Lösung wird 0.5-2 µl direkt zur PCR eingesetzt.

##### Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid (CTAB):

Die Isolation pflanzlicher DNA erfolgt nach einem modifizierten Protokoll (Murray and Thompson, 1980):

Eine kleine Menge Pflanzenmaterial (bis 100 mg) wird in  $N_{2liq}$  schockgefroren, aufgeschlossen und unter Zugabe des 2x CTAB-Puffers für mindestens 10 min bei 65°C inkubiert. Nach einer kurzen Abkühlphase werden 300 µl Chloroform zugegeben und gründlich vermengt. Der Phasentrennung durch kurze Zentrifugation folgt die Überführung der wässrigen Phase in 300 µl 2-Propanol. Nach gründlichem Mischen wird die Probe für 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um die DNA zu pelletieren. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 500 µl 70 % EtOH gewaschen. Nach kurzer Zentrifugation wird der Ethanol abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in 50 µl TE-RNase aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C kann die DNA-Präparation für weiterführende Experimente verwendet werden.

2x CTAB-Puffer:	2 % CTAB (Cetyltrimethyl-Ammoniumbromid) (w/v) 1.4 M NaCl 20 mM EDTA 100 mM Tris/HCL	pH 8.0
-----------------	---	--------

TE-RNase:                    1 mM EDTA  
                                  10 mM Tris/HCl        pH 8.0  
                                  100 µg/ml RNase

#### **4.4.9. Polymerase chain reaction: PCR**

Die PCR wird zur analytischen Amplifikation von DNA-Fragmenten in einem Volumen von 20 µl durchgeführt.

Reaktionsansatz:    1 µl „template“-DNA  
                          0.2 µl Phire™ bzw. Phusion™ Hot Start DNA Polymerase  
                          (Finnzymes, Finnland)  
                          4 µl 5x Phire™ bzw. Phusion™ Reaktionspuffer  
                          1 µl dNTPs (Endkonzentration 0.5 mM)  
                          je 0.5-1 µl Primer  
                          11.8 µl H<sub>2</sub>O mQ

Schematischer Ablauf der PCR-Reaktion:

1. 2 min Denaturierungsschritt bei 98°C
2. 5 Sekunden bei 98°C
3. „Annealing“: 52-60°C (je nach Primer) für 10 Sekunden
4. Elongation: 72°C für 20 Sekunden
5. Extension: 72°C für 2 min

Die Schritte 2.-4. werden in 30-35 Zyklen wiederholt.

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Diese werden lyophilisiert geliefert und nach Angabe des Herstellers mit H<sub>2</sub>O bidest. aufgenommen. Die Lagerung der Primer erfolgte bei -20°C.

#### **4.4.10. Reverse transcription-PCR: RT-PCR**

Aus Pflanzenmaterial wird mittels NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) die Gesamt-RNA isoliert und von dieser 2 µg zur cDNA-Synthese mittels M-MUL V Reverse Transcriptase (Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Um Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wird während der Extraktion DNase zugegeben. Die anschließende RT-PCR erfolgt nach dem Ablauf einer PCR (s. Kap. 4.4.9.).

#### **4.4.11. Real-time quantitative reverse transcription-PCR: qRT-PCR**

Die qRT-PCR wird am Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan durchgeführt.

Aus Pflanzenmaterial wird mittels NucleoSpin RNA Plant Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Deutschland) die Gesamt-RNA isoliert und von dieser 2 µg zur cDNA-Synthese mittels M-MUL V Reverse Transcriptase (Fermentas, Deutschland) eingesetzt. Um Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, wird während der Extraktion DNase zugegeben. Für die Quantifizierung wird dem Reaktionsansatz der iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Deutschland) zugegeben. Die qRT-PCR wird an dem C1000 Thermal Cycler mit CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Deutschland) in einem zweistufigen Programm (50 Zyklen: 10 Sekunden 95°C, 25 Sekunden 60°C) durchgeführt. Das Expressionslevel wird gegen das „housekeeping“ Gen *ACT8* normalisiert und das Expressionslevel gegebenenfalls im Wildtyp Col-0 gleich 1 gesetzt.

Die Primer wurden von Dr. Erika Isono (Lehrstuhl für Systembiologie der Pflanzen, TU München, Wissenschaftszentrum Weihenstephan) designet und zur Verfügung gestellt:

ACT8 fw: TGAGACCTTTAATTCTCCAGCTATG

ACT8 rv: CCAGAGTCCAACACAATACCG

PR1 fw: GATGTGCCAAAGTGAGGTGTAA

PR1 rv: TTCACATAATTCCCACGAGGA

PDF1.2 fw: GTT CTCTTTGCTGCTTTTCGAC

PDF1.2 rv: GCAAACCCC TGACCATGT

AtCEP1 fw: TCAGCCTGTTTCTGTTGCTATT

AtCEP1 rv: CATCTCCCGGTAAACTCC

AtCEP2 fw: GCTGTTGCAAACCAACCTG

AtCEP2 rv: TTCCACAAGATCCCGTAAACA

AtCEP3 fw: GCTCACCAGCCTGTCTCTGT

AtCEP3 rv: CGCATTCTCCGATAAACACA

#### **4.4.12. Transformation von *A. thaliana* durch „floral dipping“ mit *A. tumefaciens***

Infloreszenzen von etwa 3 Wochen alten *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen werden nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998) mit Agrobakterien transformiert.

Für diese Transformation werden in einer 400 ml LB-Übernachtskultur die mit dem jeweiligen Konstrukt-tragenden Agrobakterien mit den entsprechenden Antibiotika herangezogen. Die Zellen werden bei 5000 g für 8 min in einem sterilen Zentrifugationsgefäß sedimentiert; das Pellet wird anschließend in 350 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Nach Überführen des resuspendierten Pellets in ein steriles 400 ml Dipp-Gefäß erfolgt die Transformation nach der Methode des „floral dipping“ (Clough and Bent, 1998):

Die Infloreszenzen werden für ca. 30 Sekunden in die Lösung des resuspendierten Pellets eingetaucht. Nach einer Pause von 5 min werden die Infloreszenzen erneut für ca. 30 Sekunden in diese Lösung eingetaucht. Nicht befeuchtete Infloreszenzen werden mittels Pipette einzeln benetzt. Zur Schaffung optimaler Transformationsbedingungen werden die Töpfe mit den transformierten Pflanzen über Nacht in Cellofanfolie eingepackt. Nach drei Tagen wird das „floral dipping“ zur Erhöhung der Transformationseffizienz wiederholt.

Infiltrationsmedium:	50 g Saccharose
(pro Liter)	500 µl Vac-IN-Stuff (Silwet L-77, Lehle Seeds, USA)
	10 µl BAP (Benzylaminopurin, 1 mg/ml in DMSO oder EtOH)

#### **4.4.13. Kreuzung von *A. thaliana***

Zur Kreuzung von *Arabidopsis* Pflanzen eignet sich als Pollenspender nur eine seit kurzem geöffnete Blüte; als Pollenempfänger werden kurz vor der Öffnung stehende Infloreszenzen verwendet. Bei diesen Infloreszenzen des Pollenempfängers werden mittels Pinzette Petalen und Stamina sowie gegebenenfalls auch Sepalen entfernt. Zur Bestäubung mit Fremdpollen wird der Spenderpflanze eine offene Blüte abgenommen und leicht zusammengedrückt, sodass aus der gespreizten Blüte die Stamina herausgedrückt werden. Mit dieser Blüte wird über die freigelegte Narbe der Empfängerpflanze gestrichen, sodass der Pollen daran sichtbar hängen bleibt. Nach der erfolgreichen Bestäubung wird der Griffel mit einem Stück Cellofanfolie umwickelt, um diesen vor Fremdbestäubung und Pollenverlust zu schützen.

Im Zuge dieser Arbeit werden folgende Kreuzungen durchgeführt:

*atcep1 x atcpr5* (SAIL\_158\_B06 x NASC stock code N3770)

*atcep3 ko x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06)

*atnai1 x AtCEP2* Pflanzen (GK-136G06-012754 x *P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*)

*AtCEP2 x ER-Lumen-Markerlinie* (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL x GFP-HDEL*, Nelson et al., 2007)

#### **4.4.14. Inokulation von *Arabidopsis thaliana* mit *Erysiphe cruciferarum***

Für die makroskopische Analyse eines Pathogenese-Phänotyps werden ca. 5 Wochen alte Pflanzen (Wachstumsbedingungen vor und nach der Inokulation: 22°C, 10 h Beleuchtung mit 120µmol m<sup>-2</sup>s<sup>-2</sup> bei 65 % relativer Luftfeuchtigkeit) folgender Genotypen mit 5-7 Konidien mm<sup>-2</sup> des biotrophen Ascomyceten *E. cruciferarum* inokuliert (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.)):

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06)

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) mit funktionellem Reporterkonstrukt *P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) mit nicht funktionellem Reporterkonstrukt *P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL* (Höwing et al., 2014 (s. 7.2.))

*atcep2 ko* (SALK\_079519)

*atcep3 ko* (SALK\_016791)

*atcep3 ko x atcep1 ko*

*atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi*) Linie 2.21 und 3.14

*atcpr5* Mutante (NASC stock code N3770)

Als Vergleich zur Auswertung werden susceptible Col-0 Wildtyppflanzen verwendet. Die Befallsdichte mit *E. cruciferarum* wird bei den jeweiligen Genotypen an den Zeitpunkten 9, 11 und 13 dpi durch visuelle Auswertung der gesamten Pflanze durchgeführt. Bei dieser sogenannten Bonitierung werden die befallenen Pflanzen in drei Kategorien der Suszeptibilität eingeteilt: weniger als 30 %, 30-60 % und mehr als 60 % mit *E. cruciferarum* befallener Blattfläche (s. Abb. 8A).

Die statistische Signifikanz wird in einem ANOVA- und Duncan Test ermittelt.

## **4.5. Biochemische Methoden**

### **4.5.1. Denaturierender Protein-Rohextrakt**

Die Proteinextraktion erfolgt aus Keimlingen oder Rosettenblättern der verwendeten Mutanten sowie dem Wildtyp Col-0. Das entsprechende Pflanzenmaterial (100-300 mg) wird in einem 1.5 ml Reaktionsgefäß in N<sub>2</sub>liq<sub>u</sub> schockgefroren und mit einem in N<sub>2</sub>liq<sub>u</sub> gekühlten Pistill zerstoßen. Nach ca. 1-2 min (keine vollständige Erwärmung auf RT!) wird die Probe mit einer 1-fach Konzentration des 6-fach Auftragspuffer 1/6 (v/v) für 10 min bei 95°C inkubiert. Das Gemisch wird für 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert und 20-40 µl des Überstands zur SDS-PAGE eingesetzt.

6-fach Auftragspuffer:            350 mM Tris/HCl pH 6.6  
    30 % Glycerin (v/v)  
    10 % SDS (w/v)  
    0.5 % Bromphenolblau (w/v)  
    10 % β-Mercaptoethanol (v/v)

### **4.5.2. Immunpräzipitation**

1-10 g Pflanzenmaterial von *Arabidopsis* werden in einer Reibschale in N<sub>2</sub>liq<sub>u</sub> schockgefroren und mit einem in N<sub>2</sub>liq<sub>u</sub> gekühlten Pistill zerstoßen. Pro Gramm wird 1 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 10 % Glycerol (v/v), pH 7.5) zugegeben und verrührt. Nach Auftauen des Probengemisches wird dieses sedimentiert (14000 rpm, 4°C, 10 min). Der Überstand wird mit 70-100 µl α-HA Affinitätsmatrix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) immunpräzipitiert (1-2 h, 4°C, invertieren). Nach der Immunpräzipitation wird der Reaktionsansatz dreimal mit dem Aufschlusspuffer gewaschen (2000-3000 rpm, 1 min). Die α-HA Affinitätsmatrix mit der gebundenen Probe wird 20 min bei RT in 200 µl Probenpuffer (100 mM Na-Phosphat, 2 mM Cystein, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35, pH 7.5) inkubiert.

Im Zuge dieser Arbeit werden 7 d alte Keimlinge, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, immunpräzipitiert. Es wird 1 g Frischgewicht eingesetzt.

Nach dem Waschen der α-HA Affinitätsmatrix, wird diese mit 200 µl eines Probenpuffers bei pH 7.5 (100 mM Na-Phosphat, 2 mM Cystein, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35) (s. Abb. 37 Reihe 1-3) oder pH 4.0 (100 mM Na-Acetat, 2 mM Cystein, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35) (s. Abb. 37 Reihe 4-6) bei Raumtemperatur inkubiert und der Überstand anschließend abzentrifugiert (s. Abb. 37 Reihe 1, 4). Die α-HA Affinitätsmatrix wird daraufhin bei 95 °C

inkubiert und der Überstand (s. Abb. 37 Reihe 3, 5) erneut von der  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix (s. Abb. 37 Reihe 4, 6) abzentrifugiert. Als Kontrolle wird zusätzlich eine  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix ohne Proteinextrakt mit Puffer bei pH 4.0 inkubiert (s. Abb. 37 Reihe 7). Die  $\alpha$ -HA Affinitätsmatrix und die Überstände werden anschließend mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot Analyse durch Dekorierung mit verschiedenen Antikörpern (s. Kap. 4.5.7.) analysiert.

#### **4.5.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen erfolgt in einer diskontinuierlichen und denaturierenden SDS-PAGE. Hierfür werden Trenngele von 12.5 % bzw. 15 % mit einem 5 % Sammelgel nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die Gele werden in Biorad Mini-Protean VI® Kammern (Biorad, München) gegossen. Zuerst wird die Lösung des Trenngels zur Polymerisation in die entsprechende Vorrichtung gegossen. Eine Überschichtung des Trenngels mit Isopropanol gewährleistet eine gerade Lauffront. Nach der Polymerisation des Trenngels sowie dem Entfernen des Alkohols wird das Sammelgel aufgegossen. Die Auftragstaschen werden durch eingesetzte Kämmen erzeugt. Bei der Herstellung der Trenn- bzw. Sammelgele ist darauf zu achten, dass APS (Ammoniumperoxodisulfat) als Radikalbildner und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethan-1.2-diamin) als Radikalstabilisator zuletzt zugegeben werden, da diese die Polymerisationsreaktion katalysieren.

Proben der SDS-PAGE werden mit 6-fach Auftragspuffer zu einer Endkonzentration von 1:1 (v/v) versetzt und 5-10 min bei 95°C inkubiert. Als Protein-Marker werden der PageRuler™ Prestained Protein Ladder und der PageRuler™ Prestained Protein Ladder Plus (beide MBI Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese wird bei ca. 130V für ca. 1.5 h in 1-fach SDS-Laufpuffer durchgeführt.

6-fach Auftragspuffer:            350 mM Tris/HCl pH 6.6  
    30 % Glycerin (v/v)  
    10 % SDS (w/v)  
    0.5 % Bromphenolblau (w/v)  
    10 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (v/v)

10-fach SDS-Laufpuffer:        1.9 M Glycin  
    1 % SDS (w/v)  
    250 mM Tris pH 8.3

Stammlösungen	12.5 % Trenngel	15 % Trenngel	Sammelgel
Acrylamidlösung 30 %	8.3 ml	10 ml	1.7 ml
H <sub>2</sub> O mQ	7.7 ml	6 ml	6.9 ml
2 M Tris/HCl pH 8.8	3.72 ml		
1 M Tris/HCl pH 6.6			1.25 ml
10 % SDS (w/v)	200 µl		100 µl
TEMED	6.7 µl		5 µl
10 % APS (w/v)	200 µl		150 µl
Gesamtvolumen	20 ml (2-4 Gele)		10 ml (4 Gele)

#### **4.5.4. Coomassie-Färbung**

Zur Detektion der Proteine werden SDS-PAGE Gele Coomassie-gefärbt. Hierfür werden diese nach der Elektrophorese für wenige Stunden bis über Nacht unter langsamen horizontalem Rotieren (Orbitalschüttler) in einer Coomassie-Lösung inkubiert. Die Entfärbung der Gele erfolgt mittels einer Entfärber-Lösung für ca. 6-24 h, wobei diese mehrmals gewechselt werden muss.

Coomassie-Lösung:           40 % Methanol (v/v)  
                                   10 % Eisessig (v/v)  
                                   0.1 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (w/v)

Entfärber-Lösung:         40 % Ethanol (v/v)  
                                   10 % Eisessig (v/v)



#### **4.5.5. Silberfärbung**

Die Silberfärbung wurde nach der Methode von Blum (Blum et al., 1987) durchgeführt. Mit dieser sensitiven Färbung können Proteinmengen von 1 bis 10 ng nachgewiesen werden. Zuerst werden die Proteine im Gel für mindestens 1 h fixiert und anschließend für 20 min dreimal gewaschen. Es folgt eine Sensibilisierung der Proteine mit Natriumthiosulfat für 1 min und erneutes dreimaliges Waschen für 20 min. Bei der 20-minütigen Imprägnierung mit Silbernitrat werden Silber-Ionen von geladenen Resten der Proteine komplexiert und es kommt zu einer Silberkeimbildung. Es folgen ein erneuter Waschschrift für dreimal 20 Sekunden und die Entwicklung unter Schütteln für ca. 0.5-5 min. Das Gel wird zur Minimierung des Hintergrunds frühzeitig dreimal je 20 Sekunden mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die Entwicklung wird mit einer Methanol/Eisessiglösung abgestoppt. Das gefärbte Gel kann in der Entfärbelösung gelagert werden.

##### Fixierlösung

50 % Methanol (v/v)  
 12 % Essigsäure /v/v  
 0.5 ml/l Formaldehyd (37 %)

##### Vorbehandlung

0.2 g/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
 Färbelösung  
 2 g/l AgNO<sub>3</sub>

##### Entwickler

60 g/l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 4 mg/l Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> x 5 H<sub>2</sub>O  
 0.5 ml/l Formaldehyd (37 %)

##### Entfärbelösung

35 % Methanol (v/v)  
 10 % Essigsäure (v/v)

#### **4.5.6. Western Blot**

Zur immunologischen Detektion werden die Proteine nach Auftrennung durch SDS-PAGE auf Nitrocellulose-Membranen übertragen und fixiert. Hierfür wird das Gel luftblasenfrei auf die zuvor in Puffer A equilibrierte Nitrocellulose (Protran Nitrocellulose-Transfermembran, Porengröße 2 µm, Whatman) gelegt und in eine Haltevorrichtung eingespannt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgt gekühlt (durch Kühlraum oder Kühlakku) bei 100V und 350 mA für 1.5 h im Puffer A (Mini-Trans-Blot® Kammer, Biorad, München).

10x Puffer A:                    1.92 M Glycin  
    250 mM Tris/HCl                    pH 8.3





#### **4.5.9. Proteinexpression in *E. coli***

Nach Ermittlung der optimalen Proteinexpressionsbedingungen in *E. coli* wird die Proteinexpression in größerem Maßstab (mehrere Liter) durchgeführt. Hierzu wird die Hauptkultur aus einer Übernachtskultur 1:1000 angeimpft und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0.6$  geschüttelt. Nach der Induktion mit 100  $\mu$ m IPTG wird über Nacht inkubiert. Die anschließende Aufarbeitung der Zellen erfolgt nach Kap. 4.5.8.

#### **4.5.10. Proteinanreicherung mittels His-tag**

Bei einer His-tag Reinigung bedient man sich der Affinität von Histidin für zweiwertige Metallionen, zumeist Nickel oder Cobalt.

Nach Equilibrierung der Cobalt-Matrix (Talon-Metal-Affinity-Resin, Takara Clontech) mit dem 10-fachen Säulenvolumen Equilibrierungspuffer wird die Probe auf die Säule geladen. Nach einem weiteren Waschschriff mit dem 10-fachen Säulenvolumen Equilibrierungspuffer folgt die Elution der gebundenen Proteine mittels eines Imidazol-Stufengradienten von jeweils 5 ml von 0 mM, 5 mM, 50 mM, 100 mM, 200 mM und 500 mM Imidazol. Nach der Elution der Zielproteine wird die Cobalt-Matrix mit zehn Säulenvolumen Elutionspuffer mit 500 mM Imidazol gewaschen und in diesem bei 4°C aufbewahrt.

Beide Konstrukte AtCEP1-pET24a und AtCEP2-pET24a eluieren bei 100 mM Imidazol.

Equilibrierungspuffer:      300 mM NaCl  
   Na-Phosphat              pH 8.0

Elutionspuffer:              300 mM NaCl  
   5-500 mM Imidazol (Roth)  
   Na-Phosphat              pH 8.0

Lagerpuffer:                300 mM NaCl  
   0.2% NaN<sub>3</sub> (w/v)  
   Na-Phosphat              pH 8.0

Die Eluate werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie-Lösung gefärbt. Die blau-gefärbten Gelbereiche der Eluate werden ausgeschnitten und zur Immunisierung von Hasen verwendet (Davids Biotechnology, Regensburg, Deutschland). Der Antikörper, der aus der Untereinheit von AtCEP1 generiert wurde, erkennt sowohl die Untereinheit von AtCEP1 als auch von AtCEP2 (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

## **4.6. Mikroskopie**

### **4.6.1. Färbungen für die Mikroskopie**

#### Wheat germ agglutinin (WGA): Chitin-Färbung

Es werden Rosettenblätter 5 bzw. 6 Tage nach Inokulation (dpi) mit *E. cruciferarum* mit wheat germ agglutinin tetramethylrhodamin (WGA-TMR, Invitrogen Molecular Probes, Deutschland) für die Fluoreszenz-Mikroskopie gefärbt. Die Rosettenblätter werden in einer Ethanol-Eisessig Lösung (EtOH:HAc, 6:1 (v/v)) für mehrere Tage entfärbt. In dieser Lösung sind diese unbegrenzt haltbar. Zur Färbung werden die Blätter mit H<sub>2</sub>O bidest. vorsichtig in einer Petrischale für 1 min gewaschen und anschließend für 6 min in 1xPBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) inkubiert. Danach werden die Blätter in 1.5 ml Reaktionsgefäßen mit der Färbelösung bei -0.8 bar zweimal Vakuum-infiltriert. Nach 24-48 h Inkubation bei 4°C werden die Blätter entweder direkt zur Mikroskopie eingesetzt oder zusätzlich mit Methylblau gefärbt.

Färbelösung:                    50 µl WGA-TMR (1 µg/µl)  
                                      50 µl BSA (1 µg/µl)  
                                      4.9 ml 1xPBS

#### Methylblau: Färbung von nekrotischen Zellen und Callose-angereicherten Strukturen

Es werden Rosettenblätter 5 bzw. 6 dpi und 10-14 dpi mit *E. cruciferarum* mit Methylblau für die Fluoreszenz-Mikroskopie und CLSM gefärbt. Die entfärbten und eventuell mit WGA-gefärbten Rosettenblätter werden mit H<sub>2</sub>O bidest. abgewaschen und für ca. 10 min bei RT in einem 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Puffer eingelegt. Diese Blätter werden daraufhin für ca. 2-4 h im Dunkel bei RT in einer Färbelösung inkubiert und direkt zur Mikroskopie eingesetzt.

Färbelösung:                    0.05 g Methylblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)  
                                      100 ml 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

Calcofluor: Färbung der Zellwand

Es werden Wurzeln von 7 d alten homozygoten Keimlingen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, und als Vergleich von Col-0 Wildtyppflanzen mit einer Calcofluor-Färbelösung (Calcofluor White Stain, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) versetzt. Die mit einem Skalpell abgetrennt Wurzeln werden auf einem Objektträger in ca. 100-150  $\mu$ l Färbelösung aufgenommen und sofort zur Mikroskopie verwendet.

Färbelösung:                    200  $\mu$ l 500 mM Na-Phosphat                    pH 7.5  
   400  $\mu$ l H<sub>2</sub>O bidest.  
   400  $\mu$ l Calcofluor White stain

Probidiumiodid: Färbung der Zellwand sowie der Zellkerne in sterbenden Zellen

Es werden Wurzeln von 7 d alten homozygoten Keimlingen der *atcep2 ko* (SALK\_079519) und *atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi*) Linie 2.21 und 3.14 sowie vom Wildtyp Col-0 mit einer Probidiumiodid-Färbelösung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) versetzt. Die mit einem Skalpell abgetrennt Wurzeln werden auf dem Objektträger in ca. 100-150  $\mu$ l Färbelösung aufgenommen und sofort zur Mikroskopie verwendet.

Konzentration der Stammlösung:    1 mg Probidiumiodid in 1 ml H<sub>2</sub>O bidest.  
Konzentration der Färbelösung:    20  $\mu$ g/ml

#### **4.6.2. Fluoreszenz-Mikroskopie**

Die Mikroskopie erfolgte am Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX61TRF, Japan bei 40-fachen (4-er Objektiv), 100-fachen (10-er Objektiv) sowie 200-fachen (20-er Objektiv) Vergrößerungen. Das Fluorochrome Methylblau wird über einen UV-Filter und WGA über einen RFP-Filter mikroskopiert. Bei diesen Filtern sind die Anregung sowie das Emissionsspektrum voreingestellt und nicht wie beim CLSM (s. Kap. 4.6.3.) frei einstellbar.

##### **4.6.2.1. Statistische Auswertung nekrotischer Blattflächen unter dem Infektionsstress des echten Mehltaupilzes**

Es werden Rosettenblätter der homozygoten *atcpr5* Mutante sowie der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante 5 dpi mit *E. cruciferarum* mit dem Farbstoff Methylblau inkubiert (s. Kap. 4.6.1.). Dies färbt sowohl nekrotische Zellen als auch Callose-angereicherte Strukturen wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum*.

Zur Auswertung der nekrotischen Blattfläche werden ausschließlich Flächen, die mit Kolonien von *E. cruciferarum* bewachsen sind, analysiert. Die Fläche wird über die Fluoreszenzintensität quantifiziert. Fluoreszierende Flächen sind nekrotische Zellen sowie Callose-angereicherte Strukturen wie beispielsweise Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum*. Es werden Fluoreszenz-Aufnahmen von 65 fluoreszierenden Flächen, wobei jede der Flächen exakt von einer Kolonie des echten Mehltaupilzes bewachsen ist, auf 19 Rosettenblättern der homozygoten *atcpr5* Mutante sowie der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante erstellt. Die fluoreszierenden Flächen der nekrotischen Blattläsionen werden mittels des Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* graphical analysis software (Rasband, 1997-2014) quantifiziert. Der Schwellenwert für das Hintergrund-Rauschen wird auf die stärksten unspezifischen Fluoreszenz-Signale eingestellt. Die Bereiche der spezifischen Fluoreszenz-Signale werden ausgewählt und die Fläche mittels der Software vermessen. In dieser vermessenen Fläche sind nun sowohl nekrotische Zellen als auch Callose-angereicherte Strukturen wie Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum* erfasst. Zur Korrektur des Ergebnisses werden die fluoreszierenden Flächen der Kolonien von *E. cruciferarum*, die keine nekrotischen Läsionen aufweisen, aufgrund ihrer Intensität quantifiziert. Hierfür werden 10 Kolonien auf 5 Rosettenblättern homozygoten *atcpr5* Mutante sowie der homozygoten *atcep1 x atcpr5* Doppelmutante ausgewertet. Diese erhaltenen Durchschnittswerte ohne nekrotische Blattläsionen werden von den Durchschnittswerten mit Blattläsionen subtrahiert. Somit erhält man die Fläche der

nekrotischen Blattläsionen ohne die dem echten Mehltaupilz zugehörigen Callose-angereicherten Strukturen wie Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum*. Die statistische Signifikanz wird in einem zweiseitigen Student's *t*-Test ermittelt.

### 4.6.2.2. Statistische Auswertung von toten Zellen, Haustorien und Papillen pro Kolonie von *E. cruciferarum*

Es werden Rosettenblätter 5 bzw. 6 dpi mit *E. cruciferarum* mit WGA und Methylblau (s. Kap. 4.6.1.) gefärbt. Mit dieser Doppel-Färbung können nekrotische Zellen sowie Callose-angereicherte Strukturen wie Papillen und Einkapselungen gebildeter Haustorien von *E. cruciferarum* am Fluoreszenz-Mikroskop statistisch ausgewertet werden. Hierzu wird die Anzahl von toten Zellen, Haustorien und Papillen pro Kolonie von *E. cruciferarum* ausgezählt.

Experiment 1: Es werden auf jeweils 3 Rosettenblättern von *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06) und Col-0 Wildtyppflanzen jeweils 54 Kolonien von *E. cruciferarum* 5 dpi ausgewertet. Die Ergebnisse werden in einem zweiten unabhängigen Experiment mit 48 Kolonien von *E. cruciferarum* auf jeweils 3 Rosettenblättern pro Genotyp bestätigt (biologisches Replikat, unabhängige Inokulation). Die statistische Signifikanz wird in einem zweiseitigen Student's *t*-Test ermittelt.

Experiment 2: Es werden auf jeweils 2 Rosettenblättern von *atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06), *atcep3 ko* (SALK\_016791), *atcep3 ko x atcep1 ko* und Col-0 Wildtyppflanzen jeweils 42 Kolonien von *E. cruciferarum* 6 dpi ausgewertet. Die Ergebnisse werden in einem zweiten unabhängigen Experiment mit ebenfalls 42 Kolonien von *E. cruciferarum* auf jeweils 2 Rosettenblättern pro Genotyp bestätigt (biologisches Replikat, unabhängige Inokulation). Die statistische Signifikanz wird in einem zweiseitigen Student's *t*-Test ermittelt.



#### **4.6.3. Confocale Laser Scanning Mikroskopie: CLSM**

Die Mikroskopie erfolgte am CLSM Fluoview FV 1000, Olympus, Japan bei 100-fachen (10-er Objektiv), 200-fachen (20-er Objektiv), 400-fachen (40-er Objektiv) und 600-fachen (60-er Objektiv) Vergrößerungen. Größere Vergrößerungen werden mittels des Computerprogrammes Olympus Fluoview Ver.4.0.a Viewer manuell eingestellt. Im Zuge dieser Arbeit wurden folgende Fluorochrome am CLSM analysiert:

Fluorochrome	Anregung	Emission
Calcofluor	405 nm	420-450 nm
EGFP	488 nm	503-550 nm
mCherry	561 nm	576-630 nm
Methylblau	405 nm	420-460 nm
Probidiumiodid	488 nm	560-640 nm
UV	405 nm	420-475 nm

Für die dreidimensionale Rekonstruktion des EGFP-Signals wird die Software Imaris (Bitplane) verwendet.

#### 4.6.3.1. Statistische Auswertung von Primärwurzeln sowie deren Zelllängen und –breiten

Von 5, 7 und 11 d alten Keimlingen (Wachstumsbedingungen s. Kap. 4.3.) werden jeweils die Länge von 120 Primärwurzeln statistisch ausgewertet. Hierfür werden folgende homozygote Linien verwendet:

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06)

*atcep2 ko* (SALK\_079519)

*atcep3 ko* (SALK\_016791)

*atcep3 ko x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06)

*atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi*) Linie 2.21 und 3.14

Als Vergleich wird die durchschnittliche Primärwurzellänge von 120 Col-0 Wildtyppflanzen ausgemessen.

Die Ergebnisse werden in einem weiteren unabhängigen Experiment mit der Stichprobenanzahl 120 bestätigt (biologisches Replikat).

Zur Ausmessung der Primärwurzellänge wird das Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* graphical analysis software (Rasband, 1997-2014) verwendet. Es wird ein Lineal neben den Primärwurzel platziert und abfotografiert. Über dieses Lineal kann die Maßeinheit 1cm im Bildverarbeitungsprogramms *ImageJ* graphical analysis software definiert werden. Die statistische Signifikanz wird in einem ANOVA- und Duncan Test ermittelt.

Es werden die Primärwurzeln von 7 d alten Keimlingen der homozygoten *atcep2 ko*, der homozygoten *atcep\_triple-ko/kd* Linien 2.21 und 3.14 sowie von Col-0 Wildtyppflanzen mit Probidiumiodid gefärbt (s. Kap. 4.6.1.) und am CLSM Fluoview FV 1000, Olympus, Japan mikroskopiert.

Es wird sowohl die Länge als auch die Breite der LRC in einer 200-fachen Vergrößerung ausgemessen. Die Länge der LRC wird als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur „PCD Site I“ definiert und die Breite der LRC wird auf Höhe der „PCD Site I“ gemessen (s. Abb. 27). In der „PCD Site I“ am oberen Ende der LRC finden sich die längsten LRC-Zellen (s. Abb. 27 Stern). An dieser Position wird die Zelllänge der 3-5 längsten LRC-Zellen sowie deren Zellbreite in einer 400-fachen Vergrößerung ermittelt.

Des Weiteren wird die Länge der meristematischen Zone, die als der Abstand vom ruhenden Zentrum zur ersten elongierten Epidermiszelle definiert wird, in einer 200-fachen Vergrößerung analysiert (s. Abb. 27).

Für diese Auswertung werden drei unabhängige Experimente (biologische Replika) analysiert: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 15, in Experiment 2 = 15 und in Experiment 3 = 16.

In der Elongationszone werden die Zelllänge und -breite der drei längsten Trichoblasten (elongierte Zellen, die Wurzelhaare ausbilden) am Übergang der „rapid elongation zone“, in der eine sehr schnelle Zellelongation stattfindet, zur „late elongation zone“, in der die Zellelongation nicht mehr zunimmt, in einer 200-fachen Vergrößerung ausgemessen (s. Abb. 27). Mikroskopisch ist diese Zone daran zu erkennen, dass die ersten Ausbuchtungen von Wurzelhaaren in den Trichoblasten erkennbar sind.

Die Auswertung der Breite der Elongationszone wird auf Höhe dieser längsten Trichoblasten ebenfalls in einer 200-fachen Vergrößerung analysiert.

Für diese Auswertung werden zwei unabhängige Experimente (biologische Replika) analysiert: Stichprobenumfang in Experiment 1 = 8, in Experiment 2 = 9.

Zur Ausmessung dieser Aufnahmen wird das Computerprogramm Olympus Fluoview Ver.4.0.a Viewer verwendet, das einen internen kalibrierten Größenstandard besitzt. Die statistische Signifikanz wird in einem ANOVA- und Duncan Test ermittelt.

### 4.6.3.2. Statistische Auswertung einer zeitlichen Verzögerung beim Austritt von Seitenwurzel-Primordia

Keimlinge folgender homozygoter Linien wachsen 7-10 d auf MS-Platten (Wachstumsbedingungen s. Kap. 4.3.):

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06)

*atcep2 ko* (SALK\_079519)

*atcep3 ko* (SALK\_016791)

*atcep3 ko x atcep1 ko* (SALK\_016791 x SAIL\_158\_B06)

*atcep\_triple-ko/kd* (*atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi*) Linie 2.21 und 3.14

Als Vergleich werden 7-10 d alte Keimlinge von Col-0 Wildtyppflanzen verwendet.

Die zeitlichen Verzögerungen beim Austritt der Seitenwurzel-Primordia werden in einem „bending assay“ analysiert. Hierbei wird Drehung der entsprechenden 7-10 d alten Keimlinge um 90 Grad die synchrone Bildung eines neuen Seitenwurzel-Primordiums induziert. Somit weisen alle analysierten Seitenwurzel-Primordia dasselbe Alter auf. Nach 49 h werden die gebogenen Bereiche der entsprechenden Wurzeln mit einem Skalpell ausgeschnitten und am CLSM Fluoview FV 1000, Olympus, Japan bei einer 400-fachen Vergrößerung zur quantitativen Auswertung mikroskopiert. Die Seitenwurzel-Primordia der entsprechenden Genotypen werden in folgende Entwicklungsstadien eingeteilt (s. Abb. 39):

Stadium I-VI: Zusammenfassung der Seitenwurzel-Primordia, die sich im Perizykel, Endodermis oder Cortex befinden und noch nicht in die epidermale Zellschicht eingedrungen sind.

Stadium VII: Die Seitenwurzel-Primordia befinden sich in der Epidermis.

Stadium VIII: Die Seitenwurzel-Primordia treten aus der Epidermis aus.

Stadium LR: Die Seitenwurzel-Primordia sind bereits deutlich aus der Epidermis ausgetreten und werden zusammengefasst als adulte Seitenwurzel (lateral root, LR) bezeichnet. Sie weisen das charakteristische Zellmuster 10-16-10 (linke und rechte Seite der Epidermis bestehen aus jeweils zehn Zellen; Spitze der Epidermis wird aus 16 Zellen gebildet) auf (Malamy and Benfey, 1997).

Es werden die Entwicklungsstadien aus vier unabhängigen Experimenten (biologische Replika) in folgendem Stichprobenumfang ausgewertet:

WT Col-0: 15, 20, 18, 20

*atcep1 ko* (SAIL\_158\_B06): 26, 24, 30, 27

*atcep2 ko* (SALK\_079519): 25, 29, 26, 28

*atcep3 ko* (SALK\_016791): 26, 30, 29, 28

*atcep3 x atcep1 ko*: 22, 22, 27, 26

*atcep\_triple-ko/kd (atcep3xatcep1+AtCEP2-RNAi)*: 21, 24, 22, 26

Die statistische Signifikanz wird in einem ANOVA- und Duncan Test ermittelt.

### 4.6.3.3. „Whole Mount“ Immunlokalisierung

Keimlinge von Col-0 Wildtyp und der homozygoten *atcep2 ko* (SALK\_079519) (Negativkontrolle) wachsen 10 d auf MS-Platten (Wachstumsbedingungen s. Kap. 4.3.). Ihre Wurzeln werden mittels Formaldehydlösung (4 % in 1xPBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na<sub>2</sub>PHO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) und 0.1 % Tween) für eine Stunde fixiert. Anschließend erfolgen mehrere Waschungen mit Reinwasser und 1xPBS. Mittels eines PAP-pen werden auf einem Objektträger ovale Zonen markiert, in denen alle nachfolgenden Schritte durchgeführt werden. Gewaschene Wurzeln werden mittels Pinzetten flächig auf dem präparierten Objektträger ausgelegt, so dass sie bei RT eintrocknen. Darauffolgend werden die Proben mit 1xPBS rehydriert und mit Driselase (2 % in 1xPBS) in einer feuchten Kammer bei 37°C für 45 min inkubiert. Nach wiederholter Waschung des Materials mit 1xPBS wird das Permeabilisat (4 % IGEPAL und 10 % DMSO in 1xPBS) hinzugegeben und in einer feuchten Kammer bei 37°C für 1 h inkubiert. Anschließend erfolgen mehrere Waschungen mit Reinwasser und 1xPBS. Nach Waschen werden die Präparate mit einer Blockierlösung (2 % BSA in 1xPBS und 0.01 % Tween) für

30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgt die Inkubation mit dem Peptid-Antikörper AtCEP2-II (1:60; Eurogentec, Belgien; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)) über Nacht bei 4°C. Der Peptid-Antikörper AtCEP2-II aus Hase bindet an die letzten 15 Aminosäuren am Ende der AtCEP2 Untereinheit, die direkt N-terminal zum „KDEL“ ER-Rückhaltesignal benachbart sind (C-IKLSSSNPTPKDGDV) (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Das Präparat wird danach mit Blockierlösung gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Cyanin CY2-gekoppelten sekundären Antikörper gegen Hase (1:60; Dianova, Hamburg, Deutschland) bei 37°C für 4 h. Das Präparat wird darauffolgend mit Blockierlösung gewaschen und für die Mikroskopie mit Wasser eingedeckelt.

Die Mikroskopie erfolgt an einem CLSM (Leica SP8, Wetzlar, Deutschland) mit einem 40-er Objektiv bei einer Laserintensität von 20 %. Der Cyanin CY2-gekoppelte sekundäre Antikörper wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 500-550 nm mikroskopiert. Des Weiteren wird die Autofluoreszenz der pflanzlichen Zellwand bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt und die Emission in einem Wellenlängenbereich von 420-475 nm mikroskopiert.

Diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung wurde in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) durchgeführt. Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) führte diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung und die anschließende Mikroskopie am CLSM (Leica SP8, Wetzlar, Deutschland) sowie die Bearbeitung der Rohdaten selbstständig durch.

#### **4.7. Chemikalien und Enzyme**

Für die durchgeführten Methoden im Zuge dieser Arbeit wurden Chemikalien der Firmen Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland und Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe, Deutschland verwendet. Chemikalien oder Lösungsmittel anderer Firmen werden explizit angegeben.

<b>Enzym</b>	<b>Firma</b>
T4-DNA-Ligase	Promega
Restriktionsendonucleasen	MBI Fermentas, New England Biolabs
Taq Polymerase	MBI Fermentas
Phire Polymerase	Biozym
Phusion Polymerase	Biozym
RNAse	Roth
DNase	Roth
Antarctic Phosphatase	New England Biolabs

**4.8. Geräte**

Gerät	Modell	Hersteller
Blotting-Apparatur	Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad
Feinwaage	Handy	Sartorius analytic
Gelelektrophorese-Netzteil	EPS 200/301/EV231	Pharmacia Biotech
Inkubatoren	WTB Brutschrank	Binder
	Thermoshake	Gerhardt,
	Thermoshake	Infors AG
Kippschüttler	RotoShake Genie	Scientific Industries
Magnetrührer	Stuart-VWR	Bibby
Mikrowelle	R-239W-A	Sharp
NanoDrop-Photometer	NanoPhotometer 7122 V1.4	Implen
PCR-Cycler	Piko thermo cycler	Biozym
pH-Meter	pH 526	WTW
Photometer	Ultrospec 2000 UV/Visible Spectrometer	Pharmacia Biotech
SDS-Gelelektrophorese	Mini Protean 3 System	Bio-Rad
Sterilbank	Laminar Flow Workstation	Microflow
Schüttler	Orbit LS	Labnet
Ultraschall	Sonopuls HD2070	Bandelin
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS1	IKA
Waage	BP 3100 S	Sartorius
Zentrifugen	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5810	Eppendorf AG
	Typ 5415C	Eppendorf AG
	Typ 5415R (Kühlzentrifuge)	Eppendorf AG

## 5. Literaturverzeichnis

Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S. and Oliver, R.P. *et al.* 1999 Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a Survey of 360 *Arabidopsis thaliana* Accessions for Resistance to These Two Powdery Mildew Pathogens. *MPMI* **12**, 1031–1043. doi: 10.1094/MPMI.1999.12.12.1031.

Andème Ondzighi, C., Christopher, D.A., Cho, E.J., Chang, S.-C. and Staehelin, L.A. 2008 *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine proteases during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *The Plant cell* **20**, 2205–2220. doi: 10.1105/tpc.108.058339.

Aravind, L. and Koonin, E.V. 2002 Classification of the caspase-hemoglobinase fold: detection of new families and implications for the origin of the eukaryotic separins. *Proteins* **46**, 355–367.

Arnaud, C., Bonnot, C., Desnos, T. and Nussaume, L. 2010 The root cap at the forefront. *Comptes rendus biologiques* **333**, 335–343. doi: 10.1016/j.crvi.2010.01.011.

Babu, Y., Musielak, T., Henschen, A. and Bayer, M. 2013 Suspensor Length Determines Developmental Progression of the Embryo in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY* **162**, 1448–1458. doi: 10.1104/pp.113.217166.

Barlowe, C. 1994 COPII. A membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Cell* **77**, 895–907. doi: 10.1016/0092-8674(94)90138-4.

Battelli, R., Lombardi, L., Picciarelli, P., Lorenzi, R., Frigerio, L. and Rogers, H.J. 2014 Expression and localisation of a senescence-associated KDEL-cysteine protease from *Lilium longiflorum* tepals. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **214**, 38–46. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.09.011.

Becker, C., Senyuk, V.I., Shutov, A.D., Nong, H., Fischer, J., Horstmann, C. and Muntz, K. 1997 Proteinase A, A Storage-Globulin-Degrading Endopeptidase of Vetch (*Vicia Sativa* L.) Seeds, is not Involved in Early Steps of Storage-Protein Mobilization. *Eur J Biochem* **248**, 304–312. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00304.x.

Beers, E.P., Jones, A.M. and Dickerman, A.W. 2004 The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* **65**, 43–58. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.09.005.

Bennett, T., van den Toorn, A., Sanchez-Perez, G.F., Campilho, A., Willemsen, V., Snel, B. and Scheres, B. 2010 SOMBRERO, BEARSKIN1, and BEARSKIN2 regulate root cap maturation in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **22**, 640–654. doi: 10.1105/tpc.109.072272.

Berger, D. and Altmann, T. 2000 A subtilisin-like serine protease involved in the regulation of stomatal density and distribution in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **14**, 1119–1131.

Blanvillain, R., Young, B., Cai, Y.-m., Hecht, V., Varoquaux, F. and Delorme, V. *et al.* 2011 The *Arabidopsis* peptide kiss of death is an inducer of programmed cell death. *The EMBO journal* **30**, 1173–1183. doi: 10.1038/emboj.2011.14.

Blum, H., Beier, H., Gross, H.J. 1987 Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

Boch, J., Verbsky, M.L., Robertson, T.L., Larkin, J.C. and Kunkel, B.N. 1998 Analysis of Resistance Gene-Mediated Defense Responses in *Arabidopsis thaliana* Plants Carrying a Mutation in CPR5. *MPMI* **11**, 1196–1206. doi: 10.1094/MPMI.1998.11.12.1196.

Boller, T. and Felix, G. 2009 A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* **60**, 379–406. doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.

Bollhöner, B., Zhang, B., Stael, S., Denancé, N., Overmyer, K. and Goffner, D. *et al.* 2013 Post mortem function of AtMC9 in xylem vessel elements. *New Phytol* **200**, 498–510. doi: 10.1111/nph.12387.

- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. and Dong, X. 1997 The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant cell* **9**, 1573–1584. doi: 10.1105/tpc.9.9.1573.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. and Dong, X. 1994 A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *The Plant cell* **6**, 1845–1857. doi: 10.1105/tpc.6.12.1845.
- Bowman, J.L. 1993 Arabidopsis: an atlas of morphology and development. New York, Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag.
- Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., Suarez, M.F., Helmersson, A., Smertenko, A.P., Zhivotovsky, B. and Arnold, S. von. 2004 VEIDase is a principal caspase-like activity involved in plant programmed cell death and essential for embryonic pattern formation. *Cell death and differentiation* **11**, 175–182. doi: 10.1038/sj.cdd.4401330.
- Bozhkov, P.V., Suarez, M.F., Filonova, L.H., Daniel, G., Zamyatin, A.A. and Rodriguez-Nieto, S. *et al.* 2005 Cysteine protease mcll-Pa executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 14463–14468. doi: 10.1073/pnas.0506948102.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M. and Oliva, R. *et al.* 2011 Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 20832–20837. doi: 10.1073/pnas.1112708109.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J. 1992 Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein. A novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21–30. doi: 10.1016/0092-8674(92)90530-P.
- Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J., Shin, H.-D. 2002 The taxonomy of powdery mildew fungi. The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise. (Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J. and Carver, T.L. Eds.), St. Paul, Minnesota, pp. 13-55.
- Brininstool, G., Kasili, R., Simmons, L.A., Kirik, V., Hülskamp, M. and Larkin, J.C. 2008 Constitutive Expressor of Pathogenesis-Related Genes5 affects cell wall biogenesis and trichome development. *BMC Plant Biol* **8**, 58. doi: 10.1186/1471-2229-8-58.
- Campbell, P. 1999 Xyloglucan endotransglycosylases. Diversity of genes, enzymes and potential wall-modifying functions. *Trends in Plant Science* **4**, 361–366. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01468-5.
- Campilho, A., Garcia, B., Toorn, H.v., Wijk, H.v., Campilho, A. and Scheres, B. 2006 Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the Arabidopsis thaliana root meristem. *The Plant Journal* **48**, 619–627. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02892.x.
- Cannon, M.C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y. and Wegenhart, B.L. *et al.* 2008 Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 2226–2231. doi: 10.1073/pnas.0711980105.
- Cercós, M., Santamariá, S., Carbonell, J. 1999 Cloning and Characterization of TPE4A, a Thiol-Protease Gene Induced during Ovary Senescence and Seed Germination in Pea. *PLANT PHYSIOLOGY* **119**, 1341-1348.
- Cercós, M., Urbez, C. and Carbonell, J. 2003 A serine carboxypeptidase gene (PsCP), expressed in early steps of reproductive and vegetative development in Pisum sativum, is induced by gibberellins. *Plant molecular biology* **51**, 165–174. doi: 10.1023/A:1021142403856.
- Cheng, F.-y., Zamski, E., Guo, W.-w., Pharr, D.M. and Williamson, J.D. 2009 Salicylic acid stimulates secretion of the normally symplastic enzyme mannitol dehydrogenase: a possible defense against mannitol-secreting fungal pathogens. *Planta* **230**, 1093–1103. doi: 10.1007/s00425-009-1006-3.



- Cho, C.-W., Chung, E., Kim, K., Soh, H.-A., Jeong, Y.K., Lee, S.-W., Lee, Y.-C., Kim, K.-S., Chung, Y.-S., Lee, J.-H. 2009 Plasma membrane localization of soybean matrix metalloproteinase differentially induced by senescence and abiotic stress. *Biologia Plantarum* **53**, 461-467.
- Choi, K.H., Laursen, R.A. and Allen, K.N. 1999 The 2.1 Å Structure of a Cysteine Protease with Proline Specificity from Ginger Rhizome, *Zingiberofficinale*†,‡. *Biochemistry* **38**, 11624–11633. doi: 10.1021/bi990651b.
- Clarke, J.D. 2000 Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in cpr-Induced Resistance in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE* **12**, 2175–2190. doi: 10.1105/tpc.12.11.2175.
- Clough, S.J. and Bent, A.F. 1998 Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Coffeen, W.C. and Wolpert, T.J. 2004 Purification and characterization of serine proteases that exhibit caspase-like activity and are associated with programmed cell death in Avena sativa. *The Plant cell* **16**, 857–873. doi: 10.1105/tpc.017947.
- Coll, N.S., Epple, P. and Dangl, J.L. 2011 Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* **18**, 1247–1256. doi: 10.1038/cdd.2011.37.
- Coll, N.S., Vercammen, D., Smidler, A., Clover, C., van Breusegem, F., Dangl, J.L. and Epple, P. 2010 Arabidopsis type I metacaspases control cell death. *Science (New York, N.Y.)* **330**, 1393–1397. doi: 10.1126/science.1194980.
- Cosgrove, D.J. 2000a Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 109–124. doi: 10.1016/S0981-9428(00)00164-9.
- Cosgrove, D.J. 2000b Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**, 321–326. doi: 10.1038/35030000.
- Cunningham, D.F. and O'Connor, B. 1997 Proline specific peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1343**, 160–186. doi: 10.1016/S0167-4838(97)00134-9.
- Cutler, S.R., Ehrhardt, D.W., Griffiths, J.S. and Somerville, C.R. 2000 Random GFP. CDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, 3718–3723. doi: 10.1073/pnas.97.7.3718.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. 2001 Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826–833. doi: 10.1038/35081161.
- Day, K.J., Staehelin, L.A. and Glick, B.S. 2013 A three-stage model of Golgi structure and function. *Histochemistry and cell biology* **140**, 239–249. doi: 10.1007/s00418-013-1128-3.
- DeBono, A.G. and Greenwood, J.S. 2006 Characterization of programmed cell death in the endosperm cells of tomato seed. Two distinct death programs. *Can. J. Bot.* **84**, 791–804. doi: 10.1139/b06-034.
- Delorme, V.G.R., McCabe, P.F., Kim, D.-J., Leaver, C.J. 2000 A Matrix Metalloproteinase Gene Is Expressed at the Boundary of Senescence and Programmed Cell Death in Cucumber. *Plant Physiology* **123**, 917–927. doi: 10.1104/pp.123.3.917.
- Ding, Y., Wang, J., Wang, J., Stierhof, Y.-D., Robinson, D.G. and Jiang, L. 2012 Unconventional protein secretion. *Trends in Plant Science* **17**, 606–615. doi: 10.1016/j.tplants.2012.06.004.
- Dodds, P.N. and Rathjen, J.P. 2010 Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews. Genetics* **11**, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812.
- Domínguez, F., González, M.C. and Cejudo, F.J. 2002 A germination-related gene encoding a serine carboxypeptidase is expressed during the differentiation of the vascular tissue in wheat grains and seedlings. *Planta* **215**, 727–734. doi: 10.1007/s00425-002-0809-2.

- Drakakaki, G. and Dandekar, A. 2013 Protein secretion: how many secretory routes does a plant cell have? *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **203-204**, 74–78. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.12.017.
- Drenth, J., Jansonius, J.N., Koekoek, R., Swen, H.M., Wolthers, B.G. 1968 Structure of Papain. *Nature* **218**, 929–932. doi: 10.1038/218929a0.
- Driouich, A., Durand, C., Cannesan, M.-A., Percoco, G. and Vitré-Gibouin, M. 2010 Border cells versus border-like cells: are they alike? *Journal of experimental botany* **61**, 3827–3831. doi: 10.1093/jxb/erq216.
- Eason, J.R., Ryan, D.J., Watson, L.M., Hedderley, D., Christey, M.C., Braun, R.H. and Coupe, S.A. 2005 Suppression of the cysteine protease, aleurain, delays floret senescence in Brassica oleracea. *Plant molecular biology* **57**, 645–657. doi: 10.1007/s11103-005-0999-7.
- Eichmann, R. and Hüchelhoven, R. 2008 Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells. *Journal of Plant Physiology* **165**, 5–18. doi: 10.1016/j.jplph.2007.05.004.
- Eichmann, R., Dechert, C., Kogel, K.-H. and Hüchelhoven, R. 2006 Transient over-expression of barley BAX Inhibitor-1 weakens oxidative defence and MLA12-mediated resistance to Blumeria graminis f.sp. hordei. *Molecular plant pathology* **7**, 543–552. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00359.x.
- Elmore, S. 2007 Apoptosis. A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Path.* **35**, 495–516. doi: 10.1080/01926230701320337.
- Escamez, S. and Tuominen, H. 2014 Programmes of cell death and autolysis in tracheary elements: when a suicidal cell arranges its own corpse removal. *Journal of experimental botany* **65**, 1313–1321. doi: 10.1093/jxb/eru057.
- Felle, H.H. 2001 pH. Signal and Messenger in Plant Cells. *Plant Biology* **3**, 577–591. doi: 10.1055/s-2001-19372.
- Fendrych, M., van Hautegeem, T., van Durme, M., Olvera-Carrillo, Y., Huysmans, M. and Karimi, M. *et al.* 2014 Programmed cell death controlled by ANAC033/SOMBRERO determines root cap organ size in Arabidopsis. *Current biology : CB* **24**, 931–940. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.025.
- Ferrando, A., Farràs, R., Jásik, J., Schell, J. and Koncz, C. 2000 Intron-tagged epitope: a tool for facile detection and purification of proteins expressed in Agrobacterium-transformed plant cells. *The Plant Journal* **22**, 553-560.
- Flinn, B.S. 2008 Plant extracellular matrix metalloproteinases. *Functional Plant Biol.* **35**, 1183. doi: 10.1071/FP08182.
- Fu, Z.Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J. and Oka, N. *et al.* 2012 NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature* **486**, 228–232. doi: 10.1038/nature11162.
- Funk, V., Kositsup, B., Zhao, C. and Beers, E.P. 2002 The Arabidopsis Xylem Peptidase XCP1 Is a Tracheary Element Vacuolar Protein That May Be a Papain Ortholog. *PLANT PHYSIOLOGY* **128**, 84–94. doi: 10.1104/pp.010514.
- Galluzzi, L. and Kroemer, G. 2008 Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. *Cell* **135**, 1161–1163. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.004.
- Ge, X., Dietrich, C., Matsuno, M., Li, G., Berg, H. and Xia, Y. 2005 An Arabidopsis aspartic protease functions as an anti-cell-death component in reproduction and embryogenesis. *EMBO reports* **6**, 282–288. doi: 10.1038/sj.embor.7400357.
- Gechev, T.S., van Breusegem, F., Stone, J.M., Denev, I. and Laloi, C. 2006 Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **28**, 1091–1101. doi: 10.1002/bies.20493.

- Geldner, N., Denervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D. and Chory, J. 2009 Rapid combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant Journal* **59**, 169–178. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03851.x.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., Höfte, H. 1997 Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *PLANT PHYSIOLOGY* **114**, 295–305.
- Gille, S., Hänsel, U., Ziemann, M. and Pauly, M. 2009 Identification of plant cell wall mutants by means of a forward chemical genetic approach using hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 14699–14704. doi: 10.1073/pnas.0905434106.
- Gille, S., Sharma, V., Baidoo, E.E.K., Keasling, J.D., Scheller, H.V. and Pauly, M. 2013 Arabinosylation of a Yariv-precipitable cell wall polymer impacts plant growth as exemplified by the *Arabidopsis* glycosyltransferase mutant ray1. *Molecular plant* **6**, 1369–1372. doi: 10.1093/mp/sst029.
- Glazebrook, J. 2001 Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* — 2001 status. *Current opinion in plant biology* **4**, 301–308. doi: 10.1016/S1369-5266(00)00177-1.
- Golldack, D., Popova, O.V. and Dietz, K.-J. 2002 Mutation of the matrix metalloproteinase At2-MMP inhibits growth and causes late flowering and early senescence in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* **277**, 5541–5547. doi: 10.1074/jbc.M106197200.
- Granat, S.J., Wilson, K.A. and Tan-Wilson, A.L. 2003 New serine carboxypeptidase in mung bean seedling cotyledons. *Journal of Plant Physiology* **160**, 1263–1266. doi: 10.1078/0176-1617-01128.
- Greenwood, J.S., Helm, M. and Gietl, C. 2005 Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during *Ricinus* seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2238–2243. doi: 10.1073/pnas.0409429102.
- Gregersen, P.L., Holm, P.B. and Krupinska, K. 2008 Leaf senescence and nutrient remobilisation in barley and wheat. *Plant Biology* **10**, 37–49. doi: 10.1111/j.1438-8677.2008.00114.x.
- Hara-Nishimura, I. 1998 Transport of Storage Proteins to Protein Storage Vacuoles Is Mediated by Large Precursor-Accumulating Vesicles. *THE PLANT CELL ONLINE* **10**, 825–836. doi: 10.1105/tpc.10.5.825.
- Hara-Nishimura, I. and Hatsugai, N. 2011 The role of vacuole in plant cell death. *Cell death and differentiation* **18**, 1298–1304. doi: 10.1038/cdd.2011.70.
- Hara-Nishimura, I., Hatsugai, N., Nakaune, S., Kuroyanagi, M. and Nishimura, M. 2005 Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Current opinion in plant biology* **8**, 404–408. doi: 10.1016/j.pbi.2005.05.016.
- Hara-Nishimura, I., Kinoshita, T., Hiraiwa, N. and Nishimura, M. 1998 Vacuolar processing enzymes in protein-storage vacuoles and lytic vacuoles. *Journal of Plant Physiology* **152**, 668–674. doi: 10.1016/S0176-1617(98)80028-X.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2006 A cellular suicide strategy of plants: vacuole-mediated cell death. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **11**, 905–911. doi: 10.1007/s10495-006-6601-1.
- Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. 1987 Proglobulin processing enzyme in vacuoles isolated from developing pumpkin cotyledons. *PLANT PHYSIOLOGY* **85**, 440-445.
- Hatsugai, N., Yamada, K., Goto-Yamada, S. and Hara-Nishimura, I. 2015 Vacuolar processing enzyme in plant programmed cell death. *Frontiers in plant science* **6**, 234. doi: 10.3389/fpls.2015.00234.
- Hattori, M. and Sakaki, Y. 1986 Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal Biochem* **152**, 232-238.
- Hayashi, Y. 2001 A Proteinase-Storing Body that Prepares for Cell Death or Stresses in the Epidermal Cells of *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **42**, 894–899. doi: 10.1093/pcp/pce144.

- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Molineaux, P.M. 2000 pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**, 819–832. doi: 10.1023/A:1006496308160.
- Helm, M., Schmid, M., Hierl, G., Terneus, K., Tan, L. and Lottspeich, F. *et al.* 2008 KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells, and dismantling of extensin scaffolds. *American journal of botany* **95**, 1049–1062. doi: 10.3732/ajb.2007404.
- Herman, E.M. 1999 Protein Storage Bodies and Vacuoles. *THE PLANT CELL ONLINE* **11**, 601–614. doi: 10.1105/tpc.11.4.601.
- Herman, E. and Schmidt, M. 2004 Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 3440–3446. doi: 10.1104/pp.104.051722.
- Hierl, G., Höwing, T., Isono, E., Lottspeich, F. and Gietl, C. 2014 Ex vivo processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant molecular biology* **84**, 605–620. doi: 10.1007/s11103-013-0157-6.
- Hierl, G., Vothknecht, U. and Gietl, C. 2012 Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiologia plantarum* **145**, 103–113. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01580.x.
- Hijazi, M., Velasquez, S.M., Jamet, E., Estevez, J.M. and Albenne, C. 2014 An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins. Toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. *Front. Plant Sci.* **5**, 525. doi: 10.3389/fpls.2014.00395.
- Hong, J.K., Yun, B.-W., Kang, J.-G., Raja, M.U., Kwon, E. and Sorhagen, K. *et al.* 2008 Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of experimental botany* **59**, 147–154. doi: 10.1093/jxb/erm244.
- Höwing, T., Huesmann, C., Hoefle, C., Nagel, M.-K., Isono, E., Hüchelhoven, R. and Gietl, C. 2014 Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of *Arabidopsis* (AtCEP1) is involved in pathogen defense. *Frontiers in plant science* **5**, 58. doi: 10.3389/fpls.2014.00058.
- Hüchelhoven, R. 2005 Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS microbiology letters* **245**, 9–17. doi: 10.1016/j.femsle.2005.03.001.
- Hüchelhoven, R. 2007a Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual review of phytopathology* **45**, 101–127. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094325.
- Hüchelhoven, R. 2007b Transport and secretion in plant-microbe interactions. *Current opinion in plant biology* **10**, 573–579. doi: 10.1016/j.pbi.2007.08.002.
- Hüchelhoven, R. and Panstruga, R. 2011 Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Current opinion in plant biology* **14**, 738–746. doi: 10.1016/j.pbi.2011.08.002.
- Huesmann, C., Hoefle, C. and Hüchelhoven, R. 2011 ROPGAPs of *Arabidopsis* limit susceptibility to powdery mildew. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1691–1694. doi: 10.4161/psb.6.11.17943.
- Hwang, W.S., Roh, S.I., Lee, B.C., Kang, S.K., Kwon, D.K. and Kim, S. *et al.* 2005 Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science (New York, N.Y.)* **308**, 1777–1783. doi: 10.1126/science.1112286.
- Iakimova, E.T., Sobiczewski, P., Michalczyk, L., Węgrzynowicz-Lesiak, E., Mikiciński, A. and Woltering, E.J. 2013 Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora*-induced hypersensitive cell death in apple leaves. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **63**, 292–305. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.12.006.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. 2006 The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329. doi: 10.1038/nature05286.

- Kawashima, T. and Goldberg, R.B. 2010 The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends in Plant Science* **15**, 23–30. doi: 10.1016/j.tplants.2009.11.002.
- Kim, S.-J. and Brandizzi, F. 2012 News and Views into the SNARE Complexity in Arabidopsis. *Frontiers in plant science* **3**, 28. doi: 10.3389/fpls.2012.00028.
- Kim, S.-J. and Brandizzi, F. 2014 The plant secretory pathway: an essential factory for building the plant cell wall. *Plant & cell physiology* **55**, 687–693. doi: 10.1093/pcp/pct197.
- Kirik, V., Bouyer, D., Schöbinger, U., Bechtold, N., Herzog, M., Bonneville, J.-M. and Hülskamp, M. 2001 CPR5 is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Current Biology* **11**, 1891–1895. doi: 10.1016/S0960-9822(01)00590-5.
- Klionsky, D.J. 2000 Autophagy as a Regulated Pathway of Cellular Degradation. *Science* **290**, 1717–1721. doi: 10.1126/science.290.5497.1717.
- Koh, S., André, A., Edwards, H., Ehrhardt, D. and Somerville, S. 2005 Arabidopsis thaliana subcellular responses to compatible Erysiphe cichoracearum infections. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**, 516–529. doi: 10.1111/j.1365-313X.2005.02545.x.
- Koizumi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Tsuji, H. and Shinozaki, K. 1993 Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteine proteinases in Arabidopsis thaliana. *Gene* **129**, 175–182. doi: 10.1016/0378-1119(93)90266-6.
- Koncz, C. and Schell, J. 1986 The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of Agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics MGG* **204**, 383-396.
- Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S. and Baehrecke, E.H. *et al.* 2009 Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* **16**, 3–11. doi: 10.1038/cdd.2008.150.
- Kroemer, G. and Levine, B. 2008 Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 1004–1010. doi: 10.1038/nrm2529.
- Krüger, J., Thomas, C.M., Golstein, C., Dixon, M.S., Smoker, M. and Tang, S. *et al.* 2002 A tomato cysteine protease required for Cf-2-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. *Science (New York, N.Y.)* **296**, 744–747. doi: 10.1126/science.1069288.
- Kuroyanagi, M. 2002 Activation of Arabidopsis Vacuolar Processing Enzyme by Self-Catalytic Removal of an Auto-Inhibitory Domain of the C-Terminal Propeptide. *Plant and Cell Physiology* **43**, 143–151. doi: 10.1093/pcp/pcf035.
- Kuroyanagi, M., Yamada, K., Hatsugai, N., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2005 Vacuolar processing enzyme is essential for mycotoxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana. *The Journal of biological chemistry* **280**, 32914–32920. doi: 10.1074/jbc.M504476200.
- Laemmli, U.K. 1970 Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamport, D.T.A., Kieliszewski, M.J., Chen, Y. and Cannon, M.C. 2011 Role of the extensin superfamily in primary cell wall architecture. *PLANT PHYSIOLOGY* **156**, 11–19. doi: 10.1104/pp.110.169011.
- Laskowski, M., Biller, S., Stanley, K., Kajstura, T. and Prusty, R. 2006 Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence. *Plant & cell physiology* **47**, 788–792. doi: 10.1093/pcp/pcj043.
- Lavenus, J., Goh, T., Roberts, I., Guyomarc'h, S., Lucas, M. and Smet, I. de *et al.* 2013 Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin. *Trends in Plant Science* **18**, 450–458. doi: 10.1016/j.tplants.2013.04.006.

- Lecki, C.P., Callow, J.A. and Green, J.R. 1995 Reorganization of the endoplasmic reticulum in pea leaf epidermal cells infected by the powdery mildew fungus *Erysiphe pisi*. *New Phytologist* **131**, 211–221. doi: 10.1111/j.1469-8137.1995.tb05722.x.
- Li, D., Zhang, H., Song, Q., Wang, L., Liu, S. and Hong, Y. *et al.* 2015 Tomato SI3-MMP, a member of the Matrix metalloproteinase family, is required for disease resistance against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *BMC plant biology* **15**, 143. doi: 10.1186/s12870-015-0536-z.
- LI, X. 1993 Segregation of storage protein mRNAs on the rough endoplasmic reticulum membranes of rice endosperm cells. *Cell* **72**, 869–879. doi: 10.1016/0092-8674(93)90576-C.
- López-Fernández, M.P. and Maldonado, S. 2013 Ricinosomes provide an early indicator of suspensor and endosperm cells destined to die during late seed development in quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Annals of botany* **112**, 1253–1262. doi: 10.1093/aob/mct184.
- Lozano-Torres, J.L., Wilbers, R.H.P., Gawronski, P., Boshoven, J.C., Finkers-Tomczak, A. and Cordewener, J.H.G. *et al.* 2012 Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 10119–10124. doi: 10.1073/pnas.1202867109.
- Macho, A.P. and Zipfel, C. 2014 Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell* **54**, 263–272. doi: 10.1016/j.molcel.2014.03.028.
- Malamy, E.J. and Benfey, N. P. 1997 Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* **124**, 33-44.
- Marino, G. and Funk, C. 2012 Matrix metalloproteinases in plants: a brief overview. *Physiologia plantarum* **145**, 196–202. doi: 10.1111/j.1399-3054.2011.01544.x.
- Marin-Rodriguez, M.C. 2002 Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *Journal of experimental botany* **53**, 2115–2119. doi: 10.1093/jxb/erf089.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G. 2003 Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annual review of plant biology* **54**, 23–61. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135035.
- Martinière, A., Desbrosses, G., Sentenac, H. and Paris, N. 2013 Development and properties of genetically encoded pH sensors in plants. *Frontiers in plant science* **4**, 523. doi: 10.3389/fpls.2013.00523.
- Matsushima, R., Fukao, Y., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2004 NAI1 gene encodes a basic-helix-loop-helix-type putative transcription factor that regulates the formation of an endoplasmic reticulum-derived structure, the ER body. *The Plant cell* **16**, 1536–1549. doi: 10.1105/tpc.021154.
- Matsushima, R., Kondo, M., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2003 A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates a  $\beta$ -glucosidase with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **33**, 493–502. doi: 10.1046/j.1365-313X.2003.01636.x.
- Meslin, B., Beavogui, A.H., Fasel, N. and Picot, S. 2011 Plasmodium falciparum metacaspase PfMCA-1 triggers a z-VAD-fmk inhibitable protease to promote cell death. *PloS one* **6**, e23867. doi: 10.1371/journal.pone.0023867.
- Micali, C., Göllner, K., Humphry, M., Consonni, C. and Panstruga, R. 2008 The Powdery Mildew Disease of *Arabidopsis*: A Paradigm for the Interaction between Plants and Biotrophic Fungi. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **6**, e0115. doi: 10.1199/tab.0115.
- Micheli, F. 2001 Pectin methylesterases. Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science* **6**, 414–419. doi: 10.1016/S1360-1385(01)02045-3.
- Mollenhauer, H.H. and Totten, C. 1970 Studies on seeds. V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *PLANT PHYSIOLOGY* **46**, 794–799.

- Mulisch, M., Asp, T., Krupinska, K., Hollmann, J. and Holm, P.B. 2013 The Tr-cp 14 cysteine protease in white clover (*Trifolium repens*) is localized to the endoplasmic reticulum and is associated with programmed cell death during development of tracheary elements. *Protoplasma* **250**, 623–629. doi: 10.1007/s00709-012-0427-1.
- Murray, M.G., Thompson, W.F. 1980 Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* **8**, 4321-4325.
- Nadeau, J.A., Zhang, X.S., Li, J. and O'Neill, S.D. 1996 Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *The Plant cell* **8**, 213–239. doi: 10.1105/tpc.8.2.213.
- Nakano, R.T., Yamada, K., Bednarek, P., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2014 ER bodies in plants of the Brassicales order: biogenesis and association with innate immunity. *Frontiers in plant science* **5**, 73. doi: 10.3389/fpls.2014.00073.
- Nakashima, J., Endo, S. and Fukuda, H. 2004 Immunocytochemical localization of polygalacturonase during tracheary element differentiation in *Zinnia elegans*. *Planta* **218**, 729–739. doi: 10.1007/s00425-003-1167-4.
- Nakaune, S. 2005 A Vacuolar Processing Enzyme, VPE, Is Involved in Seed Coat Formation at the Early Stage of Seed Development. *THE PLANT CELL ONLINE* **17**, 876–887. doi: 10.1105/tpc.104.026872.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenführ, A. 2007 A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **51**, 1126–1136. doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03212.x.
- Niu, N., Liang, W., Yang, X., Jin, W., Wilson, Z.A., Hu, J. and Zhang, D. 2013 EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. *Nature communications* **4**, 1445. doi: 10.1038/ncomms2396.
- Nürnbergger, T. and Lipka, V. 2005 Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology* **6**, 335–345. doi: 10.1111/j.1364-3703.2005.00279.x.
- O'Donoghue, E.M. 2002 Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissue. *Journal of experimental botany* **53**, 513–523. doi: 10.1093/jexbot/53.368.513.
- Ogasawara, K., Yamada, K., Christeller, J.T., Kondo, M., Hatsugai, N., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. 2009 Constitutive and inducible ER bodies of *Arabidopsis thaliana* accumulate distinct beta-glucosidases. *Plant & cell physiology* **50**, 480–488. doi: 10.1093/pcp/pcp007.
- Okamoto, T. 2003 C-Terminal KDEL Sequence of A KDEL-Tailed Cysteine Proteinase (Sulfhydryl-Endopeptidase) Is Involved in Formation of KDEL Vesicle and in Efficient Vacuolar Transport of Sulfhydryl-Endopeptidase. *PLANT PHYSIOLOGY* **132**, 1892–1900. doi: 10.1104/pp.103.021147.
- Olvera-Carrillo, Y., van Bel, M., van Hautegeem, T., Fendrych, M., Huysmans, M. and Simaskova, M. *et al.* 2015 A Conserved Core of Programmed Cell Death Indicator Genes Discriminates Developmentally and Environmentally Induced Programmed Cell Death in Plants. *PLANT PHYSIOLOGY* **169**, 2684–2699. doi: 10.1104/pp.15.00769.
- Orjuela, J., Deless, E.F.T., Kolade, O., Chéron, S., Ghesquière, A. and Albar, L. 2013 A recessive resistance to rice yellow mottle virus is associated with a rice homolog of the CPR5 gene, a regulator of active defense mechanisms. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* **26**, 1455–1463. doi: 10.1094/MPMI-05-13-0127-R.
- Peaucelle, A., Braybrook, S. and Höfte, H. 2012 Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited. *Frontiers in plant science* **3**, 121. doi: 10.3389/fpls.2012.00121.
- Péret, B., Rybel, B. de, Casimiro, I., Benková, E., Swarup, R. and Laplaze, L. *et al.* 2009a *Arabidopsis* lateral root development: an emerging story. *Trends in Plant Science* **14**, 399–408. doi: 10.1016/j.tplants.2009.05.002.
- Péret, B., Larrieu, A. and Bennett, M.J. 2009b Lateral root emergence: a difficult birth. *Journal of experimental botany* **60**, 3637–3643. doi: 10.1093/jxb/erp232.

- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. 2004 NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current opinion in plant biology* **7**, 456–464. doi: 10.1016/j.pbi.2004.05.006.
- Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2014.
- Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J. & Bateman, A. 2014 *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **42**, D503-D509
- Rayle, D.L. and Cleland, R.E. 1992 The Acid Growth Theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *PLANT PHYSIOLOGY* **99**, 1271–1274. doi: 10.1104/pp.99.4.1271.
- Reymond, P. and Farmer, E.E. 1998 Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current opinion in plant biology* **1**, 404–411. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80264-1.
- Rojo, E., Martín, R., Carter, C., Zouhar, J., Pan, S. and Plotnikova, J. *et al.* 2004 VPEgamma exhibits a caspase-like activity that contributes to defense against pathogens. *Current biology : CB* **14**, 1897–1906. doi: 10.1016/j.cub.2004.09.056.
- Rost, T.L. 2011 The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of botany* **107**, 1213–1222. doi: 10.1093/aob/mcq229.
- Roycewicz, P.S. and Malamy, J.E. 2014 Cell wall properties play an important role in the emergence of lateral root primordia from the parent root. *Journal of experimental botany* **65**, 2057–2069. doi: 10.1093/jxb/eru056.
- Schaller, A. 2004 A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**, 183–197. doi: 10.1007/s00425-004-1407-2.
- Schiermeyer, A., Hartenstein, H., Mandal, M.K., Otte, B., Wahner, V. and Schillberg, S. 2009 A membrane-bound matrix-metalloproteinase from *Nicotiana tabacum* cv. BY-2 is induced by bacterial pathogens. *BMC plant biology* **9**, 83. doi: 10.1186/1471-2229-9-83.
- Schmid, M., Simpson, D. and Gietl, C. 1999 Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 14159–14164. doi: 10.1073/pnas.96.24.14159.
- Schmid, M., Simpson, D.J., Sarioglu, H., Lottspeich, F. and Gietl, C. 2001 The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 5353–5358. doi: 10.1073/pnas.061038298.
- Senatore, A., Trobacher, C.P. and Greenwood, J.S. 2009 Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *PLANT PHYSIOLOGY* **149**, 775–790. doi: 10.1104/pp.108.132720.
- Shindo, T., Misas-Villamil, J.C., Hörger, A.C., Song, J. and Van der Hoorn, Renier A L. 2012 A role in immunity for Arabidopsis cysteine protease RD21, the ortholog of the tomato immune protease C14. *PLoS one* **7**, e29317. doi: 10.1371/journal.pone.0029317.
- Shindo, T. and Van der Hoorn, Renier A L. 2008 Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Molecular plant pathology* **9**, 119–125. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00439.x.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. 1998 Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1387**, 17–31. doi: 10.1016/S0167-4838(98)00133-2.
- Suarez, M.F., Filonova, L.H., Smertenko, A., Savenkov, E.I., Clapham, D.H. and Arnold, S. von *et al.* 2004 Metacaspase-dependent programmed cell death is essential for plant embryogenesis. *Current biology : CB* **14**, R339-40. doi: 10.1016/j.cub.2004.04.019.
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B. and Yang, Y. *et al.* 2008 The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nat Cell Biol* **10**, 946–954. doi: 10.1038/ncb1754.



- Szul, T. and Sztul, E. 2011 COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda, Md.)* **26**, 348–364. doi: 10.1152/physiol.00017.2011.
- Takemoto, D., Jones, D.A. and Hardham, A.R. 2006 Re-organization of the cytoskeleton and endoplasmic reticulum in the Arabidopsis pen1-1 mutant inoculated with the non-adapted powdery mildew pathogen, *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular plant pathology* **7**, 553–563. doi: 10.1111/j.1364-3703.2006.00360.x.
- Tamura, K., Yamada, K., Shimada, T. and Hara-Nishimura, I. 2004 Endoplasmic reticulum-resident proteins are constitutively transported to vacuoles for degradation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **39**, 393–402. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02141.x.
- Tanaka, H., Onouchi, H., Kondo, M., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., Machida, C., Machida, Y. 2001 A subtilisin-like serine protease is required for epidermal surface formation in *Arabidopsis* embryos and juvenile plants. *Development* **128**, 4681–4689.
- Tanaka, T., Yamauchi, D. and Minamikawa, T. 1991 Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits. *Plant Mol Biol* **16**, 1083–1084. doi: 10.1007/BF00016081.
- Teper-Bamnolker, P., Buskila, Y., Lopesco, Y., Ben-Dor, S., Saad, I. and Holdengreber, V. *et al.* 2012 Release of apical dominance in potato tuber is accompanied by programmed cell death in the apical bud meristem. *PLANT PHYSIOLOGY* **158**, 2053–2067. doi: 10.1104/pp.112.194076.
- Than, M.E., Helm, M., Simpson, D.J., Lottspeich, F., Huber, R. and Gietl, C. 2004 The 2.0 Å crystal structure and substrate specificity of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase functioning in programmed cell death of *Ricinus communis* endosperm. *Journal of molecular biology* **336**, 1103–1116. doi: 10.1016/j.jmb.2003.12.075.
- Thomma, B.P., Penninckx, I.A., Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F. 2001 The complexity of disease signaling in Arabidopsis. *Current Opinion in Immunology* **13**, 63–68. doi: 10.1016/S0952-7915(00)00183-7.
- Thordal-Christensen, H. 2003 Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current opinion in plant biology* **6**, 351–357. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00063-3.
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E. and Kamoun, S. 2007 A Phytophthora infestans cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 364–377. doi: 10.1104/pp.106.090050.
- Toyooka, K. 2000 Mass Transport of Proform of a KDEL-tailed Cysteine Proteinase (SH-EP) to Protein Storage Vacuoles by Endoplasmic Reticulum-derived Vesicle Is Involved in Protein Mobilization in Germinating Seeds. *The Journal of Cell Biology* **148**, 453–464. doi: 10.1083/jcb.148.3.453.
- Trobacher, C.P., Senatore, A., Holley, C. and Greenwood, J.S. 2013 Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta* **237**, 665–679. doi: 10.1007/s00425-012-1780-1.
- Tsiatsiani, L., van Breusegem, F., Gallois, P., Zavalov, A., Lam, E. and Bozhkov, P.V. 2011 Metacaspases. *Cell death and differentiation* **18**, 1279–1288. doi: 10.1038/cdd.2011.66.
- Tsiatsiani, L., Timmerman, E., Bock, P.-J. de, Vercammen, D., Stael, S. and van de Cotte, B. *et al.* 2013 The Arabidopsis metacaspase9 degradome. *The Plant cell* **25**, 2831–2847. doi: 10.1105/tpc.113.115287.
- Valpuesta, V., Lange, N.E., Guerrero, C. and Reid, M.S. 1995 Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Hemerocallis*) flowers. *Plant Mol Biol* **28**, 575–582. doi: 10.1007/BF00020403.
- van Baarlen, P., Staats, M. and VAN Kan, Jan A L. 2004 Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen *Botrytis elliptica*. *Molecular plant pathology* **5**, 559–574. doi: 10.1111/j.1364-3703.2004.00253.x.
- van der Hoorn, Renier A. L. 2008 Plant Proteases. From Phenotypes to Molecular Mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 191–223. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092835.

- van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., Van der Hoorn, Renier A L, Kumlehn, J. and Doehlemann, G. 2012 A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplastic cysteine proteases. *The Plant cell* **24**, 1285–1300. doi: 10.1105/tpc.111.093732.
- van Doorn, W.G., Beers, E.P., Dangl, J.L., Franklin-Tong, V.E., Gallois, P. and Hara-Nishimura, I. *et al.* 2011 Morphological classification of plant cell deaths. *Cell death and differentiation* **18**, 1241–1246. doi: 10.1038/cdd.2011.36.
- van Doorn, W.G. 2011 Classes of programmed cell death in plants, compared to those in animals. *Journal of experimental botany* **62**, 4749–4761. doi: 10.1093/jxb/err196.
- van Doorn, W.G. and Woltering, E.J. 2005 Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10**, 117–122. doi: 10.1016/j.tplants.2005.01.006.
- van Hautegeem, T., Waters, A.J., Goodrich, J. and Nowack, M.K. 2015 Only in dying, life: programmed cell death during plant development. *Trends in Plant Science* **20**, 102–113. doi: 10.1016/j.tplants.2014.10.003.
- van Kan, J. A.-L. 2006 Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science* **11**, 247–253. doi: 10.1016/j.tplants.2006.03.005.
- Van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J. 1974 Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability. *Nature* **252**, 169–170.
- Van Sandt, Vicky S T, Suslov, D., Verbelen, J.-P. and Vissenberg, K. 2007 Xyloglucan endotransglucosylase activity loosens a plant cell wall. *Annals of botany* **100**, 1467–1473. doi: 10.1093/aob/mcm248.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A. and Farmer, E.E. 1994 Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant cell* **6**, 1191–1192. doi: 10.1105/tpc.6.9.1191.
- Velasquez, M., Salter, J.S., Dorosz, J.G., Petersen, B.L. and Estevez, J.M. 2012 Recent Advances on the Posttranslational Modifications of EXTs and Their Roles in Plant Cell Walls. *Front. Plant Sci.* **3**. doi: 10.3389/fpls.2012.00093.
- Velasquez, S.M., Ricardi, M.M., Dorosz, J.G., Fernandez, P.V., Nadra, A.D. and Pol-Fachin, L. *et al.* 2011 O-Glycosylated Cell Wall Proteins Are Essential in Root Hair Growth. *Science* **332**, 1401–1403. doi: 10.1126/science.1206657.
- Verbelen, J.-P., Cnodder, T.D., Le, J., Vissenberg, K. and Baluška, F. 2014 The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities. *Plant Signaling & Behavior* **1**, 296–304. doi: 10.4161/psb.1.6.3511.
- Vercammen, D., Belenghi, B., van de Cotte, B., Beunens, T., Gavigan, J.-A. and Rycke, R. de *et al.* 2006 Serpin1 of *Arabidopsis thaliana* is a suicide inhibitor for metacaspase 9. *Journal of molecular biology* **364**, 625–636. doi: 10.1016/j.jmb.2006.09.010.
- Vercammen, D., van de Cotte, B., Jaeger, G. de, Eeckhout, D., Casteels, P. and Vandepoele, K. *et al.* 2004 Type II metacaspases Atmc4 and Atmc9 of *Arabidopsis thaliana* cleave substrates after arginine and lysine. *The Journal of biological chemistry* **279**, 45329–45336. doi: 10.1074/jbc.M406329200.
- Vermeer, J.E.M. and Geldner, N. 2015 Lateral root initiation in *Arabidopsis thaliana*: a force awakens. *F1000prime reports* **7**, 32. doi: 10.12703/P7-32.
- Vigil, E.L. 1970 Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *The Journal of Cell Biology* **46**, 435–454.
- Vilches-Barro, A. and Maizel, A. 2015 Talking through walls. Mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Current opinion in plant biology* **23**, 31–38. doi: 10.1016/j.pbi.2014.10.005.

- Vissenberg, K., Oyama, M., Osato, Y., Yokoyama, R., Verbelen, J.-P. and Nishitani, K. 2005 Differential expression of AtXTH17, AtXTH18, AtXTH19 and AtXTH20 genes in Arabidopsis roots. Physiological roles in specification in cell wall construction. *Plant & cell physiology* **46**, 192–200. doi: 10.1093/pcp/pci013.
- Wang, J. and Bayles, K.W. 2013 Programmed cell death in plants: lessons from bacteria? *Trends in Plant Science* **18**, 133–139. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.004.
- Wang, S., Gu, Y., Zebell, S.G., Anderson, L.K., Wang, W., Mohan, R. and Dong, X. 2014 A noncanonical role for the CKI-RB-E2F cell-cycle signaling pathway in plant effector-triggered immunity. *Cell host & microbe* **16**, 787–794. doi: 10.1016/j.chom.2014.10.005.
- Wang, W., Wen, Y., Berkey, R. and Xiao, S. 2009 Specific targeting of the Arabidopsis resistance protein RPW8.2 to the interfacial membrane encasing the fungal Haustorium renders broad-spectrum resistance to powdery mildew. *The Plant cell* **21**, 2898–2913. doi: 10.1105/tpc.109.067587.
- Watanabe, N. and Lam, E. 2011 Calcium-dependent activation and autolysis of Arabidopsis metacaspase 2d. *The Journal of biological chemistry* **286**, 10027–10040. doi: 10.1074/jbc.M110.194340.
- Watanabe, S., Shimada, T.L., Hiruma, K. and Takano, Y. 2013 Pathogen infection trial increases the secretion of proteins localized in the endoplasmic reticulum body of Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY* **163**, 659–664. doi: 10.1104/pp.113.217364.
- Wenzel, C.L. and Rost, T.L. 2001 Cell division patterns of the protoderm and root cap in the closed root apical meristem of Arabidopsis thaliana. *Protoplasma* **218**, 203–213. doi: 10.1007/BF01306609.
- Wettstein, D. von. 2007 From analysis of mutants to genetic engineering. *Annual review of plant biology* **58**, 1–19. doi: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003.
- Wilson, M.H., Holman, T.J., Sørensen, I., Cancho-Sanchez, E., Wells, D.M. and Swarup, R. et al. 2015 Multi-omics analysis identifies genes mediating the extension of cell walls in the Arabidopsis thaliana root elongation zone. *Frontiers in cell and developmental biology* **3**, 10. doi: 10.3389/fcell.2015.00010.
- Wit, P.J. de. 1992 Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annual review of phytopathology* **30**, 391–418. doi: 10.1146/annurev.py.30.090192.002135.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z. and Patel, K. et al. 2004 An extracellular aspartic protease functions in Arabidopsis disease resistance signaling. *The EMBO journal* **23**, 980–988. doi: 10.1038/sj.emboj.7600086.
- Yadav, S.R. and Helariutta, Y. 2014 Programmed Cell Death. New Role in Trimming the Root Tips. *Current Biology* **24**, R374-R376. doi: 10.1016/j.cub.2014.03.055.
- Yamada, K., Matsushima, R., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2001 A Slow Maturation of a Cysteine Protease with a Granulin Domain in the Vacuoles of Senescing Arabidopsis Leaves. *PLANT PHYSIOLOGY* **127**, 1626–1634. doi: 10.1104/pp.010551.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. 2008 NAI2 Is an Endoplasmic Reticulum Body Component That Enables ER Body Formation in Arabidopsis thaliana. *THE PLANT CELL ONLINE* **20**, 2529–2540. doi: 10.1105/tpc.108.059345.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Nishina, M., Hara-Nishimura, I. and Nishimura, M. 2013 Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *PLANT PHYSIOLOGY* **161**, 108–120. doi: 10.1104/pp.112.207654.
- Yamada, K., Shimada, T., Nishimura, M. and Hara-Nishimura, I. 2005 A VPE family supporting various vacuolar functions in plants. *Physiol Plant* **123**, 369–375. doi: 10.1111/j.1399-3054.2005.00464.x.
- Yang, Z. and Klionsky, D.J. 2010 Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Current opinion in cell biology* **22**, 124–131. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014.

- Yoshida, S., Ito, M., Nishida, I. and Watanabe, A. 2002 Identification of a novel gene HYS1/CPR5 that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**, 427–437. doi: 10.1046/j.0960-7412.2001.01228.x.
- Young, T.E. and Gallie, D.R. 2000 Programmed cell death during endosperm development. In *Programmed Cell Death in Higher Plants*. E. Lam, H. Fukuda and J. Greenberg (eds). Springer Netherlands, pp. 39–57.
- Yu, X.-H., Perdue, T.D., Heimer, Y.M. and Jones, A.M. 2002 Mitochondrial involvement in tracheary element programmed cell death. *Cell Death Differ* **9**, 189–198. doi: 10.1038/sj/cdd/4400940.
- Zhang, D., Di Liu, Lv, X., Wang, Y., Xun, Z. and Liu, Z. *et al.* 2014 The cysteine protease CEP1, a key executor involved in tapetal programmed cell death, regulates pollen development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **26**, 2939–2961. doi: 10.1105/tpc.114.127282.
- Zhao, C. 2000 Exploiting Secondary Growth in *Arabidopsis*. Construction of Xylem and Bark cDNA Libraries and Cloning of Three Xylem Endopeptidases. *PLANT PHYSIOLOGY* **123**, 1185–1196. doi: 10.1104/pp.123.3.1185.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., Gruissem, W. 2004 GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *PLANT PHYSIOLOGY* **136**, 2621–2632. doi: 10.1104/pp.104.046367.
- Zong, W.-X. and Thompson, C.B. 2006 Necrotic death as a cell fate. *Genes & development* **20**, 1–15. doi: 10.1101/gad.1376506.



## 6. Anhang

### 6.1. Erzeugung von Fusionsproteinen für AtCEP3 mit einem dreifachen Hämagglutinin-tag und verschiedenfarbigen Fluoreszenzproteinen unter dem respektiven endogenen Promotor

#### 6.1.1. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt *P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP3-KDEL*

##### DNA-Sequenz:

GGTACCcacaacagagagactgaaagactgattttattaagtctgtacggtactcagaaaacagaggatctagtttc  
 ttgccatataagttatctattcttagtactttttcttttaattcttatataaatatcgaaagccatgaaatcatacatcg  
 aagatctattaaaggcttcttttaacttgggtggctttttttttttgggtggctttgtttttcaagatatgttcgt  
 caatctctcccaaaaatgtaagctctttttttctatcattgtttgttttcagatttttagattcttcaaatcgaaacc  
 ttctccgaaggatgtgtcctcaatcttttcttatgtttgatcttctgatttatttttttaataatatgaggtctttt  
 cattataaatttgctcttataaatttgacctttcatcttatgtagttgcagattttacagtctattgatatggtgctca  
 tctcattaaccaaagaactcttcgtgggatcttccaaatcacttaagaggcggagacaacgcatgcaaaatcacacac  
 atacacacgtacataacatacacaatacacacacgaaatacaaacatacatgcatgcatacaaaccttatacataca  
 tacaatatacatacatgcatcatacattcatacatgcatacatgcatacatgcatttatacattcaaacatacataca  
 tatacattgcatcatacatacattcagtcatacatgcattcatgcattcatacattcagtcataca  
 ttcatcattgcatcatacattcagtcatacatgcattcatgcattcatacattcagtcataca  
 ttcatgcattcaaacatacatgtagtcatacatacactgacaatattgtaagtcttaactcaaacatttatgtata  
 gaataaataaataaaaatgtataaaagaccatttttgtatagaacattgttgccgcgactagttcacggacatagga  
 agggaaatgataaaactcgattagataaggtggttttctgtcttgaactcgattaataacatgaattatgacttatt  
 gtcgatagcctaagtgatagatgacccagctcgagcttatttgcatttcttgagtaaaataatttcca  
 ttgaaatatctataatttaatttaagaaggaccaaccatcttcatcttaccatttataataatccactg  
 aaaaatgggaatggcagtcggttctatgtgtttctaccaaatattttgcggttttaataatcttcaactgctctacc  
 aaatctaaaattgtagacttcaatataatattcataaagtttgcggtttcacggtttatgaaacgtaaccggtt  
 cttgcattagtcccacgcaactatcttttttatccatacttgattactttctcaattcgtcgtatctcacacataata  
 tccggcaagcggtaagtccaccataaaaacgaattatctgataaccggaatggtatcagaaatttacaatgtaatat  
 ttctggaatgactattaactttgacgtgttacgagtttaataattttgaaaagactataaactctcaaacgtaacat  
 gtaatttttagcaatgctcttgagaaaacaagtgtacaattacatgtacgtgtaaaataaataatgcaaatgtcag  
 tcaatatttcgaggaacaataatatttctgttcccactctcaatcatttctcaatcatacaccataaaaggcataaaca  
 gaaccaaccaaccaaccaaccaagaagaagaatccaagac**ATGAAACTTTTCTTTATGTTCTCATCTCTTTCTT**  
**TCCCTCCTCAAGCATCAAAGGA**TTTCGATTTCGACGAAAAAGAATTAGAAACCGAAGAGAACGTATGGAAGCTCTATGA  
 GAGGTGGAGAGGCCACCCTCTGTATCCAGAGCCTCCCACGAGGCAATAAAAGCGGTTCAACGTTTATAGACACAATGTCC  
 TTCATGTCCACAGGACTAACAAAAAGAACAGCCTTACAACTCAAGATCAATAGATTCCCGACATAACGCCACCACGAG  
 TTTAGAGCTCCTACGCTGGCTCTAATGTTAAGCATCACCGAATGCTTCGTGGACCGAAGCGCGGATCTGGTGGTTTCAT  
 GTATGAGAATGTGACCAGA**GTTCGGAGTCTCGAG**taccatacagacgttctctgactatgctgactctaccctatgacg  
 taccggtattgcatccctatatccgtatgatgttccagattacgctttctctacggttcttagaggcgctccaccatag  
 GTCGAC**ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCTCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGAGCTAAACGG**  
**CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGAAAGTTCATCTGCACCACCG**  
**GCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCGACCAC**  
**ATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGG**  
**CAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCA**  
**AGGAGGACGGCAACATCTTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTATATCATGGCCGACAAGCAG**  
**AAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCA**  
**GAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACC**  
**CCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTAC**  
**AAGTCCGGA**GCTGCTGCCGCTGCCGCTGCCGCGAGCGGCCGGATCC**GTTCCGAGTTCGTGATTGGCGAGAGAAAGGAGC**  
**TGTCACTGAGGTCAAGATCAACAAGATTGTGGAAGTTGCTGGGCGTTTTTCGACGGTTGCAGCAGTGAAGGGGATAAACA**  
**AGATCAGAACAACTGGTTTCATTGTCTGAACAAGAGCTGTGGATTGTGACACTGAAGAGAATCAAGGTTGTGCA**  
**GGAGTCTCATGAACTGCGTTTGAATTTATAAAGACAATGGTGGCATCAAACCGAAGAGACTATCCTTACGATT**  
**CAGTGCAGTCTCAATCTGTAGAGCTAATAGTATTGGTGAGAAACTGTAACCATCGATGGACACGAACACCTCCCTGAGA**  
**ATGATGAGGAAGAATCTCAAAGCTGTGCTCACCAGCCTGTCTGTAGCTATTGATGCTGGGAGCTCAGATTCCAG**  
**CTTTACTCTGAGGGTGTGTTTATCGGAGAATGCGGGACTCAGTTGAACCACGGGTGGTATTGTTGGGTATGGAGAGAC**  
**CAAAAATGGAACAAAATATTGGATAGTAAAGAACTCATGGGGACCTGAATGGGGAGAAGGAGGCTATGTTCCGATAGAAA**  
**GAGGAATATCGGAGAATGAAGGACGTTGCGGTATAGCCATGGAGGCTTCTTATCCCAAGCTCTCTCGACTCCTTCT**  
**ACTCATGAGTCAGTAGTTCGTGATGATGTTAAAGACCGACTCTAG**agactttaagtcattgaaaactgaatttcgaacca  
 ttctctagttagcttacactgagtttatttatttattgattgaggttcatgggtttcagtttacacatttatcgtgtat  
 tcatcttaaatgagacgatttttatctccttgaatattggccagcatttgcctttgcggaaaaatggcgttaaatCGCG  
 CCGC

Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Klonierung:

Primerpaar 1 zur Amplifikation des Promotors mit Prä-Pro-Sequenz (2268 bp):

Sense: gtcGGTACCCacaaaaacagaggagact  
Antisense: ctcCTCGAGgggttgggagagtatttaca

Primerpaar 2 zur Amplifikation des 3x HA-Tags (132 bp):

Sense: aaaCTCGAGtaccatacgcggttctctg  
Antisense: catGTCGACcatatggtggagcgcctct

Primerpaar 4 zur Amplifikation von EGFP (759 bp):

Sense: gttcctGTCGACatggtgagcaagggcgagg  
Antisense: cctgaaGGATCCgggccgctgccgcagcggc

Primerpaar 3 zur Amplifikation von AtCEP3 (918 bp):

Sense: aagGGATCCggttccgagttctgttgattg  
Antisense: gtgGCGCCCGCatttaacgccatttttcc

Proteinsequenz:

MK<sup>Pre</sup>LF<sup>Pro</sup>FFIVLISF<sup>3xHA</sup>LSLIQASKG<sup>EGFP</sup>FD<sup>AtCEP3</sup>FDEKELETEENVW<sup>KDEL</sup>KLYERWRGHSVSRASHEAIKRFNVFRHNVLHVHRTN  
KKNKPYK<sup>Pre</sup>LKINRFADITHHEFRSSYAGSNVKHHRMLRGPKRGS<sup>Pro</sup>GGFMYENVTRVPSLEYPYDVPDYASLYPY  
DVPDYASLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMVD<sup>3xHA</sup>MVSKGEELFTGVVPI<sup>EGFP</sup>LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK  
LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLT<sup>AtCEP3</sup>YGVQCF<sup>KDEL</sup>SRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYQERTIFFKDDGNYKTRAEVK  
FEGDTLVNRIELKGI<sup>Pre</sup>DFKEDGNILGHKLEY<sup>Pro</sup>NYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQN  
TPIGDGPVLLPDNHYLSTQ<sup>3xHA</sup>SALS<sup>EGFP</sup>KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKS<sup>AtCEP3</sup>GAAAAAAAAAAGSV<sup>KDEL</sup>PSSV  
DWREKGA<sup>Pre</sup>VT<sup>Pro</sup>EVKNQDCGSCWAFSTVAAVEGINKIRTNKLVSLSEQLVDCDTEENQGCAGGLMEPAFEFIK  
NNGGIKTEETYPYDSSDVQFCRANSIGGETVTIDGHEHVPENDEEELLKAVAHQPVSVAIDAGSSDFQLYSE  
GVFIGECGTQLNHGVVIVGYGETKNGTKYWI<sup>3xHA</sup>VRNSWGPEWEGGGYVRIERGIS<sup>EGFP</sup>ENEGRCGIAMEASYPTKLS  
STPSTHESVVRDDV<sup>AtCEP3</sup>KDEL

Pre - Pro - 3xHA - EGFP - AtCEP3 - KDEL

Weiß markierte Aminosäuren wurden aufgrund der Klonierungsstrategie hinzugefügt.

## 6.1.2. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt *P<sub>CEP3</sub>::pre-pro-3xHA-mTFP1-AtCEP3-KDEL*

### DNA-Sequenz:

GGTACCcacaaaacagaggagactgaaagactgattttattaagtctgtacggactcagaaaacagaggatctagtttc  
 ttgccatataagttatctattcttagtactttttcttttaattcttatataaaatcgaagccatgaaatcatacattcga  
 aagatctattaaggtctcttttaacttgggtggctctttttttttttgggtggctctttgtttttcaagatagttcgt  
 caatctctctccacaaaatgtaagctctttttttctatctttggttttcagattttagattcttcaaatcgaaacc  
 ttctccgaaggatgtgtcctcaatctttttcttatgtttgatcttctgatttatttttttaataatatgatggctcttt  
 cattataaatttgctcttataaattttgacctttcatcttatgtagttgcagattttacagtctattgatatgtggctcaa  
 tctcattaaccaaagaactcttcgtgggatcttccaaatcacttaaaggcggagacaacgcatgcaaaatcacacac  
 atacacacgtacataacatacacaatacacacacgaaatacaaacatacatgcatgcatacaaaacttacatacaca  
 tacaataacatacatacagcattcatacattcatacattgcatacattgcatacattgcatttatacattcaaacatacaca  
 tatatacagcattcatacatacagcattcatacattgcatacattgcatacattgcattcattgcattcattcattcattc  
 ttatacattgcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcattcatt  
 ttcatgcatcacaacatacattgatgcatacatacagcacaatattgtaagtcttaactcaaacattttatgtata  
 gaataaataaataaaatgtataaaagaccatttttgatagaacattgttggccgactagttcacggacatagga  
 agggaaatgataaaactcgattagataaggtggttttctgtcttgactcgattaaataacatgaattattgacttatt  
 gtcgatagcctaagtgatagagtcaccagctcgagcttatttgcctttgacttatttgagtaaaataatttcca  
 ttgaaatctataaatttaatttaagagagccaaccatcttcatcttattctttaccatttataaaatccactg  
 aaaatgggaatggacgtacgtgttctatgtgtttctacaaatatttttgcggttttaatactttcaactgtctctacc  
 aaatctaaattgggttagacttcaatataatatttataaaagttttgcgtgtttcacgtgtttatgaaacgtaccggt  
 cttgcattttagtcccacgactatctttttttatccacttgattactttctcaattcgtcgtatctcacacattata  
 tccggcaagcggtaagtccaccataaaaacgaattatogataaccggaatggtatcagaaatttacaatgtaatat  
 ttctggaatgactattaactttgacgtgttacgagtttaataattttgaaaagactataaactctcaaacgtacat  
 gtaatttttagcaatgtccttgagaaaacaagtgaacaattacatgtacgtgtaaatataaaataatgcaaatgtcag  
 tcaatatttcogagaaacaatatttctgttcccactctcaatcatttctcaatcatataccataaaaggcataaaaca  
 gaaccaaccaaccaaccaacaagaagaatccaaagacATGAAACTTTTCTTTATTGTTCTCATCTCTTTTCTT  
 TCCCTCTCCAAGCATCAAAAGGATTTCGATTTTCGACGAAAAAGAATTAGAAAACCGAAGAGAACGATGGAAGCTCTATGA  
 GAGGTGGAGAGGCCCAACTCTGTATCCAGAGCCTCCCAGAGGCAATAAAGCGGTTCAACGTTTTTAGACACAATGTCC  
 TTCATGTCCACAGGACTAACAAAAAGAACAGCCTTACAAACTCAAGATCAATAGATTCCGGACATAACGCACCACGAG  
 TTTAGAACTCCTACGCTGGCTCTAATGTTAAGCATCACCGAATGCTTCGTGGACCGAAGCGCGGATCTGGTGGTTTTCA  
 GTATGAGAATGTGACCAGATTTCGGACTTACCATAcgcagcttctgactatgctcactctaccctatgacg  
 taccgattatgcatccctatatccgtatgatgtttccagattacgcttctcta cgttcctctagaggcgtccaccatag  
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGACCACAATGGGCGTAATCAAGCCGACATGAAGATCAAGCTGAAGATGGAGGGCAACGT  
 GAATGGCCACGCTTCGTGATCGAGGGCGAGGGCGAGGGCAAGCCCTACGACGGCACCAACACCATCAACCTGGAGGTGA  
 AGGAGGGAGCCCCCTGCCTTCTCCTACGACATTCGACCACCGCGTTCCGCTACGGCAACAGGGCCTTCAACAAGTAC  
 CCCGACGACATCCCCAACTACTTCAAGCAGTCTTCCCCGAGGGCTACTCTTGGGAGCGCACCATGACCTTCGAGGACAA  
 GGGCATCGTGAAGGTGAAGTCCGACATCTCCATGGAGGAGGACTCCTTCATCTACGAGATACACCTCAAGGGCGAGA  
 TCCCCCAACGGCCCGTGATGCAGAAGAAGACCACCGGCTGGGACGCTCCACCGAGAGGATGTACGTGCGCGACGGC  
 GTGCTGAAGGGCGACGTCAGCACAAGCTGCTGCTGGAGGGCGGGCCACCACCGCGTTGACTTCAAGACCATCTACAG  
 GGCCAAGAAGGGCGTGAAGCTGCCGACTATCACTTTGTGGACCACCGCATCGAGATCCTGAACCACGACAAGGACTACA  
 ACAAGGTGACCGTTTACGAGAGCGCGTGGCCCGCAACTCCACCGACGGCATGGACGAGCTGTACAAGAGCTTGTCCG  
 AGTTCTGTTGATTGGCGAGAGAAAGGACTGTCACTGAGGTCAAGAATCAACAAGATTGTGGAAGTTGCTGGGCGTTTTT  
 GACGGTTCAGCAGTGAAGGGATAAACAAGATCAGAACAACAACCTGGTTTCATTGCTGAACAAGAGCTTGTGGATT  
 GTGACACTGAAGAGAATCAAGGTTGTGAGGAGTCTCATGAACTCGGTTTGAATTTATAAAGAACAATGGTGGC  
 AAAACCGAAGAGACTTATCCTTACGATTCAGGTGACGTTCAATCTGTAGAGCTAATAGTATTGGTGGAGAACTGTAAC  
 CATCGATGGACACGAACCGTCCCTGAGAATGATGAGGAAGAATCTCAAAAGCTGTTGCTCACCAGCCTGCTCTGTAG  
 CTATTGATGCTGGGAGCTCAGATTTCCAGCTTACTCTGAGGGTGTGTTTATCGGAGAATGCGGGACTCAGTTGAACCAC  
 GGGGTGGTATTGTTGGGTATGGAGAGACAAAAATGGAACAAAAATATTGGATAGTAAGGAACTCATGGGACCTGAATG  
 GGGAGAAGGAGGCTATGTTCCGATAGAAAGAGGAATATCGGAGAATGAAGGACGTTGCGGTATAGCCATGGAGGCTTCTT  
 ATCCCACCAAGCTCTCTTCGACTCCTTCTACTCATGAGTCAGTAGTTCGTGATGATGTTAAAGACGAGCTCTAGagactt  
 taagtcatgaaaactgaatttcgaaccattcttctagtgagcttacactgagtttattatattttatggattgaggttcat  
 ggtttcagtttacacattttatcgtgtatcattcttaatttgagacgatttttatctccttgtaaatattggccagcattt  
 gctttgcggaataatggcgtaaatGCGGCCCG



Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Klonierung:

Primerpaar 1 zur Amplifikation des Promotors mit Prä-Pro-Sequenz (2268 bp):

Sense: gtcGGTACCCacaaaaacagaggagact  
Antisense: gtaGTCGACactcggaactctggtcac

Primerpaar 2 zur Amplifikation des 3x HA-Tags mit mTFP (837 bp):

Sense: agaGTCGACTacccatacgcggttcoct  
Antisense: aacAAGCTTcttgtacagctcgtccat

Primerpaar 3 zur Amplifikation von AtCEP3 (918 bp):

Sense: aagAAGCTTggttccgagttctggtgattg  
Antisense: gtgGCGGCCGCatttaacgccatttttcc

Proteinsequenz:

MK<sup>Pre</sup>LVFFIVLISF<sup>Pro</sup>LSLQASK<sup>3xHA</sup>GFDFDEKELETEENVW<sup>mTFP1</sup>KLYERWRG<sup>AtCEP3</sup>HHSVSRASHEAIKRFNVFRHNVLHVHRTN  
KKNKPYK<sup>Pro</sup>LKINRFADITHHEFRSSYAGSNVKHHRMLRGPKRGS<sup>3xHA</sup>GGFMYENVTRV<sup>mTFP1</sup>PSVDY<sup>AtCEP3</sup>PDV<sup>Pro</sup>PDYASLYPY  
DVPDYASLYPYDVPDYASL<sup>3xHA</sup>IRSSRGVHHM<sup>mTFP1</sup>MVSKGEETTMGV<sup>AtCEP3</sup>IKPDMKIKLKMEGNVNGHAFVIEGEGEGKPYD  
GTNTINLEVKEGAPLPFSYDILTTAFAYGNRAFTKYPDDIPNYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGI<sup>Pro</sup>VK<sup>AtCEP3</sup>SDI  
SMEEDSFIYEIHLKGENFPNGPVMQKKT<sup>3xHA</sup>TGWDASTERMYVRDGV<sup>mTFP1</sup>LKGDVKHKLLLEGGG<sup>AtCEP3</sup>HHRVDFKTIYRA  
KKAVKLPDYHFVDHRIEILNHDKDY<sup>Pro</sup>NKVTVYESAVARNSTDGMDELYK<sup>AtCEP3</sup>KLVPSSVDWREK<sup>Pro</sup>GAVTEVKNQ<sup>AtCEP3</sup>QDC  
GSCWAFSTVAAVEGINKIRTNKLVSLSEQELVDCDTEENQGCAGGLMEPAFEFIK<sup>Pro</sup>KNNGGIKTEETYPYDSSD  
VQFCRANSIGGETVTIDGHEHVPENDEEELLKAVAHQPV<sup>3xHA</sup>SVAIDAGSSDFQLYSEG<sup>mTFP1</sup>VFIGECGTQLNHGVVI  
VGYGETKNGTKYWIVRNSWGPWEGEGGYVRIERGIS<sup>AtCEP3</sup>ENEGRCGIAMEASYPTKLSSTPSTHESVVRDDV<sup>Pro</sup>KDE  
L

Pre - Pro - 3xHA - mTFP1 - AtCEP3 - KDEL

Weiß markierte Aminosäuren wurden aufgrund der Klonierungsstrategie hinzugefügt.

### **6.1.3. Klonierungsstrategie für das funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-mCerulean-AtCEP3-KDEL$**

#### **DNA-Sequenz:**

GGTACCacaaaaacagaggagactgaaagactgattttattaagtctgtacggactcagaaaaacagaggatctagtttc  
 ttgccatataagttatctattcttagtactttttcttttaattcttatataaatatcgaaagccatgaaatcatacattcga  
 aagatctattaaaggcttcttttaacttggtgggtctttttttttttgggtgggtctttgttttcaagatagttcgt  
 caatctctctccacaaaaatgtaagctctttttttctatctttggtgttttcagattttagattcttcaaatcgaaacc  
 ttctccgaaggtatgtgtcctcaatctttttcttatgtttgatcttctgatttatttttttaataatatgatggctctttt  
 cattataaatttgctcttataaattttgacctttcatcttatgtagttgcagattttacagtctattgatatgtgggtccaa  
 tctcattaaccaaagaactcttctggtggatcttccaaatcacttaagaggccggagacaacgcatgcaaaatcacacac  
 atacacacgtacataacatacatacaaaatcacacacgaatacaaacatacatgcatgcatacaaaacttacatacataca  
 taaaaatatacatacatgcatcctacatacattcatacatgcatacatgcatacatgcatttatacattcaaacatacataca  
 tatatacatgcatcctacatacatacattcagtcatacattcatacatgcattcatgcattcatacattcagtcataca  
 ttcatacatgcatcctacatacattcatacatacatacatgcattcatgcattcatacattcatacatacatgca  
 ttcattgcattcaaacatacatgtagtcatacatacagtcacaatattgtaagtcttaactcaaacattttatgtata  
 gaataaataaataaataaataaagaccattttgtatagaacattgttggcgcgcactagttccaggacatagga  
 agggaaatgataaaactcgattagataaggtggttttctgtcttgaactcgattaataaacatgaattatgacttatt  
 gtcgtatagcctaaggtacgtatagagtcaccagctcgagcttatttgcctttgacttcttgagtaaaaaaatttcca  
 ttgaaatatctataatttaatttaagaaggaccacccatcttcatcttattcttaccatttataaaatccactg  
 aaaatgggaatggacgtacgtgttctattgtgtttctacaaatattttgctgttttaatatctttcaactgtctctacc  
 aatctaaaattggttagacttcaatataatatttccataaagtttgcgtgtttcacgtgtttatgaaacgtaccggt  
 cttgcatttagtcccacgcaactctttttttatccatactgattactttctcaattcgtcgtatctcacacataattata  
 tccggccaagcggctaagtccaccataaaaaacgaattatcgtataaccggaatgttatcagaaatttacaatgtaatat  
 tcttggaaatgactattaactttgacgttgttacgagtttaataattttgaaaagactataaactctcaaacgtacat  
 gtaatttttagcaatgtccttggagaaaaaagtgtaacaattacatgtacgtgtaattaaaaataatgcaaatgtcag  
 tcaatatttcgaggaaacaatataatttctgttcccactctcaatcatttctcaatcatataccataaaaggcataaaca  
 gaaccaaccaaccaaccaaccaagaagaagaatccaaagac**ATGAAACTTTTCTTTATTGTTCTCATCTCTTTTCTT**  
**TCCCTCTCCAAGCATCAAAAGGA**TTTCGATTTCGACGAAAAAGAATTAGAAAACCGAAGAGAACCGTATGGAAGCTCTATGA  
 GAGGTGGAGAGGCCACCCTCTGTATCCAGAGCCTCCCACGAGGCAATAAAGCGGTTCAACGTTTGTAGACACAATGTCC  
 TTCATGTCCACAGGACTAACAAAAAGAACAAGCCTTACAACTCAAGATCAATAGATTCCCGACATAACGCACCACGAG  
 TTTAGAACTCCTACGCTGGCTCTAATGTTAAGCATCACCGAATGCTTCGTGGACCGAAGCGCGGATCTGGTGGTTTCAT  
 GTATGAGAAATGTGACCAGA**GTTCCGAGT**GTCGACtaccatacagacgttctctgactatgagctcactctaccctatgagc  
 taccggattatgcatccctatatccgtatgatgttccagattacgcttctctacgttcctctagaggcgtccaccatag  
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAA  
 GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGC  
 TGCCCGTGCCCTGGCCACCTCTGTGACCACCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAG  
 CAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA  
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG  
 ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAAGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAAC  
 GGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC  
 CCCCATCGGGCAGGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACG  
 AGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAG  
**CTT**GTTCCGAGTTCGTGATTGGCGAGAGAAAGGAGCTGTCACTGAGGTCAAGAATCAACAAGATTGTGGAAGTTGCTG  
 GCGGTTTTCGACGGTTCAGCAGTGGAAAGGATAAACAAGATCAGAACAAAACAACCTGGTTTTATTGCTGAACAAGAGC  
 TTGTGGATTGTGACACTGAAGAGAATCAAGTTGTGCAGGAGGTCTCATGGAACCTGCGTTTTGAATTTATAAAGAACAAT  
 GGTGGATCAAAACCGAAGAGACTTATCCTTACGATTCCAGTGACGTTCAATTCTGTAGAGCTAATAGTATTGGTGGAGA  
 AACTGTAACCATCGATGGACACGAACCGTCCCTGAGAATGATGAGGAAGAACTTCTCAAAGCTGTTGCTCACCAGCCTG  
 TCTCTGAGCTATTGATGCTGGGAGCTCAGATTTCCAGCTTACTCTGAGGGTGTGTTTATCGGAGAATGCGGGACTCAG  
 TTGAACCAGGGGTGGTATTGTTGGGTATGGAGAGACCAAAAATGGAACAAAATATTGGATAGTAAGGAACTCATGGGG  
 ACCTGAATGGGGAGAAGGAGCTATGTTCCGATAGAAAGAGGAATATCCGAGAATGAAGGACGTTGCGGTATAGCCATGG  
 AGGCTTCTTATCCCAAGCTCTCTTCGACTCCTTCTACTCATGAGTCAGTAGTTCGTGATGATGTT**AAAGACGAGCTC**  
**TAG**agactttaagtcatgaaaactgaatttcgaaccattcttctagttagcttacactgagtttattatattttatggatt  
 gaggtcatgggtttcagtttacacatttatcgtgtattcatcttaaatgagacgatttttatctccttgaatattgg  
 ccagcatttgcctttgcggaataatggcgttaaatGCGGCCGC

Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Klonierung:

Primerpaar 1 zur Amplifikation des Promotors mit Prä-Pro-Sequenz (2268 bp):

Sense: gtcGGTACCCacaaaaacagaggagact  
Antisense: gtaGTCGACactcggaactctggtcac

Primerpaar 2 zur Amplifikation des 3x HA-Tags mit mCerulean (849 bp):

Sense: agaGTCGACTaccatacagacgttct  
Antisense: aacAAGCTTcttgtacagctcgtccat

Primerpaar 3 zur Amplifikation von AtCEP3 (918 bp):

Sense: aagAAGCTTggtccgagttctggtgattg  
Antisense: gtgGCGGCCGCatttaacgccatttttcc

Proteinsequenz:

MK<sup>Pre</sup>LVVLI<sup>Pro</sup>SFLSLLQASKG<sup>3xHA</sup>FDFDEKELETEENVW<sup>mCerulean</sup>KLYERWRG<sup>AtCEP3</sup>HHSVSRASHEAIK<sup>KDEL</sup>RFNVFRHNVLHVHRTN  
KKNKPYK<sup>Pre</sup>LKINRFADITHHEFRSSYAGSNVKHHRMLRGP<sup>Pro</sup>KRGSGGFMYENVTR<sup>3xHA</sup>VPS<sup>mCerulean</sup>VDY<sup>AtCEP3</sup>YPYDVPDYASLYPY  
DVPDYASLYPYDVPDYASL<sup>3xHA</sup>RSSRGVHHM<sup>mCerulean</sup>MVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT  
LKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE  
GDTLVNRIELKGI<sup>mCerulean</sup>DFKEDGNILGHKLEYNAISDNVYITADKQNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTP  
IGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK<sup>AtCEP3</sup>KL<sup>mCerulean</sup>VPSSVDWREKGA<sup>Pro</sup>VEVKNQ  
QDCGSCWAFSTVAAVEGINKIRTNKLVSLSEQELVDCDTEENQGCAGGLMEPAFEFIKNNGGIKTEETYPYD  
SSDVQFCRANSIGGETVTIDGHEHVPENDEEELLKAVAHQPVSVAIDAGSSDFQLYSEG<sup>3xHA</sup>VF<sup>mCerulean</sup>FIGECGTQLNHG  
VVIVGYGETKNGTKYWIVRNSWGPWEGEGGYVRIERGIS<sup>AtCEP3</sup>ENEGRCGIAMEASYPTKLSSTPSTHESVRRDDV  
KDEL-

<sup>Pre</sup> - <sup>Pro</sup> - <sup>3xHA</sup> - <sup>mCerulean</sup> - <sup>AtCEP3</sup> - <sup>KDEL</sup>

Weiß markierte Aminosäuren wurden aufgrund der Klonierungsstrategie hinzugefügt.

### **6.1.4. Klonierungsstrategie für das nicht funktionelle Reporterkonstrukt $P_{CEP3}::pre-pro-3xHA-mCerulean-KDEL$**

#### **DNA-Sequenz:**

GGTACCacaaaaacagaggagactgaaagactgattttattaagtctgtacggactcagaaaaacagaggatctagtttc  
 ttgccatataagttatctattcttagtactttttcttttaattcttatataaatatcgaaagccatgaaatcatacattcga  
 aagatctattaaggtctctttttaacttggggtggtctttttttttttgggtggtctttgtttttcaagatatgttcgt  
 caatctctctccacaaaaatgtaagctctttttttctatctttgtttgttttcagatttttagattcttcaaatcgaaacc  
 ttctccgaaggtatgtgtcctcaatctttttctttatgtttgatctttctgatttatttttttaataaatatgatggctctttt  
 cattataaatttgctcttataattttgacctttcatcttatgtagttgcagattttacagtctattgatatgtgggtccaa  
 tctcattaaccaaagaactcttcgtgggatcttccaaatcacttaagaggccggagacaacgatgcaaaatcacacac  
 atacacacgtacataacatacatacaaaatacacacagaaatacaaacatacatgcatgcatacaaaacttacatacataca  
 taaaaatacatacattgcattcatacattcatacattgcatacattgcatacattgcatttatacattcaaacatacataca  
 tatatacattgcattcatacatacattgcattgcatacattgcatacattgcattgcattgcattgcattgcattgcattgcatac  
 ttcatgcattcacaacatacattgcattgcatacattgcatacattgcatacattgcatacattgcatacattgcatacattgcatac  
 gaataa  
 agggaaatgataaaactcgattagataaaggtgggttttctgtcttgaactcgattaataaacatgaattatgacttatt  
 gtcgtatagcctaaggtacgtatagagtcaccagctcgagcttattttgctttttgcattactttgagtaaaaaataatttcca  
 ttgaaatatctataattttaatttaagaaggaccacaaccatcttcatcttaccatttataataatccactg  
 aaaatgggaatggacgtacgtgttctatgtgtttctacaaatattttgctgttttaataatctttcaactgtctctacc  
 aatctaaaattgggttagacttcaatataatatttccataaagttttgctgtgtttcacgtgtttatgaaacgtaccggtt  
 cttgcatttagtcccacgcaactatcttttttttaccatacttgattactttctcaattcgtcgtatctcacacataattata  
 tccggcaagcggctaagtccaccataaaaaacgaatttatcgataaccggaatgttatcagaaatttacaacatgtaatat  
 tctggaatgactattaactttgacgttgttacgagtttaataattttgaagactataaactctcaaacgtacat  
 gtaatttttagcaatgtccttgagaaaaaagtgtaacaattacatgtacgtgtaaatataaataatgcaaatgtcag  
 tcaatatttcgaggaaacaatataatctgttcccactctcaatcttctcaatcatataccataaaaggcataaaca  
 gaaccaaccaaccaaccaaccaagaagaagaatccaaagac**ATGAAACTTTTCTTTATGTTCTCATCTCTTTTCTT**  
**TCCCTCTCCAAGCATCAAAAAGGATTTCGATTTTCGACGAAAAAGAATTAGAAAACCGAAGAGAACGTATGGAAGCTCTATGA**  
**GAGGTGGAGAGGCCACCCTCTGTATCCAGAGCCTCCCACGAGGCAATAAAGCGGTTCAACGTTTTTAGACACAATGTCC**  
**TTCATGTCCACAGGACTAACAAAAAGAACAAGCCTTACAAACTCAAGATCAATAGATTCCGCCGACATAACGCACCACGAG**  
**TTTAGAAGCTCCTACGCTGGCTCTAATGTTAAGCATCACCGAATGCTTCGTGGACCGAAGCGCGGATCTGGTGGTTTTCAT**  
**GTATGAGAAATGTGACCAGA**GTTCCGAGT**GTCGACtaccatacagacgttctctgactatgctgactctaccctatgacg**  
**taccggattatgcatccctatatccgtatgatgttccagattacgcttctcta**cgttcctctagaggcgtccaccatag  
 ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAA  
 GTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGC  
 TGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTGGGGCGTGCAGTGTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAG  
 CAGCAGGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTA  
 CAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGG  
 ACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACGCCATCAGCGACAAGTCTATATCACCGCCGACAAGCAGAAGAAC  
 GGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACAC  
 CCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCAAGCTGAGCAAAGACCCCAACG  
 AGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGAAG  
 CTT**GATGATGTTAAAGACGAGCTCTAG**agactttaagtattgaaaactgaatttcgaaccattcttctagttagcttac  
 actgagtttattttttatggattgaggttcatgggttccagtttacacatttatcgtgtattcatcttaattgagacg  
 atttttatctccttgtaattattggccagcatttgcctttgcggaaaaatggcgttaaat**GCGGCCGC**

Verwendete Primer zur PCR-Amplifikation und Klonierung:

Primerpaar 1 zur Amplifikation des Promotors mit Prä-Pro-Sequenz (2268 bp):

Sense: gtcGGTACCCacaaaaacagaggagact  
Antisense: gtaGTCGACactcgggaactctggtcac

Primerpaar 2 zur Amplifikation des 3x HA-Tags mit mCerulean (849 bp):

Sense: agaGTCGACTaccatacagacgttcoct  
Antisense: aacAAGCTTcttgtacagctcgtccat

Primerpaar 3 zur Amplifikation von KDEL-3'UTR (235 bp):

Sense: aagAAGCTTgatgatgttaaagacgagc  
Antisense: gtgGCGCCCGCatttaacgccatttttcc

Proteinsequenz:

MK<sup>Pre</sup>LFFIVLISFLLQASKG<sup>Pro</sup>FDFDEKELETEENVWKL<sup>3xHA</sup>YERWRGHHSVSRASHEAIKRFNVFRHNVLHVHRTN  
KKNKPYKLIKINRFADITHHEFRSSYAGSNVKHHRMLRGPKRGS<sup>mCerulean</sup>GGFMYENVTRVPSVDY<sup>AtCEP3</sup>YPDYDPDYASLYPY  
DVPDYASLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMMVSKGEELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT  
LKFICTTGKLPVPWPPTLVTTLTWGVQCFARYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFE  
GDTLVNRIELKGI<sup>KDEL</sup>DFKEDGNILGHKLEYNAISDNVYITADKQKNGIKANFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTP  
IGDGPVLLPDNHYLSTQSKLSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYK<sup>KDEL</sup>KLDDV<sup>KDEL</sup>-

Pre - Pro - 3xHA - mCerulean - AtCEP3 - KDEL

Weiß markierte Aminosäuren wurden aufgrund der Klonierungsstrategie hinzugefügt.

## **6.2. Lokalisation des Pro-Enzyms von AtCEP2 in der Epidermis an der endogenen Austrittsstelle des Seitenwurzel-Primordiums**

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP2 *in vivo* im vegetativen Gewebe werden 10 d alte homozygote Keimlinge, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 ( $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$ ) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren, analysiert (s. Kap. 2.1.1.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

Bei der Untersuchung der subzellulären Lokalisation von AtCEP2 *in vivo* kann am CLSM ausschließlich die Expression des Pro-Enzyms von AtCEP2 pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL und nicht die maturierte Form von AtCEP2 visualisiert werden. Dies liegt daran, dass im Zuge der Maturierung von AtCEP2 auch das Fluoreszenzprotein mCherry von der maturierten Untereinheit abgespalten wird (s. Kap. 2.4.4.; Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)).

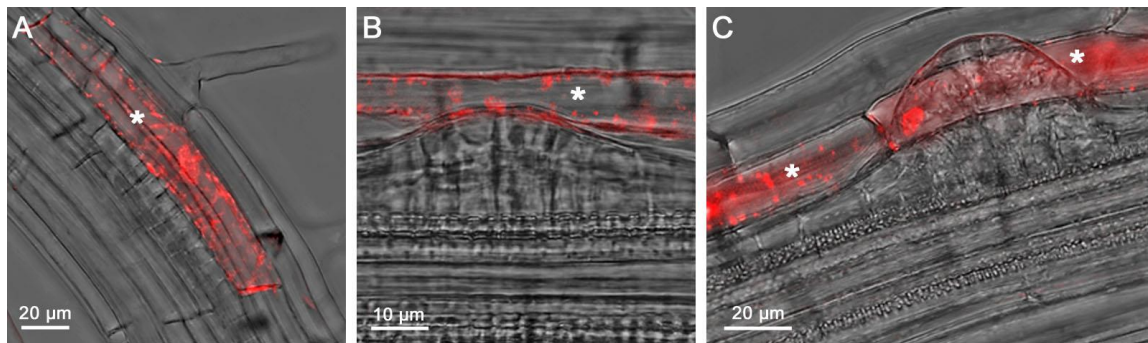
Diese Aufnahmen des Pro-Enzyms von AtCEP2 am CLSM wurden in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) erarbeitet. Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) führte die Mikroskopie am CLSM Leica SP8 sowie die Bearbeitung der Rohdaten alleine durch. Die Fein-Bearbeitung der Daten sowie die Erstellung der Abbildung 49 wurden ausschließlich vom Verfasser dieser Dissertation (Timo Höwing) getätigt.

In der Wurzel ist das Pro-Enzym von AtCEP2 sehr distinkt in einer bzw. zwei Epidermiszellen lokalisiert. Genau neben diesen Epidermiszellen (Abb. 49 weiße Asteriske) tritt das neugebildete Seitenwurzel-Primordium endogen aus (Abb. 49).

Es ist deutlich zu erkennen, dass das Pro-Enzym von AtCEP2 vor Erreichen des Seitenwurzel-Primordiums in die epidermale Zellschicht in dieser bereits akkumuliert (Abb. 49A). Es kann nicht ausgewertet werden, in welchem Stadium der Seitenwurzelentwicklung sich das Primordium befindet (s. Abb. 39). Aus diesem Grund werden die frühen Stadien zusammengefasst und als Stadium I-VI angegeben.

Im Stadium VII der Seitenwurzelentwicklung dagegen befindet sich das neugebildete Seitenwurzel-Primordium in der Epidermis und steht unmittelbar vor dem Austritt durch diese (s. Abb. 39). Genau in dieser Epidermiszelle, die an der endogenen Austrittsstelle auseinanderweichen muss, ist das Pro-Enzym von AtCEP2 lokalisiert (Abb. 49B).

Das Pro-Enzym von AtCEP2 ist zudem auch nach dem endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums durch die Epidermis im Stadium VIII in zwei auseinandergewichenen Epidermiszellen akkumuliert (Abb. 49C).



**Abbildung 49: Akkumulierung des Pro-Enzyms von AtCEP2 in einer bzw. zwei (weiße Asteriske) der Epidermiszellen, die für den endogenen Austritt des Seitenwurzel-Primordiums auseinanderweichen müssen, im Stadium I-VI (A), Stadium VII (B) und Stadium VIII (C).** Dargestellt sind neugebildete Seitenwurzel-Primordia von verschiedenen 10 Tage alten homozygoten Keimlingen, die ein funktionelles Reporterkonstrukt für AtCEP2 (*P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL*) im Col-0 Wildtyp Hintergrund exprimieren. Die Aufnahmen wurden am CLSM (Leica SP8) mit einem 40-er Objektiv getätigt und manuell vergrößert. Weiße Asteriske (A-C) zeigen eine bzw. zwei Epidermiszellen, in der Pro-AtCEP2 akkumuliert und die für den endogenen Austritt des neugebildeten Seitenwurzel-Primordiums weichen müssen. Für die entsprechenden Entwicklungsstadien der Seitenwurzel-Primordia siehe Abb. 39. Diese Aufnahmen des Pro-Enzyms von AtCEP2 am CLSM wurden in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) durchgeführt. Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) führte alleine die Mikroskopie am CLSM sowie die Bearbeitung der Rohdaten durch. Die Fein-Bearbeitung der Daten sowie die Erstellung der Abbildung wurden ausschließlich vom Verfasser dieser Dissertation (Timo Höwing) getätigt.

### **6.3. Lokalisation von AtCEP2-Signalen mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers in der Zellwand von LRC-Zellen und in der Zellwand von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone**

Die subzelluläre Lokalisation von AtCEP2 in der Zellwand kann mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers gegen die reife Untereinheit von AtCEP2 in einer „Whole Mount“ Immunlokalisierung untersucht werden. Hierfür werden Wurzeln von 10 d alten Keimlingen des Col-0 Wildtyps und als Negativkontrolle der homozygoten *atcep2 ko* analysiert. Der verwendete Peptid-Antikörper bindet an die letzten 15 Aminosäuren am Ende der reifen AtCEP2 Untereinheit, die direkt N-terminal dem „KDEL“ ER-Rückhaltesignal benachbart sind (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Anschließend erfolgt die Inkubation mit einem Cyanin CY2-gekoppelten sekundären Antikörper.

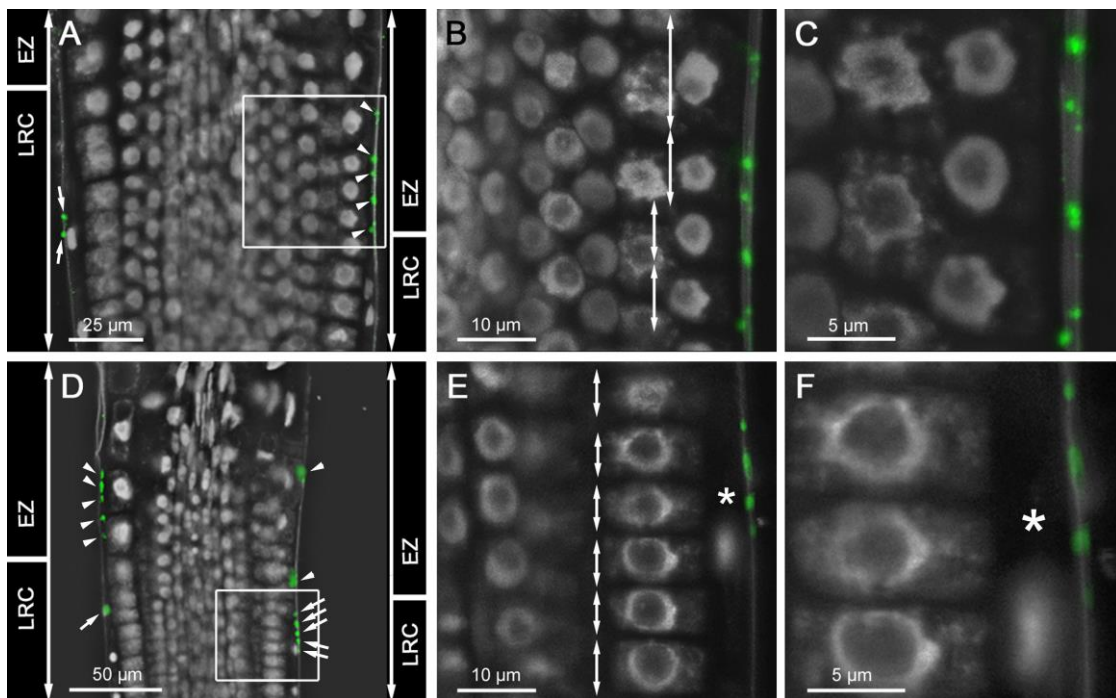
Diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung wurde in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) durchgeführt. Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) führte diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung selbstständig durch. Die anschließende Mikroskopie am CLSM (Leica SP8) und die Bearbeitung der Rohdaten wurden ebenfalls ausschließlich von Benedikt Müller getätigt. Die Fein-Bearbeitung der Daten sowie die Erstellung der Abbildung 50 wurden ausschließlich vom Verfasser dieser Dissertation (Timo Höwing) durchgeführt.

In der Wurzelspitze sind AtCEP2-Signale in verschiedenen Zellwänden detektierbar (Abb. 50). Einerseits sind AtCEP2-Signale in der Zellwand von LRC-Zellen am oberen Ende der LRC kurz vor dem Übergang zur Elongationszone lokalisiert (Abb. 50A, D: Pfeile). LRC-Zellen sind sehr langgestreckte Zellen und um ein Vielfaches länger als die darunterliegenden Zellen der meristematischen Zone. Andererseits sind zudem AtCEP2-Signale in der Zellwand der Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone, der „rapid elongation zone“, detektierbar (Abb. 50A, D: Pfeilspitzen). Aufgrund der starken Autofluoreszenz der äußeren, dicken Zellwand ist diese von übrigen Strukturen zu unterscheiden. Sie erscheint ebenso wie die großen Zellkerne weiß, wohingegen das Cytosol kaum autofluoresziert und schwarz erscheint. Zellwände innerer Zellschichten sind nicht detektierbar, da diese dünner sind und demzufolge eine schwache Autofluoreszenz aufweisen. Zusätzlich werden sie von anderen Zellen überlagert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die jeweiligen sehr distinkten punktierten AtCEP2-Signale ausschließlich in der Zellwand der LRC-Zellen lokalisiert sind (Abb. 50E, F: Asterisk markiert LRC-Zelle). In der darunterliegenden Epidermis sind keine AtCEP2-Signale detektierbar. Diese Epidermiszellen besitzen eine kurze Zelllänge (Abb. 50E Doppelpfeile) und zentrierte Zellkerne (Abb. 50E, F). Dagegen nimmt die Zelllänge der



Epidermiszellen nach Abschilferung der LRC-Zellen zu (Abb. 50B Doppelpfeile). Darüber hinaus sind die Zellkerne an der Zellinnenseite lokalisiert (Abb. 50B, C). Diese beiden Tatsachen belegen, dass es sich hierbei um den Übergang vom Ende der LRC zum Beginn der Elongationszone, der „rapid elongation zone“, handeln muss (Verbelen et al., 2006). In diesen Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone befinden sich ausschließlich in der Zellwand sehr distinkte punktierte AtCEP2-Signale (Abb. 50B, C). Es sind keine LRC-Zellen wie in Abbildung 50 E und F sowie noch anhaftende Reste von abschilfernden LRC-Zellen festzustellen.



**Abbildung 50: Lokalisation von AtCEP2-Signalen mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers in der Zellwand von Epidermiszellen der beginnenden Elongationszone (A, D: Pfeilspitzen) sowie in der Zellwand von LRC-Zellen (A, D: Pfeile). Es sind sehr distinkte punktierte AtCEP2-Signale in der Zellwand der Elongationszone (B, C) und in der Zellwand der LRC-Zellen (E, F: Asterisk markiert LRC-Zelle) lokalisiert.** Dargestellt sind zwei Wurzelspitzen von 10 Tage alten Keimlingen des Col-0 Wildtyps. Diese wurden im Zuge einer „Whole Mount“ Immunlokalisierung mit Hilfe eines Peptid-Antikörpers gegen die reife Untereinheit von AtCEP2 untersucht (Hierl et al., 2014 (s. 7.1.)). Die Aufnahmen wurden am CLSM (Leica SP8) mit einem 40-er Objektiv getätigt und manuell vergrößert. Die in A und D weiß umrandeten Bereiche sind in B und C bzw. E und F in jeweils zwei verschiedenen Vergrößerungen dargestellt. LRC = Lateral Root Cap, laterale Wurzelhaube; EZ = Elongation Zone, Elongationszone. Diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung wurde in Kollaboration mit der Universität Regensburg (Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenbiochemie, AG Hammes) durchgeführt. Benedikt Müller (benedikt.mueller@biologie.uni-regensburg.de) führte diese „Whole Mount“ Immunlokalisierung selbstständig durch. Die anschließende Mikroskopie am CLSM und die Bearbeitung der Rohdaten wurden ebenfalls ausschließlich von Benedikt Müller getätigt. Die Fein-Bearbeitung der Daten sowie die Erstellung der Abbildung wurden ausschließlich vom Verfasser dieser Dissertation (Timo Höwing) durchgeführt.

Ein „Festkleben“ des Peptid-Antikörpers bzw. des sekundären Antikörpers an der äußeren Zellschicht kann ausgeschlossen werden. Im Zuge der „Whole Mount“ Immunlokalisierung konnten weitere AtCEP2-Signale in den parenchymatischen Xylem-Zellen der Leitbündel in der Wurzelspitze detektiert werden (nicht dargestellt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die verwendeten Antikörper komplett durch alle Zellschichten diffundiert sind. Demzufolge stellen die AtCEP2-Signale in den Zellwänden der äußeren Zellschicht kein Artefakt in Folge eines „Festklebens“ der verwendeten Antikörper dar.

Darüber hinaus wurde eine „Whole Mount“ Immunlokalisierung von 10 d alten Keimlingen der homozygoten *atcep2 ko* mit den gleichen Antikörpern als Negativkontrolle durchgeführt. Hierbei sind keine AtCEP2-Signale zu erkennen (nicht dargestellt).

Ebenso wurde eine „Whole Mount“ Immunlokalisierung von 10 d alten Keimlingen des Col-0 Wildtyps mit dem entsprechendem Präimmunserum durchgeführt. Es sind keine Hintergrundsignale detektierbar (nicht dargestellt).

## **7. Appendix**

### **7.1. Hierl et al., 2014**

Hierl, G., Höwing, T., Isono, E., Lottspeich, F. and Gietl, C. 2014 Ex vivo processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant molecular biology* **84**, 605–620. doi: 10.1007/s11103-013-0157-6.

### **7.2. Höwing et al., 2014**

Höwing, T., Huesmann, C., Hoefle, C., Nagel, M.-K., Isono, E., Hüchelhoven, R. and Gietl, C. 2014 Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (AtCEP1) is involved in pathogen defense. *Frontiers in plant science* **5**, 58. doi: 10.3389/fpls.2014.00058.

**7.1. Hierl et al., 2014**

Plant Mol Biol (2014) 84:605–620  
 DOI 10.1007/s11103-013-0157-6

## Ex vivo processing for maturation of *Arabidopsis* KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (AtCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles

Georg Hierl · Timo Höwing · Erika Isono · Friedrich Lottspeich · Christine Gietl

Received: 9 October 2013 / Accepted: 19 November 2013 / Published online: 28 November 2013  
 © The Author(s) 2013. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Ricinosomes are specialized ER-derived organelles that store the inactive pro-forms of KDEL-tailed cysteine endopeptidases (KDEL-CysEP) associated with programmed cell death (PCD). The *Arabidopsis* genome encodes three KDEL-CysEP (AtCEP1, AtCEP2, and AtCEP3) that are differentially expressed in vegetative and generative tissues undergoing PCD. These *Arabidopsis* proteases have not been characterized at a biochemical level, nor have they been localized intracellularly. In this study, we characterized AtCEP2. A 3xHA-mCherry-AtCEP2 gene fusion including pro-peptide and KDEL targeting sequences expressed under control of the endogenous promoter enabled us to isolate AtCEP2 “ex vivo”. The purified protein was shown to be activated in a pH-dependent manner. After activation, however, protease activity was pH-independent. Analysis of substrate specificity showed that AtCEP2 accepts proline near the cleavage site, which is a rare feature specific for KDEL-CysEPs. mCherry-AtCEP2 was detected in the epidermal

layers of leaves, hypocotyls and roots; in the root, it was predominantly found in the elongation zone and root cap. Co-localization with an ER membrane marker showed that mCherry-AtCEP2 was stored in two different types of ER-derived organelles: 10 µm long spindle shaped organelles as well as round vesicles with a diameter of approximately 1 µm. The long organelles appear to be ER bodies, which are found specifically in Brassicaceae. The round vesicles strongly resemble the ricinosomes first described in castor bean. This study provides a first evidence for the existence of ricinosomes in *Arabidopsis*, and may open up new avenues of research in the field of PCD and developmental tissue remodeling.

**Keywords** Ricinosomes · ER-bodies · Programmed cell death · Developmental tissue remodeling · Cell wall degradation

### Abbreviations

3xHA	Three-fold hemagglutinin (HA) tag
CBZ-Phe-Arg-AMC	Fluorescence-quenched peptide
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
GFP	Green fluorescent protein

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s11103-013-0157-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

G. Hierl · T. Höwing · C. Gietl (✉)  
 Center of Life and Food Sciences Weihenstephan,  
 Lehrstuhl fuer Botanik, Technische Universitaet Muenchen,  
 Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising, Germany  
 e-mail: christine.gietl@wzw.tum.de

E. Isono  
 Center of Life and Food Sciences Weihenstephan,  
 Department of Plant Systems Biology, Technische Universitaet  
 Muenchen, Emil-Ramann-Str. 4, 85350 Freising, Germany

F. Lottspeich  
 Max Planck Institute of Biochemistry, Protein Analysis,  
 82152 Martinsried, Germany

### Introduction

Programmed cell death (PCD) is a genetically determined, highly regulated process in all multicellular organisms. PCD is a prerequisite for the successful development of plants. It is involved in the development of generative tissues during micro- and macro-gametogenesis, in seed and fruit maturation, and in seed detachment and dispersal. It occurs in the development of vegetative tissues such as root cap, aerenchyma or wood formation (Beers 1997; Hadfield

 Springer

and Bennett 1997). Furthermore, PCD is an integral part of the responses to abiotic stress and pathogen infections.

All classes of proteases are involved in PCD, including cysteine proteases, serine proteases, aspartic proteases and metalloproteases (Beers et al. 2000, 2004; Schaller 2004). In plant PCD, special functions are described for vacuolar proteases (Müntz 2007; Hara-Nishimura and Hatsugai 2011), metacaspases (Tsiatsiani et al. 2011; Lam and del-Pozo 2000; Xu and Zhang 2009) or subtilisin-like proteases (Vartapetian et al. 2011). It is not clear, however, how these proteases orchestrate PCD and if there is functional redundancy between the different gene families.

Specific for plant PCD is a unique group of papain-type cysteine endopeptidases (CysEPs) characterized by a C-terminal KDEL endoplasmic reticulum (ER) retention signal (KDEL CysEPs) with RcCysEP from castor bean (*Ricinus communis*) as the founding member (Schmid et al. 1998). KDEL CysEPs are not present in mammals or fungi, but are ubiquitous in plants. KDEL CysEPs have been cloned and sequenced from 25 plant species so far; a high degree of homology between the deduced amino acid sequences is apparent; a phylogenetic tree discloses distinct groups among the monocots, dicots and gymnosperms (Hierl et al. 2012).

Castor beans store fat and proteins in a living endosperm, which is laterally attached to the cotyledons. When the mobilization of the storage material is completed after germination, the desiccated endosperm abscises and represents a senescing tissue. Senescing endosperm tissue from castor bean contains a spherical organelle surrounded by a single ribosome-studded membrane with a diameter averaging 1  $\mu\text{m}$ . This organelle was discovered in ultrastructural and cytochemical studies independently by two groups in 1970. It was called “dilated cisternae”, since it seemed to develop from the ER (Vigil 1970), or “ricinosome”, since it was found only in castor bean at that time (Mollenhauer and Totten 1970). The ricinosomes were “re-discovered” with the identification of their marker enzyme, the KDEL-tailed cysteine endopeptidase (Schmid et al. 1998). In *R. communis* the KDEL CysEP and ricinosomes were found not only in the senescing endosperm of germinating seeds (Schmid et al. 1999, 2001), but also in the nucellus of maturing seeds, where the endosperm expands at the expense of the nucellus cells (Greenwood et al. 2005). Crushed cell layers are left behind in the endosperm cells in germinating castor bean seedlings (Schmid et al. 1999, 2001) or in the nucellus cells in maturing castor bean seeds (Greenwood et al. 2005), since there is no need for a photosynthetic plant to recycle the carbon of these cell walls to the surviving parts of the plant. Ricinosomes have been identified by immunoelectron-microscopy in other collapsing tissues undergoing PCD: in senescing flower petals of *Hemerocallis* (Schmid et al. 1999), in the hypogeous cotyledons of *Vicia sativa*

(Becker et al. 1997), the unpollinated ovaries of *Pisum sativum* (Cercos et al. 1999), in both developing and dehiscing tomato anthers (Senatore et al. 2009) and in endosperm cells of imbibed tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) (Trobacher et al. 2013). The accumulation of KDEL CysEP and the appearance of ricinosomes seem to act as very early predictors of PCD.

KDEL-tailed protease-accumulating vesicles (KDEL vesicles, KVs) in germinating mung bean (*Vigna mungo*) cotyledons are similar to ricinosomes in that they accumulate the KDEL-tailed cysteine protease SH-EP (Toyooka et al. 2000). In contrast to ricinosomes, immunocytochemistry identified KDEL vesicles to transport large amounts of SH-EP from the endoplasmic reticulum to protein storage vacuoles. The mass transport of the proteinase by ER-derived KDEL vesicles is thus involved in the protein mobilization of plants (Toyooka et al. 2000; Okamoto et al. 2003).

RcCysEP is synthesized as a pre-pro-enzyme and is co-translationally transferred into the ER, where the pre-sequence is removed. The pro-enzyme is transported from the ER to the cytoplasm of the senescing cells in the form of ER-derived ribosome studded ricinosomes. The final stage of PCD is characterized by destruction of the vacuole integrity, consequent acidification of the cytoplasm and disruption of the ricinosomes, which release the mature RcCysEP. The N-terminal pro-peptide and the C-terminal KDEL-motif are cleaved off, and the activated RcCysEP degrades the cytosolic macromolecules for recycling to the surviving parts of the plant (Schmid et al. 1998, 1999, 2001). RcCysEP exhibits a characteristic and unusual broad substrate specificity. The cleavage site ↓ within a substrate is denoted as P2-P1-↓-P1'-P2'. RcCysEP has a clear preference for neutral amino acids with large aliphatic and non-polar (Leu, Val, Met) or aromatic (Phe, Tyr, Trp) side-chains in the P2 position and no clear preference in the P1 position, as is typical for papain-type CysEPs. RcCysEP accepts proline in the P1 and P1' positions (Than et al. 2004), which is highly unusual among endopeptidases (Cunningham and O'Connor 1997; Simpson 2001). RcCysEP can therefore digest extensin with its ability to accept glycosylated hydroxy-proline near the cleavage site (Helm et al. 2008). Extensin build the basic scaffold of the cell wall (Cannon et al. 2008), and thus KDEL CysEPs might support final cell collapse. Crystallization of the purified mature RcCysEP revealed that castor bean CysEP folds into two distinct domains of roughly equal size, as is usual for papain-like CysEPs. The RcCysEP folding is also very similar to the proline-specific cysteine peptidase from ginger (*Zingiber officinale*). The active site cleft of RcCysEP, however, is wider than in both the ginger protease and papain (Than et al. 2004). The respective amino acids decisive for this generally more open appearance of the active site cleft—besides the amino acids Cys, His,

Gln and Asp defining the catalytic pocket—are highly conserved among all known KDEL CysEPs (Hierl et al. 2012). It can be suggested that all KDEL CysEPs share the same broad substrate specificity.

KDEL CysEPs seem to have a dual role: digesting cytoplasmic components in cells of dying tissues for recycling to the surviving parts of the plant or in cells of germinating seedlings for storage mobilization, respectively, and digesting cell wall extensin in the final stage of PCD or in tissue remodeling.

Castor bean CysEP is thus characterized in terms of biochemistry and cell biology. However, without the *R. communis* genome sequence and in the absence of genetics, it is difficult to see how different gene families work together to orchestrate PCD in different tissues in response to a broad range of developmental or environmental cues.

In *Arabidopsis*, on the other hand, the genome sequence and gene families for all proteases are known. *Arabidopsis* encodes three KDEL CysEPs with homology to the RcCysEP, designated AtCEP1 (At5g50260), AtCEP2 (At3g48340) and AtCEP3 (At3g48350) that are expressed in tissues undergoing PCD. Determination of promoter activities using  $\beta$ -glucuronidase as reporter in *Arabidopsis* transformants elucidated a remarkable tissue- and organ-specificity. AtCEP1 and AtCEP3 promoter activities were found in generative tissues at several stages of seed and fruit development. AtCEP1, AtCEP2, and AtCEP3 promoter activities were found in vegetative tissue such as AtCEP1 in the course of lateral root formation, AtCEP2 in roots within the beginning root cap, and AtCEP3 at the hypocotyl-root transition zone or in trichomes of leaves (Helm et al. 2008). However, the *Arabidopsis* CEP proteases have not been characterized at a biochemical level, nor have they been localised intracellularly. The storage organelle for AtCEP1, AtCEP2 and AtCEP3, respectively, their release at the “site of action” and their activation modus remained unknown. There is in fact no evidence for the existence of ricinosomes in *Arabidopsis*, in spite of numerous attempts at isolating such organelles from this model plant.

In this study, we analyzed the root cap as a model tissue for PCD and chose AtCEP2, which is specifically expressed in the course of root cap formation. We used translational fusion proteins of AtCEP2 with a three-fold hemagglutinin-tag (3xHA) and the red fluorescent protein mCherry under the control of the endogenous AtCEP2 promoter (P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL) transformed into *Arabidopsis* WT plants. We could then isolate the AtCEP2 protein “ex vivo” and characterize its pH dependent activation, its pH-independent activity and its substrate specificity.

The reporter line expressing P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL in a WT background was crossed with the ER membrane marker line expressing a

translational fusion protein of green fluorescent protein (GFP) with a ER membrane protein (Cutler et al. 2000) in order to visualize ER-derived subcellular structures functioning as the AtCEP2 storage organelle. We demonstrated AtCEP2 expression in the PCD of root cap formation and identified organelles surrounded by ER-derived membranes as the AtCEP2 storage organelles in young seedlings. Furthermore, we transformed the non-functional reporter protein without the protease subunit, that is, mCherry with the necessary N-terminal and C-terminal targeting signals under the control of the endogenous AtCEP2 promoter (P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL) into the *atcep2* knockout mutant line in order to facilitate analysis of the *atcep2* knockout mutant phenotype.

## Methods

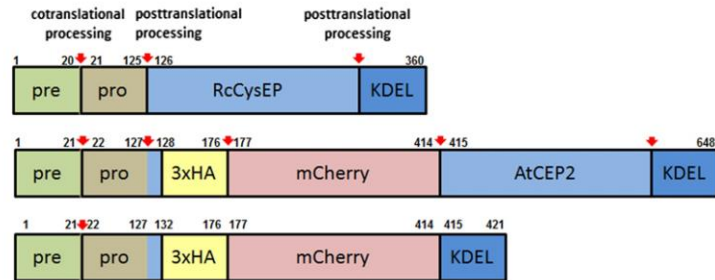
Generation of reporter lines expressing pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL, GFP fused to an ER membrane protein in the *Arabidopsis* Col0 WT background, and pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL under control of the endogenous AtCEP2 promoter in the *atcep2* knockout mutant

For the cloning strategy of the fusion gene coding for pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL under the control of the endogenous promoter of AtCEP2 and the primers used see Figs. 1 and S1. The AtCEP2 promoter comprising approximately 2,000 bp with the adjacent 5'UTR and the coding region for the pre-pro-sequence were amplified from WT (Col0) genomic DNA isolated by cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) extraction (Murray and Thompson 1980). The 3xHA tag was amplified from pNIGEL18 and mCherry was amplified from pNIGEL17 (Geldner et al. 2009). The mature AtCEP2 subunit with the 3'UTR was amplified from WT (Col0) genomic DNA. The resulting PCR products were cloned into pGREEN conferring hygromycin resistance (Hellens et al. 2000; www.ac.uk). The final plasmid construct was sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (pGV3101) by electroporation. Flowers from WT *Arabidopsis* ecotype Columbia (Col0) plants were transformed by floral dipping (Clough and Bent 1998). Eight different homozygous transformants were screened for high expression of the fusion protein by CLSM and three were chosen for further analysis.

The reporter line expressing pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL under the control of the endogenous AtCEP2 promoter was crossed with the GFP-ER membrane protein marker line (Cutler et al. 2000) for determining the subcellular localization of AtCEP2.

The construct P<sub>CEP2</sub>::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL as a non-functional reporter protein lacking the mature

**Fig. 1** Schematic representation of the fusion proteins pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL and pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL expressed under the control of the endogenous AtCEP2 promoter. Pre-pro-RcCysEP is shown for comparison



AtCEP2 protease subunit was obtained in an analogous manner. It comprised the endogenous AtCEP2 promoter, the 5'UTR and the coding regions for the N-terminal pre-pro-peptide, for the 3xHA tag and mCherry and for the nine C-terminal amino acids of the mature AtCEP2 subunit, including the ER retention signal KDEL (for cloning strategy and primers used see Fig. 1 and S2). The resulting PCR products were cloned into pGREEN (Hellens et al. 2000). The final plasmid construct was sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (pGV3101) by electroporation. Flowers of *A. thaliana* ecotype Columbia (Col0) plants were transformed by floral dipping. Eight different homozygous transformants were chosen and screened for high expression of the fusion protein by CLSM. The line exhibiting the highest expression level was chosen for crossing with homozygous *cep2* knockout mutant plants.

*atp2* knockout mutant plants (Cold Spring Harbour ET 6591) exhibit the ecotype Landsberg erecta (La-er) background and carry the T-DNA insertion conferring Km resistance approximately in the middle of the first exon (207 bases downstream of the start codon). Homozygous *atp2* knockout plants were back crossed two times with WT (Col0) plants that were transformed with the non-functional reporter construct  $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL$  in order to remove unwanted secondary mutations in the *atp2* knockout mutant line, to replace the La-er background by the Col0 background and to introduce the reporter construct without the protease mature subunit. Finally transformants homozygous for the T-DNA insertion in the first exon of AtCEP2—as confirmed by kanamycin resistance and PCR—in the Col0 background that were expressing the non-functional reporter protein pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL—as confirmed by hygromycin resistance and analysis at the CLSM—were obtained.

#### Generation of pro-AtCEP2 specific antibodies

Given the large degree of homology between the three members of the AtCEP gene family, polyclonal anti-peptide antibodies were raised that recognized individual family

members (Eurogentec, Belgium). Two peptides for AtCEP1, AtCEP2 and AtCEP3 that were specific for each family member were chosen (Figure S3A). An additional Cys at the N-terminus of the peptides was added for coupling to the carrier protein hemocyanin. A mix of the coupled peptides AtCEP2-I (C-QGPKRGSKQFMYDHE) and AtCEP2-II (C-IKLSSSNPTPKDGDV) was used for immunization of two rabbits. Finally, affinity purification of the antisera of the two rabbits against each of the peptides separately was carried out (Eurogentec, Belgium). The AtCEP2-I sequence is located within the pro-peptide and the AtCEP2-II sequence comprises the 15 amino acids upstream of the KDEL-signal. The pro-peptide and the carboxy-terminal ten amino acids including the KDEL-signal are both cleaved off during maturation so the respective antibodies are expected to recognize the pro-form of AtCEP2 but not the mature protein. Anti-peptide antibodies specific for pro-AtCEP1 and pro-AtCEP3 were raised for control. The following peptides were chosen: AtCEP1-I (C-IRMQRGIRHKEGLC), AtCEP1-II (C-LKN-SNTNPSRLSLD), AtCEP3-I (C-KTEETYYPYDSSDVQFC) and AtCEP3-II (C-TKLSSTPSTHESVVRDDV). The specificity of the anti-peptide antibodies was tested by western blot analysis of pro-AtCEP1, pro-AtCEP2 and pro-AtCEP3 expressed in *E. coli* (Figure S3B). The respective cDNA-clones were used as templates for amplifying and cloning the pro-enzymes of AtCEP1 (RIKEN pda 08738), AtCEP2 (EST clone 99B11) and AtCEP3 (RIKEN pda 12055). Primers for amplification: AtCEP1 (CEP1-NdeI sense 5' GCAGC CATATG TTA GAT TTC CAT AAC AAA GAT GTG G 3'; CEP1-SalI anti-sense 5' AGCTT GTCGAC TTA GAG TTC ATC CTT AAG CGA GTC C 3'); AtCEP2 (CEP2-NdeI sense 5' GCAGC CATATG TTC GAT TAC GAC GAC AAG GAA ATA G 3'; CEP2-SalI anti-sense 5' AGCTT GTCGAC CTA GAG CTC ATC TTT GAC ATC ACC G 3'); AtCEP3 (CEP3-NdeI sense 5' GCAGC CATATG TTC GAT TTC GAC GAA AAA GAA TTA GAA ACC 3'; CEP3-SalI anti-sense 5' AGCTT GTCGAC CTA GAG CTC GTC TTT AAC ATC ATC 3'). The PCR products were sequenced, cloned into pET28 for addition of the N-terminal His-tag and expressed in *E. coli* (Rosetta2, Novagen). Protein extracts

from *E. coli* expressing AtCEP1, AtCEP2 or AtCEP3 were used for western blot analysis in order to test the specificity of the anti-peptide antibodies. Castor bean ricinosomes containing RcCysEP (Schmid et al. 2001) and antibodies specific for RcCysEP (Gietl et al. 1997; Schmid et al. 1998) were used for control.

#### Generation of antibodies recognizing the mature AtCEP2 subunit

Polyclonal antibodies were raised against the mature AtCEP1 subunit with the expectation that these antibodies would recognize AtCEP1, AtCEP2 and AtCEP3. The *N*-terminal 10 amino acids and the *C*-terminal 13 amino acids of the AtCEP1 mature subunit were omitted in order to obtain antibodies against the mature core sequence of the AtCEP family (Figure S4A). The DNA sequence was cloned into pET24a between the *Nde*I and *Xho*I restriction sites and transformed into Rosetta 2 (DE3)pLysS competent cells (Novagen) for expression. The AtCEP1 protein was purified from inclusion bodies by His-tag affinity chromatography using Talon-Metal-Affinity-Resin (Clontech) followed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining. The blue stained gel piece was cut out for immunization of rabbits (Davids Biotechnology, Regensburg, Germany). The *N*-terminal amino acid sequence of the AtCEP1 subunit was determined. The mature AtCEP2 subunit was overexpressed and purified in a similar manner (Figure S4A). Cross-reactivity of the antibodies directed against the mature AtCEP1 subunit was tested by western blot analysis of the mature AtCEP1 and AtCEP2 subunit expressed in *E. coli* (Figure S4B).

#### Immunoprecipitation

of pro-3xHA-mcherry-AtCEP2-KDEL with anti-HA affinity matrix

A protein extract was prepared from approximately 1,500 seven-day-old seedlings (1 g fresh weight). The plant material was ground with mortar and pestle under liquid N<sub>2</sub> followed by the addition of suspension buffer (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, 10 % glycerol pH 7.5; 1 ml/g fresh weight). The suspension was centrifuged (Eppendorff centrifuge, 14,000 rpm, 10 min). The clear supernatant was incubated with 100  $\mu$ l anti-HA affinity matrix (anti-HA beads; Roche) while gently shaking for 2 h at 8 °C. The anti-HA beads were washed three times with suspension buffer pH 7.5 followed by incubation with assay buffer.

Analysis of pH-dependent activation, pH-independent activity and cleavage specificity of AtCEP2

Anti-HA beads bound to pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL were incubated with 200  $\mu$ l assay buffer pH

7.5 (100 mM phosphate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.8 % Brij35) or pH 4.0 (100 mM Na acetate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35) for 30 min at 25 °C. After centrifugation, supernatant and beads were analysed for enzymatic activity with the fluorescence-quenched peptide CBZ-Phe-Arg-AMC (10 mM stock solution in 100 % dimethylformamide, diluted 1:100 for assay) as a substrate for papain-type peptidases; linear kinetics was obtained (Fig. 2F).

Finally, supernatant and anti-HA beads were analysed by SDS-PAGE followed by western blot analysis with anti-HA antibodies (Roche), with anti-RFP antibodies (directed against mCherry; Medical & Biological Laboratories, Japan), with anti-AtCEP2 peptide antibodies detecting pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL and with anti-AtCEP antibodies detecting the mature AtCEP2 subunit or by silver staining: The supernatant separated from the beads (Fig. 2, lanes 1 and 4) was mixed with loading dye (60 mM Tris-HCl pH 6.6, 5 % glycerine, 1.5 % SDS, 1.5 %  $\beta$ -ME, 0.1 % bromophenol blue final concentration) and incubated for 10 min/95 °C before loading; the beads were mixed with loading dye and incubated for 10 min/95 °C followed by separation of this supernatant (Fig. 2, lanes 2 and 5) and the now “washed” beads itself by centrifugation; the “washed” beads were finally mixed with loading dye (Fig. 2, lanes 3 and 6) and analyzed by SDS-PAGE. As control, the anti-HA beads were treated in a similar manner without adding plant material; the finally “washed” beads were analysed by SDS-PAGE (Fig. 2, lane 7) in order to control the unspecific signals obtained by the anti-HA beads.

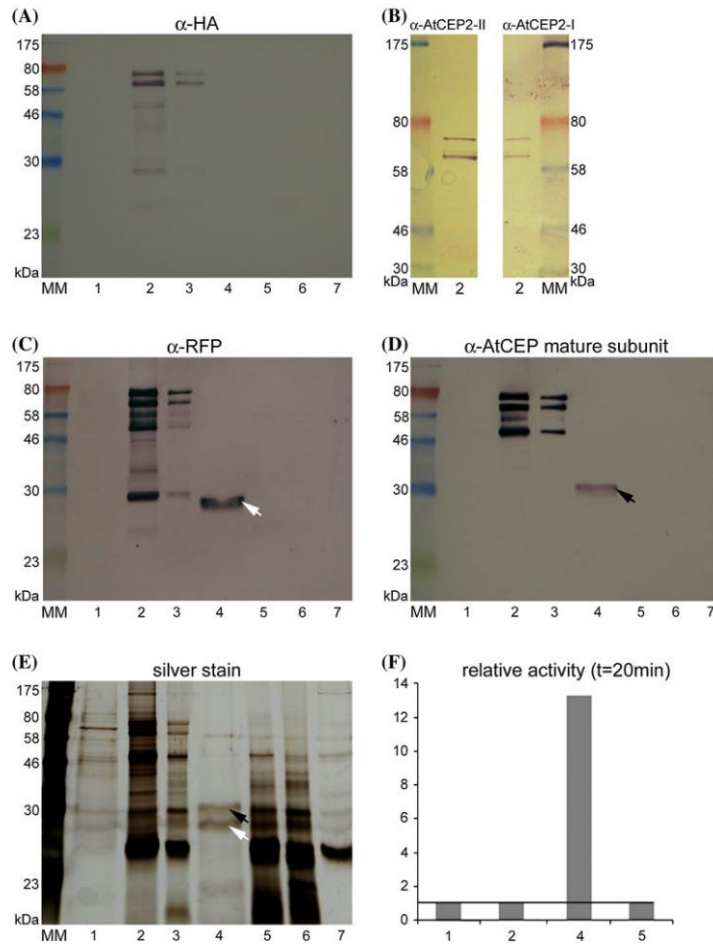
pH dependent activation: anti-HA beads with the pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL were incubated with assay buffer at different pH values (100 mM Na acetate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35 at pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0; 100 mM phosphate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35 at pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0) for 1 min or 30 min, and analysed for enzymatic activity with CBZ-Phe-Arg-AMC as substrate (Fig. 3).

pH independent activity: anti-HA beads with the pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL were incubated with 10  $\mu$ l activation buffer (50 mM Na acetate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35 pH 4.5) for 30 min at 25 °C; 190  $\mu$ l assay buffer of different pH values were added (100 mM Na acetate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35 at pH 4.0, pH 4.5, pH 5.0; 100 mM phosphate, 2 mM cysteine, 2 mM DTT, 0.08 % Brij35 at pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5, pH 8.0) and enzymatic activity was measured for 20 min. For comparison of AtCEP2 with RcCysEP, purified ricinosomes containing the pro-CysEP (Schmid et al. 2001) were used instead of immunoprecipitated pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL (Fig. 4).

Cleavage motifs of AtCEP2 were analysed by digestion of bovine beta-casein purchased from Sigma (C-6905). Anti-HA beads with the pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL



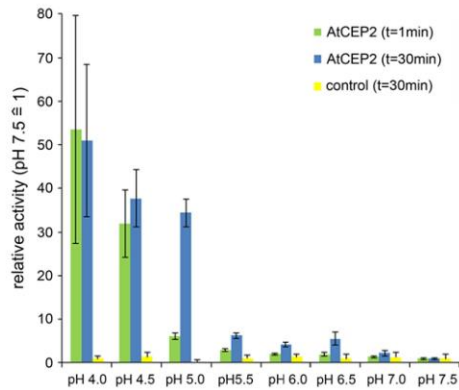
**Fig. 2** Maturation of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL by acidification leads to removal of the pro-sequence, cleavage between mCherry and AtCEP2 and release of the enzymatically active AtCEP2 mature subunit. pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL was immunoprecipitated from protein extracts of 7 days old seedlings with anti-HA affinity matrix (anti-HA beads). The anti-HA beads with the pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL attached were incubated with assay buffer pH 7.5 (lanes 1–3) or pH 4.0 (lanes 4–6), respectively, for 30 min at 25 °C. Incubation of anti-HA beads with buffer instead of plant extract was used as control (lane 7). The supernatant (Lanes 1 and 4) was separated from the beads; the beads were incubated for 10 min/95 °C followed by separation of this supernatant (Lanes 2 and 4) and the now “empty beads” (Lanes 3 and 6). The probes (1, 2, 4 and 5) were analyzed directly by measurement of enzymatic activity (F). All the probes were analyzed by SDS-PAGE followed by western blot analysis (A–D) or silver staining (E)



were incubated with buffer at pH 4.5 for 30 min at 25 °C in order to obtain the mature, active AtCEP2. Beta-casein was added (0.13 % final concentration) and incubation at 25 °C was continued. Aliquots were taken after 1 min, 10 min, 30 min, 4 h and 24 h and analysed by 17.5 % SDS-PAGE followed by Coomassie-staining. Digests were stopped by freezing in liquid nitrogen. The same time points were chosen for further analysis: The beta-casein peptides obtained by digestion with AtCEP2 for 1, 10, 30 min, 4 and 24 h were separated by reversed-phase HPLC prior to N-terminal sequencing and MALDI analysis as previously described (Than et al. 2004).

#### Confocal laser scanning microscopy

Confocal laser scanning microscopy (Fluoview FV 1,000, Olympus, Japan) was performed using excitation at 561 nm and emission detection between 600 and 630 nm for mCherry and excitation at 480 nm and emission detection between 510 and 530 nm for GFP. Single pictures or stacks of pictures with 0.5  $\mu$ m step size at higher resolution and 2.5  $\mu$ m step size at lower resolution were made. SYTO<sup>®</sup> 13 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain (Invitrogen) was used for staining of nuclei in root cap cells: seedlings were immersed for 3 min in SYTO<sup>®</sup> 13 (5  $\mu$ M final



**Fig. 3** pH dependence of activation. pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL was immunoprecipitated with anti-HA affinity matrix and incubated at different pH values for 1 min or 30 min, respectively. Subsequently, the relative enzymatic activity was measured with the fluorescence quenched substrate CBZ-Phe-Arg-AMC. A linear kinetic was obtained. Control: immunoprecipitation with anti-HA affinity matrix from untransformed WT plants. Acetate buffer pH 4.0, 4.5, 5.0; phosphate buffer pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0. Standard deviation:  $n = 3$

concentration in buffer 20 mM Tris, 45 mM NaCl pH 7.4) followed by CLSM.

## Results

Generation of reporter lines expressing pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL, GFP fused to an ER membrane protein in the *Arabidopsis* Col0 WT background, and pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL under control of the endogenous AtCEP2 promoter in the *atcep2* knockout mutant

We constructed the gene for fusion proteins including mCherry with and without the mature AtCEP2 subunit (Fig. 1). The fusion genes were cloned under the control of the endogenous AtCEP2 promoter thus obtaining  $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL$  transformed into *Arabidopsis* Col0 WT plants and the non-functional reporter  $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL$  transformed into *cep2* knock out mutant plants (Fig. 1; Figures S1 and S2).

The sequence approximately 2,000 bp upstream of the start Met, that were previously shown to confer tissue specific expression (Helm et al. 2008), were used as the AtCEP2 promoter region. We placed the first three amino acids Leu-Pro-Ser of the mature subunit C-terminal to the pro-sequence in front of the 3xHA tag in order to

ensure processing of the pro-peptide during maturation of AtCEP2. The junction between mCherry and the mature AtCEP2 subunit, on the other hand, exhibited only the “half” of the recognition site for processing to the mature subunit in order to obtain the mCherry-mature AtCEP2 protease subunit fusion protein after maturation (Fig. 1; Figure S1). The final plasmid construct was sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* for subsequent transformation of WT (Col0) plants.

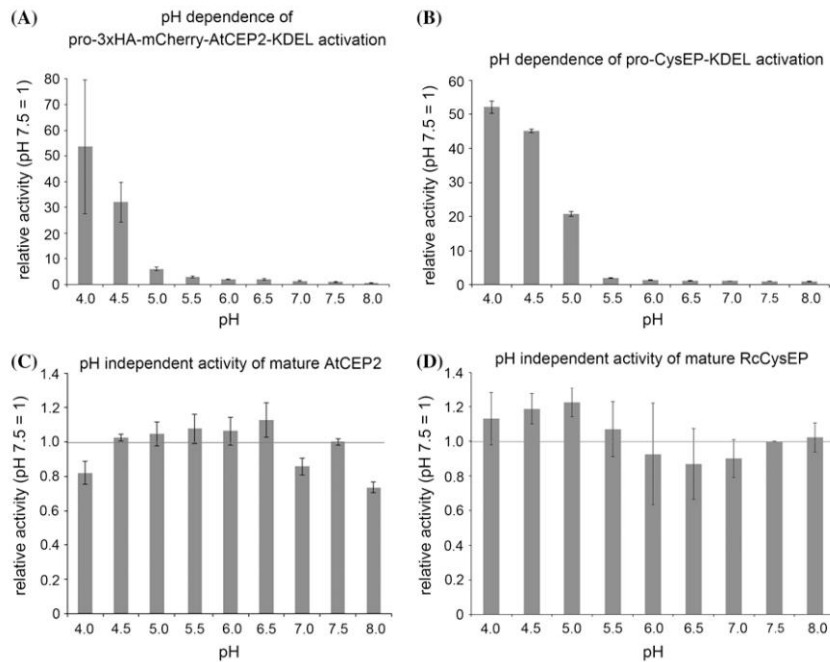
The resulting reporter line expressing pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL under the control of the endogenous AtCEP2 promoter was crossed with the *Arabidopsis* reporter line expressing a fusion protein between GFP and an ER membrane protein (Cutler et al. 2000) in order to visualize the subcellular structure that functions as the storage organelle for AtCEP2.

The construct  $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL$  as a non-functional reporter protein without the mature AtCEP2 protease subunit was obtained in an analogous manner. It comprised the endogenous AtCEP2 promoter, the 5'UTR and the coding regions for the N-terminal pre-pro-peptide, for the 3xHA tag and mCherry and for the C-terminal nine amino acids of the mature AtCEP2 subunit including the ER retention signal KDEL (Fig. 1; Figure S2). It was transferred into *cep2* knockout mutant plants.

## Maturation of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL

Analysis of the tissue- and organ-specific activities of the three KDEL CysEP promoters in *Arabidopsis* transformants revealed significant AtCEP2 promoter activity in young seedlings (Helm et al. 2008). AtCEP2 promoter activity was especially striking in root tips, and probably in the calyptra and the root elongation zone of the root.

A protein extract was prepared from seven-day-old seedlings. The fusion protein pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL was immunoprecipitated with anti-HA affinity matrix (anti-HA beads) at pH 7.5. The beads were washed with buffer at pH 7.5 and subsequently incubated with 200  $\mu$ l assay buffer at pH 7.5 (Fig. 2A–E, lanes 1–3) or pH 4.0 (Fig. 2A–E, lanes 4–6). As a control, anti-HA beads were incubated with buffer instead of protein extract (Fig. 2A–E, lane 7). After separation of supernatant and beads by centrifugation, supernatant and beads were analysed for enzymatic activity with the fluorescence–quenched peptide CBZ-Phe-Arg-AMC (Fig. 2F). Supernatant and beads were subsequently analysed by SDS-PAGE, followed by western blot analysis with anti-HA antibodies (Fig. 2A), with anti-AtCEP2 peptide antibodies detecting pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL (Fig. 2B), with anti-RFP antibodies directed against mCherry (Fig. 2C), or with antibodies recognizing the mature AtCEP2 subunit (Fig. 2D), respectively, and by SDS-PAGE followed by silver staining (Fig. 2E).



**Fig. 4** pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL and pro-CysEP-KDEL exhibit similar pH dependence of activation (**A, B**) and pH independence of activity (**C, D**). **A, B** Activation at different pH values for 1 min followed by measurement of enzymatic activity for 20 min with the fluorescence quenched substrate CBZ-Phe-Arg-AMC. Ac-

tate buffer pH 4.0, 4.5, 5.0; phosphate buffer pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0. **C, D** Activation for 30 min at pH 4.5 in 10  $\mu$ l buffer followed by addition of 190  $\mu$ l buffer of the indicated pH and measurement of enzymatic activity for 20 min. A linear kinetic was obtained in all experiments. Standard deviation:  $n = 3$

Immunoprecipitation of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL with anti-HA beads and incubation at pH 7.5 revealed two distinct protein bands as recognized by anti-HA antibodies (Fig. 2A). Both proteins exhibit molecular masses smaller than the 80 kDa MW marker and represented the pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL protein with a calculated MW of 70.5 kDa. At pH 7.5, these proteins were not released into the supernatant (Fig. 2A, lane 1), but remained attached to the anti-HA beads and had to be solubilized by treatment with loading dye at 95 °C for 10 min (Fig. 2A, lane 2). Both proteins exhibited no enzymatic activity (Figs. 2F, 3) and thus should contain the intact pro-peptide. Both protein bands were recognized by the antiAtCEP2-I pro-peptide antibody (Fig. 2B, right) and by the anti-AtCEP2-II peptide antibody directed against the peptide at the extreme carboxy-terminus (Fig. 2B left and Figure S3), by anti-RFP- (Fig. 2C, lane 2) and by anti-AtCEP-antibodies (Fig. 2D, lane 2 and Figure S4).

Immunoprecipitation of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL with anti-HA beads, followed by incubation at pH 7.5 and decoration with anti-HA antibodies revealed two more relatively faint protein bands: one with a MW < 58 kDa that probably represents 3-HA-mCherry-AtCEP2 with a calculated MW of 57.2 kDa, and another that is probably 3xHA-mCherry lacking the pro-peptide and the AtCEP2 mature (Fig. 2A–D, lane 2). The AtCEP2 mature subunit adjacent to 3xHA-mCherry seems to be below the level of detection using antibodies or by enzymatic activity (Fig. 2D, F, lane 2). A small amount of all three HA-tagged proteins could not be solubilized and remained attached to the anti-HA beads (Fig. 2, lane 3).

Immunoprecipitation of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL with anti-HA beads and incubation at pH 4.0 resulted in maturation by self-cleavage and in release from the anti-HA beads to the supernatant (Fig. 2A, C and D; lane 4). Most interesting, not only were the KDEL-motif and pro-peptide removed, but mCherry (Fig. 2, lane 4, white arrow)

and the mature AtCEP2 subunit (Fig. 2, lane 4, black arrow) were separated. The AtCEP2 mature protease in the supernatant (Fig. 2D, lane 4) was enzymatically active (Fig. 2F, lane 4). Maturation and cleavage between mCherry and AtCEP2 mature subunit at pH 4.0 was confirmed by SDS-PAGE and silver staining (Fig. 2E, lane 4). pH-dependent activation could also be followed by CLSM: incubation of the anti-HA affinity matrix containing the immunoprecipitated pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL with assay buffer at pH 7.5 resulted in a “stably localized” mCherry signal around the beads, whereas incubation with assay buffer pH 4.0 resulted in a diffuse mCherry signal spreading away from the beads. Our AtCEP2 reporter fusion construct thus represents a protein functional *in vivo*.

The pH dependence of AtCEP2 activation was analysed in more detail by incubating the anti-HA affinity matrix containing the immunoprecipitated pro-3xHA-mCherry-CEP2-KDEL at pHs between pH 7.5 and 4.0. The relative activity with the fluorescence quenched peptide CBZ-Phe-Arg-AMC for 20 min exhibited a linear progress (Fig. 3). As a control we used anti-HA affinity matrix incubated for immunoprecipitation with protein extract from untransformed WT plants not expressing the HA tagged AtCEP2 fusion protein (Fig. 3). Between pH 5.5 and pH 7.5, only a weak activation close to the background could be observed. The turning-point was observed at pH 5.0, where after 1 min a 5-fold increase of relative fluorescence units was reached and after 30 min activation time, a 35-fold increase of relative fluorescence units was reached. At pH 4.5 and at more acidic pH values the full activity of the mature AtCEP2 was reached after 1 min activation time (Figs. 3, 4A).

When activated (incubation time at pH 4.5 for 30 min), the mature AtCEP2 exhibited a pH independent activity reaching similar relative fluorescence units within 20 min measurement at all pH values between pH 4.0 and pH 8.0 (Fig. 4C).

This pH-dependent activation and pH-independent activity of AtCEP2 was compared with that of RcCysEP from isolated ricinosomes. RcCysEP had its “turning-point” at pH 5.0 and reached full enzymatic activity within 1 min at pH 4.5 and 4.0 (Fig. 4B). Mature castor bean CysEP exhibited a pH-independent activity similar to AtCEP2: acidification of isolated ricinosomes for 30 min at pH 4.5 revealed the mature CysEP that had a similar enzymatic activity at all pH values between pH 4.0 and pH 8.0 (Fig. 4D).

The pro-enzymes of AtCEP2 and RcCysEP isolated “*ex vivo*” either by immunoprecipitation with anti-HA-affinity matrix or by purification of ricinosomes, exhibit similar biochemical properties in that acidification at pH 5.0 and at more acidic pH values leads to self-cleavage of the pro-peptide, and to maturation of the pro-enzyme to the mature and enzymatically active protease.

AtCEP2 accepts proline near the cleavage site thus exhibiting the broad substrate specificity typical for KDEL-CysEPs

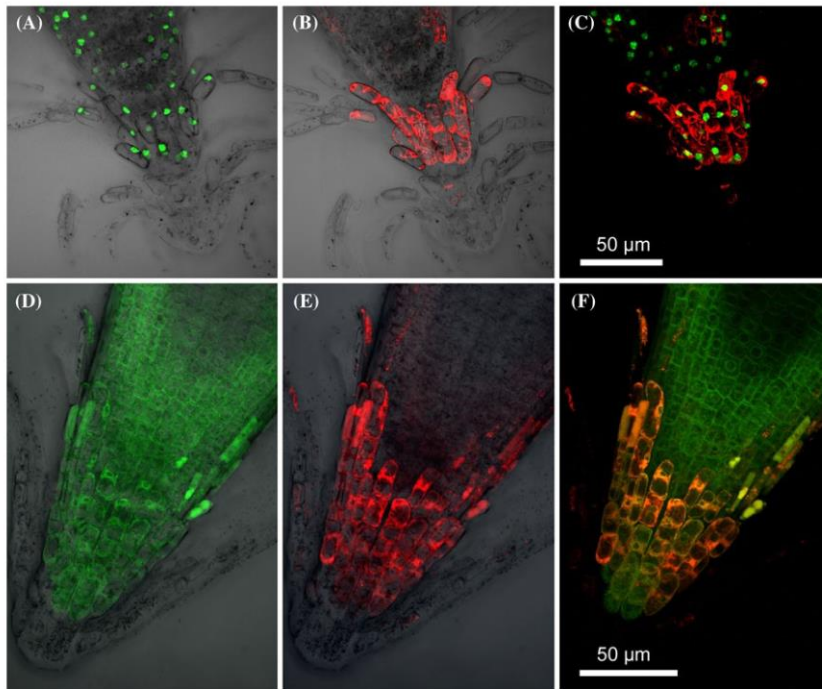
We examined peptide fragments generated by digestion of bovine milk beta-casein with AtCEP2. Peptides were separated by reversed-phase HPLC prior to N-terminal sequencing and MALDI-TOF analysis. The sequences of the 80 peptides identified revealing 57 different cleavage sites are listed in Table S1. An additional six cleavage sites were identified by N-terminal amino acid sequencing (EELN..., ELNV..., IEKF..., KFQS..., NSLP..., VPPF...). Figure S5 shows the beta-casein sequence with the identified cleavage sites marked by arrows.

Neutral amino acids with large aliphatic and non-polar residues or with aromatic residues were preferentially found at the P2 and P2' positions (Figure S5). A clear preference at the P1 and P1' positions was not apparent (Figure S5). Of particular interest was the acceptance of Pro at P2, P1, P1' P2' (Figure S5). AtCEP2 can thus cleave at both the N- and C-terminal side of proline. This highly unusual proline-specific cleavage seems to be a characteristic feature of KDEL CysEPs. The biochemical data therefore confirmed that the translational fusion protein pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL is functional.

AtCEP2 is expressed in the final stage of root cap formation and in root elongation

Analysis of seedlings between 2 and 35 days old expressing pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL in the WT background by western blot analysis of protein extracts with anti-HA-tag antibodies and by CLSM indicated that AtCEP2 was expressed from the beginning of seedling growth in root caps as soon as the root tips emerged.

Seven days old seedlings were analysed by CLSM (Fig. 5). The DNA stain SYTO<sup>®</sup> 13 Green-Fluorescent Nucleic Acid Stain marked the nuclei of the root and the latest root cap (Fig. 5A), whereas the AtCEP2 reporter protein is most strongly expressed in cells of the latest root cap (Fig. 5B). Merging the AtCEP2 reporter and the stained nuclei revealed the greatest expression of the AtCEP2 reporter in the last cells carrying a stainable nucleus, indicating that the oldest cells of the root cap were dead (Fig. 5C). Localization of the red AtCEP2 reporter (Fig. 5E) and the green ER membrane protein reporter (Fig. 5D) in the root tip revealed co-localization of pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL in distinct areas of the ER in the root cap (Fig. 5F). A diffuse labelling could be observed in a few outermost root cap cells, suggesting that their vacuole was disrupted (Fig. 5D–F). Expression of the AtCEP2 reporter protein caused a distinct two band pattern in the root, where the upper band marked the root



**Fig. 5** Localization of the mCherry-AtCEP2 reporter protein and the nuclei stained with the DNA-stain SYTO<sup>®</sup> 13 in the root cap (A–C) and localization of the mCherry-AtCEP2 reporter protein and the GFP-ER membrane reporter protein (D–F). **A** The DNA stain marks the nuclei of the root and the latest root cap. **B** The mCherry-AtCEP2 reporter is most strongly expressed in cells of the latest root cap. **C** Merge of the AtCEP2 reporter and the stained nuclei reveals the strongest expression of the AtCEP2 reporter in the last cells carrying a stainable nucleus indicating the following cells to be dead. **D–F** The

mCherry-AtCEP2 can be detected in cells of the already released root cap and in root tip cells that are developing into the next root cap cells. Co-expression of mCherry-AtCEP2 and a GFP-ER membrane protein marker (Cutler et al. 2000) reveals a partial co-localization indicating that AtCEP2 might be localized to subdomains of the ER. **A–C** Stacks of images were obtained with a step size of 1.0  $\mu\text{m}$ ; enlargement 600 $\times$ . **D–F** Stacks of images were obtained with a step size of 0.5  $\mu\text{m}$ ; enlargement 600 $\times$

elongation zone and the lower band represented the signal in the youngest root cap cells of the root tip (Fig. 6F). Single CLSM pictures show the localization of AtCEP2 exclusively in the outermost layer of the root, that is in the latest root cap cells peeling off and in the epidermis of the elongation zone; no AtCEP2 expression was seen in cells inside the root (Fig. 6F, insets). It should be noted that—in contrast to root cap formation—PCD does not occur in the root elongation zone.

In principle, the expression of the *AtCEP*'s in roots is reflected in the “root expression visualizer ([www.arexbd.org](http://www.arexbd.org) database)” (Figure S6). However, no probeset ID is available for *AtCEP2* (At3g48340) in the ATH1 datasource. The *AtCEP2* expression pattern has

erroneously been attributed to *AtCEP1* (At5g50260, probe ID 248545\_at) or *AtCEP3* (At3g48350; probe ID\_252368\_at).

Interestingly, *atcep2* knockout mutant lines exhibited no obvious phenotype such as impairment in root elongation or cap formation (Fig. 7). We analysed the *atcep2* knockout mutant line expressing pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL. No difference to WT root cells was observed. Roots exhibited a normal root cap; expression of the non-functional reporter without the AtCEP2 protease subunit revealed the characteristic two band pattern (Fig. 7).

Expression levels of *AtCEP1* and *AtCEP3* were 1.9-fold and 1.8-fold up-regulated in 7 days old seedlings of *atcep2* knock out plants in comparison with those of the wild type

(Figure S7). In young seedlings, *AtCEP1* is expressed in the root tip and during lateral root formation and *AtCEP3* is expressed in the hypocotyl-root transition zone and within the main root inside the endodermis (Helm et al. 2008). The slight up-regulation of *AtCEP1* and *AtCEP3* in *atcep2* knock out plants might take place in these tissues without a change of the promoter specificity of these KDEL peptidases.

Comparison of proteolytic activity in a protein extract from wild type plants and from the *atcep2* knockout mutants indicated a reduction of proteolytic activity to <60 % in the *atcep2* knockout mutant plant compared to wild type (Fig. 8). *AtCEP2* might therefore account for more than 40 % of the papain-type proteolytic activity in roots.

*AtCEP2* is expressed in young primary leaves and in the hypocotyl

The *AtCEP2* reporter protein was also expressed in epidermis cells at the base of young leaves (Fig. 6A–C). *AtCEP2* was expressed in the hypocotyl in cells of non-protruding cell files (Fig. 6A, D, E) but not in the stomata itself (Fig. 6D, white arrows).

*AtCEP2* in young seedlings is exclusively expressed in epidermal cells and is localized to ER-derived organelles

Confocal laser scanning microscopy analysis of WT plants co-expressing the red *AtCEP2* reporter protein and a green ER membrane protein (Cutler et al. 2000) established storage of *AtCEP2* in ER-derived organelles: vesicles filled with the red *AtCEP2* reporter are surrounded by a green membrane (Figs. 6C, E, H, K and L). We found two types of storage organelles: round ricinosome-like organelles with their characteristic diameter of approximately 1  $\mu\text{m}$  and ER-bodies with their characteristic 10  $\mu\text{m}$  long spindle-shaped appearance.

Epidermis cells at the base of young leaves exhibited the round ricinosome-like organelles; no ER-bodies were found (Fig. 6B, C).

Epidermis cells of the hypocotyl showed exclusively the spindle-shaped ER-bodies; no ricinosome-like organelles could be detected (Fig. 6D, E). Interestingly, cells in the non-protruding cell files containing the stomata were “full” of ER-bodies that could be seen due to their length at lower magnifications. On the other hand, cells in the protruding cell files where no stomata are formed exhibited no *AtCEP2*-containing organelles (Fig. 6D).

In cells of the root elongation zone (Fig. 6G, H) and in root cap cells (Fig. 6I–L), co-localization of *AtCEP2* with distinct areas of the ER was observed: *AtCEP2* can be localized to ricinosome-like organelles, that is, round

bodies filled with the red *AtCEP2* reporter and surrounded by a green membrane.

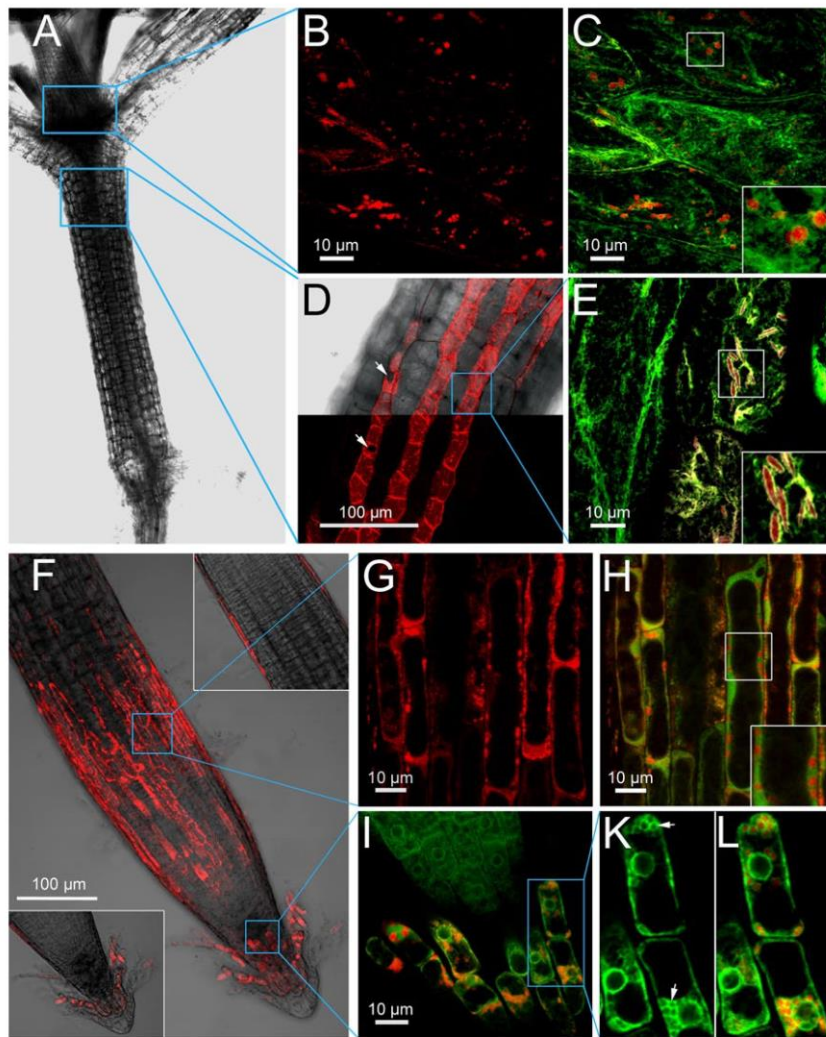
A careful examination of the tissues analyzed in the 7 days old seedlings revealed that either ricinosome-like organelles or ER-bodies harbouring mCherry-*AtCEP2* were found in the same tissue; both types of organelles labeled with *AtCEP2* could not be detected in the same cell or tissue.

## Discussion

We could show that *AtCEP2* is expressed in vegetative tissues such as young *A. thaliana* seedlings, that is, in the root cap and root elongation zone, in the non-protruding cell files of the hypocotyl containing stomata (but not in the stomata itself) and at the base of young leaves. We found *AtCEP2* exclusively in epidermal cells, where it is stored in round ricinosome-like organelles or in spindle-shaped ER-bodies as the enzymatically inactive pro-form, although very small amounts of the mature subunit seem to present at neutral pH. Acidification of pro-*AtCEP2* results in maturation, that is, cleavage of the pro-peptide and also cleavage between mCherry and the *AtCEP2* mature protease, indicating that the pre-pro-3xHA-mCherry-*AtCEP2*-KDEL reporter is a functional construct in vivo. The similarity to RcCysEP suggests that this pH-dependent activation is common to KDEL-CysEPs. A small amount of the mature *AtCEP2* protease was also present, consistent with our finding with the RcCysEP (Schmid et al. 1998): the assay at pH7.5 with the radioactively labelled precursor of glyoxysomal malate dehydrogenase (pre-gMDH) as a substrate revealed the pro-form to exhibit a very low proteolytic activity.

The presence of a GFP-tagged ER membrane protein showed that *AtCEP2* was localized in two different ER-derived compartments: in spherical 1  $\mu\text{m}$  organelles (similar to ricinosomes or KDEL vesicles) and in 1  $\times$  10  $\mu\text{m}$  spindle-shaped ER-bodies. *AtCEP2* was expressed exclusively in epidermal cells: at the base of young leaves, in the hypocotyl, in the root elongation zone and in the root cap of seedlings.

Plants exhibit several organelles for transport of proteins synthesized at the ER to their final destination. In general, proteins for secretion are synthesized at the ER and are modified in the ER lumen or Golgi, respectively, through formation of disulfide bridges and glycosylation before they reach their final destination by vesicle transport. Most transport vesicles from the ER are coat protein II (COPII) vesicles with a diameter of 50 nm. Plants develop various ER-derived structures with a diameter between 200 nm and 1  $\mu\text{m}$  for protein storage (Hara-Nishimura et al. 2004; Herman and Schmid 2004). Monocotyledons produce



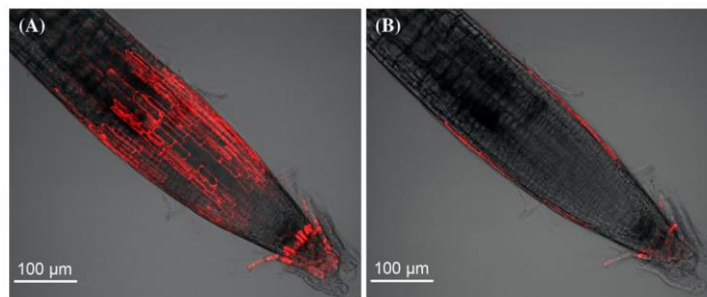
“protein bodies (PB)” for accumulation of seed storage proteins (Herman and Larkins 1999; von Wettstein 2007). “Precursor-accumulating (PAC) vesicles” in the maturing cotyledons of pumpkin (*Cucurbita maxima*) are instrumental in the bulk transport of seed protein precursors (Hara-Nishimura et al. 1998, 2004).

The “ER body” is a unique organelle of Brassicales plants (for a recent review see Yamada et al. 2011). ER bodies are spindle-shaped structures surrounded by a

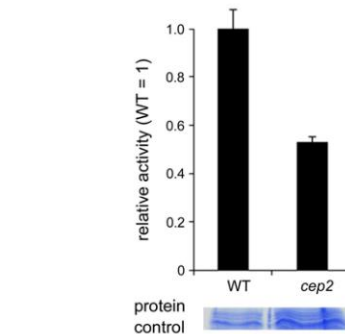
single membrane with attached ribosomes. With a size of 10  $\mu\text{m}$  long and 1  $\mu\text{m}$  wide, they are the largest ER structure in plants. ER bodies can be categorized into two types in *Arabidopsis*: seedling and root ER bodies, and wound-inducible ER bodies. *Arabidopsis* seedlings accumulate ER bodies in the epidermis. ER bodies are found in cotyledons and hypocotyl, where they disappear with the progression of senescence, and in root tissues, where ER bodies are constitutively accumulated; when plants are wounded,

◀ **Fig. 6** Sub-cellular co-localization of mCherry-AtCEP2 and a GFP-ER membrane protein in epidermis cells at the base of young leaves, in the hypocotyl and in the root cap of *Arabidopsis thaliana* seedlings. **A** Light micrograph (differential interference contrast) of an *Arabidopsis* seedling. **Blue boxes** indicate representative tissues, where the enlarged images (**B–E**) can be found. **B, C** mCherry-AtCEP2 at the base of young leaves is stored in round, ricinosome-like ER-derived vesicles; **B** red channel showing mCherry-AtCEP2; **C** merge of red mCherry-AtCEP2 and green ER membrane protein. **D** mCherry-AtCEP2 is observed in epidermis cells of the hypocotyl only in cell files including the stomata (**white arrow**); the upper part shows the red channel and differential interference contrast, the lower part shows the red channel only. **E** Enlargement of the tissue boxed in (**D**) elucidates the co-localization of mCherry-AtCEP2 and the GFP-ER membrane protein in spindle-shaped ER-derived vesicles resembling ER-bodies. **F** Roots exhibits a distinct and characteristic two band pattern; the upper band seems to mark the root elongation zone, whereas the signal in the root tip is localized in the latest root cap cells. **G, H** Co-localization of mCherry-AtCEP2 with distinct areas of the ER is observed. AtCEP2 is found in round ricinosome-like organelles. **I, K, L** AtCEP2 can be localized in the latest root cap cells to ER-derived organelles; numerous round organelles resembling ricinosomes (Fig. 6K, **white arrows**) are found that were filled with AtCEP2. **A, F** the **blue boxes** indicate representative tissues, where the enlarged images can be found. **C, E, H** the **white insets** represent enlargements of the **white boxed** areas. **K** and **L** represent enlargements of the tissue boxed in **I**. Stacks of images were obtained. **D, F**: Step size 1  $\mu\text{m}$ ; **insets** in **F**, single images. **B, C, E, G, H, I, K** step size 0.5  $\mu\text{m}$

the accumulation of ER bodies increases (Matsushima et al. 2002). ER bodies have specific membrane proteins termed “membrane protein of endoplasmic reticulum body 1” (MEB1) and MEB2 that localize to the ER body membrane but not to the ER network; MEB1 and MEB2 are suggested to be metal transporters since they suppress iron and manganese toxicity upon heterologous expression in yeast (Yamada et al. 2013). Several  $\beta$ -glucosidases with an ER retention signal were described as the main components in the ER body, which lets suggest that ER bodies are involved in the metabolism of glycosides such as glucosinolates (Matsushima et al. 2003; Yamada et al. 2009). It is



**Fig. 7** *atcep2* KO mutant plants exhibit no obvious phenotype such as an impairment in root cap formation compared to WT plants. *atcep2* KO mutant line transformed with the non-functional reporter



**Fig. 8** AtCEP2 amounts to more than 40 % of the papain-type protease activity in 7 days old seedlings. Seven days old seedlings from wild type and *atcep2* knock out plants were analyzed for enzymatic activity with the fluorescence-quenched peptide CBZ-Phe-Arg-AMC at pH 4.5 (n = 3). For control of the protein amounts obtained and measured in the protein extract, the protein extracts were compared by SDS-PAGE; a representative area is shown

suggested that the ER body is involved in defense against metal stress as well as pathogens and herbivores (Yamada et al. 2013).

We found ER bodies harbouring mCherry-AtCEP2 in epidermis cells of the hypocotyl; this might indicate that ER bodies in *Arabidopsis* are storage organelles not only for  $\beta$ -glucosidases but also for AtCEP2. It is possible that both enzymes may be present at the same time. On the other hand, we found numerous AtCEP2-storing ricinosome-like organelles in roots, but apparently no AtCEP2-storing ER bodies, although  $\beta$ -glucosidase-accumulating ER bodies should be present in root tissues. Future experiments visualizing ER bodies with a luminal KDEL-tailed GFP should clarify if ricinosomes and ER bodies are simultaneously

protein pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL. **A** Stacks of images were obtained with a step size of 1  $\mu\text{m}$ . **B** single image



present, and if AtCEP2 is routed to only one of the organelles, depending on the cell type.

Ricinosomes were established as storage organelle for the pro-form of KDEL-CysEPs in several plants such as castor bean endosperm of germinating seeds and nucellus of maturing seeds (Schmid et al. 1999, 2001; Greenwood et al. 2005) and tomato anthers and imbibed seeds (Senatore et al. 2009, Trobacher et al. 2013); in these tissues, the appearance of ricinosomes and the accumulation of KDEL CysEP are an early indicator for the final stage of developmental PCD. Ricinosome-like organelles have now been found for the first time in *Arabidopsis*. AtCEP2 storing ricinosomes in *Arabidopsis* seedlings seem to be—like ER bodies—exclusively localized in epidermal cells. Interestingly, AtCEP2-storing ricinosome-like organelles were found not only in the root cap as a prominent example for developmental PCD, but mCherry-AtCEP2 containing ricinosome-like vesicles surrounded by the GFP-labeled ER-derived membrane were also present in the root elongation zone, where no PCD is to be expected. KDEL CysEPs are not glycosylated (Than et al. 2004); together with the KDEL endoplasmic reticulum retention signal, a localization to Golgi bodies or the TGN is not to be suggested.

ER bodies are suggested to be involved in defence against biotic and abiotic stress. A role for KDEL-CysEPs and ricinosomes in pathogen defense, for example against biotrophic fungi, cannot be excluded. Depending on the developmental stage or the necessity for pathogen defense of the plant, ricinosomes could be the storage organelle not only for KDEL CysEPs but also for other, yet unknown enzymes. For example, ricinosomes in the nucellus of young maturing castor bean seeds exhibit a grape-like structure and contain a diverse spectrum of proteins in addition to the KDEL CysEP (Greenwood et al. 2005), whereas the matrix enzymes of ricinosomes in the endosperm of germinating castor bean seeds obviously mainly consist of KDEL-CysEP (Schmid et al. 2001).

An alternative pathway for transfer of proteases from the ER via the Golgi apparatus to vacuoles prior to PCD has been identified in the endothelium cells of maturing *Arabidopsis* seeds (Ondzighi et al. 2008). The endothelium is the layer of cells that surrounds the endosperm and undergoes PCD during embryogenesis. A protein disulfide isomerase with a C-terminal KDEL ER retrieval signal (PDI5) is transferred together with a cysteine protease without the KDEL motif via the Golgi into lytic and protein storage vacuoles. It is suggested that the KDEL-tailed PDI5 functions as a chaperone for transporting proteases from the ER to their site of action and prevents their premature activation. Because PDI5 carries a KDEL ER retrieval signal, it remains to be seen how the ER retrieval signal is silenced during the transport of PDI5 through the Golgi apparatus (Ondzighi et al. 2008). This transport

pathway, however, is not prominent for KDEL-CysEPs. Furthermore, there is no need for inhibition by a protein disulfide isomerase during transport or storage, since KDEL CysEPs are present in ricinosomes as the enzymatically inactive pro-form.

Catabolic processes occur in plant senescence/PCD and involve various hydrolytic enzymes for macromolecule degradation. The papain-like cysteine protease RD21 (RESPONSIVE TO DESICCATION 21) contains a C-terminal granulin domain (Yamada et al. 2001). RD21 is present in ER bodies and the vacuole (Yamada et al. 2001; Carter et al. 2004). RD21-like proteases play a role in plant immune responses. The *Arabidopsis* nuclease BFN1 is induced during both senescence and developmental PCD (Perez-Amador et al. 2000; Farage-Barhom et al. 2008). BFN1 was localized in filamentous, ER-derived structures as storage compartments scattered throughout the cytoplasm in young leaves (Farage-Barhom et al. 2011). These BFN1-containing filaments clustered and wrapped around the nuclei in the progress of senescence. At the final stage of senescence, when the leaves turned yellow, most of the filaments had disappeared and the nuclease was localized within vesicles that seemed to be derived from the clustered filaments. The filamentous structures may serve as storage and transport compartments bringing the nuclease to its substrate (Farage-Barhom et al. 2011).

Hydrolytic enzymes such as proteases and especially KDEL CysEPs, glucosidases or nucleases are thus stored in ER-derived organelles and are released during developmental PCD or upon biotic stress/wounding. In addition, the concrete function of AtCEP2 stored in ricinosomes or ER bodies might be diverse. The expression of AtCEP2 in root cap formation might suggest a function in the final stage of developmental PCD. The presence of pro-AtCEP2 at the basis of young leaves, in the hypocotyl and in the root elongation zone, on the other hand, might indicate a function for AtCEP2 in loosening the cell wall for extension and/or tissue remodelling by dismantling the extensin scaffold. Due to their ability to cleave at glycosylated hydroxyl-proline, KDEL CysEPs might not only support the cell collapse in the final stage of PCD, but also serve in cell elongation. Ricinosomes and the related KDEL vesicles (KV; Toyooka et al. 2000; Okamoto et al. 2003) seem to be instrumental in the efficient transport of KDEL CysEPs for diverse purposes such as storage mobilization, PCD or tissue remodeling.

Interestingly, AtCEP2 was expressed in the hypocotyl epidermis in cell files containing stomata (and not in the stomata itself) but not in cell files without stomata. In *Arabidopsis*, epidermal cells in the hypocotyl are organized in files that run parallel to the long axis of the seedling. Files consisting of non-protruding cells are placed outside

two cortical cell files, whereas that consisting of protruding cells overlay a single cortical cell (Gendreau et al. 1997; Berger et al. 1998). Stomatal development progresses from the upper to the basal part of the hypocotyl with no stomata formed in the basal third of the embryonic stem (Berger et al. 1998). Stomata only develop in epidermal files located outside two cortical cells (Berger et al. 1998; Hung et al. 1998). Only cell elongation, but no cell division occurs in the hypocotyl, except the stomata that derive from mother cells by cell division. Cell wall weakening necessary for cell elongation might be assisted by AtCEP2. It is, however, unclear why ricinosomes were found exclusively in the non-protruding cell files containing the stomata and not in the protruding cell files. The underlying regulation or function needs further investigation.

No obvious *atcep2* knockout phenotype in young seedlings was found, especially not in root cap formation. The *atcep2* knockout phenotype indicates functional redundancy with other proteases necessary for PCD. A dual role in developmental PCD as well as in pathogen defense is established for vacuolar processing enzymes (VPEs) (Hara-Nishimura et al. 2005). VPEs (C13 legumain family) are asparaginyl endopeptidases cleaving their substrate C-terminal to Asp and Asn residues. *Arabidopsis* has four VPE genes ( $\alpha$ -VPE,  $\beta$ -VPE,  $\gamma$ -VPE und  $\delta$ -VPE). VPEs are localized in the vacuole, thus participating in the vacuole-mediated PCD typical for plants. VPE could be a key molecule in plant PCD by disrupting the vacuole. Similar to KDEL-CysEPs, VPEs are specific for plants. Metacaspases are cysteine-dependent proteases found in protozoa, fungi and plants. They lack Asp specificity and cleave their targets after Arg or Lys residues. Metacaspases are essential for normal physiology of non-metazoan organisms; they are involved in programmed cell death, stress and cell proliferation (for review see: Tsiatsiani et al. 2011; Lam and Zhang 2011).

The strong tissue specific expression of *AtCEP1*, *AtCEP2* and *AtCEP3* does not suggest redundancy among *Arabidopsis* KDEL CysEPs (Helm et al. 2008), although this cannot be excluded since *AtCEP1* or *AtCEP3* are slightly up regulated in *atcep2* mutants. Future experiments with double knockout mutant plants expressing the appropriate functional or non-functional reporter-AtCEP fusion proteins should elucidate if the third AtCEP is now expressed in the affected tissues.

**Acknowledgments** This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft: Gi154/14-1 to CG and SFB924 to CG (A07) and EI (A06).

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License which permits any use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and the source are credited.

## References

- Becker C, Senyuk VI, Shutov AD, Nong VH, Fischer J, Horstmann C, Müntz K (1997) Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage protein mobilization. *Eur J Biochem* 248:304–312. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00304.x
- Beers EP (1997) Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ* 4:649–661
- Beers EP, Woffenden BJ, Zhao C (2000) Plant proteolytic enzymes: possible role during programmed cell death. *Plant Mol Biol* 44:399–415
- Beers EP, Jones AM, Dickerman AW (2004) The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 65:43–58
- Berger F, Linstead P, Dolan L, Haseloff J (1998) Stomata patterning on the hypocotyl of *Arabidopsis thaliana* is controlled by genes involved in the control of root epidermis patterning. *Dev Biol* 194:226–234
- Cannon MC, Terneus K, Hall Q, Tan L, Wang Y, Wegenhart BL, Chen L, Lampion DT, Chen Y, Kieliszewski MJ (2008) Self-assembly the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2226–2231. doi:10.1073/pnas.0711980105
- Carter C, Pan S, Zoihar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16:3285–3303. doi:10.1105/tpc.104.027078
- Cercos M, Santamaria S, Carbonell JSO (1999) Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiol* 119:1341–1348
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16:735–743. doi:10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Cunningham DF, O'Connor B (1997) Proline specific peptidases. *Biochim Biophys Acta* 1343:160–186
- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR (2000) Random GFP:cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at high frequency. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3718–3723. doi:10.1073/pnas.97.7.3718
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Perl-Treves R, Lers A (2008) Expression analysis of the BFN1 nuclease gene promoter during senescence, abscission, and programmed cell death-related processes. *J Exp Bot* 59:3247–3258. doi:10.1093/jxb/ern176
- Farage-Barhom S, Burd S, Sonogo L, Mett A, Belausov E, Gidoni D, Lers A (2011) Localization of the *Arabidopsis* senescence- and cell death-associated BFN1 nuclease: from the ER to fragmented nuclei. *Mol Plant* 4:1062–1073. doi:10.1093/mp/ssr045
- Geldner N, Denervaud-Tendon V, Hyman DL, Mayer U, Stierhof Y-D, Chory J (2009) Rapid combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J* 59:169–178. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03851.x
- Gendreau E, Traas J, Desnos T, Grandjean O, Caboche M, Höfte H (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114:295–305
- Gietl C, Wimmer B, Adamec J, Kalousek F (1997) A cysteine endopeptidase isolated from castor bean endosperm microbodies processes the glyoxysomal malate dehydrogenase precursor protein. *Plant Physiol* 113:863–871
- Greenwood JS, Helm M, Gietl C (2005) Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucleus during *Ricinus* seed development. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:2238–2243. doi:10.1073/pnas.0409429102
- Hadfield KA, Bennett AB (1997) Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Differ* 4:662–670

- Hara-Nishimura I, Hatsugai N (2011) The role of vacuole in plant death. *Cell Death Differ* 18:1298–1304. doi:10.1038/cdd.2011.70
- Hara-Nishimura I, Shimada T, Hatano K, Takeuchim Y, Nishimura M (1998) Transport of storage proteins to protein-storage vacuoles is mediated by large precursor-accumulating vesicles. *Plant Cell* 10:825–836. doi:10.1105/tpc.10.5.825
- Hara-Nishimura I, Matsushima R, Shimada T, Nishimura M (2004) Diversity and formation of endoplasmic reticulum-derived compartments in plants. Are these compartments specific to plant cells. *Plant Physiol* 136:3435–3439. doi:10.1104/pp.104.053876
- Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M, Nishimura M (2005) Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. *Curr Opin Plant Biol* 8:404–408
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, Bean S, Mulineaux PM (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* 42:819–832
- Helm M, Schmid M, Hierl G, Terneus K, Tan L, Lottspeich F, Kieliszewski MJ, Gietl C (2008) KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells and dismantling of extensin scaffolds. *Am J Bot* 95:1049–1062. doi:10.3732/ajb.2007404
- Herman EM, Larkins BA (1999) Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell* 11:601–613. doi:10.1105/tpc.11.4.601
- Herman EM, Schmid M (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* 136:3440–3446. doi:10.1104/pp.104.051722
- Hierl G, Vothknecht U, Gietl C (2012) Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiol Plant* 145:103–113. doi:10.1111/ij.1399-3054.2012.01580.x
- Hung CY, Lin Y, Zhang M, Pollock S, Marks MD, Schiefelbein J (1998) A common position-dependent mechanism controls cell-type patterning of *GLABRA2* regulation in the root and hypocotyl epidermis of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 117:73–84
- Lam E, delPozo O (2000) Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* 44:417–428
- Lam E, Zhang Y (2011) Regulating the reapers: activating metacaspases for programmed cell death. *Trends Plant Sci* 17:487–494
- Matsushima R, Hayashi Y, Shimada T, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2002) An endoplasmic reticulum-derived structure that is induced under stress conditions in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130:1807–1814
- Matsushima R, Kondo M, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2003) A novel ER-derived compartment, the ER body, selectively accumulates  $\beta$ -glucosidases with an ER-retention signal in *Arabidopsis*. *Plant J* 33:493–502. doi:10.1046/j.1365-3113.2003.01636.x
- Mollenhauer HH, Totten C (1970) Studies on seeds. V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol* 46:794–799
- Müntz K (2007) Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J Exp Bot* 58:2391–2407. doi:10.1093/jxb/erm089
- Murray MG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4325
- Okamoto T, Shimada T, Hara-Nishimura I, Nishimura M, Minamikawa T (2003) C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiol* 132:1892–1900. doi:10.1104/pp.103.021147
- Ondzighi CA, Christopher DA, Cho EJ, Chang SC, Staehelin LA (2008) *Arabidopsis* protein disulfide isomerase-5 inhibits cysteine protease during trafficking to vacuoles before programmed cell death of the endothelium in developing seeds. *Plant Cell* 20:2205–2220. doi:10.1105/tpc.108.058339
- Perez-Amador MA, Ablter ML, De Rocher EJ, Thompson DM, van Hoof A, LeBrasseur ND, Lers A, Green PJ (2000) Identification of BFN1, a bifunctional nuclease induced during leaf and stem senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 122:169–179
- Schaller A (2004) A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220:183–197
- Schmid M, Simpson D, Kalousek F, Gietl C (1998) A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206:466–475
- Schmid M, Simpson D, Gietl C (1999) Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:14159–14164. doi:10.1073/pnas.96.24.14159
- Schmid M, Simpson DJ, Sarioglu H, Lottspeich F, Gietl C (2001) The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5353–5358. doi:10.1073/pnas.061038298
- Senatore A, Trobacher CP, Greenwood JS (2009) Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiol* 149:775–790. doi:10.1104/pp.108.132720
- Simpson DJ (2001) Proteolytic degradation of cereal prolamins—the problem with proline. *Plant Sci* 161:825–838
- Than ME, Helm M, Simpson DJ, Lottspeich F, Huber R, Gietl C (2004) The 2.0-Å crystal structure of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase from germinating endosperm of *Ricinus communis* confirms its function in the final stage of programmed cell death. *J Mol Biol* 336:1103–1116
- Toyooka K, Okamoto T, Minamikawa T (2000) Mass transport of a KDEL-tailed cysteine protease (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J Cell Biol* 148:453–463. doi:10.1083/jcb.148.3.453
- Trobacher CP, Senatore A, Holley C, Greenwood JS (2013) Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta* 237:665–679
- Tsatsiani L, Van Breusegem F, Gallois P, Zaviyalov A, Lam E, Bozhkov PV (2011) Metacaspases. *Cell Death Differ* 18:1279–1288. doi:10.1038/cdd.2011.66
- Vartapetian AB, Tuzhikov AI, Chichkova NV, Taliensky M, Wolpert TJ (2011) A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death Differ* 18:1289–1297. doi:10.1038/cdd.2011.49
- Vigil EL (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J Cell Biol* 46:435–454
- Von Wettstein D (2007) From analysis of mutants to genetic engineering. *Ann Rev Plant Biol* 58:1–19. doi:10.1146/annurev.arplant.58.032806.104003
- Xu Q, Zhang L (2009) Plant caspase-like proteases in plant programmed cell death. *Plant Signal Behav* 4:902–904
- Yamada K, Matsushima R, Nishimura M, Hara-Nishimura I (2001) A slow maturation of a cysteine protease with a granulin domain in the vacuoles of senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 127:1626–1634
- Yamada K, Nagano AJ, Ogasawara K, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2009) The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific  $\beta$ -glucosidases. *Plant Signal Behav* 4:849–852
- Yamada K, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2011) Unique defense strategies by the endoplasmic reticulum body in plants. *Plant Cell Physiol* 52:2039–2049. doi:10.1093/pcp/pcr156
- Yamada K, Nagano AJ, Nishina M, Hara-Nishimura I, Nishimura M (2013) Identification of two novel endoplasmic reticulum body-specific integral membrane proteins. *Plant Physiol* 161:108–120. doi:10.1104/pp.112.207654

**Figure S1: Cloning strategy in pGreen 0179 for expression of the fusion protein pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL under control of the endogenous AtCEP2 promoter.**

**DNA sequence:**

```

GGTACCagtagagtcacttccaagaaactaggaacatcaaacaccgctcgttgcatcttggggatcctatgaaat
acacaagcttatacaaaaaaaaaattataaaaaaaaaatgaacgtatattaattcgtaattacatagccttaaaacc
aagataagatcgttacatggtgaaatgaaatattcaatctcctaataagagtgagacaattatcaattcgaa
actatcacatcaatcataaaagctacaatattttctcaactccatcaattatccgctgggagtcatacaaaaaaaa
aattaaaaaattattacatatatgtattttttttcagaaaagtgaatctcttcgaaacatatgaaattat
gaattatcatcaattggcctaggattacgagatcaacgtaaattatttaataacaaaaataaaaaatattgtttc
cttgcataggaagcatcattatccaaccacgacgcccgggtattaagccaagatccattccaattattcattcat
atctactacctaaaacgacattagccttttataaaagaagcttaaccacgacggtggtcattttaaataatt
acatttgggtgtaaacaccaaattgtatgcctaacaacttaataaaaccgccataattgttttttattgtgtttt
tgaaaaactacttgcccgttggatctctgtggcctgagttttttctctttgttttaatatatgtagtatga
aaccacgtttcaacaaatgggctgcccacaaatgttcaacgcatcttgccctgagaattttgaaatacaacaaatta
gagattaaggtatggaatgtacaaaaatcgccacgagatcctttcgtagatccacatgggtattaccgggataca
tggagaaacatgttttcttaagatcagtacattactcattaaatggctgatattagtaaaattattttgtacgta
attgtctcggtgcatggttttaagacggtgtgttcttaaaagctactccaatttaataatgatgctttcatgtgggtg
gaattaaaagtgttgatgctgtagtggttaatacaaaaaatcataaagttcatagtttaagcttcgaaaatgcaaa
tagcttggggatcaaaaagctatctttacaaaaatcttagaaatgggtggagcttcataaatcagctgtgtgact
caaatatagatgtaataagaagaatttttctgtattttcatgtattatgcatcgcctttatcgtctacaca
tgacaaaaatttttccattttccatttttaactctatacaaaaagaagtttttttattgtacaaggcattag
gtcaacaatgccatggtgtgaacaactttgtctccacatttttggggacatattctaatctaatatcgctttcca
ttacttccctaagcaacaagttgcttcatcttaattttccattattgtataaaaactatccatcaaacctgacaa
atftaaacgatgaaagcctgaattattgataatgatattgatattcattatcatccaaacgatgaaagcctgaatt
attcagttttaaaggatattcagttttctctcactgtcagctaaacttagtcaaatcaaacattcataaataat
aatacacaacatagatctataagcatgacattataaaaccataatataaatcttatgattattatctca
attactttgaaagaatgatgggttcttattctctcaaatgctgtcctagaagttccacaagctcaacca
agcgttatcaccaatgatacacaataaataattcattttccaaacgttgatgggtatttgagtaatttcaaatctct
acagaaaaatatttctcttccctataatataccgataccatctcattgcactttcaacctcaaaaaataacca
atcaaccaaaaaaaaaaaaaaaaaATGAAGAACTCTTTTGATATTTCTCTTTTCTCTTTGTCATTTCCAAAACCTGC
TTGTGGATTCGATTACGACGACAAGGAAATAGAAAGCGAAGAGGGGTTATCAACGCTTTATGATAGATGGAGGAG
CCACCACCTCCGTTCTAGGAGTCTAAATGAAAGGGAGAAGAGATTCAACGTTTTTCAGACACAATGTCATGCATGT
CCACAATACCAACAAGAAGAACCAGATCCTACAAACTTAAGCTCAACAAGTTTGCAGATTTAACAATTAATGAGTT
CAAGAATGCATACACCGGTTCCAACATCAAGCATCACAGAAATGTTGCAAGGACCAAAACGGGGCTCAAAACAGTT
CATGTATGATCATGAGAATTTATCCAAATTTACCGTCCCTCGAGTaccatacagcagcttccctgactatgctgcaact
ctaccctatgacgtaccggattatgcatccctatataccgtagatggttccagattacgcttctctcactgcttctc
tagaggcgtccacatattgTTCGACatgttgagcaaggcggaggagat aacatggccatcatcaaggagt tcat
ggcgttcaagggtgcacatggagggtccgtgaaacggccacaggttcgagatcgagggcgagggcgaggggcgccc
ctacgaggggcacccagaccgccaagctgaaggtgaccaaggttggccccctgcccctcgccctgggacatcctgtc
cccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcacccggccgacatcccgaactacttgaagctgctct
cccggagggttcaagtgaggagcggctgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgacgtgacccaggactcctc
cctgaggaagggcagttcatctcaagggtgaagctggcggcaccacactcccctcgaagggccccgtaatgca
gaagaagaccatgggctgggaggcctcctccgagcggatgtaccccagggacggcgcctgaagggcgagatcaa
gcagaggctgaagctgaaggacggcggccactacgacgctgaggtcaagaccactcaaggccaagaagcccgt
gcagctgcccggcctacaacgtcaacatcaagttggacatcactcccacaacgaggaactacacctcgtgga
acagtagcaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
acagtagcaacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
GGATCCTTACCGTCTCTC
CGTTGATTGGAGAAAGAAAGGTGCTGTCACTGAAATCAAGAATCAAGGAAAATGTGGAAGTTGTTGGGCATTTCTC
TACCGTAGCAGCTGTTGAGGGAATCAACAAGATCAAGACTAACAACCTGGTCTCACTGTCTGAACAAGAAGTAGT
GGATTGTGATACTAAGCAGAATGAAGTTGTAACGGAGGTCTTATGGAGATTGCATTTGAATTCATCAAGAAGAA
CGGTGGTATCACCACCTGAAGATAGCTATCCTTATGAAGGTATCGATGGAAAATGCGACGCTTCAAAGGATAACGG
CGTGCTTGTGACGATAGATGGGCATGAAGATGTACCCGAAAACGACGAAAATGCTCTTCTTAAGGCTGTTGCAAA
CCAACCTGTATCTGTTGCAATTGATGCTGGAAGTTCAGATTTCCAGTTTATTTCAGAGGGAGTGTTTACGGGATC
TTGTGGAACAGAGCTGAACCATGGTGTGGCAGCGGTCCGGTATGGATCTGAGAGGGGGAAAAGTATTGGATAGT
GAGAAACTCATGGGGAGCTGAATGGGGAGAGGGAGGCTATATAAAGATTGAAAGAGAGATTGATGAACCGGAAAG
GCGTTGCCGTATGCGATGGAGGCATCGTATCCGATCAAGCTATCGTCGCTAATCCTACCCCGAAAAGACGGTGA
TGTCAAAAGATGAGCTCTAGatattgtgtacacattgtgtaaaaccatatacaaggtgatcccaattcctgtg
ttgattcatgtttagtttctctcattgatttggattttgttgggttttgaatttgaataaaaaat
gtctcgtgttttctcCGGCCCGC

```

**Primers used for PCR amplification and cloning:****Primer pair 1 for amplification of the promoter and the pre-pro-sequence (2362 bp):**

Sense: 5'-cattgGGTACCagtagagtcacttccaag-3'  
Tm ges.: 66°C Tm: 51°C

Antisense: 5'-gtaCTCGAGggacggtaatttggataaa-3'  
Tm ges.: 65°C Tm: 53°C

**Primer pair 2 for amplification of the 3xHA tag (132 bp):**

Sense: 5'-aaaCTCGAGtaccatacgcagcttctctg-3'  
Tm ges.: 66°C Tm: 54°C

Antisense: 5'-catGTCGACcatatggtggacgcctct-3'  
Tm ges.: 65°C Tm: 52°C

**Primer pair 3 for amplification of mCherry (714 bp):**

Sense: 5'-atgGTCGACatggttgagcaagggcgag-3'  
Tm ges.: 65°C Tm: 52°C

Antisense: 5'-taaGGATCCcttgtacagctcgtccatg-3'  
Tm ges.: 66°C Tm: 54°C

**Primer pair 4 for amplification of AtCEP2 (846 bp):**

Sense: 5'-aagGGATCCttaccgtcctccttgat-3'  
Tm ges.: 65°C Tm: 52°C

Antisense: 5'-gtgGCGGCCGcgaaaaacacgagacatt-3'  
Tm ges.: 68°C Tm: 51°C

**Protein sequence:**

MKKLLLIPLFSLVILQTACGFDYDDKEIESEEGSLTYDRWRSHHSVPRSLNEREKRFNVFRHNVMHVHNTNKKN  
RSYKLLKLNKFADLTINEFKNAYTGSNIKHHRMLQGPKRGSKQFMYDHENLSKLP SLEYYPYDVPDYASLYPYDVPD  
YASLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMVDMLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGGRPYEGTQTA  
KLVKTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADLPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI  
YKVKLRGTNFPFSDGPFVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRLKLDGGHYDAEVKTTYKAKKFPVQLPGAYN  
VNIKLDITSHNEDYTVQYERARGRHSTGGMDLEYLGS LPSSVDWRKKGAVTEIKNQGKCGSCWAFSTVAAVEG  
INKIKTNKLVLSLSEQLVDCDTKQNEGCNGLMEIAFEFIKKNGGITTEDSYPYEGIDGKCDASKDNGVLVLTIDG  
HEDVPENDENALLKAVANQPVSVAIDAGSSDFQFYSEGVTGSCGTELNHGVAAVGVYGSERGGKYWIVRNSWGAE  
WEGGGYIKIEREIDEPEGRCGIAMEASYPIKLSSSNPTPKDGDV KDEL

Pre - Pro - 3xHA - mCherry - AtCEP2 - KDEL

Amino acids shaded in white were introduced due to cloning strategy

**Figure S2: Cloning strategy in pGreen 0179 for expression of the non-functional fusion protein pre-pro-3xHA-mCherry-KDEL under control of the endogenous AtCEP2 promoter.**

**DNA sequence:**

```
GGTACCagtagagtcacttccaagaaactaggaacatcaaaccacgctcgttgatttggggatcctatgaaat
acacaagcttatacaaaaaaaaaattataaaaaaatgaacgtatattaattcgttaattacatagccttaaaacc
aagataagatcgttacatggttgaanaatgaaaattatcaatctcctaataagaggtgagacaattatcaattcgaa
actcacaatcaatcataaaagctacaatattttctcaactccatcaattatccgtgggagtcatacaaaaaaaaa
aattaaaaaaaaattattacataatagtattttttttcagaaaagtgaatctctttcgacaatagaaattat
gaattatcatcaattggcctaggattacgagatcaacgtaaattatttaatacaaaaaataaaaaatagtttc
cttgcattaggaagcatcattatccaaccacgacgcccgggtatgaagccaagatccattccaattattcattcat
atctactaactaaaacgacattagccttttataaagaaagtcttaacccacgacggtgttcataattaaatatt
acatttgggttaaacaccaaattgctatgcctaaacacttaataaaaccgcccaattggtttttattggtgttt
tgaanaactacttgcccgtgttatctgtggcctgagttttttctctttgttttaatatatgtagtatga
aaccaagcttcaacaaatgggctgcgcaaatgttcacgcatcttgccttgagaattttgaaatacaacataatta
gagattaaggtatggaatgtacaaaaatcgccacgagatcctttcgtagatccacatggtattaccgggataca
tgagaaacatggttttcttaagatcagtacattactcattaaatgggtcgatattagtaaaattattttgtacgta
attgctcgtgcatggttttaagacggtgtgttcttaaaagctactccaattaataatgatgctttcatggtgtg
gaatataaagttttgtagcgtagtgctaatcaaaaaatcataaagttcatagtttaagcttcgaaaatgcaaa
tagcttggggatacaaaagctatctttacaaaaatcttagaaaatgggtggagcttacataatcagctgtgtgatc
caaatatagatgtaataagaagaatttttcttgtattttcattgtattatagcatcgctttatcgtctacaca
tgacaaaaatttttccattttccatttttaattctatacaaaaagaagttttttttattgtaacaggcatttag
gtcaacaatgccatggtgtgaacaactttgtctccacatttttggggacatatcttaattcaattatcgcttttc
ttacttccctaagcaacaagttgcttcatcttaattttccattattgtataaaaactatccatcaaccctgacaa
atttaaacgatgaaagcctgaattattgataatgatattgatattcattatcatcaaacgatgaaagcctgaatt
attcagtttttaaaaggatattcagttttctcactgtcagctaaacttagtcaaatcaaacattcataaataat
attacacaacataatagatctataagcatgacatttataaaaacatataattataaattcttagatttatctcta
aactatttagaagaatagatggttctcttattctctcaaatgctgtccttagaagttccacaagctcaacca
agcgtatacacaatgatacaataataattcattttccaaacgcttgatggtatttgagtaatttcaaatctct
acagaaaaatatttctcttccctataatataccgataccatctcattgcactttcaacctcaaaaaataacca
atcaaccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc
ATGAAGAACTTCTTTTGATATTTCTCTTTTCTCTTGTGATTCTCCAAACTGC
TTGTGGATTCGATTACGACGACAAGGAAATAGAAAAGCGAAGAGGGCTTATCAACGCTTTATGATAGATGGAGGAG
CCACCACCTCCGTTCTAGGAGCTAAATGAAAGGGAGAAGAGATTCAACGTTTTCAGACACAATGTCATGCATGT
CCACAATACCAACAAGAAACCGGATCCTACAAACTTAAGTCAACAAGTTTGAGATTTAACAAATTAATGAGTT
CAAGAATGCATACCCGGTTCCAACATCAAGCATCACAGAAATGTTGCAAGGACCAAAACGCGGCTCAAAACAGTT
CATGTATGATCATGAGAATTTATCCAAAATTACCGTCCCTCGAGTaccatacagcagttcctgactatgctgcaact
ctacccctatgacgtaccggattatgcatccctataccgtagatggtccagattacgcttctctacgttctctc
tagaggcgtccacatgatgTCGACatgttgagcaagggcagaggagataacatggccatcatcaaggagtccat
gcgcttcaaggtgcacatggagggtccgtgaaacggccacaggttcagagatcgagggcgagggcgagggcgccc
ctacgagggcaccagaccgccaagctgaaggtgaccaaaggtggcccctgcccctcgccctgggacatcctgtc
ccctcagttcatgtacggctccaaggcctacgtgaagcaaccccgccgacatcccgaactacttgaagctgctctt
ccccgagggcttcaagtgaggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgacggtgacccaggactcctc
cctgcaggacggcaggttcatctacaaggtgaagctgcgcccgcacaaacttcccctccgacggccccgtaattgca
gaagaagacatgggctgggagggcctcctccgagcggatgtaccccgaggaaggcggccctgaagggcgagatcaa
gcagaggttgaagctgaaggaaggcggcactacgacgctgaggtcaagaccactcaaggccaagaagcccgt
gcagctccccggcgcctacaacgtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggaactacacacatcgtgga
acagtagcaagcggccggggcccccactccacgggggatggacgagctgtacaagGGATCCGGTGTATGTCAA
AGATGAGCTCTAGatattgtgtacacattgtgtaaaacatatacaaggtgatcccaattccttgttgat
tcatgttgtagttctcttcatgatttgattttgttggttttgaaattgaaataaaaaatgtctc
gtgtttctcCGGCCCGC
```

**Primers used for PCR amplification and cloning :**

**Primer pair 1 for amplification of the promoter and the pre-pro-sequence (2362 bp):**

Sense: cattgGGTACCagtagagtcacttccaag  
Tm ges.: 66°C Tm: 51°C

Antisense: gtaCTCGAGggacggttaattggataaa  
Tm ges.: 65°C Tm: 53°C

**Primer pair 2 for amplification of the 3xHA tag (132 bp):**

Sense: aaaCTCGAGtaccatacagcgttcctg  
Tm ges.: 66°C Tm: 54°C

Antisense: catGTCGACcatatggtggacgcctct  
Tm ges.: 65°C Tm: 52°C

**Primer pair 3 for amplification of mCherry (714 bp):**

Sense: atgGTCGACatggttgagcaaggcgag  
Tm ges.: 65°C Tm: 52°C

Antisense: taaGGATCCcttgtagcgtcgtccatg  
Tm ges.: 66°C Tm: 54°C

**Primer pair 4 for amplification of the KDEL-3'UTR (178 bp):**

Sense-kdel aagGGATCCGGTGATGTCAAAGATGAGC  
Tm ges.: 65°C Tm: 54°C

Antisense: gtgGCGCCCGagaaaaacagagacatt  
Tm ges.: 68°C Tm: 51°C

**Protein sequence:**

MKKLLIIFLFSLVILQACGFDYDDKEIESEEGLSTLYDRWRSHHSVPRSLNEREKRFNVFRHNVMHVHNTNKKN  
RSYKLNKLNKADLTINEFKNAYTGSNIKHHRLQGPKRGSKQFMYDHENLSKLP SLEYYPYDVPDYASLYPYDVPD  
YASLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMVDMLSKGEEDNMAIIKEFMRFKVHMEGVSNGHEFEIEGEGGRPYEGTQTA  
KLVTKGGPLPFAWDILSPQFMYGSKAYVKHPADLPDYLLKLSFPEGFKWERVMNFEDGGVVTVTQDSSLQDGEFI  
YKVKLRGTNFPSPDGPVMQKKTMGWEASSERMYPEDGALKGEIKQRIKLDGGHYDAEVKTTYKAKKPVQLPGAYN  
VNIKLDITSHNEDYTI VEQYERAEGRHSTGGMDELYKSGDVKDEL

Pre - Pro - 3xHA - mCherry - KDEL

Amino acids shaded in white were introduced due to cloning strategy

**Figure S3: Anti-peptide antibodies are specific for the respective AtCEP pro-enzymes. A: Alignment of KDEL-CysEPs from *Ricinus communis* and *Arabidopsis thaliana* (adapted from Helm et al. 2008). The arrow ↓ indicates the cleavage site of the pre-sequence that is co-translationally removed during transfer into the ER; the double arrow ↓↓ indicates cleavage of the pro-sequence and the last 10 amino acids including the KDEL motif during maturation to the active enzyme (Schmid et al. 1998; Than et al. 2004). Conserved amino acids are shaded. Synthetic peptides used for immunization of rabbits are indicated in red. B: The anti-peptide antibodies are specific for pro-AtCEP1, pro-AtCEP2 and pro-AtCEP3, respectively, overexpressed in *E.coli*. Lane 1 and 2, protein extracts from *E.coli* harbouring the empty vector un-induced or induced, respectively. Lane 3-5, protein extracts from *E. coli* over-expressing AtCEP1 (lane 3) AtCEP2 (lane 4) and AtCEP3 (lane5). Lane 5, castor bean CysEP from isolated ricinosomes. M, molecular weight marker. The antibodies used for decoration are indicated above the westernblot.**

**A**

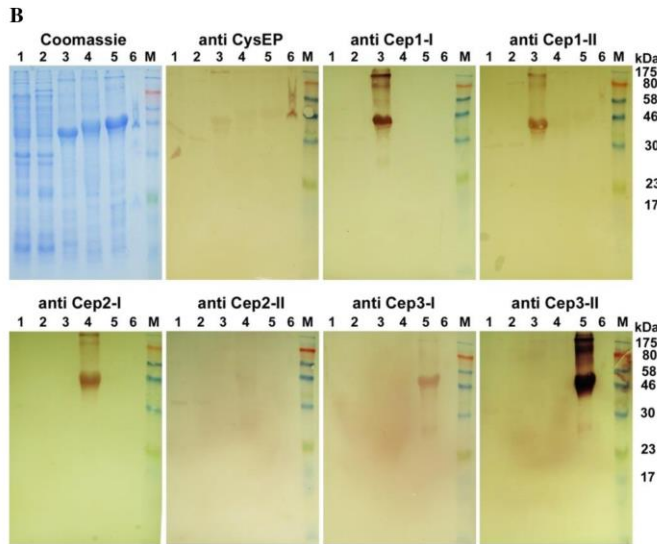
```

1                                     ↓                                     100
R. communis--MQKFI1LLA LSLALVLA... .TTESFD1PHE KELESE1E1SLW G1LYERWRSH TVSR... . . . . .SLHEK1QK R1FN1VFR1HN1M HV1HN1N. K1MD K1PY1KL1KL1N1
Arabidopsis --MKRFIVLA L1CM1LVLE... .TTKGLDF1HN K1DVESEN1SLW E1LYERWRSH TVAR... . . . . .SLEEK1AR R1FN1VFR1HN1VK HI1H1ET1N. K1KD K1SY1KL1KL1N1
Arabidopsis --MKLLLLIF L1FSLVILQ... .TACGF1DYDD KEIESE1E1GLS T1LYDRWRSH SVPR... . . . . .SLNER1EK R1FN1VFR1HN1VK HV1HT1N. K1KN R1SY1KL1KL1N1
Arabidopsis --MKLFFIVL I1SFLSLQ... .ASKGF1DFDE KELETE1ENVW K1LYERWRGH SVSR... . . . . .ASHEAI1K R1FN1VFR1HN1VL HV1HT1N. K1KN K1PY1KL1KL1N1

101                                     ↓↓                                     200
R. communis A1IM1TN1HE1FRN T1YSGSK1VKH R1MF1RG1PRGN GT... .FM1.. EK1VD1TEA. S V1DWR1KGA1VT SV1KD1GG1Q. G SC1WAF1ST1VA VEGIN1Q1IK1TN K1LV1SL1SE1QEL
Arabidopsis G1MT1SE1EF1FR T1YAGS1NIK1HH R1MF1QGE1KKAT KS... .FM1.. AN1VT1LET. S V1DWR1KGA1VT F1V1KN1GG1Q. G SC1WAF1ST1V1A VEGIN1Q1IK1TK K1LV1SL1SE1QEL
Arabidopsis A1DL1TNE1FKN A1Y1TGS1NIK1HH R1ML1Q1GF1KRGS K1Q... .FM1YD1H R1NLS1KL1ES. S V1DWR1KGA1VT E1I1KN1GG1CGG SC1WAF1ST1V1A VEGIN1Q1IK1TN K1LV1SL1SE1QEL
Arabidopsis A1DL1TH1EF1RS S1YAGS1N1VKH R1ML1RG1FRGS GG... .FM1Y.. EN1VR1VES. S V1DWR1E1KGA1VT E1V1R1NQ1DE. G SC1WAF1ST1V1A VEGIN1Q1IK1TN K1LV1SL1SE1QEL

201                                     ↓↓                                     300
R. communis V1DC1TD1Q1NG C1NGGL1MDYAF E1FI1K1Q1PGGIT TE1AN1Y1P1Y1EAY D. GT1CD1VSKE NAP1AV1SDGH EN1VE1ND1ENA I1LK1AV1AN1Q1V S1VAID1AG1SSD F1Q1F1Y1SE1GV1T
Arabidopsis V1DC1TD1Q1NG C1NGGL1MDLAF E1FI1KE1KG1GLT SEL1V1Y1P1Y1KAS D. E1TC1DT1NKE NAP1V1SDGH ED1VE1KN1SED I1LM1KAV1AN1Q1V S1VAID1AG1SSD F1Q1F1Y1SE1GV1T
Arabidopsis V1DC1TD1Q1NG C1NGGL1MDLAF E1FI1K1NG1GIT TED1S1Y1P1Y1EGI D. GK1ED1ASKD NG1V1LT1IDGH ED1VE1ND1ENA I1LK1AV1AN1Q1V S1VAID1AG1SSD F1Q1F1Y1SE1GV1T
Arabidopsis V1DC1TE1EN1Q C1AGGL1MDYAF E1FI1KN1GGIK TES1Y1P1Y1DSS DV1Q1FRANSI GG1ET1Y1IDGH EN1VE1ND1EE I1LK1AV1AN1Q1V S1VAID1AG1SSD F1Q1F1Y1SE1GV1T

301                                     ↓↓                                     387
R. communis G1SC1GT1LD1HG V1AIV1GY1GTI D1GT1KY1TV1VN SW1GF1EW1GEK Y1IR1MER1GI. S D1REG1LC1GIAM E1ASY1F1IK1SS N1NP1SGI... .K G1SP1KDEL1 CysEPAF050756
Arabidopsis G1SC1GT1LD1HG V1AV1VG1GTI D1GT1KY1IV1N SW1GF1EW1GEK Y1IR1MER1GI. S D1REG1LC1GIAM E1ASY1F1IK1SS N1NP1SGI... .L D1SK1DEL1 CEP1 AB024031
Arabidopsis G1SC1GT1LD1HG V1AV1VG1. SE R1K1KY1IV1N SW1GF1EW1GEK Y1IR1ER1ET. D E1PE1GR1GIAM E1ASY1F1IK1SS SN1TF1KD... DV1Q1DEL CEP2 AL049659
Arabidopsis G1EC1GT1LD1HG V1VIV1GY1ETK NG1KY1IV1PN SW1GF1EW1GEK Y1VR1IER1GI. S E1NEG1RC1GIAM E1ASY1F1TK1SS TF1ST1HE1V1VR DD1V1KDEL CEP3 AL049659
    
```





**Figure S4: Antibodies directed against the mature subunit of AtCEP1 cross-react with AtCEP2****A: Cloning strategy.** M, L and E (shaded in green) and the His-tag (yellow) were added by cloning.**AtCEP1 (636bp)**

```

GGAGCCGTCACCTCCTGTCAAAAACCAAGGCCAATGCGGGAGTTGTTGGGCGTTTTCAACAGTTGTTGCGGTGGAA
GGGATCAACCAAAATAAGAACTAAAAAGCTGACATCACTCTCAGAGCAAGAGCTAGTAGATTGTGATACAAACCAG
AACCAAGGATGCAATGGAGGCTAATGGACCTTGCTTTTGAGTTCATCAAGGAGAAAGGAGGACTCACAAAGTGAG
CTAGTGTACCCCTTACAAGGCTTCTGATGAAACTTGTGACACAAACAAGAAAAATGCTCCGGTAGTTTCAATCGAT
GGACACGAAGATGTTCTAAGAACAGCGAGGATGATCTAATGAAAGCTGTTGCTAATCAGCCTGTTTCTGTTGCT
ATTGATGCTGGAGGCTCAGACTTCAATTCTACTCCGAGGGAGTGTACCAGGAGATGCGGAACAGAGCTAAAC
CATGGAGTTGCGGTAGTAGGGTATGGAACAACGATAGACGGAACAAAGTATTGGATTGTTAAGAATTCATGGGGA
GAGGAATGGGGAGAGAAAGGATACATAAGAATGCAGAGAGGGATTGCTCATAAAGAAGGACTTTGTGGTATTGCA
ATGGAAGCTTCTTATCCTCTCAAGAACTCCAACACT

```

```

CEP1 sense      5'-agaCATATGGGAGCCGTCACCTCCTGTCAA-3'
CEP1 anti-sense 5'-agaCTCGAGAGTGTGGAGTCTTGAGAGG-3'

```

**Protein:**

```

M GAVTPVKNQGCSCWAFSTVWAVEGINQIRTKLTLSEQLVDCDTNQNQCNGGLMDLAFEFIKKGLTSELVYPYKA
SDETCDTNKENAPVVSIDGHEDVPKNSDDLKAVANQPVSVAIDAGGSDFFYSEGVFTGRCGTELNHGVAVVGYGTTIDG
TKYWIVKNSWGEWEWGEKGYIRMQRGIRHKEGLCGIAMEASYPLKNSNT L E H H H H H H H

```

**AtCEP2 (630bp)**

```

GGTGCTGTCACTGAAATCAAGAATCAAGGAAAAATGTGGAAGTTGTTGGGCATTCTCTACCGTAGCAGCTGTTGAG
GGAAATCAACAAGATCAAGACTAACAACTGGTCTCACTGCTGAAACAAGAACTAGTGGATTGTGATACTAAGCAG
AATGAAGGTTGTAACGGAGGCTTATGGAGATTGCATTTGAATTCATCAAGAAGAACGGTGGTATCACCACCTGAA
GATAGCTATCCTTATGAAGGTATCGATGGAAAAATGCGACGCTTCAAAGGATAACGGCGTGTGTTGACGATAGAT
GGGCATGAAGATGTACCCGAAAACGACGAAAATGCTCTTCTTAAGGCTGTGCAAACCAACCTGTATCTGTTGCA
ATTGATGCTGGAAGTTCAGATTTCCAGTTTTATTTCAGAGGGAGTGTACCAGGATCTTGTGGAACAGAGCTGAAC
CATGGTGTGGCAGCGGTCCGGTATGGATCTGAGAGGGGGAAAAAGTATTGGATAGTGAGAAACTCATGGGGAGCT
GAATGGGGAGAGGGGAGGCTATATAAAGATTGAAAGAGAGATTGATGAACCGGAAGGGCGTTGCGGTATTGCGATG
GAGGCATCGTATCCGATCAAGCTATCGTCG

```

```

CEP2 sense      5'-agaCATATGGGTGCTGTCACTGAAATCAAGA-3'
CEP2 anti-sense 5'-agaCTCGAGCGACGATAGCTTGATCGGAT-3'

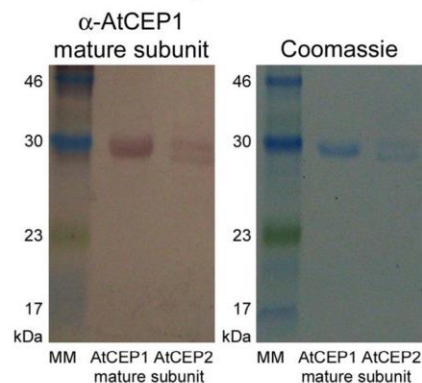
```

**Protein:**

```

M GAVTEIKNQKRCGSCWAFSTVAAVEGINKIKTNKLVLSLSEQLVDCDTKQNEGCNGLMEIAFEFIKKNGGITTT
EDSYPYEGIDGKCDASKDNGVLVTIDGHEDVPDENENALLKAVANQPVSVAIDAGSSDFQFYSEGVFTGSCGTTEL
NHGVAAVGYGSEERGKKYWIVRNSWGAEWEGGYIKIEREIDEPEGRCGIAMEASYPIKLSSE L E H H H H H H H

```

**B: Westernblot analysis**

6

**Figure S5: AtCEP2 accepts proline near the cleavage site thus exhibiting the broad substrate specificity typical for KDEL-CysEPs.**

**Amino acids of the entire beta-casein sequence (224 aa) including the pre-sequence (amino acid residues 1-15) and the mature beta-casein (amino acid residues 16-224) with the cleavage sites indicated by arrows; proline residues are shown in red.**

```

MKVLILACLVALALA-
REL|E|EELN|VPGEIVESLSSESSEITRINKK|I|E|KFQ|S|EEQQQTEDELO|DKIH|PFA|Q|TQS|LV|Y|P|F
PG|P|I|N|S|L|P|Q|N|P|P|L|T|Q|T|P|V|V|I|P|P|F|L|Q|P|E|V|M|G|I|V|S|I|K|V|K|E|I|A|I|M|A|P|K|H|K|I|E|I|M|P|F|P|K|I|Y|P|V|E
P|F|T|E|S|Q|S|L|T|L|T|D|V|E|N|L|H|L|P|L|L|L|Q|I|S|W|M|H|I|Q|P|H|I|Q|P|L|P|T|V|M|I|F|P|P|Q|S|V|L|S|I|S|Q|I|S|K|V|I|L|P|V|P|Q|I
K|I|A|I|V|P|Y|P|Q|I|R|I|D|I|M|P|I|Q|I|A|F|I|L|I|L|Y|I|Q|I|E|P|V|L|I|G|P|V|R|I|G|P|F|P|I|I|V
    
```

**Cleavage sites in beta-casein ↓ identified by amino acid sequencing alone or in combination with MALDI-TOF and summary of amino acids found in positions P2, P1, P1' and P2'**

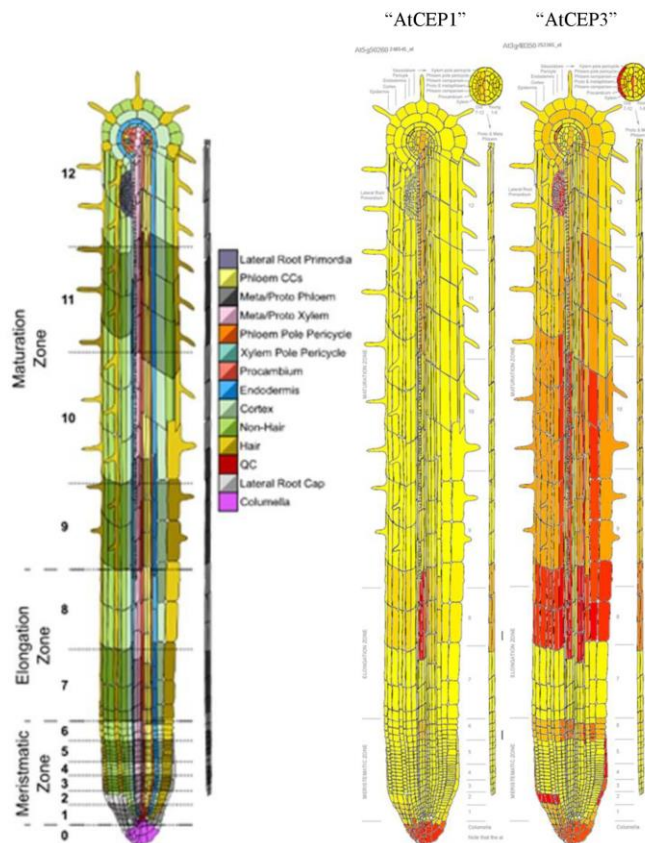
MKVLILACLVALALA	KHKE MPFP			
-REL EELN	FFPK YPVE			
REL EELNVP	EPFT ESQS			
EELN VPGEIVESLSSESSEITR	FTES QSLT			
INKK IEKF	ESQS LTLT			
KKIE KFQS	QSLT LTDV			
EKFQ SEEQ	LTLT DVEN			
KFQS EEQQQTE	ENLH LPLP			
DELO DKIH	LPLL QSWM			
HPFA QTQS	PLLQ SWMH			
FFAQ TQSL	QSWM HQPH			
QTSQ LVYP	SWMH QPHQ			
QSLV YFPF	HQPH QLEP			
LVYP FPGP	PTVM FPPQ			
GP P N S L P Q	SVLS LSQS			
E P N S L P Q	L S L S Q S K V			
I P N S L P Q	S L S Q S K V L			
P N S L P Q N I	Q S K V L P V P			
S L P Q N I P P	E V P Q K A V P			
P P L T Q T P V	V P Q K A V P Y			
P L T Q T P V V	P Q K A V P Y P			
T P V V V P P F	E Y P Q R D M P			
E V V V P P F L	Y P Q R D M P I			
P P F L Q P E V	P Q R D M P I Q			
P E V M G V S K	M P I Q A F L L			
E V M G V S K V	I Q A F L L Y Q			
M G V S K V K E	Q A F L L Y Q E			
S K V K E A M A	A F L L Y Q E P			
K V K E A M A P	F L L Y Q E P V			
V K E A M A P K	L L Y Q E P V L			
A P K H K E M P	E P V L G P V R			
P K H K E M P F	G P V R G P F P I I V			

Residues in black correspond to the primary sequence, and those shown in red are replicates to illustrate the cleavage site from P4 to P4'.

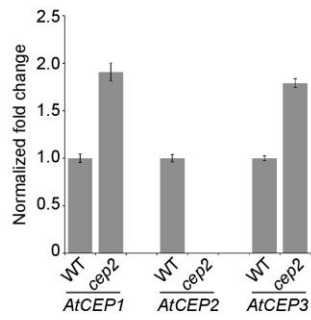
P2	P1	P1'	P2'
L (14x)	S (11x)	S (9x)	P (20x)
V (8x)	S (8x)	L (9x)	S (7x)
K (6x)	L (7x)	E (7x)	E (6x)
P (6x)	K (5x)	K (4x)	V (5x)
Q (5x)	H (4x)	V (4x)	Q (4x)
F (5x)	S (4x)	S (4x)	T (4x)
I (3x)	T (4x)	M (3x)	L (4x)
E (3x)	V (4x)	A (3x)	M (3x)
M (2x)	A (3x)	S (3x)	A (3x)
Y (2x)	M (3x)	Y (3x)	F (2x)
S (2x)	P (2x)	D (3x)	Y
A (2x)	N (2x)	P (2x)	K
W	R (2x)	F (2x)	L
H	I	T (2x)	I
R	F	Y (2x)	W
I	I	I	
N	G	R	
		H	

distribution	P2	P1	P1'	P2'
nonpolar	65 %	32 %	38 %	62 %
basic	13 %	17 %	10 %	2 %
acidic	5 %	8 %	16 %	11 %
polar, uncharged	17 %	43 %	36 %	25 %

**Figure S6: Expression of *AtCEP1* (At5g50260), *AtCEP2* (At3g48340) and *AtCEP3* (At3g48350) as visualized by the “root expression map visualizer [www.arexdb.org/]” shown in red (middle and right) and the *Arabidopsis* root template (left). The www.arexdb.org database attributes the observed expression for the KDEL peptidase(s) to *AtCEP1* (middle) and *AtCEP3* (right). No data set is available for *AtCEP2* in the ATH1 database. Comparison with our results from  $P_{CEP1}::GUS$ ,  $P_{CEP2}::GUS$  and  $P_{CEP3}::GUS$  plants (Helm et al., 2008) and  $P_{CEP2}::pre-pro-3xHA-mCherry-AtCEP2$ -KDEL, however, suggests that the *AtCEP2* expression pattern has erroneously been attributed to *AtCEP1* (At5g50260, probe ID 248545\_at) or *AtCEP3* (At3g48350; probe ID\_252368\_at).**



**Figure S7: *AtCEP1* and *AtCEP3* transcripts are slightly up-regulated in *cep2*.** Relative gene expression of *AtCEP1*, *AtCEP2* and *AtCEP3* in wild-type (WT) and *cep2* seedlings. Total RNA was extracted from 7-day-old seedlings. Expression levels were normalized to the reference gene *ACT8* and the expression in wild type was set to 1 in each experiment. Error bars: SEM.



**Table S1:** Beta-casein peptides obtained by cleavage with AtCEP2

aa-position in beta-casein	Peptide sequence
16 - 22 N-term	- . RELEELN    V
50 - 68	Q   SEEQQTTEDELQDKIHFFA    Q
51 - 68	S   EEQQQTEDELQDKIHFFA    Q
62 - 68	Q   DKIHFFA    Q
62 - 69	Q   DKIHFFA    T
73 - 82	S   LVYFFFGPIIP    N
73 - 87	S   LVYFFFGPIHNSLPQ    N
73 - 93	S   LVYFFFGPIHNSLPQNIPLT    Q
75 - 82	V   YFFFGPIIP    N
75 - 83	V   YFFFGPIIPN    S
75 - 84	V   YFFFGPIIPNS    L
75 - 87	V   YFFFGPIIPNSLPQ    N
75 - 93	V   YFFFGPIIPNSLPQNIPLT    Q
77 - 87	P   FFGPIIPNSLPQ    N
94 - 108	T   QTPVVVPPFLQPEVM    G
94 - 103	T   QTPVVVPPFL    Q
94 - 111	T   QTPVVVPPFLQPEVMGVS    K
95 - 103	Q   TPVVVPPFL    Q
100 - 108	V   PFFLQPEVM    G
100 - 109	V   PFFLQPEVMG    V
100 - 111	V   PFFLQPEVMGVS    K
110 - 135	G   VSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFT    E
110 - 141	G   VSKVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
112 - 128	S   KVKEAMAPKHKEMPFPK    Y
112 - 135	S   KVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFT    E
112 - 137	S   KVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTES    Q
112 - 141	S   . KVKEAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
115 - 135	K   EAMAPKHKEMPFPKYPVEPFT    E
115 - 141	K   EAMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
116 - 135	E   AMAPKHKEMPFPKYPVEPFT    E
116 - 141	E   AMAPKHKEMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
117 - 135	A   MAPKHKEMPFPKYPVEPFT    E
122 - 128	H   KEMPFPK    Y
122 - 135	H   KEMPFPKYPVEPFT    E
122 - 141	H   KEMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
123 - 135	K   EMPFPKYPVEPFT    E
123 - 137	K   EMPFPKYPVEPFTES    Q
123 - 141	K   EMPFPKYPVEPFTESQSLT    L
124 - 135	E   MPFPKYPVEPFT    E
129 - 135	K   YPVEPFT    E
140 - 156	S   LTLTDVENLHLPPLLQ    S
144 - 149	T   DVENLH    L
144 - 155	T   DVENLHLPPLL    Q
144 - 166	T   DVENLHLPPLLQ    S
150 - 156	H   LPLPLLQ    S
160 - 171	M   HQPHQPLPPTVM    F
160 - 179	M   HQPHQPLPPTVMFPQSVLS    L
161 - 171	H   QPHQPLPPTVM    F
161 - 179	H   QPHQPLPPTVMFPQSVLS    L
164 - 171	H   QPLPPTVM    F
182 - 191	S   QSKVLPVPQK    A
182 - 192	S   QSKVLPVPQKA    V
182 - 198	S   QSKVLPVPQKAVYPQR    D
182 - 203	S   QSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQ    A
182 - 205	S   QSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQAF    L
182 - 206	S   QSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQAFLL    L
182 - 207	S   QSKVLPVPQKAVYPQRDMPIQAFLL    Y

---

183 - 191	Q	SKVLPVPQK		A
186 - 203	V	LPVPQKAVPYPQRDMPIQ		A
191 - 198	Q	KAVYPQR		D
191 - 203	Q	KAVYPQRDMPIQ		A
192 - 198	K	AVYPQR		D
192 - 199	K	AVYPQR		M
192 - 203	K	AVYPQRDMPIQ		A
192 - 205	K	AVYPQRDMPIQAF		L
192 - 206	K	AVYPQRDMPIQAF		L
192 - 224 C-term	K	AVYPQRDMPIQAFLLYQEPVLPVLRGPFPIIV	.	-
193 - 198	A	VPYQR		D
193 - 199	A	VPYQR		M
193 - 203	A	VPYQRDMPIQ		A
198 - 203	Q	RDMPIQ		A
200 - 224 C-term	D	MPIQAFLLYQEPVLPVLRGPFPIIV	.	-
204 - 224 C-term	Q	AFLLYQEPVLPVLRGPFPIIV	.	-
207 - 224 C-term	L	LYQEPVLPVLRGPFPIIV	.	-
208 - 217	L	YQEPVLPVLR		G
208 - 224 C-term	L	YQEPVLPVLRGPFPIIV	.	-
209 - 217	Y	QEPVLPVLR		G
210 - 217	Q	EPVLPVLR		G
214 - 224 C-term	L	GPVLRGPFPIIV	.	-
218 - 224 C-term	R	GPFPIIV	.	-



## 7.2. Höwing et al., 2014

frontiers in  
PLANT SCIENCEORIGINAL RESEARCH ARTICLE  
published: 24 February 2014  
doi: 10.3389/fpls.2014.00058Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of *Arabidopsis* (AtCEP1) is involved in pathogen defenseTimo Höwing<sup>1</sup>, Christina Huesmann<sup>2</sup>, Caroline Hoefle<sup>2</sup>, Marie-Kristin Nagel<sup>3</sup>, Erika Isono<sup>3</sup>, Ralph Hüchelhoven<sup>2</sup> and Christine Gietl<sup>1\*</sup><sup>1</sup> Lehrstuhl für Botanik, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany<sup>2</sup> Lehrstuhl für Phytopathologie, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany<sup>3</sup> Department of Plant Systems Biology, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany**Edited by:**

Lorenzo Frigerio, University of Warwick, UK

**Reviewed by:**

Byung-Ho Kang, University of Florida, USA

Hilary J. Rogers, Cardiff University, UK

**\*Correspondence:**Christine Gietl, Lehrstuhl für Botanik, Center of Life and Food Sciences Weihenstephan, Technische Universität München, Emil-Ramann-Str. 4, D-85350 Freising, Germany  
e-mail: christine.gietl@wzw.tum.de

Programmed cell death (PCD) is a genetically determined process in all multicellular organisms. Plant PCD is effected by a unique group of papain-type cysteine endopeptidases (CysEP) with a C-terminal KDEL endoplasmic reticulum (ER) retention signal (KDEL CysEP). KDEL CysEPs can be stored as pro-enzymes in ER-derived endomembrane compartments and are released as mature CysEPs in the final stages of organelle disintegration. KDEL CysEPs accept a wide variety of amino acids at the active site, including the glycosylated hydroxyprolines of the extensins that form the basic scaffold of the cell wall. In *Arabidopsis*, three KDEL CysEPs (*AtCEP1*, *AtCEP2*, and *AtCEP3*) are expressed. Cell- and tissue-specific activities of these three genes suggest that KDEL CysEPs participate in the abscission of flower organs and in the collapse of tissues in the final stage of PCD as well as in developmental tissue remodeling. We observed that *AtCEP1* is expressed in response to biotic stress stimuli in the leaf. *atcep1* knockout mutants showed enhanced susceptibility to powdery mildew caused by the biotrophic ascomycete *Erysiphe cruciferarum*. A translational fusion protein of *AtCEP1* with a three-fold hemagglutinin-tag and the green fluorescent protein under control of the endogenous *AtCEP1* promoter ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) rescued the pathogenesis phenotype demonstrating the function of *AtCEP1* in restriction of powdery mildew. The spatiotemporal *AtCEP1*-reporter expression during fungal infection together with microscopic inspection of the interaction phenotype suggested a function of *AtCEP1* in controlling late stages of compatible interaction including late epidermal cell death. Additionally, expression of stress response genes appeared to be deregulated in the interaction of *atcep1* mutants and *E. cruciferarum*. Possible functions of *AtCEP1* in restricting parasitic success of the obligate biotrophic powdery mildew fungus are discussed.

**Keywords:** programmed cell death, plant immunity, sporulation, haustorium, cell wall**INTRODUCTION**

Programmed cell death (PCD) is a genetically determined, highly regulated process in all multicellular organisms (Hadfield and Bennett, 1997). PCD causes the loss of unpollinated ovules and the collapse of nucellus cells; it eliminates tissues and cells serving temporary functions during development such as the tapetum cells in anthers, the elimination of suspensor cells connecting the embryo to the mother plant and dissolution of endosperm cells in germinating castor beans (Pennell and Lamb, 1997; Olsen et al., 1999; Young and Gallie, 2000). Plants furthermore limit the spread of fungal or bacterial pathogens by rapid cell death at the site of infection through a mechanism called the hypersensitive response (HR) (Dickman and Fluhr, 2013).

**Abbreviations:** CLSM, confocal laser scanning microscopy; EGFP, enhanced green fluorescent protein; 3xHA, three-fold hemagglutinin (HA) tag; HR, hypersensitive response.

Diverse classes of proteases are involved in PCD, including cysteine proteases, serine proteases, aspartic proteases and metalloproteases (Beers, 1997; Beers et al., 2000, 2004; Schaller, 2004). In plant PCD, special functions are described for vacuolar proteases (Müntz, 2007; Hara-Nishimura and Hatsugai, 2011), metacaspases (Lam and del Pozo, 2000; Xu and Zhang, 2009; Tsiatsiani et al., 2011) or subtilisin-like proteases (Vartapetian et al., 2011). Specific for plant PCD is a unique group of papain-type cysteine endopeptidases (CysEPs) characterized by a C-terminal KDEL endoplasmic reticulum (ER) retention signal (KDEL CysEPs) with RcCysEP from castor bean (*Ricinus communis*) as the founding member (Schmid et al., 1998). KDEL CysEPs are not present in mammals or fungi, but are ubiquitous in plants (Hierl et al., 2012).

KDEL CysEPs exhibit a characteristic and unusually broad substrate specificity. The cleavage site ↓ within a substrate is denoted as P2-P1-↓-P1'-P2'. KDEL CysEPs have a clear preference for neutral amino acids with large aliphatic and



non-polar (Leu, Val, Met) or aromatic (Phe, Tyr, Trp) side-chains in the P2 position and no clear preference in the P1 position, as it is typical for papain-type CysEPs. Unusually, they accept proline in the P1 and P1' positions (Than et al., 2004; Hierl et al., 2013). Crystallization of the purified RcCysEP from castor bean as the founding member of KDEL CysEPs (Schmid et al., 1998) revealed that castor bean CysEP folds into two distinct domains of roughly equal size, as it is usual for papain-like CysEPs. The folding of RcCysEP is also very similar to the proline-specific cysteine peptidase from ginger (*Zingiber officinale*). The active site cleft of RcCysEP, however, is wider when compared to the ginger protease and papain (Than et al., 2004). RcCysEP can therefore digest extensins with its ability to accept glycosylated hydroxyproline near the cleavage site (Helm et al., 2008). The respective amino acids (Leu, Met, Ala, Leu, Asn, Gly), which are decisive for this generally more open appearance of the active site cleft, together with the amino acids defining the catalytic pocket (Cys, His, Gln, Asn), are highly conserved among all known KDEL CysEPs (Hierl et al., 2012). Possibly, all KDEL CysEPs share the same broad substrate specificity. Extensins build the basic scaffold of the plant cell wall (Cannon et al., 2008), and thus KDEL CysEPs might support final cell collapse. KDEL CysEPs seem to have a dual set of substrates: digesting cytoplasmic components in cells of dying tissues for recycling to the surviving parts of the plant or in cells of germinating seedlings for mobilization of storage proteins, respectively, and digesting cell wall extensins in the final stage of PCD in support of the general cell collapse for tissue break down. Furthermore, KDEL CysEPs are expressed during tissue remodeling, possibly for clearance of dead cells and for generating space for plant organ outgrowth (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2013).

It is obvious that KDEL-CysEPs are found in tissues undergoing PCD, especially in cells that finally collapse, such as the hypogeous cotyledons of *Vicia sativa* (Becker et al., 1997), the maturing pods of *Phaseolus vulgaris* (Tanaka et al., 1991), the unpollinated ovaries of *Pisum sativum* (Cercos et al., 1999), the outer integument developing into the seed coat of *Phalaenopsis* (Nadeau et al., 1996), the senescing flower petals of *Hemerocallis* (Valpuesta et al., 1995) and *Sandersonia aurantiaca* (O'Donoghue et al., 2002), the megagametophyte cells after germination of *Picea glauca* seeds (He and Kermode, 2003), and the epigeous cotyledons of *Vigna mungo* (Toyooka et al., 2000). KDEL CysEPs were found in the senescing endosperm of germinating castor bean seeds (Schmid et al., 1999, 2001) and in the nucellus in maturing castor bean seeds, where the endosperm expands at the expense of the nucellus cells (Greenwood et al., 2005). They are expressed in both developing and dehiscing tomato anthers (*Solanum lycopersicum*) (Senatore et al., 2009) and in endosperm cells of imbibed tomato seeds (Trobacher et al., 2013).

In *Arabidopsis*, three KDEL CysEPs: AtCEP1 (At5g50260), AtCEP2 (At3g48340), and AtCEP3 (At3g48350) have been identified that are expressed in tissues undergoing PCD. Determination of promoter activities using  $\beta$ -glucuronidase as reporter in *Arabidopsis* transformants elucidated a remarkable tissue- and organ-specificity: AtCEP1 and AtCEP3 promoter activities were found in generative tissues at several stages of seed and fruit development such as AtCEP1 in the abscission zone and the nectaries

of a silique or AtCEP3 in the maturing carpels. AtCEP1, AtCEP2, and AtCEP3 promoter activities were found in vegetative tissue such as AtCEP1 in the course of lateral root formation, AtCEP2 in roots within the root elongation zone and the beginning root cap, and AtCEP3 at the hypocotyl-root transition zone or in trichomes of leaves (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2013).

KDEL CysEP are synthesized as pre-pro-enzymes and are co-translationally transferred into the ER, where the pre-sequence is removed. KDEL CysEPs can be stored as enzymatically inactive pro-enzymes in ER-derived compartments.

A spherical organelle surrounded by a single ribosome-studded membrane with a diameter averaging 1  $\mu$ m was found in senescing endosperm tissue from castor bean. This organelle was discovered in ultrastructural and cytochemical studies independently by two groups in 1970. It was called "dilated cisternae," since it seemed to develop from the ER (Vigil, 1970), or "ricinosome," since it was found only in castor bean at that time (Mollenhauer and Totten, 1970). The ricinosomes were "re-discovered" with the identification of their marker enzyme, the KDEL CysEP (Schmid et al., 1998). Ricinosomes with their KDEL CysEP have been identified by immuno-electron-microscopy in the endosperm of germinating castor bean seeds (Schmid et al., 1999, 2001), in the nucellus of maturing castor bean seeds (Greenwood et al., 2005), in flower petals of *Hemerocallis* (Schmid et al., 1999), in the cotyledons of *Vicia sativa* (Becker et al., 1997), the unpollinated ovaries of *Pisum sativum* (Cercos et al., 1999), in tomato anthers (Senatore et al., 2009) and in endosperm cells of tomato seeds (*Solanum lycopersicum*) (Trobacher et al., 2013). Hence, the accumulation of KDEL CysEPs and the appearance of ricinosomes may be used as an early predictor of PCD.

KDEL-tailed protease-accumulating vesicles (KDEL vesicles, KVs) in germinating mung bean (*Vigna mungo*) cotyledons are similar to ricinosomes in that they accumulate the KDEL-tailed cysteine protease SH-EP (Toyooka et al., 2000). In contrast to ricinosomes, immunocytochemistry identified KDEL vesicles to transport large amounts of SH-EP from the endoplasmic reticulum to protein storage vacuoles. The mass transport of the proteinase by KDEL vesicles is thus involved in the protein mobilization of plants (Toyooka et al., 2000; Okamoto et al., 2003).

Interestingly, two different types of ER-derived organelles were found in *Arabidopsis* seedlings for storage of KDEL CysEPs using the mCherry-AtCEP2 reporter fusion protein (Hierl et al., 2013). mCherry-AtCEP2 was detected in the epidermal layers of leaves, hypocotyls and roots; in the root, it was predominantly found in the elongation zone and root cap. Co-localization with an ER membrane marker showed that mCherry-AtCEP2 was stored in 10  $\mu$ m long spindle shaped organelles as well as round vesicles with a diameter of approximately 1  $\mu$ m. The long organelles appear to be ER bodies, which are found specifically in Brassicales. The round vesicles strongly resemble ricinosomes (Hierl et al., 2013).

In plant microbe-interaction PCD has to be tightly controlled. Biotrophic pathogens are restricted by PCD because they strictly depend on living host tissue to feed from. PCD is an integral part of the HR by which plants restrict biotrophs in particular if triggered by recognition of microbial effectors. By contrast, if host PCD is triggered by hemibiotrophic or necrotrophic pathogens,

it may foster disease by producing dead defenseless tissue that is easily accessible for the pathogen (Dickman and Fluhr, 2013). Papain-type cysteine proteases are involved in plant-microbe interactions. They are expressed in response to biotic stress and can be direct or indirect targets of microbial virulence effectors (Shindo and Van der Hoorn, 2008). Publicly available expression data (www.genevestigator.com; Zimmermann et al., 2004) suggested that *AtCEP1* (At5g50260, probe set ID 248545\_at) is expressed in hormone response such as auxin in mutants of the constitutive photomorphogenic9 signalosome (*csn4* and *csn3*; Dohmann et al., 2008) and in mutants that constitutively express defense responses such as *cpr5* (Bowling et al., 1997; Clarke et al., 2000). *AtCEP3* (At3g48350; probe set ID 252365\_at) does not exhibit such a pronounced response, and no expression data are available for *AtCEP2* (At3g48340). We hence wanted to know, if *AtCEP1* is involved in pathogen defense. Therefore, we chose the interaction with an obligate biotrophic powdery mildew fungus *Erysiphe cruciferarum* because it allows for observation of quantitative disease phenotypes. We further had observed that a certain degree of late epidermal cell death occurred in the interaction of *Arabidopsis* with *E. cruciferarum* and thus analyzed wild type *AtCEP1* and *atcep1* mutant phenotypes in this interaction. Data introduce a function for *AtCEP1* in limiting susceptibility of *Arabidopsis* to *E. cruciferarum* and suggest a role in controlling late stages of the compatible interaction. Apparently, *AtCEP1*-dependent PCD at late stages of the compatible interaction fulfills a function in limiting parasitic growth of the fungus.

## MATERIALS AND METHODS

### GENERATION OF REPORTER LINES EXPRESSING

#### PRE-PRO-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL AND PRE-PRO-3xHA-EGFP-KDEL, RESPECTIVELY, UNDER CONTROL OF THE ENDOGENOUS AtCEP1 PROMOTER IN THE *atcep1* KNOCKOUT MUTANT

For the cloning strategy of the fusion gene coding for pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL under the control of the endogenous promoter of *AtCEP1* ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) and the primers used see Supplemental Figure S1. The sequence approximately 2000 bp upstream of the start Met, that was previously shown to confer tissue specific expression (Helm et al., 2008), was used as the *AtCEP1* promoter region. We placed the first three amino acids Leu-Pro-Thr of the mature subunit C-terminal to the pro-sequence in front of the 3xHA tag in order to ensure processing of the pro-peptide during maturation of *AtCEP1*. The *AtCEP1* promoter with the adjacent 5'UTR and the coding region for the pre-pro-sequence were amplified from WT (Col0) genomic DNA isolated by cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) extraction (Murray and Thompson, 1980). The 3xHA tag was amplified from pNIGEL18 (Geldner et al., 2009) and EGFP was amplified from pEzS-CL (Cutler et al., 2000). The mature *AtCEP1* subunit with the 3'UTR was amplified from WT (Col0) genomic DNA. The resulting PCR products were cloned into pGREEN conferring kanamycin resistance (Hellens et al., 2000; www.ac.uk). The final plasmid construct was sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (pGV3101) by electroporation. The construct  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$  as a non-functional reporter protein lacking the mature *AtCEP1* protease subunit was

obtained in an analogous manner. It comprised the endogenous *AtCEP1* promoter, the 5'UTR and the coding regions for the N-terminal pre-pro-peptide, for the 3xHA tag and EGFP and for the nine C-terminal amino acids of the mature *AtCEP1* subunit, including the ER retention signal KDEL (for cloning strategy and primers used see Supplemental Figure S2). The resulting PCR products were cloned into pGREEN (Hellens et al., 2000). The final plasmid construct was sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* (pGV3101) by electroporation.

Flowers from homozygous *atcep1* knock out mutant plants (SAIL\_158\_B06) were transformed by floral dipping (Clough and Bent, 1998) resulting in plants expressing the functional ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) or non-functional ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) EGFP-reporter proteins, respectively. Eight different homozygous transformants for each construct were screened for high expression of the fusion protein by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and three were chosen for further analysis.

### LEAF INFECTION WITH POWDERY MILDEW AND SYMPTOMS RATING

*Arabidopsis thaliana* Col0 plants and the *AtCEP1* T-DNA insertion mutants (SAIL\_158\_B06 and SALK\_013036) as well as *atcep1* knock out plants transformed with the functional reporter ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$  in SAIL\_158\_B06) and *atcep1* knock out plants transformed with the non-functional reporter ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$  in SAIL\_158\_B06) were grown in a growth chamber at 22°C and a 10-h photoperiod with 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$  light and 65% relative humidity. The *Arabidopsis* compatible powdery mildew fungus *Erysiphe cruciferarum* was grown on *Arabidopsis* Col-0 plants and for increased conidia production on *Arabidopsis* pad4 mutant plants (Glazebrook et al., 1996) at the same conditions. Five-week-old *Arabidopsis* plants were inoculated with *E. cruciferarum* for macroscopy and microscopy evaluation of disease progression with a density of 5–7 conidia  $\text{mm}^{-2}$ . *Arabidopsis* susceptibility to *E. cruciferarum* was scored by visual examination of the whole plant 7, 9, 11, and 13 d after inoculation. Plants were distributed in three categories of susceptibility with 0–30%, 30–60%, and >60% diseased leaf area.

### STAINING OF FUNGAL STRUCTURES WITH WHEAT GERM AGGLUTININE-TETRAMETHYLRHODAMINE

Wheat germ agglutinin tetramethylrhodamin conjugate (WGA-TMR, Invitrogen Molecular Probes, Germany) binds to extra- and intracellular chitin of fungi. To investigate the development of *E. cruciferarum* on *Arabidopsis*, inoculated leaves were harvested 5 days after inoculation and were discolored in ethanol-acetic acid glacial (EtOH-HAc; 6:1). Before WGA-TMR staining, the leaves were washed with  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  to remove the EtOH-HAc solution and were incubated for 6 min in PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH7.4). The leaves were placed into the staining solution [0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  WGA-TMR (Molecular Probes, Invitrogen), 0.01  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  BSA, PBS buffer] and were vacuum infiltrated twice at  $-0.8$  bar. After 24–48 h incubation in the dark at 4°C, three leaves from WT or *atcep1* plants each containing 54 colonies, respectively, were analyzed by fluorescence microscopy (Olympus BX61TREF, Japan). The results were

reproduced in a second independent inoculation with 48 colonies analyzed on three leaves of WT and *atcep1* plants, respectively.

#### CALLOSE STAINING WITH METHYL BLUE

Callose depositions in *Arabidopsis* cells were visualized by methyl blue (Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Germany) staining. The discolored and WGA-TMR stained leaves were rinsed with distilled water and transferred into 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> buffer for 10 min followed by incubation for 3–4 h in the staining solution (0.05% methyl blue in 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) in the dark and direct analysis by fluorescence microscope (Olympus BX61TRF, Japan).

#### qRT-PCR

Primers used for qRT-PCR are: ACT8 qRT fw: TGAGACCTTTA ATTCTCCAGCTATG; ACT8 qRT rv: CCAGAGTCCAACACA ATACCG; PR1 qRT fw: GATGTGCCAAAGTGAGGTGTA; PR1 qRT rv: TTCACATAATCCCACGAGGA; PDF1.2 qRT fw: GTT CTCTTTGCTGCTTTCGAC; PDF1.2 qRT rv: GCAAACCCC TGACCATGT. Total RNA was extracted from leaves before and 12 h (hpi) and 1, 2, 3, and 5 days (dpi) post mildew inoculation. Leaves were collected from at least five individual plants and total RNA was extracted with a NucleoSpin RNA plant kit (Machery-Nagel) and 2 µg of total RNA was reverse-transcribed with an oligo-dT primer and M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas) following the manufacturers' instructions. Quantitative real-time PCR was performed using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad) in a CFX96 Real-Time System Cyler (Bio-Rad). A 50-cycle two-step amplification protocol (10 s at 95°C, 25 s at 60°C) was used for all measurements.

#### BIOCHEMICAL METHODS

Leaves were harvested 0–18 dpi days post inoculation with powdery mildew. A protein extract was prepared from one leaf (20–30 mg fresh weight). The plant material was ground with mortar and pestle under liquid N<sub>2</sub> followed by the addition of loading dye (60 mM Tris-HCl pH 6.6, 5% glycerine, 1.5% SDS, 1.5% β-ME, 0.1% bromophenol blue final concentration), incubation for 10 min/95°C and analysis by SDS-PAGE followed by western blot analysis with anti-HA antibodies (Roche).

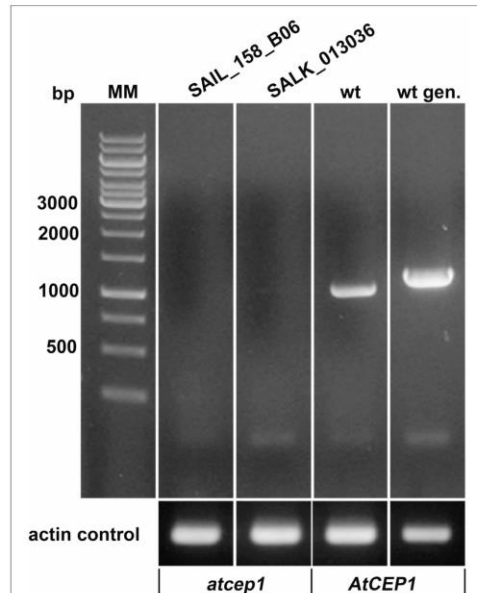
#### CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPY

CLSM (Fluoview FV 1000, Olympus, Japan) was performed using excitation at 488nm and emission detection between 503 and 550 nm for GFP. Single pictures or stacks of pictures with 0.5 µm increments at higher resolution and 2.5 µm increments at lower resolution were made.

#### RESULTS

##### HOMOZYGOUS *atcep1* KNOCK OUT MUTANTS EXHIBIT ENHANCED SUSCEPTIBILITY TO THE BIOTROPHIC FUNGUS *ERYSIPIHE CRUCIFERARUM*

Two *AtCEP1* insertion lines, SAIL\_158\_B06 and SALK\_013036, have the T-DNA insertion within the 3rd Exon. Both lines were homozygous, and RT-PCR using primers that amplified the coding region (spanning the T-DNA) confirmed the knock out of *AtCEP1* (Figure 1). Wild type Col0 plants and the two homozygous *atcep1* knock out mutants were inoculated with conidia of



**FIGURE 1 | Both *AtCEP1* mutants SAIL\_158\_B06 and SALK\_013036, harboring the T-DNA insertion in the 3. exon represents loss of function mutants. No corresponding transcript could be amplified by RT-PCR using primers that comprise the complete coding region from 7 days old seedlings, whereas the parent Col0 wild type expressed the gene. wt, RT-PCR on wild type RNA; wt gen, PCR on wild type genomic DNA.**

the powdery mildew fungus *E. cruciferarum*, an obligate biotroph that requires living cells for growth. Five week old plants were inoculated for evaluation of disease progression. *Arabidopsis* susceptibility to *E. cruciferarum* was scored by visual examination of the whole plant 7, 9, 11, and 13 days after inoculation. Both independent *atcep1* knock out mutants lines exhibited the same phenotype, that is enhanced susceptibility to *E. cruciferarum* as compared to the parental wild type, as can be seen by visual examination of the whole plant for scoring the leaf area covered by powdery mildew symptoms (Figure 2, Supplemental Figure S3, see also below).

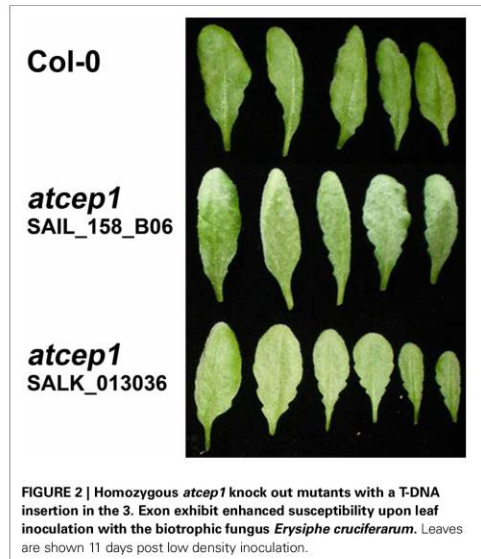
##### A FUNCTIONAL REPORTER CONSTRUCT COMPLEMENTS THE PATHOGENESIS PHENOTYPE OF *atcep1* KNOCK OUT

We constructed the fusion genes under the control of the endogenous *AtCEP1* promoter for functional ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) and non-functional ( $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$ ) reporter constructs including EGFP with and without the mature *AtCEP1* subunit (Figure 3, Supplemental Figures S1, S2, see Materials and Methods). The final plasmid constructs were sequenced and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* for subsequent transformation into

*atcep1* knock out plants SAIL\_158\_B06 in order to obtain plants expressing the functional or non-functional reporter proteins, respectively. Eight homozygous transformants for each construct were obtained. Three transformants for each construct exhibiting the highest fluorescence were chosen for further pathogen inoculation.

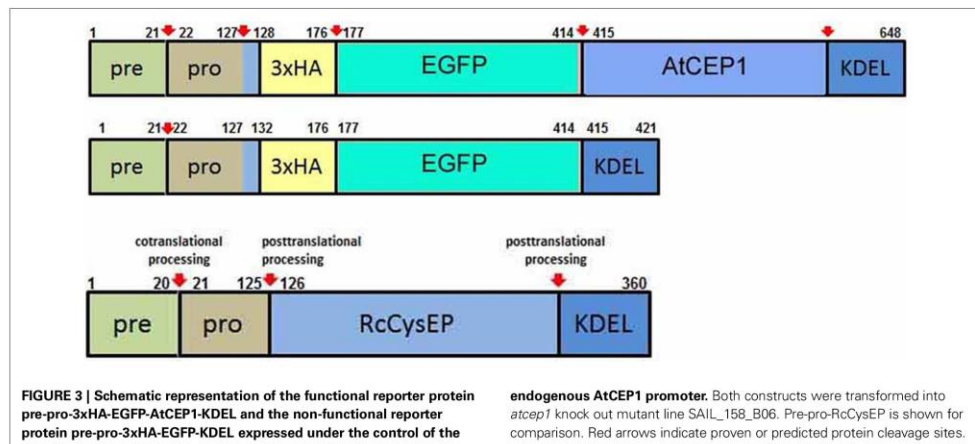
Five week old plants were inoculated with the powdery mildew fungus *E. cruciferarum* and were scored for disease progression

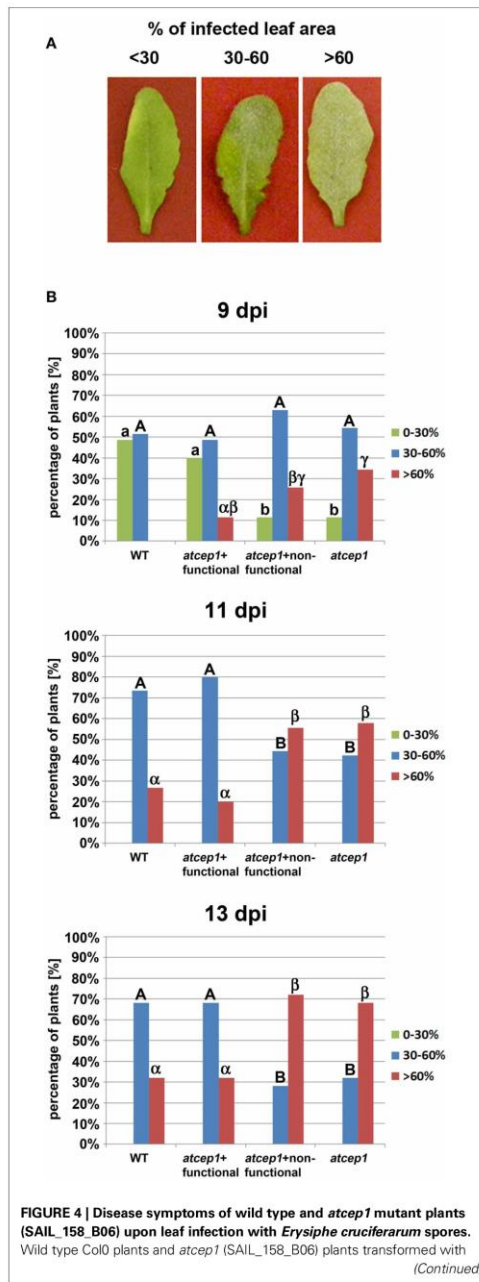
by visual examination of the whole plant 9, 11, and 13 days post inoculation: Plants were distributed in the three categories of susceptibility with less than 30%, 30–60%, and more than 60% of infected leaf area (Figure 4A). Significantly more plants of the *atcep1* knock out line SAIL\_158\_B06 were classified in the category with >60% diseased leaf area compared to Col0 control plants. This was particularly obvious at later stages of the interaction, resulting in a super-susceptibility phenotype of the mutants. By contrast, *atcep1* knock out plants transformed with the functional reporter construct reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$  exhibited a similar basal resistance to *E. cruciferarum* as compared to wild type Col0 plants thus proving the functionality of the reporter protein and complementation of the mutant phenotype. On the other hand, *atcep1* knock out plants transformed with the non-functional reporter construct reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$  behaved similar to the original *atcep1* knock out plants in showing super-susceptibility (Figure 4B).



#### EGFP-AtCEP1 EXPRESSION CORRELATES WITH THE APPEARANCE OF LEAF SYMPTOMS DURING INFECTION WITH POWDERY MILDEW

For detection of AtCEP1 protein expression, we scored the appearance of AtCEP1 on total protein extracts from infected leaves of *atcep1* knock out plants transformed with the functional reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$  that are comparable to wild type Col0 plants and *atcep1* knock out plants transformed with the non-functional reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$  that are comparable to *atcep1* knock out plants by immunoblot analysis with anti-HA antibodies (Figure 5). Pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL was detectable from day 9 on post inoculation and disappeared after day 15. Typically, two distinct protein bands are recognized by the anti-HA antibodies. Both proteins exhibit with molecular masses smaller than the 80 kDa marker the expected sizes based on their sequence with a calculated mass of 72.03 kDa and thus probably represent the intact pro-form of AtCEP1 with the C-terminal



**FIGURE 4 | Continued**

the functional construct  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$  that are comparable to wild type plants, and *atcep1* mutant plants (SAIL\_158\_B06) transformed with the non-functional reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL$  that are comparable to *atcep1* knock out plants were infected with *E. cruciferarum* and disease symptoms were scored after visual inspection of the whole plant 9, 11, and 13 days post inoculation (dpi). Infected leaf were distributed in the three categories <30%, 30–60%, and >60% diseased leaf area. **(A)** Representative leaves were excised and photographed 11 dpi. **(B)** Columns marked with different letters indicate statistically different groups according to the ANOVA- and Duncan test ( $p < 0.05$ ) and represent the frequency of plants distributed in the three categories of susceptibility. Data represent the respective means of seven experiments from independent inoculation events of the mutants with the corresponding parent background control. Each experiment comprised 5 plants per line.

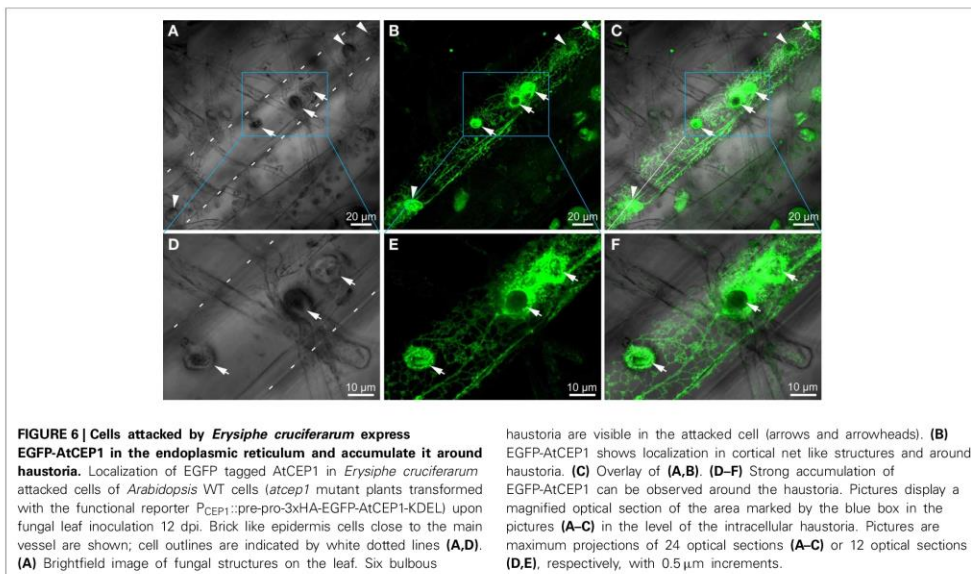
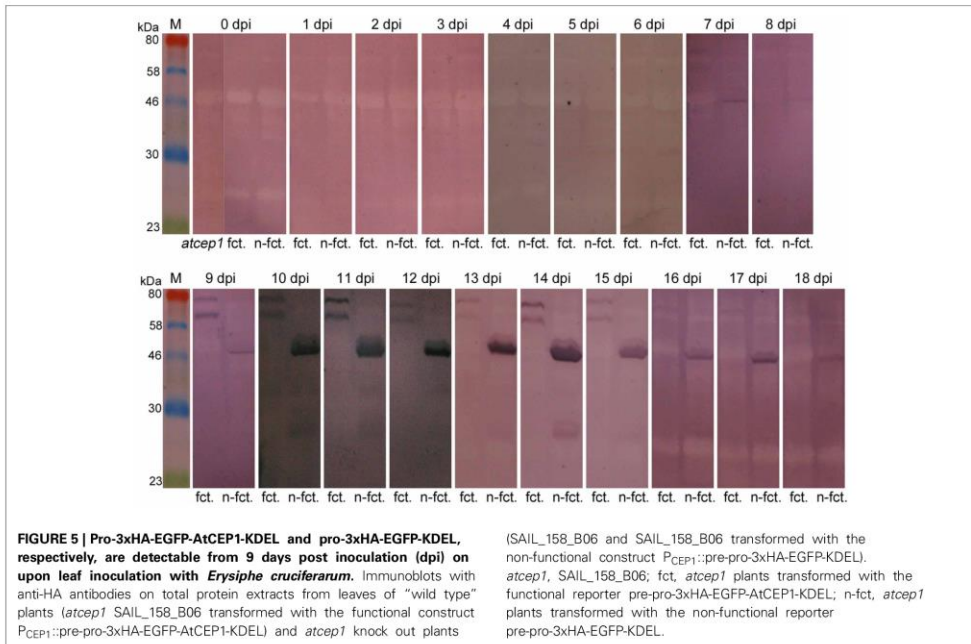
KDEL-motif still attached, however in different conformation. This double band was already found for the analogous pro-3xHA-mCherry-AtCEP2-KDEL reporter protein (Hierl et al., 2013). The non-functional reporter protein pro-3xHA-EGFP-KDEL was also detectable from day 7 post inoculation on and was found until day 18 post inoculation (Figure 5).

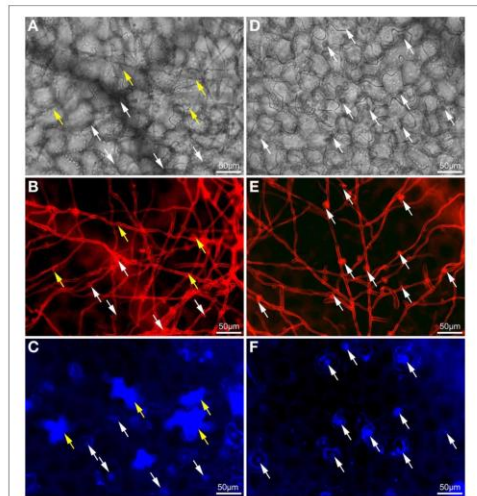
**CELLS ATTACKED BY *ERYSIPHE CRUCIFERARUM* EXPRESS EGFP-AtCEP1 IN THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND ACCUMULATE IT AROUND HAUSTORIA**

To investigate the subcellular localization of AtCEP1 *in vivo*, we analyzed complemented mutant plants (*atcep1* knock out plants transformed with the functional reporter  $P_{CEP1}::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL$ ) during interaction with *E. cruciferarum* (12 dpi) by CLSM (Figure 6). Without inoculation, we never detected the functional EGFP fusion of AtCEP1. 12 dpi, the EGFP-AtCEP1 fusion protein displayed localization within the entire endoplasmatic reticulum of cells that were successfully penetrated by the fungus and accumulated especially around established haustoria (Figures 6A–C). A strong labeling around haustoria was also observed at the haustorial plane, where the network of the endoplasmatic reticulum seemed to be very dense (Figures 6D–F).

**WILD TYPE PLANTS EXHIBIT SIGNIFICANTLY MORE DEAD EPIDERMAL CELLS AND LESS ESTABLISHED HAUSTORIA AS COMPARED TO *atcep1* MUTANTS UPON INOCULATION WITH *ERYSIPHE CRUCIFERARUM***

Visual examination of wild type and *atcep1* mutant plants upon infection with *E. cruciferarum* suggested a role for AtCEP1 in restricting the development of a biotrophic fungus (Figure 4, Supplemental Figure S3). To assess the *atcep1* knock out phenotype on a microscopic level we used two different labels: red fluorescent wheat germ agglutinin that stains the chitin of fungal hyphae and methyl blue that stains the callose at papillae and encasements of established haustoria as well as whole cells that die in the course of epidermal HR-like cell death (Figure 7). At 5dpi, fungal colonies on the wild type were grown to a size that about 24 haustoria were established per single fungal colony. In an average colony, 17 fungal attempts to penetrate were associated with localized callose depositions (papillae) without a visible haustorium. More than 19 cells per fungal colony displayed whole-cell callose deposition indicative of cell death, which was associated with



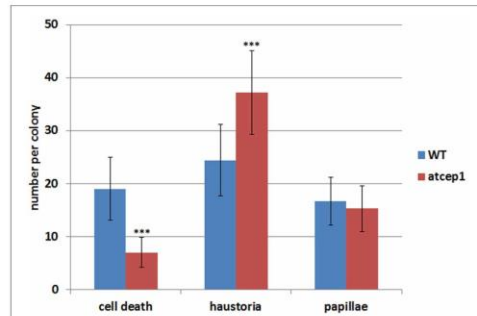


**FIGURE 7 | Wild type plants exhibit significantly more dead epidermal cells and less established haustoria as compared to *atcep1* mutants upon inoculation with *Erysiphe cruciferarum*.** Microscopic phenotype of powdery mildew attacked cells on *Arabidopsis* WT (Col0) and the *atcep1* knock out mutant (SAIL\_158\_B06) 5 dpi. WT cells show a frequent hypersensitive response (HR)-like reaction of penetrated cells (A-C) whereas no HR-like reaction is observed in the *atcep1* mutant (D-F). (A,D) Brightfield image of the selected areas. (B,E) Fungal structures on the leaf surface and bulbous haustoria marked by white arrows were stained with wheat germ agglutinin-tetramethylrhodamine. (C,F) Callose was stained by methyl blue staining. Punctate methyl blue stained structures show papilla/cell wall appositions and encapsulated haustoria. Completely stained cells marked by yellow arrows indicate an HR-like cell death.

fungal infection structures, in most cases collapsed haustoria. By contrast, the *atcep1* mutant displayed significantly less epidermal cell death (7 cells per colony) per fungal colony and at the same time supported the development of more haustoria (37 per colony) in living cells. Hence, the *atcep1* mutants displayed a failure to restrict establishment or maintenance of fungal haustoria under execution of an HR-like epidermal cell death (Figure 8).

#### PATHOGEN-RESPONSIVE GENES EXPRESSION IN *atcep1*

The difference in visual scoring leaf symptoms between wild type and *atcep1* mutant plants was most obvious at 9 to 13 dpi. However, differences were observed in fungal development and in plant cell death responses at the microscopic level already at 5 dpi. By contrast, no differences were observed in fungal development or host defense responses at 1 dpi (data not shown). We also tested wild type and *atcep1* mutants for differential expression of defense associated genes at 12 hpi, 1 dpi, 2 dpi, 3 dpi and 5 dpi. We measured relative expression of biotic stress markers *PR1* and *PDF1.2* (Reymond and Farmer, 1998) in wild type and *atcep1* plants after powdery mildew inoculation. Expression levels were normalized to the reference gene *ATC8*, and expression before inoculation



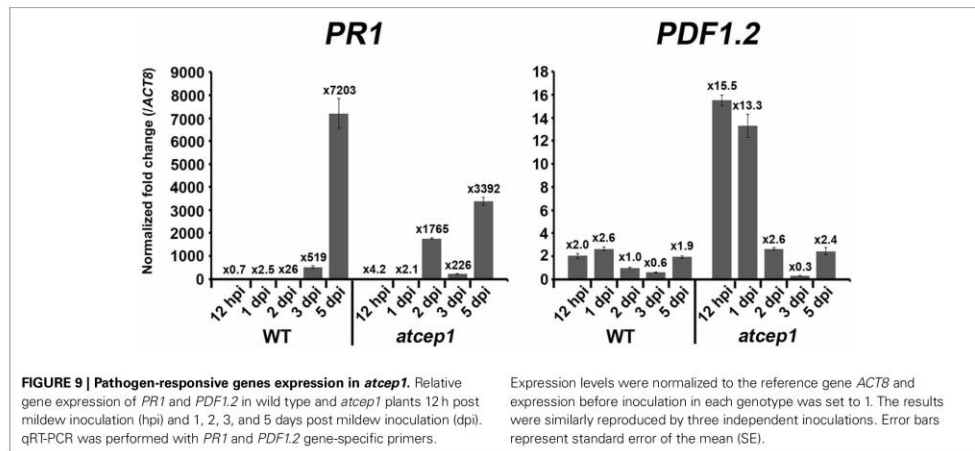
**FIGURE 8 | The epidermal cell death is suppressed in cells attacked by *Erysiphe cruciferarum* on the *atcep1* mutant 5 dpi compared to the WT.** Columns show the frequency per colony of epidermal cell death, haustoria and papilla in cells attacked by *E. cruciferarum*. Data present the mean of 54 colonies on three leaves per wild type and *atcep1* mutant line, respectively. Error bars are standard deviations. Differences between wild type and *atcep1* are highly significant after two sided student's *t*-test  $p < 0.001$  (\*\*\*). The results were similarly reproduced in a second independent inoculation with 48 colonies on three leaves per WT and *atcep1* mutant line, respectively.

in each genotype was set to 1. At distinct stages of the interaction, powdery mildew inoculation provoked very high induction of *PR1*. *PR1* gene expression was attenuated in super-susceptible *atcep1* mutants at 5 dpi, which was coinciding with lower levels of epidermal cell death at this time (Figures 8, 9). By contrast, *PDF1.2* expression in *atcep1* transiently exceeded wild type level at 0.5 dpi and at 1 dpi (Figure 9).

#### DISCUSSION

PCD is part of the HR, which restricts growth of biotrophic and hemibiotrophic pathogens in both basal resistance and in effector-triggered immunity (Dickman and Fluhr, 2013). In plants like in animals, proteases often mediate the decisive or executing steps of PCD. Papain-type cysteine proteases are involved in plant-microbe interactions. They are expressed in response to biotic stress and can be direct or indirect targets of microbial virulence effectors (Shindo and Van der Hoorn, 2008). This supports a fundamental function of papain-type proteases in plant defense. However, the identity and regulation of the proteases that are functional in particular plant-microbe interactions or in specific stages of such interactions are largely unknown. We show here that an ER-resident papain-type protease, which has been implicated in developmental cell death and tissue remodeling, is co-opted for a late defense reaction in a compatible interaction with a biotrophic fungus.

We tested the ability of wild type and *atcep1* mutants to restrict growth of the biotrophic fungus *E. cruciferarum* to find possible evidence for a role of AtCEP1 in biotic stress responses and for a role of late epidermal cell death in restricting parasitic growth of an adapted powdery mildew fungus. This revealed super-susceptibility of two independent *AtCEP1* T-DNA insertion mutants to powdery mildew. Both mutants lacked expression of



*AtCEP1* and can thus be considered as loss-of-function mutants. Basal resistance of *Arabidopsis* was re-constituted by a functional but not by a non-functional complementation construct. A native promoter functional *AtCEP1*-reporter construct allowed for the detection of *AtCEP1* protein accumulation during late stages of the interaction. Together, this suggests that *AtCEP1* is involved in basal resistance of *Arabidopsis* to powdery mildew.

Little is known about the function and efficacy of plant defense responses in compatible plant-pathogen interactions. Late epidermal PCD, as observed here, could either be an indication of fungal failure to maintain compatibility at the single cell level for a long time or an effective basal defense response of the susceptible host. Our data suggest that this type of PCD is under genetic control of the host and partially restricts fungal development during late stages of the interaction and sporulation. It is generally believed that in a compatible interaction of a susceptible host with a virulent pathogen most plant immune responses are successfully suppressed by pathogen effector molecules. Indeed, host papain proteases, which function in defense against nematodes, fungi or oomycetes, are inhibited by host and pathogen protease inhibitors that are delivered during compatible interactions (Bozkurt et al., 2011; Lozano-Torres et al., 2012; van der Linde et al., 2012). Partial inhibition of *AtCEP1* by a protease inhibitor from *E. cruciferarum* or the late accumulation of *AtCEP1* protein during pathogen interaction would explain why the pathogenesis phenotype of *atcep1* was of quantitative nature. Furthermore, reporter expression of EGFP-*AtCEP1* from *P<sub>CEP1</sub>::pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL* was detectable but irregular in cells penetrated by *E. cruciferarum*. Basal expression of the *AtCEP1* gene is also low but detectable in leaves but higher in seeds, siliques, generative tissues and parts of the root (Helm et al., 2008 and unpublished results of the authors). Late defense-related expression points to possible hormone regulation of *AtCEP1* during pathogenesis-induced physiological perturbations rather than expression in response to pathogen-associated molecular

patterns, which trigger early immune responses. Alternatively, pathogenesis might have caused a loss of tissue identity.

Cells attacked by *E. cruciferarum* expressed EGFP-*AtCEP1* in the ER and accumulated it around haustoria but not in rinosome-like structures or ER-bodies, in which *AtCEP2* can be found (Hierl et al., 2012, 2013). Interestingly, mutants lacking functional *AtCEP1* did not show the same frequency of cell death in attacked epidermal cells, when compared to wild type. This suggests that *AtCEP1* is required to undergo this type of PCD during interaction with *E. cruciferarum*. However, we cannot yet distinguish whether this is due to a function in regulating epidermal PCD or in affecting the functionality of fungal haustoria. The accumulation of ER and EGFP-*AtCEP1* at the plant-fungus interface let us speculate about a possible leakiness of the plant ER to the apoplast or to the extrahaustorial matrix. There are examples of plant KDEL-motif containing ER proteins, including papain-type proteases, that have a second destination in the apoplast or in the vacuole (Jones and Herman, 1993; Okamoto et al., 2003). Late-endosomal multivesicular compartments, which are by default delivered to the vacuole, and the tonoplast can also fuse with the plasma membrane during plant-pathogen interactions. Additionally, it is still unclear whether the host extrahaustorial membrane is an extension of the plasma membrane or originates from an endomembrane (An et al., 2007; Hatsugai et al., 2009; Hückelhoven and Panstruga, 2011; Dickman and Fluhr, 2013; Drakakaki and Dandekar, 2013). Hence, *AtCEP1* could function in inhibiting haustorial functions when the protein leaks into the apoplast. Since KDEL CysEPs contain a cleavable KDEL ER retention motif (Figure 3), which is processed during protein activation (Than et al., 2004; Hierl et al., 2013), a novel mechanism would need to be postulated for controlled release of proteins from the ER.

Haustroria are likely the fungal cells, from which effector proteins are released to suppress host immune responses including



the PCD. Therefore late expression of AtCEP1 could restrict haustorial functions in suppression of cell death. This is further supported because the reduction of cell death events in *atcep1* was accompanied by a complementary increase in haustoria per fungal colony. Indeed, most of the dead cells in the wild type were successfully penetrated and contained haustoria. Alternatively, AtCEP1 might directly function in epidermal PCD. KDEL-cysteine peptidases like AtCEP1 are considered as late-acting proteases that digest cell wall proteins during the final stages of PCD and tissue remodeling after cellular disintegration (Helm et al., 2008; Hierl et al., 2012). However, a sole post cell death digestive function of AtCEP1 would not explain restriction of fungal growth. Post-cell death tissue-clearance cannot determine the outcome of the interaction, because the fungus strictly depends on an intact host cell for biotrophy at the single-cell level. An alternative explanation for the phenotype would be a new function of AtCEP1 in the initiation of epidermal cell death.

Epidermal PCD occurred late in the interaction with the virulent powdery mildew fungus. This makes it different from a canonical HR, which is observed early in effector-triggered immunity and is based on specific nonself recognition. We do not yet know whether this type of late epidermal cell death mechanistically resembles HR or a novel type of PCD. Additionally, defense gene expression was altered in *atcep1* mutants before the pathogenesis-related phenotype became detectable. This might hint at a function of AtCEP1 in communication of the ER with the nucleus in stress-related gene expression.

#### CONCLUSION

Our data suggest a new function of AtCEP1 in late epidermal PCD in the interaction with the powdery mildew fungus. This PCD might possibly be a new type of PCD rather than classical HR. Future studies will shed light on the nature and regulation of this type of PCD and its role in interaction with other pathogens. Additionally, early differential expression of stress markers in *atcep1* points to a possible involvement of AtCEP1 in crosstalk between the ER and biotic stress responses, that takes place before cell death is observed. Apparently, the ER KDEL-peptidase AtCEP1, which otherwise may function in developmental PCD, has an additional and pivotal function in translation of pathogenesis-related stress into leaf epidermal cell death and pathogen defense.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft: SFB924 to Erika Isono (A06), Christine Gietl (A07) and Ralph Hüchelhoven (B08) and G154/14-1 to Christine Gietl.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fpls.2014.00058/abstract>

#### REFERENCES

An, Q., van Bel, A. J., and Hüchelhoven, R. (2007). Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies? *Plant Signal. Behav.* 2, 4–7. doi: 10.4161/psb.2.1.3596

- Becker, C., Senyuk, V. I., Shutov, A. D., Nong, V. H., Fischer, J., Horstmann, C., et al. (1997). Proteinase A, a storage-globulin-degrading endopeptidase of vetch (*Vicia sativa* L.) seeds, is not involved in early steps of storage protein mobilization. *Eur. J. Biochem.* 248, 304–312. doi: 10.1111/j.1432-1033.1997.00304.x
- Beers, E. P. (1997). Programmed cell death during plant growth and development. *Cell Death Differ.* 4, 649–661. doi: 10.1038/sj.cdd.4400297
- Beers, E. P., Jones, A. M., and Dickerman, A. W. (2004). The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in Arabidopsis. *Phytochemistry* 65, 43–58. doi: 10.1016/j.phytochem.2003.09.005
- Beers, E. P., Woffenden, B. J., and Zhao C. (2000). Plant proteolytic enzymes: possible role during programmed cell death. *Plant Mol. Biol.* 44, 399–415. doi: 10.1023/A:1026556928624
- Bowling, S. A., Clarke, J. D., Liu, Y., Klessig, D. F., and Dong, X. (1997). The *cpr5* mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* 9, 1573–1584. doi: 10.1105/tpc.9.9.1573
- Bozkurt, T. O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., et al. (2011). Phytophthora infestans effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 20832–20837. doi: 10.1073/pnas.1112708109
- Cannon, M. C., Terneus, K., Hall, Q., Tan, L., Wang, Y., Wegenhart, B. L., et al. (2008). Self-assembly of the plant cell wall requires an extensin scaffold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 2226–2231. doi: 10.1073/pnas.071980105
- Cercos, M., Santamaria, S., and Carbonell, J. S. O. (1999). Cloning and characterization of TPE4A, a thiol-protease gene induced during ovary senescence and seed germination in pea. *Plant Physiol.* 119, 1341–1348. doi: 10.1104/pp.119.4.1341
- Clarke, J. D., Volko, S. M., Ledford, H., Ausubel, F. M., and Dong, X. (2000). Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in *cpr*-induced resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 12, 2175–2190. doi: 10.1105/tpc.12.11.2175
- Clough, S. J., and Bent, A. E. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 16, 735–743. doi: 10.1046/j.1365-313x.1998.00343.x
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S., and Somerville, C. R. (2000). Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of Arabidopsis at high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3718–3723. doi: 10.1073/pnas.97.7.3718
- Dickman, M. B., and Fluhr, R. (2013). Centrality of host cell death in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 543–570. doi: 10.1146/annurev-phyto-081211-173027
- Dohmann, E. M. N., Levesque, M. P., Isono, E., Schmid, M., and Schweddeheimer, C. (2008). Auxin responses in mutants of the Arabidopsis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome. *Plant Physiol.* 147, 1369–1379. doi: 10.1104/pp.108.12.1061
- Drakakaki, G., and Dandekar, A. (2013). Protein secretion: how many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci.* 203–204, 74–78. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.12.017
- Geldner, N., Denervaud-Tendon, V., Hyman, D. L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., and Chory, J. (2009). Rapid combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *Plant J.* 59, 169–178. doi: 10.1111/j.1365-313x.2009.03851.x
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., and Ausubel, F. M. (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143, 973–982.
- Greenwood, J. S., Helm, M., and Gietl, C. (2005). Ricinosomes and endosperm transfer cell structure in programmed cell death of the nucellus during Ricinus seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 2238–2243. doi: 10.1073/pnas.0409429102
- Hadfield, K. A., and Bennett, A. B. (1997). Programmed senescence of plant organs. *Cell Death Differ.* 4, 662–670. doi: 10.1038/sj.cdd.4400308
- Hara-Nishimura, I., and Hatsugai, N. (2011). The role of vacuole in plant death. *Cell Death Differ.* 18, 1298–1304. doi: 10.1038/cdd.2011.70
- Hatsugai, N., Iwasaki, S., Tamura, K., Kondo, M., Fuji, K., Ogasawara, K., et al. (2009). A novel membrane fusion-mediated plant immunity against bacterial pathogens. *Genes Dev.* 23, 2496–2506. doi: 10.1101/gad.1825209
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S., and Mulineaux, P. M. (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol. Biol.* 42, 819–832. doi: 10.1023/A:1006496308160

- Helm, M., Schmid, M., Hierl, G., Terneus, K., Tan, M., Lottspeich, F., et al. (2008). KDEL-tailed cysteine endopeptidases involved in programmed cell death, intercalation of new cells and dismantling of extensin scaffolds. *Am. J. Bot.* 95, 1049–1062. doi: 10.3732/ajb.2007404
- He, X., and Kermodé, A. R. (2003). Proteases associated with programmed cell death of megagametophyte cells after germination of white spruce (*Picea glauca*) seeds. *Plant Mol. Biol.* 52, 729–744. doi: 10.1023/A:1025008117046
- Hierl, G., Höwing, T., Isono, E., Lottspeich, F., and Gietl, C. (2013). *Ex vivo* processing for maturation of Arabidopsis KDEL-tailed cysteine endopeptidase 2 (ATCEP2) pro-enzyme and its storage in endoplasmic reticulum derived organelles. *Plant Mol. Biol.* doi: 10.1007/s11103-013-0157-6. [Epub ahead of print].
- Hierl, G., Vothknecht, U., and Gietl, C. (2012). Programmed cell death in *Ricinus* and *Arabidopsis*: the function of KDEL cysteine peptidases in development. *Physiol. Plant.* 145, 103–113. doi: 10.1111/j.1399-3054.2012.01580.x
- Hückelhoven, R., and Panstruga, R. (2011). Cell biology of the plant-powdery mildew interaction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 738–746. doi: 10.1016/j.pbi.2011.08.002
- Jones, A. M., and Herman, E. M. (1993). KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.* 101, 595–606. doi: 10.1104/pp.101.5.595
- Lam, E., and del Pozo, O. (2000). Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol. Biol.* 44, 417–428. doi: 10.1023/A:1026509012695
- Lozano-Torres, J. L., Wilbers, R. H., Gawronski, P., Boshoven, J. C., Finkers-Tomczak, A., Cordewener, J. H., et al. (2012). Dual disease resistance mediated by the immune receptor Cf-2 in tomato requires a common virulence target of a fungus and a nematode. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 10119–10124. doi: 10.1073/pnas.1202867109
- Mollenhauer, H. H., and Totten, C. (1970). Studies on seeds. V. Microbodies, glyoxysomes, and ricinosomes of castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 46, 794–799. doi: 10.1104/pp.46.6.794
- Müntz, K. (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J. Exp. Bot.* 58, 2391–2407. doi: 10.1093/jxb/erm089
- Murray, M. G., and Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. *Nucl. Acid. Res.* 8, 4321–4325. doi: 10.1093/nar/8.19.4321
- Nadeau, J. A., Zhang, X. S., Li, J., and O'Neill, S. D. (1996). Ovule development: identification of stage-specific and tissue-specific cDNAs. *Plant Cell* 8, 213–239. doi: 10.1105/tpc.8.2.213
- O'Donoghue, E. M., Somerfield, S. D., and Heyes, J. A. (2002). Organization of cell walls in *Sandersonia aurantiaca* floral tissues. *J. Exp. Bot.* 53, 513–523. doi: 10.1093/jxb/53.3.513
- Okamoto, T., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Nishimura, M., and Minamikawa, T. (2003). C-terminal KDEL sequence of a KDEL-tailed cysteine proteinase (sulfhydryl-endopeptidase) is involved in formation of KDEL vesicle and in efficient vacuolar transport of sulfhydryl-endopeptidase. *Plant Physiol.* 132, 1892–1900. doi: 10.1104/pp.103.021147
- Olsen, O. A., Linnestad, C., and Nichols, S. E. (1999). Developmental biology of the cereal endosperm. *Trends Plant Sci.* 4, 253–257. doi: 10.1016/S1360-1385(99)01431-4
- Pennell, R. L., and Lamb, C. (1997). Programmed cell death in plants. *Plant Cell* 9, 1157–1168. doi: 10.1105/tpc.9.7.1157
- Reymond, P., and Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404–411. doi: 10.1016/S1369-5266(98)80264-1
- Schaller, A. (2004). A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* 220, 183–197. doi: 10.1007/s00425-004-1407-2
- Schmid, M., Simpson, D., and Gietl, C. (1999). Programmed cell death in castor bean endosperm is associated with the accumulation and release of a cysteine endopeptidase from ricinosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14159–14164. doi: 10.1073/pnas.96.24.14159
- Schmid, M., Simpson, D. J., Sarioglu, H., Lottspeich, F., and Gietl, C. (2001). The ricinosomes of senescing plant tissue bud from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 5353–5358. doi: 10.1073/pnas.061038298
- Schmid, M., Simpson, D., Kalousek, F., and Gietl, C. (1998). A cysteine endopeptidase with a C-terminal KDEL motif isolated from castor bean endosperm is a marker enzyme for the ricinosome, a putative lytic compartment. *Planta* 206, 466–475. doi: 10.1007/s004250050423
- Senatore, A., Trobacher, C. P., and Greenwood, J. S. (2009). Ricinosomes predict programmed cell death leading to anther dehiscence in tomato. *Plant Physiol.* 149, 775–790. doi: 10.1104/pp.108.132720
- Shindo, T., and Van der Hoorn, R. A. (2008). Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* 9, 119–125. doi: 10.1111/j.1364-3703.2007.00439.x
- Tanaka, T., Yamauchi, D., and Minamikawa, T. (1991). Nucleotide sequence of cDNA for an endopeptidase (EP-C1) from pods of maturing *Phaseolus vulgaris* fruits. *Plant Mol. Biol.* 16, 1083–1084. doi: 10.1007/BF00016081
- Than, M. E., Helm, M., Simpson, D. J., Lottspeich, F., Huber, R., and Gietl, C. (2004). The 2.0-Å crystal structure of the KDEL-tailed cysteine endopeptidase from germinating endosperm of *Ricinus communis* confirms its function in the final stage of programmed cell death. *J. Mol. Biol.* 336, 1103–1116. doi: 10.1016/j.jmb.2003.12.075
- Toyooka, K., Okamoto, T., and Minamikawa, T. (2000). Mass transport of a KDEL-tailed cysteine protease (SH-EP) to protein storage vacuoles by endoplasmic reticulum-derived vesicle is involved in protein mobilization in germinating seeds. *J. Cell Biol.* 148, 453–463. doi: 10.1083/jcb.148.3.453
- Trobacher, C. P., Senatore, A., Holley, C., and Greenwood, J. S. (2013). Induction of a ricinosomal-protease and programmed cell death in tomato endosperm by gibberellic acid. *Planta* 237, 665–679. doi: 10.1007/s00425-012-1780-1
- Tsiatsiani, L., Van Breusegem, F., Gallois, P., Zaviyalov, A., Lam, F., and Bozhkov, P. V. (2011). Metacaspases. *Cell Death Differ.* 18, 1279–1288. doi: 10.1038/cdd.2011.66
- Valpuesta, V., Lange, N. E., Guerrero, C., and Reid, M. S. (1995). Up-regulation of a cysteine protease accompanies the ethylene-insensitive senescence of daylily (*Heimerocallis*) flowers. *Plant Mol. Biol.* 28, 575–582. doi: 10.1007/BF00020403
- van der Linde, K., Hemetsberger, C., Kastner, C., Kaschani, F., van der Hoorn, R. A., Kümlehn, J., et al. (2012). A maize cystatin suppresses host immunity by inhibiting apoplast cysteine proteases. *Plant Cell* 24, 1285–1300. doi: 10.1105/tpc.111.093732
- Vartapetian, A. B., Tuzhikov, A. I., Chichikova, N. V., Taliensky, M., and Wolpert, T. J. (2011). A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. *Cell Death Differ.* 18, 1289–1297. doi: 10.1038/cdd.2011.49
- Vigil, E. L. (1970). Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J. Cell Biol.* 46, 435–454. doi: 10.1083/jcb.46.3.435
- Xu, Q., and Zhang, L. (2009). Plant caspase-like proteases in plant programmed cell death. *Plant Signal. Behav.* 4, 902–904. doi: 10.4161/psb.4.9.9531
- Young, T. E., and Gallie, D. R. (2000). Programmed cell death during endosperm development. *Plant Mol. Biol.* 44, 283–301. doi: 10.1023/A:1026588408152
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* 136, 2621–2632. doi: 10.1104/pp.104.046367

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 28 November 2013; accepted: 05 February 2014; published online: 24 February 2014.

Citation: Höwing T, Huesmann C, Hoefle C, Nagel M-K, Isono E, Hückelhoven R and Gietl C (2014) Endoplasmic reticulum KDEL-tailed cysteine endopeptidase 1 of Arabidopsis (ATCEP1) is involved in pathogen defense. *Front. Plant Sci.* 5:58. doi: 10.3389/fpls.2014.00058

This article was submitted to *Plant Cell Biology*, a section of the journal *Frontiers in Plant Science*.

Copyright © 2014 Höwing, Huesmann, Hoefle, Nagel, Isono, Hückelhoven and Gietl. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Figure S1: Cloning strategy in pGreen 0029 for expression of the fusion protein pre-pro-3xHA-EGFP-AtCEP1-KDEL under control of the endogenous AtCEP1 promoter.**

**DNA sequence:**

```
GGTACCaaCGaatacattttatcttctgaaacaagatggattatcggttacagatcttagaagcaaacgcaattc
atgacactgcatcctctttagtagtgatgtgatgtgctgtagctgtgtgtggtccgctttatctttttttttt
tgtaacttttctcctaacttagttgttattacgtgcttttcccaatatacaagtaaatcacacacacttcccacc
accttctctcattttcttccgaaatttagcatttttagtctcttttgacaaatagtagtcttcttctttaaattt
aagatcttctttagtctttagacacagttattgtaattgtcttttagttgaatgacataagttaggccaaaata
atgtgagttcaattttcaaaagcgttgatgaaagctaaaaccaatgactaaaaatgacatctaactcggctcctga
aaaccataatcagatatacatatgacaaatacctaaccctttttacctttcaaaataaaataatatttgagat
agatttaaaatagtaaagttattgaaaaaaaatacaatagaaaaacataatattacctaataattattacatt
ttaaagatataatagaaaaaaaatcttagtttcgacgatggaattttttttttatatagaacatcacatacc
aaataacttttagtctcttattgtgaaacaatggaagaaattgactttttaaataaattttgaaattgtttc
ttgttcacataccaaacaacttctgtttattatctgtgaaaaaagataacgtaaatgggttagccacacatgac
ggcttttccaaattatcataaggtccatatttgtaaaagaaaaatacataatccacataaataatcatagtg
aggttacatgaataacagagttcctagctagtaaagataaattgttgcgtacaagttgtgctttgattaattatc
actatcctgcttcatataaaaatgtcattttacactatataatgaatcctcctcctcctcctcctcctcctcctc
aaatcatcaattattgttccaagaataaagaaaagtaaatgagagagcttgccttgccatataatcaacataa
agttcaattatagttgaaatctttatgaatctccattaataatgtatccatgtcactaaccttgaatctttg
ttgaaatcccacaagtaactccttaacccttttggtaacttttcattacatatacgaatcaacaataaccctcacc
aatgtatctataatccctataataaacactttctctttagtctctgattaccatcaacaaactcaatcacaatcaca
agtaatacaaaaatcccatagaaaaatATGAAGCGATTTATTGTTCTTGGCTTTGCATGCTTATGGTTCTTG
AAACCACAAGGGTTTAGATTTCCATAACAAGATGTGGAATCAGAGAATAGCTTGTGGGAGCTATACGAACGGT
GGAGGAGTACCACACTGTTGCTAGGAGCCTTGAAGAGAAAGCTAAGAGGTTCAACGTTTCAAGCACAACGTTGA
AGCAGATCCATGAGACCAACAAGAGGATAAATCTTACAAGCTCAAGCTAAACAAGTTGGTGACATGACTAGTG
AAGAATTTAGGAGAACATACGCTGGTTCAAACATCAAACATCATAGGATGTTTCAAGGCCGAAAAAAGGCCACAA
AGAGCTTCATGTATGCAAAATGTAATACTCTCCCAACCCTCGAGtaccatacagagttcctgactatgctgac
tctacccctatgacgtaccggattatgcatccctatataccgtatgatgttccagattacgcttctctcagttctc
ctagagggctccaccatatagTCGACATGGTGGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCAACGGGGTGGTGGCCATCCTGG
TCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCTGAAGTTCATCTGACACCACCGCAAGCTGCCCTGCCCCACCTCGTGACCACCTGACCT
ACGGCGTGCAAGTTCAGCCGCTACCCCGACCCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGGCATGCCGAAG
GCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGG
GCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCGACAAGC
TGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCA
AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGC
GCCCGTGTCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG
ATCATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGAG
CTGCTGCCGCTGCCGCTGCCGACGGCCGGATCCCTCCCAACCTCCGTTGATTGGAGAAAAGATGGAGCCGTC
CTCCTGTCAAAAACCAAGGCCAATGCCGGAGTGTGGGGCTTTTCAACAGTTGTTGGGGTGAAGGGATCAACC
AAATAAGAACTAAAAAGCTGACATCACTCTCAGAGCAAGAGCTAGTAGATTGTGATACAACCAGAACCAGGAT
GCAATGGAGGTCTAATGGACCTTGTCTTTGAGTTTCAAGGAGAAAAGGAGGACTCACAAGTGAAGTGTGATACC
TTTACAAGGCTTCTGATGAACTTGTGACACAAACAAGAAAATGCTCCGGTAGTTTCAATCGATGGACACGAAG
ATGTTCTAAGAACAGCGAGGATGATCTAATGAAAGCTGTTGCTAATCAGCCTGTTTCTGTGCTATTGATGCTG
GAGGCTCAGACTTTCAATTCTACTCCGAGGAGTGTTTACGGGAGATGCCGAACAGAGCTAAACCATGGAGTTG
CGGTAGTAGGTTATGGAACAACGATAGACGGAACAAGTATGGATTGTTAAGAATTCATGGGAGAGGAATGGG
GAGAGAAAAGGATACATAAGAATCGAGAGAGGATTCGTCATAAAGAAGGACTTTGTGGTATGCAATGGAAGCTT
CTTATCCTCTCAAGAACTCCAACACTAACCTTCTAGACTTTCTTGGACTCGCTTAAGGATGAATCTAAatta
aatctctttatattaagattaaatagacattgacaagtttgtttatgatgattgttttttttttaaatatattt
ctttttcattaataggttatggttttcaatgtatgaagttgatgggaatcgtttgaattcggttaaatgaataaat
aatggtttttatgtGCGGCCG
```

**Primer used for PCR amplification and cloning:**

Primer pair 1 for amplification of the promoter and the pre-pro-sequence (1763 bp):

Sense: gtcGGTACCaacgaatacatttatttttc  
 Antisense: ctcCTCGAGggttgggagagtatttaca

Primer pair 2 for amplification of the 3xHA tag (132 bp):

Sense: aaaCTCGAGtaccatacgcagcttctg  
 Antisense: catGTCGACcatatggtggacgcctct

Primer pair 3 for amplification of EGFP (759 bp):

Sense: gttcctGTCGACatggtgagcaagggcgagg  
 Antisense: cctgaaGGATCCggccgctgccgagcggc

Primer pair 4 for amplification of AtCEP1-KDEL-3' UTR (885 bp):

Sense: aagGGATCCctcccaacctcgttgat  
 Antisense: gtgGCGCCGCacataaaaccatttatttatttc

**Protein-Sequence:**

MKRFIVLALCMLMVLLETTKGLDFHNKDVESENSLWELYERWRSHHTVARSLSEKAKRFNVFKHNVKHHIHETNKKK  
 KSYKLLKLNKFGDMTSEEFRRTYAGSNIKHHRMFQGEKKATKSFMYANVNI LPTLEYPYDVPDYASLYPYDVPDYA  
 SLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMVD MVSKEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTT  
 GKLPVFPWPTLVTTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFPKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIEL  
 KGIDFKEDGNI LGHKLEYNYN SHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNI EDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHY  
 LSTQSALS KDPNEKRDMVLEEFVTAAGITLGMDELYKS GAAAAAAAAAAGSLPTSVDRKNGAVTPVKNGQCGG  
 SCWAFSTVVAVEGINQIRTKKLTSLSEQELVDCDTNQNQGCNGGLMDLAFEFIKEKGGLTSELVYPKASDETC  
 TNKENAPVVSIDGHEDVPKNS EDDLKAVANQPVSVAIDAGGSDFQFYSEGVFTGRCGTELNHGVAVVGYGTTID  
 GTKYWIVKNSWGEWGEKGYIRMQRGIRHKEGLCGIAMEASYPLKNSNTNPSRLSLDSLKDEL

Pfe - Pro - 3xHA - EGFP - AtCEP1 - KDEL

Amino acids in white were introduced due to cloning strategy

**Figure S2: Cloning strategy in pGreen 0029 for expression of the fusion protein pre-pro-3xHA-EGFP-KDEL under control of the endogenous AtCEP1 promoter.**

**DNA sequence:**

```
GGTACCaacgaatacatttatttttctgaaacaagatggattatcgggtacagattttagaagcaaacgcaattc
atgacactgcatcctcctttagtagtgatgtgctgttagctgtgtgtgtccggttatccttttttttttt
tgttacttttctcctacttagttgttattacogtgccttttccaatatcaagttaaatcacacacactcccacc
acctccttcatcttttctcgaatttagcatttttagcctccttttgacaaatagtatccttcttctaaattt
aagatccttctttagcttttagacaacagttattgtaatgtccttttagttgaaatgacataaagttaggccaaaata
atgtgagttcaattttcaaaagcgttgatgaaagctaaaaccaatgactaaaaatgacatcctaattcggctcctgga
aaaccataatcagatatacattgacaaatacctaaacaaaatttttacctttcaataaaaataaatttgagat
agatttaaaatagtaaggttatgaaaaaaaatacaatagaaaaacataatattacctaataattttattacatt
ttaaagatatatagaaaaaaaattcttagtttcgacgatggaatttttttttttatatagaacatcacataacc
aaataacttttagttccttattgtgaaacaaatggaagaaattgactttttaaataaattttgaaattgatttc
ttgttcaatacaacaacttcgcttttatcgtgaaaaaagataacgtaaatggttagccacacatgcac
ggcttttccaaattatcataaggtccatatttgtaaaaaagaaaaatacataatccacataaattatcatagtg
aggttacatgaataacagagttcctagctagtaagataaaattgttgcgtacaagttgtgctttgattaattatc
actatcgtgcttcatataaaaaatgtcattttacacttatataatagtcacatcctcgcgactatttccca
aaatcatcaattattgttccaagaataaagaaatgaaatgagagagcttgcttgccataaatcaacataa
agttcaattatagttgaaatcctttagaattcctcatttaattaatgtatccatgtcactaaccttgaattctgt
ttgaaatccacaagtaactcctttaaacccttttggtacttttcttaccatcctcgtcacaataacctctcacc
aatgtatctataatccctatataaacactttctttagctcctgattaccatcaacaaactcaatcacaatcaca
agtaaatcaaaaaatcaccatagaaaaatATGAAGCGATTATTTGTTCTTGGCTTTGCATGCTTATGTTCTTC
AAACCACAAAGGGTTAGATTTCCATAACAAGATGTGGAATCAGAGAATAGCTTGTGGGAGCTATACGACCGGT
GGAGGAGTCACCACACTGTGCTAGGAGCCTGAAGAGAAAGCTAAGAGGTTCAACGTGTCAAGCACAACGTGA
AGCACATCCATGAGACCAACAAGAAGGATAAATCTTACAAGTCAAGCTAAACAAGTTGGTGACATGACTAGTG
AAGAATTTAGGAGAACATACGCTGGTTCAAACATCAAACATCATAGGATGTTTCAAGGCGAAAAAAGGCCAAA
AGAGCTTCATGTATGCAAAATGTAATACTCTCCCAACCCTCGAGtaccatacagcgttccctgactatgctcacc
tctacccctatgacgtaccggattatgcatccctatcctgtagatgttccagattacgcttctctacgttctct
ctagagcgtccaccatgTCGACATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGG
TCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCTGAAGTTCATTCGACCACCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCT
ACGGCGTGCAGTGCCTCAGCCGCTACCCGACCCATGAAGCAGCACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAG
GCTACGCTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGG
GCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGC
TGGAGTACAACACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCA
AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGC
GCCCGTGTCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCG
ATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTCCGGAG
CTGCTGCCGCTGCCGTGCCGACGGCCGGATCCTTGGACTCGCTTAAGGATGAACCTAAAtttaaattcctttt
atattaagattaatagacattgacaagttgtttatgatgattgttttttttttaaatatattcttttttcat
taataggttatggtttcaatgtatgaagttgatgggaatcgtttgaaatcgtttaaataaataaattggttt
tatgtCGGCCCGC
```

**Primer used for PCR amplification and cloning:**

**Primer pair 1 for amplification of the promoter and the pre-pro-sequence (1763 bp):**

Sense: gtcGGTACCaacgaatacattttatttttc  
 Antisense: ctccTCGAGggttgggagagtatttaca

**Primer pair 2 for amplification of the 3xHA tag (132 bp):**

Sense: aaaCTCGAGtaccatacagcgttcctg  
 Antisense: catGTCGACcatatggtggagcgcctct

**Primer pair 3 for amplification of EGFP (759 bp):**

Sense: gttcctGTCGACatggtgagcaagggcgagg  
 Antisense: cctgaaGGATCCggccgctgcccagcgagg

**Primer pair 4 for amplification of AtCEP1-KDEL-3'UTR (201 bp):**

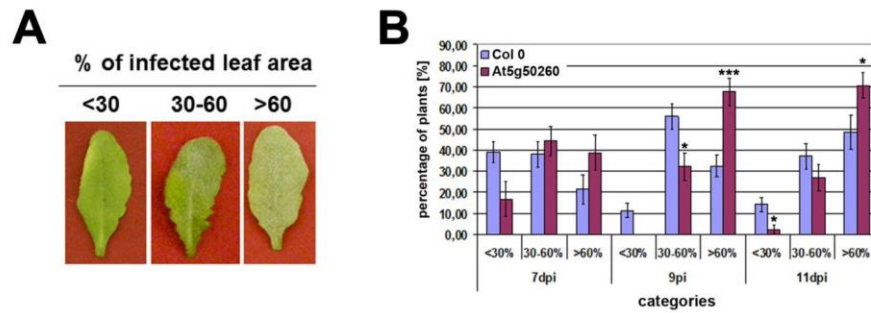
Sense: aagGGATCCTtgactcgcttaaggatg  
 Antisense: gtgCGGCCGCacataaaaccatttattttatc

**Protein-Sequence:**

MKRFTVLALCMLMLETTKGLDFHNKDVESEN<sup>W</sup>ELYERWRSHHTVARSL<sup>E</sup>EKAKRFNVFKHN<sup>V</sup>KHIHETNKKD  
 KSYKLIKLNKFGDMTSEEFRRTYAGSNIK<sup>H</sup>HRMFQGEKKATKSFMYANVNTLPTLEYPYDVPDYASLYPYDVPDYA  
 SLYPYDVPDYASLRSSRGVHHMVD<sup>M</sup>VSKEELFTGVVPI<sup>L</sup>VELDGDVNGHKFSVSGEGDATY<sup>G</sup>KLTLKFI<sup>C</sup>TT  
 GKLPVWPPTLVTLTYGVQCF<sup>S</sup>RYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRA<sup>E</sup>VKFE<sup>G</sup>DTLVNRIEL  
 KGIDFKEDGNI<sup>L</sup>GHKLEYN<sup>N</sup>SHNVYIMADKQKNGIKVNEKIRH<sup>N</sup>IEDGGSVQLADHYQ<sup>N</sup>TPIGDGPVLLPD<sup>N</sup>HY  
 LSTQSALS<sup>R</sup>KDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYKS<sup>G</sup>AAAAAAAAAAGSL<sup>L</sup>DSL<sup>K</sup>DEL

Pre - Pre - 3xHA - EGFP - KDEL

Amino acids in white were introduced due to cloning strategy



**Figure S3. Disease symptoms of wild type (Col0) and *atcep1* mutant plants (SALK\_013036, At5g50260) upon infection with *E. cruciferarum* spores.** Disease symptoms were scored by visual examination of the whole plant 7, 9 and 11 days after inoculation (dpi). Infected leaves were distributed in the three categories <30%, 30-60%, and >60% diseased leaf area. A. Representative leaves were excised and photographed 11 dpi. B. Columns represent the frequency of plants distributed in the three categories of susceptibility. Differences between wild type and *atcep1* are highly significant (\*\*\*) after two sided student's t-test,  $p < 0.05$  (\*),  $p < 0.001$  (\*\*). Each experiment comprised 8-10 plants per line. Data represent the respective means of five experiments from independent inoculation events. Error bars represent standard error of the mean (SE).

## Danksagung

Mein größter Dank gebührt Frau Prof. Dr. C. Gietl für die Möglichkeit am Lehrstuhl für Botanik zu promovieren. Ich möchte Ihr für die Überlassung dieses faszinierenden, spannenden und vor allem Fürchte-bringenden Projektes, für die zielstrebigsten Diskussionen und die direkte Betreuung der letzten Jahre, für die durchgehende Diskussionsbereitschaft sowie für Ihren Einsatz mit allen Ihr zur Verfügung stehenden Mitteln während der gesamten Dauer meiner Arbeit danken. Zudem möchte ich Ihr für die sehr netten Einladungen ins „Flüsschen“ zum Essen danken und besonders für Ihre direkte sowie offene Art, die mich im Zuge meiner Arbeit immer vorangebracht hat: Herzlichsten Dank liebe Christine!

Dem Ordinarius des Lehrstuhls für Botanik der TU München Herrn Prof. Dr. E. Grill möchte ich für seine stete Unterstützung sowie die anregenden Gespräche und Diskussionen während der Mittwochsseminare danken. Und natürlich auch für das leckere Essen bei so mancher Grill-Session.

Außerdem möchte ich Dr. A. Christmann danken, der immer ein offenes Ohr und einen Ratschlag parat hatte.

Dr. F. Assaad möchte ich für Ihre nützlichen Vorschläge während der Mittwochsseminare und für die Korrektur so mancher englischer Manuskripte danken.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. K. Schneitz für seine genetische Sichtweise der Dinge danken, die in neuen Anstößen für meine Arbeit resultierten. Außerdem dem kompletten Labor des Lehrstuhls der Entwicklungsbiologie für Pflanzen für die jahrelange, kollegiale Labor-Nachbarschaft.

Ein sehr großer Dank gilt dem SFB924 mit dem Sprecher Prof. Dr. C. Schwechheimer für die Finanzierung des Großteils meiner Arbeit sowie die zur Verfügung gestellten Finanzmittel für Labormaterialien und Kongresse. Darüber hinaus möchte ich mich für die einmalige Möglichkeit bedanken unkompliziert und effizient mit anderen Arbeitsgruppen des SFB924 sehr produktive Kollaborationen eingehen zu können.

Im Zuge derer möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Hüchelhoven für die einmalige Möglichkeit bedanken, dass ich meine Arbeit in das phytopathologische Wissenschaftsfeld ausdehnen konnte. Ich möchte mich bei Ihnen für die vielen sehr hilfreichen, offenen und vor allem Fürchte-bringenden Diskussionsrunden bedanken. Und natürlich für die gemeinsamen Publikationen. Herzlichsten Dank lieber Ralph!

Darüber hinaus möchte ich allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Phytopathologie für die offene, hilfreiche und zuvorkommende Art danken. Ganz besonders danke ich Caroline Höfle und Tina Reiner! Danke, dass Ihr mich mit „Mehltau-Versuchen“ vertraut gemacht habt und euch immer Zeit genommen habt für meine „Mehltau-Probleme“.

Auch gilt mein Dank den Regensburgern des SFB924. Ich möchte mich bei Prof. Dr. T. Dresselhaus und Dr. L. Zhou für die spannenden Ergebnisse und die hilfreichen Diskussionen für meine Arbeit bedanken. Ebenso möchte ich mich bei Dr. U. Hammes und seinem Doktoranden B. Müller für die bahnbrechende Immunlokalisierung bedanken! Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. E. Isono und M.-K. Nagel für die Einführung, Auswertung sowie Bereitstellung von Materialien der qRT-PCR bedanken.



Ebenso gilt ein sehr großer Dank Dr. G. Hierl, der mich zu Beginn meiner Arbeit sehr hilfsbereit in die Biologie der Pflanzen eingeführt hat. Danke lieber Georg, dass du Dir immer Zeit für meine Probleme genommen hast! Auch danke ich Dr. E. Dolze für die lebensmittelchemischen Abwechslungen im Laboralltag und das sehr nette Arbeitsklima im Büro sowie in unserem Labor! Euch beiden danke ich auch für die gute Musik und vor allem für unsere gemeinsame Leidenschaft: gutes Essen!

Besonders möchte ich meinem „Hiwi“ M. Dann Dank aussprechen: Herzlichsten Dank lieber Marcel für Deine jahrelange Unterstützung im Labor! Danke, dass Du Dir immer, auch spontan, Zeit für die Laborarbeiten genommen hast. Auch will ich Dir für zahlreiche anregende Diskussionen danken. Ich weiß das sehr zu schätzen, dass Du deutlich mehr geleistet hast als ein normaler „Hiwi“. Aus diesem Grund verleihe ich Dir offiziell den Titel: Bester „Hiwi“ aller Zeiten!

Bei C. Eltschig, C. Kornbauer und C. Heidersberger möchte ich mich ganz herzlich für die organisatorischen Tätigkeiten bedanken. Danke für euren steten Rat und für die vielen Sonderbestellungen.

C. Klaus, L. Held und M. Schmidt danke ich für Ihre unermüdlichen Anstrengungen die Pflanzen zu versorgen und immer einen Platz zu finden, dass man doch noch eben schnell was hinstellen kann.

Für die vielen Instandhaltungsarbeiten, Sonderanfertigungen und besonders für die netten Gespräche im Erdgeschoss danke ich Herrn J. Reischenbeck.

Ich möchte zudem B. Seeliger und U. Schubert für die zahllosen Ratschläge und Hilfestellungen in Verwaltungsangelegenheiten danken.

Ebenso möchte ich allen Doktoranden am Lehrstuhl Botanik für die vielen Ratschläge, aber auch für die Ablenkungen in Form von Getränken, Essen und Raucherpausen, die mir als überzeugter Nichtraucher als „Frischluff“ schnappen dienten, bedanken.

Explizit möchte ich mich für die andauernde Fußball-Fachsimpelei der Botanik-Tipprunde bedanken. Und wie wir alle wissen: Ich bin derjenige mit dem größten Fußball-Sachverstand!

Zum Ende möchte ich nochmals meinen größten Dank insbesondere meiner Freundin, all meinen Freunden und meiner Familie aussprechen.

Danke liebe Mama für die stete Unterstützung, fürs Korrekturlesen und dass Du mir immer den Rücken freihältst. Und Dein Fahrservice sucht seinesgleichen!

Auch vielen lieben Dank an Dich Heidi fürs ständige Korrekturlesen und vor allem dafür, dass Du es immer wieder geschafft hast mich auf andere Gedanken zu bringen.

Zuletzt möchte ich all meinen Freunden danken: Vielen Dank für eure Unterstützung vor allem in Word-technischen Problemen. Leider kann ich nicht alle einzeln aufzählen, aber sei Dir sicher, wenn Du diese Danksagung liest fühle Dich auf jeden Fall angesprochen!