

I.

**Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems
zur Identifizierung von Mutanten der
salizylsäureabhängigen Signaltransduktion**

II.

**Expression von tierischen Signaltransdukti-
onskomponenten in Tabak zur Herstellung eines
induzierbaren Expressionssystems**

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Wolfram Brenner
aus Volkmarsen

Göttingen, 2002

D7

Referent: Professorin Dr. Christiane Gatz
Korreferent: Professor Dr. Hans-Walter Heldt
Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juni 2002

Inhaltsverzeichnis

TEIL 1 ETABLIERUNG EINES INDUZIERBAREN SUIZIDSYSTEMS ZUR IDENTIFIZIERUNG VON MUTANTEN DER SALIZYLSÄUREABHÄNGIGEN SIGNALTRANSDUKTION.....	1
1.1 EINLEITUNG	1
1.1.1 Lokale und systemische Pathogenabwehr der Pflanze	1
1.1.2 Signaltransduktion der systemischen erworbenen Resistenz (SAR).....	4
1.1.2.1 Signaltransduktion des Salizylsäurestimulus	4
1.1.2.2 NPR1 als zentraler Regulator der SAR.....	5
1.1.3 Regulierung der salizylsäureinduzierten Genaktivierung.....	7
1.1.3.1 Das <i>as-1</i> -Element.....	7
1.1.3.2 Steuerung von Promotoren mit einem <i>as-1</i> -Element durch TGA-Transkriptionsfaktoren und interagierende Proteine	8
1.1.3.3 Zusammenfassung des derzeitigen Kenntnisstandes über salizylsäureabhängige Signaltransduktion zur Pathogenabwehr	13
1.1.4 Anwendung von dominant negativen Selektionssystemen.....	13
1.1.4 Anwendung von dominant negativen Selektionssystemen.....	14
1.1.4.1 Bekannte dominant negative Selektionssysteme in der Anwendung zur Suche nach Mutanten.....	14
1.1.4.2 Barnase	15
1.1.4.3 Deacetylase und N-Acetyl-Phosphinothricin	15
1.1.5 Über diese Arbeit.....	16
1.1.5.1 Zielsetzung	16
1.1.5.2 Experimentelle Ansätze	16
1.2 MATERIAL UND METHODEN	18
1.2.1 Pflanzen.....	18
1.2.2 Bakterienstämme, Kultur und Erhaltung	18
1.2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme	18
1.2.2.2 Kultur von <i>Escherichia coli</i>	19
1.2.2.3 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme.....	19
1.2.2.4 Kultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
1.2.2.5 <i>Pseudomonas syringae</i> -Stämme	19
1.2.2.6 Kultur von <i>Pseudomonas syringae</i>	20
1.2.2.7 Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen	20
1.2.3 Plasmide.....	21
1.2.4 Oligonukleotide.....	22
1.2.5 DNA-Sonden für Hybridisierungen.....	22
1.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> -Kulturen.....	22
1.2.6.1 Miniaturmaßstab	22
1.2.6.2 Midi- und Maximaßstab.....	23

1.2.7	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Kulturen.....	23
1.2.8	Quantifizierung von Nukleinsäuren	23
1.2.9	Lagerung von Nukleinsäuren	24
1.2.10	Sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA.....	24
1.2.11	Auffüllen von 3'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase.....	24
1.2.12	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
1.2.13	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	25
1.2.14	Visualisierung und Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA	26
1.2.15	Elution von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	26
1.2.16	Sequenzierung von DNA.....	27
1.2.17	Ligation von DNA-Fragmenten.....	28
1.2.18	Klonierung von PCR-Produkten	28
1.2.19	Blau-Weiß-Färbung zur Vorselektion auf rekombinante Plasmide	29
1.2.20	Transformation chemisch kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen.....	29
1.2.21	Transformation elektrokompeter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	30
1.2.22	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
1.2.22.1	Erdkultur	30
1.2.22.2	Sterilkultur.....	31
1.2.22.3	Netzplatten und Induktion der Genexpression in Sterilkultur	32
1.2.22.4	Oberflächensterilisation	32
1.2.23	Gewinnung von Samen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
1.2.24	Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
1.2.25	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Pseudomonas syringae</i>	34
1.2.26	Induktion der Genexpression von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Erdkultur.....	34
1.2.27	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
1.2.28	Mutagenese von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Samen.....	35
1.2.29	Histochemische Färbung zum Test auf β -Glucuronidaseaktivität.....	36
1.2.30	Quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase	37
1.2.31	Extraktion von DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
1.2.31.1	Prozedur für hochwertige DNA	38
1.2.31.2	Schnellextraktion von DNA für PCR-Zwecke	39
1.2.32	Extraktion von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
1.2.33	Expressionsstudien anhand des Nachweises spezifischer mRNA durch DNA-Fragmente	40
1.2.33.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	40
1.2.33.2	Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA auf Nylonmembran („Northern-Blot“).....	41
1.2.33.3	Herstellung radioaktiv markierter genspezifischer DNA-Sonden	41
1.2.33.4	Hybridisierung von Northern-Blots mit genspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden.....	42
1.2.33.5	Entfernung von Sonden aus hybridisierten Nylonmembranen („Strippen“).....	43
1.2.34	Reverse Transkription von RNA.....	43

1.2.35	Fotografische Dokumentation und Bildbearbeitung	43
1.2.36	Rechnergestützte Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen	44
1.3	ERGEBNISSE	45
1.3.1	Barnase als Suizidgen	45
1.3.1.1	Konstruktion eines binären Vektors mit einer RNase als Suizidgen unter der Kontrolle eines Promotors mit einem <i>as-1</i> -Element	45
1.3.2	Deacetylase als konditionelles Suizidgen unter der Kontrolle eines Promotors mit einem einzelnen <i>as-1</i> -Elements	46
1.3.2.1	Konstruktion eines binären Vektors mit der Deacetylase unter der Kontrolle eines Promotors mit einem einzelnen <i>as-1</i> -Elements	46
1.3.2.2	Phänotypische Charakterisierung der 1GuDe-Linien	47
1.3.2.3	Histochemische Färbungen der 1GuDe-Pflanzen	50
1.3.2.4	Quantitative Untersuchung der β -Glucuronidaseaktivität in 1GuDe-Linien	50
1.3.2.5	Erzeugung homozygoter transgener 1GuDe-Pflanzen	51
1.3.3	Deacetylase als konditionelles Suizidgen unter der Kontrolle von fünf <i>as-1</i> -Elementen	52
1.3.3.1	Konstruktion eines binären Vektors mit der Deacetylase unter der Kontrolle eines Promotors mit fünffach wiederholtem <i>as-1</i> -Element	52
1.3.3.2	Histochemische Färbungen der 5GuDe-Pflanzen	53
1.3.3.3	Erzeugung homozygoter transgener 5GuDe-Linien	54
1.3.3.4	Phänotypische Charakterisierung der homozygoten 5GuDe-Linien in Sterilkultur	55
1.3.3.5	Phänotypische Charakterisierung von 1GuDe- und 5GuDe-Linien auf Erde	57
1.3.3.6	Expressionsanalyse der 5GuDe-Linie #16-12 auf Erde	58
1.3.3.7	Vergleich der Hintergrundexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen	60
1.3.3.8	Expressionsanalyse der 5GuDe-Linie #16-12 in Sterilkultur	60
1.3.3.9	Kreuzung mit <i>npr1-1</i>	64
1.3.3.10	Kreuzung mit <i>npr1-2</i>	66
1.3.3.11	Weitere Kreuzungen	69
1.3.3.12	Mutagenese	69
1.3.3.13	Suche nach Mutanten in der Signaltransduktion der Salizylsäure	71
1.3.3.14	Phänotypische Beschreibung auffälliger Linien aus der Selektion mit der differentiellen Strategie	72
1.3.3.15	Verifizierung des Überlebens unter Selektionsbedingungen	73
1.3.3.16	Prüfung der Überlebenden auf das zweite Markergen β -Glucuronidase	78
1.3.3.17	Prüfung des Vorhandenseins der Deacetylase in ausgewählten ana-Linien	80
1.3.3.18	Auswahl von ana-Linien für die weitere Charakterisierung	81
1.3.3.19	Expressionsanalysen ausgewählter überlebender Linien	82
1.3.3.20	Zusammenfassung der Charakteristika der getesteten ana-Linien	84
1.3.3.21	Histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidase in ausgewählten überlebenden Linien	86
1.3.3.22	Infektion ausgewählter überlebender Linien mit <i>Pseudomonas syringae</i>	89
1.4	DISKUSSION	90
1.4.1	Expressionsstärke, Gewebsspezifität und Entwicklungsabhängigkeit des <i>as-1</i> -Elements im Unterschied zum <i>ocs</i> -Element	90

1.4.2	Induktion des <i>as-1</i> -Elements durch verschiedene Stimuli	94
1.4.3	Mutagenese und Suche nach Mutanten	95
1.4.4	Charakteristika der überlebenden Linien	96
1.4.5	NPR1 hat bei der salizylsäureinduzierten Induktion der frühen Abwehrgene keine entscheidende Bedeutung.....	99
1.4.6	Ausblick	102

TEIL 2 EXPRESSION VON TIERISCHEN

SIGNALTRANSDUKTIONSKOMPONENTEN IN TABAK ZUR KONSTRUKTION EINES INDUZIERBAREN EXPRESSIONSSYSTEMS. 103

2.1	EINLEITUNG	103
2.1.1	Induzierbare Expressionssysteme	103
2.1.2	Die Jak-Stat-Signaltransduktion in Tieren	104
2.1.2.1	Allgemeiner Mechanismus der Jak-Stat-Signaltransduktion	104
2.1.2.2	Erythropoietin.....	105
2.1.2.3	Der Erythropoietinrezeptor.....	106
2.1.2.4	Jak2	108
2.1.2.5	Stat5b	109
2.1.3	Modifizierte Jak-Stat-Signaltransduktionssysteme.....	110
2.1.4	Zielsetzung und experimenteller Ansatz	112
2.2	MATERIAL UND METHODEN	113
2.2.1	Pflanzen.....	113
2.2.2	Anzucht von <i>Nicotiana tabacum</i>	113
2.2.3	Oberflächensterilisation von Tabaksamen	113
2.2.4	Bakterienstämmen, Kultur und Erhaltung	114
2.2.4.1	<i>Escherichia coli</i> -Stämme	114
2.2.4.2	Kultur von <i>Escherichia coli</i>	114
2.2.4.3	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme.....	114
2.2.4.4	Kultur von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	114
2.2.4.5	Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen	114
2.2.5	Plasmide.....	115
2.2.6	Oligonukleotide.....	116
2.2.7	DNA-Sonden für Hybridisierungen.....	116
2.2.8	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> -Kulturen	117
2.2.8.1	Miniaturmaßstab	117
2.2.8.2	Midi- und Maximaßstab.....	117
2.2.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Kulturen.....	117
2.2.10	PEG-vermittelte Fällung von DNA.....	117
2.2.11	Quantifizierung von Nukleinsäuren	117
2.2.12	Lagerung von Nukleinsäuren	118
2.2.13	Sequenzspezifische Spaltungen von Plasmid-DNA.....	118

2.2.14	Auffüllen von 3'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase.....	118
2.2.15	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	118
2.2.16	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA.....	118
2.2.16.1	Auftrennung im Agarosegel.....	118
2.2.16.2	Auftrennung kleiner Fragmente im Polyacrylamidgel.....	118
2.2.17	Visualisierung und Dokumentation von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA.....	119
2.2.18	Elution von elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus Gelen.....	119
2.2.18.1	Agarosegele.....	119
2.2.18.2	Polyacrylamidgele.....	119
2.2.19	Sequenzierung von DNA.....	119
2.2.20	Ligation von DNA-Fragmenten.....	119
2.2.21	Multimerisierung kleiner DNA-Fragmente.....	119
2.2.22	Klonierung von PCR-Produkten.....	120
2.2.23	Blau-Weiß-Färbung zur Vorselektion auf rekombinante Plasmide.....	120
2.2.24	Transformation von chemisch kompetenten <i>Escherichia coli</i>	120
2.2.25	Transformation elektrokompetenter <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	120
2.2.26	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	120
2.2.27	Transiente Expressionsstudien.....	121
2.2.27.1	Transfektion von Protoplasten aus <i>Nicotiana tabacum</i> cv. Bright Yellow 2 (BY-2)-Zellkulturen mittels Elektroporation.....	122
2.2.27.2	Transfektion von Protoplasten aus Mesophyllgewebe von <i>Nicotiana tabacum</i> mittels Elektroporation.....	123
2.2.28	Kreuzung von <i>Nicotiana tabacum</i>	124
2.2.29	Induktion der Genexpression durch Erythropoietin.....	124
2.2.30	Histochemische Färbung zum Test auf β -Glucuronidaseaktivität.....	125
2.2.31	Quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase.....	125
2.2.32	Extraktion von Proteinen aus Blättern von <i>Nicotiana tabacum</i> unter denaturierenden Bedingungen.....	125
2.2.33	Extraktion von RNA aus Blättern von <i>Nicotiana tabacum</i>	125
2.2.34	Expressionsstudien anhand des spezifischen Nachweises von mRNA durch DNA-Fragmente.....	125
2.2.35	Expressionsstudien anhand des spezifischen Nachweises von Proteinen durch Antikörper.....	126
2.2.35.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen.....	126
2.2.35.2	Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf proteinbindende Membranen.....	127
2.2.35.3	Spezifische Detektion von Proteinen auf proteinbindenden Membranen mit Hilfe von Antikörpern.....	128
2.2.35.4	Färbung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen im Polyacrylamidgel.....	129
2.2.35.5	Färbung von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen.....	129
2.2.35.6	Entfernung von Antikörpern auf proteinbindenden Membranen.....	129

2.2.36	Fotografische Dokumentation und Bildbearbeitung	130
2.2.37	Rechnergestützte Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen	130
2.3	ERGEBNISSE	131
2.3.1	BLAST-Suche nach Jak2- und Stat5b-homologen Genen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	131
2.3.2	Transiente Expressionsstudien zur Funktionalität der Jak-Stat-Signaltransduktion im pflanzlichen System	131
2.3.3	Strategie zur Etablierung der Jak-Stat-Signaltransduktionskette in <i>Nicotiana tabacum</i>	135
2.3.4	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> mit einem 35S-Stat5b*VP16-Konstrukt und dem 6×GAS-GUS-Reporter	137
2.3.5	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> 6GGS mit einem 35S-Jak2-Konstrukt	139
2.3.6	Transiente Expressionsstudien zur Verbesserung der Expression von mJak2	141
2.3.6.1	Ergebnisse zur Stabilität und Funktionalität der verbesserten Jak2-Konstrukte	142
2.3.7	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> 6GGS mit einem verbesserten 35S-Jak2-Konstrukt	145
2.3.8	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> mit dem Erythropoietinrezeptor	148
2.3.9	Kreuzung der 6GGS-Jak2t-Pflanzen mit den EpoR-Pflanzen	149
2.3.10	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> mit einem verbesserten Konstrukt von 35S-Stat5b*VP16 und dem 6×GAS-GUS-Reporter	151
2.3.11	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> 6GGSdT mit dem verbesserten 35S-Jak2-Konstrukt	155
2.4	DISKUSSION	156
2.4.1	Einige der Voraussetzungen für die Etablierung der Jak-Stat-Signaltransduktion in Pflanzen sind gegeben	156
2.4.2	Die Wirkung ocs-Polyadenylierungssignals im synthetischen Stat5b-Gen ist ungenügend	157
2.4.3	Die mRNA von Jak2 wird in Pflanzen spezifisch abgebaut: Lösungsstrategien	158
2.4.4	Ausblick	161
	ZUSAMMENFASSUNG DES TEILS I („MUTAGENESE“)	163
	ZUSAMMENFASSUNG DES TEILS II („JAK-STAT“)	164
	TEIL 3 ALLGEMEINES	165
3.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	165
3.2	LITERATURVERZEICHNIS	168
3.3	ANHANG	188
3.4	DANKSAGUNG	190
3.5	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	191
3.6	ERKLÄRUNG	192
3.7	LEBENS LAUF	193

Teil 1 Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion

1.1 Einleitung

1.1.1 Lokale und systemische Pathogenabwehr der Pflanze

Pflanzen sind wie alle Lebewesen in ihrer Umwelt einer Vielzahl von Organismen ausgesetzt, die ernste Schäden verursachen oder tödlich wirken können. Dazu zählen neben Fraßfeinden vor allem bakterielle und virale Pathogene sowie Pilze. Um dem Angriff eines Pathogens Widerstand leisten zu können, haben Pflanzen eine Vielzahl von physikalischen, chemischen und physiologischen Barrieren und Abwehrmechanismen entwickelt.

Auf Seite der Pathogene unterscheidet man zwischen virulenten und avirulenten Pathogenen. Avirulente Pathogene werden vom pflanzlichen Organismus effizient erkannt. Daraufhin werden Abwehrmechanismen aktiviert und der Pathogenbefall erfolgreich abgewehrt, so daß es nicht zur Ausbildung eines Krankheitsbildes kommt, das die ganze Pflanze erfaßt: Pflanze und Pathogen sind inkompatibel. Virulente Pathogene werden hingegen nur uneffizient von der Pflanze erkannt und die Abwehr findet entweder stark verzögert oder gar nicht statt. Dies hat zur Folge, daß sich ein Pathogen in der Pflanze ausbreiten kann und sich ein Krankheitsbild ausprägt, das bis zum Tod der Pflanze führen kann: Pflanze und Pathogen sind kompatibel.

Viele der physiologischen Abwehrmechanismen sind nicht dauerhaft aktiv, sondern werden vom pflanzlichen Organismus erst zu Beginn eines Pathogenbefalls aktiviert. Die Erkennung eines avirulenten Pathogens wird durch ein spezifisches Resistenzprotein der Pflanze vermittelt, das ein Signal von einem Avirulenzprotein des Pathogens registriert (Gen-für-Gen-Modell, Abbildung 1; Flor, 1955; van der Biezen und Jones, 1998). Nach dem Gen-für-Gen-Modell liegt eine große Zahl individueller Resistenzgene vor, von denen jedes für die Erkennung eines bestimmten Avirulenz-

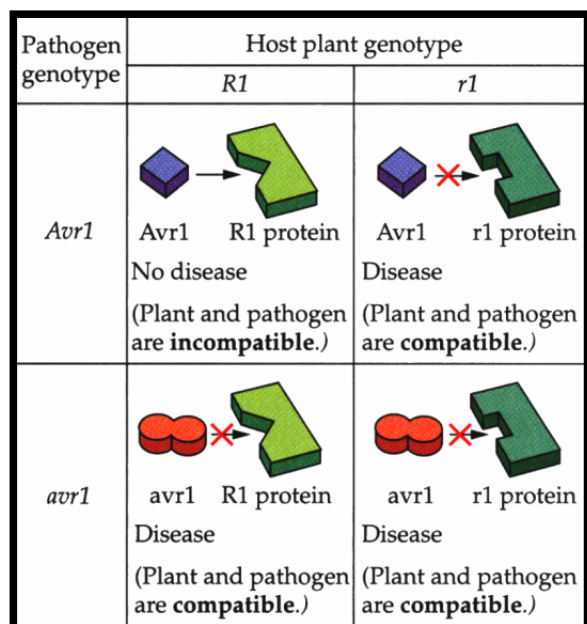


Abbildung 1: Gen-für-Gen-Modell der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion von Pflanze und Pathogen

aus Buchanan *et al.* (2000)

faktors aus einem Pathogen verantwortlich ist. Ein gut charakterisiertes Beispiel ist die spezifische Erkennung der Replikase des Tabakmosaikvirus durch das Genprodukt des N-Gens (Baker *et al.*, 1996; Dinesh-Kumar und Baker, 2000). Die große Mehrheit der Resistenzproteine besitzt konservierte Domänen: Eine Nukleotid-Bindestelle (*nucleotide binding site*, NBS), eine Region mit wiederholten leucinreichen Motiven (*leucine rich repeats*, LRR) und entweder eine Doppelwendelstruktur (*coiled coil*, CC) oder eine Toll/Interleukinrezeptordomäne (TIR-Domäne). Sie werden daher als CC-NBS-LRR- beziehungsweise TIR-NBS-LRR-Resistenzproteine klassifiziert. In ihrer Struktur ähneln diese Proteine den Interleukinrezeptoren der Säugetiere und dem Spätzle-Rezeptor Toll aus *Drosophila melanogaster*, nach deren Aktivierung Abwehrgene induziert werden (Cohn *et al.*, 2001). Möglicherweise können aus einem Vergleich zwischen tierischem und pflanzlichem System generelle Mechanismen der Pathogenabwehr geleitet werden.

Nach der Erkennung eines Pathogens werden direkt an der Infektionsstelle Abwehrmechanismen aktiviert. Diesen sehr schnellen Prozeß nennt man hypersensitive Antwort (*hypersensitive response*, HR; Flor, 1971; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Keen, 1992; Lamb, 1994; Lamb *et al.*, 1989; Staskawicz *et al.*, 1995). Die HR setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen: Bildung hoher Konzentrationen reaktiver Sauerstoffverbindungen (*oxidative burst*; Sutherland, 1991; Baker und Orlandi, 1995; Rossetti und Bonatti, 2001), Synthese von Phytoalexinen, Expression von Schutzproteinen wie Glutathion-S-Transferasen und programmierter Zelltod an der Infektionsstelle. Die Ausprägung einer HR ist gut anhand der Bildung von Läsionen an den Infektionsstellen zu erkennen (Abbildung 2).



Abbildung 2: Ausbildung von Läsionen im Rahmen einer HR nach Infektion eines Tabakblattes mit dem Tabakmosaikvirus

Gleichzeitig mit der Auslösung der HR wird die Etablierung eines molekularen Schutzschildes im gesamten pflanzlichen Organismus angeregt, der sich binnen weniger Tage bis Wochen ausprägt und gegen eine Vielzahl von Pathogenen gerichtet ist. Zwei Abwehrmechanismen sind bisher charakterisiert worden: Die jasmonsäureabhängige induzierte systemische Resistenz (*induced systemic resistance*, ISR; Pieterse *et al.*, 1998; Pieterse und van Loon, 1999), auf die im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande eingegangen wird, und die sali-

zylsäureabhängige systemische erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR; Ross und Bozarth, 1960; Ross, 1961; Kuc, 1982; Ryals *et al.*, 1996), die im Folgenden detailliert beschrieben werden soll.

Das Phänomen, daß Pflanzen nach einer erstmaligen Pathogeninfektion eine Resistenz ausbilden und bei einer zweiten Infektion weniger schwere Symptome zeigen, wurde von Ross (1961) als systemisch erworbene Resistenz bezeichnet, nachdem ähnliche Phänomene erstmals bereits 1911 (Smith *et al.*, 1911) und danach 1933 und 1952 wieder beschrieben worden waren (Chester, 1933; Gilpatrick und Weintraub, 1952). Ross (1961) beschrieb, daß sich sieben Tage nach einer Erstinfektion eines resistenten Tabakkultivars

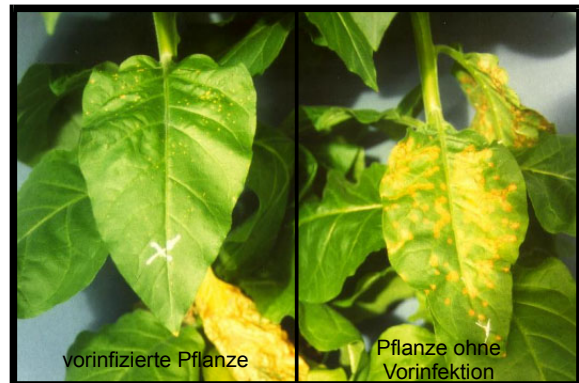


Abbildung 3: Vergleich der Symptome von Pflanzen mit und ohne SAR nach einer Infektion mit dem Tabakmosaikvirus

Die links abgebildete Pflanze hat eine SAR etabliert, die rechte hingegen nicht.

mit dem Tabakmosaikvirus eine Resistenz ausgebildet hatte, die bewirkte, daß bei einer zweiten Infektion keine Läsionen mehr auftraten (eine Wiederholung dieses Experiments ist in Abbildung 3 dargestellt). Diese Resistenz war auch gegen andere Viren wirksam.

Die Etablierung der SAR wird durch einen Anstieg der Salizylsäurekonzentration im pflanzlichen Gewebe eingeleitet und kann auch experimentell durch Applikation von Salizylsäure induziert werden: Allein eine erhöhte Salizylsäurekonzentration ist ausreichend und notwendig, um die SAR auszulösen (White, 1979; Klessig und Malamy, 1994; Verbene *et al.*, 2000; Mauch *et al.*, 2001). Die Manifestation der SAR in der Pflanze läßt sich anhand der Expression charakteristischer Gene, wie *PR-1* oder *BGL2* nachweisen, deren Funktion im folgenden Absatz erklärt wird. Hat sich die SAR manifestiert, so hält der resistente Zustand mindestens über einige Wochen an.

Die im Verlaufe der SAR induzierten Gene sind verschiedener Natur. Für das *PR-1*-Protein wurde nachgewiesen, daß es eine biologische Aktivität gegen Pilzwachstum besitzt (Alexander *et al.*, 1993; Rauscher *et al.*, 1999), so daß durch die Anwesenheit dieses Proteins bereits das Wachstum von potentiellen Pathogenen gehemmt wird. *BGL2*, auch als *PR-2* bekannt, codiert für eine β -Glucanase. Weitere Proteine sind Chitinasen und sekretierte Proteasen. Diese Enzyme haben die Funktion, Zellwände von Bakterien und Pilzen zu schädigen. Signaltransduktionskomponenten verschiedener Klassen werden ebenfalls verstärkt exprimiert. Dazu gehören Rezeptorkinasen (Ohtake *et al.*, 2000), Lipoxigenasen, Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen, Proteinphosphatasen, Ubiquitin und assoziierte Proteine, MAP-Kinasen, leucinreiche Proteine (LRR) und 14-3-3-Proteine (Schenk *et al.*, 2000b). Die erhöhte Expression von Signaltransduktionskomponenten während der SAR dient wahr-

scheinlich dazu, Pathogensignale schneller und stärker zu vermitteln, da Reaktionszeit und Intensität der Reaktion entscheidende Parameter sind, die über Erfolg oder Mißerfolg der Pathogenabwehr bestimmen. Letztendlich konnte auch die Aktivierung von Schutzproteinen wie ABC-Transportern, DNA-Reparaturproteinen, Superoxid-Dismutasen oder den bereits erwähnten Glutathion-S-Transferasen nachgewiesen werden (Maleck *et al.*, 2000; Schenk *et al.*, 2000b; Schenk *et al.*, 2000a). Glutathion-S-Transferasen dienen wahrscheinlich dem Überleben der Zellen während der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies während der HR nach einer Infektion.

1.1.2 Signaltransduktion der systemischen erworbenen Resistenz (SAR)

Salizylsäure wird allgemein als das von einer Infektionsstelle ausgehende Signal zur Etablierung der SAR angesehen (Malamy *et al.*, 1990; Métraux *et al.*, 1990) und ist zwingend dafür erforderlich (Gaffney *et al.*, 1993). Nach einer Infektion von Tabakblättern mit dem Tabakmosaikvirus steigt die Salizylsäurekonzentration in der gesamten Pflanze auf etwa das zehnfache des Ursprungswertes an. Damit es zum Anstieg der Salizylsäurekonzentration im Gewebe kommen kann, müssen eine Reihe von Signaltransduktionskomponenten aktiv werden, die an dieser Stelle nicht detailliert besprochen werden sollen (Übersichtsartikel von Glazebrook, 1999; Klessig *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001; Zhang und Klessig, 2001).

1.1.2.1 Signaltransduktion des Salizylsäurestimulus

Von der zellulären Perzeption des Salizylsäuresignals bis zur Manifestierung der SAR durch die Synthese eines Satzes charakteristischer Schutzproteine muß das Signal prozessiert und an eine Anzahl von Promotoren vermittelt werden. Der Beginn der von der Salizylsäure ausgehenden zellulären Signaltransduktion ist unklar. Obwohl mehrere Proteine gefunden wurden, die Salizylsäure binden (Chen und Klessig, 1991; Du und Klessig, 1997), konnte keines dieser als SABP bezeichneten Proteine bisher zweifelsfrei als Salizylsäurerezeptor identifiziert werden. Funktionelle Analoga der Salizylsäure wie Benzothiadiazol und 2,6-Dichloroisonicotinsäure, die auch eine SAR auslösen können, binden ebenfalls an die SABPs (Conrath *et al.*, 1995; Durner und Klessig, 1996; Wendehenne *et al.*, 1998). Für weitere funktionelle Analoga wie β -Aminobuttersäure, Acetylsalicylsäure oder Thiouracil, die ebenfalls eine SAR auslösen, wurde die Bindung an SABP bislang nicht nachgewiesen (Holmes, 1955; White, 1979; Zimmerli *et al.*, 2001). Alternativ zur Bindung von Salizylsäure an einen Rezeptor wird auch die Bildung von freien Salizylsäureradikalen als Auslöser der folgenden Signaltransduktionsereignisse diskutiert (z. B. in Dempsey *et al.*, 1999).

Eine der frühesten molekularen Antworten auf ein Salizylsäuresignal, die bisher nachgewiesen werden konnten, ist die Aktivierung einer ungewöhnlichen, 48 kDa großen MAP-

Kinase in Tabak, der SIP-Kinase (Zhang und Klessig, 1997). Diese Kinase ist auch durch Behandlung mit Elicitoren (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999), durch Verwundung (Zhang und Klessig, 1998) und durch Stickstoffmonoxid aktivierbar (Kumar und Klessig, 2000). In *Arabidopsis* sind die MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 funktionell analog zur SIPK in Tabak (Tena *et al.*, 2001). Die Tatsache, daß derart verschiedene Stimuli die Aktivierung der selben Kinasen bewirken, aber dennoch verschiedene physiologische Antworten der Pflanze auslösen, läßt vermuten, daß die Signaltransduktion der SAR in ein äußerst komplexes Netzwerk von streßabhängigen Signaltransduktionswegen eingebunden ist, die zum Teil über die gleichen Signaltransduktionskomponenten laufen. Auf diese Weise könnte auch eine Kommunikation zwischen Signaltransduktionswegen zur Abstimmung verschiedener physiologischer Antworten auf unterschiedliche Stimuli stattfinden. Die Aktivität einer Kinase in Tabak mit einem Molekulargewicht von 47 kDa, die nach Behandlung mit einem Elicitor an Tyrosinresten phosphoryliert wird, ist abhängig von Calcium-Ionenströmen (Suzuki und Shinsi, 1995). Möglicherweise handelt es sich bei diesem Protein um die von Zhang und Klessig (1997) identifizierte SIP-Kinase.

In *Arabidopsis* wurde an einer weiteren MAP-Kinase, MPK4, gezeigt, daß sie sowohl die SAR als auch die ISR beeinflusst (Peterson *et al.*, 2000). Dabei ist die Aktivierung von MPK4 für die Expression der jasmonsäureabhängigen Abwehrgene notwendig. Gleichzeitig bewirkt ihre Aktivität eine Repression des salizylsäureabhängigen Signaltransduktionswegs zur Induktion der SAR. MPK4 stellt also einen Verknüpfungspunkt zwischen zwei Signaltransduktionswegen dar, die als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli zu einer differenzierten physiologischen Antwort des pflanzlichen Organismus führen. Die jüngsten Interpretationen zur Funktion von MPK4 vermuten diese Komponente in der Signaltransduktion eher oberhalb von Salizylsäure, da *mpk4*-Mutanten durch hohe Salizylsäurekonzentrationen und konstitutive Expression von *PR*-Genen charakterisiert sind (Glazebrook, 2001). Als Regulatoren von MPK4 werden die Kinasen MEKK1 und MEK1 angenommen (Zhang und Klessig, 2001).

Conrath *et al.* (1997) konnten mit Hilfe von Hemmstoffen gegen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen zeigen, daß auch die Dephosphorylierung von Serin- oder Threoninresten an der Signaltransduktion zur salizylsäureinduzierten Expression von *PR-1* beteiligt ist; über die Epistase dieser Dephosphorylierungsereignisse bezüglich der weiteren Signaltransduktionskomponenten ist jedoch nichts bekannt.

1.1.2.2 NPR1 als zentraler Regulator der SAR

Für die Etablierung der SAR in *Arabidopsis thaliana* ist das NPR1-Protein von entscheidender Bedeutung. In mehreren Forschungsgruppen wurden durch verschiedene Ansätze bisher 12 allelische *npr1*-Mutanten (*nonexpressor of PR genes*, ursprünglich such als *nim1*, *non immunity* oder *sai1*, *salicylic acid insensitivity* bezeichnet) identifiziert, die nach Infektion mit Pathogenen oder Induktion durch Salizylsäure die Transkription von *PR*-Genen

nur noch in sehr geringem Maße aktivieren, und auch keine SAR etablieren können (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). Wird hingegen NPR1 überexprimiert, so entwickeln solche Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen (Cao *et al.*, 1998). Dabei ist die erhöhte Resistenz nicht auf eine konstitutive Expression, sondern auf eine schnellere und verstärkte Aktivierung der PR-Gene nach Pathogeninfektion oder einem Salizylsäurestimulus zurückzuführen.

Cao *et al.* (1997) und Ryals *et al.* (1997) konnten nach der Klonierung des *NPR1*-Gens die strukturellen Charakteristika des NPR1-Proteins beschreiben. NPR1 enthält demnach zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen: Eine BTB/POZ-Domäne (*broad complex*, *tram-track*, *bric-à-brac* / *poxyvirus zinc finger*) und eine Region mit vier Ankyrinmotiven. Sequenzvergleiche ergaben, daß es in Teilen eine signifikante Homologie zu I κ B α aufweist. Nach Untersuchungen in Säugetieren und Insekten bewirken Proteine der I κ B-Familie eine Retention des Transkriptionsfaktors NF κ B im Cytoplasma. Nach einem Pathogensignal wird I κ B ubiquitiniert und durch das Proteasom abgebaut, so daß der Transkriptionsfaktor NF κ B freigesetzt wird und in den Zellkern gelangt wo er Genexpression induziert. Dieser Mechanismus ist in Säugetieren und *Drosophila* an der Signaltransduktion im Rahmen der Pathogenabwehr beteiligt. Insofern kann es sich bei NPR1 um eine archaische Signaltransduktionskomponente zur Abwehr von Pathogenen handeln. Im Gegensatz zu I κ B wirkt NPR1 jedoch als positiver Regulator, sodaß trotz der strukturellen Homologie von NPR1 und I κ B α die Wirkungsmechanismen der beiden Proteine offensichtlich unterschiedlich sind. Dies zeigt sich auch darin, daß im Gegensatz zu I κ B im tierischen System ein Abbau von NPR1 nach Pathogeninfektion in Pflanzen nicht stattfindet. Statt dessen konnten Kinkema *et al.* (2000) mit Hilfe eines GFP-NPR1-Fusionsproteins nachweisen, daß sich die Verteilung von NPR1 in der Zelle nach Induktion durch Salizylsäure oder nach Infektion mit Pathogenen von einer mehr oder weniger ubiquitären Verteilung zu einer strikten Kernlokalisierung ändert und daß die Kernlokalisierung essentiell für die Aktivierung von *PR-1* ist.

Aufgrund verschiedener Befunde an den Mutanten *cpr5* und *cpr6* (*constitutive expressor of PR genes*), die eine konstitutive Expression von *PR*-Genen aufweisen (Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998), sowie von Expressionsstudien (Rairdan *et al.*, 2001) wird postuliert, daß ein weiterer, NPR1-unabhängiger Zweig der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion existiert, der allerdings von geringerer Bedeutung für die Pathogenabwehr und die SAR ist (Thomma *et al.*, 2001b).

Ein weiteres Gen, dessen Produkt in der Signaltransduktion nach der Salizylsäure und anscheinend unabhängig von NPR1 wirkt, ist *DTH9* (*detachment*). *dth9*-Mutanten sind zwar noch immer in der Lage, PR-Proteine zu exprimieren; andererseits sind sie aber gegen *Pero­nospora parasitica* NOCO weniger resistent als Pflanzen des Wildtyps (Mayda *et al.*,

2000). Weitere Charakteristika von *dth9* sind bisher nicht publiziert worden; auch ist noch unbekannt, welche Gene durch DTH9 gesteuert werden (Glazebrook, 2001).

1.1.3 Regulierung der salizylsäureinduzierten Genaktivierung

1.1.3.1 Das *as-1*-Element

Das *as-1*-Element ist ein wichtiges *cis*-Element in den Promotoren salizylsäureaktivierter Gene. Ein Minimalpromotor mit dem *as-1*-Element als alleinigem *cis*-Element vermittelt in Tabak eine schwache Expression von Reportergenen in Wurzelspitzen und Sproßspitzen (Benfey und Chua, 1990). Zudem ist ein solcher Promotor in der Lage die Transkription auf einen Salizylsäurestimulus hin transient zu stimulieren: Innerhalb von 1 – 3 h wird die Transkription zu einem Maximum gesteigert (Xiang *et al.*, 1996) und im Verlauf von 24 h wieder auf den ursprünglichen Wert zurückgeführt (Qin *et al.*, 1994). Weiterhin findet eine durch das *as-1*-Element vermittelte Transkriptionsaktivierung nach Induktion mit Auxin statt, die im Gegensatz zur Induktion mit Salizylsäure auch nach 24 h noch anhält (Liu und Lam, 1994; Qin *et al.*, 1994; Zhang und Singh, 1994).

Das *as-1*-Element (Abbildung 4) wurde erstmals in der –90-Region des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus' identifiziert (Lam *et al.*, 1989) und kommt in ähnlicher Form auch in den Promotoren von Octopinsynthase, Mannopinsynthase und Nopalinsynthase von *Agrobacterium tumefaciens* vor (Bouchez *et al.*, 1989; Lam *et al.*, 1990; Feltkamp *et al.*, 1994).

Das *as-1*-Element besteht aus zwei imperfekten Palindromen, die von der Konsenssequenz TGACGTCA abgeleitet sind. In den meisten *as-1*-ähnlichen Elementen ist der Abstand zwischen den beiden Palindromen mit 12 Basenpaaren — gemessen von Zentrum zu Zentrum — konserviert.



Abbildung 4: Das *as-1*-Element

Die zwei von der Sequenz TGACGTCA abgeleiteten imperfekten Palindrome sind farblich hervorgehoben. Die Zentren der Palindrome sind durch gelbe Linien gekennzeichnet

In Pflanzen wurden *as-1*-ähnliche Elemente in Promotoren von Genen gefunden, die mit der Pathogenabwehr in Zusammenhang stehen. So befinden sich solche Elemente in den Promotoren der Glutathion-S-Transferasegene *GST-1* (Yang *et al.*, 1998) und *GST-6* (Chen *et al.*, 1996; Chen und Singh, 1999) aus *Arabidopsis thaliana*. In Tabak findet man in den Promotoren der Glutathion-S-Transferasegene *GNT35 / Nt103* (van der Zaal *et al.*, 1987) und *parA / Nt114* (van der Zaal *et al.*, 1987; Takahashi *et al.*, 1989), sowie des Glucosyltransferasegens *IEGT* (Horvath und Chua, 1996). Auch der *PR-1a*-Promotor von Tabak besitzt ein für die Expression wichtiges *as-1*-ähnliches Element (Strompen *et al.*, 1998).

Obwohl das *as-1*-Element für die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften aller genannten Promotoren wichtig ist, unterscheiden sich die Aktivitätsmuster der Promotoren von *GNT35*, *IEGT* und *parA* einerseits und der *PR*-Promotoren andererseits bezüglich ihrer Kinetik nach Induktion durch Salizylsäure grundlegend. Die Promotoren von *GNT35*, *IEGT* und *parA* verhalten sich in ihrer Aktivität nach einem Salizylsäurestimulus ähnlich wie ein Minimalpromotor mit einem einzelnen *as-1*-Element (Niggeweg *et al.*, 2000a), und ihre Aktivierung ist unabhängig von einer Neusynthese von Proteinen; *GNT35*, *IEGT* und *parA* fallen daher in die Klasse der frühen Abwehrgene (*immediate early genes*). Das isolierte *as-1*-Element kann also als Modellsystem für die salizylsäureinduzierte Aktivitätssteigerung der frühen Abwehrgene verwendet werden.

Die in ihrer Struktur komplexeren *PR*-Promotoren hingegen werden sehr viel später im Zeitverlauf der Induktion aktiviert und benötigen dafür eine funktionierende Proteinbiosynthese (Uknes *et al.*, 1993; Qin *et al.*, 1994); die *PR*-Gene werden daher in der Klasse der späten Abwehrgene (*late genes*) zusammengefaßt. Bemerkenswerterweise weicht der Abstand zwischen den Palindromen der *as-1*-ähnlichen Elemente in den Promotoren der *PR*-Gene von der konservierten Distanz von 12 bp ab. Im Promotor von *PR-1a* in Tabak ist der Abstand auf 14 bp erweitert, im Promotor von *PR-1* in Arabidopsis auf 17 bp.

1.1.3.2 Steuerung von Promotoren mit einem *as-1*-Element durch TGA-Transkriptionsfaktoren und interagierende Proteine

Die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften des *as-1*-Elements wird durch einen Proteinkomplex vermittelt, der als ASF-1 (activating sequence factor 1) oder SARP (salicylic acid response protein) bezeichnet wird (Lam *et al.*, 1989; Jupin und Chua, 1996). Die Tatsache, daß diese Proteinkomplexe nach Induktion mit Salizylsäure *in vitro* stärker an DNA binden, legt nahe, daß sie an der Steigerung der Transkription durch das *as-1*-Element beteiligt sind (Jupin und Chua, 1996; Stange *et al.*, 1997). Des weiteren korreliert die verstärkte *in vitro*-Bindefähigkeit von ASF-1 an ein optimiertes *as-1*-Element mit zwei perfekten Palindromen mit dessen erhöhter Salizylsäureinduzierbarkeit *in vivo* (Qin *et al.*, 1994); umgekehrt korreliert die verminderte Bindefähigkeit von ASF-1 an ein mutiertes *as-1*-Element mit dessen verminderter Transkriptionsaktivierung (Lam *et al.*, 1989). Bemerkenswert ist, daß die Bindefähigkeit des ASF-1-Komplexes an das *as-1*-Element durch Phosphorylierung von Kernproteinen gesteigert und durch Dephosphorylierung gesenkt werden kann (Stange *et al.*, 1997). Unter Einfluß von Detergenzien oder Formamid konnte *in vitro* ebenfalls eine Bindeverstärkung beobachtet werden, woraus geschlossen wurde, daß dissoziierbare Faktoren inhibitorisch auf DNA-Bindung des ASF-1-Komplexes wirken (Jupin und Chua, 1996).

Die DNA-bindenden Proteine, die den ASF-1-Komplex bilden, sind Transkriptionsfaktoren der TGA-Familie, von denen ein Repräsentant in Abbildung 5 schematisch dargestellt ist.

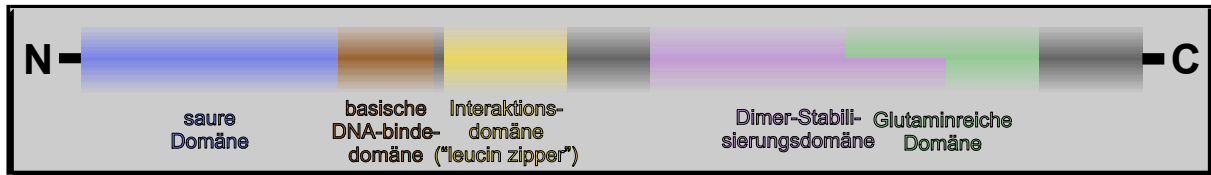


Abbildung 5: Schematische Darstellung des bZIP-Transkriptionsfaktors TGA1a

Diese Transkriptionsfaktoren zeichnen sich durch eine für die Bindung an DNA notwendige basische Domäne und eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne mit Leucionresten an jeder siebten Position (*leucin zipper*, Landschulz *et al.*, 1988) aus und werden daher auch als bZIP-Faktoren bezeichnet. Neben diesen beiden Domänen können die verschiedenen Mitglieder der Gruppe unterschiedliche Domänen, wie saure oder glutaminreiche Transkriptionsaktivierungsdomänen (Neuhaus *et al.*, 1994; Pascuzzi *et al.*, 1998) oder weitere Dimer-Stabilisierungsdomänen (Katagiri *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 2001) besitzen.

Die bislang identifizierten TGA-Faktoren lassen sich aufgrund ihrer Homologie in Klassen einteilen. Im Blattgewebe von Tabak finden sich praktisch ausschließlich TGA-Faktoren der Klasse II im ASF-1-Komplex (Niggeweg, 1999; Klinedinst *et al.*, 2000), wobei TGA2.2 den Hauptanteil ausmacht (Niggeweg *et al.*, 2000a). Im heterologen Hefesystem wurde festgestellt, daß TGA2.2 kein eigenes Aktivierungspotential besitzt, sehr wohl aber TGA2.1 (Niggeweg *et al.*, 2000b). In *Arabidopsis thaliana* ist der ebenfalls zur Klasse II gehörende Transkriptionsfaktor TGA2 zu 50% im ASF-1-Komplex vertreten (Lam und Lam, 1995), die weiteren Bestandteile wurden bislang noch nicht identifiziert.

Jedes der beiden TGACG-Motive im *as-1*-Element kann von einem TGA-Dimer besetzt werden. TGA1a, TGA2.1 und TGA2.2 können *in vitro* jede Kombination an denkbaren Hetero- und Homodimeren einnehmen (Abbildung 6). Jedes der beiden TGACG-Motive kann wiederum von allen verschiedenen Hetero- oder Homodimeren besetzt werden (Niggeweg *et al.*, 2000b), wobei die Besetzung mit lediglich einem TGA2.1-Homodimer ausgeschlossen ist (Niggeweg *et al.*, 2000b). Deleti-

Tabelle 1: Klassifizierung von TGA-Faktoren aufgrund ihrer Homologie

Klasse	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
I	TGA1 TGA4	TGA1a PG13
II	TGA2 TGA5 TGA6	TGA2.1 TGA2.2
III	TGA3	
IV		TGA7

(Niggeweg und Gatz, 1997; Xiang *et al.*, 1997; Schiermeyer, 2001)

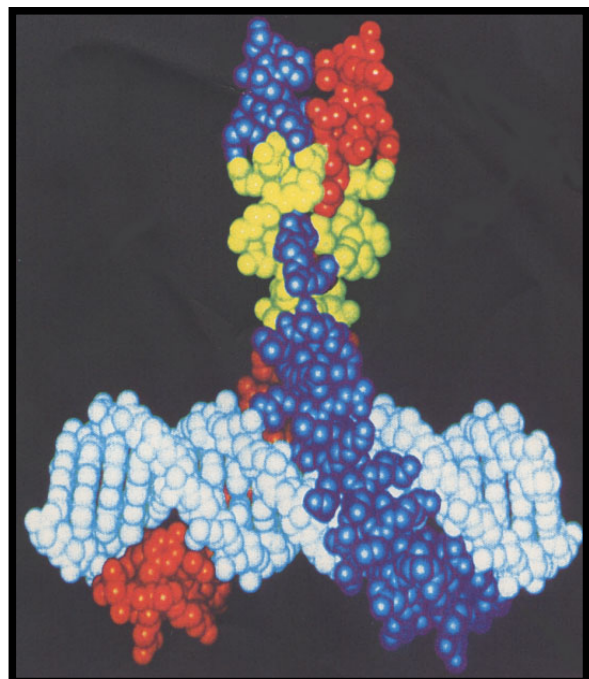


Abbildung 6: Ein Dimer von bZIP-Transkriptionsfaktoren bindet an DNA

onsanalysen zeigten, daß der N-Terminus von TGA2.1 für die obligatorische Doppelbesetzung verantwortlich ist.

Bei der Bindung der TGA-Faktoren an das *as-1*-Element ist der korrekte Abstand von 12 bp zwischen den Zentren der beiden Palindrome entscheidend für die Bindung der TGA-Faktoren an die TGACG-Motive und die Transkriptionsaktivierung (Krawczyk *et al.*, 2002). Inwiefern der auf 14 bp (*PR-1a*, Tabak) beziehungsweise 17 bp (*PR-1*, *Arabidopsis*) vergrößerte Abstand zwischen den TGACG-Motiven in den PR-Promotoren für deren besondere regulatorische Eigenschaften verantwortlich ist, wurde noch nicht abschließend geklärt.

Die Bedeutung der Besetzung des *as-1*-Elements durch TGA-Faktoren der Klasse II für die transkriptionsaktivierenden Eigenschaften konnte durch Überexpressions- und Suppressionsstudien in *Nicotiana tabacum* gezeigt werden. Bei Überexpression von TGA2.2 und TGA2.1 findet eine verstärkte Expression der frühen Abwehrgene statt (Niggeweg *et al.*, 2000b; Kegler, 2001). Wird hingegen eine mutierte Form von TGA2.2 verwandt, die die endogenen funktionellen TGA-Faktoren an der DNA-Bindung hindert, so ist die Expression der frühen wie der späten Abwehrgene deutlich reduziert (Niggeweg *et al.*, 2000a). Bei Expression eines entsprechend mutierten TGA2.1-Derivats konnte der supprimierende Effekt lediglich bei den frühen Abwehrgenen, nicht jedoch bei *PR-1a* nachgewiesen werden (Kegler, 2001). Die Ergebnisse von Pontier *et al.* (2001) stehen zum Teil im Gegensatz zu den oben beschriebenen. In dieser Studie wurde gezeigt, daß die transdominante Suppression von TGA-Faktoren in Tabak mit einer mutierten Form von TGA2 aus *Arabidopsis thaliana* zwar die Expression der frühen Gene vermindert, die Expression der späten Gene jedoch verstärkt. Die Autoren formulieren ein Modell, bei dem aktivierende und reprimierende TGA-Faktoren postuliert werden.

TGA-Faktoren der Klasse II interagieren mit NPR1. Dies konnte in Zwei-Hybrid-Versuchen in Hefe sowohl für die Transkriptionsfaktoren TGA2.1 und TGA2.2 aus Tabak (Niggeweg *et al.*, 2000b) als auch für die Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 aus *Arabidopsis thaliana* (Zhou *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Des Weiteren interagiert der zur Klasse III gehörende Faktor TGA3 sehr stark und der zur Klasse I gehörende Faktor TGA1 sehr schwach mit NPR1. Zwischen NPR1 und den ebenfalls zur Klasse I gehörenden Faktoren TGA4 aus *Arabidopsis thaliana* und TGA1a aus *Nicotiana tabacum* konnten keine Interaktionen nachgewiesen werden (Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000), ebenfalls nicht für TGA7 aus Tabak (Schiermeyer, 2001).

Für die Interaktion sind die Dimerisierungsdomäne (*leucin zipper*) und der C-Terminus der TGA-Faktoren (Zhou *et al.*, 2000) sowie die Ankyrinmotive von NPR1 (Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000) von Bedeutung. Hingegen sind mutierte NPR1-Proteine, die dazu führen, daß die Pflanzen keine SAR etablieren können, auch nicht mehr in der Lage, mit TGA-Faktoren zu interagieren (Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). In diesen *npr1*-

Mutanten konnte gezeigt werden, daß die *in-vitro*-Bindung von ASF-1 an das *as-1*-Element des *PR-1*-Promotors dereguliert ist: Es findet eine verstärkte Bindung auch in Abwesenheit von Salizylsäure statt, während in Extrakten aus NPR1-Wildtyppflanzen die Bindung von ASF-1 an das *as-1*-Element im uninduzierten Zustand gering ist. Im Widerspruch dazu stehen Daten, die zeigen, daß funktionelles NPR1-Protein *in vitro* in der Lage ist, die Bindung von TGA2 an das *as-1*-Element zu verstärken (Després *et al.*, 2000).

Durch ein *in-vivo*-Nachweissystem für die Interaktion zweier Proteine konnten quantitative und zeitliche Analysen der TGA2-NPR1-Interaktion durchgeführt werden (Subramaniam *et al.*, 2001). Diese zeigten, daß die Interaktion von NPR1 und TGA2 nach einem Salizylsäurestimulus biphasisch verläuft. Dabei findet etwa ½ h nach der Induktion die stärkste Interaktion statt, klingt im Verlaufe von 6 h wieder vollständig ab, steigt danach zu einem neuen Maximum bei etwa 10 h an, fällt danach langsam und gleichmäßig wieder ab und hat nach 24 h noch nicht wieder den ursprünglichen Wert erreicht. Damit korrelieren die erste Phase mit der Aktivierung der frühen Abwehrgene und die zweite Phase mit der Aktivierung der späten Abwehrgene. Da NPR1 auch noch nach sieben Tagen Wachstum auf Salizylsäure im Zellkern akkumuliert ist (Kinkema *et al.*, 2000), kann die Abnahme der Interaktion nach 24 h nicht auf eine Relokalisation von NPR1 aus dem Zellkern ins Cytoplasma zurückzuführen sein, sondern muß von anderen regulatorischen Faktoren abhängen. Ob die beobachtete biphasische Interaktion Auslöser der Expressionsaktivierung oder lediglich Begleiterscheinung bei der Rekrutierung von TGA-Faktoren und NPR1 an den Promotoren ist, wurde bislang nicht untersucht.

Eine weitere wichtige Komponente der Transkriptionsregulierung am *PR-1*-Promotor ist SNI1. Eine Mutation von *SNI1* in *npr1*-Mutanten führt zu einer Restauration der in *npr1*-Mutanten gestörten SAR und *PR-1*-Induktion (Li *et al.*, 1999). SNI1 ist vorwiegend im Zellkern lokalisiert und weist eine marginale Homologie zu einem Retinoblastomprotein aus *Mus musculus* auf.

Nach dem von Li *et al.* (1999) vorgeschlagenen Modell (Abbildung 7) ist SNI1 ein negativer Regulator am *PR-1*-Promotor. Das mit den TGA-Transkriptionsfaktoren interagierende NPR1-Protein bewirkt nach einer Induktion durch Salizylsäure, daß SNI1 vom Promotor freigesetzt und daraufhin die Transkription freigegeben wird. In der *snl1*-Mutante befindet sich kein Repressor mehr auf dem Promotor, und dieser zeigt eine erhöhte Grundaktivität. Für die Steigerung der Transkription ist nun lediglich die Bindung der Transkriptionsfaktoren erforderlich. Eine direkte Interaktion von SNI1 mit NPR1 oder den TGA-Faktoren konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Daher wird die Existenz weiterer Komponenten eines regulativen Superkomplexes postuliert (Thomma *et al.*, 2001b). Da SNI1 keine offensichtliche DNA-Bindestelle besitzt, könnte es indirekt über einen WRKY-Transkriptionsfaktor wirken, für den eine negativ regulierende Bindestelle im *PR-1*-Promotor nachgewiesen wurde (Lebel *et al.*, 1998). Die Bedeutung von MYB-Transkriptionsfaktoren, deren Bindung an eine passende Bindestelle im *PR-1*-Promotor *in vitro* nachgewiesen wurde (Yang und Klessig, 1996), ist ungeklärt (Rushton und Somssich, 1998). Ebenso ist ungeklärt, welche Rolle die mit NPR1 interagierenden NIMIN-Proteine spielen (Weigel *et al.*, 2001) und ob sie beispielsweise an der Aufhebung der inhibitorischen Wirkung von SNI1 beteiligt sind.

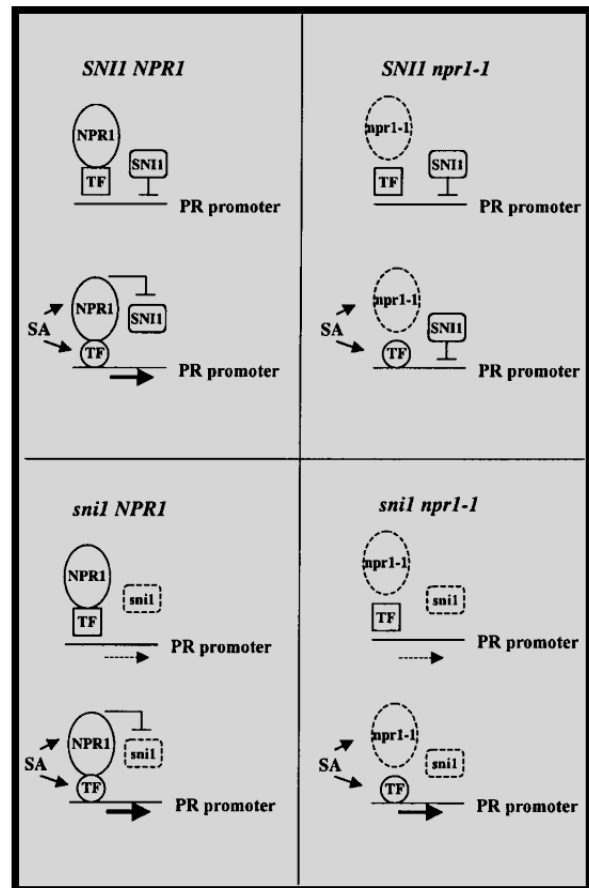


Abbildung 7: Modell des Zusammenwirkens von TGA-Transkriptionsfaktoren, NPR1 und SNI1 im *PR-1*-Promotor

aus Li *et al.*, 1999

1.1.3.3 Zusammenfassung des derzeitigen Kenntnisstandes über salicylsäureabhängige Signaltransduktion zur Pathogenabwehr

Die in den Kapiteln 1.1.1 bis 1.1.3.2 referierten Daten wurden in den Übersichtsartikeln von Klessig *et al.* (2000) und Glazebrook (2001) zu schematischen Darstellungen zusammengefaßt. Gemeinsam mit den Daten von Jupin und Chua (1996), Stange *et al.* (1997), Li *et al.* (1999), Mayda *et al.* (2000), Zhang und Klessig (2001), (Weigel *et al.*, 2001) und Johnson *et al.* (2001) kann das in Abbildung 8 dargestellte Schema aufgestellt werden.

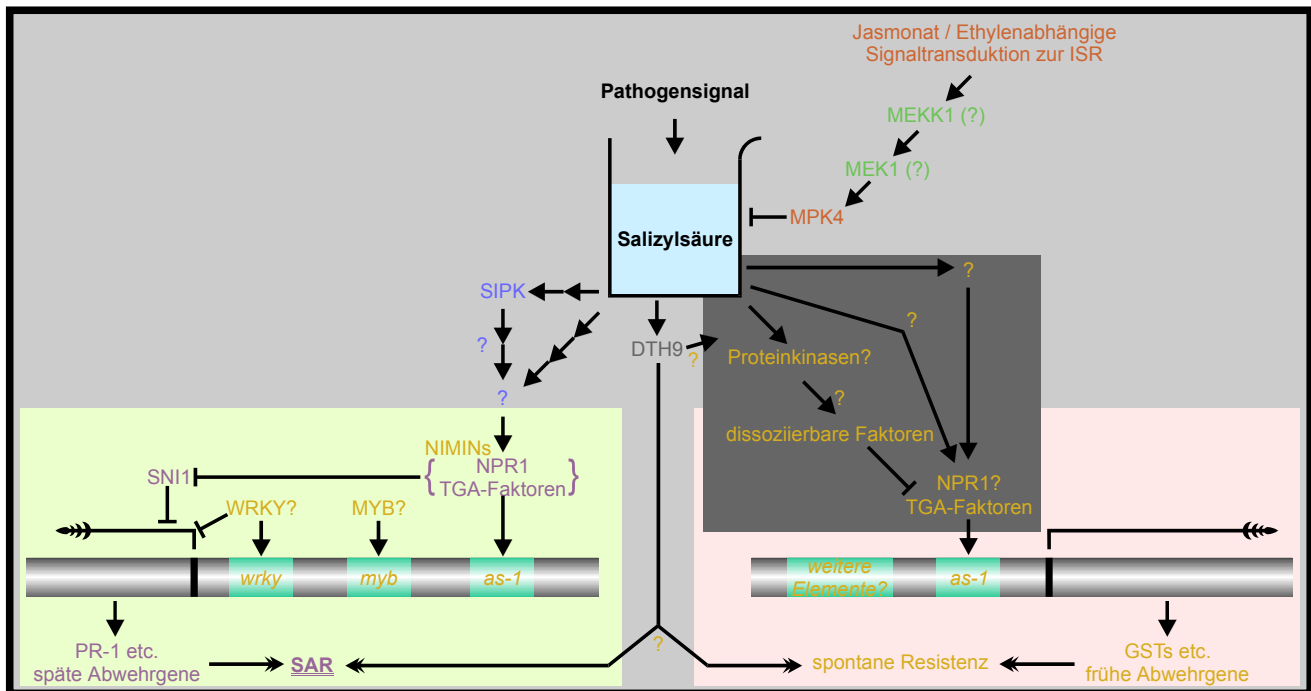


Abbildung 8: Schematische Zusammenfassung bisher bekannter Komponenten der salicylsäureabhängigen Signaltransduktion zur Pathogenabwehr

blaue Schrift.....nach Klessig *et al.* (2000), verändert

braune Schrift.....nach Glazebrook (2001), verändert

grüne Schrift.....nach Zhang und Klessig (2001), verändert

violette Schrift...nach Li *et al.* (1999), verändert

graue Schrift.....nach Mayda *et al.* (2000), verändert

gelbe Schrift.....aus den in Kapitel 1.1.3.3 genannten weiteren Quellen zusammengestellt

grün unterlegt...Signaltransduktion der späten Antwort

rot unterlegt.....Signaltransduktion der frühen Antwort

grau unterlegt...potentielle Abdeckung der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Mutagenese (siehe Kapitel 1.1.5)

Anwendung von dominant negativen Selektionssystemen

1.1.4.1 Bekannte dominant negative Selektionssysteme in der Anwendung zur Suche nach Mutanten

Bei der Forschung an tierischen Organismen sind dominant negative Selektionssysteme zur Suche nach Mutanten weit verbreitet (Saxon *et al.*, 1985; Ashman *et al.*, 1986; Mansour *et al.*, 1988). In Pflanzen hingegen wurden bisher nur wenige solche Systeme, die auch als Suizidsysteme bezeichnet werden, erfolgreich angewandt.

Eine konstitutiv exprimierte Nitratreduktase, die ungiftiges Chlorat zu toxischem Chlorit umsetzt, konnte als konditionelles Suizidsystem eingesetzt werden (Klee *et al.*, 1987; LaBrie *et al.*, 1991; Nussaume *et al.*, 1991). Dieses System ist in der Anwendung nicht unproblematisch, da die Aktivität der endogenen Nitratreduktase von den Wachstumsbedingungen abhängt (Cheng *et al.*, 1991). Die Nitratreduktase als dominant negativer Selektionsmarker ist unter anderem zur Selektion von Mutanten im Phytochrom-Signaltransduktionsweg eingesetzt worden, indem das Nitratreduktasegen mit dem Promotor eines Gens fusioniert wurde, das für ein lichtsammelndes Chlorophyll *a/b*-Protein codiert (Heimer *et al.*, 1995).

Ein weiteres Gen, das erfolgreich als dominant negativer Selektionsmarker eingesetzt wurde, ist das *tms2*-Gen, das auch als *iaaH* oder T-DNA-Gen 2 bezeichnet wird, und dessen Genprodukt die ungiftigen Substrate Naphtylacetamid und Indolacetamid zu den in hohen Konzentrationen toxischen Produkten Naphtylelessigsäure beziehungsweise Indolessigsäure umsetzt (Depicker *et al.*, 1988; Karlin-Neumann *et al.*, 1991). Dieses System ist jedoch nur begrenzt einsetzbar, da in Pflanzen relativ hohe Hintergrundaktivitäten unspezifischer Hydrolasen ebenfalls die toxisierende Reaktion katalysieren. Erfolgreiche Suchen nach Mutanten konnten mit diesem System dennoch durchgeführt werden, von denen eine zur Identifikation eines *npr1*-Allels, ursprünglich als *sai1* bezeichnet, führte (Brusslan *et al.*, 1993; Shah *et al.*, 1997; Cecchini *et al.*, 1998). Shah *et al.* (1997) verwandten das *tms2*-Gen jedoch nicht als Suizidgen, sondern identifizierten ihre die *sai1*-Mutante anhand des verringerten Wurzelwachstums in Pflanzen, die das *tms2*-Gen in Anwesenheit von Naphtylacetamid exprimieren.

Auch über den Einsatz eines Antisense-*nptII*-Gens, das in Verbindung mit dem *nptII*-Gen in korrekter Orientierung ein dominant negatives Selektionssystem auf Kanamycinresistenz ergibt, liegen Berichte vor (Xiang und Guerra, 1993).

Das bisher am häufigsten eingesetzte Suizidsystem basiert auf der enzymatischen Wirkung der Cytosindeaminase des *codA*-Gens aus *Escherichia coli*. Dieses Enzym katalysiert den Umsatz von nicht toxischem 5'-Fluorocytosin zu giftigem 5'-Fluorouracil (Perera *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1995). Mit Hilfe dieses dominant negativen Markers wurde eine

Reihe von Selektionssystemen etabliert und erfolgreich eingesetzt (Risseeuw *et al.*, 1997; Thykjær *et al.*, 1997; Gallego *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2001).

1.1.4.2 Barnase

Bei der Barnase handelt es sich um eine sehr aktive RNase aus *Bacillus amyloliquefaciens*, die von diesem Bakterium als Exoenzym ausgeschieden wird und eine äußerst toxische Wirkung hat. Dieses Enzym wurde erstmals 1972 isoliert und die Aminosäuresequenz bestimmt (Hartley und Barker, 1972; Hartley und Rogerson, 1972). Es wurde zunächst gemeinsam mit dem ebenfalls aus *Bacillus amyloliquefaciens* isolierten spezifischen Inhibitor Barstar als Modellsystem für Proteinfaltung und Interaktionen verwandt. (Hartley, 1969; Hartley und Smeaton, 1973; Hartley, 1975; Hartley, 1977; Hartley, 1989; Hartley, 1993; Griko *et al.*, 1994; Makarov *et al.*, 1994; Hartley, 2001).

Das Barnasegen wurde erfolgreich zur Herstellung männlich steriler transgener Pflanzen angewandt, indem es mit einem tapetumspezifischen Promotor fusioniert wurde (Mariani *et al.*, 1990a). Nachdem gezeigt wurde, daß der Barnaseinhibitor Barstar auch *in vivo* und im pflanzlichen System die Toxizität der Barnase effizient aufhebt (Hartley, 1988; Hartley, 1989; Mariani *et al.*, 1990b), wurde ein System konstruiert, das einen effizienten Zelltod nach der Infektion von Pathogenen rund um die Infektionsstelle auslöst und damit das Wachstum der Pathogene verhindert (Strittmatter *et al.*, 1995). Bei diesem System wurde der Barnaseinhibitor Barstar konstitutiv exprimiert, um die im Grundzustand des pathogeninduzierten Promotors in geringen Mengen exprimierten Barnasemoleküle zu detoxifizieren. Die Barnase wirkte somit erst dann toxisch, wenn ihre Expression nach Infektion mit einem Pathogen einen Schwellenwert überschritt, sodaß die Inhibition durch das Barstar-Protein überwunden wurde. Die Autoren beobachteten, daß die RNaseaktivität der Barnase so effizient ist, daß kein Barnasetranskript in den Pflanzen nachweisbar war: Die Barnase hatte nach ihrer Induktion sämtliche in den induzierten Zellen vorhandene RNA einschließlich ihres eigenen Transkripts sofort abgebaut.

Die Anwendung der Barnase als Suizidgen zur Identifikation von Signaltransduktionsmutanten ist bisher nicht berichtet worden. Die hohe Toxizität der Barnase ermöglicht zwar eine effiziente Selektion, erfordert aber, daß die Grundaktivität des zu untersuchenden Promotors sehr gering ist, weshalb die Anwendung als dominant negativer Selektionsmarker durchaus schwierig sein kann.

1.1.4.3 Deacetylase und N-Acetyl-Phosphinothricin

Phosphinothricin ist ein Herbizid, das in der Landwirtschaft unter dem Produktnamen BASTA weite Verwendung findet. Insbesondere nach der Herstellung transgener Nutzpflanzensorten, welche die Phosphinothricin-Aminotransferase exprimieren und damit BASTA-resistent sind, wird dieses Herbizid zur Vernichtung aller konkurrierenden Pflanzen auf dem

Feld eingesetzt. Die Wirkungsweise von Phosphinothricin basiert auf der Hemmung der Glutaminsynthetase, an deren aktives Zentrum das Herbizid bindet. Da die Glutaminsynthetase für alle Pflanzen essentiell für die Stickstoffassimilation und die Detoxifizierung von Produkten der Photorespiration ist, wirkt Phosphinothricin effizient und universell.

Aminosäuredeacetylasen mit einer Spezifität für *N*-Acetyl-Phosphinothricin wurden im Zuge der Suche nach Enzymen gefunden, welche das ungiftige Pro-Herbizid *N*-Acetyl-Phosphinothricin durch Hydrolyse in das Herbizid Phosphinothricin umsetzen können (Bartsch *et al.*, 1996; Kriete *et al.*, 1996). Als aktivste der gefundenen Deacetylasen erwies sich das Enzym aus *Stenotrophomonas spec.*, das aus einer Bodenprobe in Frankfurt unweit des Hoechst-Geländes bei Tor Süd gewonnen wurde (Bartsch *et al.*, 1996).

Die Wirksamkeit von Deacetylasen zur Zerstörung pflanzlicher Gewebe in Anwesenheit von *N*-Acetyl-Phosphinothricin wurde an Tabak nachgewiesen (Kriete *et al.*, 1996). Hierbei wurde eine Ornitindeacetylase aus *Escherichia coli* verwandt, die ebenfalls eine Spezifität für *N*-Acetyl-Phosphinothricin besitzt. Mit Hilfe dieses Enzyms, das im Vergleich zur Deacetylase aus *Stenotrophomonas spec.* weniger effizient war, konnten unter Verwendung eines tapetumspezifischen Promotors nach Besprühen mit *N*-Acetyl-Phosphinothricin männlich sterile Pflanzen gewonnen werden. Das Auftropfen von *N*-Acetyl-Phosphinothricin auf Pflanzen, welche die Deacetylase aus *Escherichia coli* unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors konstitutiv exprimierten, führte zum Auftreten von Läsionen, die auf die Umgebung der Applikationsstelle begrenzt waren. Wurden solche Pflanzen auf Nähragar mit *N*-Acetyl-Phosphinothricin gesetzt, so starben sie innerhalb von sechs Wochen ab.

1.1.5 Über diese Arbeit

1.1.5.1 Zielsetzung

Mit Hilfe eines induzierbaren Suizidsystems sollten Mutanten in der Signaltransduktion zwischen einem Salizylsäurestimulus und der Induktion der frühen Abwehrgene identifiziert werden. Dabei sollte das *as-1*-Element verwandt werden, um die Transkription eines Suizidgens in ähnlicher Weise wie die frühen Abwehrgene zu steuern. Die Mutanten wären durch eine fehlende Induzierbarkeit des mit dem *as-1*-Element fusionierten Suizidgens leicht daran zu erkennen, daß sie die Bedingungen überleben, unter denen die transgenen Pflanzen absterben. Die auf diese Weise identifizierten Mutanten sollten nach Möglichkeit in Grundzügen charakterisiert werden.

1.1.5.2 Experimentelle Ansätze

In einem ersten Schritt sollte ein Suizidsystem geeigneter Art und Stärke etabliert und charakterisiert werden. In einem Ansatz wurde dazu das konstitutive Suizidgen Barnase mit

dem -90-Fragment des CaMV 35S-Promotors verwandt. In einem weiteren Ansatz wurde das nur in Anwesenheit von *N*-Acetyl-Phosphinothricin toxisch wirkende Enzym Deacetylase in Kombination mit synthetischen Promotoren eingesetzt, die ein einzelnes *as-1*-Element beziehungsweise fünf *as-1*-Elemente enthielten. Als zusätzliches Reportergen wurde mit jedem Suizidgen ein Fusionskonstrukt des jeweils verwandten Promotors mit dem β -Glucuronidasegen transformiert. Dieses sollte zum Ausschluß von Mutanten dienen, bei denen das Suizidgen mutiert war, ferner zur Charakterisierung der Gewebsspezifität der *as-1*-Aktivität in den transgenen Pflanzen und den Mutanten.

Nach der Mutagenese sollten unter Anwendung des Suizidsystems mögliche Mutanten selektiert werden. Nach der Reproduktion des suizidresistenten Phänotyps sollte aufgrund der Aktivität des zweiten Reportergens, der β -Glucuronidase, zwischen den Signaltransduktionsmutanten und den Mutanten im Suizidgen unterschieden werden. Letztere sollten noch über eine unverminderte Glucuronidaseaktivität verfügen. Gleichzeitig sollte über histochemische Färbeversuche mit einer phänotypischen Charakterisierung bezüglich der gewebespezifischen Änderungen der Transkriptionsaktivität des *as-1*-Elements begonnen werden.

Die Ergebnisse zur Aktivität der Reportergene sollten schließlich durch Transkriptionsanalysen vor und nach Salizylsäureinduktion abgesichert und die gewonnenen überlebenden Linien in wahrscheinliche und mögliche Signaltransduktionsmutanten sowie Mutanten des Suizidgens klassifiziert werden.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Pflanzen

Ausgangsmaterial für alle Versuche war der Ökotyp Columbia-0 (NASC Stock No. N1092, NASC, 2002) von *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH.

Aus den *Arabidopsis*-Stammsammlungen in Nottingham (Großbritannien, <http://nasc.nott.ac.uk>) und Columbus, Ohio (USA, <http://aims.cse.msu.edu>) wurden folgende Mutantenlinien bezogen: *npr1-1* (Cao *et al.*, 1994), *npr1-2* (Glazebrook *et al.*, 1996), *cpr5-2* (Bowling *et al.*, 1997), *eds4-1* (Glazebrook *et al.*, 1996), *eds5-2* (Glazebrook *et al.*, 1996), *aux1-7* (Maher und Martindale, 1980; Pickett *et al.*, 1990), *axr2* (Wilson *et al.*, 1990) und *axr4-1* (Hobbie und Estelle, 1995).

Die Mutantenlinie *phyA/phyB* (Reed *et al.*, 1994) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Alfred Batschauer zur Verfügung gestellt.

Die *cpr1*- und *cpr6*-Mutanten (Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998) wurden von Weihua Fan aus dem Labor von Xinnian Dong zugesandt.

Die Linie *ssi1* (Shah *et al.*, 1999) wurde von Jyoti Shah aus der Arbeitsgruppe von Daniel F. Klessig übermittelt.

1.2.2 Bakterienstämme, Kultur und Erhaltung

1.2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme

Die in dieser Arbeit verwandten *Escherichia coli*-Stämme sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Stämme von *Escherichia coli*, die in dieser Arbeit verwandt wurden

Stamm	Referenz	Genotyp	Verwendung
DH5 α	(Hanahan, 1983; Raleigh <i>et al.</i> , 1989)	F ⁻ <i>endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>glnV44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (ϕ 80 <i>dlac</i> Δ (<i>lacZ</i>)M15)	Plasmidvermehrung allgemeine Klonierungen
MC1061	(Huynh <i>et al.</i> , 1985; Wertman <i>et al.</i> , 1986; Raleigh <i>et al.</i> , 1989)	F ⁻ <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7696 <i>galE15 galK16</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>rpsL</i> (Str ^r) <i>hsdR2</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>mcrA mcrB1</i>	Klonierungen und Plasmidvermehrung bei welchen keine Expression erwünscht war
SCS110	(Stratagene, 1999)	<i>rpsL thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F ⁻ <i>traD36 proAB lacI</i> ^c Z Δ M15]	Klonierung und Plasmidvermehrung bei Verwendung von <i>dAm</i> -sensitiven sequenzspezifischen Endonucleasen

1.2.2.2 Kultur von *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde in Kulturvolumina von bis zu 5 mL in Reagenzröhrchen im Roller, in Kulturvolumina ab 25 mL in Erlenmeyerkolben im Schüttler bei 37 °C angezogen. Als Kulturmedien kamen LB (Sambrook *et al.*, 1989, Tabelle 4) oder dYT (Sambrook *et al.*, 1989, Tabelle 4) zum Einsatz, wobei mit dYT höhere Plasmidausbeuten erzielt werden konnten. Kulturen auf Festmedium wurden auf LB-Agar angelegt und bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion auf die üblichen rekombinanten Plasmide wurden die Medien mit Antibiotika gemäß Tabelle 7 versetzt. Für die Herstellung von Festmedien wurden 7 g/L Agar zugesetzt.

Tabelle 4: LB-Medium

Substanz	Menge
Trypton	10 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Natriumchlorid	10 g/L
pH 7,0 – 7,2	

Tabelle 4: dYT-Medium

Substanz	Menge
Trypton	16 g/L
Hefeextrakt	10 g/L
Natriumchlorid	5 g/L
pH 7,0 – 7,2	

1.2.2.3 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101(pMP90) (Koncz und Schell, 1986) verwandt. Der Wildtypstamm GV3101 ist von Natur aus resistent gegen Rifampicin, das Helferplasmid pMP90 vermittelt eine Resistenz gegen Gentamycin.

1.2.2.4 Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens GV3101(pMP90) wurde bei 28 °C in YEB-Medium (Vervliet *et al.*, 1975, Tabelle 5) bzw. auf YEB-Agar angezogen. Bei einer 5-mL-Kultur war eine Wachstumszeit von 1 – 3 Tagen nötig, um sie bis zu einer verwendbaren Zellzahl anzuziehen. Kulturen auf Festmedium wurden für 2 Tage bei 28 °C angezogen. Den Medien wurde stets Rifampicin und Gentamycin und zur Selektion auf rekombinante pBIN19-Derivate Kanamycin gemäß Tabelle 7 zugesetzt.

Tabelle 5: YEB-Medium

Substanz	Menge
Fleischextrakt „Lab Lemco“	10 g/L
Hefeextrakt	2 g/L
Pepton	5 g/L
Saccharose	5 g/L
Magnesiumsulfat	2 mM
pH 7,0	

1.2.2.5 *Pseudomonas syringae*-Stämme

In dieser Arbeit wurde der Wildtypstamm *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326, sowie der transgene Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 *avrRpt2* verwandt (Whalen *et al.*, 1991). *avrRpt2* ist ein Avirulenzgen, das die Pathogenizität des Wildtypstamms gegenüber *Arabidopsis thaliana* aufhebt. Der Wildtyp ES4326 ist von

Natur aus streptomycinresistent, das Plasmid pLH12, welches das Avirulenzgen trägt, vermittelt eine Tetracyclinresistenz.

1.2.2.6 Kultur von *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae wurden in King's B-Medium (Tabelle 6) bzw. King's B-Agar bei 30 °C angezogen. Bei einer 5-mL-Kultur war eine Wachstumszeit von 1 – 3 Tagen nötig, um sie bis zu einer verwendbaren Zellzahl anzu ziehen. Dem Medium wurden die jeweils erforderlichen Antibiotika gemäß Tabelle 7 zugesetzt.

Tabelle 6: King's B-Medium

Substanz	Menge
Proteose-Pepton	10 g/L
di-Kaliumhydrogenphosphat	8,6 mM
Glycerin	15 g/L
pH 7,0 mit Salzsäure autoklavieren	
1 M Magnesiumsulfat	5 mL/L

Tabelle 7: Stammlösungen für Medienzusätze

Substanz	Konzentration im Medium	Stammlösung	Lösungsmittel
Cefotaxim	500 mg/L	250 mg/mL	H ₂ O
Hygromycin B	40 mg/L	50 mg/mL	H ₂ O
Kanamycin	50 mg/L	50 mg/mL	H ₂ O
Chlortetracyclin	1 mg/L	10 mg/mL	50% Ethanol
α -Naphthylelessigsäure	200 μ g/L für Sproßinduktion 250 μ g/L für Calluskultur	1 mg/mL	DMSO
6-Benzylaminopurin	1 mg/L	400 μ g/mL	Ethanol
Ampicillin	100 mg/L	100 mg/mL	H ₂ O
Chloramphenicol	25 mg/L	25 mg/mL	Ethanol
Rifampicin	50 mg/L	10 mg/mL	Methanol
Gentamycin	25 mg/L	25 mg/mL	H ₂ O
X-Gal	50 μ L pro Platte	20 mg/mL	DMF
IPTG	50 μ L pro Platte	26 mg/mL	DMF
Kinetin	100 μ g/L	1 mg/mL	1 M Natriumhydroxid
Acetosyringon	100 μ M	100 mM	DMSO
β -Bactyl	125 mg/L	125 mg/mL	H ₂ O

1.2.2.7 Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen

200 μ L einer Bakterienkultur wurden mit 800 μ L sterilem 87 %igem Glycerin versetzt, gründlich gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Glycerinkulturen konnten bei –80 °C über mehrere Jahre gelagert werden.

1.2.3 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwandten Plasmide sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
p5×as-1-Deac	Fünffaches as-1-Element vor dem Deacetylasegen (Aventis, vorm. Hoechst) und dem ocs-Terminator. Verwandt als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pBIN19-5×as-1-(GuDe). <i>Amp^R</i>	Alexandra Thiele, unveröffentlichte
p5×as-1-GUS	Fünffaches as-1-Element vor dem β-Glucuronidasegen und dem ocs-Terminator. Verwandt als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pBIN19-5×as-1-(GuDe). <i>Amp^R</i>	Alexandra Thiele, unveröffentlichte
pBIN*	pBIN19-Derivat mit dem Barnase-Inhibitor Barstar	AgrEvo
pBIN*GuBa	Dreifragmentligation aus den Promotor-Gen-Fusionen aus und pSKBarney: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBIN*: <i>EcoRI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit, Kapitel 1.3.1.1
pBIN19	Binärer Vektor zur Transformation von Pflanzen mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . <i>Km^R</i>	Bevan, 1984; Frisch <i>et al.</i> , 1995
pGEM-At103-Sonde	RT-PCR-Produkt aus Arabidopsis-Gesamt-RNA mit At103-Sonde-Primern kloniert in pGEM-T. Verwandt als Ausgangsplasmid für At103-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	Yu-Jin Bae, unveröffentlicht
pGEM-AtBG2-Sonde	RT-PCR-Produkt aus Arabidopsis-Gesamt-RNA mit AtBG2-Sonde-Primern kloniert in pGEM-T. Verwandt als Ausgangsplasmid für AtBG2-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	Yu-Jin Bae, unveröffentlicht
pGEM-AtBG3-Sonde	RT-PCR-Produkt aus Arabidopsis-Gesamt-RNA mit AtBG3-Sonde-Primern kloniert in pGEM-T. Verwandt als Ausgangsplasmid für AtBG3-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pGEM-AtGST6-Sonde	GST6-Gen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pGEM. Verwandt als Ausgangsplasmid für AtGST6-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	Katharina Pawlowski
pGEM-T	linearisierter und desoxythymidinylierter pGEM-Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'A-Überhängen. <i>Amp^R</i>	Promega
pSK	allgemeiner Klonier- und Sequenziervektor. <i>Amp^R</i>	Stratagene
pSK(-90)-Deac	-90-Fragment des CaMV 35S-Promotors vor dem Deacetylasegen aus <i>Stenotrophomonas spec</i> und dem ocs-Terminator. Verwandt als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pBIN19-1×as-1-(GuDe). <i>Amp^R</i>	Alexandra Thiele, unveröffentlicht
pSK-AtGST6-Sonde	Teil der Codierregion des GST6-Gens aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pSK. Verwandt als Ausgangsplasmid für AtGST6-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	Katharina Pawlowski
pSK-AtPR1	PR1-Gen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pSK. Verwandt als Ausgangsplasmid für AtPR1-Sonde zur Northern-Analyse. <i>Amp^R</i>	Katharina Pawlowski
pSK-Barney	Ligation der an -90-Position trunkierten Expressionskassette aus pUCA7-Barney: <i>Eco32II/HindIII</i> in pSK: <i>Eco32II/HindIII</i> . Zwischenklonierung für pBIN*GuBa. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit, Kapitel 1.3.1.1
pTTL-as-1-GUS/INT	Ein as-1-Element vor der TATA-Box, dem β-Glucuronidasegen und dem 35S-Terminator. Verwandt als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pBIN19-1×as-1-(GuDe). <i>Amp^R</i>	Krawczyk <i>et al.</i> , 2002
pUCA7	pUC18-Derivat. Enthält den CaMV 35S-Promotor, den ocs-Terminator und dazwischen eine modifizierte Klonierregion aus pBINAR. <i>Amp^R</i>	Höfgen und Willmitzer, 1990
pUCA7-Barney	Ligation des Barnase-Fragments aus pVE113: <i>BamHI/PstI</i> in pUCA7: <i>BamHI/PstI</i> . Zwischenklonierung für pBIN*GuBa. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit, Kapitel 1.3.1.1
pUCA7-Deac	pUCA7-Derivat, enthält ein Deacetylasegen aus <i>Stenotrophomonas</i> . <i>Amp^R</i>	Alexandra Thiele, unveröffentlicht
pVE113	pGEM1-Derivat. Enthält das Barnasegen aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> und das Gen für den Barnaseinhibitor Barstar. Verwandt als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pBIN*GuBa <i>Amp^R</i>	AgrEvo
pBIN19-1×as-1-(GuDe)	Dreifragmentligation aus den Promotor-Gen-Fusionen pSK(-90)-Deac: <i>EcoRI/HindIII</i> , pTTL-as1-GUS/INT: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBIN19: <i>EcoRI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit, Kapitel 1.3.2.1
pBIN19-5×as-1-(GuDe)	Dreifragmentligation aus den Promotor-Gen-Fusionen aus p5×as-1-GUS: <i>EcoRI/HindIII</i> und p5×as1-Deac: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBIN19: <i>EcoRI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> und Suizidscreen. <i>Km^R</i>	diese Arbeit, Kapitel 1.3.3.1

1.2.4 Oligonukleotide

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 9 aufgeführten Oligonukleotide als Primer verwendet.

Tabelle 9: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
At103-Sonde lower	CTTCCAATCCTATTCCTTCCC
At103-Sonde upper	AAGAAGTGAAGCTTTTGGGG
AtBG2-Sonde lower	CCTGAACCTTCCTTGAGACG
AtBG2-Sonde upper	TGTCTGAATCAAGGAGCTTAGC
AtBG3-Sonde lower	TTATCCACACCCGTCGCTGCTC
AtBG3-Sonde upper	ATGCGGCTGTACGATCCCAAC
Deac analyse fwd	TCATGGGAGGTCCTTCTTCC
Deac analyse rev	ATTTCACCAGCATCCGGAG
rev	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
uni	CACGACGTTGTAAAACGACGGCCA

1.2.5 DNA-Sonden für Hybridisierungen

Folgende DNA-Fragmente wurden als Sonden für Hybridisierungen (Kapitel 2.2.34) radioaktiv markiert:

Tabelle 10: DNA-Fragmente zur Sondenherstellung

Sonde	Herstellung
At103	552 bp-Fragment der Spaltung pGEM-At103-Sonde: <i>Eco52I</i>
AtBG2	557 bp-Fragment der Spaltung pGEM-AtBG2: <i>Eco52I</i>
AtBG3	680 bp-Fragment der Spaltung pGEM-AtBG3: <i>Eco52I</i>
AtGST6	600 bp-Fragment der Spaltung pSK-AtGST6-Sonde: <i>EcoRI</i>
AtPR1	501 bp-Fragment der Spaltung pSK-AtPR1: <i>EcoRI</i>
Deac	990 bp-Fragment der Spaltung pSK-as1-Deac: <i>Eco91I</i>
GUS	1112 bp-Fragment der Spaltung pTT-GUS/INT: <i>HincII/Bsp68</i>

1.2.6 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Kulturen

1.2.6.1 Miniaturmaßstab

Für normale Zwecke wurde die Rapid-Präparation (Le Gouill *et al.*, 1994) angewandt.

Dazu wurden die Bakterien zunächst durch Zentrifugation sedimentiert, das Medium entfernt und das Sediment anschließend in 100 µL Rapid I (Tabelle 11) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µL Rapid II (Tabelle 12) und 200 µL Chloroform erfolgte eine Inkubation von 1 – 4 min. Danach wurden 150 µL Rapid III (Tabelle 13) zugegeben, der Ansatz kräftig gemischt und für 2 min bei 10.000 ×g zentrifugiert. Ohne die weißliche Interphase zu stören, wurden 450 µL der wässrigen Oberphase abge-

Tabelle 11: Rapid I

Substanz	Menge
Tris	25 mM
Glucose	50 mM
EDTA	10 mM
RNase A	100 µg/mL
pH 8,0 mit Salzsäure	

Tabelle 12: Rapid II

Substanz	Menge
Natriumhydroxid	200 mM
Natriumdodecylsulfat	1 % (w/v)

Tabelle 13: Rapid III

Substanz	Menge
Kaliiumacetat	30 % (w/v)
Ameisensäure	5 % (v/v)

nommen, mit 900 μL -20°C kaltem absolutem Ethanol versetzt und gut gemischt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 1 min bei $10.000 \times g$ sedimentiert und der Überstand

mit einer Pipette vollständig entfernt. Das Sediment wurde mit 700 μL 70%igem Ethanol gewaschen, für 5 – 10 min im 65°C -Schrank getrocknet und in 30 – 50 μL TE (Sambrook *et al.*, 1989, Tabelle 14) aufgenommen.

Sollte eine größere Reinheit der DNA erzielt werden, so wurde die klassische alkalische Lyse mit Phenol-Chloroform-Extraktion (Ish-Horowicz und Burke, 1981; Sambrook *et al.*, 1989) angewandt.

Für reinste DNA wurde das Plasmid Mini Kit der Firma Qiagen gemäß den beiliegenden aktuellen Handbüchern benutzt, wobei stets der optionale Waschschrift mit Puffer PB durchgeführt wurde.

Im Falle eines Vektors mit hoher Kopienzahl wurden 1,5 mL, im Falle eines Vektors mit geringer Kopienzahl 3 mL einer Übernachtskultur zur Plasmidpräparation eingesetzt.

1.2.6.2 Midi- und Maximaßstab

Es wurden die Plasmid Midi und Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen verwandt.

1.2.7 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen

Für die Isolierung von DNA aus *Agrobacterium tumefaciens* wurde mit 3 mL einer Kultur eine modifizierte alkalische Lyse mit Phenol-Chloroform-Extraktion in Anlehnung an (Ish-Horowicz und Burke, 1981; Sambrook *et al.*, 1989) angewandt, bei der die Zentrifugationsschritte zur Reinigung nach der Phenolisierung, die zweimal durchgeführt wurde, verlängert wurden. Diese Methode führte jedoch nicht immer zu einer ausreichend reinen DNA-Präparation.

1.2.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wäßrigen Lösungen erfolgte durch photometrische Analyse im UV-Bereich bei 260 nm. Zur Abschätzung der Qualität wurde eine zweite Absorbanz bei 280 nm vorgeommen. Bei einem Verhältnis von $R = \frac{A_{260}}{A_{280}} > 1,6$ wurde die Nukleinsäurepräparati-

Tabelle 14: TE

Substanz	Konzentration
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8 mit Salzsäure	

Gleichung 1: Berechnung der Massenkonzentrationen von Nukleinsäuren nach Messung der Absorbanz

$$b = A_{260} \cdot F \cdot G$$

b ----- Massenkonzentration der Nukleinsäure
[$\mu\text{g}/\mu\text{L}$]

A_{260} ----- Absorbanz der verdünnten Probe []

F ----- spezifischer Extinktionskoeffizient: für DNA
 $50 \mu\text{g}^{-1}$; für RNA $40 \mu\text{g}^{-1}$

G ----- Verdünnungsfaktor der gemessenen Probe

on als ausreichend rein beurteilt, hochwertige Nukleinsäuren lagen bei $R > 1,8$ vor. Die Konzentration der Nukleinsäurepräparationen wurde gemäß Gleichung 1 berechnet. Für die Messung der Absorbanz wurde eine Quarzküvette verwandt. Die Messungen und Berechnungen wurden automatisch mittels eines speziellen Nukleinsäure-Photometers (GeneQuant II, Pharmacia Biotech) vorgenommen.

1.2.9 Lagerung von Nukleinsäuren

Plasmid-DNA wurde in TE oder Qiagen-Elutionspuffer gelöst bei -20 °C gelagert.

RNA-Präparationen wurden bei -80 °C gelagert.

1.2.10 Sequenzspezifische Spaltung von Plasmid-DNA

Für analytische Zwecke wurden typischerweise $1\text{ }\mu\text{L}$ (etwa $0,5 - 1\text{ }\mu\text{g}$) einer Rapid-Plasmidpräparation (Kapitel 1.2.6.1) in einem Reaktionsansatz von $10\text{ }\mu\text{L}$ eingesetzt und mit $0,2 - 0,5\text{ }\mu\text{L}$ sequenzspezifischer Endonuclease für 60 min inkubiert.

Für präparative Zwecke wurden Ansätze von $30\text{ }\mu\text{L}$ mit $3 - 6\text{ }\mu\text{L}$ (etwa $1,5 - 3\text{ }\mu\text{g}$) einer Rapid-Plasmidpräparation verwandt, die mit $1\text{ }\mu\text{L}$ sequenzspezifischer Endonuclease für 60 min inkubiert wurden.

Die Enzyme wurden vorzugsweise von MBI, aber auch von NEB, Boehringer Mannheim, Hybaid-AGS, Gibco BRL Life Technologies und Promega bezogen.

1.2.11 Auffüllen von 3'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase

Ein $10\text{-}\mu\text{L}$ -Spaltungsansatz gemäß Kapitel 1.2.10 wurde mit $2,5\text{ }\mu\text{L}$ 2 mM dNTP-Mix, Klenow-Reaktionspuffer (MBI) und $1 - 5\text{ U}$ Klenow-Fragment (MBI, $5\text{ U}/\mu\text{L}$) zu einem Ansatz von $20\text{ }\mu\text{L}$ aufgestockt, 20 min bei 37 °C inkubiert und das Enzym anschließend für 10 min bei 75 °C inaktiviert.

1.2.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in Anlehnung an Mullis und Faloona (1987) durchgeführt.

In der Regel wurden 50- μ L-Ansätze mit 5 – 100 ng Matrizen-DNA verwandt. Im Ansatz befanden sich weiterhin 5 U *Taq*-Polymerase, je 10 pmol beider Primer, je 200 μ M dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,5 – 3 mM $MgCl_2$, 5 % DMSO und 1/10 Vol. 10 \times PCR-Puffer (Tabelle 15). Dieser Ansatz wurde nach 2-minütiger Denaturierung bei 95 °C 20 – 35 Temperaturzyklen in folgender Reihenfolge ausgesetzt: (1) 95 °C, 20 s; (2) Anlagerungstemperatur, 20 s; (3) 72 °C, Zeit abhängig von der Amplifikatgröße. Die Anlagerungstemperatur wurde abhängig von den Primern gewählt und für kleine Primer (≤ 20 Basenpaare) nach Gleichung 2 berechnet. Für größere Primer

wurde die Berechnung nach Gleichung 3 durchgeführt. Für die Abschätzung der Amplifikationszeit in Schritt 3 des Temperaturzyklus' wurde eine Reaktionsgeschwindigkeit von 1000 Basenpaaren pro Minute angenommen. Nach Ablauf der Temperaturzyklen folgte eine Schlußextension für 10 min bei 72 °C. Anschließend wurde der Ansatz auf 4 °C gekühlt.

10 μ L einer abgeschlossenen PCR-Reaktion wurden mittels Gelelektrophorese gemäß Kapitel 1.2.13 überprüft.

Für die PCR nach reverser Transkription (Kapitel 1.2.34) wurden 25- μ L-Ansätze mit der AmpliTAQ der Firma Clontech gemäß der beiliegenden Anleitung verwandt.

1.2.13 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Standardmäßig erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA in 1%igen Agarose-TAE-Gelen bei 120 V für 45 min, modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989.

Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente wurden für große Fragmente auch geringer konzentrierte Gele bis zu 0,7 % und für kleinere Fragmente höher konzentrierte Gele bis zu 2 % verwandt.

Tabelle 15: 10 \times PCR-Puffer

Substanz	Menge
Tris	100 mM
Kaliumchlorid	500 mM
Nonidet P40	0,8 % (v/v)
pH 8,8 mit Salzsäure	

Gleichung 2: Berechnung der Anlagerungstemperatur für kurze Primer

$$T_a = (4 \cdot [GC] + 2 \cdot [AT]) - 3$$

T_a ----- Annealingtemperatur

[GC]----- Anzahl an Guanosin und Cytosin

[AT]----- Anzahl an Adenosin und Thymidin

Gleichung 3: Berechnung der Anlagerungstemperatur für lange Primer

$$T_a = \left(69,3 + 0,41 \cdot (\%GC) - \frac{600}{[N]} \right) - 3$$

T_a ----- Annealingtemperatur

%GC----- relative Menge an Guanosin und Cytosin in Prozent

[N]----- Anzahl aller Basen

Tabelle 16: Zusammensetzung von 20 \times TAE-Stammlösung

Substanz	Menge
Tris	96,8 g/L
Essigsäure	22,8 mL/L
500 mM EDTA, pH 8	40 mL/L

Für kleine Fragmente (250 bis 500 bp) wurde als Alternative zu hochkonzentrierten Agarosegelen auch Gele mit 1 % Agarose und 0,7 % Hydroxyethylcellulose verwendet.

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurden die in Abbildung 9 aufgeführten Größenstandards verwendet.

1.2.14 Visualisierung und Dokumentation gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA

DNA-Gele, die gemäß Kapitel 1.2.13 hergestellt worden waren, wurden in einem Wasserbad, das mit 20 – 50 µL 10%iger Ethidiumbromidlösung (Roth) versetzt worden war, für 5 – 20 min gefärbt. Nach kurzem Waschen in vollentsalztem Wasser wurde die Anfärbung der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid mittels eines UV-Tisches (Vilber Lourmat) bei 312 nm sichtbar gemacht und mit einer CCD-Kamera und der zugehörigen Software (BioPhotonics' BP-Mx ITI722 (PCI) TWAIN Image Control) in digitaler Form dokumentiert. Die Bearbeitung der Bilder unmittelbar nach der Dokumentation erfolgte mit der Software PhotoFinish 3.0 (ZSoft WordStar Atlanta Technology Center Incorporated), die weitere Bearbeitung mit der in Kapitel 1.2.35 aufgeführten Software. Die Geldokumentationsanlage wurde mit allen Geräten von der Firma MWG bezogen.

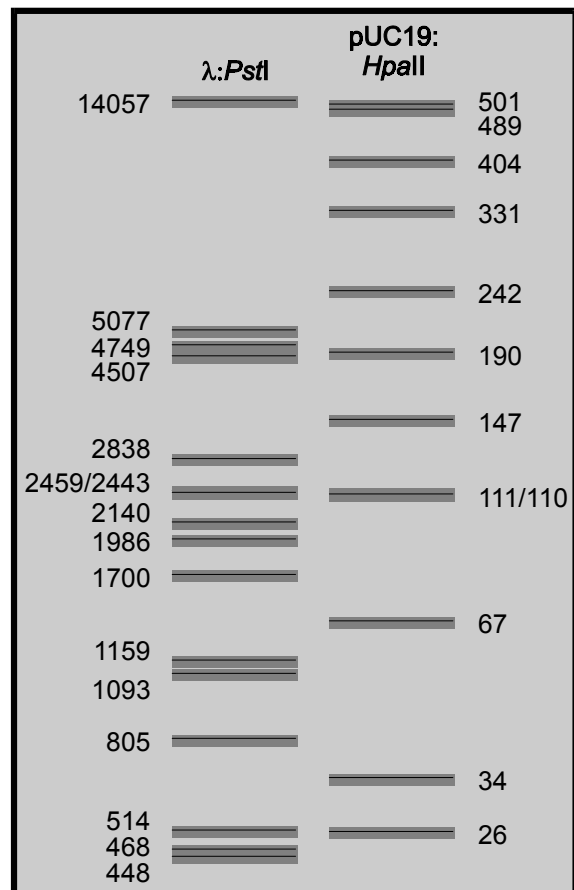


Abbildung 9: DNA-Größenstandards

1.2.15 Elution von elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden nach Färbung mit Ethidiumbromid mit Hilfe einer UV-Handlampe (365 nm) sichtbar gemacht und mit möglichst dichter Schnittführung mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten.

Die weitere Aufarbeitung erfolgte mit dem GeneClean-Kit der Firma Bio101 gemäß der beiliegenden Anleitung. Dieses Kit basiert auf Bindung der DNA an Silicapartikel (Glasmilchsuspension). Die so gewonnenen DNA-Fragmente konnten bis zu einem Volumen von 1 µL in Ligationen und 2 µL für radioaktive Markierungen (Kapitel 1.2.33.3) eingesetzt werden.

Das ausgeschnittene Gelstück wurde mit 3 Vol. der zum Kit gehörenden Natriumiodid-lösung versetzt und bei 65 °C aufgelöst. Nach Zugabe von 10 – 20 µL Glasmilchsuspension und Inkubation für 5 – 30 min bei Raumtemperatur wurde die Glasmilch durch kurze Zentrifugation sedimentiert und der Überstand vollständig mit einer Pipette abgenommen. Die Glasmilch wurde dreimal mit dem zum Kit gehörenden NewWash-Puffer durch Resuspension und Zentrifugation gewaschen und das Sediment bei 65 °C getrocknet. Nach dem Trocknen wurden je nach Menge an Glasmilch 10 – 20 µL TE zugegeben, die Glasmilch resuspendiert und die DNA durch Inkubation bei 65 °C für 5 min gelöst. Nach Zentrifugation für 2 min bei 10.000 ×g wurde der Überstand abgenommen und für weitere Prozeduren verwandt.

1.2.16 Sequenzierung von DNA

Zur Sequenzierung von DNA wurden zwei Kits verwandt, die auf der Didesoxy-Terminationsmethode (Sanger *et al.*, 1977) und der PCR (Mullis und Faloona, 1987) basieren und fluoreszenzmarkierte Terminatoren zur Detektion verwenden.

Für das DNA Sequencing Kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction der Firma ABI PRISM wurden 250 – 500 ng Plasmid-DNA in einen 10-µL-Ansatz mit 320 nM Primer und 2 µL ReadyReaction-Mix eingesetzt. Dieser Ansatz wurde 25 – 30 Zyklen des folgenden Temperaturprogramms unterworfen: (1) 96 °C 20 s; (2) 55 °C 20 s; (3) 60 °C 1,5 min. Nach Beendigung des Programms wurde eine Reinigung des Ansatzes durch Fällung vorgenommen. Dazu wurden 19 µL H₂O und 61 µL absoluten Ethanol zugegeben, 15 min inkubiert und 15 min bei 10.000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig mit einer Pipette abgenommen und das verbleibende Sediment mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand erneut vollständig entfernt, das meist nicht sichtbare Sediment 1 min bei 90 °C getrocknet und anschließend in 17 µL Template Suppression Reagent (TSR, ABI PRISM) aufgenommen. Schließlich wurde das in TSR aufgenommene Reaktionsprodukt für 2 min bei 96 °C denaturiert, sofort auf Eis gekühlt und in spezielle Sequenziergefäße überführt.

Für das DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit der Firma Amersham Pharmacia Biotech wurden dieselben Bedingungen für die PCR verwandt. Die Reinigung erfolgte jedoch nach folgendem Protokoll: 10 µL Sequenzieransatz wurden mit 1 µL der mitgelieferten Fälllösung (1,5 M Natriumacetat, 250 mM EDTA, pH > 8) durch Auf-und-Abpipettieren gut vermischt und 41 µL 96 % Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und danach bei 10.000 ×g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation vollständig mit einer Pipette entfernt und das Sediment mit 400 µL 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand auf

gleiche Weise entfernt und das meist nicht sichtbare Sediment wie oben beschrieben weiter behandelt.

1.2.17 Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in variablen Verhältnissen von Vektor und zu inserierendem Fragment mit 5 Weiss-Units T4-DNA-Ligase (MBI, 5 Weiss-Units/ μ L) in einem 15 μ L-Ansatz unter einer der folgenden Bedingungen inkubiert: (a) 16 °C über Nacht; (b) Raumtemperatur 3 h; (c) 37 °C 1 h.

Die Konzentrationsverhältnisse zwischen Fragment und Vektor wurden abhängig von der Art der Fragmentenden wie folgt gewählt: (a) Vektor mit zwei verschiedenen Enden: 1:1; (b) Vektor mit zwei gleichen Enden: Fragment im Überschuß bis zu 20:1.

Gewöhnlich wurde die Hälfte eines solchen Ansatzes direkt zur Transformation eingesetzt.

1.2.18 Klonierung von PCR-Produkten

Da mit *Taq*-Polymerase synthetisierte DNA-Doppelstränge an ihren Enden ein an 3'-Position überhängendes Desoxyadenosin besitzen, können sie leicht in geöffnete Vektoren mit einem an 5'-Position überhängenden Desoxythymidin ligiert werden. Die Erzeugung des A-Überhangs erfolgt bevorzugt dann, wenn die 5'-Enden der Primer G oder C sind.

Zur Klonierung so erzeugter PCR-Produkte wurden das T-Cloning-Kit der Firma MBI Fermentas und das pGEM-TEasy PCR Cloning Kit der Firma Promega gemäß den beiliegenden Anleitungen verwandt. In beiden Kits finden Vektoren Verwendung, die mit *EcoRV* gespalten und thymidinyliert worden sind. Im Kit der Firma MBI Fermentas ist das Plasmid pUC57, im Kit der Firma Promega das Plasmid pGEM-5Zf(+) enthalten. Die Klonierungsstelle dieser Vektoren befindet sich in einem modifizierten β -Galactosidase-Gen, so daß eine Blau-Weiß-Selektion gemäß Kapitel 1.2.19 durchgeführt werden konnte.

Da andere Polymerasen die Adenylierungsaktivität der *Taq*-Polymerase nicht besitzen, sondern stumpfe Enden erzeugen, konnten deren PCR-Produkte in einen mit *EcoRV* oder einer anderen stumpfe Enden erzeugenden sequenzspezifischen Endonuklease geöffneten Vektor kloniert werden.

1.2.19 Blau-Weiß-Färbung zur Vorselektion auf rekombinante Plasmide

Mit den in Tabelle 17 aufgeführten Plasmiden konnte eine Vorselektion mit Hilfe der β -Galactosidase-Aktivität in nicht rekombinanten Plasmiden vorgenommen werden, da ihre Klonierungsstellen innerhalb eines modifizierten β -Galactosidasegens liegen. Zur Durchführung der Vorselektion wurden IPTG zur Induktion der Genexpression und X-Gal als Substrat der β -Galactosidase gemäß Tabelle 7 auf Agarplatten ausgebracht wo sie einziehen konnten, bevor die Bakterien aus einem Transformationsansatz gemäß Kapitel 1.2.20 ausgestrichen wurden. Bakterienkolonien, die keine Blaufärbung zeigten, wurden als solche mit rekombinanten Plasmiden angesehen und bevorzugt untersucht. Zuweilen waren Kolonien, die nur eine schwache Blaufärbung aufwiesen, erkennbar an blauem Zentrum und weißem Hof, ebenfalls erfolgversprechend.

Tabelle 17: Plasmide, die eine Blau-Weiß-Selektion erlauben

Plasmid
pBIN19
pBluescript SK
pBluescript SKII
pGEM-5Zf(+)
pUC 18
pUC19
pUC57

1.2.20 Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Unter Kompetenz von Bakterien versteht man die Fähigkeit, extrazellulär befindliche DNA aufzunehmen, diese zu erhalten, zu replizieren und Genexpression daran vorzunehmen. Einige Bakterienarten besitzen diese Fähigkeit unter natürlichen Bedingungen, andere, wie *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* nur unter artifizialen Bedingungen, zum Beispiel in Anwesenheit hoher Konzentrationen schwerer einwertiger und zweiwertiger Kationen, so daß diese Bedingungen vor der Transformation eingestellt werden müssen. In dieser Arbeit wurden chemisch kompetente *Escherichia coli*-Zellen nach der Calciumchlorid-Methode (Inoue *et al.*, 1990) verwandt.

100 μ L chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen wurden mit der Hälfte eines Ligationsansatzes gemäß Kapitel 1.2.17 (7,5 μ L) oder mit 0,2 – 0,5 μ L einer Plasmidlösung beliebiger Konzentration versetzt und auf Eis für bis zu 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Temperaturschock von 42 °C für 90 s mit sofortigem Abkühlen auf Eis für mindestens 3 min.

Tabelle 18: SOC⁺-Medium

Substanz	Menge
Trypton	20 g/L
Hefeextrakt	5 g/L
Natriumchlorid	500 mg/L
Kaliumchlorid	125 mg/L
pH 7,0 autoklavieren	
2M Glucoselösung	10 mL/L
1 M MgCl ₂ -Lösung	10 mL/L
1 M MgSO ₄ -Lösung	10 mL/L

Der Transformationsansatz wurde mit 900 μL SOC⁺-Medium (Tabelle 18, modifiziert nach Sambrook *et al.* (1989) verdünnt und für 30 min (Kanamycinresistenz) bzw. 45 min (Ampicillinresistenz) bei 37 °C im Roller inkubiert.

Der Ansatz wurde in drei Verdünnungsstufen (50 μL , 100 μL und Rest) auf LB-Agar mit dem korrekten Antibiotikum ausgestrichen.

Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz ohne DNA identisch behandelt und von diesem 50 μL auf LB-Agar ohne Antibiotikum und der Rest auf LB-Agar mit Antibiotikum ausgestrichen.

1.2.21 Transformation elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*

Natürlicherweise nicht kompetente Bakterien können auch in salzfreien Lösungen mit einem kurzen Puls eines starken elektrischen Feldes zur Aufnahme von DNA gezwungen werden. Haltbare, entsalzte *Agrobacterium tumefaciens*-Suspensionen wurden nach (Dower *et al.*, 1988) hergestellt.

40 μL elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens* wurden mit 0,2 – 0,5 μL einer Plasmidlösung beliebiger Konzentration versetzt und auf Eis für bis zu 60 min inkubiert. Anschließend erfolgte ein Elektroschock mit 2,5 kV, 200 – 400 Ω , 25 μF . Der Transformationsansatz wurde möglichst rasch mit 960 μL SOC⁺-Medium (Tabelle 18) verdünnt und für 2 h bei 28 °C im Roller inkubiert.

Der Ansatz wurde in drei Verdünnungsstufen (50 μL , 100 μL und Rest) auf YEB-Agar mit allen nötigen Antibiotika ausgestrichen.

Parallel dazu wurde ein Kontrollansatz ohne DNA identisch behandelt und von diesem 50 μL auf YEB-Agar ohne plasmidselektives Antibiotikum und der Rest auf YEB-Agar mit allen Antibiotika ausgestrichen.

1.2.22 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

1.2.22.1 Erdkultur

Die Pflanzen wurden in Töpfen von 6 cm Durchmesser und 6 cm Höhe (TEKU 6L) kultiviert. Als Kultursubstrat wurde Erde, Typ Mini-Tray (Einheitserde Werkverband e. V.) verwandt, die vor Gebrauch zweimal im Abstand von zwei Tagen im Autoklaven für 30 min auf 90 °C erhitzt wurde. Diese Maßnahme wurde zur Vernichtung von Schadinsekten, vor allem Trauermücken und Thripsen, und deren Eiern getroffen. Zusätzlich wurde

Tabelle 19: Klimabedingungen für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Erdkultur

Parameter	tags	nachts
Temperatur	24 °C	18 °C
Feuchtigkeit	65 %	75 %
Helligkeit	150 μE	0 μE
Licht-Dunkelperiode	14 h	10 h

auf jeden Topf eine Spatelspitze Carbofuran als insektizider Wirkstoff ausgestreut. Zur Kräftigung der Pflanzen wurde ein Korn Langzeitdünger pro Topf hinzugefügt. Die fertig vorbereiteten Töpfe wurden in ein Tablett mit gelochtem Boden (R+S, 30×50 cm) gestellt und dieses über Nacht in ein gleich großes nicht gelochtes und mit Wasser gefülltes Tablett plaziert, um die Erde mit Wasser zu tränken.

Die Samen wurden in einem Rahmen von 1 bis 1000 pro Topf ausgesät, wobei sich eine Dichte von > 50 pro Topf als nicht mehr sinnvoll erwies, wenn alle Pflanzen bis zur Samenreife kultiviert werden sollten.

Die Aussaat von einzelnen Samen wurde mittels eines angefeuchteten Zahnstochers vorgenommen, mit dem die Samen von einer glatten Unterlage leicht aufgenommen und auf der feuchten Erde abgestreift werden konnten. Nach der Aussaat oder dem Pikieren von Pflanzen aus Sterilkultur (siehe Kapitel 1.2.22.2) wurden die Tablett für etwa eine Woche mit einer transparenten Kunststoffhaube bedeckt.

Eine Kältebehandlung (Vernalisierung, Stratifizierung) von zwei Tagen bei 4 °C wurde vorgenommen, wenn ein gleichmäßiges Auskeimen der Samen erwünscht war.

Die Anzucht der Pflanzen wurde soweit nicht besonders angegeben in einer begehbaren Klimakammer bei Temperatur-, Feuchtigkeits- und Lichtverhältnissen wie in Tabelle 19 angegeben durchgeführt. Die Bewässerung erfolgte ein- bis zweimal in der Woche durch Einstellen des gelochten in ein wassergefülltes Tablett für etwa 15 – 90 min.

Die Gewinnung von Samen wurde wie in Kapitel 1.2.23 beschrieben durchgeführt.

1.2.22.2 Sterilkultur

Zur Sterilkultur von *Arabidopsis thaliana* wurden Petrischalen mit MS-Agar ohne Saccharose oder 2MS-Agar (Murashige und Skoog, 1962) verwandt.

Die Samen wurden vor der Aussaat mit Chlorgas wie in Kapitel 1.2.22.4 beschrieben oberflächensterilisiert.

Pro Platte wurden je nach Verwendungszweck 4 – 20 mg Samen (200 – 1000 Stück) ausgebracht.

Eine gleichmäßige Verteilung der Samen auf der Agaroberfläche wurde durch Aufnehmen der oberflächensterilisierten Samen in 0,1 %igem sterilem Agar und Ausplattieren mit einem Drygalski-Spatel oder einer umgebogenen gelben Pipettenspitze erreicht.

Nach einer mindestens zweitägigen Kältebehandlung wurden die Samen in einer begehbaren Klimakammer bei den in Tabelle 20 angegebenen Bedingungen angezogen.

Tabelle 20: Klimabedingungen für die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

Parameter	tags	nachts
Temperatur	23 °C	23 °C
Helligkeit	50 – 70 µE	0 µE
Licht-Dunkelperiode	16 h	8 h

Tabelle 21: 2MS-Agar

Substanz	Menge
MS-Salzmischung (Duchefa)	variabel je nach Charge
Saccharose	2 % (w/v)
Agar	7 % (w/v)
pH 5,7 mit Kaliumhydroxid	

Nach etwa 14 Tagen konnten die Pflanzen in Erde pikiert werden. In der Periode zwischen 14 und 21 Tagen nach der Keimung wurden Induktionsversuche an den Pflanzen durchgeführt.

1.2.22.3 Netzplatten und Induktion der Genexpression in Sterilkultur

Um Pflanzen auf Agar unter sterilen Bedingungen induzieren zu können, wurden die Petrischalen vor dem Befüllen mit feinmaschigem, hartem und sterilisiertem Nylongitter versehen, auf welches 25 mL Nährmedium pipettiert wurde. Mittels zweier zuvor am Gitter befestigter und aus der Petrischale herausragender Zwirnsfäden konnte die Agarmasse mitsamt Pflanzen angehoben und 500 – 2000 μ L einer sterilisierten, 12,5 – 50-fach konzentrierten Lösung darunter ausgebracht werden. Beim Aufsetzen der Agarmasse verteilte sich die Lösung selbsttätig über die Fläche der Netzplatten. Die Endkonzentrationen von Chemikalien zur Induktion sind in Tabelle 24 aufgeführt.

1.2.22.4 Oberflächensterilisation

Nachdem die herkömmliche Methode der Oberflächensterilisation mit halbverdünnter Hypochloritlösung nicht zufriedenstellend war, wurde die Gasphasensterilisation (Clough und Bent, 1998; Clough und Bent, 2000) angewandt, auf unsere Verhältnisse angepaßt und gemäß folgendem Protokoll verfahren:

Arabidopsissamen wurden in geeigneten Gefäßen (Kunststoff, 0,5 – 50 mL) mit geöffnetem Deckel in einen Exsikkator plaziert. Ein Becherglas mit etwa 100 mL konzentrierter Hypochloritlösung wurde dazugestellt und mit 5 mL konzentrierter Salzsäure versehen. Der Exsikkator wurde rasch geschlossen und etwas Vakuum angezogen, um den Exsikkator luftdicht zu verschließen. Es stellte sich heraus, daß nach 6 h eine ausreichende Sterilisation erreicht worden war. Eine Sterilisation über Nacht führte in seltenen Fällen zur Abtötung der Samen, eine Sterilisation von 4 h reduzierte den Keimtiter auf 1 – 5 Pilzkolonien pro 20 mg (1000 Stück) Arabidopsissamen. Ständer aus Papier führten wegen ihres hohen Anteils ungebleichter Fasern, die das Chlorgas absorbierten, zu einer vollständigen Aufhebung der Wirksamkeit dieser Methode.

1.2.23 Gewinnung von Samen aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Ernte von Samen einer einzelnen Pflanze wurden Aracons (Lehle Seeds, RoundRock, TX, USA) verwandt. Die Unterteile von Aracons wurden bei beginnender Blüte auf die Töpfe gestellt, die Blütenstände durch die zentrale Bohrung geführt und die Folien der Oberteile vorsichtig in die Unterteile gesetzt. Bei fortschreitender Samenreife wurden die Pflanzen aus der Klimakammer entfernt und im Gewächshaus getrocknet.

Zur Ernte von Samen aus mehreren Pflanzen wurden bei beginnender Fruchtreife die Fruchtstände der Pflanzen in Butterbrottüten aus Pergamentersatz gesteckt. Die Pflanzen wurden aus der Klimakammer entfernt und im Gewächshaus getrocknet.

Nach dem Trocknen, das je nach Witterung und Sonneneinstrahlung 1 – 3 Wochen dauerte, wurden die Samen durch leichten Druck auf die Tüten bzw. Aracons aus den Schoten freigesetzt und durch zweimaliges Sieben durch ein Nylonsieb mit 0,5 mm Maschenweite von Schotenresten und trockenen Blütenblättern weitgehend befreit.

Die gereinigten Samen wurden in verschlossenen Kunststoffgefäßen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

1.2.24 Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde in Anlehnung an Clough und Bent (1998) durchgeführt.

Dazu wurden *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen auf Erde wie in Kapitel 1.2.22.1 beschrieben bis zur beginnenden Blüte angezogen. Wenn eine erhöhte Anzahl an Blüten zur Transformation gewünscht war, wurden die ersten Blütenstände abgeschnitten, so daß jede Pflanze zwei bis drei sekundäre Blütenstände trieb.

Wenn an den Pflanzen die ersten Blüten erschienen waren, wurden *Agrobacterium tumefaciens* GV3101(pMP90), die zuvor mit dem gewünschten binären Vektor transformiert und kontrolliert worden waren, zunächst in einer 5-mL-Vorkultur in YEB mit Rifampicin, Gentamycin und Kanamycin angezogen. Die Vorkultur wurde vollständig in eine 500-mL-Hauptkultur überführt und diese über Nacht wie in Kapitel 1.2.2.4 beschrieben kultiviert.

Am folgenden Tag wurden die Bakterien bis zu einer OD_{600} von 1,8 bis 2,0 weiterkultiviert, durch Zentrifugation sedimentiert, einmal in Transformationslösung (Tabelle 22) gewaschen und zu einer OD_{600} von 0,8 in Transformationslösung resuspendiert.

Die Pflanzen wurden kopfüber in die *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension getaucht und etwas geschwenkt, um eine gute Benetzung zu erreichen, danach für zwei Tage mit einer transparenten Haube versehen und in die Klimakammer gestellt. Je nach Zustand der Pflanzen wurde die Tauchbehandlung im Abstand von einer Woche bis zu drei Mal wiederholt.

Die Samen wurden wie in Kapitel 1.2.23 beschrieben geerntet und in der F_1 -Generation in Sterilkultur auf Agar mit Antibiotikum auf Insertion der T-DNA selektiert. Überlebende Pflanzen wurden auf Erde pikiert, und die Samen nach dem Abblühen und Reifen individuell geerntet. Die F_2 -Generation wurde abermals auf Antibiotikaresistenz selektiert und von den Überlebenden pro F_1 -Linie 8 – 12 Pflanzen auf Erde pikiert. Die daraus hervorgehende F_3 -Generation wurde in Sterilkultur mit selektivem Antibiotikum auf Homozygotie

Tabelle 22: Transformationslösung

Substanz	Menge
Saccharose	5 %
Silwet L-77	0,05 % (v/v)

getestet. Homozygote Linien, erkennbar daran, daß sie keine kanamycinsensitiven Pflanzen mehr enthielten, wurden weiterverwandt.

1.2.25 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit *Pseudomonas syringae*

Pseudomonas syringae wurden wie in Kapitel 1.2.2.6 beschrieben angezogen.

Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 7700 ×g sedimentiert und in Infektionslösung zu einer OD₆₀₀ von 0,2 aufgenommen. Die Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer Spritze in die Blätter 2 – 3 Wochen alter auf Erde angezogener *Arabidopsis*-Pflanzen infiltriert.

Tabelle 23: Infektionslösung

Substanz	Menge
Magnesiumchlorid	10 mM
Silwet L-77	0,01 % (v/v)

1.2.26 Induktion der Genexpression von *Arabidopsis thaliana* in Erdkultur

Arabidopsis thaliana in Erdkultur wurden durch Besprühen mit wäßrigen Lösungen mittels handelsüblicher Sprühflaschen, die in der Lage waren, einen feinen Sprühnebel zu erzeugen, besprüht, bis die Pflanzen gut benetzt waren. Die Sprühbehandlungen wurden bei Bedarf in regelmäßigen Abständen wiederholt. Die Induktionslösungen zum Sprühen sind in Tabelle 24 zusammengestellt. Sie wurde für jede Sprühbehandlung frisch hergestellt. Wurden mehrere Substanzen gesprüht, so wurden Mischungen angesetzt.

Tabelle 24: Induktionslösungen zum Besprühen von *Arabidopsis thaliana*

Substanz	Menge
Salicylsäure	1 mM
N-Acetylphosphinothricin	200 mg/L
2,4-Dichlorophenoxyessigsäure	200 µM
BION	400 µM
Methyljasmonat	46 µM

1.2.27 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Die Blüten von *Arabidopsis thaliana* sind so aufgebaut, daß sie sich bereits während des Öffnens selbst bestäuben. Daher können Kreuzungen nur an unreifen Blüten im Knospenstadium vorgenommen werden, die zuvor emaskuliert werden müssen. Für eine Kreuzung wurden daher junge, kräftige Blütenstände ausgewählt, an denen bereits zwei bis drei Blüten geöffnet waren. Von diesen Blütenständen wurden die unteren zwei bis drei Knospen für die Kreuzung verwandt. Alle Manipulationen wurden mit Hilfe eines Binokulars durchgeführt.

Die zu kreuzende Blüte wurde mit einer feinen, weichen Federstahlpinzette so dicht wie möglich unterhalb der Kelchblätter ergriffen und festgehalten (siehe Abbildung 10). Mit einer scharfen, spitzen Präparationspinzette wurden die vier Kelchblätter nach schräg unten abgezogen. Auf die gleiche Weise wurde mit den vier Blütenblättern und den zwei langen und vier kurzen Antheren verfahren, wobei die Fruchtanlage nicht beschädigt werden durfte. Der Donorpflanze wurde dann ein frisches Staubblatt entnommen und der Pollen auf dem Pistill der emaskulierten Blüte abgestreift. Anschließend wurde mit dem Binokular überprüft, ob Pollen auf dem Pistill hängengeblieben war und wenn nötig die Bestäubung mit einem neuen Staubblatt wiederholt. Die gekreuzten Blüten wurden durch Entfernen der unterhalb liegenden Blüten und der oberhalb befindlichen ein bis zwei Knospen isoliert und der gekreuzte Blütenstand mit einem kleinen Umhängeschild markiert.

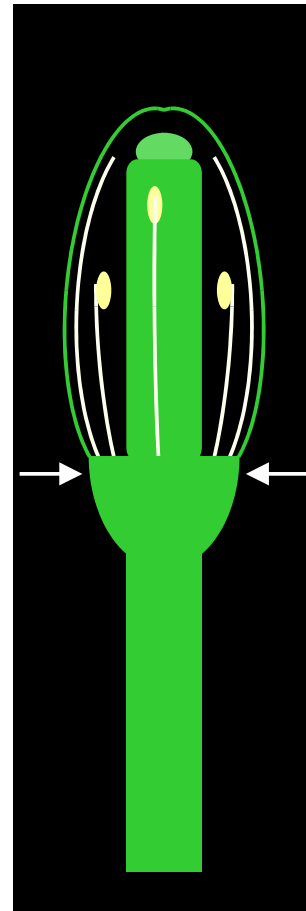


Abbildung 10: Schematische Darstellung einer Blütenknospe von *Arabidopsis thaliana*. Die Pfeile weisen auf die Stelle, an der die Knospe zur Kreuzung fixiert wird.

1.2.28 Mutagenese von *Arabidopsis thaliana*-Samen

Arabidopsis thaliana-Samen wurden einer chemischen Mutagenese mit Methansulfonsäureethylester (EMS, Ethylmethansulfonat, Sigma) in Anlehnung an Lightner und Caspar (1998) und Leyser und Furner (2000) unterzo-

Tabelle 25: Mutageneselösung

Substanz	Menge
Natriumphosphatpuffer, pH 5	100 mM
Dimethylsulfoxid	5 % (v/v)
Methansulfonsäureethylester	50 – 100 mM

gen. Da EMS eine flüchtige, stark mutagene Flüssigkeit ist, mußten alle Manipulationen unter dem Abzug durchgeführt und Schutzhandschuhe aus Nitril in doppelter Schicht getragen werden. Die Arbeitsflächen und Geräte wurden nach Beendigung der Mutagenese zur Dekontamination mit 100 mM Natriumthiosulfatlösung abgewischt, die Glas- und Kunststoffgeräte mit 100 mM Natriumthiosulfatlösung ausgewaschen und anschließend für 2 h mit fließendem Wasser gespült, bevor sie wie normales Laborgeschirr gereinigt werden konnten.

Zur Mutagenese wurden etwa 1000 Samen (20 mg) in eine 50 mL-Spritze eingewogen und über Nacht unter Schwenken in 30 mL 0,1 % Kaliumchlorid hydriert. Am folgenden Tag wurde die Mutagenese in 50 – 100 mM EMS für 3 – 5 h durchgeführt. Die EMS-Lösung wurde in einen bereitstehenden Becher mit kristallinem Natriumthiosulfat entsorgt und die Samen dreimal mit 100 mM Natriumthiosulfat gewaschen und das EMS dadurch deaktiviert. Die auf diese Weise hergestellten M₁-Samen wurden anschließend in 0,1% Agar aufgenommen, auf Erde ausgebracht und wie in Kapitel 1.2.22.1 beschrieben kultiviert.

Ein erster Indikator für eine erfolgreiche Mutagenese war das Auftreten von abweichend gefärbten Sektoren in den Blättern der M₁-Pflanzen, die in 1 – 10 von 1000 Pflanzen auftreten sollten (Lightner und Caspar, 1998; Leyser und Furner, 2000).

Nach Selbstbefruchtung wurden die Samen geerntet und die Folgegeneration M₂ auf Mutanten untersucht. Auch in der M₂-Generation wurde der Erfolg der Mutagenese am Auftreten von bleichen oder abweichend geformten Pflanzen kontrolliert.

1.2.29 Histochemische Färbung zum Test auf β -Glucuronidaseaktivität

Pflanzenteile wurden durch Vakuumbehandlung mit GUS-Färbelösung infiltriert und über Nacht bei 37 °C in Färbelösung inkubiert. Nach mehreren Waschungen mit Ethanol, die zur Entfernung des Chlorophylls dienten, wurden die gefärbten Pflanzenteile wie in Kapitel 1.2.35 beschrieben fotografisch dokumentiert.

Tabelle 26: GUS-Färbelösung

Substanz	Menge
Natriumphosphatpuffer, pH 7,2	50 mM
Kaliumferrocyanat	500 μ M
Kaliumferricyanat	500 μ M
X-Gluc	2 mM

1.2.30 Quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase

50 – 100 mg Blattmaterial wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen mit 100 μ L GUS-Ex-Puffer (Tabelle 27) mittels eines passenden Pistills und einer Bohrmaschine fein zerkleinert. Nach Zugabe von weiteren 200 μ L GUS-Ex-Puffer wurden die unlöslichen Reste durch Zentrifugation für 20 min bei 10.000 \times g sedimentiert und der Überstand zur weiteren Bearbeitung in neue Gefäße überführt.

Der Proteingehalt des Aufschlusses wurde nach Bradford (1976) bestimmt.

Die Bestimmung der Enzymaktivität wurde in Anlehnung an die Anleitungen von Jefferson (Jefferson, 1987a; Jefferson, 1987b; Jefferson *et al.*, 1987) vorgenommen. In der Regel reichten 0,2 – 1 μ g Gesamtprotein aus, um eine ausreichende und nicht zu starke Umsetzung des Substrates während einer Inkubationszeit von 30 – 60 min zu erzielen.

Im Einzelnen wurden zur Proteinbestimmung Mikrotiterplatten mit rundem Boden verwandt, in die 0,5 – 4 μ L der Proteinextrakte eingesetzt wurden. Zur Eichung wurden 1, 4 und 8 μ g BSA verwandt und ein Nöpfchen der Mikrotiterplatte als Blindwert ohne Protein gelassen. Alle Proben einschließlich Blindwert wurden mit 200 μ L Bradford-Reagenz (RotiQuant, Roth, 1:5 verdünnt) versetzt und nach fünfminütiger Inkubation bei 595 nm photometrisch mit einem Plattenlesegerät (Dynex MRX) gemessen.

Für die Bestimmung der Enzymaktivität wurden gleiche Proteinmengen in Mikrotiterplatten mit flachem Boden eingesetzt und die unterschiedlichen Volumina mit GUS-Ex-Puffer zu einem Endvolumen von 100 μ L aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 μ L 4 mM MUG-Lösung (Tabelle 28) erfolgte eine Vorinkubation für 10 – 15 min bei 37 °C. Danach wurde die Hälfte des Reaktionsansatzes mit 100 μ L 200 mM Natriumcarbonatlösung abgestoppt. Die verbleibende Hälfte wurde für 30 – 60 min weiter inkubiert, danach ebenfalls abgestoppt und die Fluoreszenz des durch die enzymatische Aktivität der β -Glucuronidase entstanden Methyl-

Tabelle 27: GUS-Ex-Puffer

Substanz	Menge
500 mM Natriumdihydrogenphosphatlg.	50 mL/L
500 mM Dinatriumhydrogenphosphatlg.	50 mL/L
500 mM EDTA, pH 8	20 mL
Triton X-100	0,1 % (v/v)
Sarkosyl	0,1 % (w/v)
Unmittelbar vor Gebrauch mit 5 μ L 2-Mercaptoethanol pro 10 mL Puffer versetzen	

Tabelle 28: MUG-Lösung

Substanz	Menge
Methylumbelliferylglucuronid	40 mM
lösen in Dimethylformamid lagern bei -20 °C unmittelbar vor Gebrauch 1:10 mit GUS-Ex-Puffer verdünnen	

Gleichung 4: Berechnung der spezifischen Enzymaktivität der β -Glucuronidase

$$A = \frac{(F_2 - F_1) \cdot 50 \text{ pmol MU}}{t \cdot m \cdot F_{50 \text{ pmol MU}}}$$

A----- Enzymaktivität [pmol MU min⁻¹ mg Protein⁻¹]

F₁----- Fluoreszenz nach der Vorinkubation

F₂----- Fluoreszenz nach der Hauptinkubation

t----- Dauer der Hauptinkubation [min]

m----- Gesamtproteinmenge [mg]

F_{50 pmol MU}- Fluoreszenz des 250 nm-Fluoreszenzstandards

umbelliferons im Fluorimeter (CytoFluor Multi-Well Plate Reader Series 4000, PerSeptive Biosystems) bei 360 nm Excitation und 460 nm Emission. Als Standards wurden Lösungen von 10 μ M, 1 μ M, 250 nM und 50 nM Methylumbelliferon verwandt.

Die Berechnung der β -Glucuronidaseaktivität erfolgte nach Gleichung 4. Zur Vereinfachung der Berechnung wurde eine Excel-Tabelle programmiert, die unter <http://www.ubpb.gwdg.de/~wbrenne/mugtab.xls> zu laden ist. Ein detailliertes Protokoll ist unter <http://www.ubpb.gwdg.de/~wbrenne/mugtest.pdf> abgelegt.

1.2.31 Extraktion von DNA aus *Arabidopsis thaliana*

1.2.31.1 Prozedur für hochwertige DNA

Die Extraktion von DNA aus *Arabidopsis thaliana* erfolgte gemäß Fulton *et al.* (1995).

Unmittelbar vor Beginn der Präparation wurde DNA-Präparationspuffer gemäß Tabelle 31 vorbereitet. Dazu wurden 50 – 100 mg Blattmaterial in einem 1,5-mL Reaktionsgefäß mit einem dazu passenden Pistill und einer Bohrmaschine in Gegenwart von 200 μ L Präparationspuffer zerkleinert, danach weitere 550 μ L Präparationspuffer zugegeben, gründlich durchmischt und für 30 – 120 min bei 65 °C inkubiert. Sodann wurden die Proben mit 750 μ L Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gründlich gemischt und für 5 min bei 10.000 \times g zentrifugiert. Ohne dabei Anteile der weißlichen Interphase mitzunehmen, wurden

von der oberen Phase wurden 500 μ L in ein neues Gefäß überführt und mit 400 μ L –20 °C kaltem Isopropanol durch Schwenken gut vermischt. Durch Zentrifugation bei 10.000 \times g für 5 min wurde die präzipitierte DNA sedimentiert, der Überstand mit einer Pipette vollständig entfernt und das Sediment mit 750 μ L 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstands wurde die DNA bei 65 °C getrocknet, bis das Sediment glasig erschien. Die DNA wurde in 30 – 50 μ L TE aufgenommen und durch Inkubation bei 65 °C für 15 min gelöst. Die Bestimmung der DNA-Konzentration und Abschätzung der Qualität erfolgte wie in Kapitel 1.2.8 beschrieben.

Die auf diese Weise gewonnene DNA kann für PCR und Southern-Blot-Analysen eingesetzt werden. Letztere Methode wurde aber in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Tabelle 29: DNA-Extraktionspuffer

Substanz	Menge
Sorbit	350 mM
Tris	100 mM
EDTA	5 mM
pH 7,5 mit Salzsäure	

Tabelle 30: Kernlysepuffer

Substanz	Menge
Tris	200 mM
EDTA	50 mM
Natriumchlorid	2 M
Cetyltrimmoniumbromid	2 %

Tabelle 31: DNA-Präparationspuffer

Substanz	Menge
DNA-Extraktionspuffer	2,5 Teile
Kernlysepuffer	2,5 Teile
5% Sarcosyllösung	1 Teil
Natriumsulfit	0,33 % (w/v)

1.2.31.2 Schnellextraktion von DNA für PCR-Zwecke

Mit dieser Prozedur konnte DNA aus wesentlich geringeren Mengen an Ausgangsmaterial gewonnen werden. Ein Keimling reichte aus, um genügend DNA für mehrere PCR-Reaktionen zu gewinnen.

Ein kleines Rosettenblatt wurde in einem 1,5-mL-Reaktionsgefäß mit Hilfe eines passenden Pistills und einer Bohrmaschine unter flüssigem Stickstoff fein zerkleinert und anschließend 700 µL DNA-Extraktionspuffer Mini (Tabelle 32) zugegeben. Die Suspension wurde gut vermischt und durch Zentrifugation für 1 min bei 10.000 ×g sedimentiert. 600 µL des Überstandes wurden mit 600 µL Isopropanol versetzt, kurz vermischt und die präzipitierte DNA durch Zentrifugation für 5 min bei 10.000 ×g sedimentiert. Der Überstand wurde entfernt, das Sediment bei 65 °C getrocknet bis es glasig erschien und anschließend in 20 – 100 µL TE aufgenommen.

Diese Präparationen hatten stets eine bräunliche Farbe und waren nicht sehr lange haltbar. PCR-Reaktionen mit diesen Präparationen ergaben eine geringere Ausbeute an Produkt. Aus diesen Gründen wurde diese Methode nur für große Mengen unterschiedlicher Proben für analytische Zwecke eingesetzt.

Tabelle 32: DNA-Extraktionspuffer Mini

Substanz	Menge
Tris	200 mM
Natriumchlorid	250mM
EDTA	25 mM
Natriumdodecylsulfat	0,5 % (w/v)
pH 8,0 mit Salzsäure	

1.2.32 Extraktion von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Extraktion von RNA aus *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst verschiedene Methoden erprobt.

Das Protokoll von PeqLab mit der PeqGold-Flüssigkeit ergab zwar hohe Ausbeuten, jedoch waren Qualität und Reinheit mangelhaft und die Banden in der Northern-Analyse (Kapitel 1.2.33) nicht quantifizierbar.

Das Qiagen RNA Plant Mini Kit lieferte nur bei Pflanzen aus Sterilkultur zuverlässig hohe Ausbeuten von guter Qualität, versagte aber völlig bei der Extraktion von RNA aus Pflanzen, die auf Erde angezogen worden waren.

Das Invitex RNA Plant Spin Mini Kit lieferte zwar bei Pflanzen aus Sterilkultur etwas geringere Ausbeuten, war jedoch in der Lage, qualitativ zufriedenstellende RNA auch aus Pflanzen zu gewinnen, die auf Erde kultiviert worden waren, wenn auch mit relativ geringen Ausbeuten.

In der Folge wurde das Kit der Firma Invitex eingesetzt.

Die Quantifizierung erfolgte wie in Kapitel 1.2.8 beschrieben.

Tabelle 33: 10× MEN

Substanz	Menge
MOPS	200 mM
Natriumacetat	50 mM
EDTA	10 mM
pH 7,0 mit Natriumhydroxidlösung	

Tabelle 34: Herstellung von denaturierenden Agarosegelen

Substanz	Menge
Agarose	1,5 g
H ₂ O	100 mL
<ul style="list-style-type: none"> Gefäß auswiegen Agarose durch Aufkochen und Schwenken vollständig auflösen Wasserverlust durch Zugabe von Wasser bis zum ursprünglichen Gewicht ausgleichen 	
H ₂ O	12,5 mL
10× MEN	15 mL
37% Formaldehyd	22,5 mL

1.2.33 Expressionsstudien anhand des Nachweises spezifischer mRNA durch DNA-Fragmente

1.2.33.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Die Durchführung der Gelelektrophorese von RNA unter denaturierenden Bedingungen erfolgte in Anlehnung an (Sambrook *et al.*, 1989). Die aus *Arabidopsis thaliana* extrahierte RNA wurde nach photometrischer Quantifizierung gemäß Kapitel 1.2.8 zu gleichen Mengen aliquotiert, mit Wasser zum geringstmöglichen Volumen aufgefüllt und mit RNA-Probenpuffer (Tabelle 35) versetzt. Nach mindestens fünfmi-

Tabelle 35: Zusammensetzung des RNA-Probenpuffers

	2×	3×	4×	5×
Farbmarker	120 µL	100 µL	240 µL	300 µL
0,5 M EDTA pH 8,0	80 µL	80 µL	160 µL	200 µL
10× MEN	2000 µL	3333 µL	4000 µL	5000 µL
87% Glycerin	800 µL	1200 µL	800 µL	800 µL
Formamid	5691 µL	4286 µL	2142 µL	377 µL
Formaldehyd	1329 µL	1001 µL	2658 µL	3323 µL

Lagerung bei 4 °C

Unmittelbar vor Verwendung ein Aliquot mit 6 µL/mL 10%iger Ethidiumbromidlösung (Roth) versetzen.

nütiger Denaturierung bei 65 °C und Schockkühlung auf Eis wurden die Proben in die Taschen von 1%igen denaturierenden Agarose-Formaldehydgelen wie in Tabelle 34 beschrieben geladen. Die Taschen wurden mit Laufpuffer (1× MEN, Tabelle 33) randvoll aufgefüllt. Anschließend wurde die Elektrophorese unter Gleichspannung mit Pluspol am unteren Ende des Gels bei einer konstanten Leistung von 12 W pro Gel und einem Zeit-Spannungs-Integral von 0,2 kVh durchgeführt. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA auf dem UV-Transilluminator visualisiert und fotografiert.

Zur vereinfachten Berechnung der Aliquotierung wurde eine Excel-Tabelle programmiert, die unter <http://www.ubpb.gwdg.de/~wbrenne/rna.xls> zu laden ist.

1.2.33.2 Übertragung der gelelektrophoretisch aufgetrennten RNA auf Nylonmembran („Northern-Blot“)

Die Übertragung der RNA vom Gel auf Nylonmembran erfolgte durch Kapillartransfer nach dem in Abbildung 11 gezeigten Schema (Sambrook *et al.*, 1989) mit 10×SSC als Transfermedium. Als Filterpapier wurde das Papier MN 218 B der Firma Macherey & Nagel verwendet. Am folgenden Tag, wurde die an die Nylonmembran gebundene RNA mit dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und als Bild dokumentiert. Die Membran wurde in einem Briefumschlag verpackt und für mindestens 2 h bei 80 °C gebacken, um die RNA an den Nylonfasern der Membran zu fixieren.

Tabelle 36: 20× SSC

Substanz	Menge
Natriumcitrat	175,3 g/L
Natriumchlorid	88,2 g/L
pH 7,0	

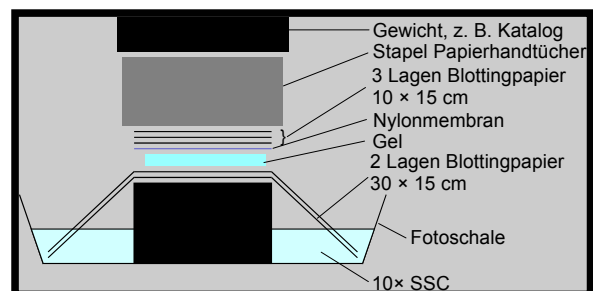


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Kapillarblotapparatur

1.2.33.3 Herstellung radioaktiv markierter genspezifischer DNA-Sonden

Die Sonden zur Hybridisierung mit Northern-Blots wurden nach der Random-Prime-Methode hergestellt (Feinberg und Vogelstein, 1983). Dabei wurde ein Gemisch von kurzen DNA-Fragmenten aller möglichen Basensequenzen in einer DNA-Polymerasereaktion als Primer eingesetzt, die mit $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP als radioaktiv markiertem Nukleotid durchgeführt wurde. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 39 aufgeführt.

Nach einer Inkubationszeit von mindestens 1 h wurde die radioaktiv markierte DNA durch Fällung wie folgt gereinigt: Nach Zugabe von 50 μL STE (Tabelle 39, Sambrook *et al.*, 1989) und 250 μL vergälltem Ethanol wurde eine Kältebehandlung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ für mindestens 1 h durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde mittels Zentrifugation bei $10.000 \times g$ für

Tabelle 39: Zusammensetzung eines Ansatzes zur radioaktiven Markierung von DNA-Fragmenten

Lösung	Menge
DNA-Fragment aus Gelelution	2 μL
Random-Primer, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	1,4 μL
H ₂ O	29,6 μL
5 min 95 °C, dann auf Raumtemperatur stellen	
dNTP –A-Mix	6 μL
10× Reaktionspuffer (MBI)	5 μL
Klenow exo^- (MBI)	1 μL
$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP	5 μL

Tabelle 39: dNTP –A-Mix

Substanz	Menge
Desoxycytosintriphosphat	0,5 mM
Desoxyguanosintriphosphat	0,5 mM
Desoxythymidintriphosphat	0,5 mM

Tabelle 39: STE

Substanz	Menge
Natriumchlorid	100 mM
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
pH 8,0	

20 min sedimentiert, der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Die ins Sediment inkorporierte Radioaktivität wurde mittels eines Geigerzählers (Survey Meter Model 3, Ludlum Measurements, Inc., Lieferant AGS) mit der im Überstand verbliebenen verglichen. Die radioaktive Markierung wurde dann als erfolgreich beurteilt, wenn im Sediment die 1,5 – 2-fache Impulszahl des Überstandes gemessen wurde. Das Sediment wurde in 50 µL TE aufgenommen, mit 50 µL gescherter Heringssperm-DNA-Lösung (10 µg/µL) versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Der Ansatz wurde entweder auf Eis gekühlt oder unmittelbar nach Entnahme aus dem Heizblock oder dem Wasserbad verwandt.

1.2.33.4 Hybridisierung von Northern-Blots mit genspezifischen radioaktiv markierten DNA-Sonden

Die nach Kapitel 1.2.33.2 behandelten Nylonfilter wurden zunächst in 10× SSC rehydriert. Gestrippte Nylonmembranen wurden ohne weitere Behandlung luftblasenfrei in eine Glas-Hybridisierungsröhre eingelegt und für mindestens 1 h bei 42 °C im Hybridisierungsofen mit 10 – 15 mL Dextransulfat-Hybridisierungslösung (Tabelle 40) vorhybridisiert. Nach Zugabe der durch Hitze denaturierten radioaktiv markierten Sonde erfolgte eine Inkubation bei derselben Temperatur über Nacht.

Tabelle 40: Dextransulfat-Hybridisierungslösung

	Menge
deionisiertes Formamid	50 % (v/v)
Dextransulfat	10 % (w/v)
Natriumdodecylsulfat	1 % (w/v)
Natriumchlorid	1 M
Natriumphosphatpuffer, pH 6,8	50 mM

Die Hybridisierungslösung wurde nach der Inkubation in ein Auffanggefäß abgegossen und zur Wiederverwendung bei –20 °C, zum Abklingen bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Nylonmembran wurde zwei- bis dreimal in der Hybridisierungsröhre mit 2×SSC + 0,1% SDS (siehe Tabelle 36) gespült und anschließend bis zum Erreichen einer gleichbleibenden Restaktivität, gemessen mit einem Endflächenzählgerät (Contamat FHT 111M, Eberline) in einer absteigenden Konzentrationsreihe mit 1×SSC + 0,1% SDS, 0,5×SSC + 0,1% SDS und 0,1×SSC + 0,1% SDS für jeweils 20 min bei 65 °C im Rotationswasserbad (Belly Dancer, Stovall Life Sciences, Inc., Greensboro, NC, USA) gewaschen.

Die fertig gewaschenen Filter wurden in handelsübliche Gefrierfolie eingeschweißt und mindestens bis zum folgenden Tag auf Phosphoimagerplatten exponiert.

Die Platten wurden mit einem speziellen Phosphoreszenzmeßgerät (Fujifilm BAS-1000) eingelesen und mit geeigneter Auswertungssoftware (TINA 2.09f, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH; AIDA 2.11, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH) am Computer bearbeitet und quantifiziert.

1.2.33.5 Entfernung von Sonden aus hybridisierten Nylonmembranen („Strippen“)

Hybridisierte DNA-Sonden wurden durch 20 – 30-minütige Inkubation im Rotationswasserbad (Belly Dancer, Stovall Life Sciences, Inc., Greensboro, NC, USA) bei 75 °C in 0,1% SDS aus den Nylonmembranen ausgewaschen. Die Membranen konnten nach Vorhybridisierung für neue Hybridisierungen wie in Kapitel 1.2.33.4 beschrieben verwandt werden.

1.2.34 Reverse Transkription von RNA

Zur reversen Transkription von RNA wurde das 1st strand cDNA Synthesis Kit mit der PowerScript™-Transkriptase der Firma Clontech verwandt. Hierbei wurden zunächst 1,5 µg Gesamt-RNA und je 2 pmol beider genspezifischer Primer mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 11 µL aufgefüllt, für 10 min bei 70 °C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Zu diesem Ansatz wurden 4 µL des zum Kit gehörenden Reaktionspuffers, 2 µL dNTP-Mix (je 10 mM), 2 µL DTT (im Kit befindlich) und schließlich 1 µL reverse Transkriptase hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 50 – 90 min bei 42 °C wurde die Reaktion durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C abgebrochen und eine PCR mit dem Advantage 2 Polymerase Mix der Firma Clontech wie in Kapitel 1.2.12 beschrieben durchgeführt.

1.2.35 Fotografische Dokumentation und Bildbearbeitung

Für Standardfotografie wurde eine Digitalkamera (Nikon CoolPix) oder eine Spiegelreflexkamera (Canon AE-1 Program) mit 24–50 mm-Zoomobjektiv (Sigma UC Zoom) und Kodak EliteChrome Diafilm ISO 200/24° verwandt.

Für Vergrößerungsaufnahmen wurde an der Spiegelreflexkamera ein Balgengerät (Canon Bellows FL) montiert und ein Kodak EliteChrome Diafilm ISO 400/27° verwandt. Damit war ein Abbildungsmaßstab von bis zu 2:1 erreichbar.

Alternativ wurde für Vergrößerungsaufnahmen eine an ein Binokular angeschlossene CCD-Kamera mit zugehöriger Software verwendet.

Die Dias wurden mittels eines Durchlichtscanners (Epson GT-9600) in digitales Format überführt.

Die Bildbearbeitung (Helligkeit, Kontrast, Ausschneiden, Vergrößern, Verkleinern) erfolgte mit Adobe Photoshop (Adobe Systems Incorporated) und Corel PhotoPaint (Corel Corporation).

Beschriftungen, Linien, Pfeile etc. wurden mit Corel Draw (Corel Corporation) eingefügt und die Bilder zum Einfügen in diese Arbeit ins WMF-Format konvertiert.

1.2.36 Rechnergestützte Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen

Für die Darstellung von Plasmiden und deren Restriktionsschnittstellen sowie für die Simulation enzymatischer Reaktionen an Plasmiden wurde anfangs die Software Clone Manager 4.01 der Firma Scientific & Educational Software verwendet. Im Verlauf dieser Arbeit wurde diese Software durch die erheblich leistungsfähigere Vector NTI Suite der Firma Informax Incorporated, zuletzt in der Version 6.0.5 ersetzt. Diese Software bot neben der Analyse von Restriktionsschnittstellen auch die Analyse von Oligonukleotiden, Primerbindestellen Translation, eine Datenbank für Nukleinsäuren, Proteine, Enzyme, Oligonukleotide, Größenstandards und Zitate. Mittels weiterer Programme waren Alignments und die Zusammensetzung von Sequenzdaten möglich.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Barnase als Suizidgen

1.3.1.1 Konstruktion eines binären Vektors mit einer RNase als Suizidgen unter der Kontrolle eines Promotors mit einem *as-1*-Element

Für die Suche nach Mutanten, die das *as-1*-Element nicht mehr aktivieren können, wurde als ein möglicher Ansatz die Steuerung eines konstitutiven Suizidgens durch das *as-1*-Element gewählt. Als Suizidgen kam hierbei die Barnase, eine RNase aus *Bacillus amyloliquefaciens*, zum Einsatz. Zur Konstruktion eines binären Vektors zur Pflanzentransformation mit der Barnase unter der Kontrolle eines *as-1*-Elements und mit der β -Glucuronidase als zusätzlichem Reportergen unter der Kontrolle eines fünffach wiederholten *as-1*-Elements wurden die folgenden Klonierungsschritte unternommen:

Um das Barnasegen zunächst mit dem CaMV 35S-Promotor zu fusionieren, wurde aus dem bereits bestehenden Plasmid pVE113 ein 472 bp langes Fragment, das die codierende Sequenz der Barnase enthielt, mit den Enzymen *Bam*HI und *Pst*I ausgeschnitten und in die mit *Bam*HI und *Pst*I geöffnete Klonierungsstelle des Vektors pUCA7 ligiert. Der so entstandene Vektor pUCA7-Barney wurde in den *Escherichia coli*-Stamm MC1061 transformiert, in dem eine ungewollte Expression der Barnase, die zum Absterben der Bakterien geführt hätte, nicht stattfinden konnte.

In einem zweiten Klonierungsschritt wurde ein 783 bp langes Fragment aus pUCA7-Barney mit den Enzymen *Eco*32I und *Hind*III ausgeschnitten. Dieses Fragment, das ein einzelnes *as-1*-Element, die codierende Region der Barnase und den *ocs*-Terminator enthielt, wurde in die mit *Eco*32I und *Hind*III geöffnete Klonierungsstelle des Vektors pBluescriptSK ligiert. Auch dieses Konstrukt pSK-Barney mußte in den *Escherichia coli*-Stamm MC1061 transformiert werden.

Im letzten Schritt wurden in einer Dreifragmentligation ein 787 bp langes Fragment, aus pSK-Barney und ein 2480 bp langes Fragment aus dem bereits bestehenden Plasmid p5 \times *as1*-GUS (A. Thiele, unveröffentlicht), die beide mit *Eco*RI und *Hind*III ausgeschnitten worden waren, in den mit *Eco*RI geöffneten binären Vektor pBIN*, der den Barnaseinhibitor Barstar unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors enthält, ligiert. Der so entstandene Vektor pBIN*GuBa (Abbildung 12) wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana* wie in Kapitel 1.2.24 beschrieben verwandt.

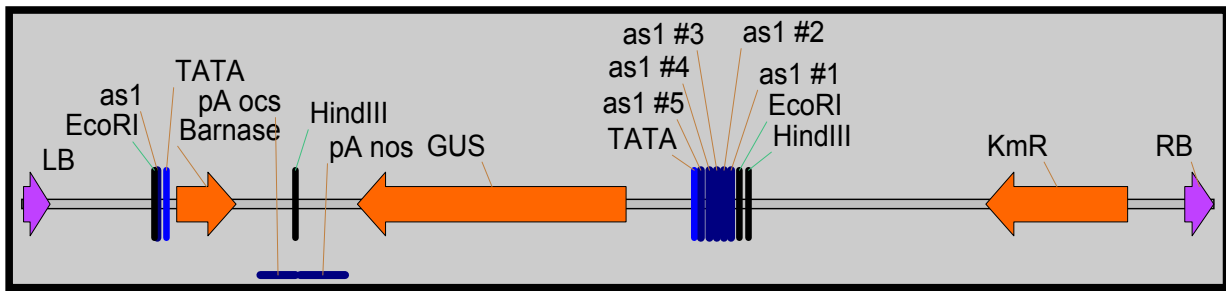


Abbildung 12: T-DNA-Region des Vektors pBIN*GuBa

Drei Transformationen mit diesem Vektor lieferten 10 kanamycinresistente Pflanzen, von denen jedoch keine eine β -Glucuronidaseaktivität aufwies, und keine einen durch Salizylsäure und Auxin induzierbaren Suizid zeigte. Damit wurde dieser Ansatz aufgegeben, da das Konstrukt anscheinend letal war. Der Letalitätsverdacht wurde durch die Beobachtung erhärtet, daß viele Pflanzen nach der Transformation mit dem GuBa-Konstrukt an den mit der Agrobacteriensuspension in Kontakt gekommenen Pflanzenteilen kleine Läsionen und verkrüppelte Schoten entwickelten, was bei der parallel stattfindenden Transformation mit dem 5GuDe-Konstrukt (Kapitel 1.3.3) nicht beobachtet wurde.

1.3.2 Deacetylase als konditionelles Suizidgen unter der Kontrolle eines Promotors mit einem einzelnen *as-1*-Elements

1.3.2.1 Konstruktion eines binären Vektors mit der Deacetylase unter der Kontrolle eines Promotors mit einem einzelnen *as-1*-Elements

Ein weiterer Ansatz für die Suche nach Mutanten, die das *as-1*-Element nicht mehr aktivieren können, war die Verwendung eines konditionellen Suizidgens. Hierfür wurde eine Deacetylase aus *Stenotrophomonas spec.* (Bartsch *et al.*, 1996) verwandt. Dieses Enzym ist in der Lage, die ungiftige Chemikalie N-Acetyl-Phosphinothricin (NAcPT) durch Deacetylierung in das für Pflanzen toxische Phosphinothricin umzusetzen. Auf diese Weise tritt ein Absterben der Pflanzen erst in Gegenwart von NAcPT ein.

Zur Konstruktion dieses Vektors wurden mit den in der Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Plasmiden pSK-(–90)-Deac und pTTL-*as1*-GUS/INT folgende Klonierungsschritte durchgeführt:

Ein 1706 bp großes Fragment aus pSK-(–90)-Deac und ein 2377 bp großes Fragment aus pTTL-*as1*-GUS/INT, die beide mit *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten worden waren, wurden in einer Dreifragmentligation in den mit *EcoRI* geöffneten Vektor pBIN19 ligiert. Das auf diese Weise entstandene Plasmid pBIN19-1×*as1*(GuDe) (Abbildung 13) mit der Deacetylase und der β -Glucuronidase unter der Kontrolle eines einzelnen *as-1*-Elements wurde für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wie in Kapitel 1.2.24 beschrieben verwandt.

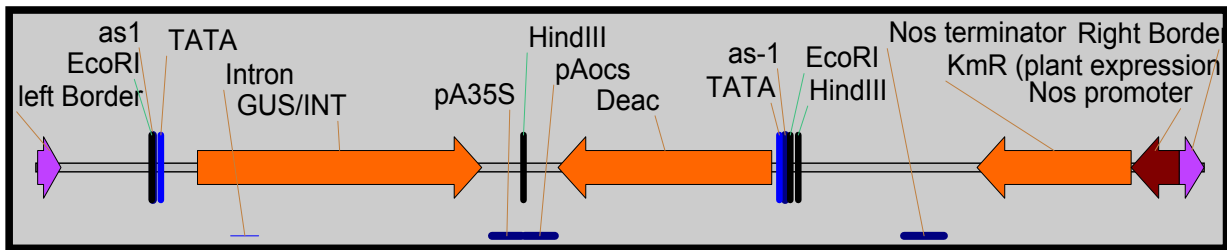


Abbildung 13: T-DNA-Region des Vektors pBIN19-1*as-1(GuDe)

Aus dieser Transformation ging eine große Anzahl kanamycinresistenter Pflanzen hervor, von denen einige Linien (1GuDe-Linien) charakterisiert wurden.

1.3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der 1GuDe-Linien

An zehn der transgenen 1GuDe Linien wurde in der T_2 -Generation untersucht, ob sie den gewünschten Effekt des transgenen Konstrukts, nämlich das durch Salizylsäure und Auxin induzierbare Absterben in Gegenwart von NAcPT, zeigen.

Wie Abbildung 14 zeigt, konnte das Absterben in Gegenwart von NAcPT durch Salizylsäure oder das synthetische Auxin 2,4-D induziert werden. Die Ausprägung dieses Merkmals war jedoch von Linie zu Linie sehr unterschiedlich.

Alle Linien zeigten eine mehr oder weniger starke Vergiftung bereits im uninduzierten Zustand. Am stärksten trat dieser Effekt bei der Linie #32 hervor. Auch bezüglich des toxischen Effekts im induzierten Zustand unterschieden sich die Linien sehr stark: Während die Linien #23 und #25 im induzierten Zustand nur einen geringen Unterschied zur uninduzierten Kontrolle aufwiesen und alle Pflanzen noch lebten, waren die Pflanzen der Linien #28 und #29 unter Einfluß von Salizylsäure und NAcPT vollständig ausgebleicht und abgestorben.

Dieser Versuch zeigte aber auch, daß auf diese Weise keine Suche nach Signaltransduktionsmutanten durchführbar war. Dies lag vor allem an den folgenden zwei Gründen:

Erstens war der Unterschied zwischen uninduziertem und induziertem Zustand bei allen Linien zu gering, um ein verlässliches Absterben der *as-1*-aktivierenden und Überleben der *as-1*-aktivierungsdefizienten Pflanzen zu erzielen.

Zweitens dauerte das Absterben der Pflanzen mindestens drei Wochen. Nach dieser Zeit waren die mit Salizylsäure induzierten Pflanzen ohne NAcPT durch den toxischen Effekt der Salizylsäure bereits so weit geschädigt, daß die Überlebensrate nach dem Pikieren in Erde weniger als 10 % betrug. Meistens war das Gewebe, obwohl es grün und intakt erschien so stark aufgeweicht, daß die Pflanzen im Bereich des Hypokotyls von den Wurzeln abrissen. Auch bei den mit NAcPT behandelten uninduzierten Pflanzen war die Überlebensrate beim Pikieren nach drei Wochen gering.

Diese beiden Nachteile führten zu dem Schluß, daß ein Suizidexperiment zur Gewinnung von Signaltransduktionsmutanten nach einer Mutagenese mit den 1GuDe-Linien kaum Aussicht auf Erfolg haben könnte. Weitere Aufschlüsse über den Absterbephänotyp gaben die Experimente, die in Kapitel 1.3.3.5 beschrieben sind.

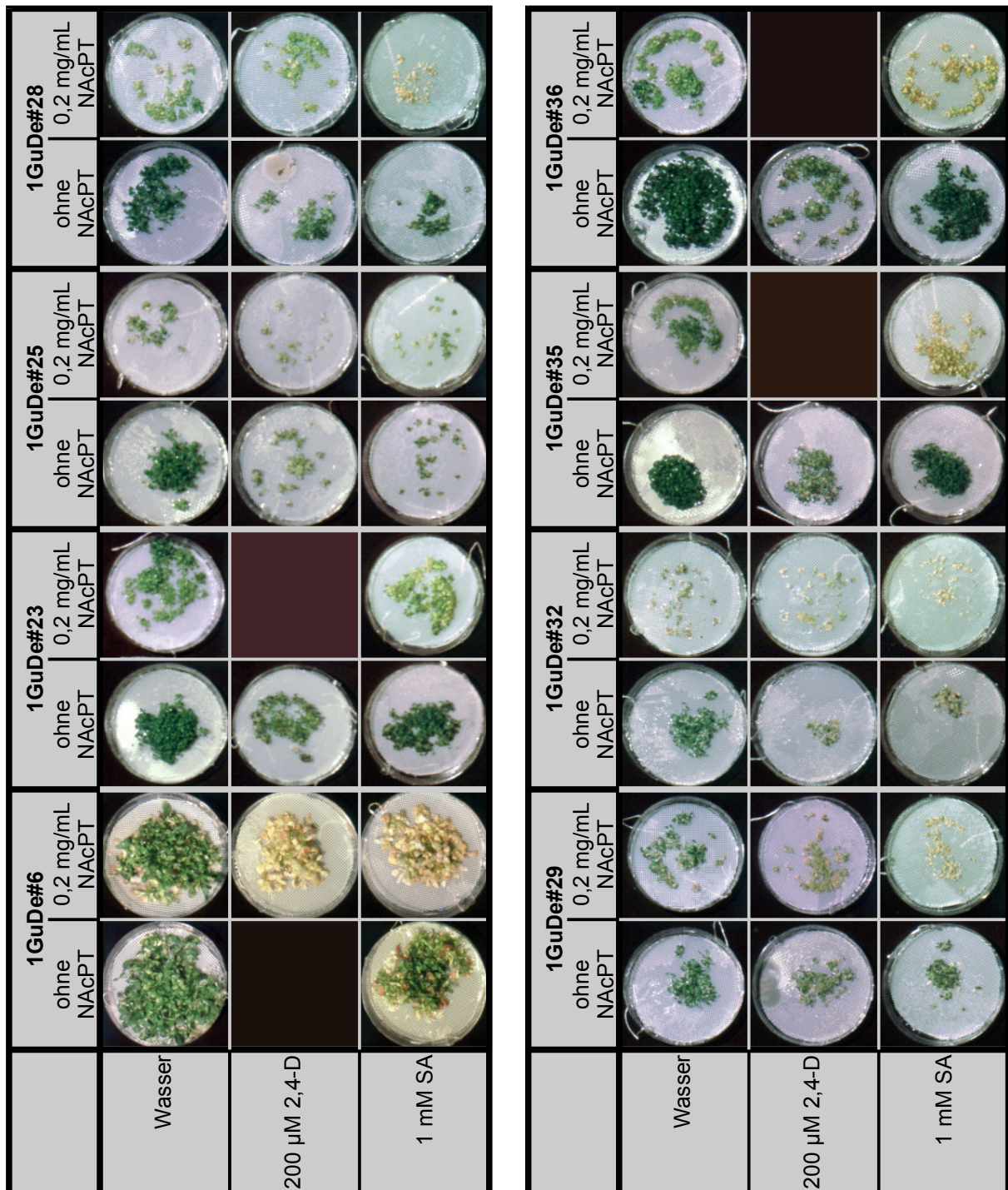


Abbildung 14: Test von 1xas-1-Deac-Linien auf induzierbaren konditionellen Suizid

Transgene 1GuDe-T₂-Samen wurden auf Netzplatten (Kapitel 1.2.22.3) mit 2MS-Agar ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen mit den angegebenen Induktionslösungen behandelt. Die Fotos wurden drei Wochen nach der Induktion aufgenommen.

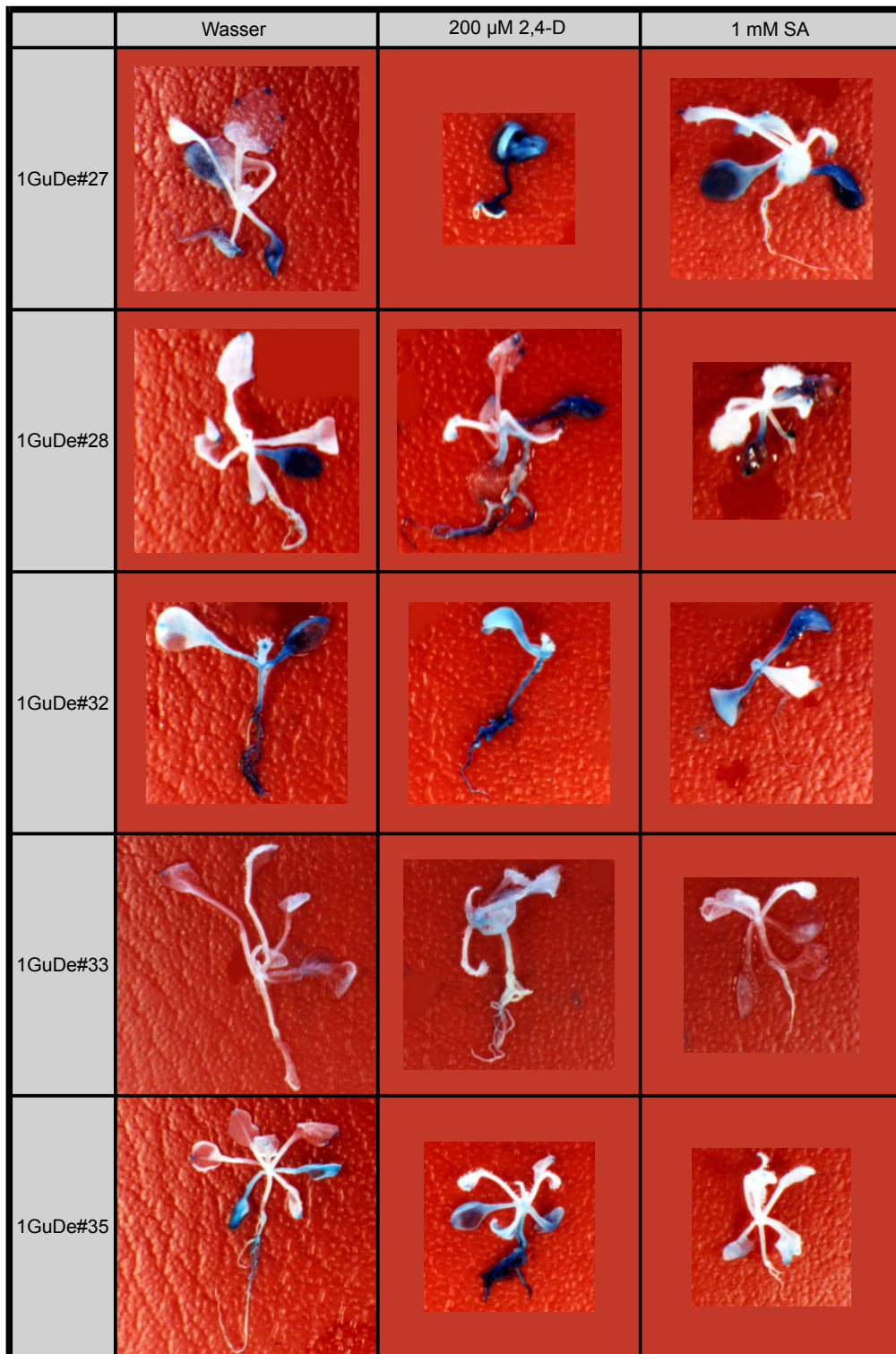


Abbildung 15: Histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen 1GuDe- T_2 -Linien

Die Pflanzen wurden auf 2MS-Agar angezogen und zwei Wochen nach der Keimung mit den angegebenen Lösungen induziert. Zwei Tage nach der Induktion wurden Pflanzen entnommen und wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben gefärbt.

1.3.2.3 Histochemische Färbungen der 1GuDe-Pflanzen

Zur näheren Charakterisierung der Gewebespezifität, des Induktionsverhaltens und der Hintergrundaktivität des $1 \times as-1$ -GUS-Konstrukts, dessen Eigenschaften des $1 \times as-1$ -Deac-Konstrukts wegen des identischen Promotors entsprechen sollten, wurden an ganzen Keimlingen der F_2 -Generation histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität unter verschiedenen Induktionsbedingungen durchgeführt.

Wie Abbildung 15 zeigt, waren die Färbintensitäten in verschiedenen Linien unterschiedlich stark ausgeprägt. So zeigte die Linie 1GuDe#27 eine starke Färbung, während die schwache Färbung der Linie 1GuDe#33 kaum erkennbar war.

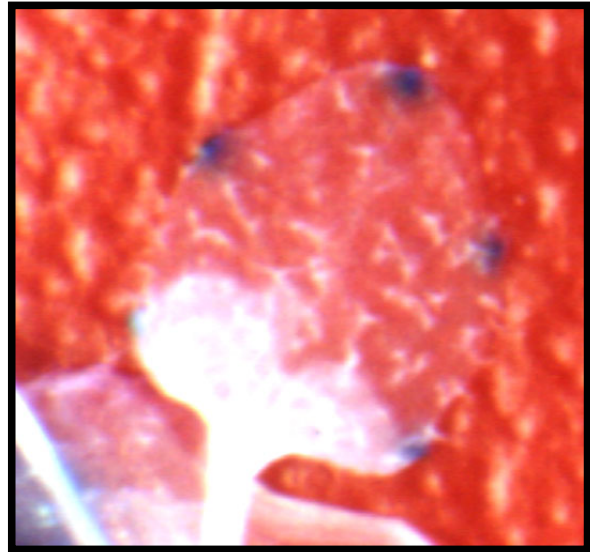


Abbildung 16: Detailaufnahme des histochemischen β -Glucuronidasenachweises im Blattgewebe einer uninduzierten T_2 -Pflanze der Linie 1GuDe#27

aus Abbildung 15

Bei allen Linien war bereits im uninduzierten Zustand die Aktivität der β -Glucuronidase anhand der Färbung sichtbar. Dies weist auf eine konstitutive Aktivität des $as-1$ -Elements hin.

In allen Linien war die β -Glucuronidaseaktivität im Wurzelsystem sehr gut mit Auxin induzierbar. Die Induzierbarkeit durch Salizylsäure war hingegen in der Färbung praktisch nicht erkennbar.

Ferner fallen Punkte erhöhter $as-1$ -Aktivität im Sproßmeristem und an den Enden der Hauptnerven der Blätter (Abbildung 16) auf. Letztere Strukturen wurden von Lubenow (1997) als Hydathoden angesehen. Im parenchymatischen Gewebe und den Epidermiszellen sowie den Trichomen ist unter keinen der untersuchten Induktionsbedingungen eine Färbung sichtbar.

1.3.2.4 Quantitative Untersuchung der β -Glucuronidaseaktivität in 1GuDe-Linien

Ganze Keimlinge der F_2 -Generation von 1GuDe-Linien, die ebenso wie für den Färbversuch zwei Tage nach der Induktion geerntet worden waren, wurden zur quantitativen Untersuchung der β -Glucuronidaseaktivität eingesetzt.

Wie Abbildung 17 zeigt, wiesen die verschiedenen Linien auch in diesem Versuch stark unterschiedliche β -Glucuronidaseaktivitäten auf. Eine verstärkte Enzymaktivität war nur zwei

Tage nach der Induktion durch Auxin meßbar. Die Aktivität zwei Tage nach der Induktion durch Salizylsäure war im Bereich der uninduzierten Kontrollen.

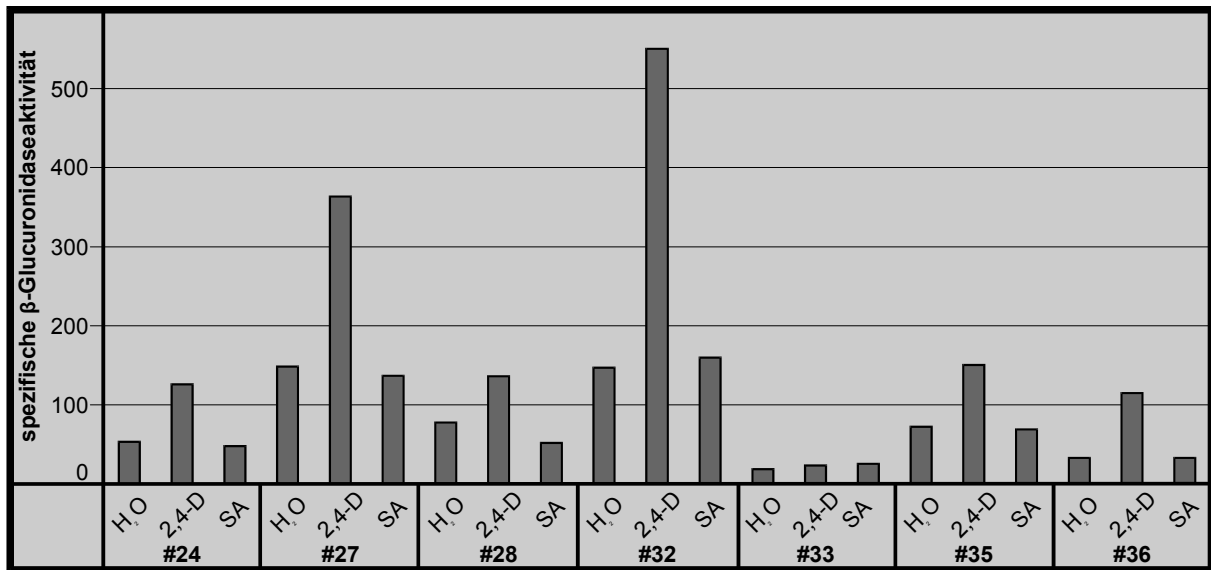


Abbildung 17: Quantitative Untersuchung der β -Glucuronidaseaktivität in 1GuDe-Linien

Pflanzen der angegebenen Linien wurden auf 2MS-Agar angezogen und zwei Wochen nach der Keimung mit den angegebenen Lösungen induziert. Zwei Tage nach der Induktion wurden etwa 100 mg Keimlinge entnommen und die Enzymaktivität der β -Glucuronidase wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben bestimmt.

Je nach Linie zeigt dieser Versuch, daß die transgenen 1GuDe-Linien eine mehr oder weniger starke β -Glucuronidaseaktivität bereits im uninduzierten Zustand aufweisen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den mehr oder weniger starken Vergiftungserscheinungen im Versuch aus Kapitel 1.3.2.2, die durch eine gewisse Hintergrundaktivität der Deacetylase hervorgerufen sein müssen.

1.3.2.5 Erzeugung homozygoter transgener 1GuDe-Pflanzen

Von den gemäß Kapitel 1.2.24 transformierten Pflanzen (T_0 -Generation) wurden die Samen geerntet und diese T_1 -Samen auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät. Die überlebenden Pflanzen wurden in Erde pikiert, bis zur Fruchtreife kultiviert und die segregierenden T_2 -Samen geerntet.

Von diesen wurden je 100 – 200 Samen pro Linie auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät.

Gemäß den Mendelschen Regeln wurde durch Auszählen überprüft, ob eine Überlebensrate von $\frac{3}{4}$ der Pflanzen auftrat. Anhand dieser Segregationsrate wurden Linien identifiziert, die eine einzelne oder mehrere T-DNAs in einer Kopplungsgruppe trugen. Dies waren lediglich die Linien #27, #36 und #57.

Jeweils 16 überlebende Pflanzen dieser Linien wurden erneut in Erde pikiert, von denen später Samen gewonnen wurden. Zur Identifikation von homozygoten Linien wurde erneut eine Aussaat auf kanamycinhaltigen Agar vorgenommen. Die Linien #27-4, #36-1 und

#57-2, die homogen kanamycinresistent waren, wurden als homozygote Linien mit 5GuDe-T₃-Linien verglichen (Kapitel 1.3.3.4).

1.3.3 Deacetylase als konditionelles Suizidgen unter der Kontrolle von fünf *as-1*-Elementen

1.3.3.1 Konstruktion eines binären Vektors mit der Deacetylase unter der Kontrolle eines Promotors mit fünffach wiederholtem *as-1*-Element

Zur Verstärkung der Induktion der Deacetylase durch das *as-1*-Element wurde dieses in fünf Kopien vor die kodierende Region der Deacetylase kloniert. Zur Konstruktion dieses Vektors wurde auf in der Arbeitsgruppe bereits vorhandene Plasmide zurückgegriffen (A. Thiele, unveröffentlicht).

Ein 1888 bp großes Fragment aus p5×*as1*-Deac und ein 2480 bp großes Fragment aus p5×*as1*-GUS, die beide mit *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten worden waren, wurde in einer Dreifragmentligation in das mit *EcoRI* geöffnete Plasmid pBIN19 ligiert. Der auf diese Weise entstandene Vektor pBIN19-5×*as1*(GuDe) (Abbildung 18) wurde für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* gemäß Kapitel 1.2.24 verwandt.

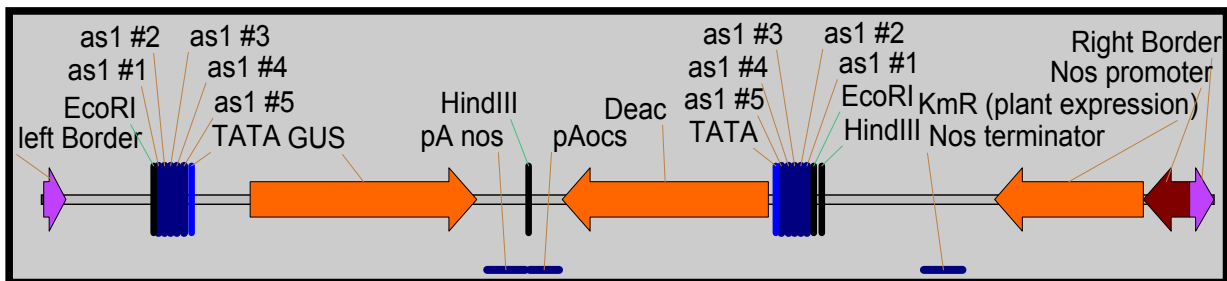


Abbildung 18: T-DNA-Region des Plasmids pBIN19-5×*as-1*(GuDe)

Aus dieser Transformation ging eine große Anzahl kanamycinresistenter Pflanzen hervor, von denen einige Linien (5GuDe-Linien) charakterisiert wurden.

1.3.3.2 Histochemische Färbungen der 5GuDe-Pflanzen

An ganzen Keimlingen der T_2 -Generation, die auf kanamycinhaltigen 2MS-Agar ausgesät worden waren, wurden histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität durchgeführt. Dabei wiesen alle Linien bereits im uninduzierten Zustand eine sehr starke Färbung auf, die sich durch Induktion nicht mehr steigern ließ (Beispiel in Abbildung 19). Die Färbung war in allen Pflanzenteilen so intensiv, daß es nicht möglich war, zwischen verschiedenen Gewebetypen zu unterscheiden. Dieser Befund korreliert mit dem Ergebnis aus Kapitel 1.3.3.4, bei dem ein vollständiges Absterben der Pflanzen bereits im uninduzierten Zustand beobachtet wurde, das nur durch eine hohe Deacetylaseaktivität hervorgerufen sein konnte.

Des Weiteren wurden auf Erde angezogene Pflanzen der homozygoten Linie 5GuDe #16-12 (siehe Kapitel 1.3.3.3) in der T_4 -Generation gefärbt. Wie Abbildung 20 zeigt, war eine starke Färbung im Bereich der Blattnerven von Keimblättern und Rosettenblättern

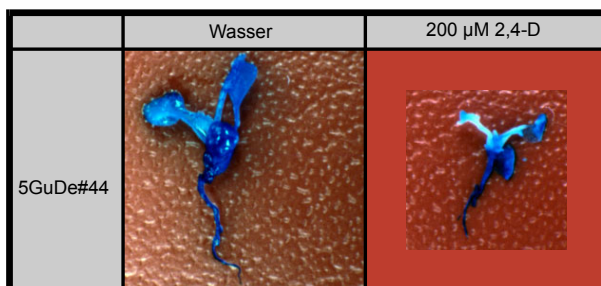


Abbildung 19: Beispiel einer histochemischen Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen 5GuDe- T_2 -Linien

Die Pflanzen wurden auf 2MS-Agar angezogen und zwei Wochen nach der Keimung mit den angegebenen Lösungen induziert. Zwei Tage nach der Induktion wurden Pflanzen entnommen und wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben gefärbt.

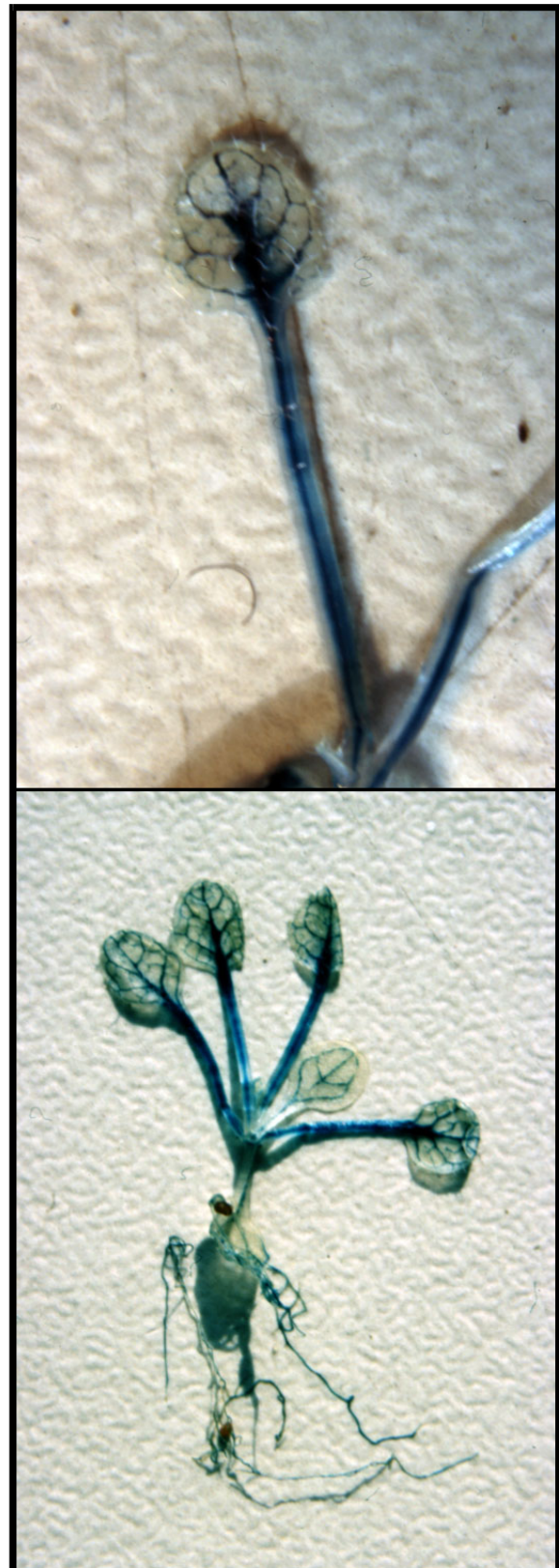


Abbildung 20: Histochemische Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzen der homozygoten Linie 5GuDe #16-12

F_4 -Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf Erde ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen nebst Wurzelwerk vorsichtig aus der Erde gezogen, und nach behutsamer Entfernung der an den Wurzeln haftenden Erdpartikel wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben gefärbt.

erkennbar. Gewebe im Gefäßsystem der Blattstiele und des Hypokotyls waren ebenfalls stark gefärbt, desgleichen das Wurzelsystem. Keine Färbung trat in den Trichomen und im parenchymatischen Gewebe der Blätter und Blattstiele auf, wenn man von der unmittelbaren Nachbarschaft der Nervatur absieht. Die Färbung dort kann man aber als diffusibles Artefakt aufgrund der extrem intensiven Färbung im Bereich der Blattnerven ansehen.

1.3.3.3 Erzeugung homozygoter transgener 5GuDe-Linien

Von den gemäß Kapitel 1.2.24 mit dem Konstrukt 5×as1(GuDe) transformierten Pflanzen (T_0 -Generation) wurden die Samen geerntet und diese T_1 -Samen auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät. Die überlebenden Pflanzen wurden in Erde pikiert, bis zur Fruchtreife kultiviert und die segregierenden T_2 -Samen geerntet.

Von diesen wurden je 100 – 200 Samen pro Linie auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät.

Gemäß den Mendelschen Regeln wurde durch Auszählen überprüft, ob eine Überlebensrate von 75 ± 3 % der Pflanzen auftrat. Anhand dieser Segregationsrate wurden Linien identifiziert, die eine einzelne oder mehrere

T-DNAs in einer Kopplungsgruppe trugen. Dies waren die Linien #3, #16 und #33 (Tabelle 41).

Jeweils 16 überlebende Pflanzen dieser Linien wurden in Erde pikiert und von ihnen Samen gewonnen. Zur Identifikation von homozygoten Linien wurden diese Samen auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät. Die Linien #3-1, #16-12 und #33-11, die in der T_3 -Generation homogen kanamycinresistent waren, wurden als homozygote Linien für weitere Charakterisierungen verwandt.

		s	Km ^R	Überlebensrate [%]
#3	100	23	77	77,0
#5	102	13	89	87,3
#6	100	31	69	69,0
#7	137	46	91	66,4
#9	155	31	124	80,0
#10	101	36	65	64,4
#11	129	48	81	62,8
#13	112	32	80	71,4
#14	102	42	60	58,8
#16	100	28	72	72,0
#21	102	50	52	51,0
#25	101	48	53	52,5
#27	114	22	92	80,7
#29	117	36	81	69,2
#31	109	32	77	70,6
#33	107	25	82	76,6
#35	103	38	65	63,1
#36	98	35	63	64,3
#39	111	21	90	81,1
#41	149	33	116	77,9
#45	149	28	121	81,2

1.3.3.4 Phänotypische Charakterisierung der homozygoten 5GuDe-Linien in Sterilkultur

Die drei homozygoten 5GuDe-Linien #3-1, #16-12 und #33-11 wurden einem Suizidtest auf Netzplatten mit 2MS-Agar (Kapitel 1.2.22.3) unter selektiven Bedingungen mit Kanamycin unterzogen. Dabei zeigte sich, daß die Expression der Deacetylase auch im uninduzierten Zustand schon so stark war, daß in Gegenwart von NAcPT alle Pflanzen binnen vier Tagen abstarben (Abbildung 21).

Dennoch wurden die 5GuDe-Pflanzen aus dieser Transformation weiter verwandt, da mit diesen Pflanzen zumindest eine Suche nach Pflanzen möglich war, die das *as-1*-Element unter keinen Umständen mehr aktivieren können, wobei jedoch die gewünschte Einschränkung auf Mutanten in der Salizylsäure-Signaltransduktion nicht mehr gegeben war.

In Abbildung 21 ist auch der Vorteil des Netzplattensystems gut zu erkennen: Bei den Pflanzen auf 2MS wurden keine Netze verwendet und das NAcPT direkt auf die Agaroberfläche pipettiert. Die ungleichmäßige Verteilung von NAcPT ist durch das Überleben von Pflanzen an einer Seite der Petrischale gut sichtbar.

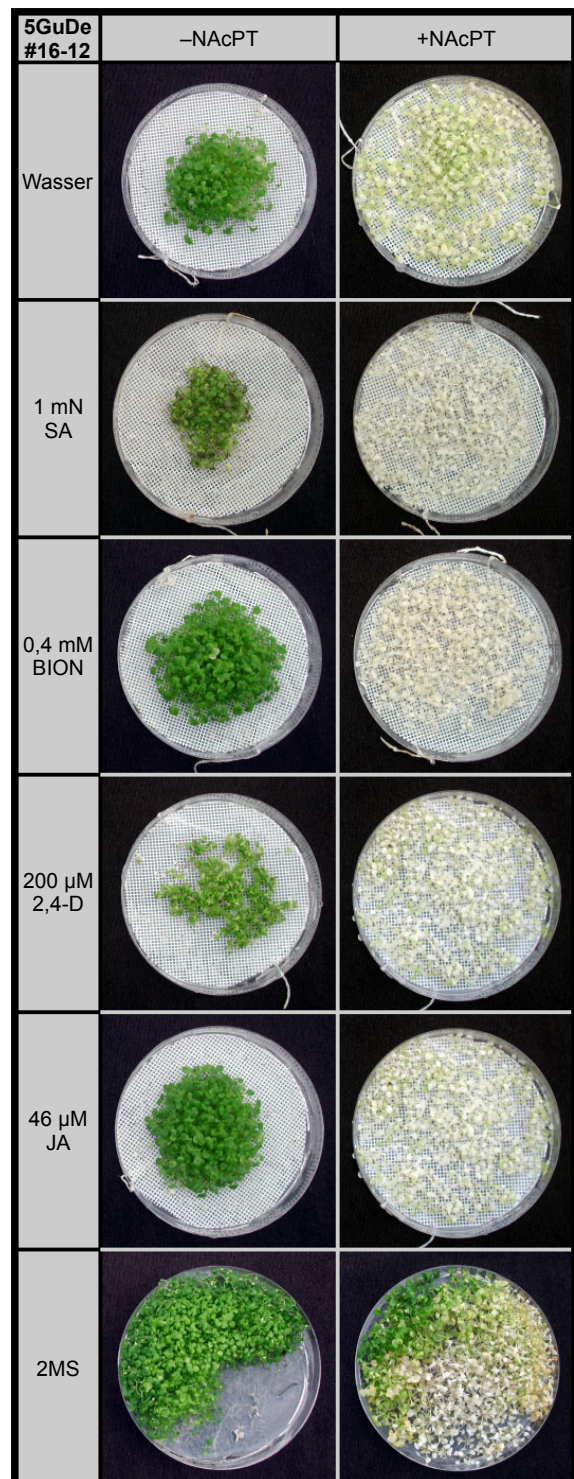


Abbildung 21: Suizidphänotyp der Linie 5GuDe#16-12 in Sterilkultur

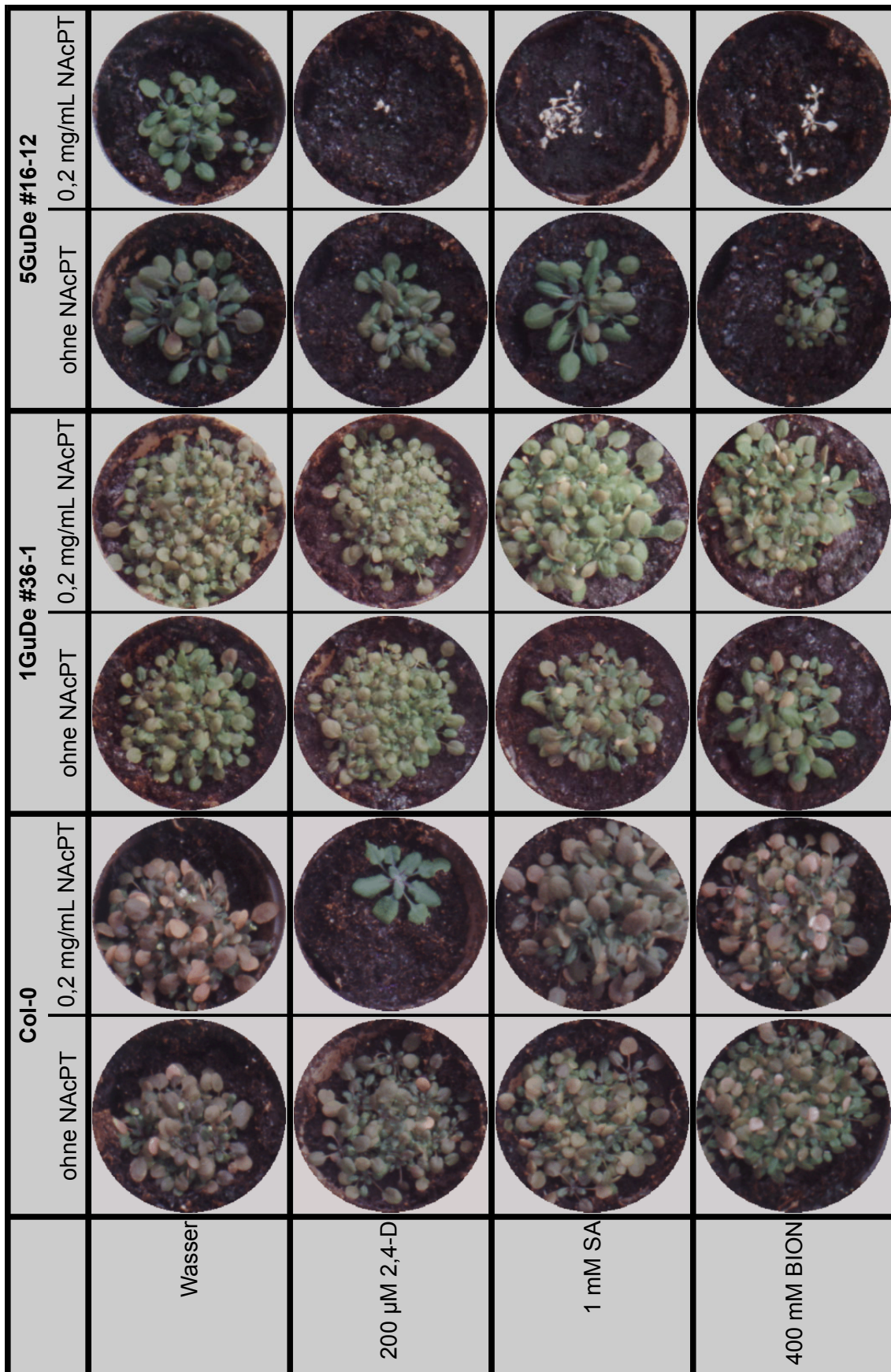


Abbildung 22: Phänotypische Charakterisierung von 1GuDe- und 5GuDe-Linien auf Erde.

Die Pflanzen wurden beginnend mit der zweiten Woche nach der Keimung drei Wochen lang drei Mal wöchentlich mit den angegebenen Lösungen besprüht.

1.3.3.5 Phänotypische Charakterisierung von 1GuDe- und 5GuDe-Linien auf Erde

Die in Kapitel 1.3.2.4 und 1.3.3.3 beschriebenen homozygoten transgenen Linien wurden in der T₃-Generation einem Suizidtest auf Erde unterzogen. Dabei wurde zwei Wochen nach der Keimung damit begonnen, die Pflanzen dreimal wöchentlich mit Lösungen zur Induktion zu besprühen. Diese Behandlung wurde drei Wochen lang fortgesetzt.

Wie Abbildung 22 zeigt, trat bei den 1GuDe-Pflanzen kein Anzeichen einer Vergiftung auf, während die 5GuDe-Pflanzen das gewünschte induzierte Absterben zeigten. Von den drei 5GuDe-Linien wies hierbei die Linie #16-12 das für eine Mutantenselektion vorteilhafteste Verhalten auf und zeigte in Gegenwart von NAcPT die geringsten Beeinträchtigungen im uninduzierten Zustand und das schnellste Absterben im induzierten Zustand. Diese Linie wurde daher für die Mutagenese eingesetzt und dafür eine Produktion von Samen im großen Maßstab durchgeführt.

Die folgende T₄-Generation wurde auf die gleiche Weise getestet, wobei das soeben beschriebene Ergebnis nicht wiederholt werden konnte. Vielmehr zeigte sich bei allen Linien, daß sie bereits im uninduzierten Zustand in Gegenwart von NAcPT starke Schäden erlitten. Im Gegensatz zu den Linien #3-1 und #33-11 konnte bei der Linie #16-12 festgestellt werden, daß die Pflanzen nach zweiwöchiger Sprühbehandlung nur mit NAcPT geringere Schäden erlitten hatten, als mit Salizylsäure und NAcPT (Abbildung 23). Wurde daraufhin das Sprühen eingestellt, so erholten sich die uninduzierten Pflanzen zum großen Teil wieder und wuchsen — allerdings bei geringerer Fertilität — bis zur Fruchtreife heran, während von den mit Salizylsäure induzierten Pflanzen nur sehr wenige überlebten.

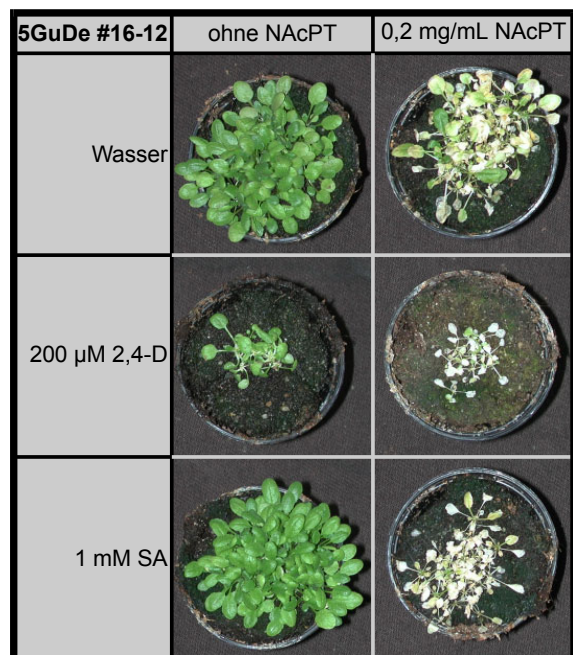


Abbildung 23: Konditionelle Vergiftung im uninduzierten Zustand bei Linie 5GuDe #16-12 in der T₄-Generation

Die Pflanzen wurden beginnend mit der zweiten Woche nach der Keimung 2½ Wochen lang drei Mal wöchentlich mit den angegebenen Lösungen besprüht.

Im Gegensatz zu den Blattorganen, bei denen mindestens vier Sprühbehandlungen mit 1 mM Salizylsäure und 0,2 mg/mL NAcPT nötig waren, um irreversible Schäden hervorzurufen, waren Blüten und Knospen sehr viel empfindlicher. Hier genügten bereits zwei Behandlungen, um die Organe vollständig abzutöten (Abbildung 24).

Auf Grund dieser Ergebnisse schien es möglich, das Induktionssystem durch Sprühen auf Erde auf zwei Arten für die Suche nach Signaltransduktionsmutanten einzusetzen:

1. Bei Wahl einer stringenten Strategie besprühe man die Pflanzen bis kurz vor der Blüte. Auf diese Weise erhalte man vorwiegend Mutanten, bei denen das *as-1*-Element nicht mehr aktiviert werden könnte.

2. Bei Wahl einer differentiellen Strategie vergleiche man die mit Salizylsäure behandelten Pflanzen mit einer uninduzierten Kontrollgruppe und stelle das Sprühen rechtzeitig vor dem Absterben ein. Auf diese Weise erhalte man wahrscheinlich auch Mutanten, bei denen zwar noch eine Restaktivität des *as-1*-Elements vorläge, aber die Induktion durch Salizylsäure nicht mehr gegeben wäre. Allerdings enthielte dieses Vorgehen das Risiko, daß viele Pflanzen zufällig überlebten. Eine aufwendige Kontrolle der überlebenden Linien wäre daher erforderlich. Auch wären die dabei entstehenden Mutanten mit gradueller Reduktion der Aktivität der durch das *as-1*-Element gesteuerten Reportergene schwierig zu charakterisieren und von jenen Mutanten zu unterscheiden, bei denen eine Punktmutation im Deacetylasegen die Enzymaktivität der Deacetylase nur teilweise aufhebt.



Abbildung 24: NAcPT-Sensitivität der Blüten

Die ersten Blüten einer 5GuDe #16-12 Pflanze in der F_4 -Generation wurden zwei Mal mit 1 mM Salizylsäure und 0,2 mg/mL NAcPT besprüht und eine Woche nach der letzten Behandlung fotografiert.

1.3.3.6 Expressionsanalyse der 5GuDe-Linie #16-12 auf Erde

Als Voraussetzung für quantitative Expressionsanalysen von aus der Mutagenese hervorgehenden Linien mußte die transgene Linie 5GuDe #16-12 bezüglich des Zeitverlaufs und der Stärke der Induktion durch Salizylsäure unter verschiedenen Wachstumsbedingungen intensiv charakterisiert werden.

Dazu wurden zunächst F_4 -Pflanzen der Linie 5GuDe#16-12 auf Erde ausgesät und drei Wochen nach der Keimung mit Salizylsäure induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen. RNA-Präparationen dieser Proben wurden wie in Kapitel 1.2.33 beschrieben auf die Expression von Deacetylase, β -Glucuronidase und *PR-1* hin untersucht.

Wie Abbildung 25 zeigt, wird die Expression der Deacetylase unter der Kontrolle des $5 \times as-1$ -Promotors binnen zwei Stunden nach der Induktion ungefähr um das Fünffache ge-

steigert. Danach fällt die Expression zunächst rasch, später langsamer ab, bis sie nach etwa 24 h wieder das Ausgangsniveau erreicht.

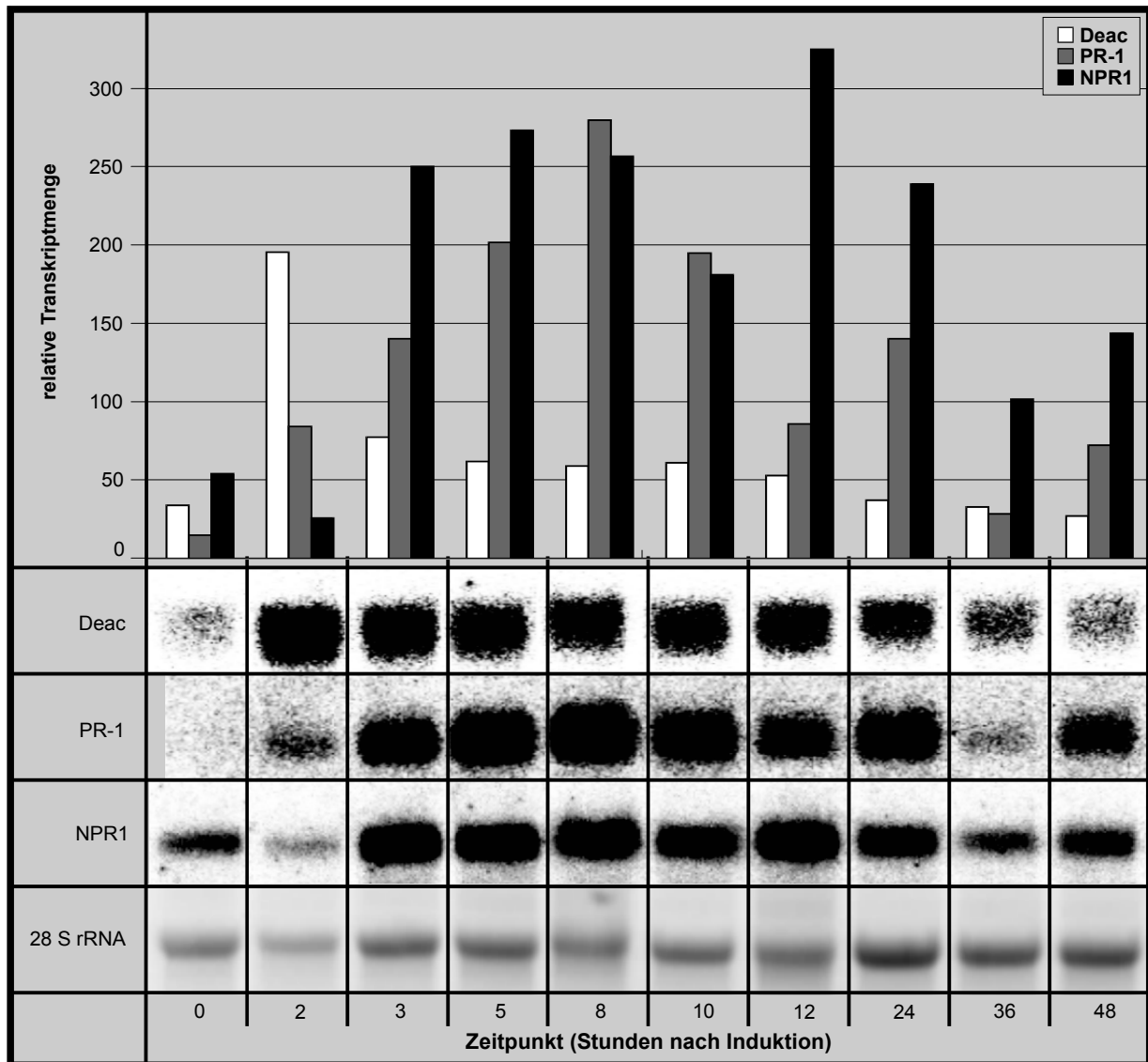


Abbildung 25: Bestimmung der relativen Transkriptmengen der Deacetylase, von *PR-1* und von *NPR1* in der Linie 5GuDe #16-12 in Erdkultur.

Drei Wochen alte F_4 -Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 wurden wie in Kapitel 1.2.26 beschrieben mit 1 mM Salizylsäure induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen. Von Gesamt-RNA-Präparationen dieser Proben wurden die relativen Transkriptmengen der Deacetylase, von *PR-1* und *NPR1* bestimmt.

Die Expression von *PR-1* steigt in diesem Versuch unerwartet früh bereits nach zwei Stunden an, erreicht ihr Maximum mit einer Steigerung ungefähr um den Faktor 15 aber erst 6 h nach der Induktion. Es folgt ein gleichmäßiges Abklingen, bis die Expression später als 48 h nach der Induktion wieder die Hintergrundstärke erreicht hat.

NPR1 ist bereits vor der Induktion gering exprimiert. Der Zeitverlauf der Expression von *NPR1* nach einem Salizylsäurestimulus entspricht in etwa dem von *PR-1* und erreicht ein erstes Maximum bei 5 h. Zu diesem Zeitpunkt ist etwa 5,5 mal mehr Transkript vorhanden als vor der Induktion. Danach fällt die Transkriptmenge bis zum Zeitpunkt 10 h wieder ab, um

12 h nach der Induktion ein zweites Maximum zu erreichen. Nach 48 h ist noch immer mehr *NPR1*-Transkript vorhanden als vor der Induktion.

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs wurden bei allen weiteren Induktionsversuchen auf Erde zu den Zeitpunkten 0 h und 4 h nach Zugabe von Salizylsäure Proben geerntet und ausgewertet.

1.3.3.7 Vergleich der Hintergrundexpression unter verschiedenen Wachstumsbedingungen

Um die Hintergrundaktivität des *as-1*-Elements unter verschiedenen Wachstumsbedingungen näher zu charakterisieren und die idealen Bedingungen für weitere Charakterisierungen zu finden, wurden Pflanzen der transgenen Linie 5GuDe #16-12 auf Erde, 2MS-Agar und MS-Agar ohne Saccharose angezogen und das Expressionsniveau der Deacetylase bestimmt.

Wie Abbildung 26 zeigt, war die Expression der Deacetylase im uninduzierten Zustand auf Erde am geringsten, auf 2MS-Agar am höchsten. Dieses Ergebnis läßt zweierlei vermuten:

1. Das *as-1*-Element ist durch feuchtigkeitsbedingten Streß induzierbar.
2. Das *as-1*-Element ist durch Saccharose induzierbar.

Weitere Untersuchungen, um diese beiden Vermutungen zu klären, wurden im Verlaufe dieser Arbeit nicht durchgeführt, da dieser Versuch lediglich dazu diente, die besten Bedingungen für weitere Induktionsversuche zu evaluieren.

Aufgrund der Ergebnisse dieses Versuchs wurden Induktionsversuche auf saccharosefreiem MS-Agar und auf Erde durchgeführt, während 2MS-Agar für Induktionsversuche nicht mehr verwandt wurde.

1.3.3.8 Expressionsanalyse der 5GuDe-Linie #16-12 in Sterilkultur

Um die starken Schwankungen der Hintergrundaktivität, die bei der Anzucht auf Erde auftraten, und den unspezifischen Streß, der zur Verschiebung der *PR-1*-Induktion zu uner-

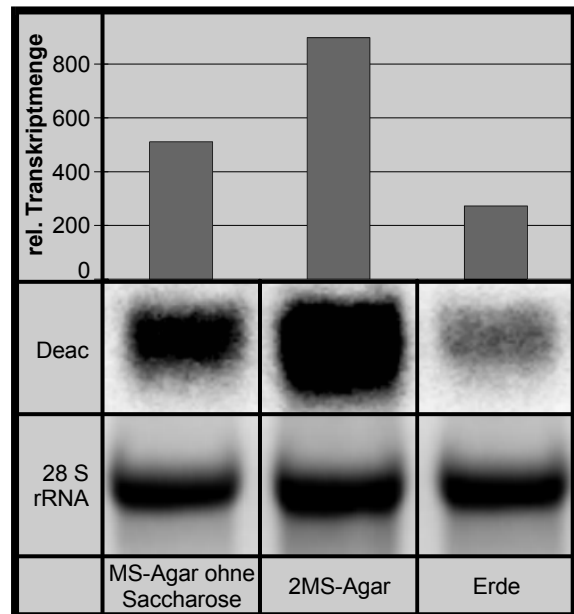


Abbildung 26: Vergleich der Expression der Deacetylase unter verschiedenen Kulturbedingungen

F₄-Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf den angegebenen Substraten für drei Wochen kultiviert und anschließend die Expression der Deacetylase wie in Kapitel 1.2.33 beschrieben bestimmt.

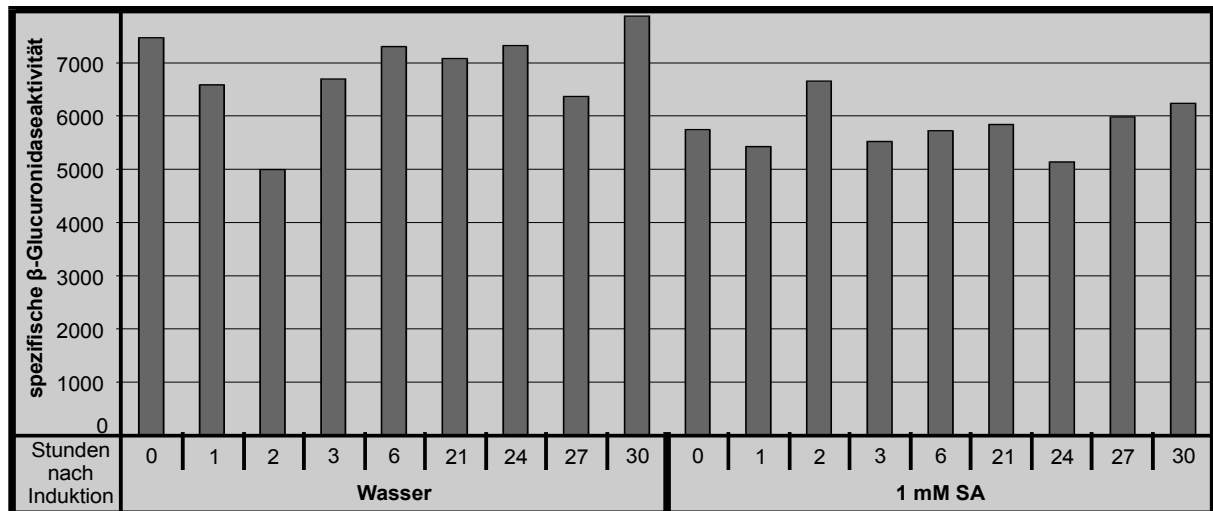


Abbildung 27: Zeitverlauf der spezifischen Aktivität β -Glucuronidase in Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 in Sterilkultur auf MS-Agar ohne Saccharose

F₄-Samen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit 1 mM Salizylsäure induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen. Die spezifische Enzymaktivität der β -Glucuronidase wurde in Proteinextrakten dieser Proben wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben getestet.

wartet frühen Zeitpunkten der *PR-1*-Expression führte, zu vermeiden, wurden weitere Induktionsversuche in Sterilkultur durchgeführt.

Wie die Abbildung 29 zeigt, ist auch in diesem Versuch eine Hintergrundaktivität des 5 \times as-1-Promotors anhand der Expression der Deacetylase bereits im uninduzierten Zustand deutlich sichtbar. Dem Problem der starken Aktivitätsschwankungen des as-1-Elements konnte durch Sterilkultur ebenfalls nicht begegnet werden.

Der Anstieg der Expression der Deacetylase begann bereits 1 h nach Zugabe von Salizylsäure und steigerte sich zu einem Maximum etwa 27 h nach der Induktion um den Faktor 6,5. Der Induktionsfaktor liegt damit im selben Bereich wie bei dem Versuch auf Erde (Kapitel 1.3.3.6). Das Expressionsniveau lag allerdings auf Agar generell höher als auf Erde, was die Quantifizierung, die bei geringen Transkriptmengen schwierig war, zuverlässiger machte. Auch die Extraktion von RNA war bei Pflanzen, die auf Agar angezogen waren, effizienter als bei Pflanzen auf Erde. Wenn möglich wurden daher Induktionsversuche auf Agar durchgeführt.

Mit Proben derselben Pflanzen wurden Messungen der β -Glucuronidaseaktivität durchgeführt.

Wie in zahlreichen nicht dargestellten Versuchen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen ist auch hier eine Erhöhung der β -Glucuronidaseaktivität nach Induktion mit Salizylsäure nicht feststellbar (Abbildung 27). Vielmehr verharrt die Enzymaktivität in allen 5GuDe-Linien auf sehr hohem Niveau. Die Bestimmung der Enzymaktivität hat sich damit als ungeeignet für die weitere Charakterisierung der Salizylsäureinduktion erwiesen. Dies schließt jedoch nicht aus, daß eine starke Verringerung der β -Glucuronidaseaktivität im Falle einer verminderten Induktion des as-1-Elements aufgrund einer Mutation in einem Versuch

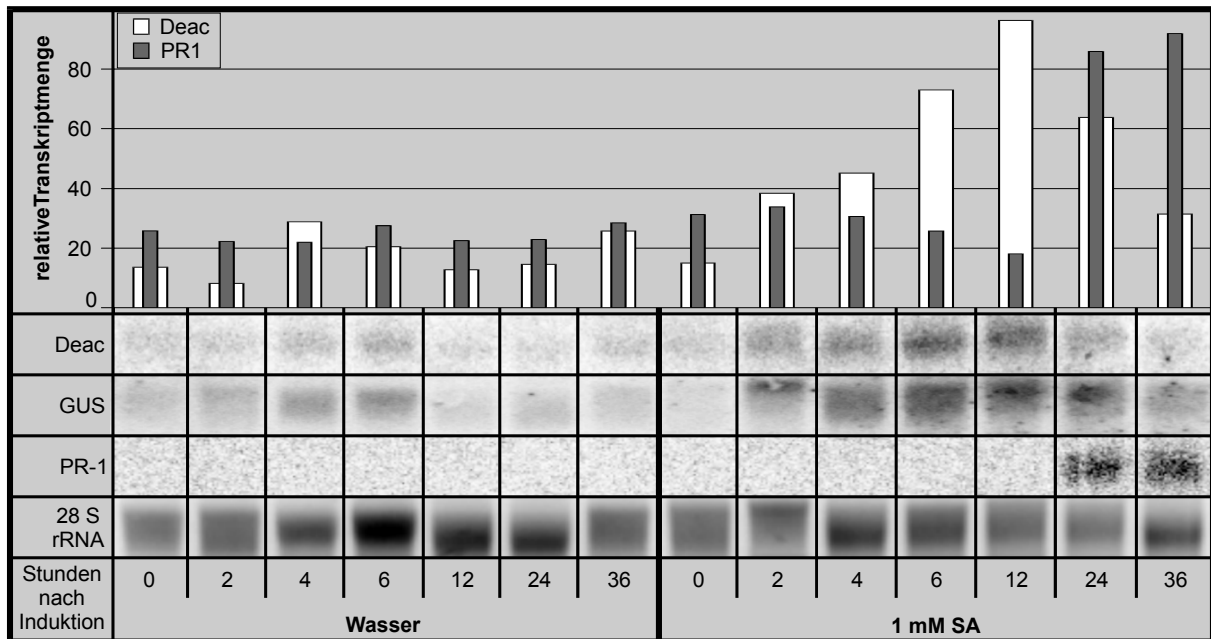


Abbildung 28: Zeitverlauf der Expression der Deacetylase, der β -Glucuronidase und von PR-1 in Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 in Sterilkultur auf MS-Agar ohne Saccharose

F_4 -Samen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit 1 mM Salizylsäure induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen. RNA-Extrakte dieser Proben wurden auf die Expression der Deacetylase, der β -Glucuronidase und von PR-1 getestet.

dieser Art repräsentiert werden kann. Daher kann die Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität von vermuteten Mutanten hilfreich für deren Identifikation sein.

Die Daten der Enzymaktivität stehen damit im Widerspruch zu der sehr wohl stattfindenden Erhöhung der Transkriptmenge der β -Glucuronidase nach Induktion mit Salizylsäure. Welche Ursachen für die offenbar nicht weiter zu erhöhenden β -Glucuronidasegehalte in Frage kommen, konnte in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden.

In einem weiteren Induktionsexperiment gelang es, die durch den $5\times as-1$ -Promotor vermittelte frühe Antwort von der späten Antwort, repräsentiert durch *PR-1*, zu trennen.

Wie Abbildung 28 zeigt, war die Expression der beiden *as-1*-gesteuerten Reportergene Deacetylase und β -Glucuronidase bereits zwei Stunden nach der Induktion gesteigert, erreichte ihr Maximum bei etwa 12 h und war dann etwa um den Faktor $6\frac{1}{3}$ stärker als im uninduzierten Zustand. Danach sanken die Transkriptmengen ab und waren 36 h nach der Induktion beinahe wieder auf die Anfangskonzentrationen zurückgegangen.

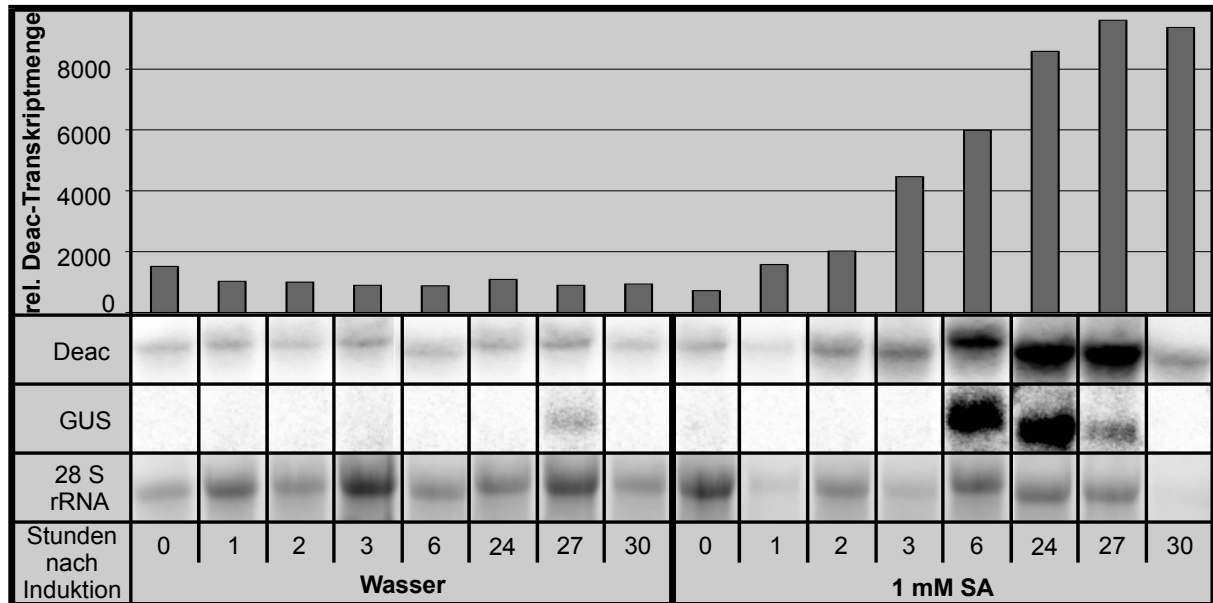


Abbildung 29: Zeitverlauf der Expression der Deacetylase und der β -Glucuronidase in Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 in Sterilkultur auf MS-Agar ohne Saccharose

F₄-Samen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit 1 mM Salizylsäure induziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen. RNA-Extrakte dieser Proben wurden auf die Expression von Deacetylase und β -Glucuronidase getestet.

Die Expression von *PR-1* wurde dagegen erst zwischen 12 h und 24 h nach der Induktion gesteigert. Zu den Zeitpunkten 24 h und 36 h wurden vergleichbare Transkriptmengen gemessen.

Damit ist in diesem Experiment die Trennung von früher und später Antwort gelungen. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden bei allen weiteren Induktionsversuchen auf Agar mit Salizylsäure zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h und 24 h nach Zugabe von Salizylsäure Proben geerntet und ausgewertet.

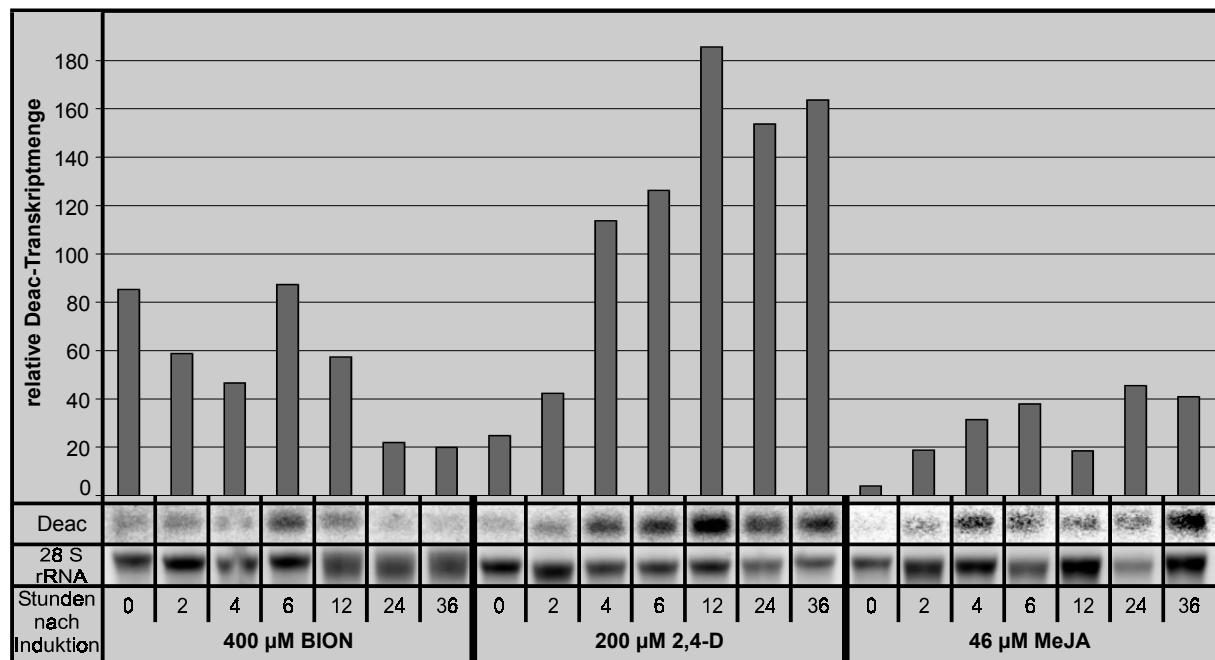


Abbildung 30: Zeitverlauf der Expression der Deacetylase in Pflanzen der Linie 5GuDe #16-12 in Sterilkultur auf MS-Agar ohne Saccharose

F₄-Samen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit den angegebenen Lösungen induziert und zu den aufgeführten Zeitpunkten Proben genommen. RNA-Extrakte dieser Proben wurden auf die Expression der Deacetylase, der β -Glucuronidase und von PR-1 getestet.

Zur Charakterisierung weiterer Stimuli wurden Induktionen mit dem funktionellen Salizylsäureanalog BION, dem synthetischen Auxin 2,4-D und Methyljasmonat durchgeführt. Damit sollten Daten gewonnen werden, die bei der späteren Charakterisierung von Mutanten herangezogen werden könnten.

In Abbildung 30 ist gezeigt, daß eine Induktion der Deacetylaseexpression nur durch 2,4-D zu erzielen war. Hierbei unterschied sich allerdings die Kinetik der Deacetylaseaktivierung von derjenigen bei Salizylsäureinduktion. Mit 2,4-D stieg die Expression bis 12 h nach der Induktion an. Danach blieb die Expression stabil und fiel nicht, wie bei Induktion mit Salizylsäure, wieder ab.

1.3.3.9 Kreuzung mit *npr1-1*

Da bisher bei Mutageneseversuchen, die Mutanten in der Salizylsäure- und Pathogensignaltransduktion zum Ziel hatten, zumeist Mutanten im *NPR1*-Gen identifiziert wurden, war es von Interesse zu analysieren, ob *NPR1* an der Signaltransduktion zur Induktion des *as-1*-Elements durch Salizylsäure beteiligt ist. Um Informationen hierüber zu erhalten, wurden Kreuzungen mit *npr1*-Mutanten durchgeführt und charakterisiert.

T₄-Pflanzen der transgenen Linie 5GuDe #16-12 wurden mit der Mutantenlinie *npr1-1* wie in Kapitel 1.2.27 beschrieben gekreuzt. Dazu wurden emaskulierte Blüten der Mutantenlinie mit Pollen der transgenen Linie bestäubt. Die Selektion auf das Transgen konnte hier nicht über die Kanamycin-Resistenzmarker der das 5 \times *as-1*-Gus-Deac-Konstrukt enthalten-

den T-DNA vorgenommen werden, da auch die Mutantenlinie *npr1-1* kanamycinresistent ist (Cao *et al.*, 1994). Daher wurde die Selektion von transgenen F₁-Kreuzungsprodukten über PCR mit den Primern Deac Analyse fwd und Deac Analyse rev (Kapitel 1.2.4) vorgenommen. Pollen von F₁-Pflanzen, bei denen die Deacetylase in der genomischen DNA nachgewiesen werden konnten, wurden wiederum auf emaskulierte Blüten der *npr1-1*-Mutanten übertragen. Jeweils 16 der aus dieser Kreuzung hervorgehenden F₂-Samen wurden auf Erde ausgesät und an den Pflanzen eine PCR-Analyse zum Nachweis der Deacetylase und eine Northern-Analyse nach Induktion durch Salizylsäure auf *PR-1*-Expression durchgeführt. Zwei Pflanzen, bei denen die *PR-1*-Expression nach Salizylsäureinduktion nicht nachweisbar und zwei weitere, bei denen sie nachweisbar war und bei denen die Deacetylase in der genomischen DNA nachgewiesen werden konnte, wurden bis zur Samenreife weiter kultiviert. Die durch Selbstbefruchtung gewonnenen F₃-Samen wurden für ein Induktionsexperiment verwendet.

Dazu wurden diese Samen, sowie zur Kontrolle Samen der transgenen Linie 5GuDe #16-12 in der T₆-Generation auf Netzplatten mit MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit 1mM Salizylsäure induziert und zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h und 24 h Proben genommen. RNA-Präparationen dieser Proben wurden wie in Kapitel 1.2.33 beschrieben auf Expression von *PR-1*, Deacetylase und β -Glucuronidase getestet.

Das Ergebnis dieses Versuchs in Abbildung 31 zeigt, daß in der *npr1-1*-homozygoten Linie XII, die keine *PR-1*-Expression aufweist, die Deacetylase noch im selben Maße exprimiert wird wie bei den beiden *PR-1*-exprimierenden Linien XI und XXVII. Demnach scheint *NPR1* keinen Einfluß auf die Aktivierung des *as-1*-Elements zu haben. Gleiches gilt für die Expression von *GST6*.

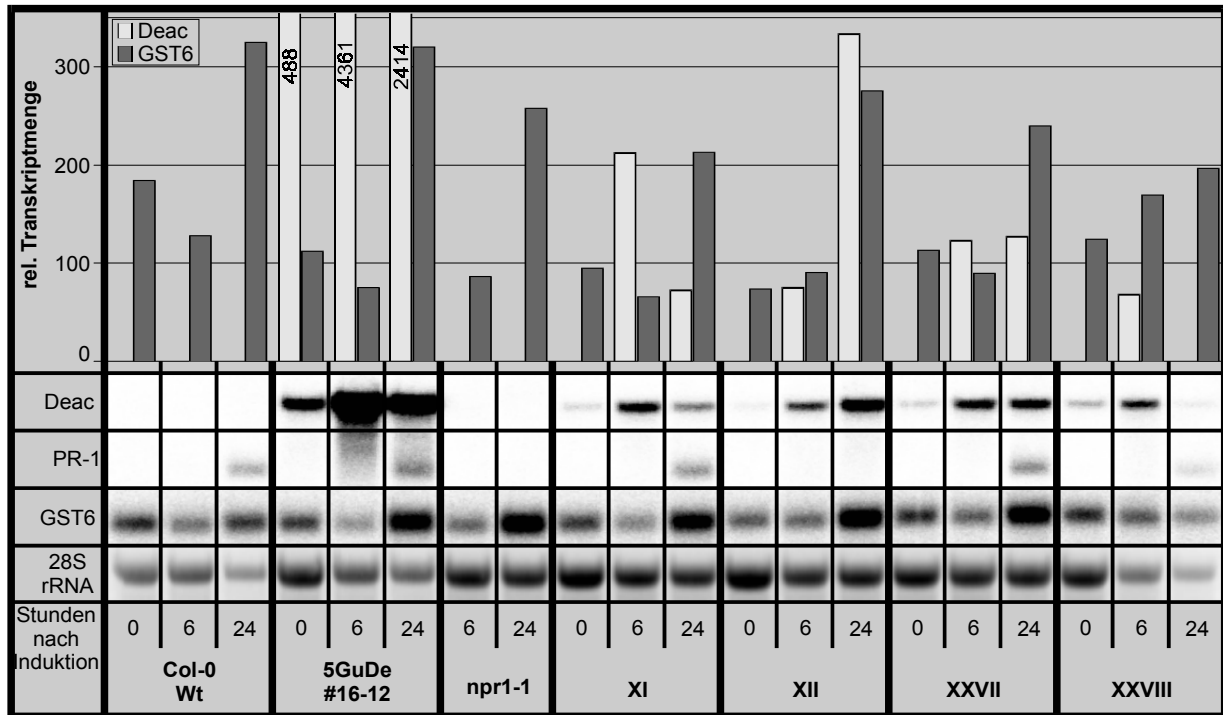


Abbildung 31: Quantitative Expressionsanalyse von *npr1-1* × 5GuDe #16-12

Columbia-0-, 5GuDe #15-12-*F₅*-, *npr1-1*- und vier *F₃*-Linien der Kreuzung *npr1-1* × 5GuDe #16-12 wurden zwei Wochen nach der Keimung auf Netzplatten mit MS-Agar ohne Saccharose mit 1 mM Salizylsäure induziert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Gesamt-RNA dieser Proben wurde auf die Expression der Deacetylase sowie von *PR-1* und *GST6* getestet und nach Abgleich mit der rRNA quantifiziert.

Die Aussagekraft dieses Experiments wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß die Expression der Deacetylase in den transgenen Kontrollpflanzen mehr als zehn Mal so stark war, wie die Expression in den Kreuzungsprodukten. Möglicherweise ist dieses Phänomen aber nur ein allgemeines Artefakt der Kreuzung. Daher wurden im folgenden Kreuzungsexperiment, das unternommen wurde, um die hier gewonnenen Ergebnisse mit einem weiteren Mutantenallel von *NPR1* zu untermauern, nur die Kreuzungsprodukte untereinander verglichen.

1.3.3.10 Kreuzung mit *npr1-2*

T₄-Pflanzen der transgenen Linie 5GuDe #16-12 wurden mit der Mutantenlinie *npr1-2* wie in Kapitel 1.2.27 beschrieben gekreuzt. Dazu wurden emaskulierte Blüten der Mutantenlinie mit Pollen der transgenen Linie bestäubt. Da die Linie *npr1-2* im Gegensatz zu *npr1-1* nicht kanamycinresistent ist, war eine Selektion auf Antibiotikaresistenz zur Identifikation transgener Kreuzungsprodukte möglich. Dazu wurden die aus der Kreuzung hervorgegangenen Samen auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät, die überlebenden *F₁*-Pflanzen auf Erde pikiert und zur Rückkreuzung Pollen dieser Pflanzen auf Blüten der *npr1-2*-Mutanten übertragen. Die aus der Rückkreuzung hervorgegangenen Samen wurden auf kanamycinhaltigen Agar ausgesät und die überlebenden *F₂*-Pflanzen auf Erde pikiert. Diese Pflanzen wurden mit Salizylsäure induziert und die *PR-1*-Expression durch eine Northern-Analyse wie in Kapitel 1.2.33 beschrieben überprüft. Pflanzen, die nicht mehr zur Expression von *PR-1* fähig

waren, wurden als *npr1-2*-homozygote Pflanzen weiter vermehrt und die durch Selbstbefruchtung gewonnenen F₃-Samen für ein Induktionsexperiment verwandt. Dazu wurden diese Samen, sowie zur Kontrolle Samen, die nicht *npr1-2*-homozygot waren, auf Netzplatten mit kanamycinhaltigem MS-Agar ohne Saccharose ausgesät. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen wie in Kapitel 1.2.22.3 beschrieben mit Salizylsäure behandelt und zu den Zeitpunkten 0 h, 6 h und 24 h Proben genommen.

Wie Abbildung 32 zeigt, war bei der *npr1-2*-homozygoten Linie IV die Expression der beiden Markergene für die späte Antwort PR-1 und PR-2 24 h nach Induktion mit Salizylsäure unterdrückt. Demgegenüber lag die Expression der beiden Reportergene Deacetylase und β -Glucuronidase in allen Linien auf einem vergleichbaren Niveau. *GST6* zeigte in allen Linien eine unveränderte Induktion. Das GST-Gen *At103* wies in allen Linien 6 h nach der Induktion eine reduzierte Expression auf, wobei die Transkriptmenge stets das 0,62-fache ($\pm 0,02$) wie vor der Induktion betrug. Auch dieses Experiment wies wegen der unveränderten Expression der Deacetylase, von *AtGST6* und von *At103* in der *npr1-2*-homozygoten Pflanze darauf hin, daß *NPR1* in der frühen salizylsäureabhängigen Signaltransduktion keine entscheidende Funktion hat.

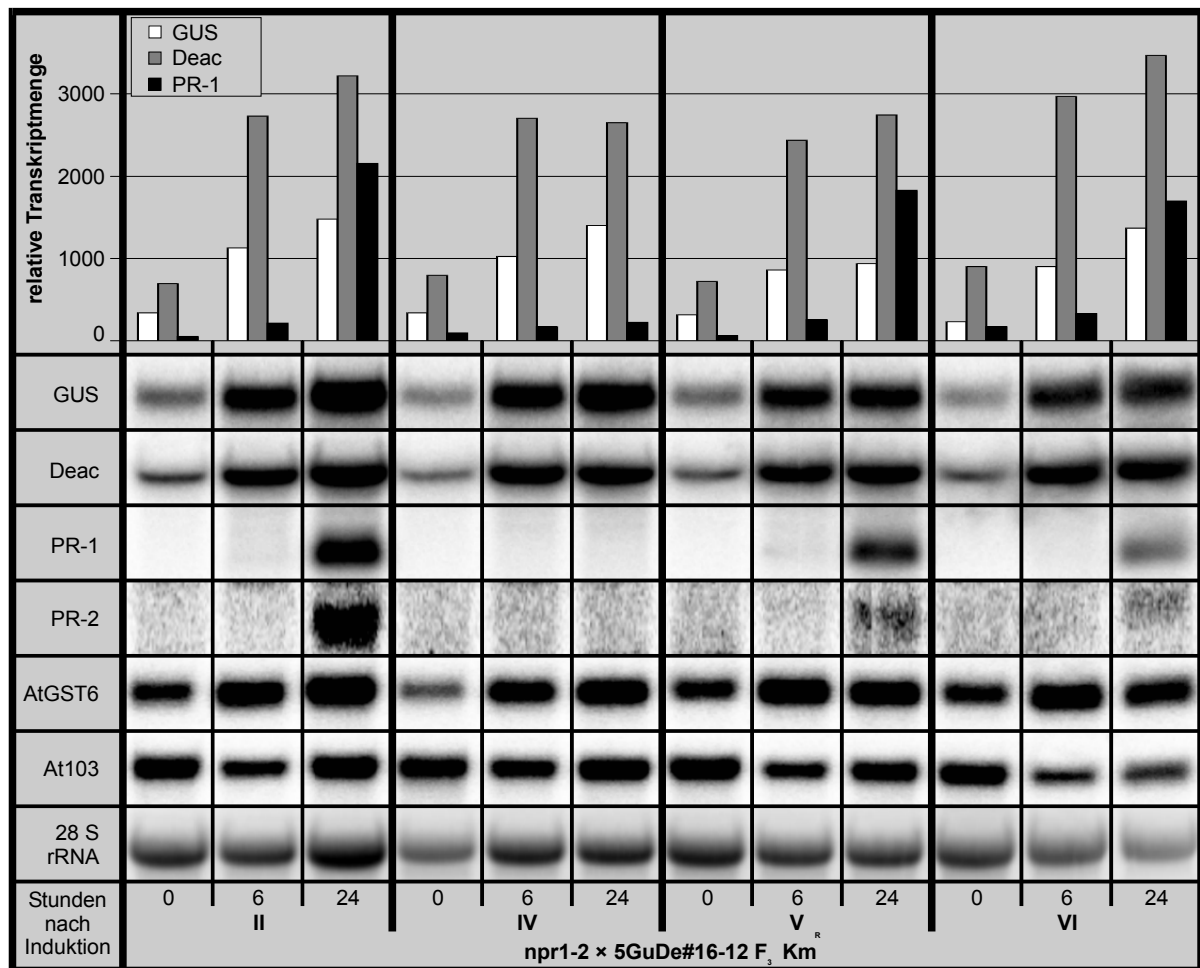


Abbildung 32: Quantitative Expressionsanalyse von *npr1-2* × 5GuDe #16-12-Kreuzungsprodukten

F₃-Pflanzen von vier verschiedenen Linien der Kreuzung *npr1-2* × 5GuDe #16-12 wurden zwei Wochen nach der Keimung auf kanamycinhaltigen Netzplatten mit MS-Agar ohne Saccharose mit 1 mM Salizylsäure induziert und Proben zu den angegebenen Zeitpunkten genommen. Gesamt-RNA dieser Proben wurde auf die Expression von β -Glucuronidase, Deacetylase, *PR-1*, *PR-2*, *AtGST6* und *At103* getestet und nach Abgleich mit der rRNA quantifiziert.

Zusammen mit dem Ergebnis aus Kapitel 1.3.3.9 kann man die gesicherte Aussage machen, daß Mutationen im *NPR1*-Gen, die dessen Funktion aufheben, die Signaltransduktion der Salizylsäure bezüglich des *as-1*-Elements nicht stören. Daraus läßt sich schließen, daß *NPR1* am Signalweg von der Salizylsäureperzeption zum *as-1*-Element nicht beteiligt ist oder durch alternative Signaltransduktionskomponenten vollständig komplementiert werden kann.

1.3.3.11 Weitere Kreuzungen

Die transgenen Linien 1GuDe#57-2 und 5GuDe#16-12 wurden für eine Reihe von Kreuzungen mit Mutanten, die in der Pathogen- und Auxinantwort betroffen sind, verwandt. Diese Kreuzungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr bis zum Stadium der Analyse vorangetrieben werden. Details zu diesen Kreuzungen und dem jeweiligen Kreuzungsstadium sind in Tabelle 42 aufgeführt.

Tabelle 42: Weitere Kreuzungen

Kreuzung	Stadium
<i>aux1-7</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>axr2</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>axr4-1</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>cpr1</i> ×1GuDe#57-2	F ₁
<i>cpr1</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>cpr5-2</i> ×1GuDe#57-2	F ₁
<i>cpr5-2</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>cpr6</i> ×1GuDe#57-2	F ₁
<i>cpr6</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>eds4-1</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>eds5-2</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>phyA/phyB</i> ×5GuDe#16-12	F ₂
<i>ssi1</i> ×5GuDe#16-12	F ₁

1.3.3.12 Mutagenese

Ziel dieser Arbeit war es, Mutanten in der Signaltransduktion der Salizylsäure zu finden, die nicht mehr in der Lage sind, das *as-1*-Element zu aktivieren. Nachdem in Kapitel 1.3.3.4 die Bedingungen für die Suche nach Mutanten durch Suizidexperimente festgelegt worden waren, konnte mit der Herstellung von Mutantenpopulationen begonnen werden. Wegen der relativ unkomplizierten Durchführung bei gleichzeitig hoher Dichte verschiedener Mutationen, die zudem gleichmäßig über das Genom verteilt sind, wurde eine chemische Mutagenese mit EMS alternativen Methoden wie T-DNA-Insertion oder „Transposon-Tagging“ vorgezogen. Der Nachteil liegt bei der hier angewandten Methode in einer schwierigen und unter Umständen sehr langwierigen Identifikation des von der Mutation betroffenen Gens.

T₄-Samen der transgenen Linie 5GuDe #16-12 wurden einer Mutagenese wie in Kapitel 1.2.28 beschrieben unterworfen. Dazu wurden jeweils 5000 Samen mit 50, 75 und 100 mM EMS nach der Methode von Leyser und Furner (2000) und weitere 5000 Samen mit 100 mM EMS nach der Methode von Lightner und Caspar (1998) behandelt. Anschließend wurden jeweils 5000 Samen auf 36 Töpfe Erde verteilt.

Der Erfolg der Mutagenese zeigte sich darin, daß ein Teil der M₁-Pflanzen abweichend gefärbte Sektoren in ihren Blättern aufwies (Abbildung 33). Dabei zeigte sich eine Dosisabhängigkeit in der Weise, daß bei der Mutagenese nach Leyser und Furner mit 50 mM EMS etwa 1 Pflanze pro Topf die gezeigten Sektoren aufwies, bei der Mutagenese mit 100 mM waren dies etwa 2 Pflanzen pro Topf. Das Protokoll nach Lightner und Caspar erwies sich als weniger effizient. Trotz einer Konzentration von 100 mM EMS konnten nur etwa 0,5 Pflanzen mit fehlfarbenen Blattsektoren pro Topf gezählt werden.

Die Samen dieser Pflanzen wurden nach Selbstbefruchtung als M₂-Samen geerntet und zur Suche nach Signaltransduktion wie im folgenden Kapitel beschrieben verwandt.

In der M₂-Generation wurde abermals der Erfolg der Mutagenese kontrolliert, indem nach abweichend gefärbten oder geformten Pflanzen gesucht wurde. Zwei Beispiele sind in Abbildung 34 dargestellt.



Abbildung 33: Erfolgskontrolle der Mutagenese durch Auftreten fehlfarbener Sektoren in der M₁-Generation

Mutagenisierte Samen der Linie 5GuDe #16-12 wurden auf Erde ausgesät und auffällige Blätter in der dritten Woche nach der Keimung fotografiert.



Abbildung 34: Form- und Farbmутanten in der M₂-Generation

M₂-Pflanzen wurden 3 Tage nach der Keimung fotografiert. Die Pfeile im linken Teil der Abbildung weisen auf abweichend gefärbte Pflanzen.

1.3.3.13 Suche nach Mutanten in der Signaltransduktion der Salizylsäure

Zur Identifikation von Mutanten, bei denen der Signalweg zwischen der Salizylsäureperzeption und der Aktivierung des *as-1*-Elements beeinträchtigt ist, wurden aus den in Kapitel 1.3.3.4 dargestellten Erwägungen zwei Strategien angewandt, die in den folgenden beiden Kapiteln beschrieben werden.

1.3.3.13.1 Stringente Strategie

Jeweils etwa 1000 M₂-Samen pro Topf wurden ausgesät und ab der zweiten Woche nach der Keimung bis zur Bildung erster Blütenknospen drei Mal wöchentlich mit 1 mM Salizylsäure und 0,2 mg/mL NAcPT besprüht. Die Selektionsbedingungen wurden nicht bis zur Fruchtreife fortgesetzt, da alle Blütenorgane extrem sensitiv gegenüber NAcPT waren (siehe Kapitel 1.3.3.4).

Aus etwa 108000 M₂-Pflanzen gingen 6 Überlebende hervor. Diese Pflanzen wurden als *ana1* bis *ana6* bezeichnet (*ana* $\hat{=}$ *as-1*-Element nicht aktiv). Eine dieser Pflanzen, *ana3*, bildete lediglich zehn Samen aus, die nicht keimfähig waren. Pflanzen der Linie *ana6* zeigten schmalere und nach unten eingerollte Rosettenblätter und eine ins olivgrüne abweichende Färbung (siehe Abbildung 36). Die weiteren Linien waren phänotypisch unauffällig.

1.3.3.13.2 Differentielle Strategie

Jeweils etwa 1000 M₂-Samen pro Topf wurden ausgesät und ab der zweiten Woche nach der Keimung zweimal wöchentlich mit 1 mM Salizylsäure und 0,2 mg/mL NAcPT be-

sprüht. Gleichzeitig wurden zwei Kontrollpopulationen von je 18000 5GuDe #16-12-F₆-Pflanzen angezogen. Eine dieser Kontrollpopulationen wurde mit einer Lösung von 0,2 mg/mL NAcPT besprüht, die andere mit der oben beschriebenen Lösung behandelt. Die Sprühinduktionen wurden eingestellt, sobald erkennbar wurde, daß in der mit Salizylsäure und NAcPT besprühten Kontrollpopulation alle Pflanzen absterben würden, in der uninduzierten Kontrolle hingegen noch nicht bei allen Pflanzen letale Schäden aufgetreten waren.

Aus etwa 108000 M₂-Pflanzen gingen bei Anwendung dieser Strategie 58 überlebende Pflanzen hervor, die als ana7 bis ana60 (mit Lücken) bezeichnet wurden. Einige dieser Pflanzen wiesen auffällige Phänotypen auf.

Weitere 36000 Samen, die aus einer zweiten Mutagenese mit 100 mM EMS und dem Protokoll nach Leyser stammten, wurden ebenfalls mit der differentiellen Strategie selektiert. Daraus gingen 22 überlebende Pflanzen hervor, die als surII.1 bis surII.25 (mit Lücken) bezeichnet wurden. Diese Linien wurden bisher nicht weiter charakterisiert.

1.3.3.14 Phänotypische Beschreibung auffälliger Linien aus der Selektion mit der differentiellen Strategie

Fotos von Linien mit den auffälligen Phänotypen sind in Abbildung 35 zusammengestellt.

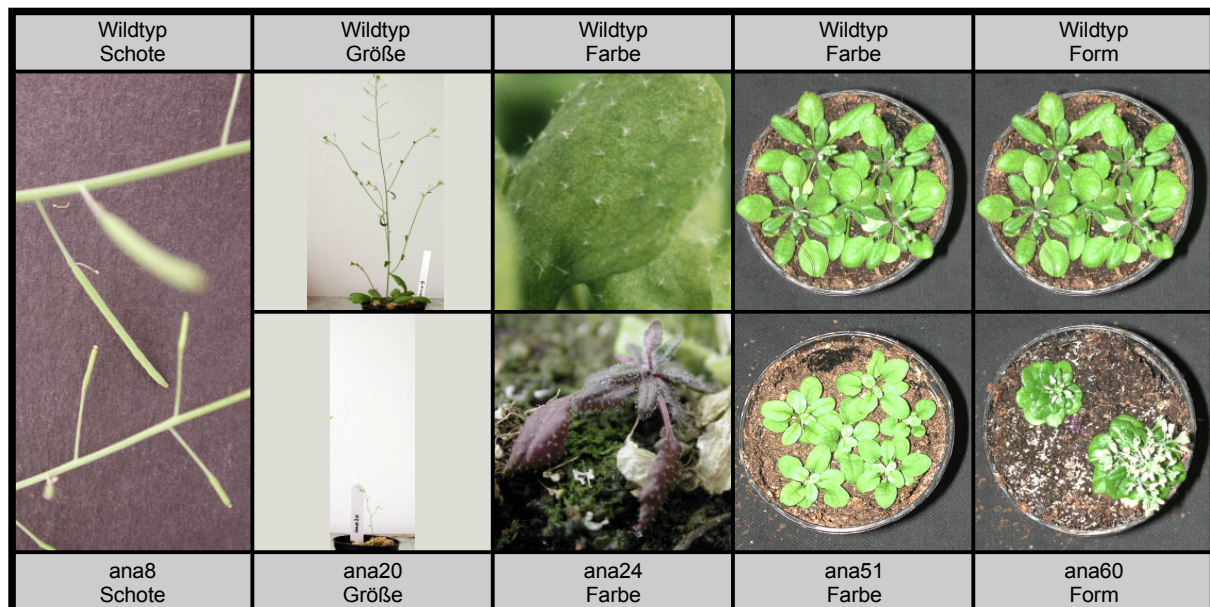


Abbildung 35: Überlebende der Selektion auf Signaltransduktionsmutanten mit auffälligem Phänotyp

Pflanzenteile und Pflanzen wurden in Entwicklungsstadien, in denen der Phänotyp besonders offensichtlich wurde fotografiert und vergleichbare Wildtypen hinzugezogen. Die Pflanzen der Linie ana60 waren 6 Wochen, die Wildtyppflanzen zum Vergleich 3 Wochen alt. Ansonsten wurden Pflanzen gleichen Alters miteinander verglichen.

Die Linie ana6 war durch Rosettenblätter gekennzeichnet, die einen seitlich nach unten eingerollten Rand ausbildeten und gelblich grün gefärbt waren.

Pflanzen der Linie ana8 wiesen stark verzweigte Infloreszenzen auf, die Schoten waren nur etwa halb so groß wie bei Pflanzen des Wildtyps. Die Generationszeit war verlängert und die wenigen Samen waren nicht keimfähig.

Pflanzen der Linie ana15 hatten kräftigere Blütentriebe und dickere Schoten, die nicht wie bei den Wildtyppflanzen konisch zur Narbe hin zuliefen, sondern unterhalb der Narbe gestutzt waren. Die Dichte der Trichome auf den Rosettenblättern war reduziert.

Pflanzen der Linie ana20 waren bei gleicher Form von Blättern, Blüten und Schoten klein und bildeten nur wenige Samen, von denen lediglich die Hälfte keimfähig war. Daher konnten an dieser Linie nicht alle Analysen durchgeführt werden. Die geringe Blattgröße ist auch in Abbildung 40 gut zu erkennen.

Die Linie ana24 war durch schmale, lange Rosettenblätter charakterisiert, die im Alter große Mengen an Anthocyanen bildeten, so daß sie zum Zeitpunkt des Abblühens dunkelviolett bis bräunlich erschienen.

Die Linie ana51 war durch kleinere, rundlichere, hellgrüne Blätter charakterisiert, die zur Rosettenmitte hin gelblich verfärbt waren.

Pflanzen der Linie ana60 zeigten einen extremen Zwergwuchs mit rundlichen, dachziegelartig überlappenden Blättern, deren Blattstiel stark verkürzt, und die darüberhinaus dick und hart waren und eine auffällig glänzende Kutikula besaßen. Die Blütenstände waren kurz und reich verzweigt. Die Früchte dieser Linie waren klein und hatten wenige Samen von eingeschränkter Keimfähigkeit. Die Generationszeit dieser Linie war gegenüber Pflanzen des Wildtyps verdoppelt. Daher konnten an dieser Linie nicht alle Analysen durchgeführt werden.

1.3.3.15 Verifizierung des Überlebens unter Selektionsbedingungen

Um Linien auszuschließen, welche die Selektion — insbesondere bei der differentiellen Strategie — nur zufällig überlebt hatten, wurden Nachkommen der Überlebenden erneut auf Erde ausgesät und denselben Selektionsbedingungen ausgesetzt wie deren Eltern.

Wie die Abbildung 36 zeigt, überlebten Pflanzen der unter stringenten Bedingungen selektierten Linien auch diesen Test zumindest teilweise. Allerdings wiesen die verschiedenen Linien ein unterschiedliches Erscheinungsbild auf. Während ana1 praktisch keine Anzeichen von Vergiftungen zeigte, waren jeweils zwei von vier Pflanzen der Linien ana2 und ana4 abgestorben, die anderen zwei begannen zu blühen.

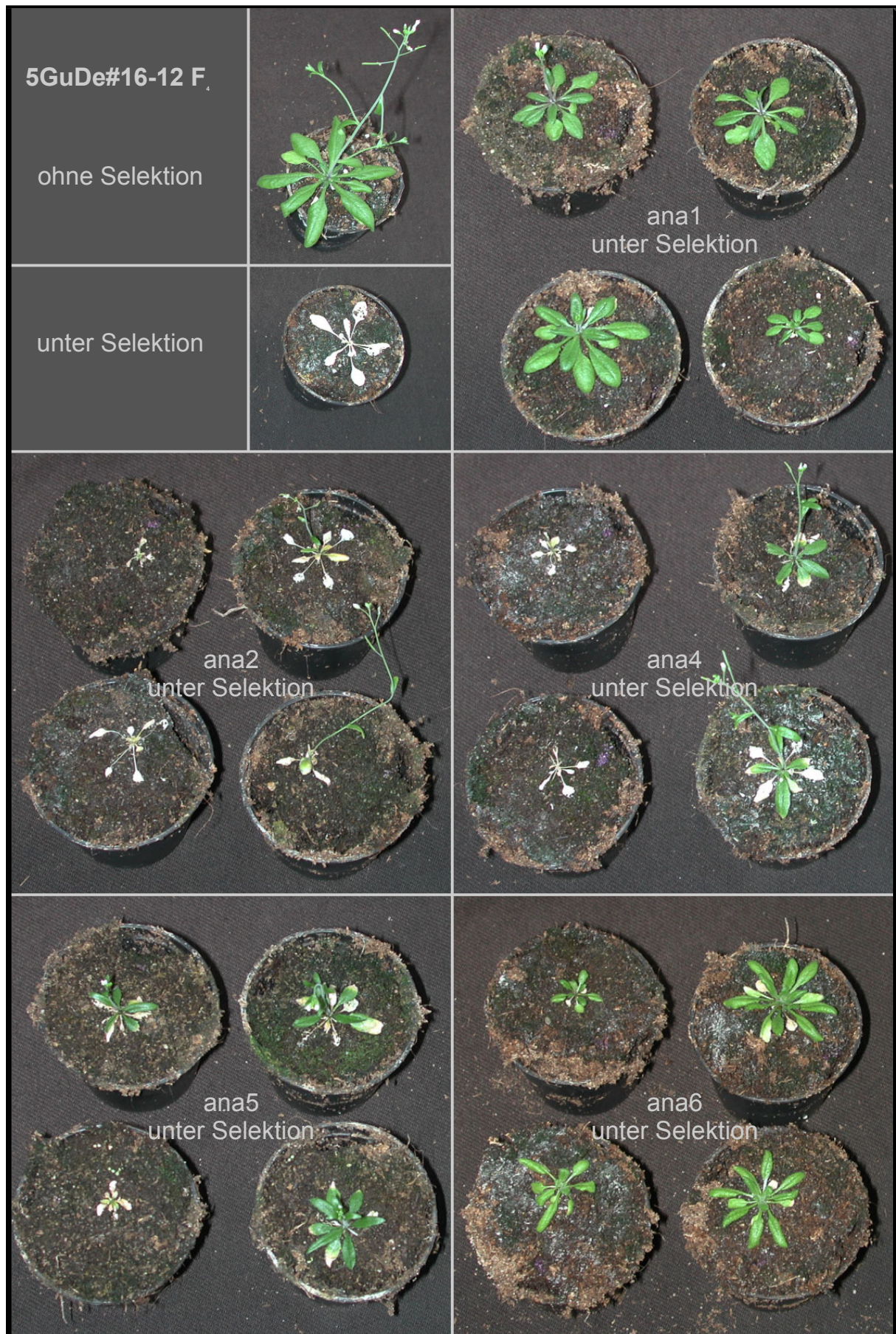


Abbildung 36: Kontrolle der überlebenden Linien aus der stringenten Selektion

Nachkommen der Überlebenden aus der stringenten Selektion auf Signaltransduktionsmutanten wurden auf Erde ausgesät und beginnend mit der zweiten Woche nach der Keimung drei Mal wöchentlich bis zur Blüte der ersten Pflanzen mit 1 mM Salizylsäure und 0,2 mg/mL NAcPT besprüht. Die Fotos wurden zwei Wochen nach Aufhebung des Selektionsdrucks aufgenommen.

Pflanzen der Linie ana5 wiesen im Vergleich zu ana2 und ana4 geringere Beeinträchtigungen auf, Pflanzen der Linie ana6 waren nur wenig sensitiver als Pflanzen der Linie ana1.

In Abbildung 37 sind neben den Linien ana1 bis ana6 auch überlebende Linien aus der differentiellen Selektionsstrategie gezeigt. Wie wegen der weniger stringenten Selektionsbedingungen zu erwarten war, befanden sich darunter einige Linien, die vollständig abstarben.

Deren Elternpflanzen hatten die Selektionsbedingungen wahrscheinlich nur zufällig und nicht wegen einer verminderten Aktivität der Deacetylase überlebt. Unter den überlebenden Linien fanden sich solche, die keinerlei Vergiftungserscheinungen aufwiesen, wie Linie ana38, neben anderen, bei denen eine deutliche Schädigung erkennbar war, wie bei Linie ana54, die aber dennoch überlebten. Die Samen von ana9 und ana30 waren nicht keimfähig.

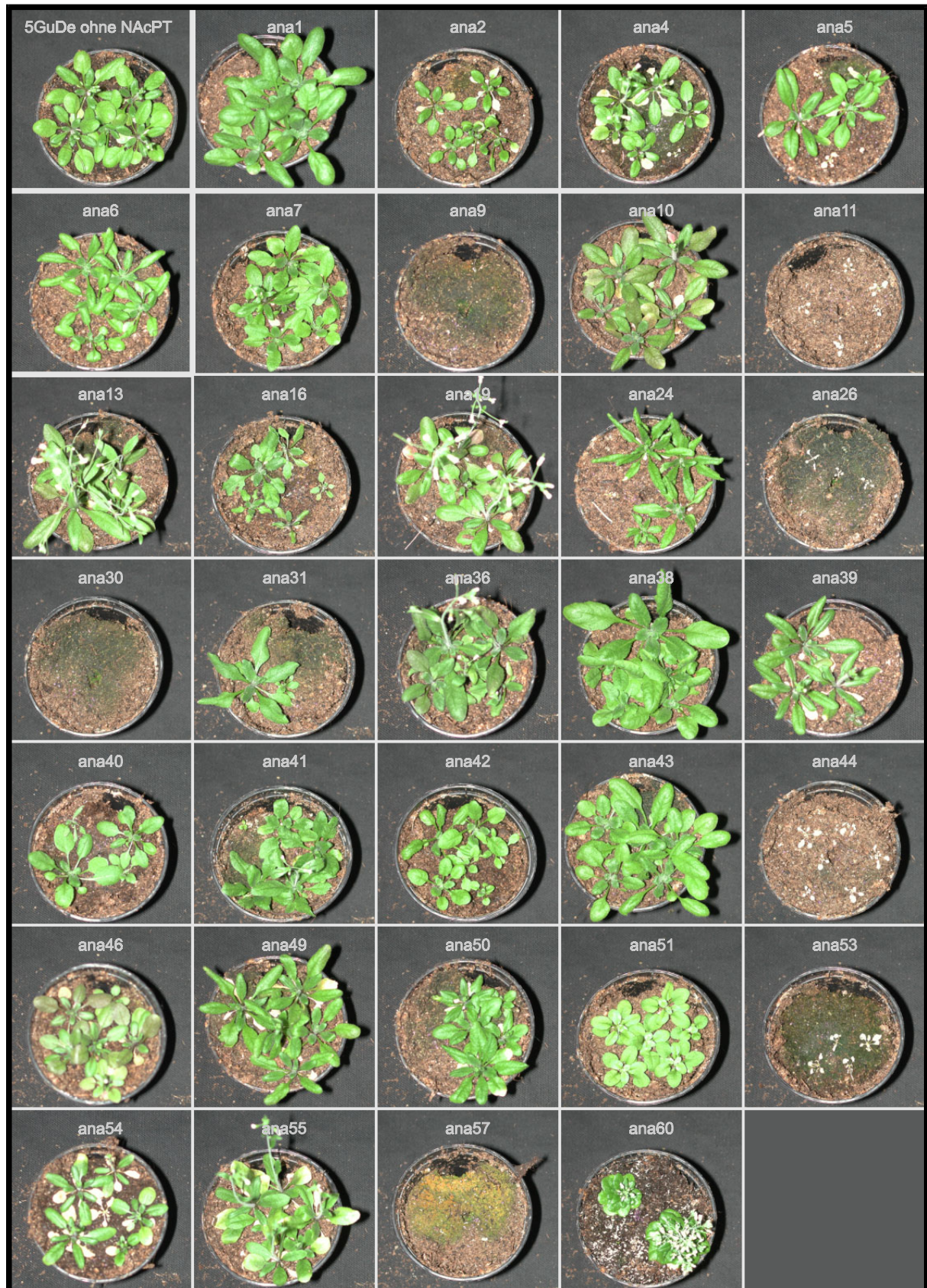


Abbildung 37: Kontrolle der überlebenden Linien aus den Selektionen auf Signaltransduktionsmutanten

Nachkommen der Überlebenden aus den beiden Selektionen auf Signaltransduktionsmutanten wurden auf Erde ausgesät und beginnend mit der zweiten Woche nach der Keimung für 2½ Wochen unter Selektionsbedingungen gehalten. Die Pflanzen wurden eine Woche nach Beendigung des Selektionsdrucks fotografiert.

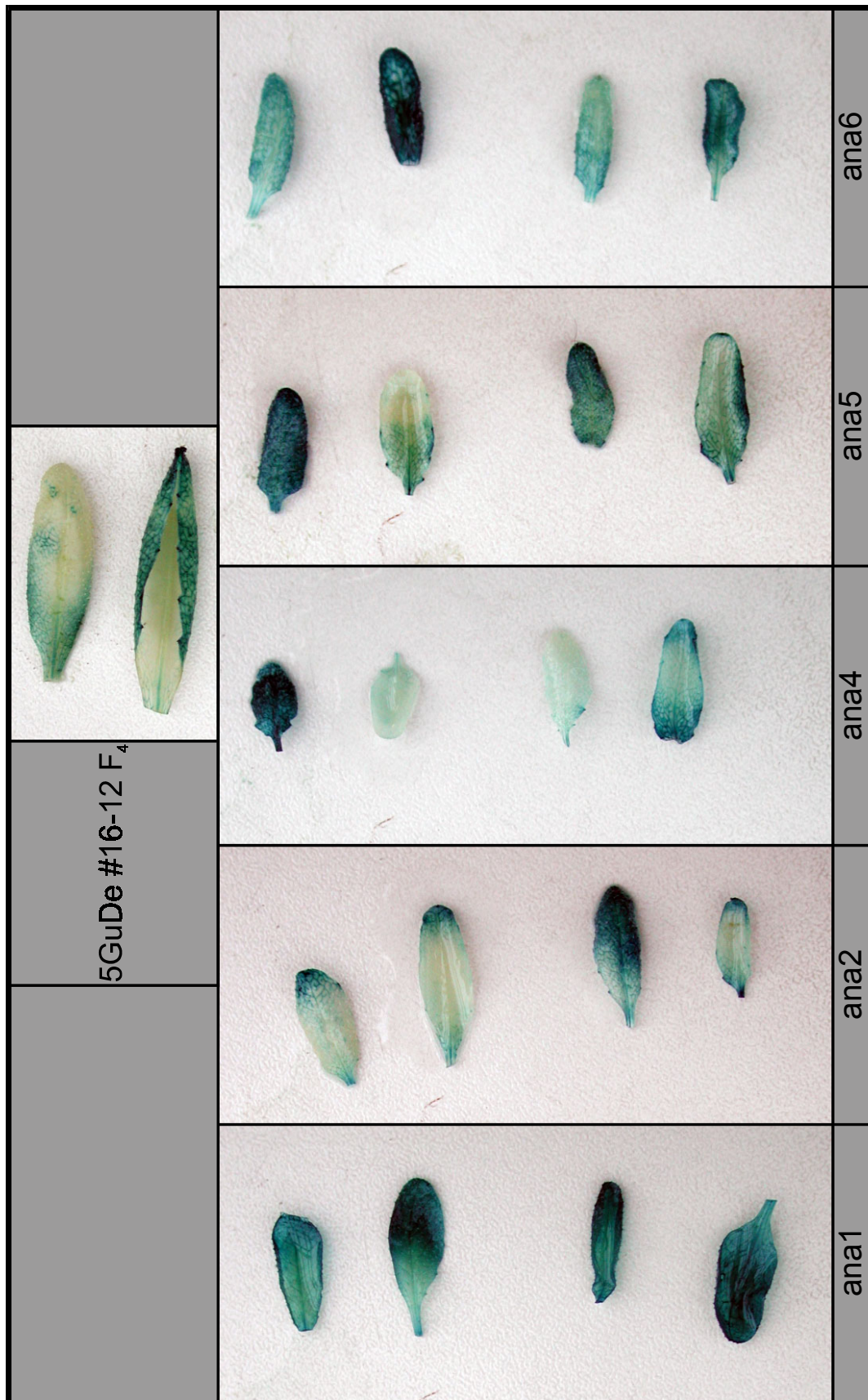


Abbildung 38: Histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidase in ana-Linien

Nachkommen der Überlebenden der stringenten Selektion auf Signaltransduktionsmutanten wurden auf Erde angezo- gen. Sechs Wochen nach der Keimung wurden Blätter von salizylsäureinduzierten Pflanzen abgetrennt und wie in Kapi- tel 1.2.29 beschrieben gefärbt.

1.3.3.16 Prüfung der Überlebenden auf das zweite Markergen β -Glucuronidase

Die β -Glucuronidase wurde als zweites Markergen in die Pflanzen eingebracht, um bei den Überlebenden der Selektion auf Verminderung der Deacetylaseaktivität Signaltransduktionsmutanten von Deacetylasemutanten unterscheiden zu können. Bei letzteren sollte eine unverminderte Aktivität der β -Glucuronidase vorhanden sein, während bei echten Mutanten in der Signaltransduktion die Deacetylase ebenfalls betroffen sein sollte.

Die ersten Ergebnisse, basierend auf der histochemischen Färbung (Abbildung 38), zeigten jedoch eine gegenüber der Kontrolle eher erhöhte β -Glucuronidaseaktivität. Auch in der quantitativen Untersuchung, dargestellt in Abbildung 39, ergaben sich Enzymaktivitäten, die durchweg im Bereich oder über den Werten der unmutierten Kontrollpflanzen lagen.

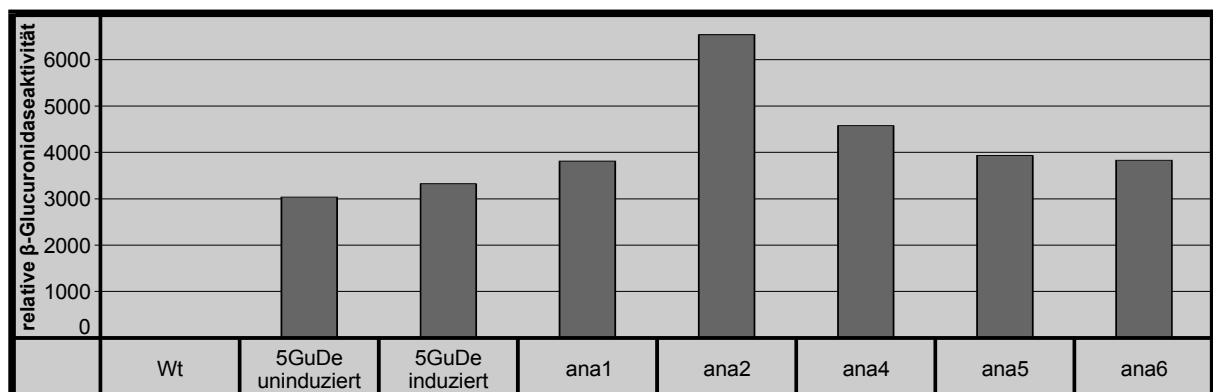


Abbildung 39: Bestimmung der β -Glucuronidaseaktivität in transgenen 5GuDe-Pflanzen und ana-Mutanten aus der stringenten Selektion

Nachkommen der Überlebenden der stringenten Selektion auf Signaltransduktionsmutanten wurden auf Erde angezogen. Sechs Wochen nach der Keimung wurden Blätter abgetrennt, die zuvor mit Salizylsäure induziert worden waren, und die β -Glucuronidaseaktivität wurde wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben bestimmt.

Aufgrund der vorhergegangenen Versuche, die β -Glucuronidaseaktivität quantitativ zu bestimmen, und die niemals eine Induzierbarkeit der Enzymaktivität durch Salizylsäure zeigten, mußte davon ausgegangen werden, daß geringe Verminderungen der Genexpression in den Mutanten nicht von dem Enzymaktivitätstest erfaßt werden. Angesichts der fehlenden Vergiftungserscheinungen, die auf eine sehr starke Reduktion der Deacetylaseaktivität hinweisen, wäre zumindest in den Linien ana1 und ana6 eine sichtbare Verminderung der β -Glucuronidaseaktivität gegenüber der transgenen Kontrollpflanze zu erwarten gewesen, beispielsweise auf Werte um $500 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ wie in den 1GuDe-Pflanzen, die ja ebenfalls keine Vergiftung auf Erde aufwiesen (siehe Kapitel 1.3.2.2).

Auch die Linien, deren Elternpflanzen die differentiellen Selektionsbedingungen überlebt hatten, wurden mittels histochemischer Färbung überprüft (Abbildung 40). In diesem Versuch fielen zwei Linien mit einer deutlich reduzierten Färbung auf, ana20 und ana24. Diese beiden Linien wiesen auch einen auffälligen Phänotyp auf (siehe Kapitel 1.3.3.14).

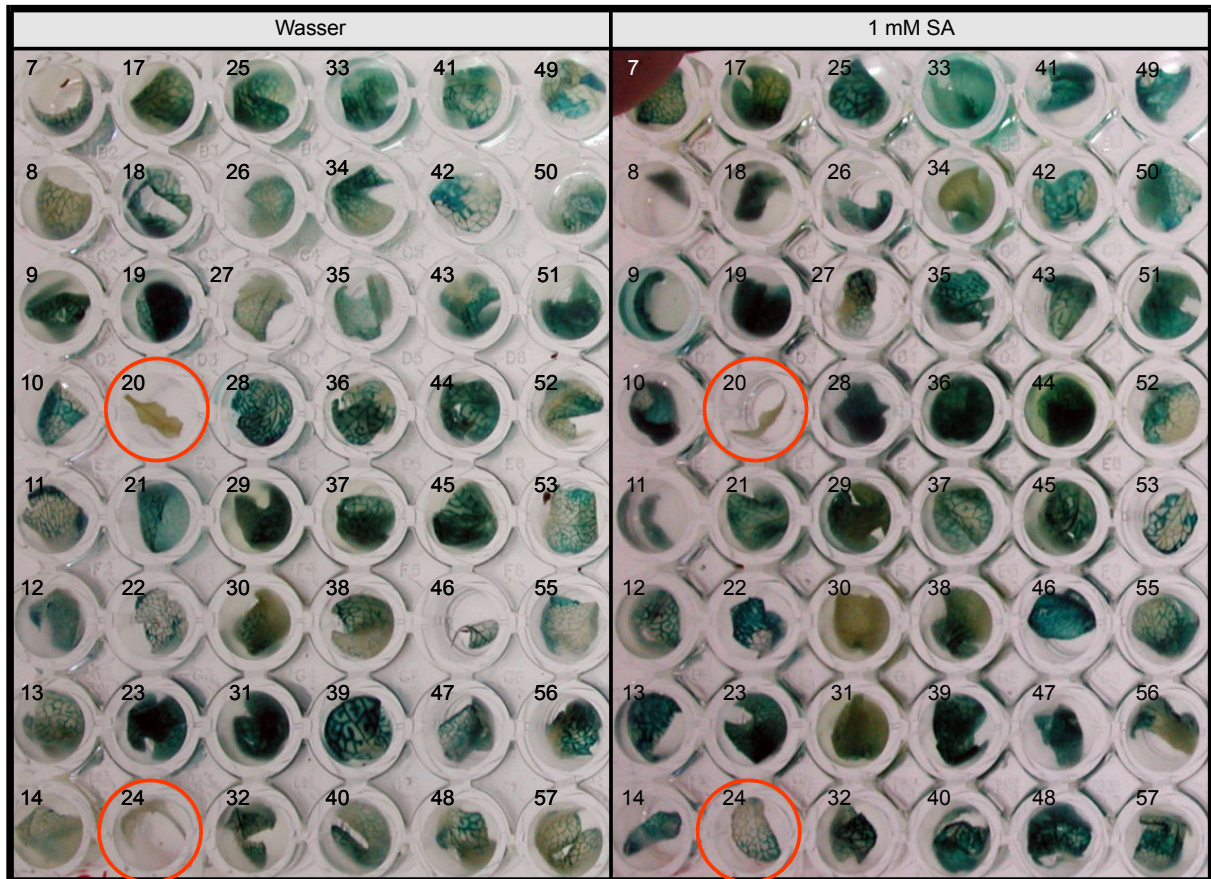


Abbildung 40: Histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidase in ana-Linien aus der differentiellen Selektion

Pflanzen, die die differentielle Selektion überlebt hatten und in Blüte standen, wurden mit den angegebenen Lösungen induziert. 12 h nach der Induktion wurden Blätter geerntet und wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben in Mikrotiterplatten gefärbt.

Weitere Ergebnisse wurden aus der quantitativen Analyse der β -Glucuronidaseaktivität erzielt (Abbildung 41). Auch hier traten die bereits beschriebenen Schwierigkeiten auf. Es fallen aber Linien auf, die eine signifikante Reduktion gegenüber der transgenen 5GuDe-Kontrolle aufweisen. Dies sind vor allem die Linien ana7, ana15, ana38, ana40, ana42, ana44, und ana49 bis ana55. Gemäß der in Kapitel 1.3.3.6 ausgeführten Erwägungen, können Reduktionen der spezifischen Enzymaktivität der β -Glucuronidase durch diesen Versuch durchaus dargestellt werden, so daß es sinnvoll erschien, diese Linien in weitere Analysen näher zu charakterisieren.

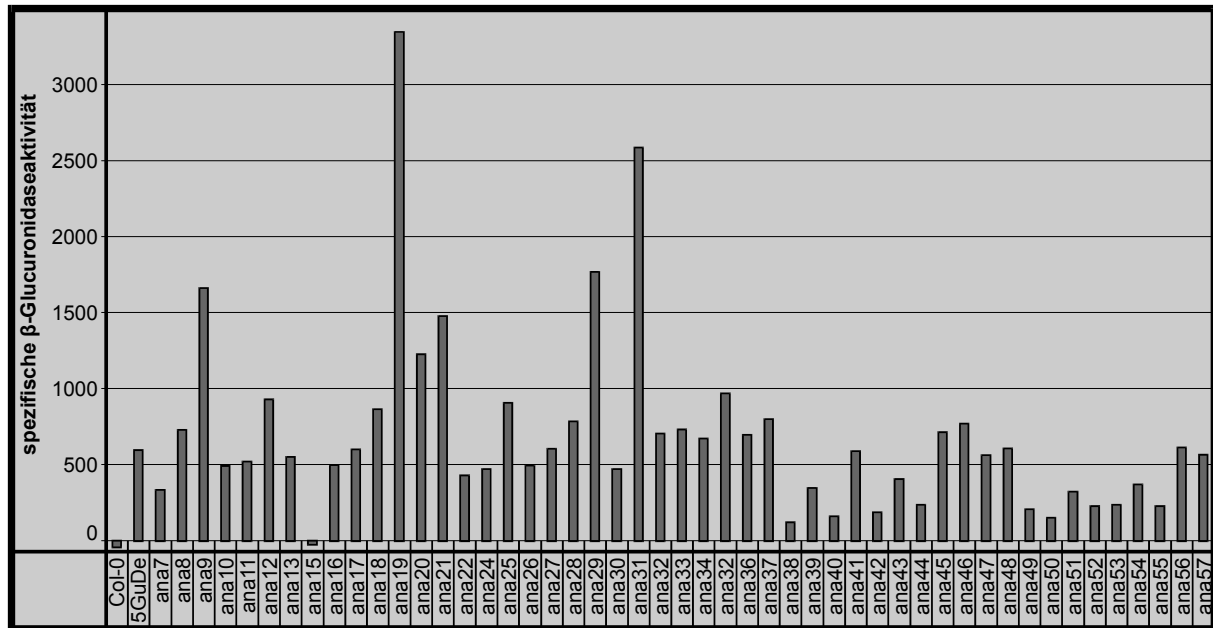


Abbildung 41: Quantitative Analyse der β -Glucuronidaseaktivität in ana-Linien aus der differentiellen Selektion

Von Pflanzen, die die differentielle Selektion überlebt hatten und in Blüte standen, wurde jeweils ein Blatt geerntet und von Proteinextrakten dieser Proben die spezifische Enzymaktivität der β -Glucuronidase wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben bestimmt.

Im Widerspruch zu den Ergebnissen aus der histochemischen Färbung ist die β -Glucuronidaseaktivität in den Linien ana20 und ana24 nicht signifikant gegenüber der transgenen Kontrolle vermindert, in Linie ana20 sogar deutlich erhöht.

1.3.3.17 Prüfung des Vorhandenseins der Deacetylase in ausgewählten ana-Linien

Die Linien ana15, ana38, ana40, ana42 und ana50, in denen die β -Glucuronidaseaktivität besonders niedrig war, wurden mittels PCR (Kapitel 1.2.12) mit den Primern Deac analyse fwd und Deac analyse rev auf das Vorhandensein der Deacetylase überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß die Deacetylase in der Linie ana15 nicht vorhanden war. Diese Linie schied damit als Mutante aus.

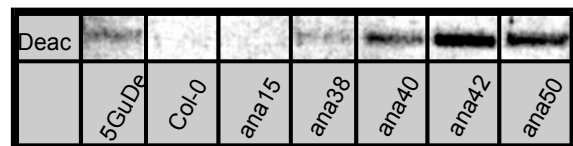


Abbildung 42: PCR-Analyse ausgewählter ana-Linien auf das Vorhandensein der Deacetylase

Mit 150 ng genomischer DNA der angegebenen Linien und den Primern Deac analyse fwd und Deac analyse rev wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Färbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und als Negativabbild fotografiert.

1.3.3.18 Auswahl von ana-Linien für die weitere Charakterisierung

Da die gesamte Anzahl der die Selektionsbedingungen überlebenden Linien nicht auf einmal bearbeitet werden konnte, mußten vor den folgenden Analysen vielversprechende Linien ausgewählt werden, die vorrangig bearbeitet werden sollten. Aufgrund der in den Kapiteln 1.3.3.15 bis 1.3.3.17 gewonnenen Ergebnisse wurde die Auswahl anhand der folgenden Kriterien durchgeführt:

- Eine Auswahl von Linien mit ungeschädigten, schwach geschädigten und stark geschädigten Pflanzen, welche die Selektionsbedingungen überlebt hatten
- Die Linie sollte eine entweder in der histochemischen Färbung oder in der quantitativen Untersuchung eine niedrige β -Glucuronidaseaktivität aufweisen
- Linien mit sichtbarem Phänotyp sind unabhängig von der β -Glucuronidaseaktivität interessant

Diese Kriterien führten zur Auswahl der in Tabelle 43 aufgeführten ana-Linien, mit denen die folgenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

Tabelle 43: ana-Linien für die weitere Analyse

Linie	Grund
ana1	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar
ana2	Deacetylaseaktivität leicht reduziert
ana4	Deacetylaseaktivität leicht reduziert
ana5	Deacetylaseaktivität reduziert
ana6	Deacetylaseaktivität stark reduziert, Phänotyp in Blattmorphologie und Färbung
ana7	Deacetylaseaktivität und β -Glucuronidaseaktivität reduziert
ana10	Deacetylaseaktivität reduziert
ana13	Deacetylaseaktivität stark reduziert
ana16	Deacetylaseaktivität stark reduziert, geringfügig kleinerer Wuchs
ana19	Deacetylaseaktivität reduziert
ana20	extrem kleiner Wuchs, geringe Fruchtbarkeit und Keimfähigkeit, keine β -Glucuronidaseaktivität in der Färbung
ana24	Deacetylaseaktivität stark reduziert, Phänotyp in Blattmorphologie und Anthocyanengehalt, geringe β -Glucuronidaseaktivität in der Färbung
ana31	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar, geringe Keimfähigkeit, hohe β -Glucuronidaseaktivität
ana36	Deacetylaseaktivität reduziert
ana38	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar, β -Glucuronidaseaktivität stark reduziert
ana40	Deacetylaseaktivität stark reduziert, β -Glucuronidaseaktivität reduziert
ana41	Deacetylaseaktivität stark reduziert
ana42	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar, β -Glucuronidaseaktivität stark reduziert
ana43	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar, β -Glucuronidaseaktivität leicht reduziert
ana46	Deacetylaseaktivität stark reduziert
ana49	Deacetylaseaktivität leicht reduziert
ana50	Deacetylaseaktivität reduziert β -Glucuronidaseaktivität stark reduziert
ana51	Deacetylaseaktivität nicht nachweisbar, β -Glucuronidaseaktivität leicht reduziert, Phänotyp in Blattmorphologie und Färbung
ana54	Deacetylaseaktivität reduziert β -Glucuronidaseaktivität stark reduziert
ana55	Deacetylaseaktivität leicht reduziert
ana60	extremer Phänotyp

1.3.3.19 Expressionsanalysen ausgewählter überlebender Linien

Da die Ergebnisse zur Charakterisierung des zweiten Markergens β -Glucuronidase in Färbung und Quantifizierung nicht eindeutig waren, wurde die Transkription beider Gene näher untersucht. Auch diese Untersuchungen dienten zur Klärung der Frage, ob die Überlebenden der Selektion auf Signaltransduktionsmutanten wirklich solche sind oder ob sie eine Mutation im Deacetylasegen als Selektionsmarker besitzen. Bei Signaltransduktionsmutanten wäre zu erwarten, daß die Induzierbarkeit von Deacetylase und β -Glucuronidase vermindert und die Transkriptmengen zumindest im induzierten Zustand verringert wären, während bei Mutanten im Reportergen Transkriptmengen und Induzierbarkeit unverändert sein müßten oder die beiden Reportergene sich divergent verhielten. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 43 dargestellt.

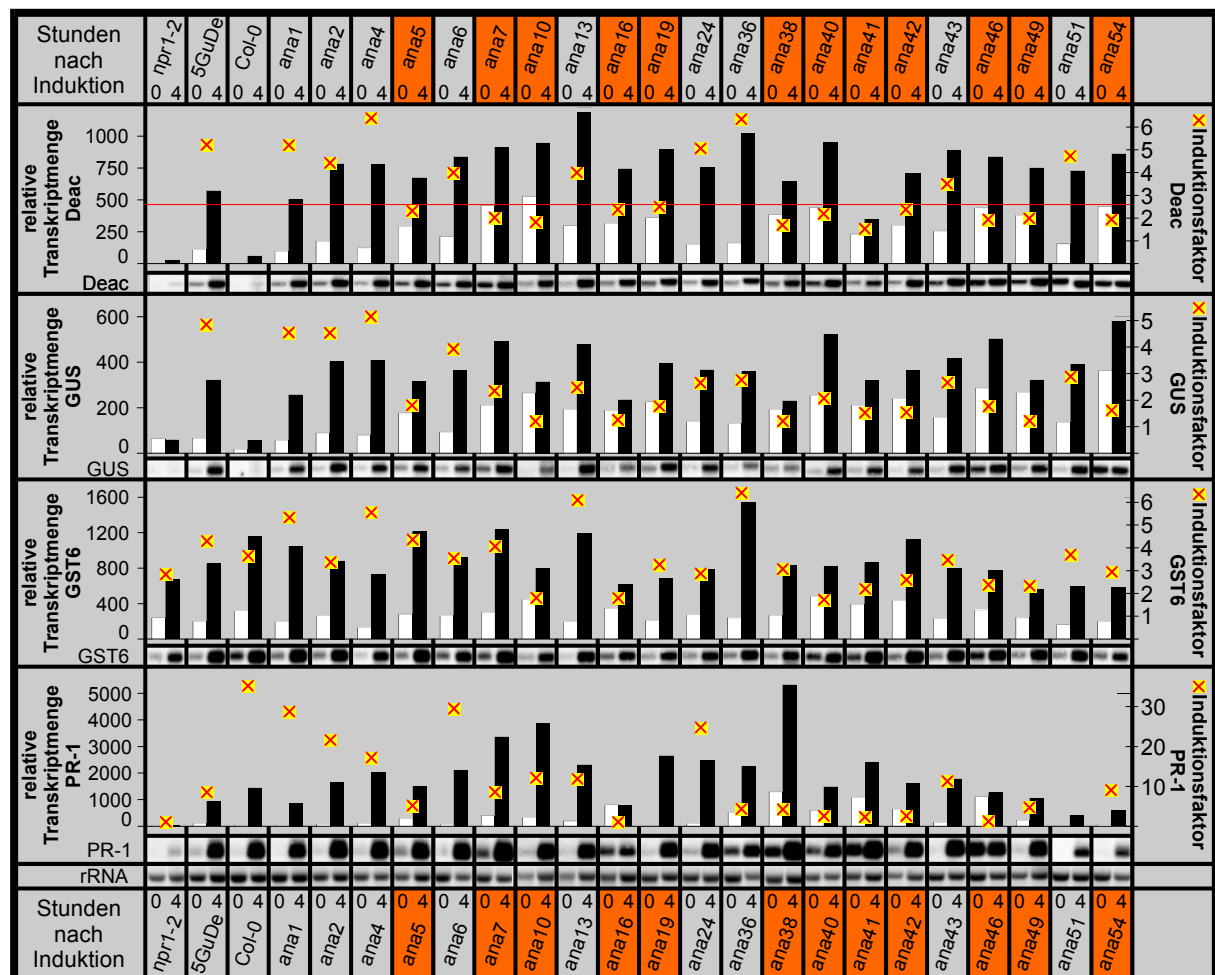


Abbildung 43: Prüfung ausgewählter ana-Linien auf Expression und Induktion verschiedener Markergene

Pflanzen der anhand der in Tabelle 43 aufgeführten Kriterien ausgewählten ana-Linien wurden auf Erde angezogen und drei Wochen nach der Keimung mit 1 mM Salizylsäure induziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Blattproben genommen. RNA-Präparationen wurden gemäß Kapitel 1.2.33 auf die Expression der transgenen Marker Deacetylase und β -Glucuronidase sowie auf die pflanzlichen Gene *GST6* und *PR-1* getestet. Die Induktionsfaktoren der Gene nach 4 h sind durch gelb-rote Kreuze repräsentiert. Die rote Linie kennzeichnet die Schwelle unterhalb derer eine signifikante Reduktion der Induzierbarkeit des *as-1*-Deacetylasekonstrukts angenommen wurde. Linien, bei denen dies der Fall ist, sind farblich markiert.

In diesem Versuch lagen die Induktionsraten von Deacetylase und β -Glucuronidase in der transgenen Kontrolllinie 5GuDe #16-12 etwa beim Faktor 5. Dies deckt sich mit den vorhergehenden Induktionsversuchen, bei denen die Faktoren im Mittelwert bei $5,6 \pm 1$ lagen. Läßt man daher bei vorsichtiger Schätzung ein experimentell bedingtes Abweichen des Induktionsfaktors um die dreifache Schwankungsbreite nach unten zu und betrachtet Induktionsraten unter dem Faktor 2,6 als signifikant vermindert, so gehen aus diesem Versuch zwölf von Linien hervor, die man gemessen am Kriterium des Induktionsfaktors als Kandidaten für echte Salizylsäure-Signaltransduktionsmutanten bezeichnen kann. Diese Linien sind in Tabelle 44 mit ihren Induktionsfaktoren aufgeführt.

Problematisch ist hierbei, daß die Transkriptmengen von Deacetylase und β -Glucuronidase in den ana-Linien fast immer oberhalb derer in der transgenen Kontrollpflanze liegen. Diesem Umstand muß jedoch nicht unbedingt Rechnung getragen werden, da die Transkriptmengen in vorherigen Versuchen von Pflanze zu Pflanze sehr stark schwankten, der Induktionsfaktor sich aber als konstant erwies. Eine breitere Datenbasis auf Grund mehrerer gleichartiger Versuche wäre aber zur Erhöhung der Aussagekraft und zur Absicherung der relativ geringen Unterschiede zwischen den einzelnen Linien sehr wünschenswert.

Weiterhin gibt es ana-Linien, bei denen eine Divergenz zwischen der Induzierbarkeit der Deacetylase und der β -Glucuronidase in der Weise festgestellt wurde, daß der Induktionsfaktor der β -Glucuronidase beeinträchtigt scheint, derjenige der Deacetylase hingegen nicht. Diese ana-Linien sind mit den zugehörigen Induktionsfaktoren in

Tabelle 45 weiter unten aufgeführt. Weiterhin ist es möglich, daß diese Linien, insbesondere jener mit stark unterschiedlicher RNA-Konzentration der beiden Proben (ana31), könnten Wiederholungen dieses Induktionsversuchs geben, die aus den oben ausgeführten Erwägungen ohnehin angebracht wären.

Tabelle 44: ana-Linien mit verringerter Induzierbarkeit des as-1-Elements

Linie	Induktionsfaktor			
	Deac	GUS	GST6	PR-1
5GuDe	5,21	4,83	4,28	8,45
ana5	2,30	1,79	4,35	5,07
ana7	2,00	2,33	4,05	8,49
ana10	1,81	1,19	1,79	12,04
ana16	2,36	1,24	1,79	0,98
ana19	2,49	1,76	3,25	div/0 ¹⁾
ana38	1,69	1,20	3,05	4,11
ana40	2,17	2,05	1,71	2,50
ana41	1,51	1,52	2,19	2,24
ana42	2,36	1,53	2,56	2,50
ana46	1,92	1,75	2,36	1,15
ana49	1,98	1,21	2,32	4,64
ana54	1,92	1,60	2,92	8,98

¹⁾ Division durch Null

Tabelle 45: ana-Linien mit stark divergenter Induzierbarkeit von Deac und GUS

Linie	Induktionsfaktor			
	Deac	GUS	GST6	PR-1
5GuDe	5,21	4,83	4,28	8,45
ana13	3,99	2,46	6,08	11,80
ana24	5,04	2,64	2,86	24,67
ana31	div/0 ¹⁾	1,21	1,40	div/0 ¹⁾
ana36	6,33	2,75	6,39	4,24
ana43	3,49	2,65	3,45	11,20
ana51	4,71	2,87	3,69	div/0 ¹⁾

¹⁾ Division durch Null

Bei allen restlichen Linien, die in diesem Versuch getestet wurden, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließen, daß es sich um Signaltransduktionsmutanten handelt, da sie keine signifikante Verringerung der Induzierbarkeit aufweisen. Bei diesen Linien handelt es sich entweder um Linien mit Mutationen im Deacetylasegen oder um solche Signal-

transduktionsmutanten, die keine signifikante Reduktion der Induzierbarkeit zeigen. Die Linie ana50 konnte wegen geringer RNA-Mengen nicht ausgewertet werden. Diese Linien sind mit ihren Induktionsfaktoren in Tabelle 46 zusammengefaßt.

Auffällig ist, daß die Mehrzahl der als wahrscheinliche Signaltransduktionsmutanten anzusehenden Linien eine Reduktion des GST6-Expression zeigen, nämlich alle außer ana5, ana7, ana19 und ana38.

Bei den Linien ana16 und ana46 ist darüber hinaus die Induzierbarkeit von PR-1 praktisch aufgehoben, allerdings dadurch, daß eine hohe Aktivität bereits im uninduzierten Zustand vorliegt. Bei den Linien ana40, ana41 und ana42 ist die Induzierbarkeit von PR-1 stark reduziert, wobei bei ana41 wieder eine Erhöhung der uninduzierten Expression, bei ana40 und ana42 hingegen eine Reduktion der Expression 4 h nach der Induktion verantwortlich ist. Bei allen anderen Linien wurde eine mehr oder weniger unveränderte Induzierbarkeit von PR-1 festgestellt.

1.3.3.20 Zusammenfassung der Charakteristika der getesteten ana-Linien

Die getesteten Eigenschaften der die Suizidbedingungen überlebenden Linien sind in Tabelle 47 zusammengefaßt. Die rot markierten Linien sind wahrscheinliche Signaltransduktionsmutanten, die blau markierten sind mit großer Wahrscheinlichkeit Mutanten im Suizidgen. Bei den grau markierten Linien ist die Situation noch nicht abschließend geklärt, nicht markierte Linien wurden nicht näher untersucht, überlebten bei der Verifizierung des suizidresistenten Phänotyps nicht oder waren aufgrund geringer Fruchtbarkeit oder anderer Umstände frühzeitig ausgestorben.

Tabelle 46: ana-Linien ohne Beeinträchtigung der Induzierbarkeit des as-1-Elements

Linie	Induktionsfaktor			
	Deac	GUS	GST6	PR-1
5GuDe	5,21	4,83	4,28	8,45
ana1	5,19	4,53	5,32	28,67
ana2	4,41	4,52	3,36	21,53
ana4	6,37	5,14	5,54	17,12
ana6	3,98	3,92	3,53	29,43
ana50	div/0 ¹⁾	div/0 ¹⁾	div/0 ¹⁾	div/0 ¹⁾

¹⁾ Division durch Null

Tabelle 47: Zusammenfassung der Eigenschaften überlebender Linien

Linie	Phänotyp	GUS-Färbung	GUS-Aktivität	Transgen	zweiter Suizid	Induktionsfaktor <i>Deac</i>	Induktionsfaktor <i>GUS</i>	Induktionsfaktor <i>GST6</i>	Induktionsfaktor <i>PR-1</i>
ana1	•	↑	↔	○	1	↔	↔	↔	↔
ana2	•	↔	↑	○	4	↔	↔	↔	↔
ana3	‡								
ana4	•	↔	↑	○	3	↔	↔	↔	↔
ana5	•	↔	↔	○	2	↓	↓	↔	↓
ana6	♣	↑	↔	○	2	↔	↔	↔	↔
ana7	•	↔	↓	○	3	↓	↓	↔	↔
ana8	♣‡	↓	↔						
ana9	‡	↔	↑↑						
ana10	•	↔	↔	○	3	↓	↓	↓	↔
ana11	•	↔	↔	○	†				
ana12	•	↔	↑	○	○	○	○	○	○
ana13	•	↔	↔	○	1	↔	↓	↔	↔
ana14	†	↔							
ana15	♣	○	↓↓↓	*	○	○	○	○	○
ana16	•	○	↔	○	1	↓	↓	↓	↓
ana17	•	↔	↔	○	○	○	○	○	○
ana18	•	↔	↑	○	○	○	○	○	○
ana19	•	↑	↑↑	○	2	↓	↓	↔	↑
ana20	♣	↓↓	↑	○	○	○	○	○	○
ana21	•	↔	↑↑	○	○	○	○	○	○
ana22	†	↔	↔						
ana23	•	↑	○	○	○	○	○	○	○
ana24	♣	↓	↔	○	2	↔	↓	↔	↔
ana25	•	↑	↑	○	○	○	○	○	○
ana26	•	↔	↔	○	†				
ana27	†	↔	↔						
ana28	•	↑	↑	○	○	○	○	○	○
ana29	•	↑	↑↑	○	○	○	○	○	○
ana30	‡	↔	↔						
ana31	•	↑	↑↑	○	1	↑	↓	↔	↑
ana32	†	↔	↑						
ana33	•	↔	↔	○	○	○	○	○	○
ana34	†	↔	↔						
ana35	•	↑	↑	○	○	○	○	○	○
ana36	•	↑	↔	○	2	↔	↓	↔	↓
ana37	•	↔	↑	○	○	○	○	○	○
ana38	•	↔	↓↓	✓	1	↓	↓	↔	↓
ana39	•	↑	↓	○	3	○	○	○	○
ana40	•	↑	↓↓	✓	1	↓	↓	↓	↓
ana41	•	↔	↔	○	1	↓	↓	↓	↓
ana42	•	↔	↓↓	✓	1	↓	↓	↔	↓
ana43	•	↔	↓	○	1	↔	↓	↔	↔
ana44	•	↑	↓	○	†				
ana45	•	↑	↔	○	○	○	○	○	○
ana46	•	↑	↔	○	2	↓	↓	↓	↓
ana47	†	↑	↔						
ana48	†	↑	↔						
ana49	•	↔	↓↓	○	3	↓	↓	↓	↓
ana50	•	↔	↓↓	✓	3	○	○	○	○
ana51	♣	↑	↓	○	1	↔	↓	↔	↑
ana52	•	↔	↓	○	○	○	○	○	○
ana53	•	↔	↓	○	†				
ana54	•	○	↓	○	4	↓	↓	↔	↔
ana55	•	↔	↓	○	4	○	○	○	○
ana56	•	↔	↔	○	○	○	○	○	○
ana57	‡	↔	↔						
ana58	†								
ana59	†								
ana60	♣	○	○	○	1	○	○	○	○

Phänotyp..... • unauffällig; ♣ auffälliger Phänotyp; † Pflanze starb oder blühte nicht; ‡ Pflanze ohne Samen oder Samen nicht keimfähig.

GUS-Färbung..... ↔ durchschnittlich; ↑ stärker; ↓ schwächer; ↓↓ keine; ○ nicht getestet.

GUS-Aktivität..... ↔ durchschnittlich; ↑ stärker (< 2×); ↑↑ viel stärker (> 2×) ↓ schwächer (> ½×) ↓↓ viel schwächer (< ½×) ↓↓↓ keine; ○ nicht getestet.

Transgen..... ✓ vorhanden; * nicht vorhanden; ○ nicht getestet.

zweiter Suizid..... 1 überlebt ohne Schäden; 2 überlebt mit geringen Schäden; 3 überlebt mit deutlichen Schäden; 4 überlebt mit sehr starken Schäden; † überlebt nicht; ○ nicht getestet.

Induktionsfaktoren... ↓ geringer; ↔ nicht geringer; ↑ nicht berechenbar; ○ nicht getestet.

Markierungen..... leere Felder Linie zum Zeitpunkt der Analyse ausgestorben; rot wahrscheinliche Signaltransduktionsmutante; blau wahrscheinliche Mutante im Deacetylasegen; grau nicht abschließend geklärt

1.3.3.21 Histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidase in ausgewählten überlebenden Linien

An den in Kapitel 1.3.3.18 ausgewählten Linien wurden erneut histochemische Färbungen an ganzen Pflanzen zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität durchgeführt, um die Pflanzen auf gewebsspezifische Reduktionen der Transkriptionsaktivierung durch das *as-1*-Element zu prüfen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 44 und Abbildung 45 dargestellt. Die meisten der Linien unterscheiden sich nicht sichtbar von den transgenen 5GuDe-Kontrollpflanzen. Im Folgenden werden die auffälligen Linien beschrieben:

In der Linie ana19 zeigt sich eine geringere Färbung im Hypokotyl.

In der Linie ana38 sind die Blätter auffällig gering gefärbt, während im Hypokotyl eine normale Färbung auftritt.

Pflanzen der Linie ana40 zeigen im uninduzierten Zustand eine geringere Färbung in allen oberirdischen Teilen.

In der Linie ana43 sind die Blätter nach Salizylsäurebehandlung weniger gefärbt.

Bei der Linie ana51 sind alle oberirdischen Teile weniger intensiv gefärbt.

Bei der Linie ana54 sind alle oberirdischen Teile nach Induktion mit Salizylsäure weniger gefärbt.

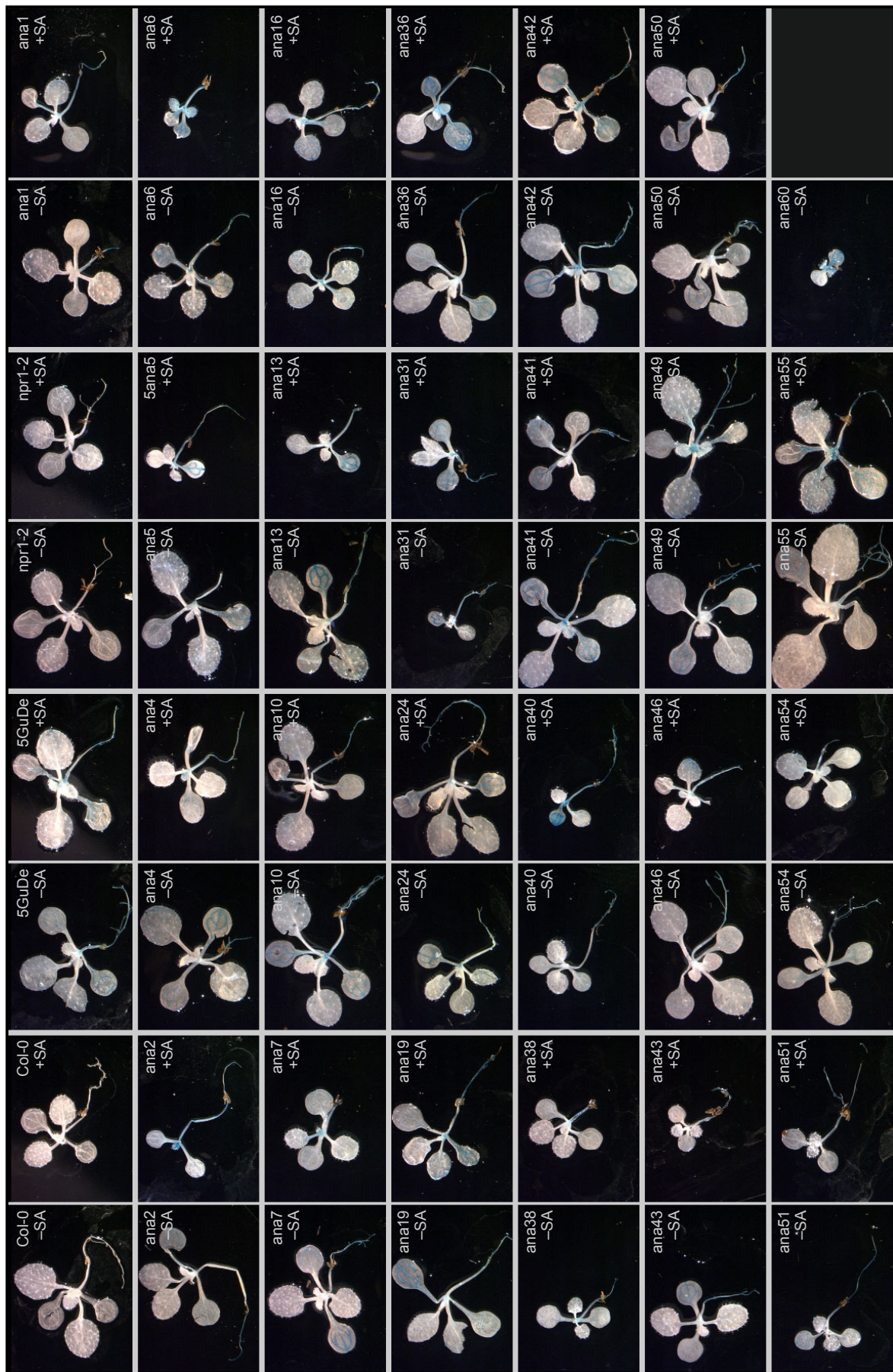


Abbildung 44: Histochemische Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzen ausgewählter überlebender Linien

Pflanzen der in Kapitel 1.3.3.18 ausgewählten Linien wurden in Erde angezogen. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die Pflanzen vorsichtig aus der Erde gezogen und nach behutsamer Entfernung an den Wurzeln haftender Erdpartikel wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben gefärbt. 1 mM Salizylsäure wurde 6 h vor der Ernte durch Sprühen appli-

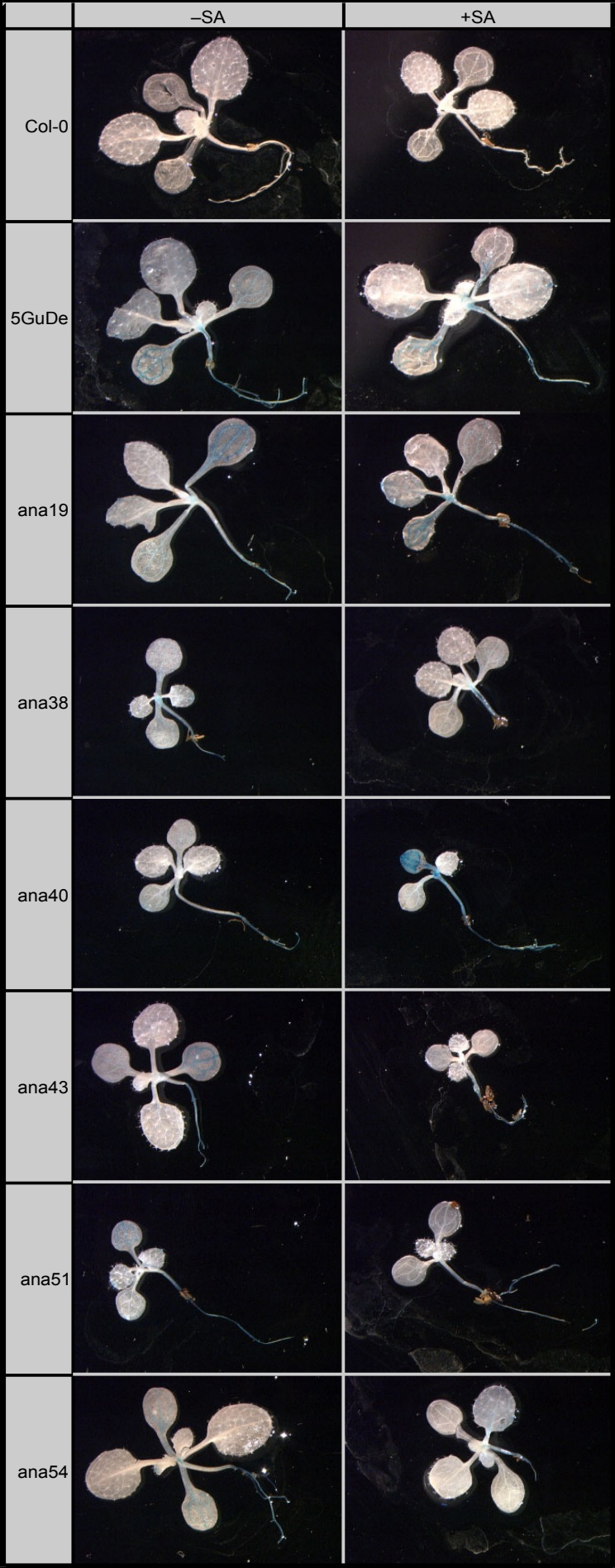


Abbildung 45: Detailliertere Abbildungen auffälliger Pflanzen aus Abbildung 44

1.3.3.22 Infektion ausgewählter überlebender Linien mit *Pseudomonas syringae*

Drei Wochen alte Pflanzen der in Kapitel 1.3.3.18 ausgewählten Linien wurden mit *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 und *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 *avrRpt2* infiziert. Die meisten Linien entwickelten wie der Wildtyp innerhalb von 48 h die typischen Symptome einer HR. Auffällig war, daß die Linie ana38 bereits nach 27 h große Läsionen aufwies, die bereits fast die in Abbildung 46 gezeigte Größe erreicht hatten. Bei den anderen Linien wurden zu diesem Zeitpunkt die ersten Bereiche absterbender Gewebe erkennbar oder waren noch nicht sichtbar. Bei der Linie ana 41 waren auch nach einer Woche nur sehr kleine Läsionen sichtbar, während bei den Kontrollpflanzen des Wildtyps die infizierten Blätter vollkommen abgestorben waren.

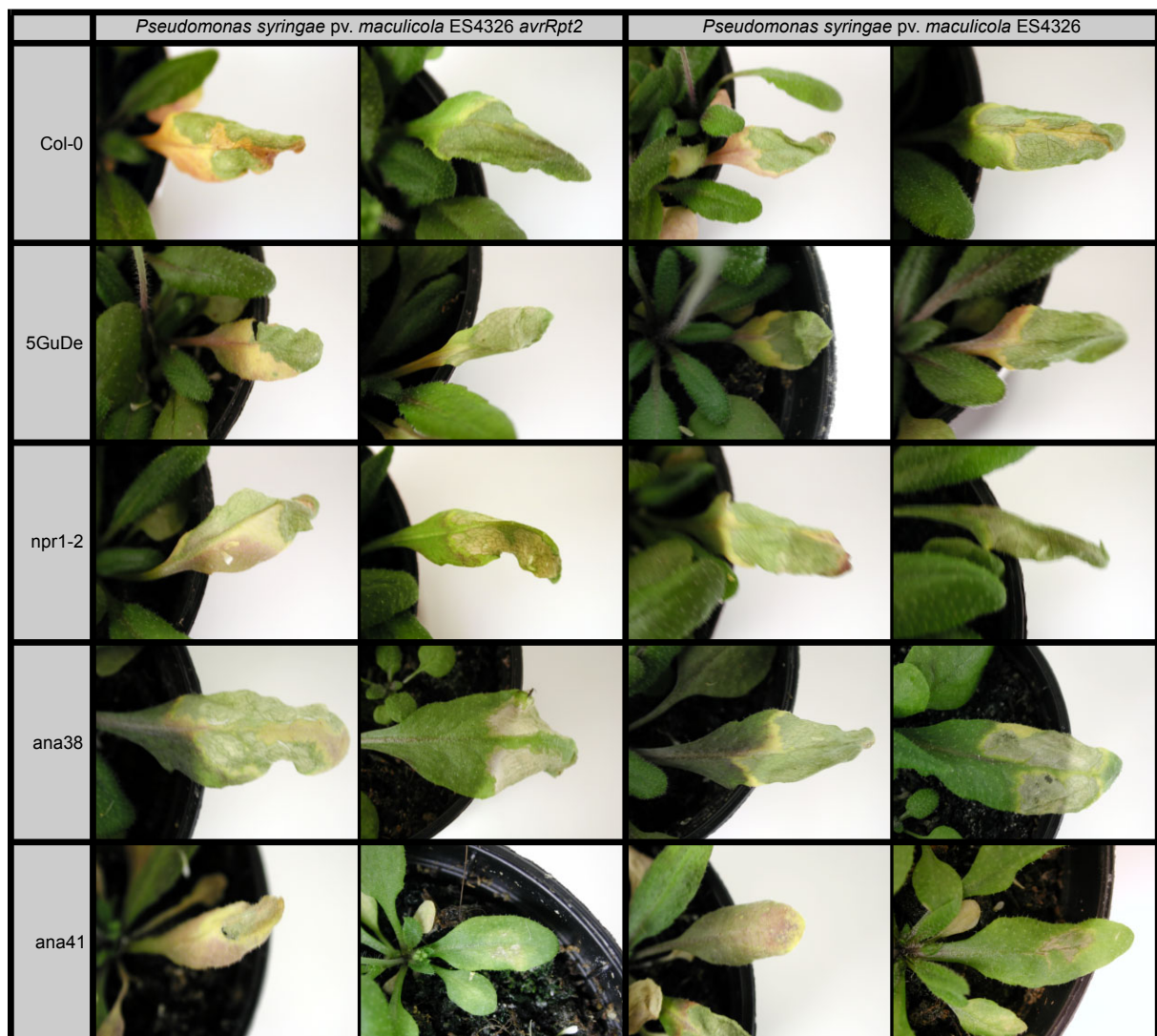


Abbildung 46: Kontrollen und auffällige ana-Linien nach Infektion mit *Pseudomonas syringae*

Die Blätter von je zwei verschiedenen Pflanzen wurden wie in Kapitel 1.2.25 beschrieben mit *Pseudomonas syringae* infiziert und 72 h nach der Infektion fotografiert.

1.4 Diskussion

1.4.1 Expressionsstärke, Gewebsspezifität und Entwicklungsabhängigkeit des *as-1*-Elements im Unterschied zum *ocs*-Element

Ziel dieser Arbeit war es Mutanten zu erzeugen, die nach Induktion mit Salizylsäure das *as-1*-Element nicht mehr aktivieren können. Zur Konstruktion eines induzierbaren Suizidsystems wurde auf die Daten zurückgegriffen, die Zhang und Singh (1994) über das *as-1*-ähnliche *ocs*-Element veröffentlicht hatten. In dieser Studie wurde gezeigt, daß das *ocs*-Element eine geringe Grundexpression in Wurzeln vermittelt. Um überhaupt einen Expressionsnachweis mittels histochemischer Färbung führen zu können, mußten vier Kopien des *ocs*-Elements als Promotor vor dem β -Glucuronidasegen eingesetzt werden. Die Grundexpression in den oberirdischen Organen befand sich mit diesem $4 \times \text{ocs}$ -Promotor an der Nachweisgrenze der quantitativen RT-PCR. In Wurzeln und oberirdischen Organen war das *ocs*-Element durch 50 μM Auxin um das 50 – 100-fache und mit Salizylsäure um das 10 – 20-fache induzierbar. Die Aktivierung der Transkription nach der Induktion mit Salizylsäure verlief transient. Mit dem –90-Fragment des 35S-Promotors, das ein *as-1*-Element enthält, konnte eine histochemische β -Glucuronidasefärbung ebenfalls nur nach Induktion mit Auxin festgestellt werden, wobei die Aktivität schwächer war als mit dem $4 \times \text{ocs}$ -Promotor. Weitere Daten mit dem –90-Fragment des 35S-Promotors wurden nicht gezeigt.

Anhand dieser Daten schien es möglich zu sein, ein induzierbares dominant negatives Selektionssystem mit dem *as-1*-Element zur Suche nach Mutanten zu konstruieren. Es wurde daher das *as-1*-Element verwandt, um die Barnase als salizylsäureabhängiges Suizidgen einzusetzen. Dieser Ansatz erwies sich als Fehlschlag, da keine Transformanden des *as-1*-Barnasekonstrukts gewonnen werden konnten. Da bereits eine sehr geringe Expression der Barnase ausreicht, um toxisch zu wirken, war durch dieses Ergebnis bereits ein erster Hinweis darauf gegeben, daß die Expressionsstärke des *as-1*-Elements größer war als zunächst vermutet wurde.

Die Charakterisierung der Transformanden mit der Deacetylase als weniger toxischem, konditionellem Selektionsmarker unter der Kontrolle eines einzelnen *as-1*-Elements zeigte, daß die Expressionsstärke nicht ausreichte, um die Pflanzen in einem nutzbaren Zeitraum absterben zu lassen. Ein langsames Absterben konnte nur erreicht werden, wenn die Pflanzen auf 2MS-Agar angezogen wurden (Kapitel 1.3.2.2). Nachdem die mit Salizylsäure und NAcPT behandelten Pflanzen abgestorben waren, erwiesen sich die nur mit Salizylsäure induzierten Pflanzen als so geschwächt, daß sie den Transfer auf Erde nicht mehr überlebten. Pflanzen, die auf Erde angezogen worden waren, zeigten keine Anzeichen einer Vergif-

tung (Kapitel 1.3.3.5). Offensichtlich reichte hier die Aktivität des $1\times as-1$ -Promotors nicht aus, um den Schwellenwert der Deacetylaseaktivität zu überschreiten, der für eine zum Erreichen toxischer Konzentrationen des Herbizids bei Umsetzung von *N*-Acetyl-Phosphinothricin nötig ist. Somit waren die $1\times as-1$ -Gus-Deac-Linien für eine Suche nach Mutanten ungeeignet. An diesen Pflanzen wurde erstmals eine aufgrund der bekannten Daten von Zhang und Singh (1994) und den an Tabak durchgeführten Untersuchungen von Benfey und Chua (1990) unerwartete Expressionsstärke und Gewebsspezifität festgestellt.

Beim Nachweis der β -Glucuronidase durch histochemische Färbung erstreckte sich die Expression auf das gesamte Wurzelsystem, und in stark exprimierenden Linien auf das Hypokotyl und die Blätter (Kapitel 1.3.2.3). Dabei war die Aktivität des *as-1*-Elements vor allem im Bereich der Leitgewebe im Hypokotyl und der Blattadern ausgeprägt. Auch war ein Gradient der *as-1*-Aktivität hinsichtlich des Alters der Blätter feststellbar: In alten Blättern war die Expression stärker als in jungen. Dieses Aktivitätsmuster in *Arabidopsis thaliana* wurde auch von Lubenow (1997) beobachtet, die statt der hier eingesetzten synthetischen *as-1*- β -Glucuronidasekonstrukte das -90-Fragment des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus verwandte. Weitere Punkte hoher *as-1*-Aktivität befanden sich an den Vegetationspunkten der Rosette in der Umgebung des Meristems sowie an den Blatträndern im Bereich der feinen Randzähne. Lubenow (1997) identifizierte die letzteren Gewebe als Hydathoden, die morphologisch als Restmeristeme angesehen werden können. Besonders starke β -Glucuronidaseaktivitäten wurden auch in den Keimblättern beobachtet, die auf dem Agar aufgelegt hatten. Damit weicht die in dieser Arbeit beobachtete Gewebsspezifität von den Daten von J. Arias (persönliche Mitteilung) und Zhang und Singh (1994) ab. Als Erklärung der Diskrepanz zwischen den in dieser Arbeit präsentierten Daten und den Ergebnissen von Lubenow (1997) einerseits und den Ergebnissen von J. Arias (persönliche Mitteilung) und Zhang und Singh (1994) andererseits kommt vor allem das unterschiedliche Alter der Pflanzen in Frage, in dem die histochemischen Färbungen durchgeführt wurden. Während die Pflanzen von Arias (persönliche Mitteilung) sowie von Zhang und Singh (1994) im Alter von einer Woche untersucht wurden, waren die in dieser Arbeit und von Lubenow (1997) gefärbten Pflanzen zwei bis drei Wochen alt. Sowohl in dieser Arbeit als auch bei Lubenow (1997) wurde festgestellt, daß die vom *as-1*-Element gesteuerte Expression vor allem in älteren Blättern stark, in jungen Blättern jedoch kaum feststellbar ist.

Um eine stärkere Expression der Deacetylase und einen besser nutzbaren Suizidphänotyp zu erhalten, wurden fünf *as-1*-Elemente als Promotor vor dem Deacetylasegen verwendet. Wie zu erwarten war, zeigte der $5\times as-1$ -Promotor eine stärkere Aktivität als ein einzelnes *as-1*-Element. Im Vergleich zu dem von Zhang und Singh (1994) beschriebenen $4\times ocs$ -Promotor war der $5\times as-1$ -Promotor jedoch unerwartet stark. Dies äußerte sich im konstitutiven Suizidphänotyp ebenso wie an der Intensität der histochemischen β -Glucuroni-

dasefärbung. Die Stärke des 5×*as-1*-Promotors brachte es mit sich, daß nach langer Inkubation im histochemischen Färbebad alle Gewebe gefärbt wurden, sodaß das *as-1*-Element scheinbar auch eine Transkriptionsaktivität im parenchymatischen Gewebe und den Epidermiszellen vermittelt (Kapitel 1.3.3.2). Wurden die 5×*as-1*-GUS-Deac-Pflanzen auf Erde kultiviert, war die Expression der Reportergene geringer als in Sterilkultur, sodaß die Gewebsspezifität bezüglich der Leitgewebe deutlich sichtbar wurde (Kapitel 1.3.3.2 und 1.3.3.21). Aufgrund dieser Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, daß keine durch die Klonierung entstandenen palindromischen oder wiederholten Sequenzen zwischen den *as-1*-Elementen zu unerwünschten Effekten führten.

Die im Vergleich zum 4×*ocs*-Promotor unerwartete Expressionsstärke des 5×*as-1*-Promotors ist nicht alleine mit dem Alter der Pflanzen, einer entwicklungspezifischen Regulierung und dem einen zusätzlichen *cis*-Element erklärbar. Als weiterer Faktor muß die bessere Konservierung der Sequenz des *as-1*-Elements bezüglich der Konsensussequenz in Betracht gezogen werden (Abbildung 47). Beim

Konsens	TGAC GTCANNNNTGAC GTCA ACTG CAGTNNNNACTG CAGT
<i>as-1</i>	TGAC GTAAGGGATGAC GCAC ACTG CATTCCCTACTG CGTG
<i>ocs</i>	AAAC GTAAGCGCTTAC GTAC TTTG CATTCCGAATG CATG

Abbildung 47: Vergleich von *as-1*- und *ocs*-Element mit der Konsensussequenz zweier perfekter Palindrome

as-1-Element weichen vier der 16 konservierten Basen von der palindromischen Konsensussequenz ab, beim *ocs*-Element sind es sechs abweichende Basen, sodaß nur die zwei ACGT-Kernmotive unverändert erhalten sind. Qin *et al.* (1994) berichteten, daß ein *as-1*-Element mit zwei perfekten Palindromen eine verstärkte Transkriptionsaktivierung bewirkt; umgekehrt besaßen *as-1*-ähnliche Elemente, die der Konsensussequenz weniger entsprachen ein geringeres Aktivierungspotential (Lam *et al.*, 1989; Qin *et al.*, 1994). Basierend auf diesen Ergebnissen muß davon ausgegangen werden, daß das weniger konservierte *ocs*-Element ebenfalls eine geringere Transkriptionsaktivierung vermittelt als das konserviertere *as-1*-Element.

Bezüglich des Suizidphänotyps vermittelte der 5×*as-1*-Promotor in Sterilkultur eine so starke Expression, daß die Pflanzen im induzierten und im uninduzierten Zustand ohne sichtbaren Unterschied abstarben. Für Pflanzen in Erdkultur konnte für eine der untersuchten transgenen Linien lediglich ein Mal gezeigt werden, daß der gewünschte Phänotyp auftrat. In weiteren Versuchen konnte dieser Phänotyp nicht mehr wiederholt werden. Stattdessen trat in den uninduzierten Pflanzen eine graduell verlangsamte Schädigung des Gewebes ein. Wurde nach einer Schädigung das Sprühen mit *N*-Acetyl-Phosphinothricin rechtzeitig eingestellt, so erholten sich einige der Pflanzen wieder. Im Vergleich dazu war die Schädigung der induzierten Pflanzen so stark, daß sie sich nach Beendigung des Sprühens mit Salizylsäure

und *N*-Acetyl-Phosphinothricin nicht mehr erholten und abstarben. Diese Differenz war ausreichend, um sie für die Suche nach Mutanten nutzbar zu machen.

Dennoch war der in dieser Arbeit verwandte $5\times as-1$ -Promotor für einen Suizidansatz zur Suche nach Mutanten nicht optimal. Erstens war er durch einen relativ geringen Induktionsfaktor gekennzeichnet. Für einen Suizidansatz wäre jedoch ein möglichst hoher Induktionsfaktor wünschenswert, um einen deutlicheren Unterschied zwischen Absterben im induzierten Zustand und Überleben im uninduzierten Zustand zu erhalten. Zweitens vermittelte der $5\times as-1$ -Promotor eine konstitutive Aktivität, die über dem Schwellenwert für eine Toxizität des dominant negativen Deacetylasesystems lag. Drittens war die Induktion des *as-1*-Elements durch Salizylsäure nur transient, sodaß in dem kurzen Zeitraum der gesteigerten Transkription möglicherweise keine großen Mengen an Deacetylase akkumuliert werden konnten; diesem Umstand konnte aber durch eine mehrfache Induktion entgegengewirkt werden. Diese Probleme im Zusammenspiel mit der geringen Induzierbarkeit zwangen zu einer differentiellen Strategie bei der Suche nach Mutanten (siehe Kapitel 1.3.3.13). Dabei wurden zwei Kontrollgruppen mit Wildtyppflanzen parallel zur mutagenisierten Population behandelt. Eine der Kontrollgruppen wurde nur mit *N*-Acetyl-Phosphinothricin besprüht, die andere mit Salizylsäure und *N*-Acetyl-Phosphinothricin. Sowie feststand, daß die Pflanzen der mit Salizylsäure induzierten Kontrollgruppe absterben würden, von den uninduzierten Kontrollpflanzen jedoch Überlebende verblieben, wurde das Sprühen aller Pflanzen eingestellt. Dabei mußten jedoch zwei Nachteile in Kauf genommen werden: Erstens war die Stringenz — eigentlich ein großer Vorteil von Suizidsystemen — viel geringer, als sie bei einem deutlichen Unterschied zwischen uninduziertem und induziertem Zustand gewesen wäre. So mußte mit dem Überleben von falsch positiven Pflanzen gerechnet werden. Zweitens konnte nicht ausgeschlossen werden, daß Pflanzen, die aufgrund einer Mutation überlebt hätten, dennoch abstarben, weil sie zufällig an einer besonders exponierten Stelle standen — beispielsweise am Rand eines Topfes — und intensiver mit der Suizidlösung in Kontakt kamen. Auf diese Weise könnten auch Mutanten verloren gegangen sein. Für den Fall, daß die Stringenz bei der differentiellen Strategie zu gering war, wurde ein Teil der M_2 -Generation mit der ursprünglich geplanten stringenten Strategie behandelt, bei der die Pflanzen bis zum Austreiben der ersten Blütenknospen mit Salizylsäure und *N*-Acetyl-Phosphinothricin besprüht wurden.

Die Verwendung einer geringeren Anzahl, zum Beispiel zwei oder drei *as-1*-Elemente, ergäbe möglicherweise einen Promotor mit besseren Eigenschaften für die Suche nach Mutanten mit der Deacetylase als dominant negativem Selektionsmarker. Umfangreichere Charakterisierungen im Vorfeld der Mutagenese auch mit solchen Promotoren wären vorteilhaft gewesen. Künstliche Promotoren mit mehr als drei wiederholten *cis*-Elementen sollten auch nach anderweitigen Erfahrungen vermieden werden, da sie lediglich eine erhöhte Hinter-

grundaktivität, aber keine vorteilhaftere Induzierbarkeit aufweisen (Imre Somssich, persönliche Mitteilung). Daß die Deacetylase im Einsatz als konditionelles, dominant negatives Selektionssystem auch hervorragende Unterschiede zwischen induziertem und induziertem Zustand markieren kann, zeigen die lediglich einmal erhaltenen Ergebnisse aus Kapitel 1.3.3.5.

1.4.2 Induktion des *as-1*-Elements durch verschiedene Stimuli

Trotz der festgestellten hohen Hintergrundaktivität läßt sich das *as-1*-Element sowohl im $1\times as-1$ -Promotor als auch im $5\times as-1$ -Promotor durch verschiedene Stimuli induzieren. Zu den in dieser Arbeit festgestellten Stimuli gehören 1 mM Salizylsäure, 200 μ M Auxin und 2% Saccharose. Anzucht auf Erde führte zu einer wesentlich schnelleren Antwort auf eine Stimulierung mit Salizylsäure als Anzucht auf Agar, obgleich die Hintergrundaktivität des *as-1*-Elements niedriger war.

Durch Auxin konnte in $1\times as-1$ -Gus-Deac-Linien die Transkription und die Enzymaktivität der β -Glucuronidase gesteigert werden (Kapitel 1.3.2.3 und 1.3.2.4). Je nach Linie schwankte der Faktor der Induktion zwischen 2,5 und 3,7. Durch Salizylsäure konnte in diesem Versuch kein Anstieg der β -Glucuronidaseaktivität nachgewiesen werden, allerdings erfolgten die einzigen Messungen hierzu zwei Tage nach der Induktion, sodaß zu diesem Zeitpunkt möglicherweise die Steigerung der Enzymaktivität bereits wieder abgeklungen war. Im Gegensatz zur Induktion mit Salizylsäure ist die Aktivierung durch Auxin nicht transient, sondern permanent und besteht mindestens 36 h nach der Induktion fort (Kapitel 1.3.3.8, Abbildung 30). Diese Daten decken sich mit jenen, die von Zhang und Singh (1994) für das *as-1*-ähnliche *ocs*-Element in *Arabidopsis* gefunden wurden. Auch für das *as-1*-Element in Tabak konnte eine auxininduzierte Aktivierung des *as-1*-Elements gezeigt werden, allerdings wurde in der Studie von Liu und Lam (1994) lediglich die Transkription 6 h nach der Induktion durch Auxin betrachtet.

Quantitative Untersuchungen zur Induktion der β -Glucuronidaseaktivität waren nur an $1\times as-1$ -GUS-Deac-Pflanzen erfolgreich. An $5\times as-1$ -Gus-Deac-Pflanzen konnte hingegen keine Steigerung der Enzymaktivität nachgewiesen werden (Kapitel 1.3.3.8, Abbildung 27). Hier traten durchweg ausgesprochen hohe Enzymaktivitäten auf, die je nach den Meßbedingungen zwischen 5000 und 25000 $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ lagen. Dies steht im Gegensatz zu den Daten aus den Transkriptionsanalysen, bei denen nach Induktion mit Auxin sehr wohl eine um den Faktor 5,6 gesteigerte Transkription nachgewiesen wurde (Kapitel 1.3.3.8, Abbildung 29 und Abbildung 28). Dies kann dadurch erklärt werden, daß die Expression bereits im uninduzierten Zustand eine Stärke erreicht hatte, bei der keine Korrelation zwischen Transkriptmenge und Proteinmenge mehr bestand. Auch kann durch die ständige konstitutive Expression des β -Glucuronidase eine Akkumulation des bekanntermaßen sehr stabilen

Enzyms zu einer Konzentration erfolgt sein, bei der die vergleichsweise geringe Enzymmenge, die während der transienten Aktivierung des *as-1*-Elements hinzukam, außerhalb der Meßbarkeit lag. In der Folge mußten die Charakterisierungen der 5×*as-1*-Linien und der potentiellen Mutanten über ungleich aufwendigere Transkriptionsanalysen vorgenommen werden.

Der Verlauf der durch Salizylsäure stimulierten Aktivierung des *as-1*-Elements entspricht ungefähr jenem, der von Qin *et al.* (1994) für Tabak publiziert wurde, wenn die Pflanzen auf Erde angezogen wurden (Kapitel 1.3.3.6). Wurden die Pflanzen unter sterilen Bedingungen auf Agar angezogen, so war der Zeitverlauf der Induktion verzögert, was durch die Applikation durch die Wurzel mittels der Netzplatten zu erklären ist (Kapitel 1.3.3.8, Abbildung 29 und Abbildung 28). Unter sterilen und unsterilen Kulturbedingungen betrug der Faktor der Induktion stets etwa 5,6.

Durch Jasmonsäure wurde keine Aktivierung der *as-1*-abhängigen Transkription beobachtet (Kapitel 1.3.3.8, Abbildung 30). Da Jasmonsäure die ISR, eine andere Komponente der systemischen Abwehr, steuert und auf die salizylsäureabhängige SAR eher inhibitorischen Effekt hat (Pieterse *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 2001a), ist dieses Ergebnis plausibel.

Des weiteren wurde festgestellt, daß das *as-1*-Element eine erhöhte Hintergrundaktivität besitzt, wenn die Pflanzen auf Medium mit 2% Saccharose wachsen (Kapitel 1.3.3.7). Im Vergleich mit Pflanzen auf MS ohne Saccharose beträgt die Expression etwa das Zweifache, im Vergleich mit auf Erde angezogenen Pflanzen etwa das Dreifache. Zur Erklärung dieses Phänomens bieten sich mehrere Möglichkeiten an: Erstens kann Saccharose selbst das Signalmolekül sein, welches die Induktion des *as-1*-Elements verursacht. Zweitens ist denkbar, daß die Induktion des *as-1*-Elements durch osmotischen Streß ausgelöst werden kann, der bei Keimung auf 2% Saccharose möglicherweise vorliegt. Drittens können die bei heterotrophem Wachstum umgekehrten Verhältnisse zwischen Quellorganen für Metabolite und Metabolitverbrauchern (*sink-source*-Verhältnis) eine Induktion des *as-1*-Elements bewirken. Versuche zur Klärung dieses Phänomens wurden im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht vorgenommen.

1.4.3 Mutagenese und Suche nach Mutanten

Drei Indikatoren zeigten, daß die Mutagenese erfolgreich war: Erstens sollten nach Leyser und Furner (2000) fehlfarbene Sektoren in den Blättern von 0,1 – 1% der M₁-Generation erscheinen. Gemäß einer Auszählung der M₁-Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit erzeugt wurden, traten fehlfarbene Sektoren je nach Durchführung der Mutagenese in 0,3 – 1,5% der Pflanzen auf. Zweitens sollten in der M₂-Generation chlorophyllfreie Pflanzen auftreten. Solche Pflanzen wurden mit einer Häufigkeit von etwa 0,6% gezählt. Auch dies

liegt im Rahmen der von Leyser und Furner (2000) angegebenen Häufigkeit von 0,5 – 3%. Nicht zuletzt bewies das Auftreten der in Kapitel 1.3.3.14 beschriebenen Form- und Farbmутanten den Erfolg der Mutagenese.

Die differentielle Strategie zur Suche nach potentiellen Signaltransduktionsmutanten erwies sich als erfolgreich. 54 Pflanzen überlebten die Selektion, 28 ihrer Nachkommen wurden weiter getestet. Da sich lediglich vier Linien als falsch positiv erwiesen, schien der Nachteil der geringen Stringenz nicht so ausgeprägt zu sein, wie zunächst zu befürchten war.

Trotz der in Kapitel 1.4.1 diskutierten Probleme wurde auch eine stringente Strategie zur Suche nach Mutanten angewandt. Die Tatsache, daß aus diesem Ansatz fast nur Mutanten des dominant negativen Markergens hervorgingen (siehe Tabelle 47) zeigt, daß die Erwägungen zur Problematik der Anwendung eines Suizidsystems in Verbindung mit einem Promotor mit hoher basaler Aktivität richtig waren.

1.4.4 Charakteristika der überlebenden Linien

Von 21 der Linien, welche die Suizidbedingungen überlebten, wurde die Induzierbarkeit des *as-1*-Elements mittels Transkriptionsanalysen untersucht (Kapitel 1.3.3.19). Dabei zeigte sich bei zwölf dieser Linien eine verringerte Induzierbarkeit des *as-1*-Elements. Bei diesen Linien war die Verringerung des Induktionsfaktors an beiden Reporter genen — Deacetylase und β -Glucuronidase — nachzuweisen. Diese Linien können als gute Kandidaten für Signaltransduktionsmutanten angesehen werden. Da diese Ergebnisse nur ein Mal gewonnen worden sind, bleibt eine Bestätigung durch Wiederholungen abzuwarten.

Die Untersuchung der Transkription weiterer salizylsäureabhängig exprimierter Gene, ebenfalls nur ein Mal durchgeführt, gab weitere Hinweise darauf, daß es sich bei den zwölf Kandidaten tatsächlich um Signaltransduktionsmutanten handelt. In drei der Linien — *ana10*, *ana16* und *ana40* — ist der Induktionsfaktor von *GST6* von etwa 4,3 beim Wildtyp auf unter 2 signifikant reduziert. In sechs der zwölf Kandidaten, nämlich den Linien *ana16*, *ana38*, *ana40*, *ana41*, *ana42* und *ana46*, war darüber hinaus der Induktionsfaktor von *PR-1* auf die Hälfte des Wildtypfaktors reduziert, in den Linien *ana16* und *ana46* sogar vollkommen aufgehoben. In den Linien *ana16*, *ana38*, *ana41* und *ana46* ist dabei die Reduktion des Induktionsfaktors auf eine höhere Grundaktivität des *PR-1*-Promotors zurückzuführen. In den Linien *ana40* und *ana42* ist hingegen die Expression im induzierten Zustand verringert.

Anhand der unterschiedlichen Beeinflussung der frühen und späten Abwehrgene lassen sich die *ana*-Mutanten in Klassen gliedern:

In die erste Klasse fallen demnach die Mutanten *ana40* und *ana42*. Sie zeichnen sich durch die reduzierte Expression der *as-1*-gesteuerten Gene und von *PR-1* aus. Bei *ana40* und *ana42* handelt es sich wahrscheinlich um Gene, deren Produkte die Expression von *PR-1* und den frühen Abwehrgenen positiv beeinflussen.

Die zweite Klasse wird von den Mutanten *ana16*, *ana38*, *ana41* und *ana46* gebildet. Bei diesen Mutanten ist die Induzierbarkeit des *as-1*-Elements verringert, die Expression von *PR-1* jedoch bereits im uninduzierten Zustand erhöht. So kann vermutet werden, daß es sich bei *ana16*, *ana38*, *ana41* und *ana46* um Gene handelt, deren Produkte die von Salizylsäure ausgehende Signaltransduktion zu den frühen Abwehrgenen positiv beeinflussen und an der Repression des *PR-1*-Promotors im uninduzierten Zustand beteiligt sind. Da die Deregulierung von *PR-1* in den Mutanten *ana38* und *ana41* nicht sehr deutlich ist, sollte hierbei eine Bestätigung durch eine Wiederholung des Induktionsversuchs aus Kapitel 1.3.3.19 abgewartet werden.

Die dritte Klasse wird von Mutanten gebildet, deren Gene allein in der Signaltransduktion zum *as-1*-Element zu stehen und den *PR-1*-Promotor nicht zu beeinflussen scheinen. In diese Klasse fallen die Mutanten *ana10*, *ana19* und *ana54*.

ana16, *ana38*, *ana40*, *ana41*, *ana42* und *ana46* könnten daher für Komponenten einer gemeinsamen Signaltransduktionskette codieren, die von Salizylsäure ausgeht und sich später in zwei Zweige trennt. Einer dieser Zweige hängt von *ana40*, *ana42* und *ana54* ab und reguliert die frühen Abwehrgene über die TGA-Faktoren und das *as-1*-Element. Der andere Zweig reguliert die späten Abwehrgene mit *PR-1* als Modellgen und beinhaltet NPR1 und SNI1 sowie die TGA-Faktoren.

Alternativ könnten eines oder mehrere der Genprodukte von *ana16*, *ana36*, *ana40*, *ana41*, *ana42*, oder *ana46* unterhalb der Verzweigung wirken und ähnlich wie die TGA-Faktoren Funktionen verschiedener Art in den beiden Signaltransduktionszweigen ausüben. Basierend auf diesen Daten kann das in Abbildung 48 dargestellte Modell für die Relationen der *ana*-Mutanten untereinander und bezüglich Salizylsäure, frühen Abwehrgenen und späten Abwehrgenen begründet aufgestellt werden.

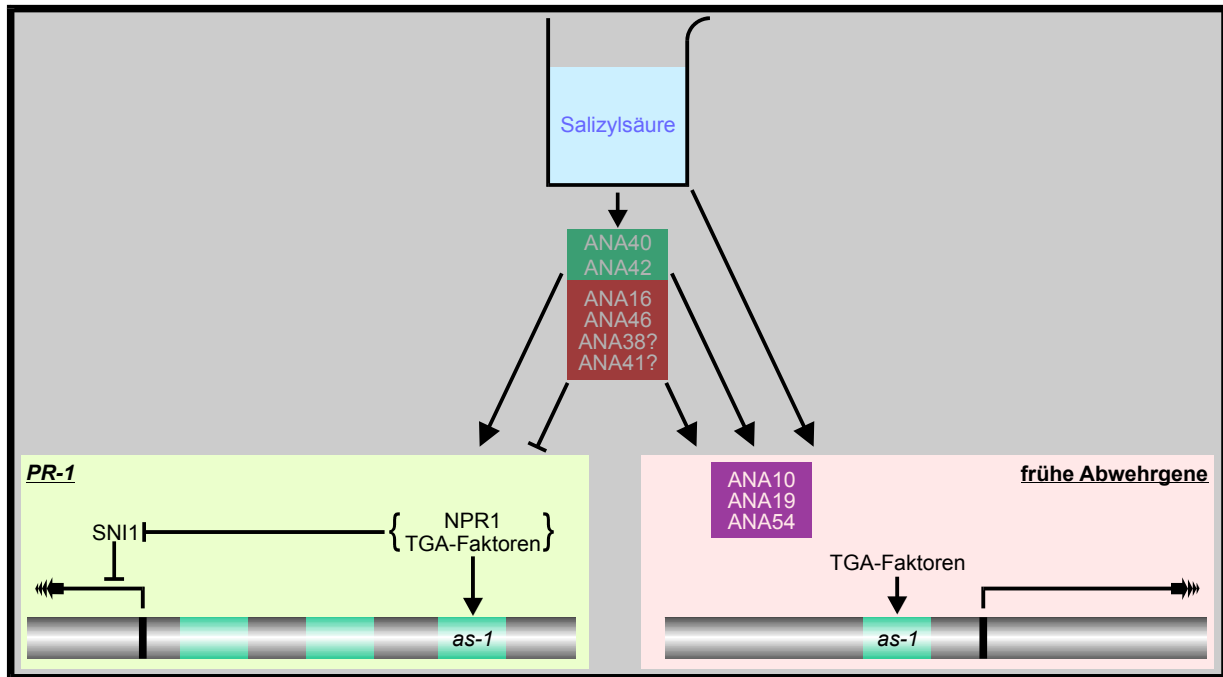


Abbildung 48: Relation von ana-Mutanten, Salizylsäure, PR-1 und den frühen Abwehrgenen

Bei einem Infektionsversuch mit pathogenen *Pseudomonas*-Stämmen fielen zwei Linien auf, die bereits ein abweichendes Induktionsverhalten des *as-1*-Elements zeigten: *ana38* und *ana41*. Bei der Linie *ana38* traten HR-Läsionen schneller auf und bei der Linie *ana41* war die Ausprägung der Läsionen deutlich geringer als bei den Kontrollpflanzen. Vorbehaltlich der Bestätigung durch Wiederholungen weisen diese beiden Linien Defekte in der pathogeninduzierten Signaltransduktion auf, die an der Ausprägung der Symptome der hypersensitiven Antwort sichtbar werden.

Bemerkenswert ist die Tatsache, daß keine Mutanten gefunden wurden, bei denen die Aktivität des *as-1*-Elements völlig ausgefallen war.

Einerseits gibt es Indizien, die darauf hindeuten, daß eine Inaktivierung des *as-1*-Elements letal ist. Einige der Pflanzen, welche die Selektion überlebt hatten, bildeten nur wenige Samen, die nicht keimfähig waren. Die meisten dieser Linien waren in der folgenden Generation daher bereits ausgestorben. Eine dieser Linien, *ana20*, konnte weiter propagiert werden, da stets wenige ihrer Samen keimten. Wegen der geringen Größe der Pflanzen und der wenigen Individuen, die bisher angezogen werden konnten, wurde bislang keine eingehende Charakterisierung der Linie *ana20* vorgenommen. Die geringe Größe und die verminderte Fruchtbarkeit stimmen jedoch mit dem Phänotyp überein, der in TGA2.2-Antisense-Pflanzen auftritt (S. Krawczyk, persönliche Mitteilung). Auffällig ist weiter, daß sowohl bei dem genannten Antisense-Ansatz als auch beim Einsatz mutierter Formen von TGA-Faktoren der Klasse II, welche die endogenen funktionellen TGA-Faktoren an der DNA-Bindung hindern, keine Pflanzen erzeugt werden konnten, bei denen die Repression vollkommen war (R. Niggeweg, S. Krawczyk, persönliche Mitteilungen; siehe auch Kapitel

1.1.3.2). Auch dies deutet auf eine entscheidende Funktion des *as-1*-Elements bei der Entwicklung der Pflanzen hin.

Andererseits konnten durchaus Mutanten erzeugt werden, die keine *as-1*-Aktivität mehr in den Wurzeln von Keimlingen in der ersten Woche aufweisen (J. Arias, persönliche Mitteilung). Allerdings wurde zur Erzeugung dieser Mutanten lediglich ein einzelnes *as-1*-Element zur Steuerung der β -Glucuronidase verwandt, und es liegen nur Färbeergebnisse sehr junger Keimlinge vor. Es ist durchaus möglich, daß diese Pflanzen noch eine Restaktivität des *as-1*-Elements aufweisen, die mit einem stärkeren Promotor wie dem $5\times as-1$ -Promotor oder in späteren Entwicklungsstadien sichtbar würde.

1.4.5 NPR1 hat bei der salizylsäureinduzierten Induktion der frühen Abwehrgene keine entscheidende Bedeutung

NPR1 interagiert mit einer Subklasse der TGA-Faktoren, die an das *as-1*-Element binden (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Niggeweg *et al.*, 2000b; Zhou *et al.*, 2000). Da das *as-1*-Element eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von *PR-1a* spielt und auch eigenes Aktivierungspotential besitzt, wurde geschlossen, daß NPR1 eine Rolle bei der salizylsäureinduzierten Aktivierung dieser Promotoren spielen könnte. Für *PR-1* wurde dies in *npr1*-Mutanten gezeigt. Für ein isoliertes *as-1*-Element und die frühen Abwehrgene hingegen sind noch keine Ergebnisse veröffentlicht worden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist die salizylsäureinduzierte Aktivierung des *as-1*-Elements in *npr1*-Mutanten nicht beeinflusst. Da dies für zwei unterschiedliche *npr1*-Allele — *npr1-1* und *npr1-2* — gilt, kann das Ergebnis generalisiert für alle *npr1*-Mutanten postuliert werden, die keine SAR mehr etablieren können.

Die mutierten NPR1-1- und NPR1-2-Proteine sind nicht mehr in der Lage mit TGA-Faktoren zu interagieren (Zhang *et al.*, 1999; Després *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Obwohl die Bindekapazität zumindest von TGA2 an das *as-1*-Element *in vitro* durch die Interaktion mit NPR1 gesteigert wird (Després *et al.*, 2000), hat die Interaktion offenbar *in vivo* keine entscheidende Bedeutung für das Aktivierungspotential von ASF-1.

Subramaniam *et al.* (2001) konnten zeigen, daß die Interaktion von NPR1 mit TGA2 biphasisch verläuft (Abbildung 49). Dabei findet ein erstes Maximum der Interaktion 1–2 h nach der Induktion mit Salizylsäure statt, ein zweites liegt bei 10 h. Damit fällt das erste Maximum mit der Aktivierung des *as-1*-Elements zusammen, das zweite Maximum korreliert mit der Expression von PR-1 (siehe Abbildung 25, Kapitel 1.3.3.6).

Zweifellos ist die Interaktionsbereitschaft zwischen NPR1 und TGA2 zwischen 1 und 2 h nach einem Salizylsäurestimulus gesteigert. Da die Untersuchungen von Subramaniam *et al.* (2001) jedoch unter konstitutiver Expression von NPR1 und TGA2 stattfanden, ist fraglich, ob die Interaktion auch unter natürlichen Bedingungen mit zunächst auf niedrigem Niveau exprimiertem NPR1 so stark ist, wie es in der vorliegenden Studie den Anschein hat. Die Tatsache, daß NPR1 erst im Zuge der späten Antwort induziert wird, legt abermals nahe, daß seine eigentliche Bedeutung bei der Expression der späten Abwehrgene liegt, und an der Induktion der frühen Abwehrgene nicht beteiligt ist.

Im Genom von *Arabidopsis* befinden sich vier Gene, die *NPR1* sehr ähnlich sind. Über die Expression dieser *NPR*-Gene sowie über die Interaktionspartner der zugehörigen *NPR*-Proteine ist bislang noch nichts bekannt. Es ist denkbar, daß eines dieser *NPR*-Gene eine ähnliche Funktion bei der Aktivierung der frühen Antwort hat wie *NPR1* bei der späten Antwort (Abbildung 50, Szenario A). Des weiteren ist vorstellbar, daß die *NPR*-Proteine bei der frühen Antwort redundant sind und bei Ausfall von *NPR1* dessen Funktion übernehmen können, ohne daß dies am Expressionsniveau der frühen Abwehrgene sichtbar würde (Abbildung 50, Szenario B). Als letzte Möglichkeit ist denkbar, daß die TGA-Faktoren unabhängig von *NPR1* und den vier uncharakterisierten *NPR*-ähnlichen Proteinen agieren und die Transkriptionsaktivierung nur durch Änderung der Besetzung des *as-1*-Elements durch unterschiedliche TGA-Dimere herbeigeführt wird. In diesem Szenario wäre die Interaktion von *NPR*-Proteinen mit den TGA-Faktoren für die Modulierung der Transkription am *as-1*-Element ohne Bedeutung (Abbildung 50, Szenario C).

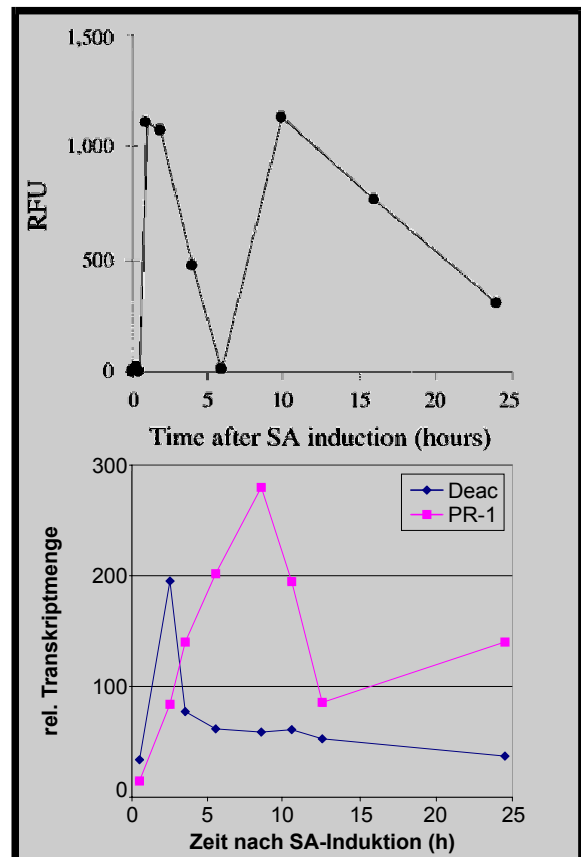


Abbildung 49: Vergleich des biphasischen Zeitverlaufs der Interaktion von NPR1 mit TGA2 mit der Expression von 5x*as-1*-Deac und PR-1

obere Grafik aus Subramaniam *et al.* (2001)

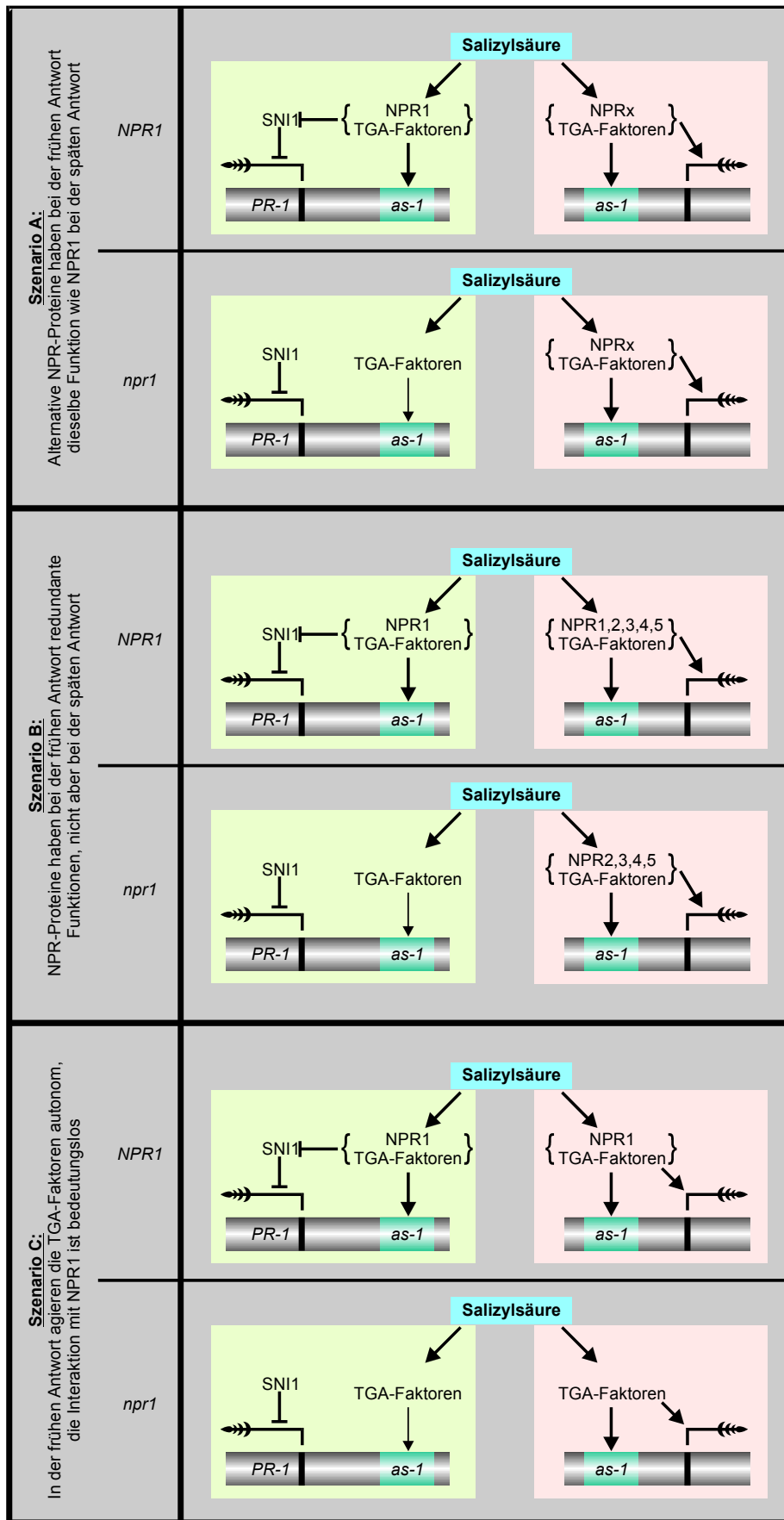


Abbildung 50: Drei Szenarien zur Rolle von NPR1 und den alternativen NPR-Proteinen bei Induktion der frühen und späten Abwehrgene

grün unterlegt: späte Abwehrgene
rot unterlegt: frühe Abwehrgene

1.4.6 Ausblick

Die charakterisierten Mutanten weisen — vorbehaltlich einer Bestätigung durch Wiederholungen der Versuche — verschiedene Charakteristika auf. Daher können an ihnen unterschiedliche Aspekte des Zusammenspiels der Signaltransduktionswege zur Induktion der frühen und der späten Abwehrgene untersucht werden. Die Identifikation der Signaltransduktionsgene wird neue Erkenntnisse über die Mechanismen der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion erlauben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nur eine Auswahl der Linien, welche die Selektion überlebt hatten, charakterisiert werden. Wahrscheinlich können bei einer Fortsetzung der Charakterisierung weitere Linien mit Defekten bei der Aktivierung der frühen Abwehrgene identifiziert werden.

Das Verhalten der Mutanten nach einer Infektion mit Pathogenen konnte in dieser Arbeit nicht eingehend untersucht werden. So konnten keine Daten zur Abtötung der Pathogene während der HR gewonnen werden. Hier könnten neue Ergebnisse zur Bedeutung der frühen Abwehrgene erzielt werden.

Die Charakterisierung der Kreuzungsprodukte zwischen den bekannten Signaltransduktionsmutanten und den *5×as-1*-GuDe-Pflanzen (siehe Kapitel 1.3.3.11) kann zu neuen Erkenntnissen über Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Signaltransduktionswegen zur Aktivierung der späten Abwehrgene führen.

Teil 2 Expression von tierischen Signaltransduktionskomponenten in Tabak zur Konstruktion eines induzierbaren Expressionssystems

2.1 Einleitung

2.1.1 Induzierbare Expressionssysteme

Das Interesse an induzierbaren Expressionssystemen speist sich sowohl aus wissenschaftlichen als auch aus wirtschaftlichen Gründen. Für die Wissenschaft kann es von Bedeutung sein, zur Untersuchung von Genwirkungen nicht nur den Zustand bei permanenter Präsenz eines Genprodukts durch konstitutive Expression zu erforschen, sondern auch die physiologischen Veränderungen, die nach der Induktion eines Gens ablaufen. Es kann auch sein, daß Transgene bei konstitutiver Expression toxisch wirken oder mit der Entwicklung und Fertilität des Organismus interferieren, wie dies bei Genen des Hormonstoffwechsels der Fall ist. Ein weiterer Vorteil von induzierbaren Expressionssystemen ist, daß sie durch Applikation des Induktionsmittels an einem definierten Ort spezifisch in bestimmten Organen oder Geweben induziert werden können.

Das wirtschaftliche Interesse erwächst zum Beispiel aus Ansätzen, pharmakologisch bedeutende Proteine wie Antikörper in Pflanzen zu produzieren oder durch Einbringung eines Stoffwechsellzyms bestimmte Naturprodukte herzustellen. Da insbesondere Antikörper mit pflanzlichen Proteinen interferieren können, ist ein induzierbares Expressionssystem, das im Produktionsmaßstab eingesetzt werden kann, wünschenswert. Unter Anwendung eines solchen Systems könnten Pflanzen heranwachsen, bis sie ausreichend Biomasse zur Akkumulation des gewünschten Produkts gebildet haben. Mit Hilfe von agrartechnischen Methoden kann dann das Induktionsmittel ausgebracht und die Pflanzen nach einer angemessenen Inkubationszeit geerntet werden.

Ein induzierbares Expressionssystem muß bestimmten Anforderungen genügen (Gatz und Lenk, 1998). So muß das Induktionsmittel hochspezifisch sein und darf die Genexpression von eigenen Genen des Organismus nicht beeinflussen. Dies kann sehr gut durch Anwendung heterologer Genexpressionselemente erzielt werden. Das Induktionsmittel darf nicht toxisch sein. Die Expression im uninduzierten Zustand muß sehr niedrig sein, während im induzierten Zustand eine sehr hohe Expression gefordert wird.

Zu den induzierbaren Expressionssystemen, die im pflanzlichen System erfolgreich etabliert und zur Klärung wissenschaftlicher Fragestellungen eingesetzt wurden, zählen tetracyclininduzierbare und tetracyclinreprimierbare Systeme (Gatz *et al.*, 1992; Weinmann *et*

al., 1994), ein kupferinduzierbares System (Mett *et al.*, 1996), ein dexamethasoninduzierbares System (Aoyama und Chua, 1997), ein ethanolinduzierbares System (Chaddick *et al.*, 1998), ein System, das mit dem Ecdyson-Agonisten induziert werden kann (Martinez *et al.*, 1999a; Martinez *et al.*, 1999b) und ein System, das durch Dexamethason induzierbar und durch Tetracyclin reprimierbar ist (Böhner *et al.*, 1999; Böhner, 2000). Während Tetracyclin, Kupfer-Kationen und Ethanol ein gewisses toxisches Potential besitzen, sind das Glucocorticoidhormon Dexamethason und der Ecdyson-Agonist als Induktionsmittel ungiftig.

Alle der genannten Expressionssysteme besitzen cytoplasmatische Rezeptoren. Diese Arbeit steht im Rahmen eines Projekts, bei dem erstmals ein System entwickelt und erprobt werden soll, das die Genexpression durch ein extrazelluläres Induktionsmittel aktivieren kann. Dazu wurde auf eine kurze Signaltransduktionskette aus dem tierischen System zurückgegriffen, nämlich die vom plasmamembranständigen Erythropoietinrezeptor ausgehende Jak-Stat-Signaltransduktion.

2.1.2 Die Jak-Stat-Signaltransduktion in Tieren

2.1.2.1 Allgemeiner Mechanismus der Jak-Stat-Signaltransduktion

Die zelluläre Perzeption vieler Peptidhormone im tierischen System wird über den Jak-Stat-Signalweg vermittelt. Zu den über 35 (Darnell, 1997) bisher identifizierten Hormonen, die über diesen Signalweg wirken, zählen Erythropoietin, Thrombopoietin, Prolactin, Insulin, Serotonin, Wachstumshormone und -faktoren, Interleukine und Interferone (Heim, 1999). Eine Vielzahl von Rezeptoren, die unter die Superfamilie der Cytokinrezeptoren fallen und durch gemeinsame Struktur motive charakterisiert sind, ist für die Erkennung der Hormone verantwortlich (Heim, 1999; Finidori, 2000). Der Erythropoietinrezeptor (*EpoR*) wurde als erster dieser Familie kloniert und charakterisiert (d'Andrea *et al.*, 1989). Durch Ligandenbindung wird entweder eine Dimerisierung zweier Rezeptoren herbeigeführt oder eine Konformationsänderung bereits bestehender Rezeptordimere induziert. Daraufhin werden die folgenden Ereignisse in der Jak-Stat-Signaltransduktion ausgelöst.

Die Signaltransduktion schreitet über eine Familie von Proteinkinasen fort, die als Januskinasen (*Jak*) bezeichnet werden. In Säugetieren besteht diese Familie aus den Mitgliedern Jak1, Jak2, Jak3, Jak4 und Tyk2. Diese Tyrosinkinassen führen eine Transphosphorylierung an ihrem jeweiligen Partner durch, wenn sie in die Nähe einer weiteren Januskinase gelangen. Durch die Phosphorylierung werden die Jaks aktiviert und können ihrerseits weitere Proteine phosphorylieren. Dazu gehören die Phospholipase C γ , SHP1, SHP2 und Stats (Damen und Krystal, 1996). Januskinassen binden an die Cytokinrezeptoren (Igarashi *et al.*, 1994; Kotenko *et al.*, 1995). Durch die Dimerisierung der Cytokinrezeptoren werden die daran gebundenen Januskinassen in räumliche Nähe zueinander gebracht und phosphorylieren

zunächst sich, danach eine Reihe von Tyrosinresten am Cytokinrezeptor. Diese Phosphotyrosinreste sind die Interaktionsstellen für die Stats.

Stats (*signal transducers and activators of transcription*) gehören zu einer Familie von dimerisierenden Transkriptionsfaktoren, welche die Mitglieder Stat1, Stat2, Stat3, Stat4, Stat5a, Stat5b und Stat6 umfaßt. Diese Transkriptionsfaktoren können nach Phosphorylierung durch die Januskinasen sowohl Homodimere als auch Heterodimere mit anderen Stats bilden, die auch als GAFs (*gamma activated factor*) bezeichnet werden. Als solche können sie in den Zellkern translozieren (Darnell, 1997). Dort binden sie an die als GAS-Elemente (*Interferon-gamma activation sequence*) bezeichneten *cis*-Elemente, die sich durch die palindromische Kernsequenz TTN₅₋₆AA auszeichnen. (Darnell, 1997; Heim, 1999) In der Folge findet eine Aktivierung der Transkription statt. Ein Schema der Jak-Stat-Signaltransduktion im uninduzierten und im induzierten Zustand ist in Abbildung 51 dargestellt.

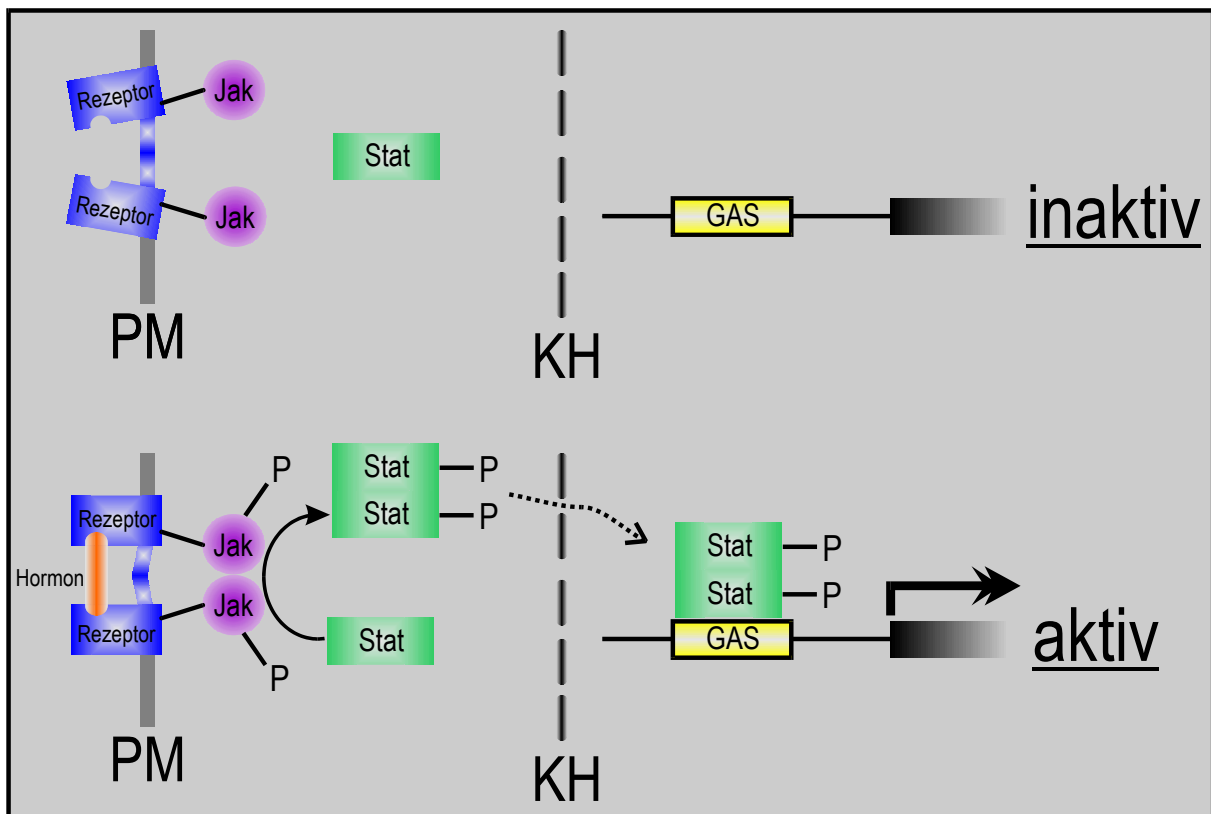


Abbildung 51: Allgemeines Schema der Jak-Stat-Signaltransduktion

PM: Cytoplasmamembran; KH: Kernhülle

Im Folgenden werden die Signaltransduktionskomponenten, die in dieser Arbeit verwendet wurden, detailliert beschrieben.

2.1.2.2 Erythropoietin

Erythropoietin ist ein Peptidhormon aus der Familie der Cytokine mit einer Größe von 163 – 166 Aminosäuren. Nachdem es zunächst als Vorläuferprotein mit 193 Aminosäuren synthetisiert wurde, verliert es als reifes Protein die 27 N-terminalen Aminosäuren, die ein

Signalpeptid sind. Ob die drei C-terminalen Aminosäuren ebenfalls entfernt werden, ist noch ungeklärt.

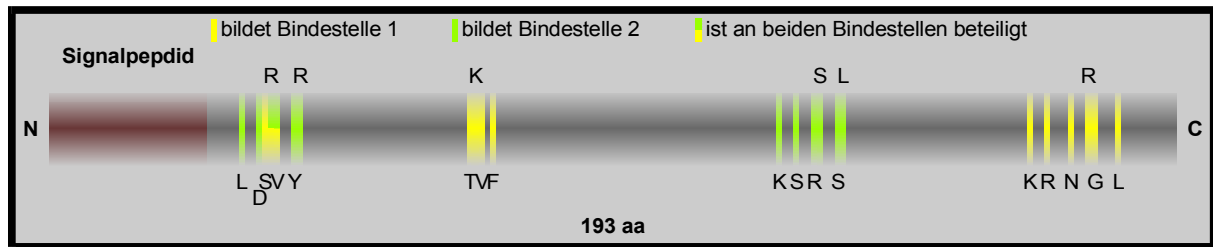


Abbildung 52: Schematische Darstellung des Peptidhormons Erythropoietin

Erythropoietin besitzt zwei ungleiche Flächen, mit denen es an den erythropoietinrezeptor binden kann. An diesen Flächen befinden sich eine Reihe von Aminosäuren die für die Interaktion mit dem Erythropoietinrezeptor verantwortlich sind (Syed *et al.*, 1998). Obwohl die zwei Bindestellen hinsichtlich der Aminosäuren und der physikalisch-chemischen Wechselwirkungen unterschiedlich sind, interagieren sie mit denselben Aminosäuren des Erythropoietinrezeptors.

2.1.2.3 Der Erythropoietinrezeptor

Der Erythropoietinrezeptor (Abbildung 53) ist ein Mitglied der umfangreichen Cytokinrezeptorfamilie. Er ist — wie alle Cytokinrezeptoren — ein Transmembranprotein mit einer N-terminalen extrazellulären und einer C-terminalen intrazellulären Domäne.

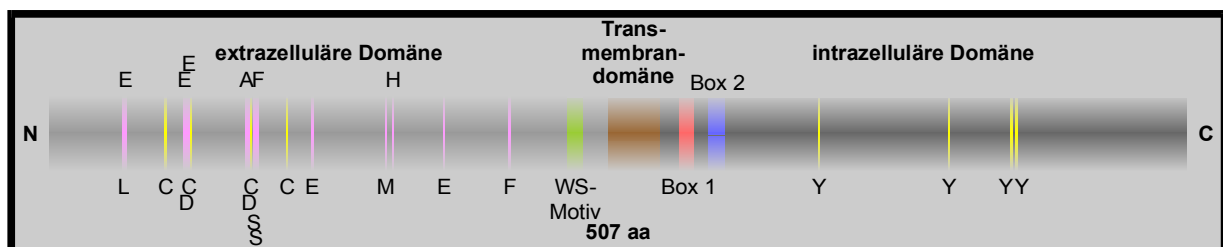


Abbildung 53: Schematische Darstellung des Erythropoietinrezeptors

Die mit Erythropoietin interagierenden Aminosäuren sind violett hervorgehoben. Weitere wichtige Aminosäuren sind gelb hervorgehoben.

Am N-Terminus der extrazellulären Domäne befinden sich vier konservierte Cysteinreste in einem Cytokinbindemotiv. Nahe der Transmembrandomäne ist ein konserviertes WS-Motiv (Trp-Ser-X-Trp-Ser) zu finden. Im intrazellulären Bereich des Rezeptors findet sich nahe der Transmembrandomäne die Box1, welche durch die Aminosäuresequenzen Ali-Aro-Pro-X-Ali-Pro-X-Aro oder Aro-X-X-X-Ali-Pro-X-Pro (Ali = aliphatische Aminosäure; Aro = aromatische Aminosäure) charakterisiert ist. Die Box 1 ist für die spezifische Interaktion mit Jak2 verantwortlich (Witthuhn *et al.*, 1993; Miura *et al.*, 1994; Tanner *et al.*, 1995; Pellegrini und Dusanter-Fourt, 1997). Eine Box 2, die weniger gut definiert ist folgt zum C-terminalen Ende hin; sie beginnt mit einer Häufung von hydrophoben Aminosäuren und endet mit ein oder zwei positiv geladenen Aminosäuren. Weiter finden sich in der intrazellulären Domäne

mehrere Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können und zu einer möglichen SH2-ähnlichen Domäne gehören (Klingmüller *et al.*, 1996; Heim, 1999). An diesen Tyrosinresten können Stat5-Proteine binden.

Neben Erythropoietin kann dieser Rezeptor auch durch Antikörper aktiviert werden, die gegen seine extrazelluläre Domäne gerichtet sind (Elliott *et al.*, 1996). Auch sind Peptide identifiziert worden, die strukturell keine Ähnlichkeit zu Erythropoietin besitzen, aber dennoch zu einer Aktivierung der Jak-Stat-Signaltransduktionskette über den Erythropoietinrezeptor führen (Wrighton *et al.*, 1996).

Über den Aktivierungsmechanismus des Erythropoietinrezeptors finden sich unterschiedliche Auffassungen. Allgemein anerkannt ist die Tatsache, daß die meisten Cytokinrezeptoren mit dem Liganden als Brücke einen trimeren Komplex bilden (Darnell, 1997; Heim, 1999). Für den Erythropoietinrezeptor hingegen gibt es starke Hinweise darauf, daß er als präformiertes Dimer vorliegt und daß durch die Bindung des Liganden eine Konformationsänderung herbeigeführt wird (Livnah *et al.*, 1999; Remy *et al.*, 1999). Im Zustand ohne gebundenen Liganden werden die an der cytoplasmatischen Domäne des Erythropoietinrezeptors gebundenen Jak2-Proteine auf Distanz gehalten, während nach der ligandeninduzierten Konformationsänderung eine Annäherung und Aktivierung der Januskinasen eintritt (Frank, 2002). Der zur Zeit angenommene molekulare Mechanismus für die Aktivierung des Erythropoietinrezeptors ist in Abbildung 54 dargestellt.

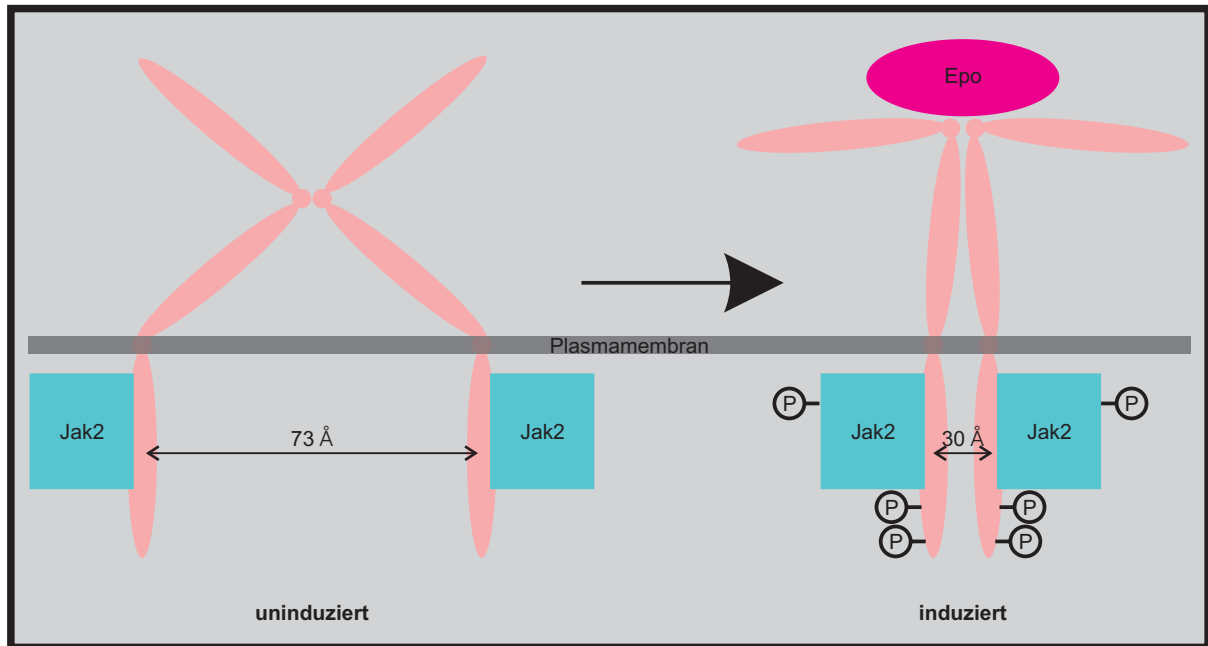


Abbildung 54: Modell zur Aktivierung des Erythropoietinrezeptors durch Erythropoietin

nach Frank, 2002, verändert

2.1.2.4 Jak2

Jak2 (Abbildung 55) gehört zur Familie der Januskinasen. Diese im Cytoplasma löslichen Kinasen besitzen eine einmalige charakteristische Struktur und sind durch sieben homologe Domänen gekennzeichnet, die als Jak-homologe-Domänen (JH-Domänen) bezeichnet werden.

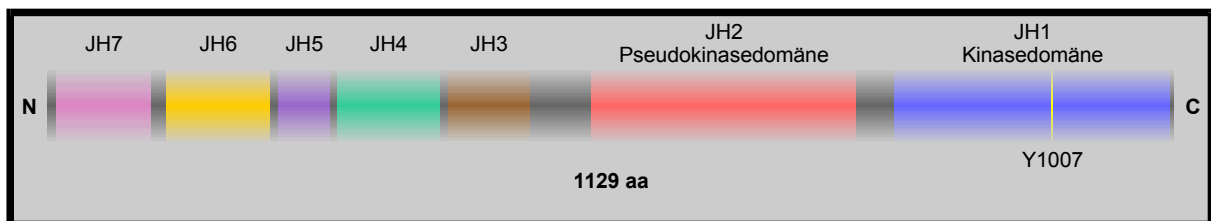


Abbildung 55: Schematische Darstellung von Jak2

In der Domäne JH1, die sich am C-Terminus befindet, ist die Kinaseaktivität lokalisiert (Heim, 1999). Das in dieser Domäne befindliche Tyrosin 1007 ist essentiell für die Modulation der Kinaseaktivität: Wird es phosphoryliert, so ist die Kinase aktiv (Feng *et al.*, 1997). Die JH2-Domäne beherbergt eine Pseudokinasedomäne. Sie ist homolog zur Kinasedomäne in der JH1-Region, die für eine Kinaseaktivität entscheidenden Aminosäurereste sind jedoch mutiert. Daher besitzt die JH2-Domäne keine eigene Kinaseaktivität. Stattdessen kommt ihr eine regulatorische Funktion zu (Luo *et al.*, 1997). Bemerkenswert ist nach Meinung vieler Autoren die Abwesenheit einer bekannten Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Wahrscheinlich sind aber die Domänen JH3 bis JH7 an der Bindung der Januskinasen an die Cytokinre-

zeptoren beteiligt (Chen *et al.*, 1997; Gauzzi *et al.*, 1997). Ob die Domäne JH3 eine signifikante und funktionelle Ähnlichkeit zu den SH2-Protein-Protein-Interaktionsdomänen besitzt (Silvennoinen *et al.*, 1993), ist umstritten. Jak2 bindet an den Erythropoietinrezeptor und wird nach Stimulierung mit Erythropoietin durch Phosphorylierung an Tyrosinresten aktiviert (Witthuhn *et al.*, 1993). Daneben wird Jak2 auch für die Transduktion weiterer Peptidhormonsignale, darunter Prolactin und Thrombopoietin (Ihle *et al.*, 1998), benötigt.

2.1.2.5 Stat5b

Stat5b (Abbildung 56) gehört zur Familie der Stat-Transkriptionsfaktoren und ist latent im Cytoplasma lokalisiert.

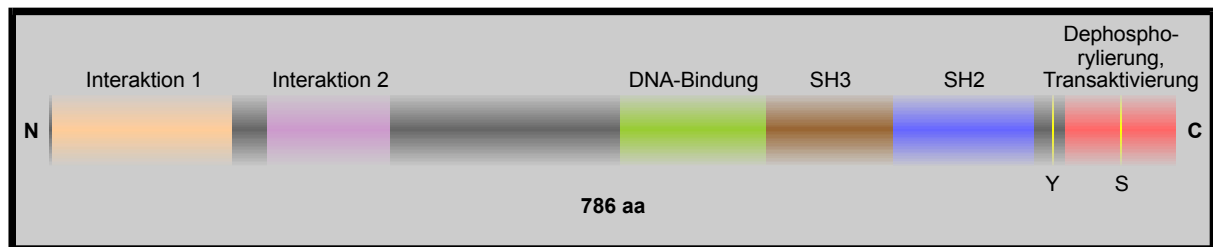


Abbildung 56: Schematische Darstellung von Stat5b

Wie alle Stat-Proteine besitzt Stat5b im N-Terminus zwei mögliche Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Heim, 1999). Die N-terminale Region bis zur DNA-Bindedomäne ist unter den verschiedenen Stats nur wenig konserviert. In der Region zwischen den Aminosäuren 400 und 500 befindet sich eine DNA-Bindedomäne (Horvath *et al.*, 1995; Darnell, 1997; Heim, 1999). Unmittelbar darauf folgt eine SH3-Domäne (Darnell, 1997). Besonders wichtig für die Funktion von Stat5b ist eine SH2-Domäne. Sie vermittelt die Bindung von Stat5b an den aktivierten Komplex von Januskinase und Erythropoietinrezeptor über dessen Phosphotyrosinreste (Darnell, 1997; Heim, 1999). Die Januskinase phosphoryliert Stat5b am Tyrosin 700. Über diesen Phosphotyrosinrest und die SH2-Domäne findet eine Dimerbildung zwischen zwei Stat5b-Molekülen statt; (Shuai *et al.*, 1994; Schindler und Darnell, 1995; Darnell, 1997; Heim, 1999). Diese Domäne ist auch für die Spezifität der Heterodimerbildung von Stat5b mit anderen Stats verantwortlich (Heim *et al.*, 1995; Heim, 1999). Die Transkriptionsaktivierungsdomäne von Stat5b liegt am C-Terminus. Es wurde gezeigt, daß ein Serinrest, der in dieser Domäne liegt, die Transkriptionsaktivität steigert, wenn er phosphoryliert ist (Heim, 1999). Der C-terminalen Domäne wird auch eine Phosphataseaktivität zugeschrieben, die für die Inaktivierung von Stat5b durch Autodephosphorylierung am Tyrosin 700 verantwortlich ist.

Nach der Dimerisierung kann Stat5b in den Zellkern gelangen, dort an Interferon γ -aktivierte Elemente verschiedener Promotoren binden und eine Transkriptionsaktivierung induzieren. Bei *in vitro*-Versuchen wurde die Bindung von Stat5b an GAS-Elemente aus dem *Fc γ RI*-Promotor oder dem β -Caseinpromotor nachgewiesen (siehe Abbildung 57; Schreiber *et al.*, 1989; Hou *et al.*, 1994; Klingmüller *et al.*, 1996). Für die Induktion der DNA-Bindung ist die Phosphorylierung des Tyrosinrestes zwischen der SH2-Domäne und der Transaktivierungsdomäne ausreichend (Becker *et al.*, 1998).

Neben der Aktivierung durch Cytokinrezeptor-Januskinase-Komplexe ist auch die Phosphorylierung von Stat-Proteinen durch konventionelle Rezeptor-Tyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor*), dem PDGF-Rezeptor (*platelet derived growth factor*) und weiteren in Abwesenheit von Januskinasen bekannt (Ruff-Jamison *et al.*, 1993; Vignais *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Akira, 1999). Auch andere Tyrosinkinasen, die keine Rezeptorfunktion besitzen, sind Lage, Stat-Proteine durch Phosphorylierung zu aktivieren (Wen *et al.*, 1999).

Stat-Proteine können mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. So wurde für Stat5a und Stat5b eine funktionelle und synergistische Interaktion mit dem Glucocorticoidrezeptor nachgewiesen (Stocklin *et al.*, 1996; Hoey und Schindler, 1998).

2.1.3 Modifizierte Jak-Stat-Signaltransduktionssysteme

Die Modifikation von Komponenten der Jak-Stat-Signaktransduktion begann mit Untersuchungen zur Funktion des Erythropoietinrezeptors. Watowich *et al.* (1992) führten eine Mutation ein, indem sie das Arginin an Position 129 durch Cystein substituierten. Diese Mutation führte zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors durch die Bildung einer irregulären Disulfidbrücke zwischen zwei Monomeren des Rezeptors.

Der Erythropoietinrezeptor läßt sich durch eine Reihe weiterer Agenzien stimulieren. Der erste Bericht dieser Art liegt über die Aktivierung des Erythropoietinrezeptors durch Antikörper gegen dessen extrazelluläre Domäne vor (Elliott *et al.*, 1996). Dabei zeigte sich, daß nur bivalente Antikörper, die zwei Bindestellen für den Erythropoietinrezeptor besaßen, die Aktivierung vermitteln konnten, nicht aber monovalente Antikörper. Dies deckt sich mit Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, daß eine mutierte Form von Erythropoietin mit nur einer Rezeptorbindestelle keine aktivierenden Eigenschaften mehr besitzt (Matthews *et al.*, 1996).

Fc γ RI	G TAT TTCC CAGAAAGGAAC C ATA AAGGGTCTTT TCCTTG
β -Casein	A GAT TTCTAGGA ATTCAATCC TCTA AAGATCCTT AAGTTAGG

Abbildung 57: GAS-Elemente, an denen die Bindung von Stat5b nachgewiesen wurde

Die Konsenssequenz ist farblich hervorgehoben. Die streng konservierten Basen sind in orange, die weniger konservierten Basen in gelb dargestellt. Für Stat6 sind vier Basen zwischen den Palindromen als optimale Distanz ermittelt worden (Hoey und Schindler, 1998).

Eine Reihe synthetischer Peptide, die aus einer Selektion mittels eines „Phage-Display“ hervorgegangen waren, ist ebenfalls in der Lage an den Erythropoietinrezeptor zu binden und eine Aktivierung auszulösen (Wrighton *et al.*, 1996). Diese Peptide wurden als EMPs (*erythropoietin mimetic peptides*) bezeichnet. Bei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, daß das Bindemotiv der EMPs sich sehr stark von jenem des Erythropoietins unterscheidet und daher wahrscheinlich an eine andere Region der extrazellulären Domäne des Erythropoietinrezeptors bindet (Johnson *et al.*, 1998). Auch das Rezeptordimer nimmt im Komplex mit Erythropoietin eine andere Konformation an als im Komplex mit den EMPs (Livnah *et al.*, 1996; Syed *et al.*, 1998).

Schließlich gelang es, auch nichtpeptidische Moleküle zu konstruieren, die eine Aktivierung des Erythropoietinrezeptors induzieren können (Qureshi *et al.*, 1999). Dazu wurde zunächst durch eine Selektion einer Molekülbank eine Verbindung gefunden, die an den Erythropoietinrezeptor bindet, ihn aber nicht zu aktivieren vermag. Acht dieser Moleküle wurden mit einer zentralen Verbindungsstruktur fusioniert. Dieses Oktamer konnte den Erythropoietinrezeptor aktivieren.

Um große Sammlungen an chemischen Verbindungen rasch und effizient auf potentielle Aktivatoren des Erythropoietinrezeptors durchsuchen zu können, wurde eine Methode entwickelt, bei der die ligandenvermittelte Dimerisierung zweier extrazellulärer Domänen des Erythropoietinrezeptors durch Inkorporation eines radioaktiv markierten Rezeptor-Monomers quantifiziert werden kann (Biazzo *et al.*, 2000).

Am menschlichen Rezeptor des Wachstumshormons (*growth hormone*), der zur gleichen Klasse der Cytokinrezeptoren gehört wie der Erythropoietinrezeptor, wurden Mutationen eingeführt, die eine Interaktion mit dem Wachstumshormon unmöglich machen. Mit diesem mutierten System wurde eine Bank kleiner Moleküle durchsucht und solche identifiziert, welche die Interaktion wieder herstellen können. Aus diesem Versuch ging eine niedermolekulare heterozyklische chlorierte Verbindung hervor (5-Chlor-2-Trichlormethylbenzimidazol), unter deren Einfluß die Funktion des mutierten Hormonrezeptors teilweise wieder hergestellt wurde (Guo *et al.*, 2000).

Die Aktivierung der Jak-Stat-Signaltransduktion kann auch durch chimäre Rezeptoren vermittelt werden, bei denen die intrazelluläre Domäne des Erythropoietinrezeptors mit einer fremden Ligandenbindedomäne fusioniert wurde. Ein solches System, das auf der Dimerisierung mit Hilfe des Liganden FK1012 basiert, wurde erstmals von Blau *et al.* (1997) beschrieben. Dabei wurde die intrazelluläre Domäne des Erythropoietinrezeptors mit dem FK506-bindenden Protein FKBP12 fusioniert. Das FK506-Dimer FK1012 führt eine Dimerisierung des chimären Rezeptors herbei. Dadurch wird die Jak-Stat-Signaltransduktion auf dem üblichen Wege induziert.

Interessanterweise kann die Jak-Stat-Signaltransduktion auch durch Expression von Jak2 und Stat5a/b in einem heterologen System ohne Anwesenheit des Erythropoietinrezeptors aktiviert werden (Barahmand-Pour *et al.*, 1998). Dabei wird Jak2 so hoch exprimiert, daß die Konzentration der Jak2-Proteine im Cytoplasma ausreicht, um die in Kapitel 2.1.2.1 beschriebene Transphosphorylierung der Januskinasen und die folgende Aktivierung von Stat5b durchzuführen. Bei der Expression von Jak2 und Stat5b in Hefe konnte gezeigt werden, daß Stat5a und Stat5b in Gegenwart von Jak2 an ein GAS-Element binden. Darüberhinaus waren Fusionsproteine von Stat5b mit der VP16-Transaktivierungsdomäne aus *Herpes simplex* in der Lage, in Gegenwart von Jak2 ein GAS-*lacZ*-Reporterkonstrukt zu aktivieren. Damit wurde der Nachweis erbracht, daß Stat5b auch im heterologen System Hefe seine Funktion korrekt ausübt.

2.1.4 Zielsetzung und experimenteller Ansatz

Im Rahmen dieses Projekts sollten Komponenten der vom Erythropoietinrezeptor ausgehenden Jak-Stat-Signaltransduktion in Pflanzen exprimiert werden, um ein induzierbares Expressionssystem zu erzeugen.

Dazu sollte zunächst in transienten Expressionsstudien der Nachweis erbracht werden, daß die Signaltransduktion über Jak2 und ein Stat5b-VP16-Fusionsprotein nicht nur in Hefe (Barahmand-Pour *et al.*, 1998), sondern auch im pflanzlichen System korrekt funktioniert. In weiteren transienten Expressionsstudien sollte untersucht werden, ob der Erythropoietinrezeptor die konstitutive Aktivierung des Systems durch die überexprimierten Januskinasen aufheben und eine erythropoietininduzierbare Expression herbeiführen kann.

Des Weiteren sollten die Signaltransduktionskomponenten stabil in Tabak exprimiert werden, um eine erythropoietininduzierbare Genexpression in ganzen Pflanzen nachzuweisen.

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Pflanzen

Ausgangsmaterial für alle Versuche waren Tabakpflanzen vom Kultivar *Nicotiana tabacum* L. cv. *Samsun* NN.

Außerdem wurde die Tabak-Zellkulturlinie *Nicotiana tabacum* cv *Bright Yellow 2* (BY-2) für Expressionsstudien verwandt.

Die transgene Tabaklinie UF9-13 wurde aus Gatersleben bezogen (Martina Siefken). Sie trägt ein β -Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors.

2.2.2 Anzucht von *Nicotiana tabacum*

Die Anzucht von *Nicotiana tabacum* in Sterilkultur erfolgte in $\frac{1}{2}$ -L-Weckgläsern (Sturzform) auf 2MS-Agar (Murashige und Skoog, 1962, Tabelle 21) in einer begehbaren Klimakammer unter den in Tabelle 20 angegebenen Bedingungen.

Tabelle 48: Klimabedingungen für die Anzucht von *Nicotiana tabacum* in Erdkultur

Parameter	tags	nachts
Temperatur	22 °C	22 °C
Feuchtigkeit	80 %	80 %
Helligkeit	40 – 60 μ E	0 μ E
Licht-Dunkelperiode	16 h	8 h

Zur sterilen Anzucht von *Nicotiana tabacum* aus Samen wurden diese zunächst in 6 %iger Natriumhypochloritlösung für 30 min oberflächensterilisiert, 3 \times für 10 min mit sterilem Leitungswasser gewaschen und auf Agar ausgebracht.

Die Kultivierung auf Erde wurde mit Archut Fruhstorfer Erde, Typ T 25 in einer begehbaren Klimakammer mit den in Tabelle 48 angegebenen Bedingungen oder im Gewächshaus vorgenommen. Wegen gesetzlicher Bestimmungen mußten im Gewächshaus die Blütenstände transgener Pflanzen mit einer Papiertüte abgeschirmt werden, um die Verbreitung von Pollen zu vermeiden.

BY-2-Zellkulturen wurden unter Schütteln bei 150 U/min in 30 mL 2MS-Flüssigmedium in 100-mL-Erlenmeyerkolben im Dunkeln bei 26 °C angezogen und wöchentlich 1:10 verdünnt subkultiviert.

2.2.3 Oberflächensterilisation von Tabaksamen

Da die Samen von *Nicotiana tabacum* die Oberflächensterilisation mit Chlorgas wie in Kapitel 1.2.22.4 beschrieben nicht überlebten, wurden sie mit halbkonzentrierter Hypochloritlösung sterilisiert. Dazu wurden die Samen für $\frac{1}{2}$ h in 6 %iger Natriumhypochloritlösung geschwenkt und anschließend drei Mal für 20 min mit sterilem Wasser gewaschen. Die auf diese Weise oberflächensterilisierten Tabaksamen wurden auf 2MS-Agar ausgesät. Diese Me-

thode verursachte eine geringe Letalität, und es konnte kein Wachstum von Pilzen beobachtet werden.

2.2.4 Bakterienstämme, Kultur und Erhaltung

2.2.4.1 *Escherichia coli*-Stämme

Es wurden dieselben Stämme wie in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben verwandt.

2.2.4.2 Kultur von *Escherichia coli*

Die Kultur von *Escherichia coli* wurde wie in Kapitel 1.2.2.2 beschrieben durchgeführt.

2.2.4.3 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Zur Transformation von *Nicotiana tabacum* wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58-C1-R pGV2260 (Deblaere *et al.*, 1985) verwandt. Dieser Stamm ist gegen Rifampicin resistent.

Für Expressionsstudien wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm EHA105 verwandt. Auch dieser Stamm ist gegen Rifampicin resistent.

2.2.4.4 Kultur von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens wurde im wesentlichen wie in Kapitel 1.2.2.4 beschrieben kultiviert. Den Medien wurde stets Rifampicin gemäß Tabelle 7 zugesetzt.

2.2.4.5 Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen

Bakterienstämme wurden als Glycerinkulturen wie in Kapitel 1.2.2.7 beschrieben dauerhaft gelagert.

2.2.5 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwandten Plasmide sind in Tabelle 49 aufgeführt.

Tabelle 49: Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
p3×GAS-TT-GUS/INT	Ligation des 3×GAS-Fragments aus pRS306-3×GAS-CYC: <i>PvuII/XhoI</i> (Klenow) mit pTT-GUS/INT: <i>StuI</i> . Verwandt für transiente Expressionsstudien. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pAVA353	Enthält ein Gen für ein grün fluoreszierendes Protein hinter dem CaMV 35S-Promotor.	Siemering <i>et al.</i> , 1996
pBIN19	siehe Tabelle 8	Frisch <i>et al.</i> , 1995
pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT	Ligation eines Multimerisierungsprodukts des 3×GAS-Fragments von pUC57-3×GAS: <i>StuI</i> und BIN-TT-GUS/INT: <i>StuI</i> . Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16	Ligation der Expressionskassette aus pUCA7-Stat5b*VP16-Oligo: <i>EcoRI</i> mit pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT: <i>EcoRI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> , transiente Expressionsstudien und weitere Klonierungen. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 DoubleTerminator	Ligation des Spacer-Terminator-Fragments aus pGEM-spacer-ocs: <i>BclI</i> in pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16: <i>BclI</i> . Verwandt zur Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINA7	Ligation des Promotor-Terminator-Fragments aus pUCA7: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBIN19: <i>EcoRI/HindIII</i> . Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINA7-EpoR	Ligation des EpoR-Fragments aus pSKII-EpoR: <i>Acc65I/XbaI</i> mit pBINA7: <i>Acc65I/XbaI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> und transiente Expressionsstudien. <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINHygA7	Ligation des Promotor-Terminator-Fragments aus pUCA7: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBINHygTx: <i>EcoRI/HindIII</i> . Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINHygA7-mJak2	Ligation des mJak2-Fragments aus pSK-mJak2: <i>NotI</i> (Klenow)/ <i>Eco32I</i> mit pBINHygA7: <i>SmaI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINHygA7-mJak2t	Ligation des mJak2-Fragments aus pUC57-mJak2t: <i>BamHI</i> (Klenow)/ <i>NotI</i> (Klenow) mit pBINHygA7: <i>SmaI</i> . Verwandt für Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pBINHygTx	BIN19-Derivat. Enthält einen mit dem Tetracyclin-Operator modifizierten CaMV 35S-Promotor, den ocs-Terminator und anstelle der pflanzlichen Kanamycinresistenz eine Hygromycinresistenz. Verwandt als Ausgangsplasmid für pBINHygA7. <i>Km^R</i>	Rieping <i>et al.</i> , 1994
pBIN-TT-GUS/INT	Ligation des TATA-GUS-Terminator-Fragments aus pTT-GUS/INT: <i>EcoRI/HindIII</i> mit pBIN19: <i>EcoRI/HindIII</i> . <i>Km^R</i>	diese Arbeit
pGEM-spacer-ocs	Klonierung des PCR-Produkts aus pSK(-90)-Deac mit den Primern Deac spacer ocs fwd <i>BclI</i> und Deac spacer ocs rev <i>BclI</i> in pGEM-T. Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pGEM-T	siehe Tabelle 8	Promega
pRS306-3×GAS-CYC	Trimere γ -Interferon-Aktivierungssequenz (IFP-53-GAS) fusioniert mit einem Minimalpromotor für Hefe in pRS306. <i>Amp^R</i>	Barahmand-Pour <i>et al.</i> , 1998
pRT106	Enthält den 35S-Promotor, eine Klonierregion und den 35S-Terminator in einem pUC18-Derivat	Töpfer <i>et al.</i> , 1993
pRT106-mJak2t	Ligation des Jak2-Fragments aus pUC57-mJak2: <i>BamHI/NotI</i> mit pRT106: <i>BamHI/NotI</i> . Verwandt für transiente Expressionsstudien. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pSKII	allgemeiner Klonier- und Sequenziervektor. <i>Amp^R</i>	Stratagene
pSKII-EpoR	Ligation des EpoR-Fragments aus pMX-EpoR: <i>SaII/EcoRI</i> mit pSKII: <i>SaII/EcoRI</i> . Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit
pSK-mJak2	cDNA des Jak2-Gens aus <i>Mus musculus</i> in pSK. <i>Amp^R</i>	Barahmand-Pour <i>et al.</i> , 1998
pTT-GUS/INT	β -Glucuronidasegen mit einem synthetischen Intron hinter der TATA-Box aus dem 35S-Promotor, terminiert mit dem 35S-Terminator	Lenk, 1997
pUC19-as-1-GUS	Enthält das β -Glucuronidasegen hinter einem einzelnen <i>as-1</i> -Element. Verwandt für transiente Expressionsstudien. <i>Amp^R</i>	Alexandra Thiele, unveröffentlichte
pUC57-3×GAS	PCR-Produkt aus pRS306-3×GAS-CYC mit Primern Ad <i>StuI</i> fwd und Ad <i>StuI</i> rev kloniert in pUC57-T. Verwandt als Ausgangsvektor für Multimerisierung und weitere Klonierung. <i>Amp^R</i>	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pUC57-mJak2	Klonierung des PCR-Produkts aus pUCA7-mJak2 mit den Primern mJak2upper(<i>Bam</i> HI) und mJak2lower(<i>Not</i> I) in pUC57-T Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUC57-mJak2t	Ligation eines unvollständigen mJak2-Fragments aus pUCA7-mJak2: <i>Asp</i> I/ <i>Bc</i> II mit pUC57-mJak2: <i>Asp</i> I/ <i>Bc</i> II zur Eliminierung von aus der PCR resultierenden Fehlern im Jak2-Gen. Verwandt für weitere Klonierungen. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUC57-T	An <i>Eco</i> RV-Schnittstelle linearisierter und desoxythymidinylierter pUC57-Vektor für die Klonierung von PCR-Produkten mit 3'A-Überhängen. <i>Amp</i> ^R	MBI Fermentas
pUCA7	pUC18-Derivat. Enthält den CaMV 35S-Promotor, den <i>ocs</i> -Terminator und dazwischen eine modifizierte Klonierregion aus pBINAR. <i>Amp</i> ^R	Höfgen und Willmitzer, 1990
pUCA7-Deac	siehe Tabelle 8. Hier verwandt zur Gewinnung eines <i>ocs</i> -Terminators mit Spacer mittels PCR	diese Arbeit, Teil 1
pUCA7-EpoR	Ligation des EpoR-Fragments aus pSKII-EpoR: <i>Acc</i> 65I/ <i>Xba</i> I mit pUCA7: <i>Acc</i> 65I/ <i>Xba</i> I. Verwandt für weitere Klonierungen und transiente Expressionsstudien. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUCA7-mJak2	Ligation des Jak2-Fragments aus pSK-mJak2: <i>Not</i> I(Klenow)/ <i>Eco</i> 32I mit pUCA7: <i>Xba</i> I(Klenow)/ <i>Sma</i> I. Verwandt für weitere Klonierungen und transiente Expressionsstudien. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUCA7-Stat5b*VP16	Ligation des Stat5b*VP16-Fragments aus pYCplacIII-Stat5b*VP16: <i>Eco</i> RI(Klenow)/ <i>Spe</i> I mit pUCA7: <i>Xba</i> I/ <i>Sma</i> I. Verwandt für weitere Klonierungen und transiente Expressionsstudien. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUCA7-Stat5b*VP16-Oligo	Ligation von pUCA7-Stat5b*VP16: <i>Hind</i> III mit den annealten Oligonukleotiden Linker HEH1 und Linker HEH2. Enthält eine zusätzliche <i>Eco</i> RI-Schnittstelle an Stelle der <i>Hind</i> III Schnittstelle hinter der Expressionskassette. <i>Amp</i> ^R	diese Arbeit
pUCA7-TetR	Enthält den Tetracyclinrepressor hinter dem CaMV 35S-Promotor. Verwandt als Negativkontrollplasmid in transienten Expressionsstudien. <i>Amp</i> ^R	Gatz <i>et al.</i> , 1991
pXM-EpoR	cDNA des EpoR-Gens aus <i>Mus musculus</i> in pXM. <i>Amp</i> ^R	Klingmüller <i>et al.</i> , 1996; Klingmüller <i>et al.</i> , 1995; Klingmüller <i>et al.</i> , 1997
pYCplac111-Stat5b*VP16	cDNA des Stat5b-Gens aus <i>Mus musculus</i> , N-terminal mit 3 <i>myc</i> -Tags und C-Terminal mit der VP16-Transaktivierungsdomäne aus <i>Herpes simplex</i> fusioniert im Hefeexpressionsvektor pYCplac111. <i>Amp</i> ^R	Barahmand-Pour <i>et al.</i> , 1998

2.2.6 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwandten Oligonukleotide sind in Tabelle 50 aufgeführt

Tabelle 50: Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Ad <i>Stu</i> fwd	AGGCCTGGTACCAAGTGTCTGAG
Ad <i>Stu</i> rev	AGGCCTCTCGAGAATCACCAGATTC
Deac spacer <i>ocs</i> fwd <i>Bc</i> ul	ACTAGTGCCGGGCAGATCGCCGTGCG
Deac spacer <i>ocs</i> rev <i>Bc</i> ul	ACTAGTGCCCCCCTCGAGGTCGACG
Linker HEH1	AGCTTGAATTCCAGCTGGATTCAAGCTGGACTCAAGCT
Linker HEH2	AGCTTGAGTCCCAGCTTGAATCCAGCTGGAATTCAGCT
mJak2lower(<i>Not</i> I)	GCGGCCGCCTATACTGTCCCGCATTGATCC
mJak2upper(<i>Bam</i> HI)	GGATCCATGTTTGCCTTAATGAGT
rev	siehe Tabelle 9
uni	siehe Tabelle 9

2.2.7 DNA-Sonden für Hybridisierungen

Folgende DNA-Fragmente wurden als Sonden für Hybridisierungen (Kapitel 2.2.34) radioaktiv markiert:

Tabelle 51: DNA-Fragmente zur Sondenherstellung

Sonde	Herstellung
EpoR	1282 bp-Fragment aus pUCA7-EpoR: <i>Eco</i> RI/ <i>Xho</i> I
GUS	siehe Tabelle 10

Sonde	Herstellung
mJak2	1208 bp-Fragment aus pUCA7-mJak2:Eco147I/XhoI
Stat5b	1575 bp-Fragment aus pUCA7-Stat5b*VP16:Eco147I/XhoI

2.2.8 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*-Kulturen

2.2.8.1 Miniaturmaßstab

Es wurden Rapid-Minilysen, alkalische Lysen mit Phenol-Chloroform-Extraktion und das Qiagen Plasmid Mini Kit wie in Kapitel 1.2.6.1 beschrieben verwandt.

2.2.8.2 Midi- und Maximaßstab

Es wurden die Plasmid Midi und Plasmid Maxi Kits der Firma Qiagen verwandt.

Für höchste Ausbeuten wurde das Protokoll für alkalische Lysen mit Phenol-Chloroform-Extraktion (Ish-Horowicz und Burke, 1981; Sambrook *et al.*, 1989) mit entsprechend vergrößerten Volumina modifiziert und anschließend eine PEG-Fällung (Kapitel 2.2.10) durchgeführt.

2.2.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen wurde wie in Kapitel 1.2.7 beschrieben vorgegangen. Ausbeute und Qualität der DNA waren bei dem hier verwandten Stamm C58-C1-R pGV2260 besser als bei GV3101 (pMP90).

2.2.10 PEG-vermittelte Fällung von DNA

Zur Reinigung einer DNA-Präparation von Oligosacchariden wurde eine PEG-Fällung angewandt. Dazu wurde eine DNA-Lösung mit ½ Vol. PEG-Fällungslösung gut vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 30 – 45 min bei 10.000 ×g und 4 °C sedimentiert, das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in Wasser oder TE gelöst. Die auf diese Weise gereinigte DNA wurde für transiente Expressionsstudien mit Protoplasten wie in Kapitel 2.2.27.1 und 2.2.27.2 beschrieben verwandt.

Tabelle 52: PEG-Fällungslösung

Substanz	Menge
PEG 6000	30 % (w/v)
Natriumchlorid	1,5 M

2.2.11 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung und Abschätzung der Qualität von Nukleinsäurepräparationen wurde wie in Kapitel 1.2.8 beschrieben durchgeführt.

2.2.12 Lagerung von Nukleinsäuren

Nukleinsäurepräparationen wurden wie in Kapitel 1.2.9 beschrieben gelagert.

2.2.13 Sequenzspezifische Spaltungen von Plasmid-DNA

Zur enzymatischen Spaltung von Plasmid-DNA wurde wie in Kapitel 1.2.10 beschrieben vorgegangen.

2.2.14 Auffüllen von 3'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase

Das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden wurde wie in Kapitel 1.2.11 beschrieben durchgeführt.

2.2.15 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde im wesentlichen wie in Kapitel 1.2.12 beschrieben durchgeführt. Zur Amplifikation von Produkten, die größer als 1500 bp waren, und die anschließend kloniert werden sollten, wurde ein Gemisch aus *Taq*-Polymerase und *Pwo*-Polymerase (Hybaid-AGS) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.16 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

2.2.16.1 Auftrennung im Agarosegel

Fragmente ab einer Größe von etwa 350 bp wurden in Agarosegelen wie in Kapitel 1.2.13 beschrieben aufgetrennt.

2.2.16.2 Auftrennung kleiner Fragmente im Polyacrylamidgel

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten, die kleiner als etwa 350 bp waren, wurde eine Elektrophorese im Polyacrylamidgel durchgeführt. Dazu wurden Gele von 8,5 cm Breite, 9,5 cm Länge und 1 mm Dicke verwendet,

die abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gemäß Tabelle 54 hergestellt wurden. Die Proben wurden mit dem Farbstoff Orange G versetzt und der Fortschritt der Elektrophorese abgewartet, bis dieser Farbmarker sich am Ende des Gels befand.

Tabelle 53: 10× TBE

Substanz	Menge
Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	25 mM

Tabelle 54: Zusammensetzung von Polyacrylamid-DNA-Gelen

Prozentigkeit	3,5%	5%	8%	12%	20%
zu trennende Fragmentgröße	100–1000 bp	80–500 bp	60–400 bp	40–200 bp	5–100 bp
40% Acrylamid	875 µL	1,25 mL	2 mL	3 mL	5 mL
10× TBE	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Wasser	8,02 mL	7,64 mL	6,89 mL	5,89 mL	3,89 mL
TEMED	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
15% APS	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL

2.2.17 Visualisierung und Dokumentation von gelelektrophoretisch aufgetrennter DNA

DNA in Agarose- und Polyacrylamidgelen wurde wie in Kapitel 1.2.14 beschrieben sichtbar gemacht.

2.2.18 Elution von elektrophoretisch aufgetrennter DNA aus Gelen

2.2.18.1 Agarosegele

DNA wurde aus Agarosegelen wie in Kapitel 1.2.15 beschrieben eluiert.

2.2.18.2 Polyacrylamidgele

DNA-Fragmente wurden aus Polyacrylamidgelen eluiert, indem zunächst das gewünschte Fragment mit möglichst dichter Schnittführung aus dem Gel ausgeschnitten wurde. Das Gelstück wurde in einem 1,5 mL-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und mit Hilfe eines passenden Pistills und einer Bohrmaschine zerkleinert. Der Ansatz wurde mit 20 µL TE versetzt, für 15 min bei 65 °C inkubiert und danach für 10 min bei 10.000 ×g zentrifugiert. Unmittelbar nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand abgenommen, in ein neues Gefäß überführt und für die folgenden Prozeduren verwandt.

2.2.19 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung wurde wie in Kapitel 1.2.16 beschrieben durchgeführt.

2.2.20 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA wurde im wesentlichen wie in Kapitel 1.2.17 beschrieben vorgegangen. Bei kleinen Fragmenten wurde jedoch ein bis zu 100-facher Überschuß an Fragment in einer Ligation eingesetzt.

2.2.21 Multimerisierung kleiner DNA-Fragmente

Zur Multimerisierung von kleinen DNA-Fragmenten wurde DNA aus einer Gelelution gemäß Kapitel 2.2.18.2 auf Eis in einem 50-µL-Ansatz mit Reaktionspuffer und 1 U T4-DNA-

Ligase (MBI) versetzt. Diesem Reaktionsansatz wurden während einer Inkubation bei 16 °C im Abstand von jeweils drei Minuten Proben entnommen und sofort bei 95 °C denaturiert. Der Erfolg der Multimerisierung wurde im Polyacrylamidgel gemäß Kapitel 2.2.16.2 überprüft und Fragmente der gewünschten Größe isoliert.

2.2.22 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mittels T-Cloning wie in Kapitel 1.2.18 beschrieben kloniert.

2.2.23 Blau-Weiß-Färbung zur Vorselektion auf rekombinante Plasmide

Zur Vorselektion auf Bakterienkolonien, die rekombinante Plasmide enthielten, wurde wie in Kapitel 1.2.19 beschrieben vorgegangen.

2.2.24 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Escherichia coli-Zellen wurden wie in Kapitel 1.2.20 beschrieben transformiert.

2.2.25 Transformation elektrokompenter *Agrobacterium tumefaciens*

Auch der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm C58-C1-R pGV2260 wurde wie in Kapitel 1.2.21 beschrieben durch Elektroporation transformiert.

2.2.26 Transformation von *Nicotiana tabacum*

Die Transformation von Tabak wurde nach einer modifizierten Prozedur in Anlehnung an (Rosahl *et al.*, 1987) durchgeführt.

Eine 5-mL-Kultur von *Agrobacterium tumefaciens* C58-C1-R pGV2260 wurde abzentrifugiert, in YEB-Medium ohne Antibiotika aufgenommen und in eine Petrischale überführt.

Nicht zu alte Tabakblätter von Pflanzen aus Sterilkultur wurden in etwa 0,5 – 1 cm² große Stücke zerschnitten, schwimmend auf die *Agrobacterium tumefaciens*-Suspension aufgelegt und für etwa 5 min dort belassen. Danach wurden die Blattscheiben fünf Mal in sterilem Leitungswasser gewaschen, so dicht wie möglich auf 2MS-Agar ausgelegt und für zwei Tage im Dunkeln bei 26 °C inkubiert. Anschließend wurden die Blattscheiben auf 2MS-Agar mit Naptylessigsäure, Benzylaminopurin, Cefotaxim und einem passenden selektiven Antibiotikum gemäß Tabelle 7 gelegt und zweimal pro Woche auf frischen Agar umgesetzt. Wenn sich sichtbare Kulturen von *Agrobacterium tumefaciens* auf den Blattscheiben oder dem Agar bildeten, wurden die befallenen Blattscheiben verworfen und zusätzlich β -Baktyl eingesetzt.

Nach 2 Wochen wurden in der Regel die ersten Kalli sichtbar und nach 4 Wochen die ersten Sprosse ausgebildet, die von den Blattscheiben abgeschnitten und in ¼-L-Weckgläsern (Sturzform) mit 2MS-Agar ohne Hormone, aber mit den zuvor eingesetzten Antibiotika gesammelt wurden.

Sprosse, die in diesen Gläsern Wurzeln bildeten, wurden auf 2MS-Agar mit Antibiotika in ½-L-Weckgläsern vereinzelt und weiter kultiviert.

2.2.27 Transiente Expressionsstudien

Außer den in den folgenden Kapiteln dargestellten Methoden wurde noch eine durch PEG vermittelte Transfektion mit BY-2-Protoplasten (Merkle *et al.*, 1996) erprobt, die sich aber wegen des hohen Zeitaufwandes nicht für die in dieser Arbeit notwendige Anzahl an Parallelversuchen eignete.

Eine ebenfalls durch PEG vermittelte Transfektion mit einer *Nicotiana benthamiana*-Zellkulturlinie (Borisjuk *et al.*, 1998) wurde im Labor von Prof. Dr. Bäumlein in Gatersleben unter Leitung von Frau Dr. Annegret Tewes und Herrn Wim Reidt erprobt, war aber ebenfalls nicht erfolgreich.

2.2.27.1 Transfektion von Protoplasten aus *Nicotiana tabacum* cv. Bright Yellow 2 (BY-2)-Zellkulturen mittels Elektroporation

Die Transfektion von Protoplasten aus BY2-Zellkulturen wurde in Anlehnung an (Gatz und Quail, 1988) durchgeführt.

BY-2-Zellkulturen wurden am dritten Tag nach der Subkultivierung durch leichte Zentrifugation (1000 \times g, 5 min ohne Auslaufbremse, Eppendorf Centrifuge 5403 mit Rotor 16A4-44) geerntet, zwei Mal mit 50 mL MSM (Tabelle 57) gewaschen und in 50 mL MSM aufgenommen. Die Suspension wurde mit 5 mL isoosmotischer Enzymlösung (Tabelle 56) versetzt und über Nacht im Dunkeln unter Schütteln wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Protoplasten durch Zentrifugation bei 1000 \times g für 3 min bei Raumtemperatur geerntet, drei Mal mit 50 mL MSM gewaschen und anschließend durch ein Drahtsieb mit 0,125 mm Maschenweite filtriert. Die Zelldichte in der Suspension wurde durch Auszählen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt, die Protoplasten erneut abzentrifugiert und anschließend in Elektroporationspuffer (Tabelle 58) mit einer Zelldichte von 10^6 Zellen pro mL aufgenommen.

Zur Elektroporation wurden 500 μ L der Protoplastensuspension unter Verwendung abgeschnittener Spitzen in Elektroporationsküvetten mit 4 mm Spaltweite pipettiert. Sodann wurden 100 μ g Heringssperma-DNA, 20 μ g Reporterplasmid-DNA und je 50 μ g Effektorplasmid-DNA zugegeben und sanft gemischt. Die Elektroporation wurde bei 340 V und 500 μ F ohne Parallelwiderstand durchgeführt (GenePulser II mit Capacity Extender Plus, BioRad). Nach der Elektroporation wurde der Inhalt der Küvetten in kleine Petrischalen überführt, mehrmals mit MSM nachgespült und mit MSM auf 6 mL aufgefüllt. Diese Ansätze wurden für zwei Tage im Dunkeln bei 26 °C inkubiert.

Zur Ernte wurden die Ansätze in 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt, für 3 min bei 1000 \times g sedimentiert, in 5 mL Mannitpuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in

Tabelle 55: Mannitpuffer

Substanz	Menge
Mannit	500 mM
MES	2%
pH 5,6 autoklavieren	

Tabelle 56: isoosmotische Enzymlösung

Substanz	Menge
Cellulase R-10	150 U/mL
Macerozym R-10	5,6 U/mL
lösen in Mannitpuffer (Tabelle 55) durch Rühren bei 4 °C unlösliche Bestandteile durch sedimentieren sterilfiltrieren	

Tabelle 57: MSM

Substanz	Menge
MS-Salzmischung	4,59 g/L
Mannit	72,87 g/L
Saccharose	30 g/L
myo-Inosit	900 mg/L
Thiaminlösung 1 mg/mL	900 μ L/L
pH 5,7	

Tabelle 58: Elektroporationspuffer

Substanz	Menge
Hepes	10 mM
Natriumchlorid	150 mM
Calciumchlorid	4 mM
Mannit	400 mM
pH 7,2	

1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt. Nach nochmaliger Zentrifugation und Entfernung des Überstandes wurden die Zellen in GUS-Ex-Puffer resuspendiert. Nach Durchführung von drei Frier-Tau-Zyklen wurde eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben durchgeführt.

2.2.27.2 Transfektion von Protoplasten aus Mesophyllgewebe von *Nicotiana tabacum* mittels Elektroporation

Die Transfektion von Protoplasten aus Mesophyllgewebe wurde in Anlehnung an die Protokolle von Denecke (Denecke und Vitale, 1995; Denecke, 1998) durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial dienen Blätter aus Tabakpflanzen, die in 1-L-Schmuckform-Weckgläsern angezogen worden waren. Die Schmuckformgläser erlauben eine besonders weite Ausbreitung der Blattspreite, so daß man aus diesen Gläsern mehr Material zur Protoplastierung gewinnen kann als aus den sonst üblichen Sturzformgläsern. Blätter aus diesen Pflanzen wurden an der Unterseite mit einer scharfen Skalpellklinge im Abstand von 1 – 2 mm vorsichtig eingeritzt, ohne dabei die obere Epidermis zu beschädigen. Die Mittelrippe wurde entfernt, die Blatthälften mit der eingeschnittenen Seite nach unten auf Enzymlösung II in Petrischalen gelegt und über Nacht bei 26 °C inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Protoplasten durch vorsichtiges Klopfen aus den unverdauten Geweberesten befreit und nach weiterer etwa 45-minütiger Inkubation zunächst zur Abtrennung der Gewebereste durch ein Drahtsieb mit 125 μ m Maschenweite filtriert. Durch Zentrifugation in einer Standzentrifuge (Christ) mit Ausschwingrotor für 20 min bei 60 \times g in 50 mL-Gefäßen wurden die lebenden Protoplasten auf der saccharosehaltigen Lösung zum Aufschwimmen gebracht, während alles tote Material sedimentiert wurde. Dabei wurde das Abbremsen des Rotors bei eingeschaltetem Motor mit verringerter Leistung durchgeführt, da die Zentrifuge ansonsten zu schnell zum Stillstand kam und sich Wirbel bildeten, welche die schwimmenden Protoplasten wieder resuspendierten. Mit einer langen Glas-Pasteurpipette, die vorsichtig durch die Bande schwimmender Protoplasten geführt wurde, und einer an der Pipette angeschlossenen Peristaltikpumpe (Roth Cyclo 1) wurden das Sediment vollständig und die trübe Lösung so weit wie möglich abgesaugt. Das Gefäß wurde sogleich mit Elektro-

Tabelle 59: TEX-Puffer

Substanz	Menge
Gamborg's B5-Medium	3,05 g/L
MES	500 mg/L
Calciumchlorid-Dihydrat	750 mg/L
Ammoniumnitrat	250 mg/L
Saccharose	400 mM
pH 5,7	

Tabelle 60: 10 \times Enzymlösung II

Substanz	Menge
Cellulase R-10	8 % (w/v)
Macerozym R-10	4 % (w/v)
in TEX-Puffer lösen in 5-mL-Aliquots bei –80 °C lagern vor Gebrauch in 50 mL TEX-Puffer auftauen	

Tabelle 61: Elektroporationspuffer II

Substanz	Menge
HEPES	2,4 g/L
Kaliumchlorid	6 g/L
Calciumchlorid	600 mg/L
Saccharose	400 mM
pH 7,2	

porationspuffer II wieder aufgefüllt und der beschriebene Vorgang dreimal wiederholt, um die Protoplasten vollständig mit Elektroporationspuffer zu äquilibrieren, wobei die Zentrifugationen diesmal bei 100 ×g für jeweils 10 min durchgeführt wurden. Während des letzten Schritts wurde die Zellzahl mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Nach der letzten Zentrifugation und Entfernen des Unterstandes wurden die Protoplasten zu einer Dichte von 3 – 4·10⁶ Zellen pro mL aufgenommen.

Zur Elektroporation wurden je 500 µL der Protoplastensuspension in Elektroporationsküvetten wie in Kapitel 2.2.27.1 beschrieben pipettiert. Nach Zugabe von 5 – 50 µg Plasmid-DNA (Gesamtmenge) und fünfminütiger Inkubation wurden die Ansätze einem elektrischen Puls von 160 V und 900 µF ohne Parallelwiderstand unterworfen und für weitere 30 min erschütterungs- und schwingungsfrei inkubiert. Sodann wurden die Ansätze in Petrischalen von 3,5 cm Durchmesser überführt, mit 2 mL TEX-Puffer aufgefüllt und bis zum übernächsten Tag im Dunkeln bei 26 °C inkubiert.

Die Zellsuspensionen wurden geerntet, indem der Inhalt der Petrischalen vollständig in 12 mL-Zentrifugenröhrchen überführt, mit TEX-Puffer auf 6 mL aufgefüllt und bei 100 ×g für 10 min zentrifugiert wurde. Sediment und Unterstand wurden bis auf 1 mL abgenommen, mit mindestens 5 mL 250 mM Natriumchloridlösung aufgefüllt und gut vermischt. Bei der anschließenden Zentrifugation (10 min, 100 ×g) wurden die lebenden Protoplasten sedimentiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und die Protoplasten zur Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität der β-Glucuronidase in GUS-Ex-Puffer oder zur Analyse der mRNA in den zu der verwandten RNA-Extraktionsmethode gehörenden Aufschlußpuffer aufgenommen und durch Auf-und-Abpipettieren zerstört.

2.2.28 Kreuzung von *Nicotiana tabacum*

Zur Kreuzung von *Nicotiana tabacum* wurden zunächst von gerade geöffneten Blüten die Blütenkronen unterhalb der Ansätze der teilweise mit der Blütenkrone verwachsenen Antheren vorsichtig abgeschnitten. Anschließend wurden die Narben der emaskulierten Blüten mit dem Pollen von älteren Blüten bestäubt. Die auf diese Weise gekreuzten Blüten wurden mit kleinen Umhängeschildern markiert. Nach der Reifung konnten die Samen durch Ausschütteln der geöffneten Fruchtkapseln leicht geerntet werden.

2.2.29 Induktion der Genexpression durch Erythropoietin

Versuche zur Induktion der Genexpression wurden durch Zugabe von Erythropoietin in einer Konzentration von 1 U/mL in passenden Puffern durchgeführt.

Die Erythropoietinpräparate wurden uns freundlicherweise von der Firma Janssen-Cilag kostenfrei zur Verfügung gestellt.

2.2.30 Histochemische Färbung zum Test auf β -Glucuronidaseaktivität

Die Färbeprozedur wurde wie in Kapitel 1.2.29 beschrieben durchgeführt.

2.2.31 Quantitative Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Glucuronidase

Die spezifische Enzymaktivität der β -Glucuronidase wurde wie in Kapitel 1.2.30 beschrieben bestimmt.

2.2.32 Extraktion von Proteinen aus Blättern von *Nicotiana tabacum* unter denaturierenden Bedingungen

Denaturierte Proteinextrakte wurden gewonnen, indem genau 100 mg Blattmaterial in 300 μ L Harnstoff-Extraktionspuffer zerkleinert, für 10 min bei 65 °C inkubiert und die unlöslichen Reste durch 20-minütige Zentrifugation bei 10.000 \times g sedimentiert wurden. Der Überstand wurde für Western-Analysen gemäß Kapitel 2.2.35 verwandt.

Tabelle 62: Harnstoff-Extraktionspuffer

Substanz	Menge
Harnstoff	4 M
Glycerin	16,66 % (w/v)
Natriumdodecylsulfat	5 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Bromphenolblau	< 0,005 % (w/v)

2.2.33 Extraktion von RNA aus Blättern von *Nicotiana tabacum*

RNA wurde mit Hilfe des Qiagen Plant Mini Kits gemäß dem jeweils beiliegenden aktuellen Protokoll aus Tabakblättern gewonnen. Die besten Ausbeuten wurden jedoch erzielt, wenn statt der angegebenen maximal 100 mg Blattmaterial 150 – 300 mg eingesetzt wurden.

2.2.34 Expressionsstudien anhand des spezifischen Nachweises von mRNA durch DNA-Fragmente

Alle Arbeitsschritte, die für eine Northern-Analyse nötig waren, wurden gemäß Kapitel 1.2.33 und Unterkapiteln durchgeführt.

2.2.35 Expressionsstudien anhand des spezifischen Nachweises von Proteinen durch Antikörper

2.2.35.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen im Polyacrylamidgel wurde in Anlehnung an Lämmli, 1970 durchgeführt.

Proteinextrakte, die wie in Kapitel 2.2.32 beschrieben gewonnen worden waren, wurden je nach Größe der zu detektierenden Proteine in 6 %igen, 7,5 %igen oder 10 %igen diskontinuierlichen denaturierenden Polyacrylamidgelen von 18,5 cm Breite, 7 cm Höhe und 1 mm Dicke aufgetrennt.

Trenngele wurden wie in Tabelle 63 und Tabelle 64 angegeben hergestellt, bis zur gewünschten Füllhöhe (etwa 1 cm unterhalb der Zähne des Kamms) zwischen zwei Glasplatten mit 1 mm Abstand gegossen, mit Isopropanol überschichtet und das Aushärten abgewartet. Nach dem Aushärten des Trenngels wurde der Isopropanol entfernt und Sammelgele wie in Tabelle 65 und Tabelle 66 beschrieben hergestellt. Mit dieser Lösung wurde das verbleibende Volumen zwischen den Glasplatten vollständig aufgefüllt und der Kamm zur Erzeugung von Taschen eingesteckt. Nachdem auch das Sammelgel ausgehärtet war, wurden die Silikondichtung zwischen den Glasplatten und der Kamm vorsichtig entfernt, das Gel zwischen den Glasplatten in eine Laufkammer eingespannt und der Laufpuffer (Tabelle 67) in beide Vorratsbehälter eingefüllt.

Die Taschen wurden mit den Proteinextrakten beladen und das Gel bei 12 W so lange unter elektrische Gleichspannung mit Pluspol am unteren Ende des Gels gesetzt, bis das Bromphenolblau, das Bestandteil des Extraktionspuffers (Tabelle 62) war, aus dem Gel herausgelaufen war.

Tabelle 63: 4× Trenngelpuffer

Substanz	Menge
Tris	1,5 M
Natriumdodecylsulfat	0,4 % (w/v)
pH 8,8 mit Salzsäure	

Tabelle 64: Trenngel

Substanz	6 %	7,5 %	10 %
30% Acrylamidlg.	4 mL	5 mL	—
40% Acrylamidlg.	—	—	5 mL
Trenngelpuffer	5 mL	5 mL	5 mL
15% APS-Lösung	200 µL	200 µL	200 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL
Wasser	10,78 mL	9,78 mL	9,78 mL

Tabelle 65: 4× Sammelgelpuffer

Substanz	Menge
Tris	500 mM
Natriumdodecylsulfat	0,4 % (w/v)
pH 6,8 mit Salzsäure	
pH vor jeder Verwendung prüfen	

Tabelle 66: Sammelgel

Substanz	Menge
30% Acrylamidlösung	1 mL
Sammelgelpuffer	2,5 mL
15% Ammoniumperoxodisulfatlösung	100 µL
TEMED	20 µL
Wasser	6,38 mL

Tabelle 67: Laufpuffer

Substanz	Menge
Tris	250 mM
Glycin	2 M
Natriumdodecylsulfat	1 % (w/v)

Solche Gele konnten entweder wie in Kapitel 2.2.35.4 beschrieben gefärbt oder die Proteine wie in Kapitel 2.2.35.2 beschrieben auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen werden.

Zur Größenabschätzung der Proteine in den Extrakten wurde eine Tasche des Gels mit einem Größenstandard beladen. Üblicherweise wurde dazu die BenchMark™ Prestained Protein Ladder der Firma GibcoBRL Life Technologies verwendet. Dieser Standard setzt sich aus farbstoffgekoppelten Proteinen mit den in Tabelle 68 angegebenen Größen zusammen.

Tabelle 68: Protein-Größenstandard

Ungefähres Molekulargewicht
195 kDa
125 kDa
90 kDa
65 kDa
55 kDa
40 kDa
30 kDa
20 kDa
15 kDa
10 kDa

Wegen der gekoppelten Farbstoffe variiert das exakte Molekulargewicht in Abhängigkeit von der jeweiligen Charge etwas und ist dem jeweils mitgelieferten Datenblatt zu entnehmen.

2.2.35.2 Übertragung von gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf proteinbindende Membranen

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf proteinbindende Membranen wurde in Anlehnung an Kyhse-Andersen (1984) durchgeführt.

Als proteinbindende Medien kamen Nitrocellulose und PVDF zum Einsatz, wobei PVDF wegen der höheren Bindekapazität bevorzugt wurde.

Fließpapier (MN 218 B, Macherey & Nagel) und Nitrocellulosemembran wurden in Blottingpuffer nach Towbin *et al.*, 1979 (Tabelle 69) eingelegt.

Die PVDF-Membran mußte vor der Verwendung in Methanol aktiviert werden, bevor sie ebenfalls in Blottingpuffer eingelegt und für mindestens 5 min äquilibriert wurde. Mit den angefeuchteten Membranen, Papieren und dem Gel wurde eine Anordnung wie in Abbildung 58 dargestellt luftblasenfrei aufgebaut. Der Elektrotransfer wurde bei 140 mA pro Gel für 2 h durchgeführt.

Mit den Membranen konnte eine Färbung wie in Kapitel 2.2.35.5 beschrieben durchgeführt oder direkt mit der immunologischen Detektion wie in Kapitel 2.2.35.3 beschrieben fortgeführt werden.

Tabelle 69: Blottingpuffer

Substanz	Menge
Tris	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol	20 % (v/v)

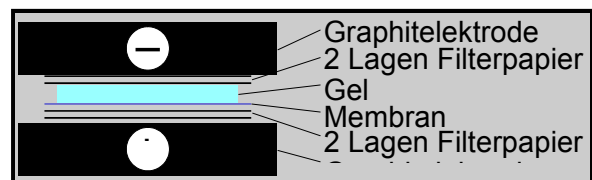


Abbildung 58: Schematische Darstellung einer Western-Blot-Apparatur

2.2.35.3 Spezifische Detektion von Proteinen auf proteinbindenden Membranen mit Hilfe von Antikörpern

Zur immunologischen Detektion von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen mußten zunächst die freien Bindestellen der Membranen durch mindestens zweistündige Inkubation in Blockierlösung unter permanentem Schwenken abgesättigt werden. Die Inkubationszeiten der folgenden Prozedur variierten je nach Antikörper und sind in der Liste der verwandten Antikörper (Tabelle 70) aufgeführt.

Grundsätzlich wurden die Primärantikörper in Blockierlösung (Tabelle 72) in der gewünschten Verdünnung unter permanentem Schwenken für die nötige Zeit und bei der vorgegebenen Temperatur auf den Membranen inkubiert. Danach folgten drei je fünfminütige Waschschrte in TBS-T (Tabelle 71) und zwei Waschschrte in TBS, bevor die Membranen für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit ebenfalls in Blockierlösung verdünnten Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert wurden. Nach dreimaligem Waschen in TBS-T und dreimaligem Waschen in TBS wurde

das ECL+-Kit der Firma Amersham Pharmacia angewandt um mittels der bei der Peroxidase-Reaktion entstehenden Biolumineszenz die gebundenen Antikörper zu detektieren. Zur sparsamen Verwendung der ECL-Lösung wurden die Membranen mit der proteinbeschichteten Seite nach unten auf Tageslichtprojektorfolien gelegt, auf die zuvor die ECL-Lösung aufgebracht worden war, und während der vorgeschriebenen Inkubationszeit ständig leicht hin und her bewegt

Zur Detektion wurden die so behandelten Membranen für 1 min bis 12 h auf Röntgenfilmen (Cronex 10T, Sterling Diagnostic Imaging Inc., Newark, USA) exponiert und diese fachgerecht entwickelt.

Tabelle 70: Antikörper

Antikörper	Eigenschaften
c-myc	primärer monoklonaler Maus-Antikörper, Klon 9E10, bezogen von Santa Cruz. Verdünnung 1:250, Inkubation bei Raumtemperatur über Nacht
mJak2	primärer polyklonaler Kaninchen-Antikörper, bezogen von Santa Cruz. Verdünnung 1:750, Inkubation bei 4 °C über Nacht
Anti-Maus-IgG, Peroxidase-Konjugat	sekundärer Antikörper zur Biolumineszenzdetektion von Mausantikörpern, Verdünnung 1:10000, Inkubation bei Raumtemperatur 2 h
Anti-Kaninchen-IgG, Peroxidase-Konjugat	sekundärer Antikörper zur Biolumineszenzdetektion von Kaninchenantikörpern, Verdünnung 1:5000, Inkubation bei Raumtemperatur 2 h

Tabelle 71: 10× TBS-Stammlösung

Substanz	Menge
Tris	500 mM
Natriumchlorid	1,5 M
pH 7,4 mit Salzsäure für TBS-T der verdünnten Lösung 0,1% (v/v) Tween-20 zufügen	

Tabelle 72: Blockierlösung

Substanz	Menge
Magermilch	5 % (w/v)
Rinderserumalbumin	1 % (w/v)
lösen in TBS	

2.2.35.4 Färbung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen im Polyacrylamidgel

Zur Anfärbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine im Polyacrylamidgel erfolgte zunächst eine Fixierung der Proteine im Gel durch 30-minütiges Schwenken in Fixierlösung (Tabelle 73). Die Färbung selbst wurde durch Inkubation in Coomassie-Färbelösung (Tabelle 74) für mindestens 2 h unter dauerndem Schwenken durchgeführt. Der überschüssige Farbstoff wurde durch mehrfaches Waschen in 10 %iger Essigsäure aus dem Gel entfernt und das Gel mit einem Durchlichtscanner wie in Kapitel 1.2.35 beschrieben dokumentiert.

Tabelle 73: Fixierlösung

Substanz	Menge
Isopropanol	25 % (v/v)
Essigsäure	10 % (v/v)

Tabelle 74: Coomassie-Färbelösung

Substanz	Menge
Essigsäure	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,006 % (w/v)

2.2.35.5 Färbung von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen

Proteinbindende Membranen konnten unmittelbar nach dem Elektrotransfer gemäß Kapitel 2.2.35.2 gefärbt werden, um den Erfolg der Proteinübertragung zu überprüfen. Dazu wurden die Membranen für einige Minuten in Ponceau-Färbegrad (Tabelle 75) geschwenkt. Danach wurde der überschüssige Farbstoff mit demineralisiertem Wasser so weit entfernt, bis deutlich angefärbte Proteinbanden hervortraten. Auf diese Weise angefärbte Membranen konnten mit einem Scanner wie in Kapitel 2.2.36 beschrieben dokumentiert werden.

Tabelle 75: Ponceau-Färbegrad

Substanz	Menge
Essigsäure	1 % (v/v)
Ponceau S	0,5 % (w/v)

Da der eingesetzte Farbstoff Ponceau-S die Bindung von Antikörpern an ihre Zielproteine negativ beeinflusst, mußten die Membranen durch mehrfaches Waschen in TBS oder TBS-T vollständig entfärbt werden, bevor mit der Prozedur der spezifischen Detektion von Proteinen (Kapitel 2.2.35.3) begonnen werden konnte.

2.2.35.6 Entfernung von Antikörpern auf proteinbindenden Membranen

Antikörper, die im Zuge der in Kapitel 2.2.35.3 beschriebenen Prozedur auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen aufgebracht worden waren und an spezifische Proteine gebunden hatten, konnten durch Schwenken in Striplösung (Tabelle 76) bei 50 °C für 60 min wieder entfernt werden. Anschließend konnten

Tabelle 76: Striplösung

Substanz	Menge
Tris	62,5 mM
Natriumdodecylsulfat	2 %
2-Mercaptoethanol	0,7 %
pH 6,7 mit Salzsäure	

die Membranen erneut für eine Detektion gemäß Kapitel 2.2.35.3 verwandt werden. Bei jeder dieser Waschungen gingen allerdings etwa 10 % der Proteinmenge auf der Membran verloren.

2.2.36 Fotografische Dokumentation und Bildbearbeitung

Hierfür wurden dieselben Geräte und Programme verwandt wie in Kapitel 1.2.35 angegeben.

Polyacrylamidgele, Röntgenfilme und angefärbte proteinbindende Membranen wurden mit dem in 1.2.35 erwähnten Durchlichtscanner dokumentiert.

2.2.37 Rechnergestützte Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen

Die für die rechnergestützte Analyse von Sequenzdaten verwandte Software wurde in Kapitel 1.2.36 beschrieben.

2.3 Ergebnisse

2.3.1 BLAST-Suche nach Jak2- und Stat5b-homologen Genen in *Arabidopsis thaliana*

Voraussetzung für die Etablierung der Jak-Stat-Signaltransduktion als induzierbares Expressionssystem in Tabak war, daß keine Proteine gleichartiger Funktion im pflanzlichen System existieren. Daher wurde zunächst ein Sequenzvergleich mit der *Arabidopsis thaliana*-Datenbank der GSF (<http://mips.gsf.de>) vorgenommen. Diese Datenbank wurde wegen ihrer Vollständigkeit ausgewählt.

Der Vergleich der Proteinsequenz des Erythropoietinrezeptors mit der Datenbank ergab nur sehr schwache Ähnlichkeiten zu einem unbekanntem Protein (At1g62760). Diese Homologie erstreckte sich auf die intrazelluläre mit mJak2 interagierende Domäne.

Der Vergleich der Proteinsequenz von mJak2 mit der Datenbank ergab innerhalb der Kinasedomäne signifikante Homologien zu Proteinkinasen verschiedener Typen (At1g56140, At1g11300, At5g03730, At4g08500), außerhalb der Kinasedomäne wurden nur schwache Homologien zu unbekanntem Proteinen gefunden. Dieses Ergebnis wurde nicht als kritisch erachtet, da die Spezifität von Kinasen nicht von der generell konservierten Kinasedomäne abhängig ist.

Der Vergleich der Proteinsequenz von Stat5b mit dieser Datenbank ergab sehr schwache Ähnlichkeiten zu kinesinartigen Proteinen (At1g73860, At1g18410) und einer vermutlichen schweren Myosinkette (At2g32240).

Aufgrund dieser Suchergebnisse konnte davon ausgegangen werden, daß in Pflanzen keine zu Jak2 und Stat5b homologen Proteine existieren. Die Abwesenheit von Stat5b-ähnlichen Transkriptionsfaktoren im Genom von *Arabidopsis thaliana* legte die Vermutung nahe, daß durch die Überexpression von Stat5b keine unerwünschten Eingriffe in die pflanzliche Genregulation erfolgen.

2.3.2 Transiente Expressionsstudien zur Funktionalität der Jak-Stat-Signaltransduktion im pflanzlichen System

Um bereits zu Beginn des Projekts rasch beurteilen zu können, ob die Signaltransduktionskomponenten, die für die Etablierung eines induzierbaren Expressionssystems vorgesehen waren, im pflanzlichen System funktionell exprimiert werden können, wurden transiente Expressionsstudien mit Hilfe von Protoplasten durchgeführt.

Dazu wurden Protoplasten aus Zellkulturen des *Nicotiana tabacum*-Kultivars *bright yellow-2* wie in Kapitel 2.2.27.1 beschrieben mit dem Reporterplasmid pTT-3 \times as-1-GUS/INT, sowie den beiden Effektorplasmiden pUCA7-mJak2 und pUCA7-Stat5b*VP16 in unterschied-

lichen Kombinationen transfiziert und die spezifischen Enzymaktivitäten der β -Glucuronidase gemessen.

Um die Spezifität der Aktivierung durch die Effektorplasmide zu zeigen, wurde das Kontrollplasmid pUC19-*as-1*-GUS zusammen mit den Effektorplasmiden eingesetzt. Der Promotor dieses Kontrollplasmids enthält ein einzelnes *as-1*-Element, das in Protoplasten eine konstitutive Aktivierung vermittelt. Damit diente es gleichzeitig als Positivkontrolle.

Das Plasmid pUCA7-TetR, das für die Expression des bakteriellen Tetracyclin-Repressors codiert, wurde als Plasmid zur Negativkontrolle eingesetzt, um unspezifische Effekte der Signaltransduktionskomponenten Jak2 und Stat5b*VP16 einschätzen zu können.

Die Klonierung der Plasmide erfolgte wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die Expressionskassetten der Plasmide pTT-3**as-1*-GUS/INT, pUCA7-mJak2 und pUCA7-Stat5b*VP16 sind mit ihren relevanten Regionen schematisch in Abbildung 59 bis Abbildung 61 dargestellt.

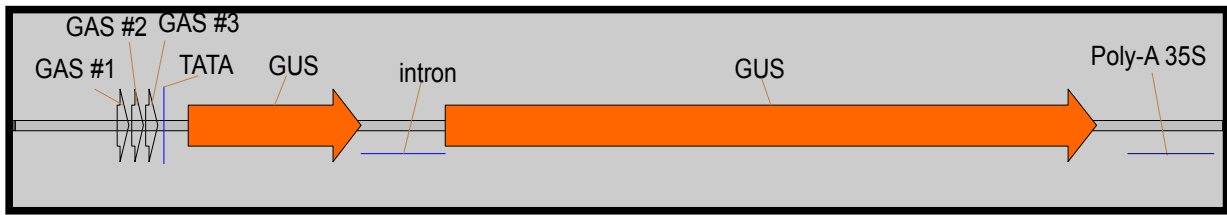


Abbildung 59: Expressionskassette des Reporterplasmids p3xGAS-TT-GUS/INT

Das pUC-Derivat p3xGAS-TT-GUS/INT enthält drei Kopien der Erkennungsstelle für Stat5b*VP16 (GAS-Elemente, offene Pfeile) oberhalb eines Minimalpromotors mit TATA-Box (TATA) und das β -Glucuronidasegen mit Intron als Reportergen (codierende Regionen in orangefarbener Markierung). Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem CaMV 35S-Gen.

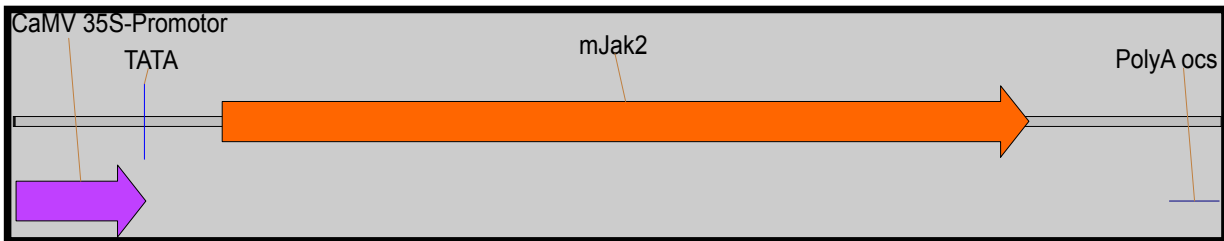


Abbildung 60: Expressionskassette des Plasmids pUCA7-mJak2

Das Plasmid pUCA7-mJak2 enthält das Jak2-Gen aus *Mus musculus* (codierende Region beginnend mit dem Translationsstart orange markiert) einschließlich der 5'-untranslatierten Region (285 bp) und der 3'-untranslatierten Region (547 bp), unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (Markierung in violett). TATA: TATA-Box. Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem Gen der Octopinsynthese aus *Agrobacterium tumefaciens*.

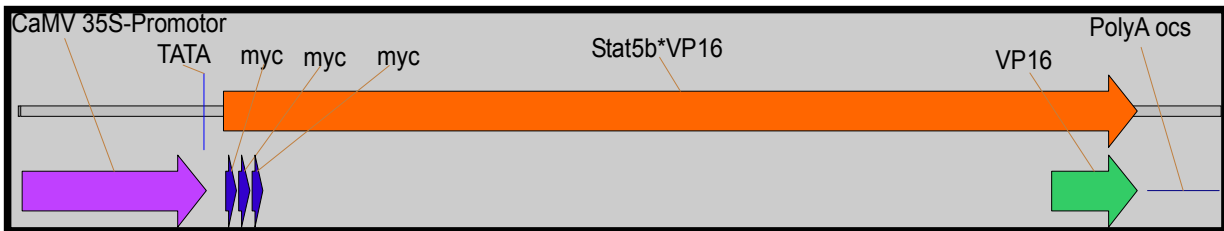


Abbildung 61: Expressionskassette des Effektorplasmids pUCA7-Stat5b*VP16

Das Plasmid pUCA7-Stat5b*VP16 enthält ein modifiziertes Stat5b-Gen aus *Mus musculus* (codierende Region beginnend mit dem Translationsstart orange markiert), dessen eigene Aktivierungsdomäne durch die stärkere Herper simplex VP16-Aktivierungsdomäne (grün markiert) ersetzt wurde und das mit drei myc-Tags (blau markiert) fusioniert wurde. Das Stat5b*VP16-Gen wurde zur starken Expression in Pflanzen unter die Kontrolle des CaMV 35S-Promotors gesetzt. TATA: TATA-Box. Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem Gen der Octopinsynthese aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Wie in Abbildung 62 dargestellt, ist die Aktivität der β -Glucuronidase in Protoplasten, die mit dem 3×GAS-GUS-Reporterplasmid alleine oder in Kombination mit dem für die Jak-Stat-Signaltransduktion irrelevanten Plasmid pUCA7-TetR sehr gering. Auch die Expression der Januskinase Jak2 mit dem Reporterplasmid führte zu keiner Aktivierung. Hingegen wird der 3×GAS-Promotor bei der gleichzeitigen Expression von Jak2 und Stat5b stimuliert und die Enzymaktivität der β -Glucuronidase steigt auf Werte, die ähnlich der Aktivität sind, die durch das in Protoplasten konstitutive *as-1*-Element vermittelt wird. Diese Aktivierung durch Jak2 in Abwesenheit eines Rezeptors entspricht dem Ergebnis, das aufgrund der Daten von Barahmand-Pour *et al.* (1998) zu erwarten gewesen wäre.

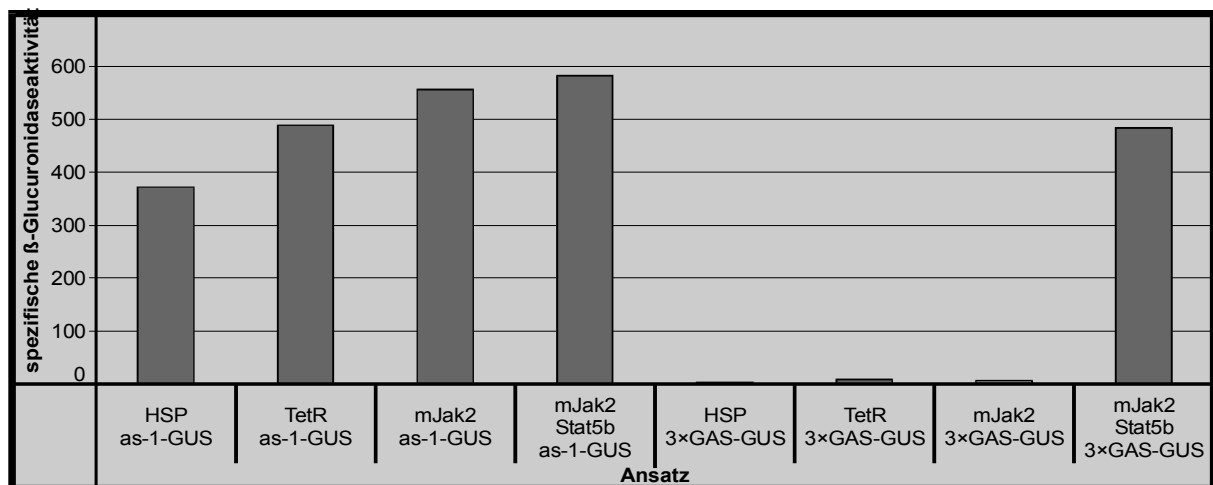


Abbildung 62: β -Glucuronidaseaktivität in einer transienten Expressionsstudie mit Protoplasten

Zur Prüfung der funktionellen Expression von Jak2 und Stat5b*VP16 in Pflanzenzellen wurden diese Proteine transient in *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten wie in Kapitel 2.2.27.1 exprimiert und die β -Glucuronidaseaktivität in Proteinextrakten der Protoplasten zwei Tage nach der Transfektion gemessen. Es wurden jeweils 20 μ g des Reporterplasmids bzw. der Positivkontrolle *as-1*-GUS und 50 μ g der Effektorplasmide und der Negativkontrolle TetR gemeinsam mit 100 μ g Heringssperma-DNA (HSP) eingesetzt.

Dieser Versuch zeigt dreierlei:

Erstens ist in Tabak kein Transkriptionsaktivator vorhanden, der unter den gegebenen Bedingungen eine Aktivierung der γ -Interferon-aktivierten Sequenz vermittelt.

Zweitens ist in Tabak keine Signaltransduktionskomponente vorhanden, die in Anwesenheit von Jak2 aktiviert wird und über die γ -Interferon-aktivierten Sequenz die Transkription stimuliert.

Drittens scheinen Jak2 und Stat5b in Tabak funktionell exprimiert werden zu können und über den bekannten Mechanismus der konstitutiven Aktivierung bei Überexpression von Jak die Transkription mittels der γ -Interferon-aktivierten Sequenz stimulieren zu können.

Da in diesem Versuch die Eigenschaften des 3×GAS-Promotors bei Expression von Stat5b ohne Jak2 nicht untersucht wurden, wurde ein weiteres Experiment vorgenommen.

Die Ergebnisse dieses Versuchs, dargestellt in Abbildung 63, zeigen, daß auch die Expression von Stat5b ohne Jak2 keine Aktivierung des GAS-Elements bewirkt. Weiterhin kann die Aktivierung des Reportergens nur durch GAS-Elemente in korrekter Orientierung erfol-

gen. Gegenüber dem ersten Versuch ist allerdings die Aktivierung der β -Glucuronidase in Gegenwart von Jak2 und Stat5b um ein Vielfaches geringer. Da dies auch für die Enzymaktivitäten gilt, die durch das *as-1*-Element vermittelt werden, ist anzunehmen, daß sich die geringere Expression beider Effektoren, Jak2 und Stat5b, stark auf die Aktivierung des GAS-Elements auswirkt.

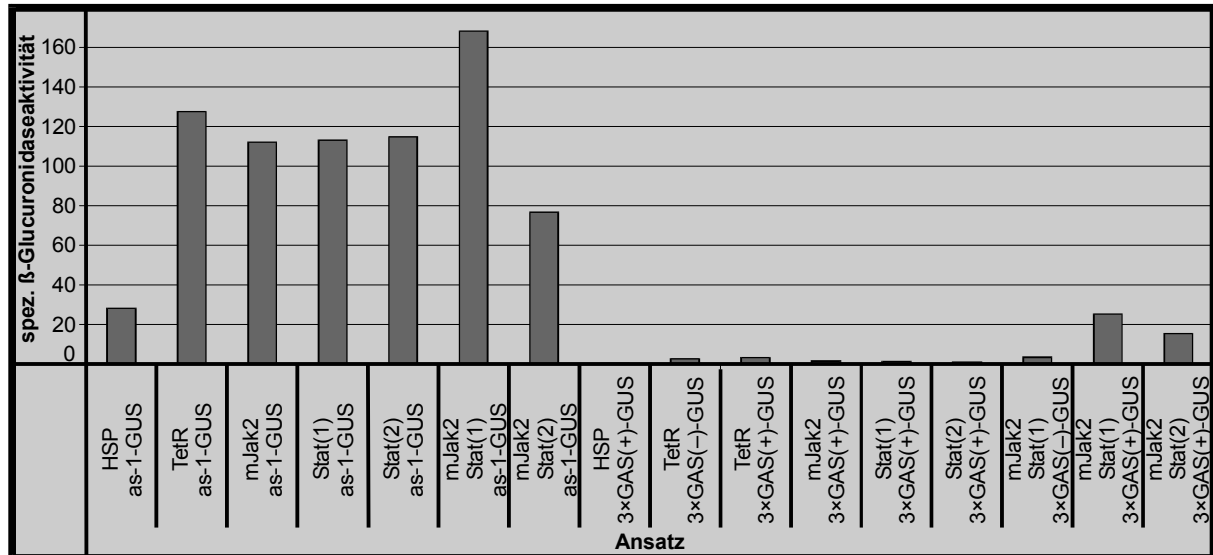


Abbildung 63: β -Glucuronidaseaktivität in einer transienten Expressionsstudie mit Protoplasten

Zur Prüfung der funktionellen Expression von Jak2 und Stat5b*VP16 in Pflanzenzellen wurden diese Proteine transient in *Nicotiana tabacum* BY-2-Protoplasten wie in Kapitel 2.2.27.1 exprimiert und die β -Glucuronidaseaktivität in Proteinextrakten der Protoplasten zwei Tage nach der Transfektion gemessen. Zur Kontrolle wurde neben einem Reporterplasmid mit dem 3xGAS-Promotor (GAS(+)) ein weiteres Plasmid eingesetzt, bei dem der 3xGAS-Promotor in reverser Orientierung vor das β -Glucuronidasegen kloniert worden war (GAS(-)). Es wurden jeweils 20 μ g des Reporterplasmids bzw. der Positivkontrolle *as-1*-GUS und 50 μ g der Effektorplasmide gemeinsam mit 100 μ g Heringssperma-DNA (HSP) eingesetzt.

Möglicherweise ist hat sich in diesem Versuch bereits teilweise der veränderte Status der BY-2-Zellkulturen bemerkbar gemacht, der in der Folge dazu geführt hat, daß in zahlreichen transienten Expressionsstudien keinerlei β -Glucuronidaseaktivität mehr gemessen werden konnte. Daher konnten keine Versuche mehr durchgeführt werden, bei denen die Funktion des Erythropoietinrezeptors untersucht wurde.

Mit den Ergebnissen der beschriebenen Versuche, konnte davon ausgegangen werden, daß die Signaltransduktionskette in Pflanzen funktionell ist. Daher wurde mit der stabilen Transformation von Tabakpflanzen fortgefahren.

2.3.3 Strategie zur Etablierung der Jak-Stat-Signaltransduktionskette in *Nicotiana tabacum*

Zur Transformation der drei Signaltransduktionsgene und des Reportergens in Tabak sollte so vorgegangen werden, daß zunächst das Reportergen gemeinsam mit dem Gen für den Transkriptionsfaktor Stat5b*VP16 transformiert wird. Als zweite Signaltransduktionskomponente sollte die Januskinase Jak2 folgen. Zum Abschluß sollte die Signaltransduktionskette durch Einkreuzen des Erythropoietinrezeptors vervollständigt werden. Ein Ablauf-

plan zur Etablierung der gesamten Signaltransduktionskette ist in Abbildung 64 schematisch dargestellt.

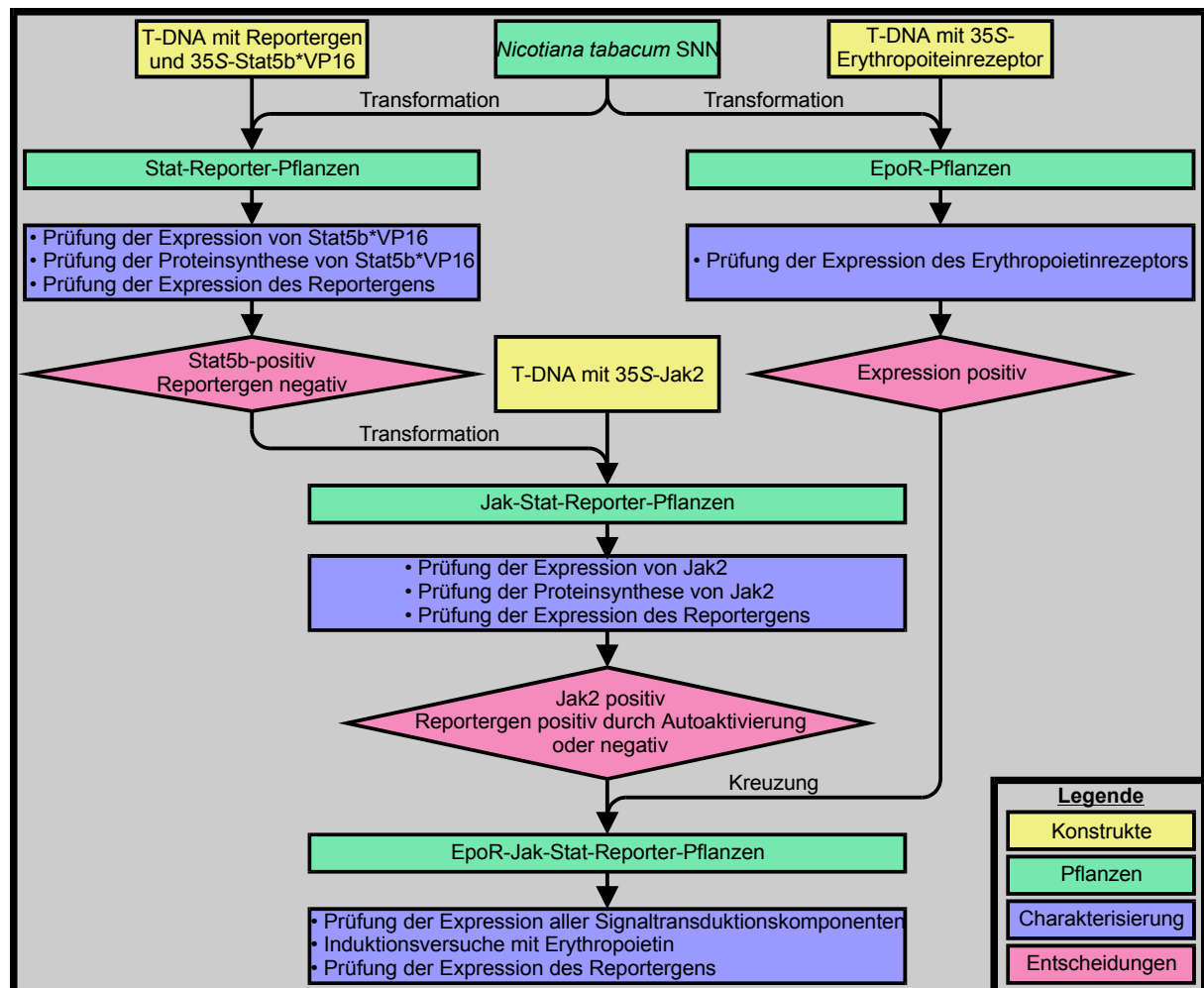


Abbildung 64: Ablaufplan zur Herstellung eines auf der Jak-Stat-Signaltransduktion basierenden induzierbaren Expressionssystems

Die Bedeutung der Farben ist in der Legende rechts unten dargestellt.

Dieses Vorgehen, die Signaltransduktionskette „von hinten nach vorne“ aufzubauen, ermöglichte es, die Auswirkungen der jeweils eingebrachten neuen Signaltransduktionskomponenten auf die Expression des Reportergens zu kontrollieren. So konnte anhand der ersten Transformanden von Stat5b*VP16 mit dem Reporter abermals kontrolliert werden, ob nicht doch eine ungewollte Transkription des Reportergens in Pflanzen auftritt.

Nach der Transformation der Januskinase sollte die nach den Ergebnissen von Barahmand-Pour *et al.* (1998) und den transienten Expressionsstudien (Kapitel 2.3.2) zu erwartende konstitutive Aktivierung der Signaltransduktionskette nachweisbar sein. Jedoch sollte der eingekreuzte Erythropoietinrezeptor im uninduzierten Zustand die überschüssigen Jak2-Proteine, die für die konstitutive Aktivierung verantwortlich sind, durch Bindung (siehe Kapitel 2.1.2) inaktivieren und somit diese Hintergrundaktivität reduzieren. Da bislang eine solche Wirkung des Erythropoietinrezeptors jedoch nicht nachgewiesen wurde, ist das Ergebnis dieses Versuchs offen, sodaß eine Hintergrundaktivität verbliebe.

Daher sollte, neben den konstitutiv aktiven transgenen Jak-Stat-Linien auch solche für die Kreuzung mit dem Erythropoietinrezeptor verwendet werden, bei denen aufgrund geringerer Jak2-Mengen keine Aktivität des Reportergens nachweisbar ist. Deren Kreuzungsprodukte hätten zwar vermutlich eine geringere Expressionsstärke, würden aber keine Hintergrundaktivität aufweisen und somit ein brauchbares Expressionssystem besitzen.

2.3.4 Transformation von *Nicotiana tabacum* mit einem 35S-Stat5b*VP16-Konstrukt und dem 6×GAS-GUS-Reporter

Um die Anzahl an Transformationen oder Kreuzungen möglichst gering zu halten, wurden das Reporterkonstrukt 6×GAS-TT-GUS/INT und die erste Signaltransduktionskomponente Stat5b*VP16 gemeinsam auf einer T-DNA vereinigt und wie in Kapitel 2.2.26 in Tabak transformiert. Dazu wurde das Plasmid pBIN6×GAS-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 über mehrere Schritte wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben konstruiert. Die T-DNA-Region dieses Plasmids ist mit allen relevanten Sequenzelementen in Abbildung 65 schematisch dargestellt.

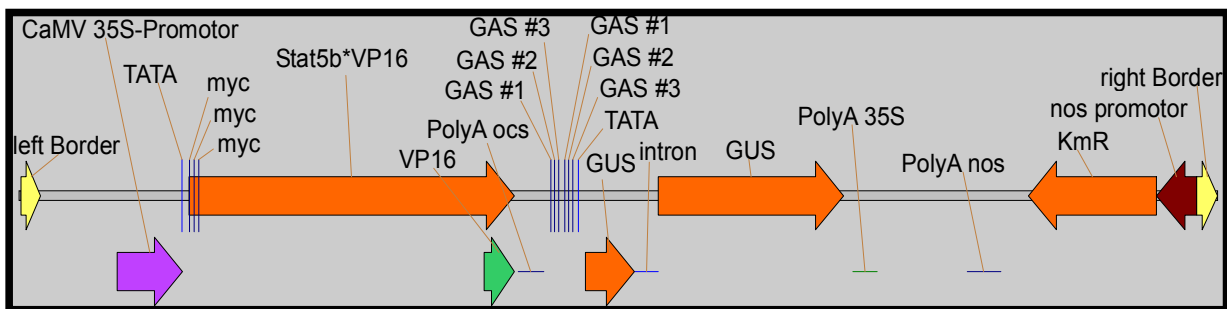


Abbildung 65: T-DNA-Region des Plasmids pBIN6×GAS-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 (pB6GGS)

Das pBIN19-Derivat pBIN6×GAS-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 (pB6GGS) enthält ein modifiziertes Stat5b-Gen, dessen eigene Transaktivierungsdomäne durch die Herpes simplex VP16-Aktivierungsdomäne (grün markiert) ersetzt wurde und das mit drei myc-Tags (blau markiert) fusioniert wurde, unter der Kontrolle des 35S-Promotors (violett markiert). Hinter dem Polyadenylierungssignal des *ocs*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* befindet sich das β -Glucuronidasegen mit Intron unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit 6 Kopien der Erkennungsstelle für Stat5b (GAS-Element). Die codierenden Sequenzen sind beginnend mit dem Transkriptionsstart orangefarben markiert. Die T-DNA besitzt eine Expressionskassette für die Kanamycinresistenz. Linke und rechte Signalsequenz der T-DNA sind gelb dargestellt. TATA: TATA-Box.

Wie Abbildung 66 zeigt, wiesen einige Linien eine hohe Expression von Stat5b*VP16-mRNA auf. Außerdem wurde eine Bande höheren Molekulargewichts detektiert (nicht gezeigt). Mit der β -Glucuronidasesonde wurden in den transgenen 6GGS-Linien zwei Transkripte nachgewiesen: Das kleinere, nur sehr schwach exprimierte Transkript entspricht der Größe nach dem Signal der β -Glucuronidase in den Positivkontrollen 35S-GUS und UF9-13. Das größere Transkript entsprach in seinem Molekulargewicht der bereits mit der Stat-Sonde hybridisierenden hochmolekularen Bande. Dies weist auf eine unvollständige Beendigung der Transkription durch das dem Stat5b-Gen folgende *ocs*-Polyadenylierungssignal hin, so daß ein langes Transkript mit Stat5b- und β -Glucuronidasesequenzen gebildet wurde. Die Menge dieses langen Transkripts betrug etwa 10 % der korrekt terminierten mRNA von Stat5b*VP16 (Daten nicht gezeigt).

Wie Erfahrungen in unserer Arbeitsgruppe bereits zeigten, ist die zusätzliche Transkription eines zweiten Gens aufgrund von unvollständiger Prozessierung am Polyadenylierungssignal kritisch zu sehen (Markus Kuhlmann, persönliche Mitteilung). Es liegen auch Berichte vor, bei denen nach der Aktivierung eines induzierbaren Transgens ein zweites, konstitutiv exprimiertes Gen wegen ungenügender Prozessierung am Polyadenylierungssignal inaktiviert wurde.

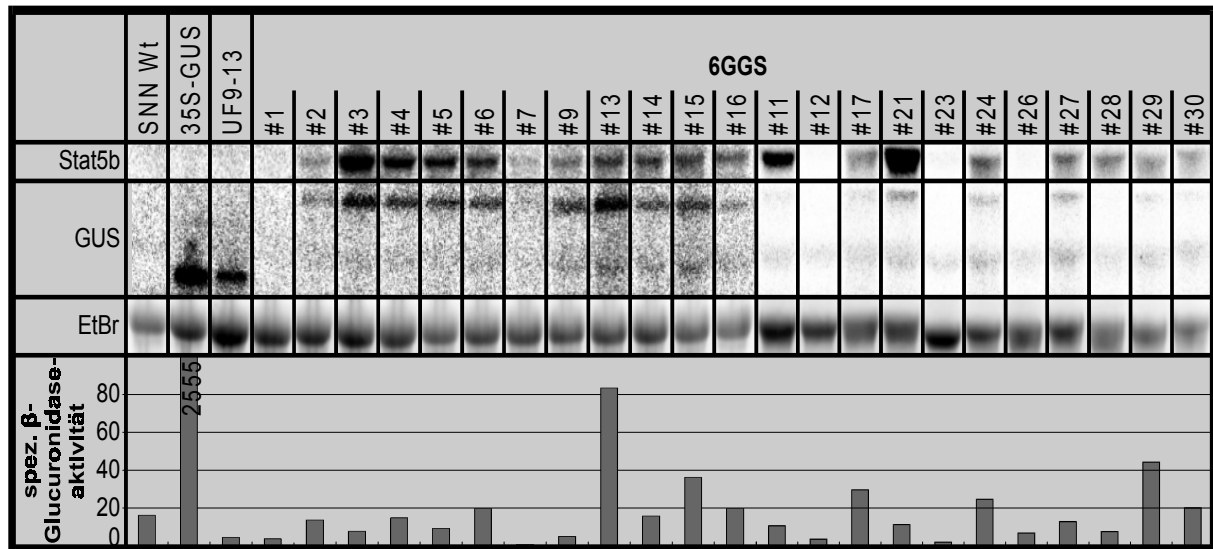


Abbildung 66: Analyse der 6GGS-Linien

Oberer Teil: Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien aus der Transformation mit dem Plasmid pB6GGS. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA der angegebenen Linien wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die mRNA von Stat5b und der β-Glucuronidase wurden durch aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wie in Kapitel 2.2.34 beschrieben nachgewiesen. EtBr: Ethidiumbromidbild der 28S rRNA

Unterer Teil: Quantitative Bestimmung der β-Glucuronidaseaktivität. 100 mg Blattmaterial derselben Pflanzen wurden geerntet und in Proteinextrakten dieser Proben die β-Glucuronidaseaktivität wie in Kapitel 2.2.31 beschrieben bestimmt.

SNN ist die Ausgangslinie für die Transformation. 35S-GUS wurde als Positivkontrolle aufgetragen. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β-Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert.

Die in Abbildung 66 gezeigten Messungen der β-Glucuronidaseaktivität wurden durchgeführt, um eine ungewollte Aktivierung des 6×GAS-Promotors durch die Anwesenheit von Stat5b*VP16 auszuschließen. Wie nach den Ergebnissen aus den transienten Expressionsstudien zu erwarten, traten in keiner der hier überprüften Linien β-Glucuronidaseaktivitäten auf, die auf ein solches Phänomen hinweisen.

Weiterhin wurde die Anwesenheit des Stat5b*VP16-Proteins mittels des am Protein vorhandenen dreifachen myc-Tags durch einen monoklonalen c-myc-Antikörper nachgewiesen. Wie in Abbildung 67 gezeigt, konnte durch den Antikörper eine starke Expression des mit dem myc-Tag versehenen, rechnerisch 95 kDa großen Stat5b*VP16-Proteins in den Linien #3, #4, #21 und #33 nachgewiesen werden; in den Linien #6 und #11 war die Expression schwächer und in allen anderen untersuchten Linien sehr schwach oder nicht nachweisbar. Auffällig ist ein etwa 10 kDa kleineres prominentes Abbauprodukt, das in nahezu ebenso hohen Konzentrationen wie das vollständige Stat5b*VP16-Protein ist.

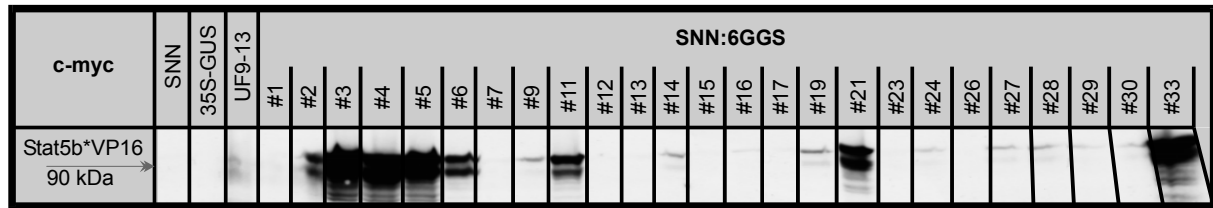


Abbildung 67: Nachweis des Stat5b*VP16-Proteins in 6GGS-Linien durch einen monoklonalen Antikörper gegen c-myc

Proteinexpressionsanalyse. Denaturierte Proteinextrakte aus jeweils 100 mg Blattmaterial der angegebenen transgenen Tabaklinien wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit 1:200 verdünntem monoklonalem c-myc-Antiserum über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zwei-stündiger Inkubation mit einem 1:15000 verdünnten Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat mit Hilfe des ECL-Systems durch 20-minütige Exposition auf einen Röntgenfilm. SNN ist die Ausgangslinie für die Transformation. 35S-GUS wurde als Negativkontrolle aufgetragen. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β -Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert und diente als Positivkontrolle.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Linien 6GGS#3, 6GGS#4 und 6GGS#21 weiter kultiviert, die anderen Linien wurden verworfen.

2.3.5 Transformation von *Nicotiana tabacum* 6GGS mit einem 35S-Jak2-Konstrukt

Für die Transformation der transgenen 6GGS-Linien #3, #4 und #21 mit Jak2 gemäß Kapitel 2.2.26 wurde das Plasmid pBINHygA7-mJak2 wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben konstruiert. Die T-DNA-Region dieses Plasmids ist mit allen relevanten Sequenzelementen in Abbildung 68 schematisch dargestellt. Zwischen dem Transkriptionsstart und dem Translationsstart des mJak2-Gens lag eine 285 bp lange untranslatierte Region, die im Anhang (Kapitel 3.3) abgebildet ist. Aus den Transformationen mit diesem Vektor ging eine große Anzahl an Sprossen hervor, von denen 30 jeder Transformation zu Pflanzen herangezogen wurden. Jeweils 23 dieser 6GGS-mJak2-Pflanzen wurden durch Nachweis der mRNA von mJak2 charakterisiert.

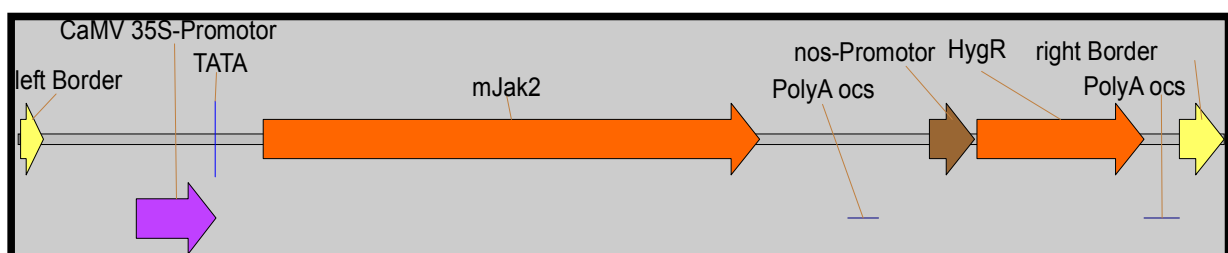


Abbildung 68: T-DNA-Region des Plasmids

Das pBINHygA7-Derivat pBINHygA7-mJak2 enthält das Gen für Jak2 aus *Mus musculus* (codierende Region beginnend mit dem Translationsstart orange markiert) einschließlich der 5'-untranslatierten Region (285 bp) und der 3'-untranslatierten Region (547 bp), unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (violett markiert). Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem Gen der Octopinsynthese aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die T-DNA besitzt eine Expressionskassette für die Hygromycinresistenz. Linke und rechte Signalsequenz der T-DNA sind gelb dargestellt. TATA: TATA-Box.

In Abbildung 69 sind beispielhaft die Ergebnisse von einigen 6GGS-mJak2-Pflanzen gezeigt. Bei der Hybridisierung mit einer mJak2-Sonde wurde ein undeutliches Signal detektiert, das sich über einen großen Bereich verschiedener Molekulargewichte erstreckte und teilweise niedermolekulare Banden erkennen ließ. Im Gegensatz dazu ergibt die Hybridisie-

rung mit der Stat5b-Sonde wohldefinierte Signale. Die Qualität der RNA-Präparation war daher gut, was auch durch das klare Abbild der rRNA in der Ethidiumbromidfärbung bestätigt wird. Diese Ergebnisse sind so zu interpretieren, daß eine Transkription des mJak2-Konstrukts stattfindet, die RNA aber nicht stabil ist.

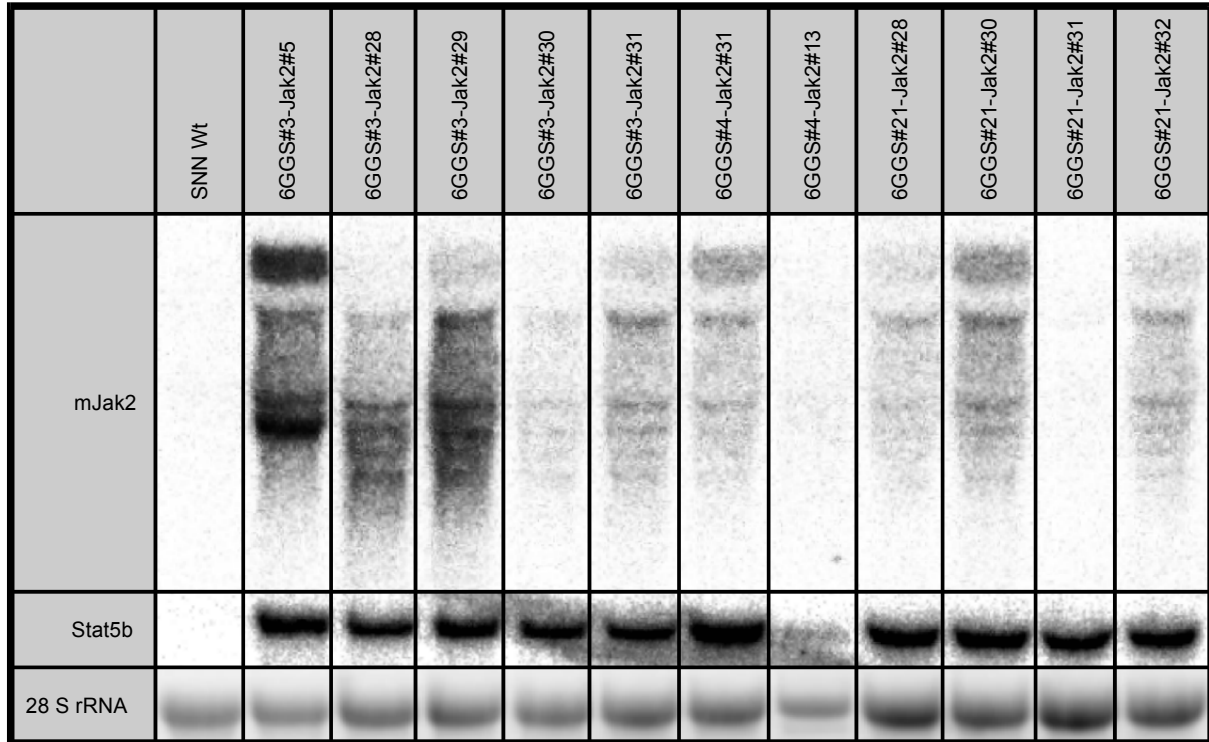


Abbildung 69: Expression des 35S-mJak2-Konstrukts in verschiedenen Tabak-6GGS-mJak2-Linien

Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien aus der Transformation von drei transgenen 6GGS-Linien mit dem Plasmid pBINHygA7-mJak2. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA von mJak2-Transformanten dreier transgener 6GGS-Linien wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und Übertragung auf Nylonmembran nacheinander mit radioaktiv markierten DNA-Sonden gegen mJak2 und Stat5b hybridisiert. Als Ladekontrolle ist das Ethidiumbromidbild der 28S-rRNA aufgetragen. RNA des Wildtyps SNN wurde als Negativkontrolle aufgetragen.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen mJak2 wurde analysiert, ob trotz der Instabilität der mJak2-mRNA eine Translation und Produktion des mJak2-Proteins erfolgte. Dazu wurden denaturierte Proteinextrakte 31 Transformanten der Linie 6GGS#3, 27 Transformanten der Linie 6GGS#4 und 29 Transformanten der Linie 6GGS#21 gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrocellulosemembran übertragen und diese Membranen mit dem mJak2-Antikörper behandelt.

In Abbildung 70 ist der Molekulargewichtsbereich dargestellt, in dem das rechnerisch 121 kDa große mJak2-Protein zu erwarten wäre. Abgesehen von den auch im untransformierten Wildtyp auftretenden Hintergrundbanden konnte durch den Antikörper kein Jak2-Protein nachgewiesen werden. Eine Synthese der Januskinasen fand also offensichtlich nicht statt.

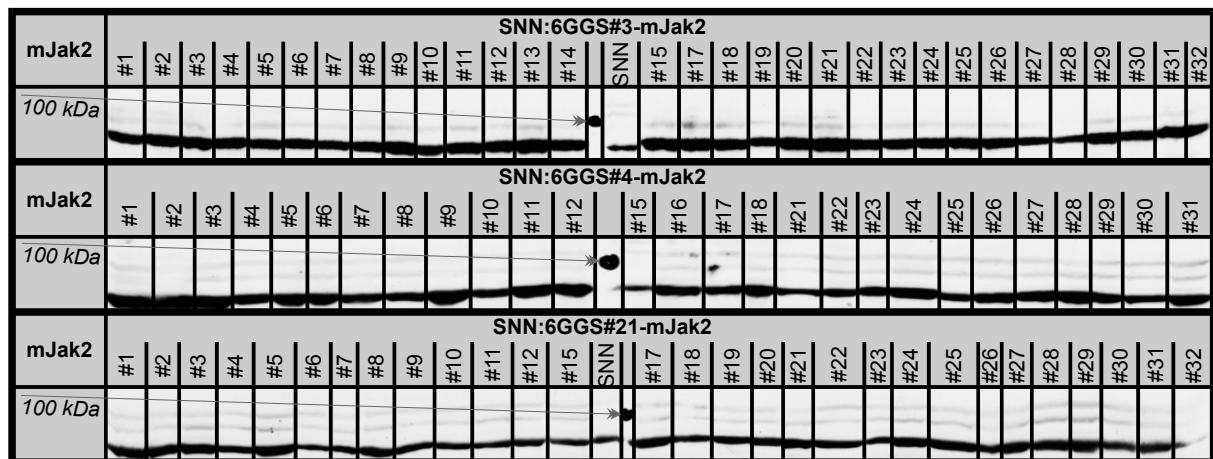


Abbildung 70: Versuch zum Nachweis des mJak2-Proteins durch einen polyklonalen Antikörper gegen mJak2

Denaturierte Proteinextrakte aus jeweils 100 mg Blattmaterial der angegebenen transgenen Tabaklinien wurden durch Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit 1:750 verdünntem polyklonalem mJak2-Antiserum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zweistündiger Inkubation mit einem 1:5000 verdünnten Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat mit Hilfe des ECL-Systems durch 30-minütige Exposition auf einen Röntgenfilm.

2.3.6 Transiente Expressionsstudien zur Verbesserung der Expression von mJak2

Zur Verbesserung der Stabilität der mRNA und der Translation von mJak2 mußte das mJak2-Gen modifiziert werden. Dazu kamen zwei Maßnahmen in Betracht:

Erstens die Verkürzung der langen untranslatierten Regionen zwischen dem codierenden Bereich von mJak2 und dem Promotor beziehungsweise Terminator. Da die Stabilität der mRNA auch durch ihre Translationseffizienz bestimmt wird, sollte dies dazu dienen, das Auffinden des Start-Codons durch die Ribosomen zu erleichtern und so die Effizienz der Translationsinitiation zu steigern.

Zweitens die Optimierung der Codons für das pflanzliche System. Wegen der Größe des codierenden Bereichs von 3138 bp und des daraus resultierenden Aufwands zur Codonoptimierung wurde von der letzteren Möglichkeit abgesehen.

Um die Wirksamkeit der Verkürzung der untranslatierten Regionen in transienten Expressionsstudien testen zu können, wurden die Plasmide pRT106-mJak2tausch und pUCA7-mJak2tausch wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben kloniert. Diese Konstrukte unterscheiden sich im wesentlichen in der Länge der 5'-untranslatierten Region. Sie beträgt im Plasmid pRT106-mJak2tausch 76 bp und im Plasmid pUCA7-mJak2tausch 16 bp. Die Expressionskassetten dieser Plasmide sind mit ihren relevanten Sequenzelementen in Abbildung 71 und Abbildung 72 schematisch dargestellt. Die untranslatierten Regionen sind im Anhang (Kapitel 3.3) abgebildet.

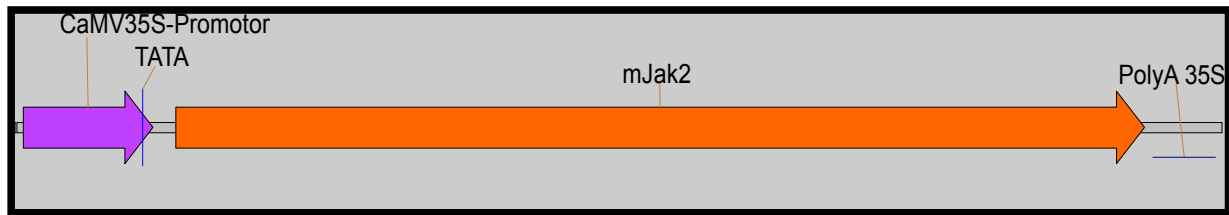


Abbildung 71: Expressionskassette des Plasmids pRT606-mJak2tausch

Das pRT-Derivat pRT606-mJak2tausch enthält zwischen dem CaMV 35S-Promotor (violett markiert) und der codierenden Region des Jak2-Gens aus *Mus musculus* (beginnend mit dem Translationsstart orange markiert) eine 76 bp lange untranslatierte Region. TATA: TATA-Box. Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem CaMV 35S-Gen.

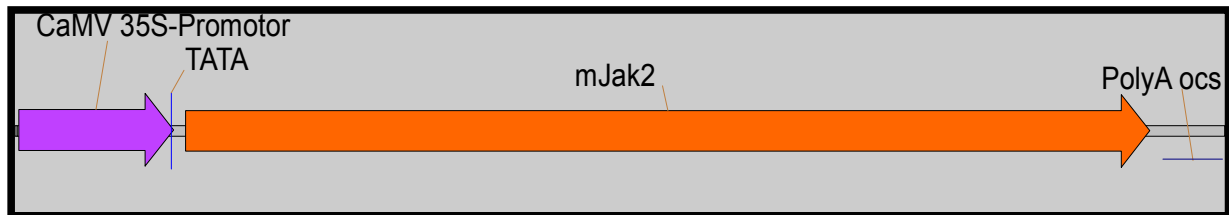


Abbildung 72: Expressionskassette des Plasmids pUCA7-mJak2tausch

Das Plasmid pUCA7-mJak2 enthält zwischen dem CaMV 35S-Promotor (violett markiert) und der codierenden Region des Jak2-Gens aus *Mus musculus* (beginnend mit dem Translationsstart orange markiert) eine 16 bp lange untranslatierte Region. TATA: TATA-Box. Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem Gen der Octopinsynthese aus *Agrobacterium tumefaciens*.

2.3.6.1 Ergebnisse zur Stabilität und Funktionalität der verbesserten Jak2-Konstrukte

Zunächst sollte in transienten Expressionsstudien überprüft werden, ob die Verkürzung der untranslatierten Regionen zu einer verbesserten Stabilität der Jak2-mRNA und damit zu einer optimierten Funktionalität geführt hatte. Dazu wurden die Plasmide pRT106-mJak2tausch und pUCA7-mJak2tausch in transienten Expressionsstudien gemäß Kapitel 2.2.27.2 mit Tabak-Mesophyllprotoplasten aus der transgenen Linie 6GGS#21, die bereits das Stat-Reporter-Konstrukt enthielt, eingesetzt. Zusätzlich zu der üblichen Quantifizierung der β -Glucuronidaseaktivität folgte eine Analyse der mRNA. Zum Vergleich wurde mRNA aus stabil transformierten Pflanzen mit dem zuvor hergestellten Jak2-Konstrukt mit den langen untranslatierten Bereichen herangezogen. Als Ausgangsmaterial für die Gewinnung der Protoplasten dienten transgene Pflanzen der Linie 6GGS#21.

Wie Abbildung 73 zeigt, war das ursprüngliche mJak2-Konstrukt mit dem 296 bp langen untranslatierten Bereich sowohl in der stabil transformierten Situation als auch in Mesophyllprotoplasten instabil und resultierte in der Produktion großer Mengen an Abbauprodukten.

Demgegenüber war das kleinere Transkript des Vektors pRT106-mJak2tausch durch das Auftreten einer deutlicheren Bande gekennzeichnet; dennoch war auch hier ein Abbau erkennbar. Eine Transkription der β -Glucuronidase war nur sehr schwach sichtbar.

Bei transienter Transformation mit dem Vektor pUCA7-mJak2tausch, der den kürzesten untranslatierten Bereich besaß, konnte keinerlei mJak2-Transkript nachgewiesen werden. Interessanterweise fand aber in diesen Protoplasten die Transkription der β -Glucuronidase statt, wie dies bei Anwesenheit von funktionellem mJak2-Protein durch Autoaktivierung zu erwarten gewesen wäre (Barahmand-Pour *et al.*, 1998). Das Signal erreichte etwa die Stärke wie das des langen Transkripts, das vom 35S-Promotor des Stat5b*VP16-Konstrukts ausging, und lag damit bei etwa 10% der Stärke des 35S-Promotors (siehe Kapitel 2.3.4). Dies korreliert mit den Ergebnissen der β -Glucuronidaseaktivität aus Kapitel 2.3.2.

Um die Expression der β -Glucuronidase auf Proteinebene zu reproduzieren, wurde dieser Versuch wiederholt. Diesmal wurden jedoch die β -Glucuronidaseaktivitäten gemessen.

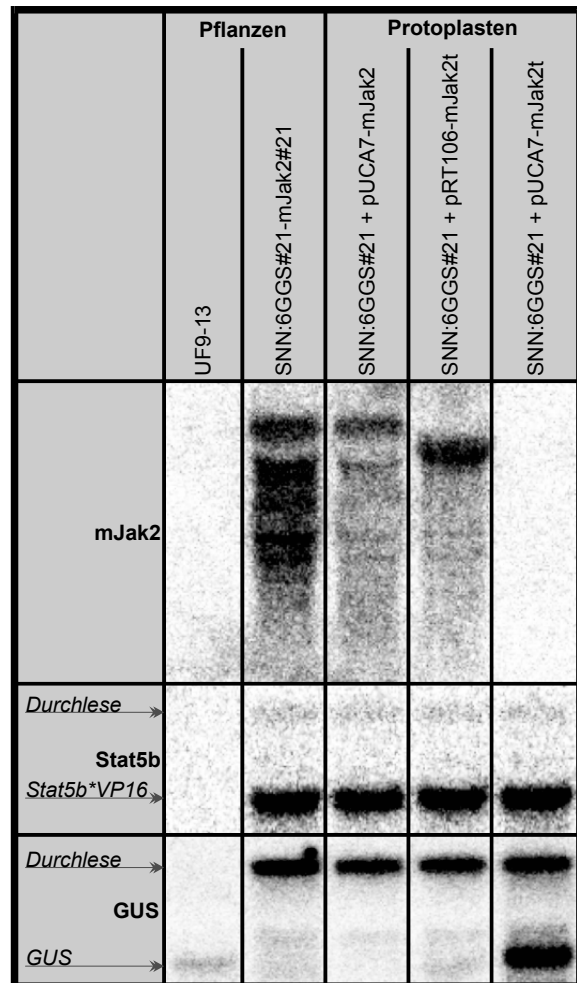


Abbildung 73: Transkriptionsanalyse von transient transformierten Tabakprotoplasten

Transkriptionsanalyse. Protoplasten aus Blattmesophyllgewebe der transgenen Linie 6GGS#21 wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und nach zweitägiger Inkubation Gesamt-RNA extrahiert. Zur Kontrolle wurde Gesamt-RNA-Extrakte aus Pflanzen der transgenen Tabaklinien UF9-13 und SNN:6GGS#21-mJak2#21 verwandt. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β -Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert. Jeweils 20 μ g der RNA wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die mRNA von mJak2, Stat5b und der β -Glucuronidase wurde durch aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden nachgewiesen.

Wie in Abbildung 74 dargestellt, waren die β -Glucuronidaseaktivitäten bei beiden mit mJak2-Effektorplasmiden transformierten Ansätzen gegenüber der Kontrolle, die mit einem für GFP codierenden Plasmid transformiert worden war, erhöht. Bei pRT106-mJak2tausch betrug die Induktion etwa das 2,5-fache, bei pUCA7-mJak2tausch etwa das fünffache der Negativkontrolle. Damit war die Funktionalität des Konstrukts mit der kürzeren untranslatierten Region besser. Allerdings war die durch den 6 \times GAS-Promotor vermittelte β -Glucuronidaseaktivität gegenüber der Positivkontrolle, die mit dem Plasmid pUCA7Tx-GUS transformiert worden war, gering und erreichte bei Transformation mit dem Plasmid pUCA7-mJak2tausch nur etwa 12% der durch den Tx-Promotor (ein modifizierter CaMV 35S-Promotor) vermittelten Aktivität.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Expressionskassette des Vektors pUCA7-mJak2tausch für die Herstellung von transgenen Pflanzen verwendet.

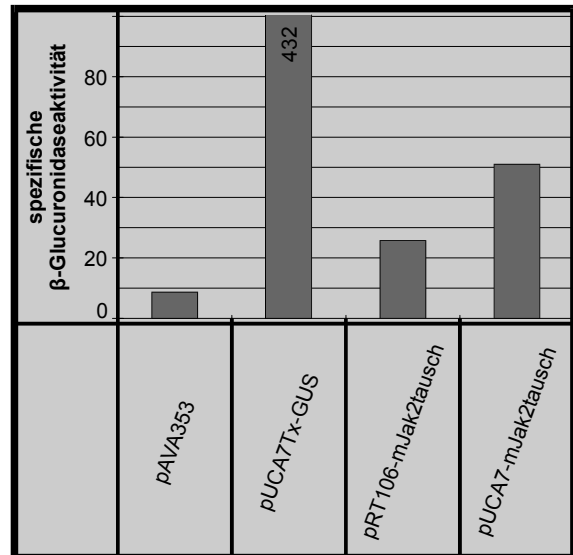


Abbildung 74: Expressionsstudie zur Funktionalität der verbesserten Jak2-Konstrukte

Mesophyllprotoplasten der transgenen Tabalinie 6GGS#21 wurden mit den angegebenen Plasmiden transfiziert und die β -Glucuronidaseaktivitäten in Proteinextrakten bestimmt. Das Plasmid pAVA353 enthält ein 35S-GFP-Konstrukt und wurde als Negativkontrolle verwendet. Das Plasmid pUCA7Tx-GUS enthält ein β -Glucuronidasegen unter der Kontrolle eines modifizierten 35S-Promotors. Es wurden jeweils 5 μ g Plasmid eingesetzt.

2.3.7 Transformation von *Nicotiana tabacum* 6GGS mit einem verbesserten 35S-Jak2-Konstrukt

Zur Transformation der transgenen Tabaklinien 6GGS#3 und 6GGS#21 mit dem verbesserten mJak2-Gen gemäß Kapitel 2.2.26 wurde das Plasmid pBINHygA7-mJak2tausch wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben kloniert. Die relevanten Sequenzelemente der T-DNA-Region sind in Abbildung 76 schematisch dargestellt.

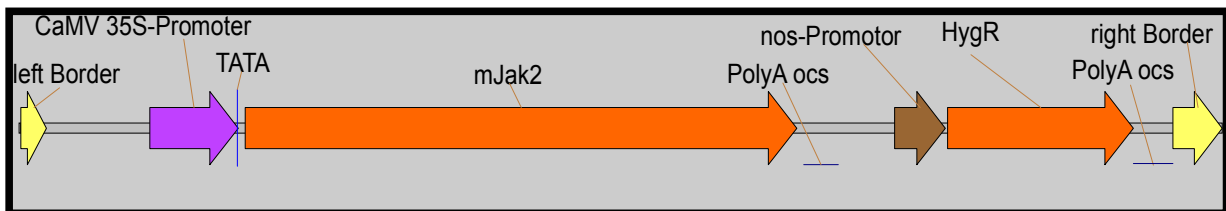


Abbildung 76: T-DNA-Region des Plasmids pBINHygA7-mJak2tausch

Das pBINHygA7-Derivat pBINHygA7-mJak2 enthält zwischen dem CaMV 35S-Promotors (violett markiert) und der codierenden Region des Jak2 Gens aus *Mus musculus* (beginnend mit dem Translationsstart orange markiert) eine 16 bp lange untranslatierte Region. Das Polyadenylierungssignal (PolyA) stammt aus dem Gen der Octopinsynthase aus *Agrobacterium tumefaciens*. Die T-DNA besitzt eine Expressionskassette für die Hygromycinresistenz. Linke und rechte Signalsequenz der T-DNA sind gelb dargestellt. TATA: TATA-Box.

Zur Überprüfung der Funktion dieses mJak2-Konstrukts wurden an einigen der bei der Transformation entstandenen Calli histochemische Färbungen zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität vorgenommen. In etwa 10% der Calli trat eine Färbung auf, die auf eine Aktivierung des 6 \times GAS-Promotors hinwies. Ein Beispiel ist in Abbildung 75 dargestellt. Generell war die Färbeintensität in den Calli niemals sehr stark.

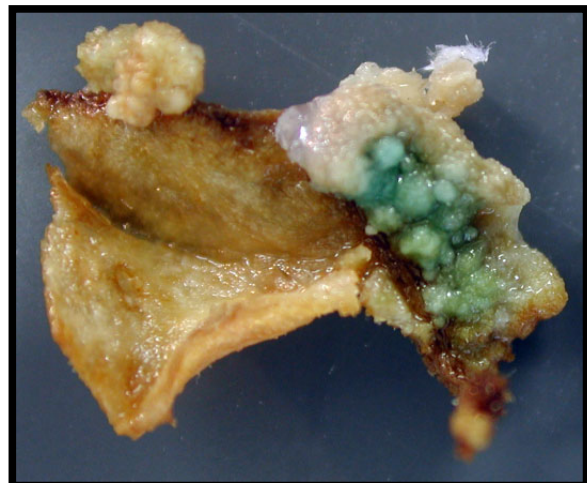


Abbildung 75: β -Glucuronidaseaktivität in Calli aus der Blattscheibentransformation von SNN:6GGS mit pBINHygA7-mJak2tausch

Die Calli wurden wie in Kapitel 2.2.30 beschrieben zur histochemischen Färbung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Chlorophyll wurde anschließend durch mehrfaches Waschen in Ethanol entfernt.

Zu einem späteren Stadium der Transformation wurden Calli und die daraus gewachsenen Sprosse in einer histochemischen Färbung miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, daß in Sprossen, die aus Calli mit β -Glucuronidaseaktivität gewachsen waren, keine Färbung auftrat (Beispiel in Abbildung 77). Offensichtlich erlaubte der physiologische Allgemeinzustand der Pflanzenzellen in Calli eine Aktivierung der Signaltransduktion ähnlich des Mechanismus, der von Barahmand-Pour *et al.*, (1998) in Hefezellen beschrieben worden war, während dies in Sprossen nicht der Fall war. Auch könnte die Stabilität der RNA in Sprossen geringer sein als in Calli.

Von weiteren Calli wurde Gesamt-RNA extrahiert und die Expression und Stabilität der mJak2-mRNA überprüft. Wie in Abbildung 78 dargestellt, ist die mJak2-mRNA in der Mehrzahl der hoch exprimierenden Linien stabiler als bei der vergleichbaren Probe aus einer



Abbildung 77: Vergleich der histochemischen Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in Sproß (oben) und Callus (unten) der transgenen Linie 6GGS#21-mJak2tausch#62

Die Calli wurden wie in Kapitel 2.2.30 beschrieben zur histochemischen Färbung über Nacht bei 37 °C inkubiert. Das Chlorophyll wurde anschließend durch mehrfaches Waschen in Ethanol entfernt.

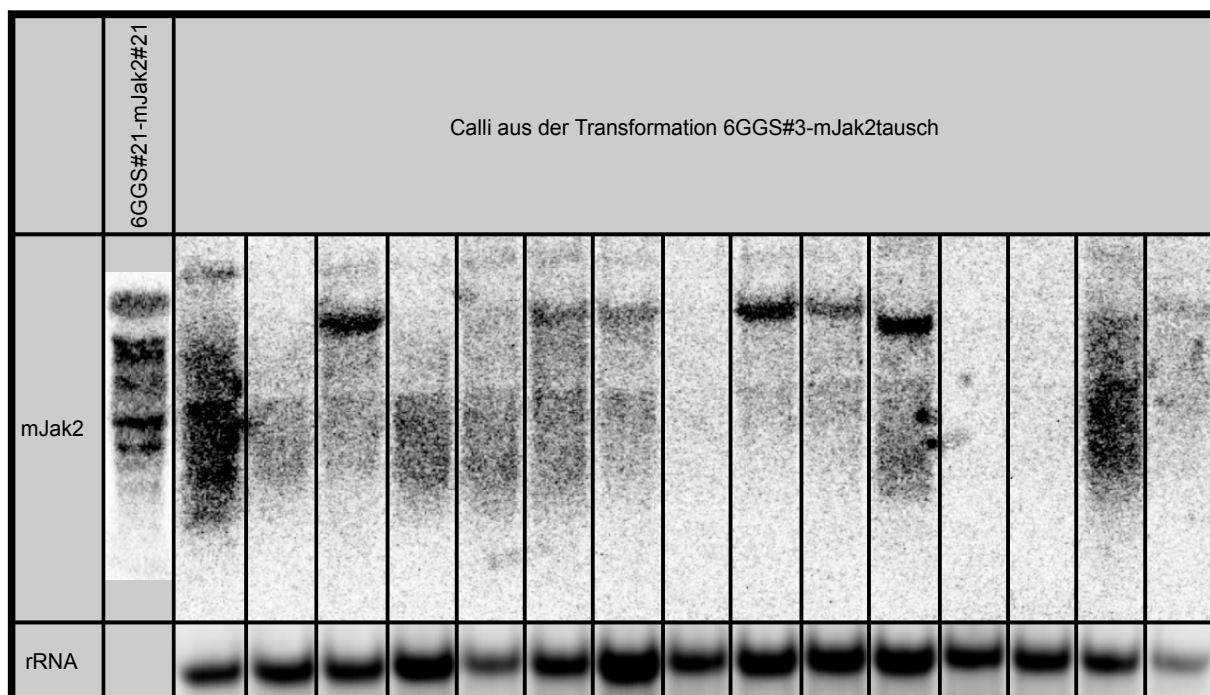


Abbildung 78: Verbesserte Stabilität der mRNA von mJak2 in transgenen Calli mit dem mJak2tausch-Konstrukt

Transkriptionsanalysen. Jeweils 16 μ g Gesamt-RNA aus unabhängig gewachsenen Calli der Transformation der transgenen Tabakinie 6GGS#3 mit dem Plasmid pBINHygA7-mJak2tausch wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im denaturierenden Agarosegel auf eine Nylonmembran übertragen. Die mRNA von mJak2 wurde durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde nachgewiesen. Zum Vergleich ist ein typisches Beispiel des ursprünglichen Jak2-Konstrukts mit den 285 bp (3') bzw. 547 bp (5') langen untranslatierten Regionen dargestellt (6GGS#21-mJak2#21).

transgenen Pflanze mit dem ursprünglichen Konstrukt. Dennoch findet auch hier ein Abbau der mRNA statt, wie er in ähnlicher Weise bereits bei den mit pRT106-mJak2tausch transfizierten Mesophyllprotoplasten beobachtet wurde (Kapitel 2.3.6.1). Darüber hinaus ist der Abbau — unabhängig von der Menge an stabilem Transkript — in verschiedenen transgenen Linien unterschiedlich stark.

Von den aus den Transformationen von 6GGS#3 und 6GGS#21 hervorgegangenen Sprossen wurden jeweils 34 durch Expressionsanalysen charakterisiert. Jeweils 17 Linien sind in Abbildung 79 dargestellt. Die mRNA-Mengen von Jak2 waren in den höchstexprimierenden mJak2tausch-Linien höher als in den transgenen Jak2-Linien mit dem ursprünglichen Konstrukt, die in diesem Versuch kaum nachweisbar waren. Bei den höchstexprimierenden Linien trat eine Bande oberhalb der der stärksten Bande auf, die als unkorrekt prozessiertes Transkript interpretiert wurde. Wie bereits in den Expressionsanalysen an Calli festgestellt, war auch hier ein gewisser Abbau der mJak2-mRNA sichtbar.

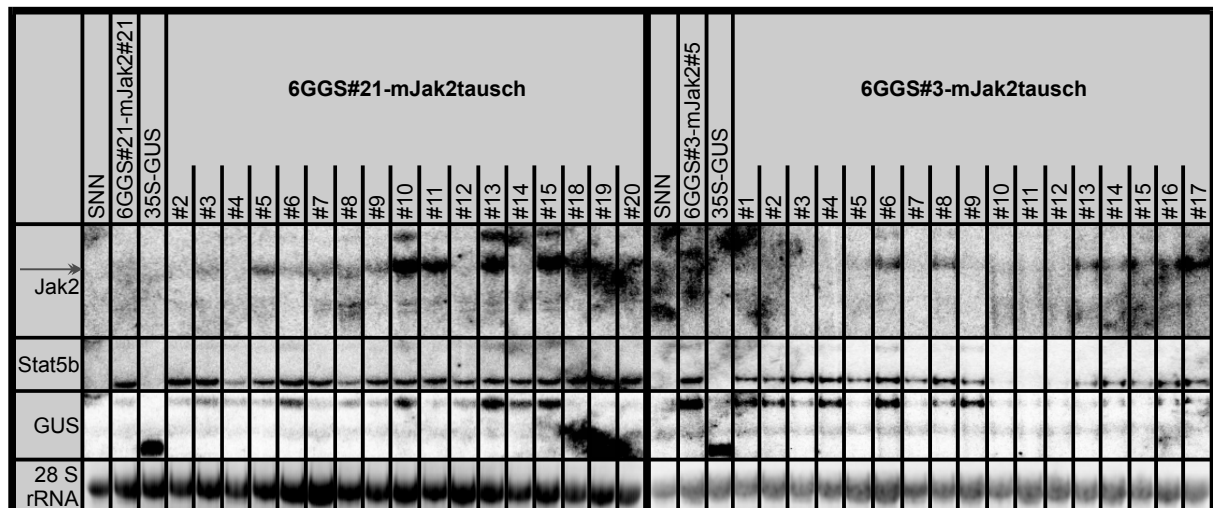


Abbildung 79: Expression des 35S-mJak2tausch-Konstrukts in verschiedenen Tabak-6GGS-mJak2tausch-Linien

Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien aus der Transformation von zwei transgenen 6GGS-Linien mit dem Plasmid pBINHygA7-mJak2tausch. Jeweils 6 µg Gesamt-RNA von mJak2-Transformanten zweier transgener 6GGS-Linien wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und Übertragung auf Nylonmembran nacheinander mit radioaktiv markierten DNA-Sonden gegen mJak2, Stat5b und der β -Glucuronidase hybridisiert. Als Ladekontrolle ist das Ethidiumbromidbild der 28S-rRNA dargestellt. RNA von SNN-Wildtyppflanzen ist als Negativkontrolle aufgetragen, 6GGS#21-mJak2 ist zum Vergleich mit dem ursprünglichen Jak2-Konstrukt aufgetragen. 35S-GUS dient als Positivkontrolle für die Expression der β -Glucuronidase.

Es wurde daher in einem Nachweis mit Hilfe von Antikörpern analysiert, ob das Jak2-Protein trotz der noch immer vorhandenen Instabilität der mRNA in detektierbaren Mengen gebildet wurde.

In Abbildung 80 ist gezeigt, daß bei einer Linie mit dem mJak2tausch-Konstrukt eine verstärkte Bande im Bereich des Molekulargewichts von mJak2 (117 kDa) durch den mJak2-Antikörper detektiert wurde. Unterhalb dieser Bande traten weitere geringeren Molekulargewichts auf, die als Abbaubanden interpretiert wurden. Bei dieser Linie konnte keine β -Glucuronidaseaktivität in den Blättern durch histochemische Färbung nachgewiesen werden (ohne Abbildung).

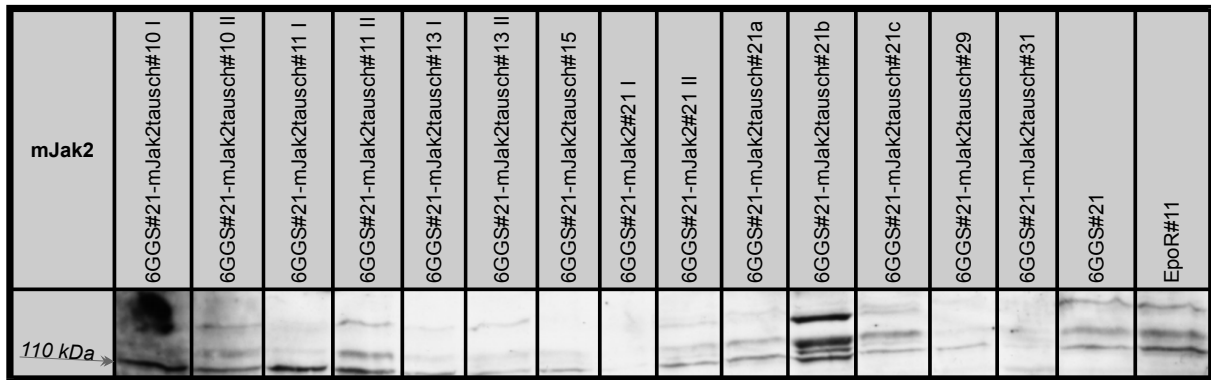


Abbildung 80: Nachweis des mJak2-Proteins in einer transgenen Linie mit dem mJak2tausch-Konstrukt

Denaturierte Proteinextrakte aus jeweils 100 mg Blattmaterial der angegebenen transgenen Tabaklinien wurden durch Gelelektrophorese fraktioniert und nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit 1:750 verdünntem polyklonalem mJak2-Antiserum über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zweistündiger Inkubation mit einem 1:5000 verdünnten Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat mit Hilfe des ECL-Plus-Systems durch 20-minütige Exposition auf einen Röntgenfilm. I und II: Parallelproben aus derselben Linie. a, b, c: verschiedene Sprosse aus einem Callus.

Da wie in Kapitel 2.3.3 dargelegt auch Pflanzen mit niedriger Jak2-Expression, die keine konstitutive Aktivierung aufweisen, erfolgversprechend sind, wurde die transgene Tabaklinie SNN:6GGS#21-mJak2tausch#21b trotz der fehlenden Aktivierung des 6×GAS-GUS-Promotors für die Kreuzung mit transgenen EpoR-Linien eingesetzt.

2.3.8 Transformation von *Nicotiana tabacum* mit dem Erythropoietinrezeptor

Für die Transformation von *Nicotiana tabacum* SNN mit dem Erythropoietinrezeptor gemäß Kapitel 2.2.26 wurde das Plasmid pBINA7-EpoR wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben konstruiert. Die T-DNA ist mit ihren relevanten Sequenzelementen in Abbildung 81 schematisch dargestellt. Aus dieser Transformation ging eine große Anzahl an Sprossen hervor, von denen 30 zu Pflanzen herangezogen wurden. 27 dieser EpoR-Pflanzen wurden durch Nachweis der mRNA des Erythropoietinrezeptors charakterisiert.

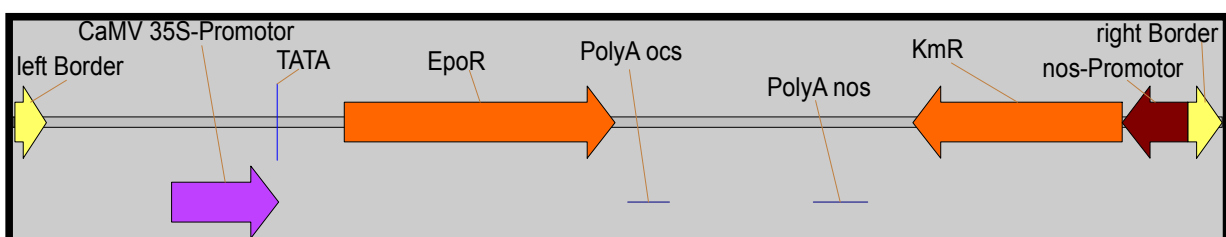


Abbildung 81: T-DNA-Region des Plasmids pBINA7-EpoR

Der binäre Vektor pBINA7-EpoR, ein pBIN19-Derivat, enthält das Gen für den Erythropoietinrezeptor (codierende Region beginnend mit dem Translationsstart in orangefarbener Markierung) unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors (Markierung in violett) in der T-DNA-Region des binären Vektors pBIN19. Die T-DNA besitzt eine Expressionskassette für die Kanamycinresistenz. Linke und rechte Signalsequenz der T-DNA sind in gelb dargestellt. TATA: Transkriptionssignal.

Wie Abbildung 82 zeigt, weisen die meisten transgenen Pflanzen eine sehr hohe Expression der EpoR-mRNA auf. Die höchstexprimierenden Linien #11, #14, #22 und #26 wurden weiter kultiviert, die restlichen verworfen.

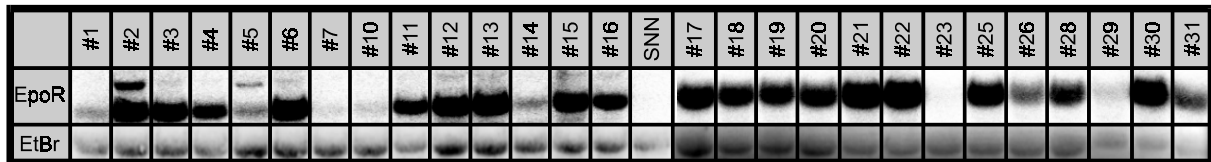


Abbildung 82: Prüfung von EpoR-Transformanten auf Expression der mRNA des Erythropoietinrezeptors

Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien. Jeweils 12 µg Gesamt-RNA der angegebenen Linien wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die EpoR-mRNA wie in Kapitel 2.2.34 beschrieben durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen. EpoR: Erythropoietinrezeptor. EtBr: Ethidiumbromidbild der 28S rRNA.

2.3.9 Kreuzung der 6GGS-Jak2t-Pflanzen mit den EpoR-Pflanzen

Zur Vereinigung aller Signaltransduktionskomponenten mußten transgene EpoR-Pflanzen mit den 6×GAS-GUS-Stat5b*VP16-Pflanzen gekreuzt werden. Dazu wurde Pollen der transgenen Linie 6GGS#21-mJak2#21b auf Narben von emaskulierten Blüten der Linie EpoR#11 übertragen. Die aus den gekreuzten Blüten hervorgegangenen Samen wurden geerntet und nach Oberflächensterilisation (Kapitel 2.2.3) auf 2MS-Agar mit Kanamycin und Hygromycin ausgesät. Zwölf der überlebenden Pflanzen wurden auf 2MS-Agar mit Kanamycin und Hygromycin vereinzelt. An diesen wurde eine Analyse der Transkription von EpoR, mJak2, Stat5b*VP16 und der β-Glucuronidase vorgenommen.

Wie in Abbildung 83 gezeigt, konnte die Expression von EpoR und mJak2 in allen gekreuzten Linien nachgewiesen werden, die mRNA von Stat5b*VP16 fehlte in den Linien 9, 10 und 12. Eine spontane Transkription der β-Glucuronidase konnte in keiner der untersuchten Linien nachgewiesen werden.

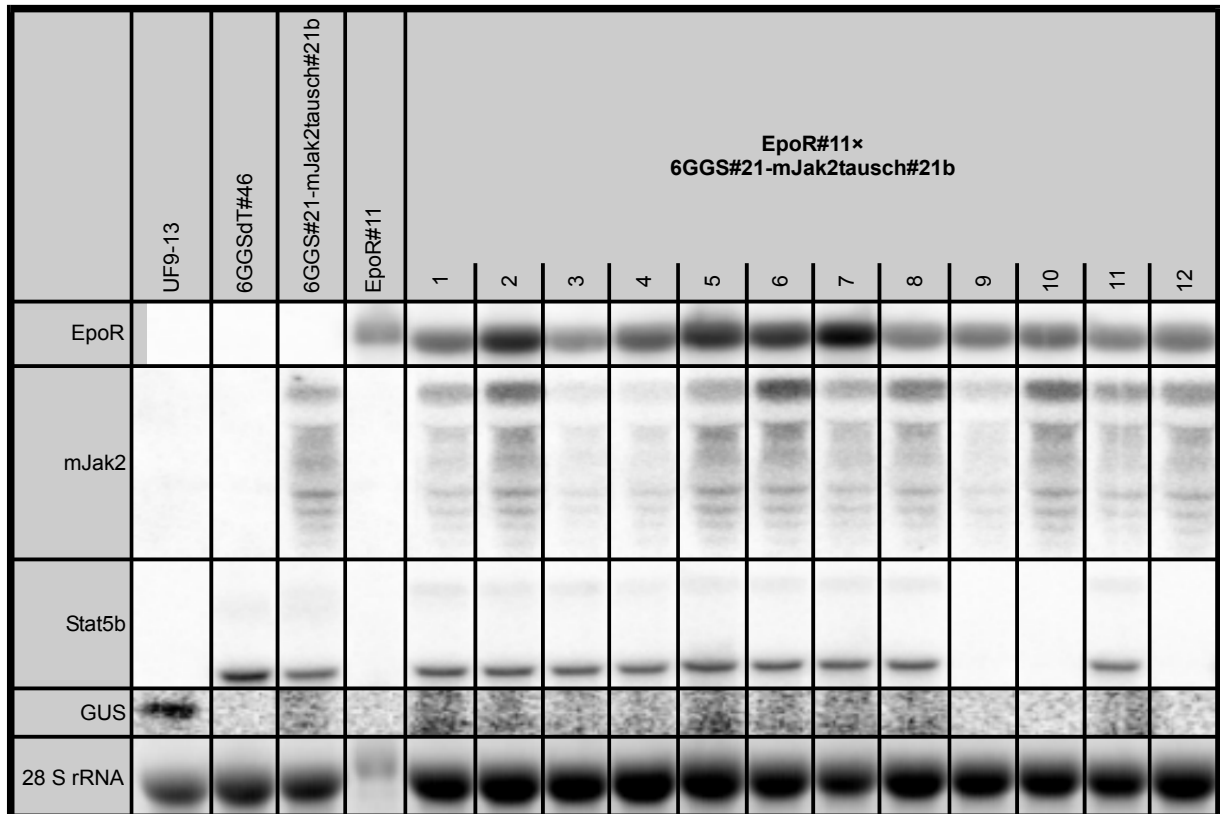


Abbildung 83: Expression der Jak-Stat-Signaltransduktionskomponenten in Nachkommen der Kreuzung von EpoR-Pflanzen mit 6GGS-mJak2tausch-Pflanzen

Transkriptionsanalyse von unabhängigen Nachkommen der Kreuzung von EpoR-Pflanzen mit 6GGS-mJak2tausch-Pflanzen. Jeweils 12,5 µg Gesamt-RNA der angegebenen Linien wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und die mRNA von EpoR, mJak3, Stat5b und der β -Glucuronidase wie in Kapitel 2.2.34 beschrieben durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde nachgewiesen. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β -Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert. 6GGSdT#46 ist eine Tabaklinie mit einem verbesserten Stat-Reporterkonstrukt, beschrieben in Kapitel 2.3.10. 6GGS#21-mJak2tausch#21b und EpoR#11 sind als Kreuzungspartner zur Kontrolle aufgetragen. Als Ladekontrolle ist das Ethidiumbromidbild der 28S rRNA dargestellt.

Vorerst wurden alle Linien weiter kultiviert, auch jene, die keine Stat5b*VP16-Expression zeigten, um sie als Negativkontrollen in weiteren Versuchen verwenden zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Induktionsversuch an den gekreuzten Linien unternommen. Dazu wurden Blattstücke von Pflanzen aus Sterilkultur unter Vakuum mit einer Lösung von 10 mM $MgCl_2$ und 1 U/mL Erythropoietin infiltriert. Nach Inkubation über Nacht in der Klimakammer wurden an den Blattstücken quantitative Bestimmungen der β -Glucuronidaseaktivität vorgenommen. Hierbei konnte lediglich bei der Kontrollinie (35S-GUS) eine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Nachkommen der gekreuzten Linien EpoR#11x6GGS#21-mJak2tausch#21b #1 bis #12 zeigten keine β -Glucuronidaseaktivität (Abbildung 84).

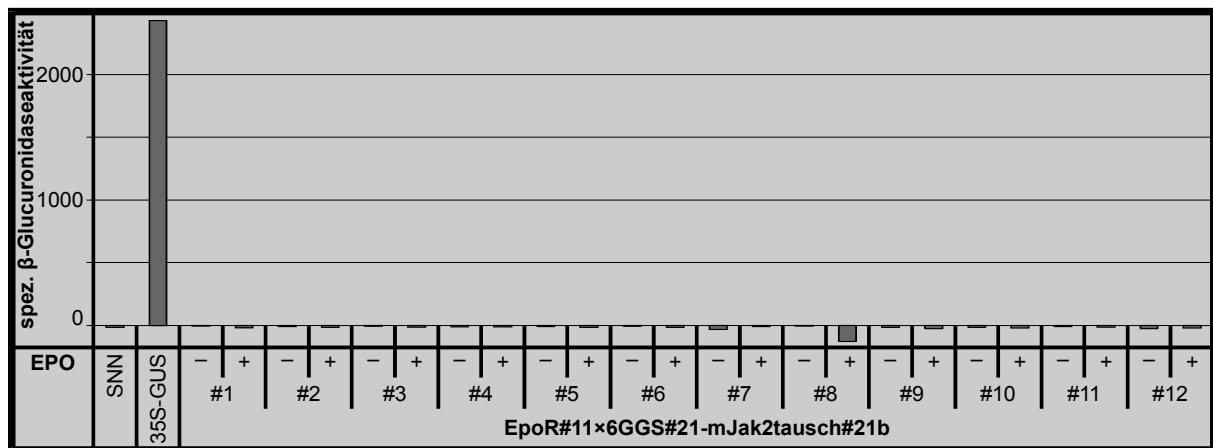


Abbildung 84: Quantitativer Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in uninduzierten und induzierten Tabakpflanzen mit der gesamten Jak-Stat-Signaltransduktionskette

Blattstücke von Nachkommen der gekreuzten Tabaklinien, die in Abbildung 83 getestet worden, waren wurden unter Einfluß von Vakuum mit 1U/mL Erythropoietin infiltriert. Nach Inkubation über Nacht wurde die Enzymaktivität der β -Glucuronidase wie in Kapitel 2.2.31 beschrieben bestimmt. Die Linien #3 und #4, die eine schwache Jak2-Expression aufwiesen, sowie die Linien #9, #10 und #12, die keine Stat5b*VP16-Expression zeigten, wurden als Negativkontrolle in diesem Versuch verwendet.

2.3.10 Transformation von *Nicotiana tabacum* mit einem verbesserten Konstrukt von 35S-Stat5b*VP16 und dem 6×GAS-GUS-Reporter

Die unvollständige Prozessierung der mRNA von Stat5b*VP16 mit der Bildung eines langen Transkripts, welches das Reporter gen mit umfaßte, kann die Induktion des Reporter gens durch das fortwährende Überlesen des Promotorbereichs negativ beeinflussen. Daher wurde der Vektor pBIN-6×GAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 durch Insertion eines zweiten Polyadenylierungssignals hinter der für Stat5b*VP16 codierenden Region optimiert. Die Klonierungen, die zur Konstruktion dieses Plasmids erforderlich waren, sind in Kapitel 2.2.5 beschrieben. Die T-DNA ist mit allen relevanten Sequenzelementen in Abbildung 85 schematisch dargestellt.

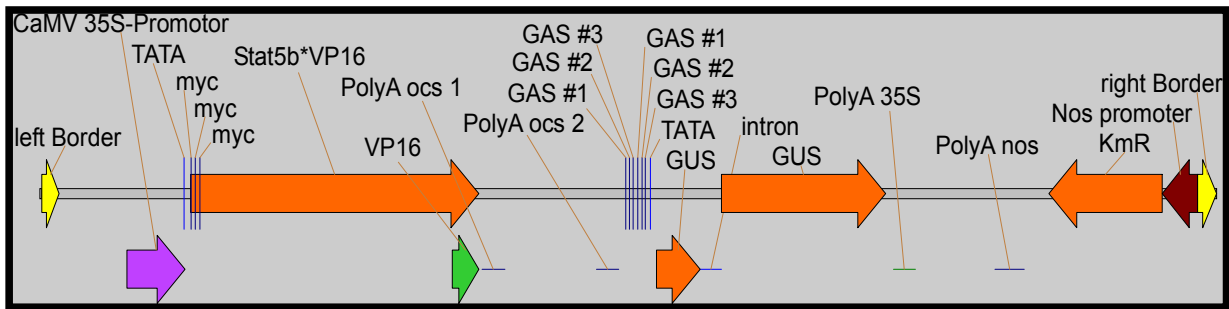


Abbildung 85: T-DNA-Region des Plasmids pBIN-6xGAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16doubleTerminator (B6GGSdT)

Das pBIN19-Derivat pBIN6xGAS-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 double Terminator (pB6GGSdT) enthält ein modifiziertes Stat5b-Gen, dessen eigene Transaktivierungsdomäne durch die Herpes simplex VP16-Aktivierungsdomäne (grün markiert) ersetzt wurde und das mit drei myc-Tags (blau markiert) fusioniert wurde, unter der Kontrolle des 35S-Promotors (violett markiert). Hinter der codierenden Region von Stat5b*VP16 befinden sich zwei Polyadenylierungssignale des *ocs*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* im Abstand von 195 bp zueinander. Danach folgt das β -Glucuronidasegen mit Intron unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit 6 Kopien der Erkennungsstelle für Stat5b (GAS-Element). Die codierenden Sequenzen sind beginnend mit dem Transkriptionsstart orangefarben markiert. Die T-DNA besitzt eine Expressionskassette für die Kanamycinresistenz. Linke und rechte Signalsequenz der T-DNA sind gelb dargestellt. TATA: TATA-Box.

Dieses Plasmid wurde für die Transformation von *Nicotiana tabacum* SNN gemäß Kapitel 2.2.26 verwandt. Aus dieser Transformation ging eine große Anzahl an Sprossen hervor, von denen 36 zu Pflanzen herangezogen wurden. 30 dieser 6xGAS-GUS-Stat5b*VP16doubleTerminator-Pflanzen (6GGSdT-Pflanzen) wurden durch Nachweis der mRNA von Stat5b*VP16 und der RNA der β -Glucuronidase, 26 durch Nachweis des Stat5b*VP16-Proteins durch einen monoklonalen c-myc-Antikörper und durch histochemische Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität charakterisiert.

Wie in Abbildung 86 zu erkennen ist, konnte durch das zweite Polyadenalierungssignal die Bildung des langen Transkripts zwar stark vermindert aber nicht völlig eliminiert werden. Besonders in der Hybridisierung gegen die β -Glucuronidase war das hochmolekulare Transkript, das sich wegen des 1000 bp großen zweiten Terminators oberhalb des langen Transkripts der Kontrolle befand, gut zu sehen. Die Quantifizierung ergab einen Rückgang des Anteils der langen Transkripte von 38,5% der Stat5b*VP16-Bande in der Linie 6GGS#21 auf unter 10% der Stat5b*VP16-Bande bei den höchstexprimierenden Linien.

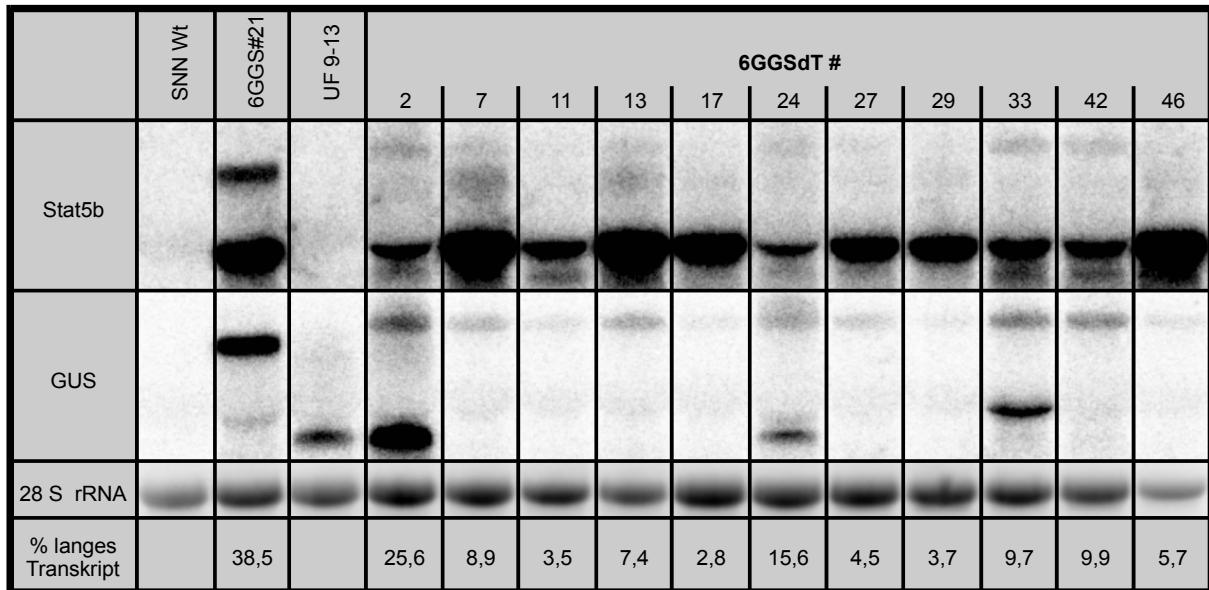


Abbildung 86: Transkriptionsanalysen ausgewählter 6GGSdT-Linien

Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien aus der Transformation mit dem Plasmid p6GGSdT. Jeweils 20 µg Gesamt-RNA der angegebenen Linien wurden in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Die mRNA von Stat5b und der β-Glucuronidase wurden durch aufeinanderfolgende Hybridisierungen mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wie in Kapitel 2.2.34 beschrieben nachgewiesen. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β-Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert. 6GGS#21 wurde als Kontrolle zum Vergleich der neuen Linien mit den ursprünglichen transgenen Stat-Reporterpflanzen aufgetragen. Das Ethidiumbromidbild der 28S rRNA ist als Ladekontrolle dargestellt. Der relative Anteil des langen Transkripts bezüglich der Stat5b-Bande an der Gesamtmenge wurde anhand der Bandenstärken mit Hilfe der Software „TINA“ bestimmt.

Ein weiteres Phänomen, das in den ursprünglichen Transformanden nicht beobachtet werden konnte, war das Auftreten einer Bande im Molekulargewichtsbereich der β-Glucuronidase, was auf eine spontane Transkription hindeutet. Dieses Phänomen war von der Expressionsstärke von Stat5b*VP16 unabhängig. In einem Fall (Linie 6GGSdT#33) trat in der Hybridisierung gegen die β-Glucuronidase eine aberrante Bande auf.

Der Nachweis des Stat5b*VP16-Proteins durch einen monoklonalen c-myc-Antikörper zeigte, daß Transkriptmengen und Proteinmengen in den untersuchten Linien korrelieren (Abbildung 87). Zudem scheint die von dem neuen Konstrukt abgeleitete für Stat5b*VP16 codierende mRNA besser translatiert werden zu können, denn in der bezüglich der Transkriptmengen ungefähr mit der Linie 6GGS#21 vergleichbaren Linie 6GGSdT#17 wird etwa die 2½-fache Menge an Protein synthetisiert.

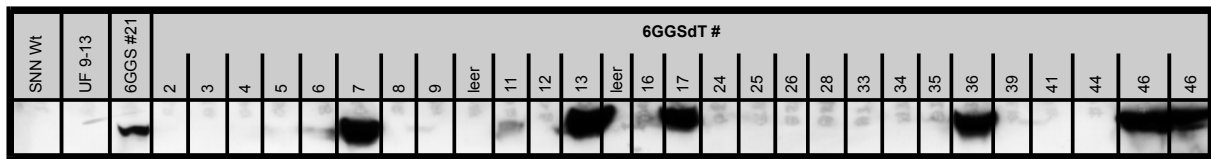


Abbildung 87: Nachweis des Stat5b*VP16-Proteins in 6GGSdT-Linien durch einen monoklonalen Antikörper gegen c-myc

Denaturierte Proteinextrakte aus jeweils 100 mg Blattmaterial der angegebenen transgenen Tabaklinien wurden durch Gelelektrophorese fraktioniert und nach Übertragung auf eine Nitrocellulosemembran mit 1:200 verdünntem monoklonalem c-myc-Antiserum über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Detektion erfolgte nach zweistündiger Inkubation mit einem 1:15000 verdünnten Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat mit Hilfe des ECL-Systems durch 20-minütige Exposition auf einen Röntgenfilm. SNN ist die Ausgangslinie für die Transformation. UF9-13 ist eine transgene Tabaklinie, welche ein β -Glucuronidasegen mit einem myc-Tag unter der Kontrolle eines schwachen Promotors exprimiert und diente als Positivkontrolle. 6GGS#21 ist eine transgene Tabakpflanze, die das ursprüngliche Stat-Reporterkonstrukt besitzt.

Um zu klären, ob die in den Transkriptionsanalysen festgestellte spontane Expression der β -Glucuronidase eine meßbare Enzymaktivität verursacht, wurden an Blattstücken histochemische Färbungen durchgeführt. Wie in Abbildung 88 dargestellt, war die Enzymaktivität der β -Glucuronidase in den Linien 6GGSdT#2, #24 und #33 nachweisbar. Dies waren genau jene Linien, bei denen eine spontane Transkription der β -Glucuronidase stattfand (siehe Abbildung 86).

Auf Grund der Ergebnisse aus den Transkriptions- und Proteinsyntheseanalysen wurden die transgenen 6GGSdT-Linien #7, #13, #17 und #46 weiterkultiviert, die restlichen Linien wurden verworfen.

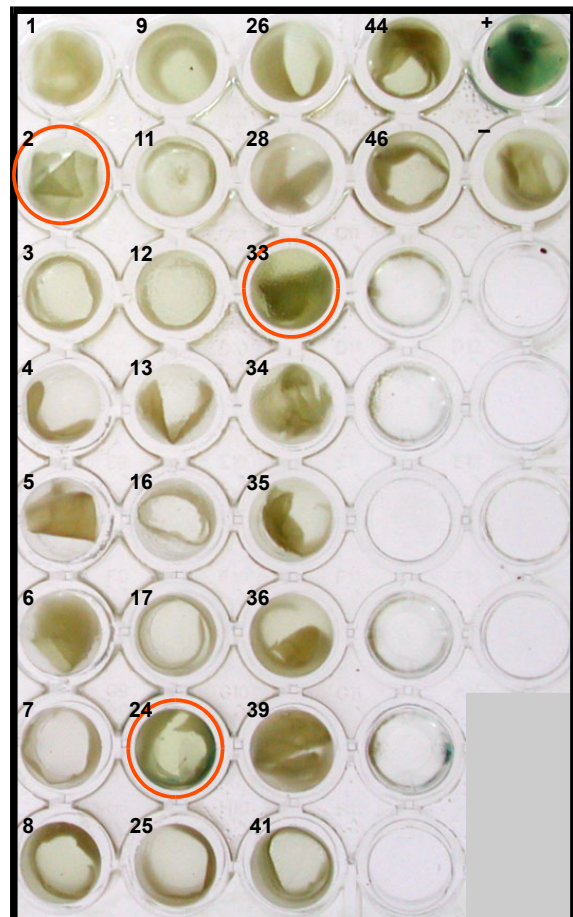


Abbildung 88: Histochemische Färbung zum Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität in Blattstücken von transgenen 6GGSdT-Linien

Blattstücke der angegebenen 6GGSdT-Linien wurden wie in Kapitel 2.2.30 beschrieben über Nacht gefärbt und anschließend das Chlorophyll durch mehrfaches Wechseln der Flüssigkeit mit Ethanol entfernt.

2.3.11 Transformation von *Nicotiana tabacum* 6GGSdT mit dem verbesserten 35S-Jak2-Konstrukt

Die transgene Linie 6GGSdT#46 (Kapitel 2.3.8) wurde mit dem verbesserten mJak2-Konstrukt im Vektor pBINHygA7-mJak2tausch (siehe Kapitel 2.3.7) gemäß Kapitel 2.2.26 transformiert. Aus dieser Transformation ging eine große Menge an Sprossen hervor, von denen 80 vereinzelt und 18 auf Expression der mJak2-mRNA hin überprüft.

Wie Abbildung 89 zeigt, war die Expression in den verschiedenen transgenen Linien unterschiedlich. Die Stabilität der mRNA war gegenüber den ursprünglichen Transformanden verbessert.

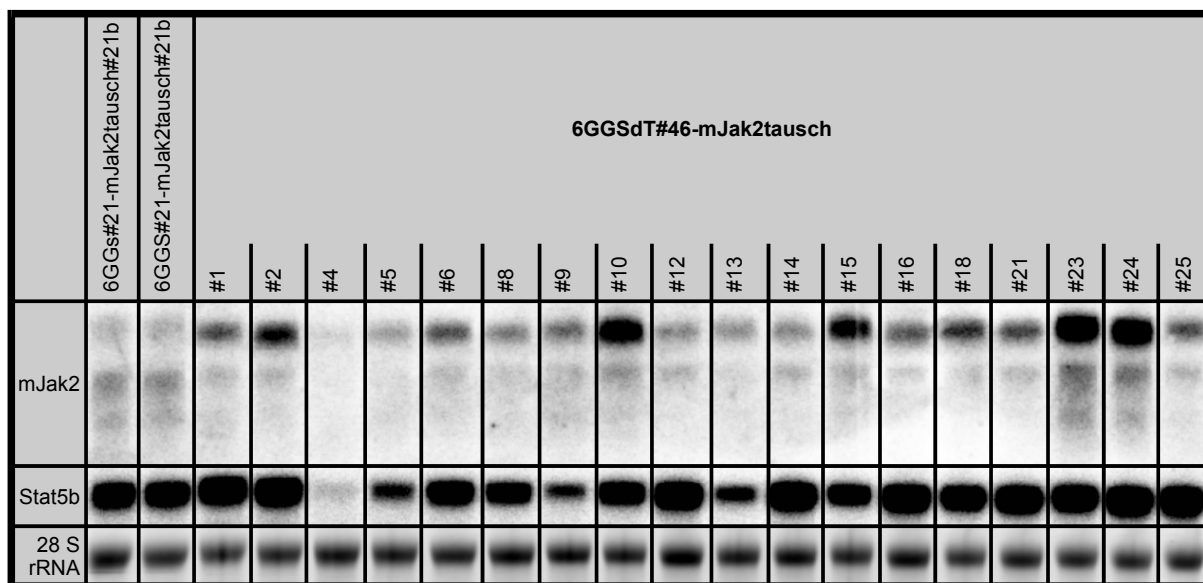


Abbildung 89: Transkriptionsanalysen von 6GGSdT#46-mJak2tausch-Linien

Transkriptionsanalyse von unabhängigen transgenen Tabaklinien aus der Transformation der höchstexprimierenden transgenen Linie 6GGSdT#46 mit dem Plasmid pBINHygA7-mJak2tausch. Jeweils 17 µg Gesamt-RNA von mJak2tausch-Transformanden wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung im denaturierenden Agarosegel und Übertragung auf Nylonmembran nacheinander mit radioaktiv markierten DNA-Sonden gegen mJak2 und Stat5b hybridisiert. Als Ladekontrolle ist das Ethidiumbromidbild der 28S-rRNA gezeigt.

Untersuchungen zur Biosynthese des mJak2-Proteins führten zu keinem Erfolg, da der mJak2-Antikörper seine Spezifität verloren hatte.

Weitere Untersuchungen konnten im Rahmen dieser Arbeit an den transgenen Linien nicht mehr durchgeführt werden. Zur weiteren Charakterisierung dieser Linien sollte die Biosynthese des mJak2-Proteins mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen. Weiterhin sollten die Pflanzen auf eine spontane Expression der β -Glucuronidase überprüft werden, die bei Anwesenheit des mJak2-Proteins nach den Daten von Barahmand-Pour *et al.* (1998) zu erwarten wäre. Eine Auswahl an konstitutiv aktivierten Linien einerseits und nicht aktivierten Linien andererseits sollte zur Kreuzung mit einer EpoR-überexprimierenden Linie eingesetzt werden und die Nachkommen dieser Kreuzung auf induzierbare Genexpression hin überprüft werden.

2.4 Diskussion

2.4.1 Einige der Voraussetzungen für die Etablierung der Jak-Stat-Signaltransduktion in Pflanzen sind gegeben

Eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Etablierung eines heterologen Genexpressionssystems in Fremdorganismen ist, daß sich keine funktionell identischen Elemente in dessen Genom befinden. Wie die BLAST-Suche nach den Proteinen Jak2, Stat5b und dem Erythropoietinrezeptor zeigte, finden sich keine Entsprechungen im vollständig sequenzierten Genom von *Arabidopsis thaliana*. Von dieser Seite sind daher Voraussetzungen für die Etablierung der vom Erythropoietinrezeptor gesteuerten Jak-Stat-Signaltransduktion zur Erstellung eines induzierbaren Expressionssystems in Pflanzen gegeben.

Die zweite Voraussetzung ist, daß das zur Steuerung von Genen eingesetzte *cis*-Element nicht von pflanzlichen Transkriptionsfaktoren besetzt wird und diese eine Aktivierung des Reportergens und damit eine unerwünschte Hintergrundaktivität verursachen. Sowohl in transienten Expressionsstudien als auch in stabil transformierten Pflanzen zeigten die jeweils verwandten GAS-GUS-Reportergene keine meßbare Induktion. Es konnte weder die mRNA des als Reportergen eingesetzten β -Glucuronidasegens noch eine Enzymaktivität der β -Glucuronidase nachgewiesen werden.

Drittens wurde gezeigt, daß im pflanzlichen System keine Kinaseaktivitäten existieren, die den Transkriptionsfaktor Stat5b zunächst inaktiv ist. Stat5b bewirkt also weder eine Transkriptionsaktivität im unphosphorylierten Zustand, noch wird er von pflanzlichen Kinasen phosphoryliert und aktiviert. Damit ist eine weitere wesentliche Voraussetzung erfüllt.

Viertens konnten im Rahmen dieser Arbeit mehrere Hinweise darauf gewonnen werden, daß die Signaltransduktionskomponenten Jak2 Stat5b im pflanzlichen System aktivieren kann. Zum einen konnte in transienten Expressionsstudien (Kapitel 2.3.2) eine Induktion des 3×GAS-GUS-Reportergens gezeigt werden, wenn Jak2 und Stat5b coexprimiert wurden. Da in Hefe gezeigt werden konnte, daß die Expression von Jak2 in hohen Konzentrationen zur Aktivierung des Reportergens in Abwesenheit des Rezeptors führt (Barahmand-Pour *et al.*, 1998), entsprechen diese Ergebnisse den Erwartungen und zeigen, daß Autoaktivierung von Jak2 sowie Transduktion und Aktivierung der Transkription durch Stat5b auch in Pflanzen erfolgen kann. Zum anderen konnte die Expression der β -Glucuronidase in transgenen Calli nachgewiesen werden, die Jak2, Stat5b und das 6×GAS-GUS-Reportergen enthielten (Kapitel 0). Einerseits wurden zwar keine Färbungen der Stat-Reporter-Pflanzen durchgeführt, womit eine spontane Expression durch Positionseffekte am Insertionsort des Reportergens nicht ausgeschlossen wurde. Andererseits weist die niedrige Frequenz des Auftretens der Färbung darauf hin, daß es sich hierbei um einen Effekt des neu transformierten Jak2-

Gens handeln könnte. Drittens lassen sich aus der starken Induktion der β -Glucuronidase in einer Transkriptionsstudie nach transienter Expression ähnliche Schlüsse ziehen (Kapitel 2.3.6.1). Allerdings konnte in stabil transformierten Pflanzen keine Autoaktivierung des Systems beobachtet werden, selbst wenn dies in Calli derselben transgenen Linie der Fall war (Kapitel 2.3.7). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre, daß in Protoplasten und Calli die Expression höher ist, sodaß trotz der in Kapitel 2.4.3 diskutierten Degradierung der mRNA eine Translation von Jak2 stattfinden kann.

Die einzige Komponente, für welche die Funktionalität bisher nicht nachgewiesen werden konnte, ist der Erythropoietinrezeptor. Der Klärung dieser Frage standen Probleme technischer Art mit den transienten Expressionsstudien und die Verfügbarkeit eines Antikörpers im Wege. Da jedoch die stabile Expression in Pflanzen unproblematisch war und große Mengen an mRNA detektiert werden konnten, kann davon ausgegangen werden daß auch die Translation des Proteins erfolgte. Die wichtigste Fragestellung bezüglich des Erythropoietinrezeptors dürfte die korrekte Lokalisierung in der Cytoplasmamembran betreffen. Da die Signalsequenzen tierischer Proteine für die Plasmamembranlokalisierung zuweilen denen der pflanzlichen Tonoplastenlokalisation stark ähneln, kann es hier zu Fehlleitungen des Proteins kommen (Gieselbert Hinz, persönliche Mitteilung).

Insgesamt ergeben die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche den Eindruck, daß die Komponenten der Jak-Stat-Signaltransduktion auch im pflanzlichen System funktionell sind und daß pflanzliche Proteine nicht mit ihnen interferieren.

2.4.2 Die Wirkung ocs-Polyadenylierungssignals im synthetischen Stat5b-Gen ist ungenügend

Bei der Untersuchung der transgenen Stat5b-Pflanzen wurde eine mRNA-Bande detektiert, die oberhalb des Stat5b-Signals lag. Eine Bande desselben Molekulargewichts wurde durch Sonden gegen die β -Glucuronidase markiert. Daraus mußte geschlossen werden, daß ausgehend von 35S-Promotor im Plasmid pBIN-6 \times GAS-TT-GUS/INT-A7-Stat5b*VP16 zwei Transkripte gebildet werden. Das kleinere ist das korrekt prozessierte Transkript, das die codierende Sequenz von Stat5b*VP16 enthält. Das größere Transkript, das sowohl von der Stat5b- als auch von der β -Glucuronidasesonde erkannt wird, entsteht aufgrund einer mangelhaften Prozessierung und enthält neben der Stat5b*VP16-Sequenz auch die β -Glucuronidasesequenz oder Teile davon. Wahrscheinlich enthält dieses Transkript die gesamte β -Glucuronidasesequenz und wird am 35S-Terminator korrekt beendet. Eine Quantifizierung ergab, daß das lange Transkript über $\frac{1}{4}$ der gesamten Stat5b*VP16-haltigen Transkriptmenge ausmachte.

Es war zu befürchten, daß das fortwährende Überlesen des 6 \times GAS-Promotors durch die RNA-Polymerase dessen transkriptionsaktivierende Eigenschaften durch Verdrängung

der an ihn bindenden Stat5b*VP16-Dimere negativ beeinflussen könnte. Daher wurde ein zweites Polyadenylierungssignal im Abstand von 795 bp zwischen die Expressionskassette von Stat5b*VP16 und dem 6×GAS-Promotor eingefügt. Zwar konnte auch hierdurch keine vollständige Terminierung erreicht werden, der Anteil des langen Transkripts an der Gesamtmenge ging aber auf unter 10% zurück. Damit dürfte dem Problem der Schwächung des 6×GAS-Promotors entgegengewirkt worden sein.

Interessanterweise waren auch in dem doppelt terminierten Konstrukt nur zwei Transkripte nachweisbar, und zwar das Stat5b*VP16-Transkript korrekter Größe und eines, das dem gesamten Abschnitt zwischen 35S-Promotor von Stat5b*VP16 und 35S-Polyadenylierungssignal des 6×GAS-GUS-Reportergens entsprach. Ein Transkript, das 795–1000bp länger als das korrekte Stat5b*VP16-Transkript war, und daher einem am zweiten ocs--Polyadenylierungssignal beendeten Transkript entsprochen hätte, wurde entgegen den Erwartungen nicht gefunden.

2.4.3 Die mRNA von Jak2 wird in Pflanzen spezifisch abgebaut: Lösungsstrategien

Das derzeit drängendste Problem ist der spezifische Abbau der mRNA von Jak2. Das ursprüngliche Gen, das von T. Decker zugesandt wurde und mit dem für den Funktionsnachweis in Hefe verwandten identisch ist, enthält in 5'-Richtung vor der für Jak2 codierenden Sequenz eine untranslatierte Region von 298 bp und in 3'-Richtung nach der codierenden Sequenz eine untranslatierte Region von 557 bp. Letztere Region ist im letzten Drittel sehr AT-reich und daher wahrscheinlich Teil eines im tierischen System wirksamen Terminators.

mRNA, die diese Bereiche enthielt, konnte zwar in großen Mengen gebildet werden, war aber gleichzeitig sehr instabil. Bei Transkriptionsanalysen zeigten sich deutliche Hinweise auf eine Degradierung, gekennzeichnet durch eine Vielzahl unterschiedlich großer Transkripte, die als großflächig verteilte Radioaktivität auf den Autoradiogrammen sichtbar wurden. Diese mRNA war offenbar nicht translatierbar, denn Jak2 konnte in Proteinexpressionsstudien mit einem polyklonalen Antikörper gegen Jak2 in 87 transgenen Linien nicht nachgewiesen werden.

Durch Entfernung der untranslatierten Regionen konnte eine Verbesserung der Stabilität der mRNA von Jak2 erzielt werden, wenn auch noch immer ein gewisser Abbau sichtbar war (Kapitel 2.3.6.1, 0 und 2.3.11). Anscheinend wurden mit der Entfernung der untranslatierten Regionen einige Determinanten für den spezifischen Abbau entfernt und damit die Lebenszeit der mRNA verlängert. Dennoch konnte nur in einer einzigen von 60 getesteten Linien mittels eines polyklonalen Antikörpers gegen Jak2 ein Signal gefunden werden, das möglicherweise dem Jak2-Protein entsprach. Diese Linie wurde mit transgenen Pflanzen, die

den Erythropoietinrezeptor enthielten, gekreuzt und eine Induktion mit Erythropoietin durchgeführt. Dabei konnte keine Steigerung der β -Glucuronidaseaktivität bei einer Induktion über Nacht festgestellt werden. Analysen zur Aktivierung der Transkription stehen noch aus. Da Böhner *et al.* (1999) beobachtet hatte, daß die Transkription bei einem Dexamethason-induzierbaren und Tetracyclin-reprimierbaren Expressionssystem nach einer Induktion mit Dexamethason nach 3 h bereits ihr Maximum erreichte, die Translation aber erst nach mehreren Tagen nachweisbar wurde, kann unter Umständen bei längerer Induktionszeit eine Reporter-genaktivität nachgewiesen werden.

Eine weitere Stabilisierung des Jak2-Transkripts ist dennoch wünschenswert, da am Beispiel des *Bt*-Toxins aus *Bacillus thuringiensis* gezeigt wurde, daß Abbau von mRNA für eine schwache Expression in Pflanzen verantwortlich ist (de Rocher *et al.*, 1998). Die Autoren begegneten diesem Problem, indem sie AT-reiche Sequenzen in der codierenden Region des *Bt*-Toxingens eliminierten und damit den GC-Gehalt von 38% auf den für die Expression in Mais optimalen Gehalt von 64% anhoben. Zudem konnte die Expression des *Bt*-Toxins in Pflanzen durch die Eliminierung von potentiellen Polyadenylierungssignalen verbessert werden (Diehn *et al.*, 1998; Haffani *et al.*, 2000). Gutiérrez *et al.* (1999) nennen in einem Übersichtsartikel ferner zwei DST-Elemente mit den Konsenssequenzen **ATAGAT** und **anTtnGTAt**, sowie **AUUUA**-Elemente als Signale für die Destabilisierung von mRNA. Alle der genannten problematischen Eigenschaften treffen auf das Jak2-Gen zu, das einen GC-Gehalt von 43% hat (Abbildung 90). Somit kommen mehrere Strategien für die Konstruktion eines synthetischen, stabil exprimierten Jak2-Gens in Frage:

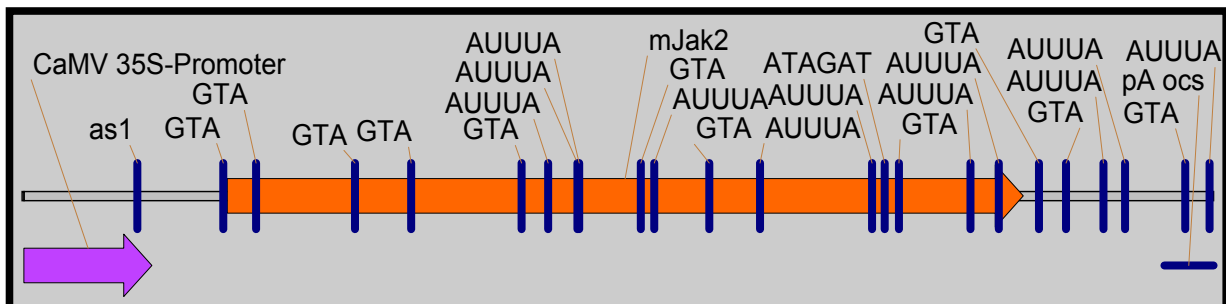


Abbildung 90: mRNA-Destabilisierungssignale im Jak2-Gen mit den untranslatierten Regionen

Erstens kommt die Entfernung der bekannten Destabilisierungssignale in Frage. Dazu müßten die in der codierenden Region vorkommenden Elemente **ATAGAT** und **anTtnGTAt** so umgewandelt werden, daß sie für dieselben Aminosäuren codieren; in gleicher Weise muß mit den zahlreich in der codierenden Region von Jak2 vorhandenen **AUUUA**-Elementen verfahren werden. Am besten geschieht dies unter Beachtung der Codontabelle für Mais, da diese eine Gruppe jener Codons bevorzugt, die auch dikotyledone Pflanzen verwenden; damit wird einer möglichen universellen Verwendung des Jak-Stat-Systems auch in monokotylen Pflanzen vorgegriffen. de Rocher *et al.* (1998) weisen jedoch darauf hin, daß die Eliminie-

rung von **AUUUA**-Elementen alleine nicht zwangsläufig zum Erfolg führt, da auch deren umgebende Sequenz die Stabilität der mRNA beeinflusst.

Zweitens sollten die potentiellen Polyadenylierungssignale eliminiert werden. (Diehn *et al.*, 1998) identifizierten im Gen für das *Bt*-Toxin drei potentielle Polyadenylierungssignale, von denen mindestens zwei in ähnlicher Form auch im Jak2-Gen vorkommen. Ferner sollten die typischen Polyadenylierungssignale FUE (*far upstream element*) mit der Konsenssequenz **UUUGUA** und NUE (*near upstream element*) mit der Konsenssequenz **AAUAAA** entfernt werden. Da diese Elemente nicht sehr gut konserviert sind, kann deren Identifikation schwierig sein.

Drittens kann die gesamte Sequenz des Jak2-Gens bezüglich ihrer Codons gemäß der Codontabelle für Mais optimiert werden. Diese Möglichkeit würde vorteilhafterweise alle AT-reichen Regionen eliminieren, da in Mais praktisch keine Codons verwendet werden, deren dritte Base C oder G ist. Andererseits erscheint diese Strategie angesichts der Größe der codierenden Sequenz des Jak2-Gens von 3138 bp sehr aufwendig.

Als Alternative zur Herstellung eines synthetischen Jak2-Gens käme in Betracht, auf das Jak2-Gen vollkommen zu verzichten und stattdessen die Signaltransduktion über eine Stat-phosphorylierende Rezeptorkinase zu aktivieren. Als solche kämen vor allem die gut charakterisierten EGF- oder PDGF-Rezeptoren in Betracht, die ebenfalls Stat5b phosphorylieren (Ruff-Jamison *et al.*, 1993; Vignais *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998; Akira, 1999). Vorteilhaft wäre beim Einsatz dieser Rezeptorkinasen, daß ein Transgen weniger erforderlich ist, um die Signaltransduktionskette vollständig im pflanzlichen System zu exprimieren. In jedem Falle sollte die codierende Sequenz der Rezeptorkinasen auf ähnlich negative Eigenschaften wie die von Jak2 überprüft werden, bevor eine Expression in Pflanzen versucht wird.

2.4.4 Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit unternommenen Ansätze, die Jak-Stat-Signaltransduktion stabil in Pflanzen zu exprimieren, sind in Abbildung 91 dargestellt.

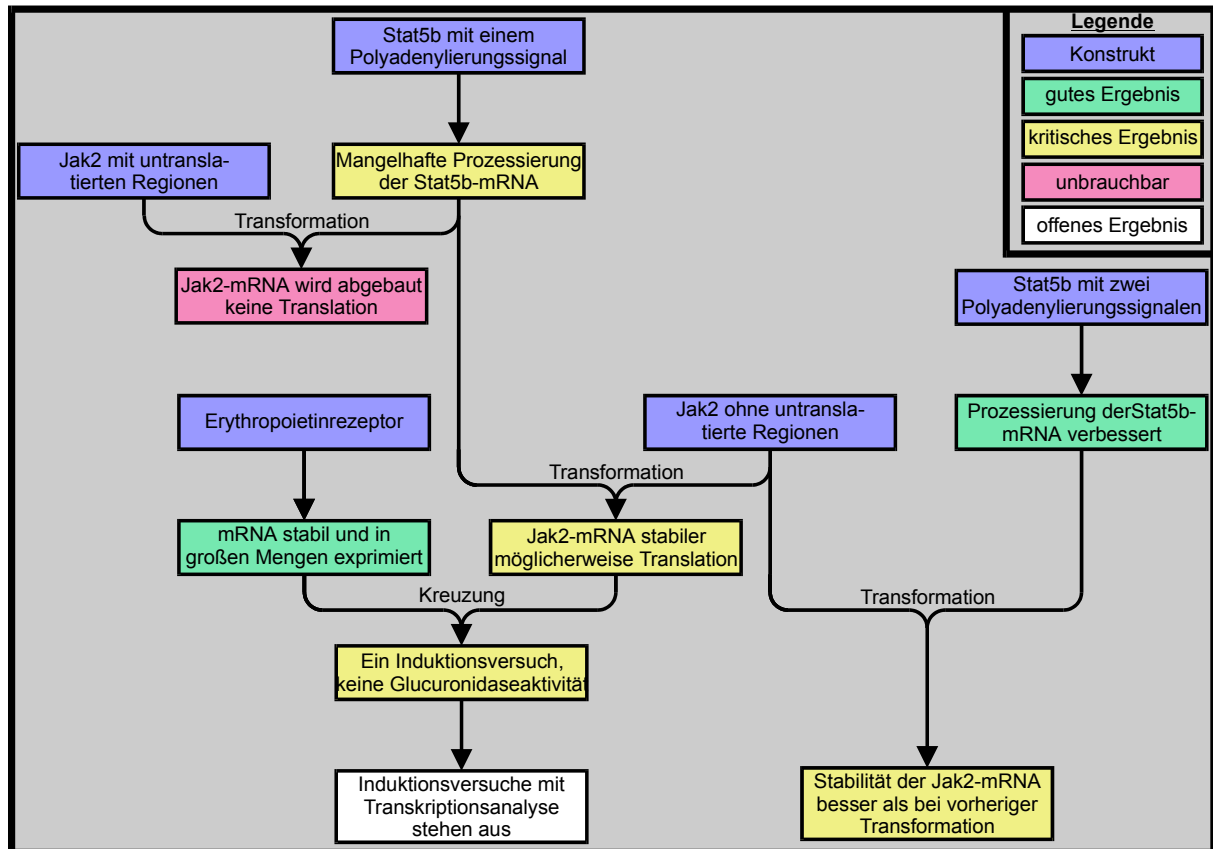


Abbildung 91: Verlauf der bisherigen Arbeiten zur Expression von Komponenten der Jak-Stat-Signaltransduktionskette

Die Legende für den Farbcode ist rechts oben angegeben.

Vorausgesetzt, daß die Schwierigkeiten der Expression von Jak2 überwunden werden können, bietet dieses Projekt die Möglichkeit ein neuartiges induzierbares Expressionssystem für den Gebrauch in Pflanzen zu konstruieren. Neuartig wäre die Induzierbarkeit über einen plasmamembrangebundenen Rezeptor mit extrazellulärer Ligandenbindedomäne.

Der Einsatz von Erythropoietin oder einem anderen Peptidhormon in einer möglichen agrartechnischen beziehungsweise biotechnologischen Anwendung („Phytofarming“) ist wegen der pharmakologischen Wirkungen auf den Menschen undenkbar. Um das Expressionssystem für solch eine Anwendung nutzbar zu machen, müßte ein chimärer Rezeptor konstruiert werden, bei dem die Ligandenbindedomäne des Erythropoietinrezeptors durch eine fremde ersetzt wäre. Als Modellsystem zum Nachweis, daß solch ein chimärer Rezeptor auch in Pflanzen funktionell wäre, böte sich eine Fusion mit dem FK506-Bindeprotein an (Blau *et al.*, 1997). Daß solch ein System mit dem FK506-Dimer FK1012 induzierbar ist, konnten Blau *et al.* (1997) bereits nachweisen. Daher könnten extrazelluläre Domänen kon-

struiert werden, die durch die Anwesenheit einer niedermolekularen Verbindung dimerisieren.

Sollten sich die Schwierigkeiten mit der Expression von Jak2 nicht lösen lassen, sind die genannten Modifikationen an der Ligandenbindedomäne möglicherweise auch für alternativ eingesetzte Rezeptorkinasen wie den EGF-Rezeptor oder den PDGF-Rezeptor denkbar.

Da der Rezeptor eine extrazelluläre Ligandenbindedomäne besitzt, ist die Auswahl möglicher Induktionsmittel nicht auf solche beschränkt, die in das Cytoplasma gelangen können. Vielmehr können auch Induktionsmittel verwendet werden, das nicht membrangängig ist, was die Auswahl an möglichen Chemikalien sehr erweitert. Daher eignet sich die Jak-Stat-Signaltransduktion als induzierbares Expressionssystem für die biotechnologische Anwendung hervorragend.

Zusammenfassung des Teils I („Mutagenese“)

Im Rahmen der Abwehrreaktion gegen Pathogene kommt es in Pflanzen zu einem Anstieg der Salizylsäurekonzentration. Als Antwort auf dieses Signal wird die Transkription einer Reihe von Abwehrgenen über eine noch weitgehend unbekannt Signaltransduktion aktiviert. Dabei unterscheidet man zwischen „frühen“ und „späten“ Abwehrgenen. Die „frühen“ Abwehrgene werden bereits zwei Stunden nach dem Salizylsäuresignal aktiviert, die „späten“ erst nach 24 Stunden. Eine gemeinsame Eigenschaft der Promotoren „früher“ und „später“ Abwehrgene ist die Anwesenheit eines charakteristischen *cis*-Elements, des *as-1*-Elements. Ein synthetischer Promotor, der eine oder mehrere Kopien des *as-1*-Elements enthält, weist dieselbe Expressionskinetik wie die „frühen“ Abwehrgene auf.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten *Arabidopsis*-Mutanten selektiert werden, welche besonders die „frühen“ Abwehrgene nicht mehr aktivieren können. Zur Selektion wurde ein Promotor aus fünf *as-1*-Elementen ($5\times as-1$ -Promotor) mit einem neuartigen dominant negativen Selektionsmarker kombiniert. Dieser codiert für eine Deacetylase, welche die Umsetzung eines ungiftigen Proherbizids in das Herbizid BASTA katalysiert. Um zwischen Mutanten im Deacetylasegen und Mutanten in der Signaltransduktionkette unterscheiden zu können, wurde die β -Glucuronidase unter der Kontrolle des gleichen Promotors als zweites Reportergen eingebracht.

Das regulatorische Protein NPR1 ist eine entscheidende Komponente bei der durch Salizylsäure induzierten Aktivierung der „späten“ Abwehrgene. Durch Kreuzung der transgenen $5\times as-1$ -GUS-Deac-Pflanzen mit *npr1*-Mutanten konnte gezeigt werden, daß NPR1 keinen entscheidenden Einfluß auf die „frühen“ Abwehrgene hat.

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß der $5\times as-1$ -Promotor eine hohe Hintergrundaktivität aufwies, welche die Selektion erschwerte. Diesem Problem konnte durch eine differentielle Selektionsstrategie zum Teil begegnet werden. Sie basierte darauf, daß parallel zu den mutagenisierten Pflanzen, die mit Salizylsäure induziert wurden, zwei nicht mutagenisierte Kontrollgruppen beobachtet wurden. Eine dieser Kontrollgruppen wurde induziert, die andere nicht. Die Selektion wurde beendet, wenn die induzierte Kontrollgruppe abgestorben war, die uninduzierte aber noch überlebte.

Aus dieser Selektion gingen 60 Überlebende hervor, von denen 31 in einem zweiten Selektionsversuch überprüft wurden. Bei 27 Linien bestätigte sich, daß die Deacetylase nicht mehr aktiv war. 22 ausgewählte Pflanzen wurden durch Transkriptionsanalysen untersucht. Zwölf der untersuchten Linien konnten — vorbehaltlich der Bestätigung der Phänotypen durch eine Wiederholung der Versuche — als wahrscheinliche Signaltransduktionsmutanten identifiziert werden: Die Induktion der beiden Reportergene, Deacetylase und β -Glucuronidase, war in diesen Pflanzen reduziert. Bei einer dieser Linien traten die sichtbaren Symptome einer Abwehrreaktion nach einer Infektion mit Pathogenen schneller auf, bei einer weiteren waren die Symptome weniger ausgeprägt. Die weitere Analyse der Mutanten wird in Zukunft zur Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Signaltransduktion der Pathogenabwehr beitragen.

Zusammenfassung des Teils II („Jak-Stat“)

In tierischen Zellen existiert ein kurzer Signalweg, der zur Induktion der Genexpression führt: Der Jak-Stat-Signalweg. Zur Induktion des Signalwegs wird ein membranständiger Rezeptor, der Erythropoietinrezeptor, durch Bindung des Liganden Erythropoietin aktiviert. Daraufhin kommt es zur Phosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen, die ihrerseits den Transkriptionsfaktor Stat5b phosphorylieren. Stat5b gelangt sodann in den Zellkern, und aktiviert nach Bindung an die GAS-Elemente die Transkription.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ermittelt werden, ob das Zusammenspiel dieser Komponenten auch in Pflanzen zur Induktion der Genexpression führt und ob es sich zur Konstruktion eines induzierbaren Expressionssystems in Tabak eignet. Das Neuartige an diesem Expressionssystem ist die Aktivierung über einen plasmamembranständigen Rezeptor mit extrazellulären Ligandenbindedomänen. Langfristiges Ziel dieses Projektes ist es, die Ligandenbindedomäne des Erythropoietinrezeptors gegen eine andere auszutauschen, sodaß die Induktion durch eine umweltfreundliche Chemikalie erfolgen kann.

Bei Sequenzvergleichen wurden im Genom von *Arabidopsis thaliana* keine zu *Jak2*, *Stat5b* und dem Gen des Erythropoietinrezeptors homologen Gene gefunden. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß in Tabak oder anderen Pflanzen solche Gene existieren, die zu einer Aktivierung der Signaltransduktion führen.

In transienten Expressionsstudien konnte nachgewiesen werden, daß Stat5b das in Pflanzen inaktive GAS-Element nur in Anwesenheit hoher Jak2-Mengen aktiviert. Diese rezeptorunabhängige Aktivierung bei hoher Jak2-Expression war bereits in Hefe gezeigt worden. Nach diesem Ergebnis erschien die Etablierung des Signaltransduktionswegs in Pflanzen zur Konstruktion eines induzierbaren Expressionssystems machbar.

Zur Etablierung des Signaltransduktionswegs in Pflanzen wurde zunächst die β -Glucuronidase unter der Kontrolle von 6 Kopien des GAS-Elements gemeinsam mit Stat5b in Tabak transformiert. Das Stat5b-Protein ließ sich ohne Schwierigkeiten exprimieren, und es konnte keine Aktivierung des Reportergens nachgewiesen werden. Dem anfänglichen Problem der unkorrekten Prozessierung der mRNA konnte durch Einfügen eines zweiten Polyadenylierungssignals begegnet werden.

Die transgenen Stat5b-exprimierenden Linien wurden mit Jak2 transformiert. Dabei zeigte sich, daß die mRNA des vollständigen Jak2-Gens in Pflanzenzellen degradiert wird und in der Folge in stabil transformierten Pflanzen keine Synthese des Jak2-Proteins stattfand. Dem konnte zum Teil durch eine Entfernung der untranslatierten Regionen entgegen gewirkt werden. Möglicherweise ist im weiteren Verlauf des Projekts eine weitere Verbesserung der Expression von Jak2 wünschenswert. Dafür müßten wahrscheinlich der AT-Gehalt der codierenden Sequenz reduziert und viele bekanntermaßen destabilisierend wirkende Sequenzelemente korrigiert werden.

In einem letzten Schritt müßte der Erythropoietinrezeptor, dessen mRNA stabil exprimiert wird, in die Jak2 und Stat5b exprimierenden Pflanzen eingekreuzt und die Kreuzungsprodukte auf eine durch Erythropoietin induzierbare Genexpression hin untersucht werden.

Teil 3 Allgemeines

3.1 Abkürzungsverzeichnis

Größenzeichen, Einheiten und Vorsätze wurden gemäß den SI-Konventionen von 1988 verwandt. Besondere Abkürzungen sind in der folgenden Liste aufgeführt.

xg	x-faches der Erdbeschleunigung (Zentrifugation)
2,4-D.....	2,4-Dichlorophenoxyessigsäure
ana	as-1 nicht aktiv
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as-1	<i>activating sequence 1</i>
ASF	<i>activating sequence1 binding factor</i>
AUX.....	<i>auxin related</i>
avr	Avirulenzgen
AXR.....	<i>auxin resistant</i>
BLAST	Sequenzsuche anhand von Ähnlichkeiten (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTB/POZ..	<i>broad complex, tramtrack, bric-a-brac / poxyvirus zinc finger</i>
BY-2	<i>bright yellow 2</i> (Tabakkultivar)
bZIP.....	Proteine mit basischer DNA-Bindedomäne und Interaktionsdomäne (<i>leucin zipper</i>)
CaMV	Blumenkohlmosaikvirus (<i>cauliflower mosaic virus</i>)
CC	Doppelwendelstruktur (<i>coiled coil</i>)
CPR.....	<i>constitutive expressor of PR genes</i>
cv.....	Kultivar
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
Deac.....	Deacetylase
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMF.....	Dimethylformamid
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desocytosintriphosphat
DST	Destabilisierung (<i>destabilization</i>)
DTH	<i>detachment</i>
DTT	Dithiothreitol

dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dYT	<i>double yeast tryptone</i>
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDS	<i>enhances disease resistance</i>
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat-Dinatriumsalz
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor (<i>epidermal growth factor</i>)
EMP	erythropoietinimitierende Peptide (<i>erythropoietin mimetic peptides</i>)
EMS	Ethylmethansulfonsäure
EPO	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietinrezeptor
FUE	<i>far upstream element</i>
GAS	Interferon- γ -aktivierte Sequenz
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	β -Glucuronidase
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxypiperazin- <i>N'</i> -2-Ethansulfonsäure
HR	hypersensitive Antwort (<i>hypersensitive response</i>)
Hyg	Hygromycin
IEGT	immediate early glucosyl transferase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
ISR	induzierte systemische Resistenz
Jak	Januskinase
Km	Kanamycin
LRR	Region mit wiederholten leucinreichen Motiven (<i>leucin rich repeat</i>)
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
NAcPT	<i>N</i> -Acetyl-Phosphinothricin
NBS	Nukleotid-Bindestelle (<i>nucleotide binding site</i>)
NIM	<i>non-immunity</i>
NPR	<i>nonexpressor of PR genes</i>
NUE	<i>near upstream element</i>
OCS	Octopinsynthase
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Wachstumsfaktor zur Entwicklung von Blutplättchen (<i>platelet derived growth factor</i>)

PEG	Polyethylenglykol
PHY	Phytochrom
PR	<i>pathogenesis related</i>
pv.....	Pathovariante
PVDF.....	Polyvinylidendifluorid
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNA.....	Ribonukleinsäure
rRNA.....	ribosomale RNA
SA.....	Salizylsäure
SABP.....	salizylsäurebindendes Protein
SAI.....	<i>salicylic acid insensitive</i>
SAR.....	systemische erworbene Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SARP.....	<i>salicylic acid response protein</i>
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
SSI.....	<i>suppressor of salicylic insensitivity</i>
Stat.....	Signalvermittler und Transkriptionsaktivator (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
surII	Überlebende des zweiten Mutageneseansatzes (<i>survivor</i>)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer-DNA
TEMED.....	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TetR.....	Tetracyclinrepressor
TGA.....	Transkriptionsfaktoren, die an TGACG-Motive binden
TIR.....	Toll/Interleukinrezeptor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
U.....	internationale Einheit (= i. E.)
UV	Ultraviolett
v/v.....	Volumen auf Volumen
w/v.....	Gewicht auf Volumen
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylglucuronid

3.2 Literaturverzeichnis

- Akira, S.** (1999): Functional roles of STAT family proteins: Lessons from knockout mice. *Stem Cells*, **17**, 138-146.
- Alexander, D., Goodman, R.M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T. und Ward, E.** (1993): Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7327-7331.
- Aoyama, T. und Chua, N.-H.** (1997): A glucocorticoid-mediated system in transgenic plants. *Plant J.*, 605-612.
- Ashman, C.R., Jagadeeswaran, P. und Davidson, R.L.** (1986): Efficient recovery and sequencing of mutant genes from mammalian chromosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3356-3360.
- Baker, B., Whitham, S. und McCormick, S.** (1996): The N gene of tobacco confers resistance to Tobacco Mosaic Virus in transgenic tomato. *In: Stacey, G., Mullin, B. und Gresshoff, P.M. (Hrsg.): Biology Of Plant Microbe Interactions. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, Minn., pp. 65-70.
- Baker, C.J. und Orlandi, E.W.** (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **33**, 299-321.
- Barahmand-Pour, F., Meinke, A., Groner, B. und Decker, T.** (1998): Jak2-Stat5 interactions analyzed in yeast. *J. Biol. Chem.*, **273**, 12567-12575.
- Bartsch, K., Kriete, G., Broer, I. und Pühler, A.** (1996): Novel genes coding for amino acid deacetylases with specificity for N-Acetyl-L-Phosphinothricin, their isolation and their use. Patent No. WO 98/27201. *Hoechst Schreing Agrevo GmbH*, EUR
- Becker, S., Corthals Garry, L., Aebersold, R., Groner, B. und Mueller Christoph, W.** (1998): Expression of a tyrosine phosphorylated, DNA binding Stat3beta dimer in bacteria. *FEBS Lett.*, **441**, 141-147.
- Benfey, P.N. und Chua, N.-H.** (1990): The cauliflower mosaic virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, **250**, 959-966.
- Bevan, M.** (1984): Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucl. Acids Res.*, **12**, 8711-8721.
- Biazzo, D.E., Motamedi, H., Mark, D.F. und Qureshi, S.A.** (2000): A high-throughput assay to identify compounds that can induce dimerization of the erythropoietin receptor. *Anal. Biochem.*, **278**, 39-45.
- Blau, C.A., Peterson, K.R., Drachman, J.G. und Spencer, D.M.** (1997): A proliferation switch for genetically modified cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3076-3081.

- Böhner, S.** (2000): Entwicklung eines Dexamethason-induzierbaren und Tetracyclin-reprimierbaren Genexpressionssystems in *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen
- Böhner, S., Lenk, I., Rieping, M., Herold, M. und Gatz, C.** (1999): Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J.*, **19**, 87-95.
- Borisjuk, N., Sitailo, L., Adler, K., Malysheva, L., Tewes, A., Borisjuk, L. und Manteuffel, R.** (1998): Calreticulin expression in plant cells: developmental regulation, tissue specificity and intracellular distribution. *Planta*, **206**, 504-514.
- Bouchez, D., Tokuhisa, J.G., Llewellyn, D.J., Dennis, E.S. und Ellis, J.G.** (1989): The ocs-element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.*, **8**, 4197-4204.
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1997): The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, **9**, 1573-1584.
- Bradford, M.M.** (1976): A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Brusslan, J.A., Karlin-Neumann, G.A., Huang, L. und Tobin, E.M.** (1993): An *Arabidopsis* mutant with a reduced level of *cab140* RNA is a result of cosuppression. *Plant Cell*, **5**, 667-677.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. und Dong, X.** (1994): Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, **6**, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. und Dong, X.** (1997): The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, **88**, 57-63.
- Cao, H., Li, X. und Dong, X.** (1998): Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 6531-6536.
- Cecchini, E., Mulligan, B.J., Covey, S.N. und Milner, J.J.** (1998): Characterization of gamma irradiation-induced deletion mutations at a selectable locus in *Arabidopsis*. *Mutat. Res.*, **401**, 199-206.
- Chaddick, M.X., Greenland, A.J., Jepson, I., Krause, K.P., Qu, N., Riddell, K.V., Salter, M.G., Schuch, W., Spnnewald, U. und Tomsett, A.B.** (1998): An ethanol-inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nat. Biotechnol.*, **16**, 177-180.

- Chen, M., Cheng, A., Chen, Y.Q., Hymel, A., Hanson, E.P., Kimmel, L., Minami, Y., Taniguchi, T., Changelian, P.S. und O'Shea, J.J.** (1997): The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 6910-6915.
- Chen, W., Chao, G. und Singh, K.B.** (1996): The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.*, **10**, 955-966.
- Chen, W. und Singh, K.B.** (1999): The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J.*, **19**, 667-677.
- Chen, Z. und Klessig, D.F.** (1991): Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease-resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8179-8183.
- Cheng, C.-L., Acedo, G.N., Dewdney, J. und M., G.H.** (1991): Differential expression of two *Arabidopsis* nitrate reductase genes. *Plant Physiol.*, **96**, 275-279.
- Chester, K.S.** (1933): The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.*, **8**, 275-324.
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F. und Dong, X.** (1998): Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterization of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell*, **10**, 557-569.
- Clough, S. und Bent, A.** (2000): Vapor-Phase Sterilization of *Arabidopsis* Seed. <http://plantpath.wisc.edu/~afb/vapster.html>.
- Clough, S.J. und Bent, A.F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735-743.
- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G.B.** (2001): Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 55-62.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R. und Klessig, D.F.** (1995): Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7143-7147.
- Conrath, U., Silva, H. und Klessig, D.F.** (1997): Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of PR-1 genes in tobacco. *Plant J.*, **11**, 747-757.
- Damen, J.E. und Krystal, G.** (1996): Early events in erythropoietin-induced signaling. *Exp. Hematol.*, **24**, 1455-1459.
- d'Andrea, A., Lodish, H.F. und Wong, G.G.** (1989): Expression cloning of the murine erythropoietin receptor. *Cell*, **57**, 277-285.
- Darnell, J.E.J.** (1997): STATs and gene regulation. *Science*, **277**, 1630-1635.

- de Rocher, E.J., Vargo, G.T.C., Diehn, S.H. und Green, P.J.** (1998): Direct evidence for rapid degradation of *Bacillus thuringiensis* toxin mRNA as a cause of poor expression in plants. *Plant Physiol.*, **117**, 1445-1461.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De-Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van-Montagu, M. und Leemans, J.** (1985): Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucl. Acids Res.*, **13**, 4777-4788.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. und Ryals, J.A.** (1995): *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 6602-6606.
- Dempsey, D.A., Shah, J. und Klessig, D.F.** (1999): Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.*, **18**, 547-575.
- Denecke, J.** (1998): Transient expression in plant protoplasts. {practical course script}.
- Denecke, J. und Vitale, A.** (1995): The use of protoplasts to study protein synthesis and transport by the plant endomembrane system. *In: Galbraith, D.W., Bourque, D.P. und Bohnert, H.J. (Hrsg.): Methods in Plant Cell Biology, Part B. Academic Press, San Diego, Vol. 50, pp. 335-347.*
- Depicker, A.G., Jacobs, A.M. und van Montagu, M.C.** (1988): A negative selection scheme for tobacco protoplast-derived cells expressing the T-DNA gene 2. *Plant Cell Rep.*, **7**, 63-66.
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. und Fobert, P.R.** (2000): The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, **12**, 279-290.
- Diehn, S.H., Chiu, W.L., de Rocher, E.J. und Green, P.J.** (1998): Premature polyadenylation at multiple sites within a *Bacillus thuringiensis* toxin gene-coding region. *Plant Physiol.*, **117**, 1433-1443.
- Dinesh-Kumar, S.P. und Baker, B.J.** (2000): Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1908-1913.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W.** (1988): High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 6127-6145.
- Du, H. und Klessig, D.F.** (1997): Identification of a soluble, high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. *Plant Physiol.*, **113**, 1319.
- Durner, J. und Klessig, D.F.** (1996): Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28492-28501.
- Elliott, S., Lorenzini, T., Yanagihara, D., Chang, D. und Elliott, G.** (1996): Activation of the erythropoietin (EPO) receptor by bivalent anti-EPO receptor antibodies. *J. Biol. Chem.*, **271**, 24691-24697.

- Feinberg, A.P. und Vogelstein, B.** (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Feltkamp, D., Masterson, R., Starke, J. und Rosahl, S.** (1994): Analysis of the involvement of ocs-like bZip-binding elements in the differential strength of the bidirectional mas1'2' promoter. *Plant Physiol.*, **105**, 259-268.
- Feng, J., Witthuhn, B.A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I.M. und Ihle, J.N.** (1997): Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 2497-2501.
- Finidori, J.** (2000): Regulators of growth hormone signaling. *Vitam. Horm.*, **59**, 71-97.
- Flor, H.H.** (1955): Host-parasite interactions in flax rust — its genetic and other implications. *Phytopathology*, **45**, 680-685.
- Flor, H.H.** (1971): Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 275.
- Frank, S.-J.** (2002): Receptor dimerization in GH and erythropoietin action — it takes two to tango, but how? *Endocrinology*, **143**, 2-10.
- Frisch, D.A., Harris-Haller, L.W., Yokubaitis, N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H. und Hall, T.C.** (1995): Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 405-409.
- Fulton, T.M., Chunwongse, J. und Tanksley, S.D.** (1995): Microprep protocol for Extraction of DNA from Tomato and other Herbaceous Plants. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **13**, 207-209.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. und Ryals, J.** (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, **261**, 754.
- Gallego, M.E., Sirand-Pugnet, P. und White, C.I.** (1999): Positive-negative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 83-93.
- Gatz, C., Froberg, C. und Wendenburg, R.** (1992): Stringent repression and homogenous de-repression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants. *Plant J.*, **2**, 397-404.
- Gatz, C. und Lenk, I.** (1998): Promoters that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.*, **9**, 352-358.
- Gatz, C. und Quail, P.H.** (1988): Tn10-encoded tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 1394-1397.
- Gauzzi, M.C., Barbieri, G., Richter, M.F., Uze, G., Ling, L., Fellous, M. und Pellegrini, S.** (1997): The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 11839-11844.

- Gilpatrick, J.D. und Weintraub, M.** (1952): An unusual type of protection with the carnation mosaic virus. *Science*, **115**, 701-702.
- Glazebrook, J.** (1999): Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 280-286.
- Glazebrook, J.** (2001): Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis — 2001 status. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 301-308.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E. und Ausubel, F.M.** (1996): Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, **143**, 973-982.
- Griko, Y.V., Makhatadze, G.I., Privalov, P.L. und Hartley, R.W.** (1994): Thermodynamics of barnase unfolding. *Protein Sci.*, **3**, 669-676.
- Guo, Z., Zhou, D. und Schultz, P.G.** (2000): Designing small-molecule switches for protein-protein interactions. *Science*, **288**, 2042-2045.
- Gutiérrez, R.A., MacIntosh, G.C. und Green, P.J.** (1999): Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanism of control. *Trends Plant Sci.*, **4**, 429-438.
- Haffani, Y.Z., Overney, S., Yelle, S., Bellemare, G. und Belzile, F.J.** (2000): Premature polyadenylation contributes to the poor expression of the Bacillus thuringiensis cry3Ca1 gene in transgenic potato plants. *Mol. Gen. Genet.*, **264**, 82-88.
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G.** (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
- Hartley, R.W.** (1969): Some environmental effects on the thermal transition of Bacillus amyloliquefaciens ribonuclease (barnase). *Biochemistry*, **8**, 2929-2932.
- Hartley, R.W.** (1975): A two-state conformational transition of the extracellular ribonuclease of Bacillus amyloliquefaciens (barnase) induced by sodium dodecyl sulfate. *Biochemistry*, **14**, 2367-2370.
- Hartley, R.W.** (1977): Complementation of peptides of barnase, extracellular ribonuclease of Bacillus amyloliquefaciens. *J. Biol. Chem.*, **252**, 3252-3254.
- Hartley, R.W.** (1988): Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease. *J. Mol. Biol.*, **202**, 913-915.
- Hartley, R.W.** (1989): Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together. *Trends Biochem. Sci.*, **14**, 450-454.
- Hartley, R.W.** (1993): Directed mutagenesis and barnase-barstar recognition. *Biochemistry*, **32**, 5978-5984.
- Hartley, R.W.** (2001): Barnase-barstar interaction. *Methods Enzymol.*, **341**, 599-611.

- Hartley, R.W. und Barker, E.A.** (1972): Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Nat. New Biol.*, **235**, 15-16.
- Hartley, R.W. und Rogerson, D.L., Jr.** (1972): Production and purification of the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and its intracellular inhibitor (barstar). I. Barnase. *Prep. Biochem.*, **2**, 229-242.
- Hartley, R.W. und Smeaton, J.R.** (1973): On the reaction between the extracellular ribonuclease of *Bacillus amyloliquefaciens* (barnase) and its intracellular inhibitor (barstar). *J. Biol. Chem.*, **248**, 5624-5626.
- Heim, M.H.** (1999): The Jak-STAT pathway: cytokine signalling from the receptor to the nucleus. *J. Recept. Signal Transduct. Res.*, **19**, 75-120.
- Heim, M.H., Kerr, I.M., Stark, G.R. und Darnell, J.E., Jr.** (1995): Contribution of STAT SH2 groups to specific interferon signaling by the Jak-STAT pathway. *Science*, **267**, 1347-1349.
- Heimer, Y.M., Brusslan, J.A., Kenigsbuch, D. und Tobin, E.M.** (1995): A chimeric Lhcb::Nia gene: an inducible counter selection system for mutants in the phytochrome signal transduction pathway. *Plant Mol. Biol.*, **27**, 129-136.
- Hobbie, L. und Estelle, M.** (1995): The axr4 auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* define a gene important for root gravitropism and lateral root initiation. *Plant J.*, **7**, 211-220.
- Hoey, T. und Schindler, U.** (1998): STAT structure and function in signaling. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **8**, 582-587.
- Holmes, F.O.** (1955): Preventive and curative effects of Thiouracil treatment in mosaic-hypersensitive tobacco. *Virology*, **1**, 1-9.
- Horvath, C.M., Wen, Z.L. und Darnell, J.E.** (1995): A stat protein domain that determines dna sequence recognition suggests a novel dna-binding domain. *Genes Dev.*, **9**, 984-994.
- Horvath, D.M. und Chua, N.H.** (1996): Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 1061-1072.
- Hou, J., Schindler, U., Henzel, W.J., Ho, T.C., Bresseur, M. und McKnight, S.L.** (1994): An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat. *Science*, **265**, 1701-1706.
- Huynh, T.V., Young, R.A. und Davis, R.W.** (1985): DNA cloning. *IRL Press*, Oxford.
- Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Lerner, A.C. und Finbloom, D.S.** (1994): Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 14333-14336.

- Ihle, J.N., Thierfelder, W., Teglund, S., Stravapodis, D., Wang, D., Feng, J. und Parganas, E.** (1998): Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **865**, 1-9.
- Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H.** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Ish-Horowicz, D. und Burke, J.F.** (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2989-2998.
- Jefferson, R.A.** (1987a): Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **5**, 387-405.
- Jefferson, R.A.** (1987b): GUS Gene Fusion System User's Manual. *Jefferson, Richard A.*, March 1987
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. und Bevan, M.W.** (1987): GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
- Johnson, C., Glover, G. und Arias, J.** (2001): Regulation of DNA binding and transactivation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 172-178.
- Johnson, D.L., Farrell, F.X., Barbone, F.P., McMahon, F.J., Tullai, J., Hoey, K., Livnah, O., Wrighton, N.C., Middleton, S.A., Loughney, D.A., Stura, E.A., Dower, W.J., Mulcahy, L.S., Wilson, I.A. und Jolliffe, L.K.** (1998): Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1. *Biochemistry*, **37**, 3699-3710.
- Jupin, I. und Chua, N.H.** (1996): Activation of the CaMV as-1 cis-element by salicylic acid: differential DNA-binding of a factor related to TGA1a. *EMBO J.*, **15**, 5679-5689.
- Karlin-Neumann, G.A., Brusslan, J.A. und Tobin, E.M.** (1991): Phytochrome control of the *tms2* gene in transgenic *Arabidopsis*: a strategy for selecting mutants in the signal transduction pathway. *Plant Cell*, **3**, 573-582.
- Katagiri, F., Lam, E. und Chua, N.H.** (1989): Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature*, **340**, 727-730.
- Keen, N.T.** (1992): Gene-for-Gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.*, **24**, 447-463.
- Kegler, C.** (2001): Analyse des Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation, *Georg-August Universität Göttingen*, Göttingen
- Kinkema, M., Fan, W. und Dong, X.** (2000): Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, **12**, 2339-2350.

- Klee, H.J., Horsch, R.B., Hinchee, M.A., Hein, M.B. und Hoffman, N.L.** (1987): The effect of overproduction of two *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA auxin biosynthetic gene products in transgenic petunia plants. *Genes Dev.*, **1**, 86-96.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. und Silva, H.** (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8849-8855.
- Klessig, D.F. und Malamy, J.** (1994): The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1439-1458.
- Klinedinst, S., Pascuzzi, P., Redman, J., Desai, M. und Arias, J.** (2000): A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 679-688.
- Klingmüller, U., Bergelson, S., Hsiao, J.G. und Lodish, H.F.** (1996): Multiple tyrosine residues in the cytosolic domain of the erythropoietin receptor promote activation of STAT5. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8324-8328.
- Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L.C., Neel, B.G. und Lodish, H.F.** (1995): Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of JAK2 and termination of proliferative signals. *Cell*, **80**, 729-738.
- Klingmüller, U., Wu, H., Hsiao, J.G., Toker, A., Duckworth, B.C., Cantley, L.C. und Lodish, H.F.** (1997): Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3016-3021.
- Kobayashi, T., Hisajima, S., Stougaard, J. und Ichikawa, H.** (1995): A conditional negative selection for *Arabidopsis* expressing a bacterial cytosine deaminase gene. *Jap. J. Genet.*, **70**, 409-422.
- Koncz, C. und 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. *Mol. Gen. Genet.*, **204**, 383-396.
- Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumar, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N. und et al.** (1995): Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J. Biol. Chem.*, **270**, 20915-20921.
- Krawczyk, S., Thurow, C., Niggeweg, R. und Gatz, C.** (2002): Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 775-781.

- Kriete, G., Niehaus, K., Perlick, A.M., Puhler, A. und Broer, I.** (1996): Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant J.*, **9**, 809-818.
- Kuc, J.** (1982): Induced immunity to plant disease resistance. *BioScience*, **32**, 854-860.
- Kumar, D. und Klessig, D.F.** (2000): Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **13**, 347-351.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984): Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **10**, 203-209.
- LaBrie, S.T., Wilkinson, J.Q. und Crawford, N.M.** (1991): Effect of chlorate treatment on nitrate reductase and nitrite reductase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, **97**, 873-879.
- Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.X. und Chua, N.H.** (1989): Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 7890-7894.
- Lam, E., Katagiri, F. und Chua, N.H.** (1990): Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter. *J. Biol. Chem.*, **265**, 9909-9913.
- Lam, E. und Lam, Y.K.** (1995): Binding site requirements and differential representation of TGA factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acids Res.*, **23**, 3778-3785.
- Lamb, C.J.** (1994): Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. *Cell*, **76**, 419-422.
- Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M. und Dixon, R.A.** (1989): Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell*, **56**, 215-224.
- Lämmli, U.K.** (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L.** (1988): The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-1764.
- Le Gouill, C., Parent, J.L., Rola-Pleszczynski, M. und Stankova, J.** (1994): Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Anal. Biochem.*, **219**, 164.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. und Ward, E.** (1998): Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **16**, 223-233.
- Leyser, H.M.O. und Furner, I.J.** (2000): EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. http://www.arabidopsis.org/comguide/chap_1_plants/6_EMS_mutagenesis.html.

- Li, X., Zhang, Y.L., Clarke, J.D., Li, Y. und Dong, X.N.** (1999): Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell*, **98**, 329-339.
- Lightner, J. und Caspar, T.** (1998): Seed Mutagenesis of Arabidopsis. *In: Martínez-Zapater, J.M. und Salinas, J. (Hrsg.): Arabidopsis Protocols. Humana Press, Totowa, N. J., Vol. 82, pp. 91-104.*
- Liu, K.D., Gaffen, S.L. und Goldsmith, M.A.** (1998): JAK/STAT signaling by cytokine receptors. *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 271-278.
- Liu, X.J. und Lam, E.** (1994): Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.*, **269**, 668-675.
- Livnah, O., Stura, E.A., Johnson, D.L., Middleton, S.A., Mulcahy, L.S., Wrighton, N.C., Dower, W.J., Jolliffe, L.K. und Wilson, I.A.** (1996): Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å. *Science*, **273**, 464-471.
- Livnah, O., Stura, E.A., Middleton, S.A., Johnson, D.L., Jolliffe, L.K. und Wilson, L.A.** (1999): Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, **283**, 987-990.
- Lubenow, H.** (1997): Genetische, molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Funktion des *axi1* Gens in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*. Inaugural-Dissertation, *Universität zu Köln, Köln*
- Luo, H., Rose, P., Barber, D., Hanratty, W.P., Lee, S., Roberts, T.M., d'Andrea, A.D. und Dearolf, C.R.** (1997): Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 1562-1571.
- Maher, E.P. und Martindale, S.J.** (1980): Mutants of *Arabidopsis thaliana* with altered responses to auxins and gravity. *Biochem. Genet.*, **18**, 1041-1053.
- Makarov, A.A., Protasevich, I.I., Lobachov, V.M., Kirpichnikov, M.P., Yakovlev, G.I., Gilli, R.M., Briand, C.M. und Hartley, R.W.** (1994): Thermostability of the barnase-barstar complex. *FEBS Lett.*, **354**, 251-254.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F. und Raskin, I.** (1990): Salicylic acid: A Likely Endogenous Signal in the Resistance Response of Tobacco to Viral Infection. *Science*, **250**, 1002-1005.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. und Dietrich, R.A.** (2000): The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.*, **26**, 403-410.
- Mansour, S.L., Thomas, K.R. und Capecchi, M.R.** (1988): Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature*, **336**, 348-352.

- Mariani, C., de Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J. und Goldberg, R.B.** (1990a): Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, **347**, 737-741.
- Mariani, C., Gossele, V., de Beuckeleer, M., de Block, M. und Goldberg, R.B.** (1990b): A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male-sterile plants. *Nature*, **357**, 384-387.
- Martinez, A., Sparks, C., Drayton, P., Thompson, J., Greenland, A. und Jepson, I.** (1999a): Creation of ecdysone receptor chimeras in plants for controlled regulation of gene expression. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 546-552.
- Martinez, A., Sparks, C., Hart, C.A., Thompson, J. und Jepson, I.** (1999b): Ecdysone agonist inducible transcription in transgenic tobacco plants. *Plant J.*, **19**, 97-106.
- Matthews, D.J., Topping, R.S., Cass, R.T. und Giebel, L.B.** (1996): A sequential dimerization mechanism for erythropoietin receptor activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 9471-9476.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B., Gaille, C., Kull, B., Haas, D. und Reimann, C.** (2001): Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase. *Plant J.*, **25**, 67-77.
- Mayda, E., Mauch-Mani, B. und Vera, P.** (2000): *Arabidopsis* *dth9* mutation identifies a gene involved in regulating disease susceptibility without affecting salicylic acid-dependent responses. *Plant Cell*, **12**, 2119-2128.
- Merkle, T., Leclerc, D., Marshallsay, C. und Nagy, F.** (1996): A plant in vitro system for the nuclear import of proteins. *Plant J.*, **10**, 1177-1186.
- Métraux, J.-P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. und Inverardi, B.** (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004.
- Mett, V.L., Lochhead, L.P. und Reynolds, P.H.S.** (1996): Copper-controllable gene expression system for whole plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4567-4571.
- Miura, O., Nakamura, N., Quelle, F.W., Witthuhn, B.A., Ihle, J.N. und Aoki, N.** (1994): Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosin kinase with the erythropoietin receptor *in vivo*. *Blood*, **84**, 1501-1507.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A.** (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**, 335-350.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 473-497.
- NASC.** (2002): Search NASC Catalogue. http://seeds.nottingham.ac.uk/Nasc/action.lasso?-database=seed3.fp3&-layout=web&-response=detail/detail_general.lasso&-token.response=noreturn&-search&code=1092&-token.user=17712594694.

- Neuhaus, G., Neuhaus-Url, G., Katagiri, F., Seipel, K. und Chua, N.H.** (1994): Tissue-specific expression of *as-1* in transgenic tobacco. *Plant Cell*, **6**, 827-834.
- Niggeweg, R.** (1999): Salizylsäure- und Auxin-induzierte Genexpression in *Nicotiana tabacum*: Funktionelle Bedeutung der TGA-Faktoren der Subklasse II. Dissertation, *Universität Bielefeld*, Bielefeld
- Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C. und Gatz, C.** (2000a): Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of *as-1*-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of *as-1*-containing target promoters. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19897-19905.
- Niggeweg, R., Thurow, C., Weigel, R., Pfitzner, U. und Gatz, C.** (2000b): Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 775-788.
- Nussaume, L., Vincent, M. und Caboche, M.** (1991): Constitutive nitrate reductase: a dominant conditional marker for plant genetics. *Plant J.*, **1**, 267-274.
- Ohtake, Y., Takahashi, T. und Komeda, Y.** (2000): Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 1038-1044.
- Pascuzzi, P., Hamilton, D., Bodily, K. und Arias, J.** (1998): Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant basic/leucine-zipper factor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26631-26637.
- Pellegrini, S. und Dusanter-Fourt, I.** (1997): The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur. J. Biochem.*, **248**, 615-633.
- Perera, R.J., Linard, C.G. und Signer, E.R.** (1993): Cytosine deaminase as a negative selective marker for *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*, **23**, 793-799.
- Peterson, M., Brodersen, P., H., N., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattson, O., Jensen, A.B. und Mundy, J.** (2000): *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, **103**, 1111-1120.
- Pickett, F.B., Wilson, A.K. und Estelle, M.** (1990): The *aux1* Mutation of *Arabidopsis* confers both Auxin and Ethylene Resistance. *Plant Physiol.*, **94**, 1462-1466.
- Pieterse, C.M.J. und van Loon, L.C.** (1999): Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.*, **4**, 52-58.
- Pieterse, C.M.J., vanWees, S.C.M., vanPelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J. und vanLoon, L.C.** (1998): A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.

- Pontier, D., Miao, Z.-H. und Lam, E.** (2001): Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.*, **27**, 529-238.
- Qin, X.F., Holuigue, L., Horvath, D.M. und Chua, N.H.** (1994): Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell*, **6**, 863-874.
- Qureshi, S.A., Kim, R.M., Konteatis, Z., Biazzo, D.E., Motamedi, H., Rodrigues, R., Boice, J.A., Calaycay, J.R., Bednarek, M.A., Griffin, P., Gao, Y.D., Chapman, K. und Mark, D.F.** (1999): Mimicry of erythropoietin by a nonpeptide molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12156-12161.
- Rairdan, G.J., Donofrio, N.M. und Delaney, T.P.** (2001): Salicylic acid and NIM1/NPR1-independent gene induction by incompatible *Peronospora parasitica* in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **14**, 1235-1246.
- Raleigh, E.A., Lech, K. und Brent, R.** (1989): Selected topics from classical bacterial genetics. *In: Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Albright, C.M., Coen, D.M. und Verki, A. (Hrsg.): Current protocols in molecular biology.* Wiley, New York, Vol. 1a, pp. 1.4.1-1.4.16.
- Rauscher, M., Adam, A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K. und Deising, H.B.** (1999): PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.*, **19**, 625-633.
- Reed, J.W., Nagatani, A., Elich, T.D., Fagan, M. und Chory, J.** (1994): Phytochrome A and phytochrome B have overlapping but distinct functions in *Arabidopsis* development. *Plant Physiol.*, **104**, 1139-1149.
- Remy, I., Wilson, I.A. und Michnick, S.W.** (1999): Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, **283**, 990-993.
- Rieping, M., Fritz, M., Prat, S. und Gatz, C.** (1994): A dominant negative mutant of PG13 suppresses transcription from a cauliflower mosaic virus 35S truncated promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, **6**, 1087-1098.
- Risseuw, E., Franke-van-Dijk, M.E. und Hooykaas, P.J.** (1997): Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome. *Plant J.*, **11**, 717-728.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H. und Jones, J.D.** (1999): Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*, **11**, 273-287.
- Rosahl, S., Schmidt, R., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987): Expression of a tuber-specific storage protein in transgenic tobacco plants: demonstration of an esterase activity. *EMBO J.*, **6**, 1155-1159.

- Ross, A.F.** (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*, **14**, 340-358.
- Ross, A.F. und Bozarth, R.F.** (1960): Resistance induced in one plant as a result of virus infection in another part. (Abstract). *Phytopathology*, **50**, 652.
- Rossetti, S. und Bonatti, P.M.** (2001): In situ histochemical monitoring of ozone- and TMV-induced reactive oxygen species in tobacco leaves. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**, 433-442.
- Ruff-Jamison, S., Chen, K. und Cohen, S.** (1993): Induction by EGF and interferon- γ of tyrosine phosphorylated DNA binding proteins in mouse liver nuclei. *Science*, **261**, 1733-1736.
- Rushton, P.J. und Somssich, I.E.** (1998): Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **1**, 311-315.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P. und Uknes, S.** (1997): The Arabidopsis *NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell*, **9**, 425-439.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. und Hunt, M.D.** (1996): Systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **8**, 1809-1819.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Saxon, J.P., Srivastan, E.S., Leipzig, G.V., Sameshima, J.H. und Stanbridge, E.J.** (1985): Selective transfer of individual human chromosomes to recipient cells. *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 140-146.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. und Manners, J.M.** (2000a): Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11655-11660.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. und Manners, J.M.** (2000b): Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis, supplemental data. <http://www.tpp.uq.edu.au/microarray/clusterdata.htm> oder <http://www.pnas.org>.
- Schiermeyer, A.** (2001): Klonierung und Charakterisierung eines neuartigen Transkriptionsfaktore der TGA-Familie aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation, *Georg-August-Universität Göttingen*, Göttingen
- Schindler, C. und Darnell, J.E., Jr.** (1995): Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **64**, 621-651.

- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. und Schaffner, W.** (1989): Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6419.
- Shah, J., Kachroo, P. und Klessig, D.F.** (1999): The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell*, **11**, 191-206.
- Shah, J., Tsui, F. und Klessig, D.F.** (1997): Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA-inducible expression of the *tms2* gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **10**, 69-78.
- Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D. und Darnell, J.E., Jr.** (1994): Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, **76**, 821-828.
- Silvennoinen, O., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Cleveland, J.L., Yi, T. und Ihle, J.N.** (1993): Structure of the murine Jak2 protein-tyrosine kinase and its role in interleukin 3 signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 8429-8433.
- Smith, E.F., Brown, N.A. und Townsend, C.O.** (1911): Crown-gall of plants: its cause and remedy. *U. S. Dept. Agr. Bur. Pl. Indus. Bull.*, 213.
- Stange, C., Ramirez, I., Gomez, I., Jordana, X. und Holuigue, L.** (1997): Phosphorylation of nuclear proteins directs binding to salicylic acid-responsive elements. *Plant J.*, **11**, 1315-1324.
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G. und Jones, J.D.** (1995): Molecular genetics of plant disease resistance. *Science*, **268**, 661-667.
- Stocklin, E., Wissler, M., Goilleux, F. und Groner, B.** (1996): Functional interactions between STAT5 and the glucocorticoid receptor. *Nature*, **383**, 726-728.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C. und Botterman, J.** (1995): Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Biotechnology*, **13**, 1085-1089.
- Strompen, G., Gruner, R. und Pfitzner, U.M.** (1998): An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **37**, 871-883.
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W. und Brisson, N.** (2001): Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.*, **19**, 769-772.
- Sutherland, M.W.** (1991): The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **39**, 79-93.
- Suzuki, K. und Shinsai, H.** (1995): Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell*, **7**, 639-647.

- Syed, R.S., Reid, S.W., Li, C., Cheetham, J.C., Aoki, K.H., Liu, B., Zhan, H., Osslund, T.D., Chirino, A.J., Zhang, J., Finer-Moore, J., Elliott, S., Sitney, K., Katz, B.A., Matthews, D.J., Wendoloski, J.J., Egrie, J. und Stroud, R.M.** (1998): Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature*, **395**, 511-516.
- Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, T., Machida, Y., Takebe, I. und Nagata, T.** (1989): Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from G0 to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9279-9283.
- Tanner, J.W., Chen, W., Young, R.L., Longmore, G.D. und Shaw, A.S.** (1995): The conserved box 1 motif of cytokine receptore is required for association with JAK kinases. *J. Biol. Chem.*, **270**, 6523-6530.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L. und Sheen, J.** (2001): Plant mitogan-sctivated protein kinase signaling cascades. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 392-400.
- Thomma, B., Tierens, K.F.M., Penninckx, I., Mauch Mani, B., Broekaert, W.F. und Cammue, B.P.A.** (2001a): Different micro-organisms differentially induce Arabidopsis disease response pathways. *Plant Physiol. Biochem.*, **39**, 673-680.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. und Broekaert, W.F.** (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 15107-15111.
- Thomma, B.P.H.J., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F. und Cammue, B.P.A.** (2001b): The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Immunol.*, **13**, 63,68.
- ThykJær, T., Finnemann, J., Schauser, L., Christensen, L., Poulsen, C. und Stougaard, J.** (1997): Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking regions. *Plant Mol. Biol.*, **35**, 523-530.
- Towbin, H., Staehlin, T. und Gordon, J.** (1979): Electrophoretic transfer of proteins from SDS and acid/urea polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350.
- Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E. und Ryals, J.** (1993): Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell*, **5**, 159-169.
- van der Biezen, E.A. und Jones, J.D.** (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends. Biochem. Sci.*, **23**, 454-456.
- van der Zaal, E.J., Memelink, J., Mennes, A.M., Quint, A. und Libbenga, K.R.** (1987): Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. *Plant Mol. Biol.*, **10**, 145-157.

- Verbene, M.C., Verpoorte, R., Bol, J.F., Mercado-Blanco, J. und Linthorst, H.J.** (2000): Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotechnol.*, **18**, 779-783.
- Vervliet, G., Holsters, M., Teuchy, H., Van-Montagu, M. und Schell, J.** (1975): Characterization of different plaque-forming and defective temperate phages in *Agrobacterium*. *J. Gen. Virol.*, **26**, 33-48.
- Vignais, M.L., Sadowski, H.B. und Watling, D.** (1996): Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 1759-1769.
- Wang, H.X., Viret, J.F., Eldridge, A., Perera, R., Signer, E.R. und Chiurazzi, M.** (2001): Positive-negative selection for homologous recombination in *Arabidopsis*. *Gene*, **272**, 249-255.
- Watowich, S.S., Yoshimura, A., Longmore, G.D., Hilton, D.J., Yoshimura, Y. und Lodish, H.F.** (1992): Homodimerization and constitutive activation of the erythropoietin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 2140-2144.
- Weigel, R.R., Bäuscher, C., Pfitzner, A.J.P. und Pfitzner, U.M.** (2001): NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.*, **46**, 143-160.
- Weinmann, P., Gossen, M., Hillen, W., Bujard, H. und Gatz, C.** (1994): A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *Plant J.*, **5**, 559-569.
- Wen, X., Lin, H.H., Shih, H.M., Kung, H.J. und Ann, D.K.** (1999): Kinase activation of the non-receptor tyrosine kinase Etk/BMX alone is sufficient to transactivate STAT-mediated gene expression in salivary and lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **274**, 38204-38210.
- Wendehenne, D., Durner, J., Chen, Z. und Klessig Daniel, F.** (1998): Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. *Phytochemistry*, **47**, 651-657.
- Wertman, K.F., Wyman, A.R. und Botstein, D.** (1986): Host / vector interactions which affect the viability of recombinant phage lambda clones. *Gene*, **49**, 253-262.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F. und Staskawicz, B.J.** (1991): Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-59.
- White, R.F.** (1979): Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology*, **99**, 410-412.

- Wilson, A.K., Pickett, F.B., Turner, J.C. und Estelle, M.** (1990): A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Mol. Gen. Genet.*, **222**, 377-383.
- Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. und Ihle, J.N.** (1993): JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*, **74**, 227-236.
- Wrighton, N.C., Farrell, F.X., Chang, R., Kashiap, A.K., Barbone, F.P., Mulcahy, L.S., Johnson, D.L., Barrett, R.W., Jolliffe, L.K. und Dower, W.J.** (1996): Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin. *Science*, **273**, 458-463.
- Xiang, C. und Guerra, D.J.** (1993): The anti-*nptII* gene. A potential negative selective marker for plants. *Plant Physiol.*, **102**, 287-293.
- Xiang, C., Miao, Z.H. und Lam, E.** (1996): Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 415-426.
- Yang, K.Y., Kim, E.Y., Kim, C.S., Guh, J.O., Kim, K.C. und Cho, B.H.** (1998): Characterization of a glutathione S-transferase gene *ATGST 1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, **17**, 700-704.
- Yang, Y., Li, R. und Qi, M.** (2000): In vivo analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. *Plant J.*, **22**, 543-551.
- Yang, Y.O. und Klessig, D.F.** (1996): Isolation and characterization of a tobacco mosaic virus-inducible myb oncogene homolog from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 14972-14977.
- Zhang, B. und Singh, K.B.** (1994): ocs element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 2507-2511.
- Zhang, S., Du, H. und Klessig, D.F.** (1998): Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell*, **10**, 435-450.
- Zhang, S. und Klessig, D.F.** (1997): Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell*, **9**, 809-824.
- Zhang, S.Q. und Klessig, D.F.** (1998): The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7225-7230.
- Zhang, S.Q. und Klessig, D.F.** (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci.*, **6**, 520-527.
- Zhang, Y.L., Fan, W.H., Kinkema, M., Li, X. und Dong, X.N.** (1999): Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6523-6528.

- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. und Klessig, D.F.** (2000): NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **13**, 191-202.
- Zimmerli, L., Metraux, J.P. und Mauch-Mani, B.** (2001): beta-Aminobutyric acid-induced protection of Arabidopsis against the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, **126**, 517-523.

3.3 Anhang

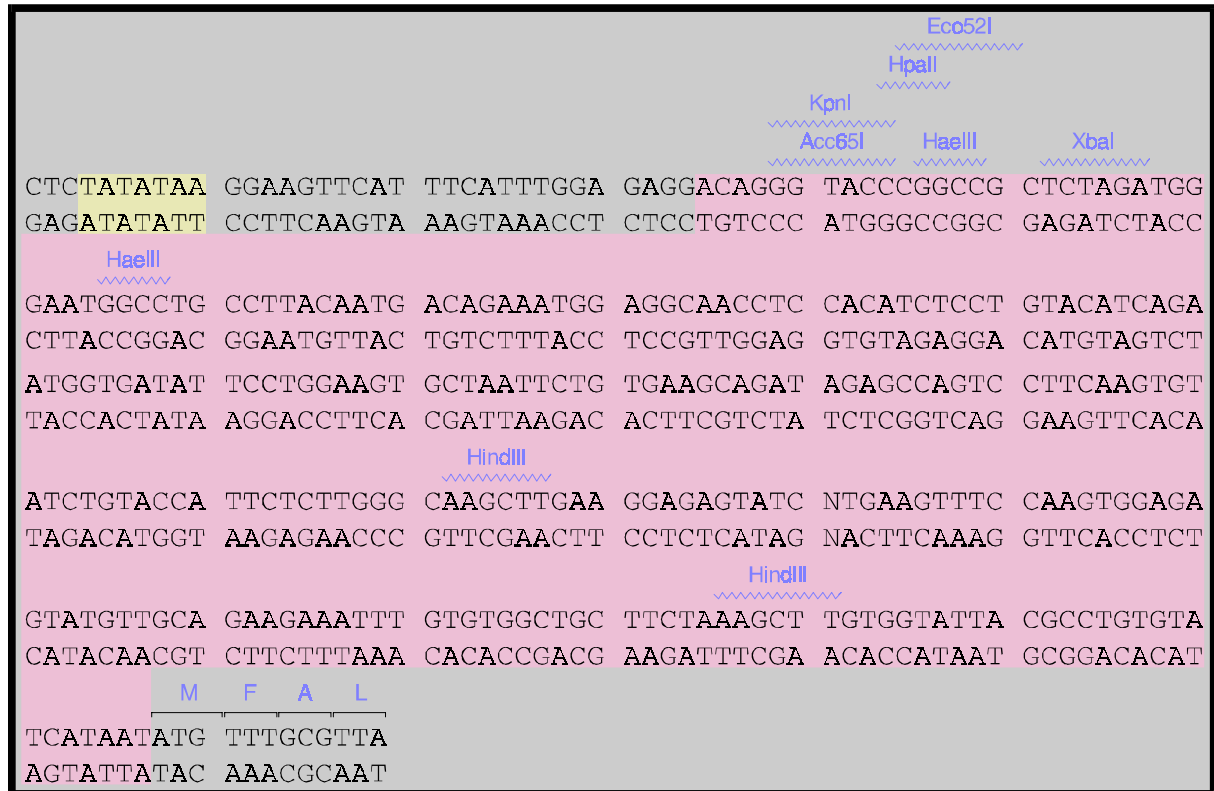


Abbildung 92: Darstellung des 5'-UTR des Jak2-Gens aus dem Plasmid UCA7-mJak2

Die 285 bp lange 5'-untranslatierte Region desmJak2-Gens aus dem Plasmid pUCA7-mJak2 ist rosa unterlegt. Die TATA-Box ist durch eine gelbe Markierung gekennzeichnet.

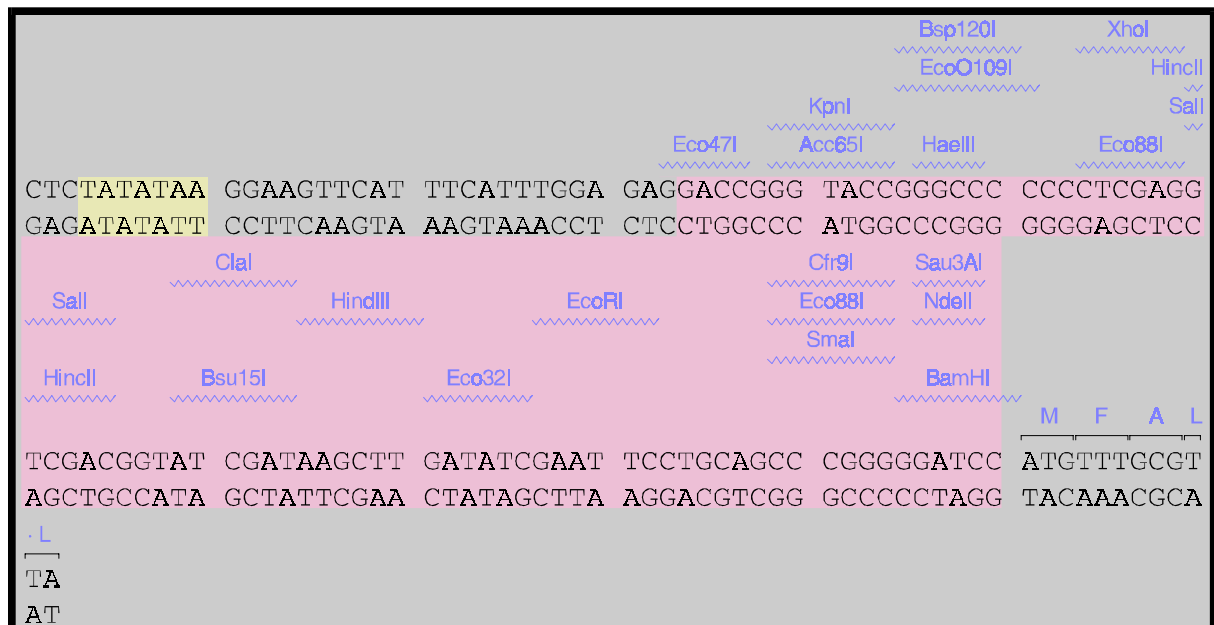


Abbildung 93: Darstellung der 5'-UTR des Jak2-Gens aus dem Plasmid pRT106-mJak2tausch

Die 76 lange 5'-untranslatierte Region desmJak2-Gens aus dem Plasmid pUCA7-mJak2 ist rosa unterlegt. Die TATA-Box ist durch eine gelbe Markierung gekennzeichnet.

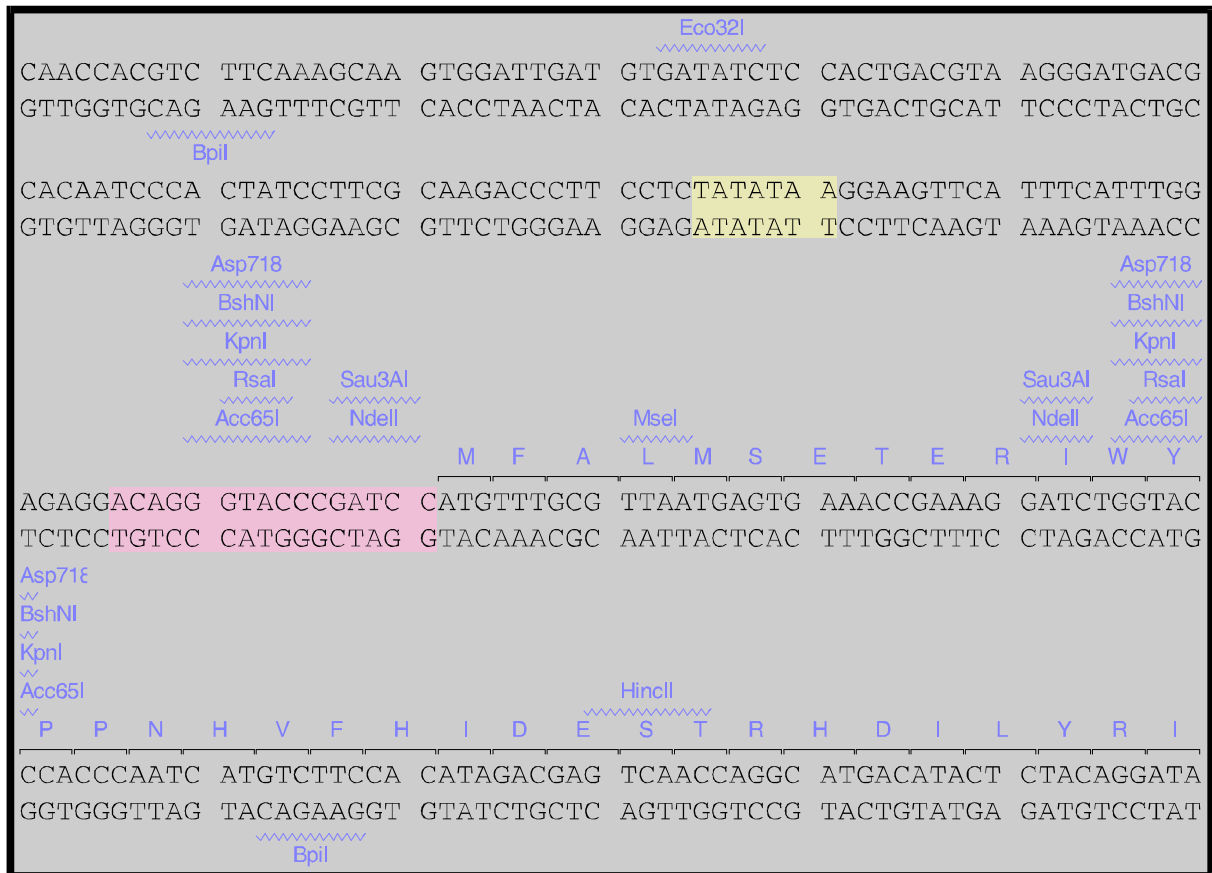


Abbildung 94: : Darstellung der 5'-UTR des Jak2-Gens aus dem Plasmid pUCA7-mJak2tausch

Die 16 lange 5'-untranslatierte Region desmJak2-Gens aus dem Plasmid pUCA7-mJak2 ist rosa unterlegt. Die TATA-Box ist durch eine gelbe Markierung gekennzeichnet

3.4 Danksagung

Zuerst möchte ich Frau Professorin Dr. Christiane Gatz meinen verbindlichen Dank aussprechen, die mir beide Projekte vertrauensvoll zur Bearbeitung überlassen hat und meine Arbeit stets durch neue Ideen und Vorschläge bereichert hat.

Herrn Professor Dr. Hans-Walter Heldt danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Die ehemaligen und jetzigen Mitglieder der Arbeitsgruppe haben durch ihre Hilfsbereitschaft, und durch ein exzellentes Betriebsklima das Werden der vorliegenden Arbeit erst möglich gemacht. Es ist sicher nicht selbstverständlich, daß auch außerhalb der Arbeit so viel freundschaftliche Verbundenheit herrscht. Insbesondere gilt dies für die Mitbewohner von Labor 334: Ian, Ronald, Steffi, Heike und Andreas

Namentlich danken möchte ich den technischen Assistenten Ronald Scholz, Alexandra Frey und Anna Hermann, die unermüdlich für Nachschub an sauberen Geräten und kompetenten Zellen sorgten. Ronald und Anna führten auch Versuche zu Ende, die während der Schreibphase noch zu erledigen waren. Am Entstehen der Ergebnisse in den Kapiteln 1.3.3.19, 1.3.3.20, 1.3.3.21 und 1.3.3.22 waren sie maßgeblich beteiligt.

Stefanie Krawczyk, und Corinna Thurow haben sich als fachliche Lektoren um die Fehlerfreiheit der Arbeit verdient gemacht. Sandra Lipproß hat unerbittlich Tippfehler und grammatikalische Verrenkungen ausgemerzt.

Peter Pimpl von der Abteilung für Cytologie danke ich für die Hilfe beim "Troubleshooting" meiner ersten Western-Blots, ohne die niemals Banden sichtbar geworden wären.

Katharina Pawlowski aus der Biochemie verdanke ich unzählige Tricks, Kniffe, Ideen, Anregungen, etliche Artikel aus der Zeitschrift MPMI und nicht zuletzt den Hinweis auf die Promotionsarbeit von Helge Lubenow.

Die Gärtner Uwe Wedemeyer und Felicitas Glasenapp versorgten die Tabakpflanzen mit viel Wasser und frischer Erde auf daß sie prächtig gediehen.

Viele Herren von der betriebstechnischen Abteilung waren daran beteiligt, daß aus einer störanfälligen Ansammlung alter Rohrleitungen und Ventile wieder eine zuverlässig laufende Klimakammer wurde, indem sie unzählige Ersatzteile besorgten und austauschten. Hierfür ein besonderes Dankeschön, denn so wurde die Anzucht von *Arabidopsis* ohne ständige Verluste erst möglich.

Folgenden Personen und Organisationen danke ich für die freundliche und kostenlose Überlassung von Samen und Chemikalien: Jyoti Shah für die *Arabidopsis*-Linie ssi1, Weihua Fan für die *Arabidopsis*-Linien cpr1 und cpr6, Prof. Dr. Alfred Batschauer für die *Arabidopsis*-Linie phyA/phyB; Ursula Klingmüller für das Plasmid pXM-EpoR, T. Decker für die Plasmide pSK-mJak2, pRS306-3×GAS-CYC und pYCplac111-Stat5b*VP16; der Firma Janssen-Cilag für die kostenlose Überlassung von 12 Ampullen Erythropoietin.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben und mich während der neun Jahre Studienzeit in jeder Hinsicht unterstützt haben.

3.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich die vorliegende zweiteilige Dissertation mit den Titeln „Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion“ und „Expression von tierischen Signaltransduktionskomponenten in Tabak zur Herstellung eines induzierbaren Expressionssystems“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Göttingen, den 13.05.2002

Wolfram Brenner

3.6 Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich an keiner anderen Universität um einen Doktorgrad beworben habe.

Göttingen, den 13.05.2002

Wolfram Brenner

3.7 Lebenslauf

Name: Georg Wolfram Brenner
Anschrift: Weender Straße 80
37073 Göttingen
Geburtsdatum: 25. Juli 1971
Geburtsort: Volkmarsen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung: 1978 – 1982 Grundschule am Heideweg, Kassel
1982 – 1991 Friedrichsgymnasium, Altsprachliches Gymnasium mit reformierter Oberstufe, Kassel

Schulabschluß: 10.06.1991 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Wehr- bzw. Ersatzdienst: befreit

Berufsausbildung: 1991 – 1993 Ausbildung zum Biologisch-technischen Assistenten an der Chemieschule Münden, Hannoversch Münden

Berufsabschluß: 18.06.1993 Staatlich geprüfter Biologisch-technischer Assistent

Studium: 1993 – 1998 Diplomstudiengang Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen. Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Lichtinduzierte Änderungen des Phosphorylierungsstatus von plasmamembranassoziierten Proteinen in *Chlorella saccharophila*: Ereignisse in der Signaltransduktion zur Regulation des Stickstoffmetabolismus durch Licht“

Studienabschluß: 07.08.1998 Diplom-Biologe mit der Note „gut“

Berufliche Laufbahn: 09/98 – 12/98 Wissenschaftliche Hilfskraft am Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften der Universität Göttingen, Abteilung für Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze

seit 01.01.99 Wissenschaftlicher Mitarbeiter ebenda mit Gelegenheit zur Promotion. Anfertigung der vorliegenden zweiteiligen Dissertation mit den Titeln „Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion“ und „Expression von tierischen Signaltransduktionskomponenten in Tabak zur Herstellung eines induzierbaren Expressionssystems“.

Göttingen, den 24.08.2002