Identifikation und Regulation einer durch Insektenfraß induzierbaren Geranyllinalool-Synthase in Arabidopsis thaliana



DIBBBOPCHOCOL

Marco Herde Göttingen 2006

# Identifikation und Regulation einer durch Insektenfraß induzierbaren Geranyllinalool-Synthase in *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

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

> vorgelegt von Marco Herde aus Alfeld

Göttingen 2006

# D7

Referent: Korreferent: Tag der mündlichen Prüfung: Prof. Dr. Christiane Gatz PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser 17.01.2007

# Inhaltsverzeichnis

# Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung1
1.1	Mechanismen der Abwehr in Pflanzen1
1.2	Molekulare Grundlage der Pflanzen-Pflanzen- und Pflanzen- Insekteninteraktion
1.3	Die Terpenbiosynthese im Überblick2
1.4	Evolution der Terpensynthasen4
1.5	Die Induktion der pflanzlichen Abwehr5
1.6	Abbau negativer Regulatoren als zentrales Ereignis der JA Signalkaskade7
1.7	Zielsetzung
2	Material
2.1	Geräte
2.2	Verbrauchmaterialien
23	Chemikalien 12
2.5	Vita 12
2.4	Kits
2.5	Enzyme
2.6	Nukleinsäuren14
2.6	.1 Grössenstandard14
2.6	.2 Oligonukleotide für EMSA
2.6	.3 Oligonukleotide
2.6	.4 Plasmide
2.6	.5 Hybridisierungssonden
2.7	Organismen
2.7	.1 Bakterien19
2.7	.2 <i>A. thaliana</i> Pflanzen/Genotypen20
2.7	.3 Tabak Pflanzen/Genotypen
2.7	.4 Insekten
2.8	Nährmedien und Zusätze
2.8	.1 Medien für die Anzucht Bakterien
2.8	.2 Medien für die Anzucht von Pflanzen
2.8	.3 Zusätze für Medien
2.9	Lösungen und Puffer

2.9.1	Standardlösungen und Puffer	24
2.9.2	Extraktion von Kernproteinen	24
2.9.3	EMSA	24
2.9.4	RNA-Extraktion	24
2.9.5	Nothern-Blot Analyse/denaturierende RNA Gelelektrophorese	24
2.9.6	Präparation pflanzlicher genomischer DNA	25
2.9.7	Alkalische Lyse von E. coli	25
2.9.8	Transformation von E. coli	25
2.10 Sof	ftware	25
3 Me	ethoden	26
3.1 Me	thoden zur Anzucht und Kultivierung von Organismen	26
3.1.1	Bakterien	26
3.1.2	Pflanzen	26
3.1.2.	1 Kultivierung von <i>N. tabacum</i>	26
3.1.2.	2 A. thaliana auf Erde	26
3.1.2.	3 Oberflächensterilisation von A. thaliana-Samen	26
3.1.2.	4 Sterile Anzucht von A. <i>thaliana</i>	27
3.1.2.	5 Kreuzung von A. <i>thaliana</i> Pflanzen	27
3.1.2.	6 Samengewinnung aus A. thaliana	27
3.1.2.	7 Hydroponische Anzucht von A. <i>thaliana</i>	27
3.1.2.	8 Induktion der Genexpression in A. thaliana	27
3.1.2.	9 Identifikation von T-DNA Insertionslinien in <i>At1g61120</i>	
3.1.2.	10 Selektion von homozygoten <i>coil</i> -Mutanten	
3.2 Klo	onierung	28
3.2.1	Restriktionsspaltung	
3.2.2	Ligation	
3.2.3	Das Gateway <sup>™</sup> -Kloniersystem	29
3.2.4	Klonierung von PCR-Produkten	29
3.2.5	Blau-Weiss Selektion	
3.2.6	Hybridisierung von Oligonukleotiden zu Doppelsträngen	
3.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	
3.2.8	Sequenzierung	
3.2.9	Plasmide für Northern-Analyse und EMSA	31
3.2.10	Transgene Pflanzen 35S::AtGLS und AlcA::At1g61120	31
3.2.11	Transgene Pflanzen 35S::AtGLS <sub>ORF</sub>	32
3.2.12	Transgene Pflanzen 35S::AtGLS:YFP	
3.2.13	Transgene Pflanzen AtGLS::GUS	
3.2.14	Transgene Pflanzen AtGLS::PAT; 35S::PAT und AtGLS::LUC	
3.2.15	Transgene Pflanzen ABC::GUS und ABD::GUS	33
3.2.16	Transgene Pflanzen BCD::LUC	33

3.3.1EMS Mutagenese.333.3.2Neutronen Mutagenese.343.3.3Herstellung kompetenter E. coli Zellen.343.3.4Transformation von E. coli343.3.5Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen.343.3.6Gentransfer in A. tumefaciens.353.3.7Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana.353.3.8Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum.353.4Präparation und Analyse von Nukleinsäuren.363.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen.363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen.363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.373.4.8Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran.393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Andryse von Volatilen403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Preiparation von Kemproteinen.413.7.1Zellkernisobestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines rad		3.3 Met	thoden zur genetischen Manipulation	33
3.3.2Neutronen Mutagenese343.3.3Herstellung kompetenter E. coli Zellen343.3.4Transformation von E. coli343.3.5Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen343.3.6Gentransfer in A. tumefaciens353.3.7Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana353.3.8Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum353.4Präparation und Analyse von Nukleinsäuren363.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidipräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidipräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3β-Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7.2<		3.3.1	EMS Mutagenese	33
3.3.3       Herstellung kompetenter E. coli Zellen.       34         3.3.4       Transformation von E. coli       34         3.3.5       Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen.       34         3.3.6       Gentransfer in A. tumefaciens.       35         3.3.7       Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana.       35         3.3.8       Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum.       36         3.4.1       Alkalische Lyse       36         3.4.2       Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits       36         3.4.4       DNA-Elution aus Agarosegelen.       36         3.4.5       Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana       36         3.4.6       RNA-Extraktion aus Pflanzen.       36         3.4.7       Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.       37         3.4.8       Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.       37         3.4.9       Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.       37         3.5.1       Northern-Blot-Analyse       38         3.5.1.1       Kapillar-Blot       38         3.5.1.2       Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion       38         3.5.1.3       Hybridisierung der Membran       39         3.5.2 <td></td> <td>3.3.2</td> <td>Neutronen Mutagenese</td> <td>34</td>		3.3.2	Neutronen Mutagenese	34
3.3.4       Transformation von E. coli       34         3.3.5       Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen       34         3.3.6       Gentransfer in A. tumefaciens       35         3.3.7       Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana       35         3.3.8       Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum       35         3.4       Präparation und Analyse von Nukleinsäuren       36         3.4.1       Alkalische Lyse       36         3.4.2       Plasmidisolation in größerem Maßstab       36         3.4.3       Plasmidisolation in größerem Maßstab       36         3.4.4       DNA-Elution aus Agarosegelen       36         3.4.5       Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana       36         3.4.6       RNA-Extraktion aus Pflanzen       36         3.4.7       Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren       37         3.4.8       Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen       37         3.4.9       Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen       37         3.5.1       Northern-Blot-Analyse       38       35.1.1         S.5.1.1       Kapillar-Blot       38       3.5.1.2       Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion       38         3.5.1.2		3.3.3	Herstellung kompetenter E. coli Zellen	34
3.3.5Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen.343.3.6Gentransfer in A. tumefaciens.353.3.7Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana353.3.8Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum353.4Präparation und Analyse von Nukleinsäuren363.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidipräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidipräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3J.5.2Real-timer RT-PCR393.5.3J.5.3Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen.413.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-		3.3.4	Transformation von E. coli	34
3.3.6Gentransfer in A. tumefaciens		3.3.5	Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen	34
3.3.7Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana.353.3.8Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum.353.4Präparation und Analyse von Nukleinsäuren.363.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidipräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA.423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA.42 <tr <td="">37</tr>		3.3.6	Gentransfer in A. tumefaciens	35
3.3.8Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum353.4Präparation und Analyse von Nukleinsäuren363.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidjräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3β-Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Pröparation von Kernproteinen413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA423.7.5Gelretardationsanalyse (EMSA)423.7.5Gelretardationsanalyse (EMSA)434.1		3.3.7	Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana	35
3.4       Präparation und Analyse von Nukleinsäuren		3.3.8	Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum	35
3.4.1Alkalische Lyse363.4.2Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3β-Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA.423.7.5Gelretardationsanalyse (EMSA)42		3.4 Präj	paration und Analyse von Nukleinsäuren	36
3.4.2Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits363.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA.424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.1	Alkalische Lyse	36
3.4.3Plasmidisolation in größerem Maßstab363.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.2	Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits	36
3.4.4DNA-Elution aus Agarosegelen363.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.3	Plasmidisolation in größerem Maßstab	36
3.4.5Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana363.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.6Sammlung und Analyse von Volatilen413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von Att1g6112043		3.4.4	DNA-Elution aus Agarosegelen	36
3.4.6RNA-Extraktion aus Pflanzen363.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse43		3.4.5	Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana	36
3.4.7Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren373.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.6	RNA-Extraktion aus Pflanzen	36
3.4.8Auftrennung von DNA in Agarosegelen373.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3β-Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.7	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	37
3.4.9Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen373.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran393.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.8	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	37
3.5Methoden zur Expressionsanalyse383.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.4.9	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	37
3.5.1Northern-Blot-Analyse383.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran393.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.5 Met	thoden zur Expressionsanalyse	38
3.5.1.1Kapillar-Blot383.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.5.1	Northern-Blot-Analyse	38
3.5.1.2Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion383.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von Atlg6112043		3.5.1.1	l Kapillar-Blot	38
3.5.1.3Hybridisierung der Membran383.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.5.1.2	2 Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion	38
3.5.1.4Waschen und Dokumentieren der Membran383.5.1.5Rehybridisierung der Membran393.5.2Real-time RT-PCR393.5.3Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen393.5.3.1Luciferase393.5.3.2Phosphinotricinacetyltransferase403.5.3.3 $\beta$ -Glucoronidase (GUS)403.6Sammlung und Analyse von Volatilen403.7Proteinbiochemische Methoden413.7.1Zellkernisolierung aus A. thaliana413.7.2Präparation von Kernproteinen413.7.3Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten423.7.4Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA424Ergebnisse434.1Funktionelle Charakterisierung von At1g6112043		3.5.1.3	3 Hybridisierung der Membran	38
3.5.1.5       Rehybridisierung der Membran       39         3.5.2       Real-time RT-PCR       39         3.5.3       Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen       39         3.5.3.1       Luciferase       39         3.5.3.2       Phosphinotricinacetyltransferase       40         3.5.3.3       β-Glucoronidase (GUS)       40         3.6       Sammlung und Analyse von Volatilen       40         3.7       Proteinbiochemische Methoden       41         3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         3.7.5       Gelretardationsanalyse (EMSA)       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.5.1.4	4 Waschen und Dokumentieren der Membran	38
3.5.2       Real-time RT-PCR       39         3.5.3       Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen       39         3.5.3.1       Luciferase       39         3.5.3.2       Phosphinotricinacetyltransferase       40         3.5.3.3       β-Glucoronidase (GUS)       40         3.6       Sammlung und Analyse von Volatilen       40         3.7       Proteinbiochemische Methoden       41         3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.5.1.5	5 Rehybridisierung der Membran	39
3.5.3       Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen       39         3.5.3.1       Luciferase       39         3.5.3.2       Phosphinotricinacetyltransferase       40         3.5.3.3       β-Glucoronidase (GUS)       40         3.6       Sammlung und Analyse von Volatilen       40         3.7       Proteinbiochemische Methoden       41         3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         3.7.5       Gelretardationsanalyse (EMSA)       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.5.2	Real-time RT-PCR	39
3.5.3.1       Luciferase       39         3.5.3.2       Phosphinotricinacetyltransferase       40         3.5.3.3       β-Glucoronidase (GUS)       40         3.6       Sammlung und Analyse von Volatilen       40         3.7       Proteinbiochemische Methoden       41         3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         3.7.5       Gelretardationsanalyse (EMSA)       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.5.3	Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen	39
3.5.3.2       Phosphinotricinacetyltransferase		3.5.3.1	l Luciferase	39
3.5.3.3       β-Glucoronidase (GUS)       40         3.6       Sammlung und Analyse von Volatilen       40         3.7       Proteinbiochemische Methoden       41         3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         3.7.5       Gelretardationsanalyse (EMSA)       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.5.3.2	2 Phosphinotricinacetyltransferase	40
3.6Sammlung und Analyse von Volatilen		3.5.3.3	β-Glucoronidase (GUS)	40
<ul> <li>3.7 Proteinbiochemische Methoden</li></ul>		3.6 San	nmlung und Analyse von Volatilen	40
3.7.1       Zellkernisolierung aus A. thaliana       41         3.7.2       Präparation von Kernproteinen.       41         3.7.3       Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten       42         3.7.4       Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA       42         3.7.5       Gelretardationsanalyse (EMSA)       42         4       Ergebnisse       43         4.1       Funktionelle Charakterisierung von At1g61120       43		3.7 Pro	teinbiochemische Methoden	41
3.7.2       Präparation von Kernproteinen		3.7.1	Zellkernisolierung aus A. thaliana	41
<ul> <li>3.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten</li></ul>		3.7.2	Präparation von Kernproteinen	41
<ul> <li>3.7.4 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA42</li> <li>3.7.5 Gelretardationsanalyse (EMSA)</li></ul>		3.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten	42
<ul> <li>3.7.5 Gelretardationsanalyse (EMSA)</li></ul>		3.7.4	Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA	<b>A</b> 42
<ul> <li>4 Ergebnisse</li></ul>		3.7.5	Gelretardationsanalyse (EMSA)	42
4.1 Funktionelle Charakterisierung von <i>At1g61120</i>	4	Erg	gebnisse	43
		4.1 Fun	ktionelle Charakterisierung von At1g61120	43

4.1	.1 <i>A. thaliana</i> emittiert TMTT und Geranyllinalool nach Behandlung mit	_
	Alamethicin	.3
4.1	.2 Die Emission von TMTT korreliert mit der Expression von $At1g611204$	5
4.1	.3 <i>At1g61120</i> Insertionslinien zeigen keine Emission von TMTT und GL	
	nach Induktion mit Coronalon4	.7
4.1	.4 Der Phänotyp der Insertionslinie kann durch ektopische Expression von	
	At1g61120 komplementiert werden4	.9
4.1	.5 Konstitutive <i>AtGLS</i> -Expression führt zu verlangsamten Wachstum5	1
4.1	.6 AtGLS ist nicht im Chloroplasten lokalisiert	3
4.2	Expressionsmuster des AtGLS-Transkriptes5	4
4.2	.1 Eine funktionelle JA-Signalkaskade ist für die Induktion des <i>AtGLS</i> -	
	Transkriptes notwendig5	4
4.2	.2 Genotypen mit konstitutiver <i>THI2.1</i> -Expression zeigen nur geringe	
	Mengen AtGLS-Transkript5	6
4.2	.3 Die Induktion von <i>AtGLS</i> -Transkript ist unabhängig von SA- und	
	Ethylen-Signalkaskaden	8
4.2	.4 Die TMTT/GL-Synthese korreliert mit der <i>AtGLS</i> -Expression in Pflanze	n
	mit Defekten in der SA-, JA- und Ethylen-Signalkaskade bzw.	
	Biosynthese	0
4.2	5 AtGLS ist ein früh induziertes Gen	2
4 2	6 Die Induktion der <i>AtGLS</i> -Transkription benötigt keine	-
1.2	Proteinbiosynthese 6	3
4 2	7 AtGLS ist in Blüten und Schoten sowie an Wundrändern exprimiert	5
4.2 A 2	8 Das AtGI S-Transkript weist einige Besonderbeiten auf	8
т.2 4 2	0 Dia affiziante Umsetzung von Gerenzulinglool zu TMTT braucht ein	0
4.2	functionallas COI1 Drotain	1
		I
4.3	Neue Elemente der Signalkaskade, die zur AtGLS-Expression führt7	2
4.3	.1 <i>AtGLS</i> -Transkript ist in sechs Ökotypen von <i>A. thaliana</i> ähnlich gut	
	exprimiert7	2
4.3	.2 Etablierung eines Screens nach Mutanten mit konstitutiver <i>AtGLS</i> -	
	Expression7	3
4.3	.3 Mutanten mit einer konstitutiven <i>AtGLS</i> Expression7	9
4.4	Kartierung regulatorischer Elemente im AtGLS-Promotor	5
5	Diskussion	3
U		v
5.1	<i>At1g61120</i> kodiert für eine ( <i>E</i> , <i>E</i> )-Geranyllinalool Synthase9	3
5.2	Reaktionsmechanismen und Substratspezifität der AtGLS9	3
5.3	Lokalisation der AtGLS9	5
5.4	Evolutionäre Aspekte des AtGLS-Ursprungs9	6
5.5	Regulation der TMTT-Synthese10	1

Inhaltsver	rzeichnis	V
5.6	Elemente der Signalkaskade die zur AtGLS-Expression führen	106
6	Zusammenfassung	111
7	Literaturverzeichnis	V
8	Anhang	XXXVII
8.1	Abkürzungsverzeichnis	XXXVII
8.2	Aminosäuren	XLII

# 1 Einleitung

#### 1.1 Mechanismen der Abwehr in Pflanzen

Pflanzen fungieren als Primärproduzenten, indem sie mit Hilfe der Energie des Sonnenlichtes energiearme Moleküle in ernergiereiche Kohlenstoffverbindungen umwandeln, die anderen Organismen als Nahrung dienen. Insbesondere den Arthropoden dienen Pflanzen als Nahrungsgrundlage. Die Pflanze ist der Schädigung durch einen Herbivoren aber nicht schutzlos ausgeliefert, sondern hat eine Reihe von Abwehrstrategien entwickelt (WALLING et al., 2000; BALDWIN und PRESTON, 1999). Dabei kann man eine direkte von einer indirekten Abwehrstrategie unterscheiden. Bei der direkten Abwehr werden Substanzen freigesetzt, die den Herbivor schädigen. Insbesondere Proteine, die die Verdauung negativ beeinflussen, wie z. B. Proteinase-Inhibitoren, sind in ihrer Wirkungsweise charakterisiert worden (RYAN 1990; FELTON et al., 1989; DUFFEY und STOUT, 1996; BROADWAY und DUFFEY, 1988). Bei der indirekten Abwehr sendet die Pflanze Signale aus, die einen Fraßfeind des Herbivoren anlocken, der dann durch die Schädigung des Herbivoren der Pflanze einen Vorteil verschafft. Da an dieser Interaktion drei verschiedene Trophieebenen beteiligt sind, spricht man auch von einer tritrophen Interaktion (DICKE und SABELIS 1989; VAN LOON et al., 2000; FRITZSCHE-HOBALLAH und TURLINGS, 2001; KESSLER und BALDWIN, 2001; DE MORAES et al., 1998; SABELIS et al., 2001). Für die Modellpflanze A. thaliana konnte unter Laborbedingungen eine tritrophe Interaktion mit dem Herbivoren Pieris rapae und dessen Fraßfeind Cotesia rubecula nachgewiesen werden (VAN POECKE et al., 2001). Eine solche Interaktion führt unter Laborbedingungen zu einem Fitnessgewinn (VAN LOON et al., 2000).

Neben der Pflanzen-Insekten Interaktion (KARBAN *et al.*, 2000) konnte auch gezeigt werden, dass volatile Signale von einer durch einen Herbivoren geschädigten Pflanze eine Auswirkung auf die Genexpression einer unbeschädigten Pflanze haben (ARIMURA *et al.*, 2000; KISHIMOTO *et al.*, 2006).

### 1.2 Molekulare Grundlage der Pflanzen-Pflanzen- und Pflanzen-Insekteninteraktion

Der Befall einer Pflanze mit einem Herbivoren führt zur Emission von Substanzen aus verschiedenen biochemischen Synthesewegen, wie Nitrilen, C6-Volatilen und Terpenen. Aus der Gruppe der Terpene werden in *A. thaliana* insbesondere das Sesquiterpene  $\alpha$ -Farnesen, das Monoterpen  $\beta$ -Myrcen und das C16-Homoterpen (*E*,*E*)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene (TMTT) gebildet (VAN POECKE *et al.*, 2001). Die Emission von TMTT konnte in Pflanzen wie Tomate, Lima-Bohne und Mais nachgewiesen werden (AMENT *et al.*, 2004; HOPKE *et al.*, 1994; WILLIAMS *et al.*, 2005), was eine konservierte Funktion dieser Komponente bei der Abwehr gegen Herbivoren vermuten lässt.

Die Bedeutung von TMTT bei der indirekten Abwehr konnte durch Versuche mit der Lima-Bohne nachgewiesen werden. *Phytoseiulus persimilis*, der Fraßfeind einer Spinnenmilbenart, wurde stärker von Pflanzen angezogen, die von Spinnenmilben (*Tetranychus urticae*) befallen waren, als von Pflanzen, die durch den Herbivoren *Spodoptera exigua* geschädigt waren. Bei der Analyse der volatilen Substanzen fiel auf, dass die mit Spinnenmilben befallenen Pflanzen deutlich mehr TMTT produzierten als die durch *S. exigua* geschädigten. Die verminderte Anziehung von *Phytoseiulus persimilis* durch die von *S. exigua* geschädigten Pflanzen ließ sich durch exogene Zugabe von TMTT derart steigern, dass TMTT-behandelte Pflanzen den mit Spinnenmilben infizierten Pflanzen vorgezogen wurden (DE BOER *et al.*, 2004). In *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass *Phytoseiulus persimilis* selektiv von transgenen Pflanzen angezogen wird, die konstitutiv 4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene (DMNT), einem dem TMTT strukturell ähnlichem Volatil, emittierten (KAPPERS *et al.*, 2005).

TMTT könnte aber auch eine Rolle in der Pflanzen-Pflanzeninteraktion spielen, denn in der Lima-Bohne wurden Gene gefunden, deren Expression durch die exogene Zugabe von entweder DMNT oder TMTT induziert werden konnte (ARIMURA *et al.*, 2000).

### **1.3 Die Terpenbiosynthese im Überblick**

Da flüchtige Terpene und im Besonderen TMTT eine wichtige Rolle bei der indirekten Abwehr spielen, soll in diesem Kapitel näher auf die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite eingegangen werden. Terpene sind aus zwei verschiedenen Grundbausteinen mit je 5 Kohlenstoffatomen zusammengesetzt (C-5-Einheiten), dem Isopentenyldiphosphat (IPP) und seinem Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Die Vielfalt der Terpene ergibt sich durch die unterschiedliche Anzahl der C-5-Einheiten sowie durch Zyklisierung und andere Modifizierungen (BOHLMANN *et al.*, 1998b). Es wurden zwei Biosynthesewege für IPP und DMAPP entdeckt. Der Mevalonat-Weg findet im endoplasmatischen Retikulum und im Cytosol statt (NEWMAN und CHAPPELL, 1999), der 2-C-Methylerythritol-4-phosphat- (MEP) Weg dagegen ist in den Plastiden lokalisiert (EISENREICH *et al.*, 1998).

Durch den Mevalonat-Weg werden IPP und DMAPP aus Acetyl-CoA gebildet, einem Produkt aus dem primären Kohlenstoffmetabolismus. Schrittweise werden drei Moleküle Acetyl-CoA zu Mevalonsäure zusammengefügt; diese wird zweimal zu Mevalonsäure-5-diphosphat phosphoryliert und anschließend zu IPP decarboxyliert und dehydriert. Die IPP-Isomerase verlagert eine endständige Doppelbindung und es bildet sich DMAPP. Der MEP-Weg ist weniger gut charakterisiert. Es wird angenommen, dass 3-Phosphoglycerat und Pyruvat die Ausgangs-Metabolite aus dem Primärstoffwechsel sind (SCHWARZ, 1994). Des Weiteren konnte 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphat als Zwischenprodukt identifiziert werden, das dann in MEP umgewandelt wird (LICHTENTHALER, 1999).

Prenyltransferasen kondensieren ("head-to-tail") ein, zwei oder drei IPP-Moleküle an ein Molekül DMAPP. Dabei werden drei zentrale Intermediate der Terpenbiosynthese gebildet: Geranyldiphosphat (GPP), Farnesyldiphosphat (FPP) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) (KOYAMA und UGURA, 1999). Aus diesen drei Intermediaten werden von spezifischen Terpensynthasen (TPS) die Grundgerüste aller Terpene synthetisiert (BOHLMANN *et al.*, 1998b).

Es werden vier verschiedene Klassen von flüchtigen Terpenen unterschieden, deren Nomenklatur sich nach der Anzahl der enthaltenen C-5- (Isopren) Einheiten richtet. Die einfachsten Terpene bestehen nur aus einer C-5-Einheit, sie werden als Hemiterpene bezeichnet und von TPS aus DMAPP gebildet (MILLER *et al.*, 2001), Monoterpene bestehen aus 10 Kohlenstoffatomen und werden aus GPP gebildet (WISE und CROTEAU 1999). Sesquiterpene weisen 3 Isopren-Einheiten auf, die aus FPP gebildet werden (CANE, 1999). Die letzte Gruppe stellen die Diterpene mit 20 Kohlenstoffatomen dar, deren Ursprung in dem Intermediat GGPP liegt (MCMILLAN und BEALE, 1999). Die strukturelle Komplexität der Terpene entsteht durch

anschließende Modifikationen wie z. B. Zyklisierung oder teilweise Degradation der Kohlenstoff-Gerüste.

Für TMTT vermuteten BOLAND *et al.* (1998) den Diterpenalkohol (E,E)-Geranyllinalool (GL) als Vorläufer, der von einer TPS aus GGPP synthetisiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass Deuterium markiertes GL in Blättern der Lima-Bohne zu TMTT umgesetzt werden kann. Es wird angenommen, dass GL anschließend mit Hilfe eines Cytochroms eine oxidative Degradation zu TMTT durchläuft (GABLER *et al.*, 1991). Allerdings konnte bisher kein Enzym identifiziert werden, dass die beschriebenen Schritte katalysiert.

#### **1.4** Evolution der Terpensynthasen

Alle TPS haben einen gemeinsamen phylogenetischen Ursprung und sind Mitglieder einer komplexen Familie, die in 6 Unterfamilien aufgeteilt wird (TPS a-f) (AUBOURG et al.. 2002). Durch die Analyse der Exon-Struktur sowie homologer Aminosäuresequenzen charakterisierter Terpensynthasen wird folgendes Modell angenommen: In einem gemeinsamen Vorfahren der Angiospermen und Gymnospermen gab es eine Duplikation eines ursprünglichen Terpensynthase-Gens. Aus diesen beiden Vorläufern haben sich jeweils die Terpensynthasen des primären und sekundären Stoffwechsels gebildet (TRAPP und CROTEAU, 2001). Bis auf eine Ausnahme sind diese Terpensynthasen Diterpensynthasen; bei dieser Ausnahme handelt es sich um eine Linalool-Synthase (LIS) aus Clarkia breweri, die die Bildung des Monoterpens Linalool katalysiert und dennoch die größte Homologie zur den ursprünglichen Terpensynthasen aufweist.

Weiterhin hat sich im Vorläufer von Gymnospermen und Angiospermen aus den Enzymen des sekundären Stoffwechsels eine Gruppe von Terpensynthasen entwickelt, die in den rezenten Gymnospermen noch vorkommt. In den Angiospermen hat sich aus dieser Gruppe eine große Anzahl von Terpensynthasen entwickelt, während Vertreter aus der Gruppe der Vorläufer in rezenten Angiospermen bisher nicht identifiziert worden sind (TRAPP und CROTEAU, 2001).

Die Gruppe der ursprünglichen Diterpensynthasen zeichnet sich durch ein 200 Aminosäuren langes Motiv ("conifer diterpene internal sequence"; CDIS) aus, das in vielen rezenten TPS fehlt. (BOHLMANN *et al.*, 1998a; BOHLMANN *et al.*, 1998b).

#### **1.5** Die Induktion der pflanzlichen Abwehr

Die Expression von Genen, die der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress dienen, ist häufig mit einem Fitnessverlust verbunden, der durch den Verbrauch von Ressourcen zu erklären ist (GERSHENZON, 1994). Um den stärkeren Verlust von Ressourcen zu vermeiden, wird in vielen Fällen die Expression von Abwehrgenen nur dann induziert, wenn der entsprechende Stress auftritt. Durch die induzierte, indirekte Abwehr kann die Umwelt (Insekten, Pflanzen) zwischen dem ungestressten und dem gestressten Zustand einer Pflanze unterscheiden und auf diesen Zustand reagieren. In Pflanzen wird die Abwehr von biotischem Stress vor allem durch die Phytohormone Salizylsäure (SA), Ethylen und Jasmonsäure (JA) reguliert. SA spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von biotrophen Pathogenen, während JA und Ethylen eine größere Bedeutung bei der Abwehr von Herbivoren und nekrotrophen Pathogenen haben (MALECK und DIETRICH, 1999; BECKERS und SPOEL, 2005). JA wird in einer Reihe enzymatischer Schritte aus Linolensäure gebildet und gehört in die Gruppe der Oxylipine, die durch einen Ring aus 5 Kohlenstoffatomen gekennzeichnet sind (MUELLER, 1997; SEMBDNER und PARTHIER, 1993). Oxylipine werden u. a. nach Insektenfraß gebildet (HOWE und SCHILMILLER, 2002) und Mutanten in der JA-Signalkette und Biosynthese weisen erhebliche Defizite in der direkten (BALDWIN et al., 1997; KARBAN et al., 2000) und indirekten (VAN POECKE und DICKE, 2002) Abwehr von Herbivoren auf.

Ethylen wird nach Verwundung (ENYEDI *et al.*, 1992) und Herbivorie (MARTIN *et al.*, 1988; RIESKE und RAFFA, 1995; KAHL *et al.*, 2000) gebildet. Die Behandlung mit Ethylen führt zur Induktion von Genen, die auch durch Verwundung induziert werden (ECKER und DAVIS, 1987). Mutanten mit einem Defekt in der Ethylen-Signalkaskade weisen eine geringere Resistenz gegen Pathogene wie *Botrytis cinera* und *Alternaria brassicicola* (THOMMA *et al.*, 1998; PENNINCKX *et al.*, 1996) auf.

SA-Mengen steigen nach Pathogen-Infektion an. Darüber hinaus spielt SA eine wichtige Rolle bei lokalen und der systemischen Abwehr von Pathogen, was sich z. B. in der erhöhten Resistenz gegenüber Pathogenen in Folge einer SA-Behandlung äußert (RYALS *et al.*, 1996).

Die SA-, JA- und Ethylen-Signalketten weisen synergistische und antagonistische Wechselwirkungen auf (FELTON *et al.*, 1999; XU *et al.*, 1994; ; KUNKEL und BROOKS, 2002; ROJO und SÁNCHEZ-SERRANO, 2003). So reprimiert z. B. SA die

Expression des JA-induzierten Gens PDF1.2, das gleichzeitig eine funktionierende Ethylen-Signalkaskade für die Expression benötigt (SPOEL et al., 2003; PENNINCKX et al., 1998). Diese Repression benötigt das Protein NPR1. Gleichzeitig führt die Aktivierung der SA-Signalkette zur Repression der JA-Synthese (SPOEL et al., 2003). In der Lima-Bohne wurde gezeigt, dass SA den Syntheseschritt von Oxophytodiensäure (OPDA) zu JA reprimiert, was zur Akkumulation von OPDA führt. Diese Akkumulation von OPDA führt in der Lima-Bohne zur Induktion u. a. der Synthese des Terpens TMTT, während die exogene Zugabe von JA dies nicht bewirken kann. Die Anwesenheit von SA verändert somit das Verhältnis von JA zu OPDA und bewirkt damit ein anderes Spektrum induzierter Gene (KOCH et al., 1999). Die Hypothese, dass auch Zwischenprodukte des JA-Biosyntheseweges eigene Signalmoleküle sind und deren Konzentrationsverhältnis zueinander die Reaktionen der Pflanze determiniert, wird unter dem Begriff Oxylipin-Signatur zusammen gefasst (WEBER et al., 1997; KRAMELL et al., 2000). Weiterhin kann OPDA auch ohne Umwandlung in JA in Zellsuspenisonskulturen von Eschscholzia california die gleichen Gene des Sekundärmetabolismus induzieren wie JA (BLECHERT et al., 1995). In A. thaliana könnte OPDA ebenfalls eine Funktion als Signal haben, da Mutanten, die in einem enzymatischen Schritt zwischen OPDA und JA blockiert sind, eine unveränderte Resistenz gegen den Herbivoren Bradysia impatiens besitzen, obwohl die Resistenz deutlich sinkt, wenn OPDA und dessen Vorläufer in der Pflanze fehlen (STINTZI et al., 2001). Darüber hinaus kann OPDA viele Gene induzieren, deren Transkript durch JA gesteigert werden kann (STINTZI et al., 2001; TAKI et al., 2005).

Die Vielfalt möglicher Signalmoleküle wird durch die Derivatisierung von JA erhöht. Eine Modifikation besteht in der Überführung der Säure in einen Methylester durch eine Methyltransferase. Dieser ist flüchtig und kann JA in den meisten Aspekten wie z. B. der männlichen Fertilität vollständig ersetzen (SEO *et al.*, 2001).

Eine weitere Art der Modifikation besteht in der Konjugation mit einer Aminosäure (präferentiell Isoleucin). Diese Form der JA-Modifikation ist in der Mutante *jar1* (*jasmonate resistent 1*) aufgrund eines defekten Enzyms nicht mehr möglich (STASWICK *et al.*, 2002; STASWICK und TIRYAKI, 2004). Die Mutante weist eine geringere Sensitivität gegenüber JA und eine reduzierte Resistenz gegenüber einigen Pathogenen auf (STASWICK *et al.*, 1992; STASWICK *et al.*, 1998; VAN LOON *et al.*, 1998; CLARKE *et al.*, 2000). Andererseits ist die Pflanze vollständig fertil, dies weist

daraufhin, dass nur ein Teil der JA-vermittelten Reaktionen in dieser Pflanze vermindert sind (STASWICK *et al.*, 2002; STASWICK und TIRYAKI, 2004).

Auf der Ebene der Pflanzen-Insekten- und Pflanzen-Pflanzeninteraktion ermöglichen Mechanismen wie die Oxylipin-Signatur eventuell eine Weitergabe von detaillierteren Informationen über den Zustand der Pflanze.

1.6 Abbau negativer Regulatoren als zentrales Ereignis der JA Signalkaskade Ein zentrales Protein in der JA-Signalkette ist das Protein CORONATIN INSENSITIV1 (COI1). Ein Funktionsverlust dieses Proteins führt in A. thaliana zu Insensitivität gegenüber dem JA-Derivat Coronatin und männlicher Sterilität. Im Gegensatz zu den JA-Biosynthese-Mutanten kann diese nicht durch exogene Zugabe von JA komplementiert werden (FEYS et al., 1994). Ein großer Teil der an der Herbivoren-Abwehr beteiligten Gene ist von COI1 abhängig. Zum einen ist die Induktion vieler JAinduzierter Gene wie VSP2 von COI1 abhängig zum anderen weist die coil-Mutante eine deutlich erhöhte Sensitivität gegenüber verschiedenen Herbivoren auf (MCCONN et al., 1997; THOMMA et al., 1998; BENEDETTI et al., 1995; DEVOTO et al., 2005). Bei COI1 handelt es sich um ein F-Box-Protein (XIE et al., 1998). F-Box-Proteine bilden zusammen mit den Proteinen Cullin und Skp1 einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex, den SCF-Komplex. Das F-Box-Protein ist dabei für die Erkennung von Zielproteinen für den Ubiquitin-vermittelte Protein-Degradation zuständig, die im 26S-Proteasom stattfindet (BAI et al., 1996). Co-Immunopräzipitationsexperimente haben gezeigt, dass auch COI1 in-vivo an Ask1, AtCul1 und AtRbx1 bindet und somit den SCF<sup>COI1</sup>-Komplex bildet (DEVOTO et al., 2002; XU et al., 2002). Dieser Komplex ist in der Lage an das COP9-Signalosom (SERINO et al., 2003), dessen Funktion ebenfalls für eine JA-vermittelte Reaktion notwendig ist, zu binden (FENG et al., 2003). Die Notwendigkeit von COI1 in der JA-Signalkaskade weist somit auf eine Beteiligung von Ubiqitin-vermittelter Protein-Degradation in dieser Kaskade hin. Darüber hinaus haben Mutanten mit Defekten in Komponenten oder Regulatoren des SCF-Komplexes wie AXR1 und SGT1b eine defekte JA-Signalkaskade (TIRYAKI und STASWICK, 2002, FENG et al., 2003, LORENZO und SOLANO, 2005). Ein gut etabliertes Modell geht davon aus, dass COI1 negative Regulatoren der JA-Signalkaskade erkennt und einer Degradation zuführt.

Eine ähnliche Regulation ist für die Auxin-Signalkaskade beschrieben, an der ebenfalls ein F-Box Protein beteiligt ist, das als TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1; RUEGGER et al., 1997; RUEGGER et al., 1998) bezeichnet wird. TIR1 erkennt negative Regulatoren und bildet mit ihnen einen Komplex, der zum Proteasomenvermittelten Abbau des Regulators führt (GRAY et al., 1999; GRAY et al., 2001). TIR1 fungiert dabei gleichzeitig als Auxin-Rezeptor. Der Komplex mit den negativen Regulatoren ist nur in der Anwesenheit von Auxin stabil, das heißt in Abwesenheit von Auxin findet kein Abbau des Regulators statt (KEPINSKI und LEYSER, 2005; DHARMASIRI et al., 2005). In der Auxin-Signalkette konnten bereits negative Regulatoren identifiziert werden, die mit Hilfe von TIR1 abgebaut werden (GRAY et al., 2001). Bei den meisten Regulatoren handelt es sich um kurzlebige Proteine (u. a. IAA/AUX-Proteine), die an einen positiv wirkenden AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF) binden und dessen Aktivität reprimieren (TIWARI et al., 2001). Im Falle der Aktivierung der Auxin-Signalkaskade stabilisiert Auxin vermutlich den SCF<sup>TIR</sup>-IAA/AUX-Komplex, wodurch die IAA/AUX-Proteine (ABEL et al., 1995a) einem verstärkten Abbau unterliegen, so dass mehr Proteine abgebaut als neu synthetisiert werden (KEPINSKI und LEYSER, 2005; DHARMASIRI et al., 2005). Als Folge der Abnahme der IAA/AUX-Proteine kann der ARF die Transkription der Zielgene aktivieren.

Charakteristisch für diese Art der Signaltransduktion ist die kurze Zeitspanne zwischen der Wahrnehmung des Reizes und der induzierten Transkription der Zielgene, da alle Faktoren zur Weiterleitung des Signals bereits in der Zelle präformiert vorliegen und keine zusätzlicher Proteinbiosynthese notwendig ist. Die Zeitspanne von der Applikation des Reizes und der Transkription einiger Auxin-induzierter Gene beträgt nur 2-5 min (ABEL und THEOLOGIS, 1996; ABEL *et al.*, 1994). Die Induktion der Transkription ohne *de novo* Proteinbiosynthese wird als primär bezeichnet, während Induktionsprozesse, die die Synthese z. B. eines Transkriptionsfaktors benötigen, als sekundär bezeichnet werden (PAUW und MEMENLINK, 2004; ABEL und THEOLOGIS, 1996). Die Transkription primärer Zielgene der Auxin-Signalkaskade ist durch Cycloheximid, einem Proteinbiosyntheseinhibitor, induzierbar. Dieses Phänomen kann dadurch erklärt werden, dass durch die Inhibierung der Proteinbiosynthese negative Regulatoren nicht mehr neu synthetisiert werden können und es zu einer

Abnahme des Faktors kommt, die wiederum in einer Induktion der Transkription primärer Zielgene resultiert (KOSHIBA *et al.*, 1995).

Während die Auxin-Signalkaskade bereits gut charakterisiert ist, gibt im Verständnis der JA- Signalkaskade noch große Lücken. Negative Regulatoren, die von COI1 erkannt werden, konnten noch nicht identifiziert werden. Ein Versuch der Identifizierung solcher Faktoren war die Suche nach Interaktionspartnern von COI1 im Hefe-zwei-Hybrid-System, die eine Histondeacetylase zum Ergebnis hatte (DEVOTO et al., 2002). Histondeacetylasen reprimieren die Transkription durch Verminderung der Zugänglichkeit des Chromatin für Transkriptionsfaktoren (ALBERTS et al., 2002). Der Phänotyp von Mutanten im Histondeacetylase-Gen lässt vermuten, dass das Gen vor allem für eine JA-abhängige Wurzelhaar-Entwicklung verantwortlich ist (DEVOTO et al., 2002). In drei genetischen Screens wurde versucht Mutanten zu finden, die eine konstitutive Expression der JA induzierten Gene THI2.1 (HILPERT et al., 2001; NIBBE et al., 2002) VSP2 (ELLIS und TURNER, 2001; ELLIS et al., 2002a) und LOX2 (JENSEN et al., 2002) aufweisen. Im Fall des konstitutiven VSP2-Exprimierers wurde eine Mutation in einer Cellulose-Synthase identifiziert (ELLIS et al., 2002b). Verantwortliche Gene für die konstitutive THI2.1- und LOX2-Expression wurden bisher nicht gefunden, allerdings weisen diese Mutanten einen Defekt auf, der zu erhöhten JA-Mengen führt. Somit liegen die Mutationen nicht in einem potentiellen Interaktionspartner von COI1 (NIBBE et al., 2002; JENSEN et al., 2002). In einem weiteren genetischen Screen wurde versucht Supressoren der coil-Mutation zu identifizieren. Der dabei gefundene COII-Suppressor besitzt eine Mutation in der Lumazin-Synthase, einem Enzym aus der Riboflavin-Biosynthese; die Wirkungsweise dieses Enzyms auf die JA-Signalkaskade ist allerdings weitgehend unbekannt (XIAO et al., 2004).

Als weitere Komponenten der JA-Signalkaskade konnten vor allem Transkriptionsfaktoren (z. B. BOTER *et al.*, 2004) identifiziert werden, deren Transkription von COI1 abhängt und die sekundär die Transkription einer Gruppe von Genen positiv oder negativ beeinflussen. Der Transkriptionsfaktor AtMYC2 ist in der *jin1-(jasmonate insensitive 1)* Mutante (BERGER *et al.*, 1996) funktionslos, was zu einer verminderten Expression des Gens *VSP2* aber gleichzeitig zu einer vermehrten Expression des Ethylen-abhängigen Gens *PDF1.2* nach Applikation von JA führt (LORENZO *et al.*, 2003). Der Transkriptionsfaktor ERF1 (ETHYLENE RESPONSE

FACTOR 1) dagegen führt bei ektopischer Expression zur Repression von *VSP2* und zur Induktion von *PDF1.2*, was zu der Annahme führt, dass ERF1 und AtMYC2 eine antagonistische Wirkung auf verschiedene Gengruppen aufweisen (LORENZO *et al.*, 2003). Es konnten weiterhin einige AP-2-Domänen-Transkriptionsfaktoren gefunden werden, die die Expression von *PDF1.2* oder *VSP2* regulieren oder die JA-Biosynthese induzieren, was ebenfalls zur Aktivierung der JA-Signalkaskade führt (PRÉ, 2006).

#### 1.7 Zielsetzung

Das Terpen TMTT spielt eine wichtige Rolle in der Pflanzen-Insekten- (DE BOER *et al.*, 2004) und Pflanzen-Pflanzeninteraktion (KARBAN *et al.*, 2000; ARIMURA *et al.*, 2000). *A. thaliana* ist in der Lage, dieses Terpen nach Befall mit dem Herbivoren *P. rapae* zu emittieren (VAN POECKE *et al.*, 2001). In der folgenden Arbeit sollten die experimentellen Vorteile dieser Modellpflanze ausgenutzt werden, um die molekularen Grundlagen der induzierten TMTT-Synthese zu ermitteln. Dafür war es zunächst notwendig, ein Enzym zu identifizieren, dessen Expression reguliert ist und das einen limitierenden Schritt in der TMTT-Synthese katalysiert. In einem zweiten Schritt sollte die TMTT-Synthese und die Expression der identifizierten Synthase in verschiedenen charakterisierten Mutanten untersucht werden, um zum einen die für die Expression benötigten Signalkaskaden zu ermitteln und zum anderen bekannte Wechselwirkungen mit anderen Phytohormonen daraufhin zu untersuchen, ob ein Einfluss auf die TMTT-Synthese besteht. Weiterhin sollte mit Hilfe einer Promotoranalyse des identifizierten Enzyms und eines genetischen Screens eine Charakterisierung der Mechanismen erfolgen, die zur Induktion der TMTT-Synthese führen.

Damit ist es möglich, einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlage der indirekten Abwehr zu leisten.

# 2 Material

# 2.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten		Gilson
Bellydancer <sup>TM</sup>		Stovall
Bioimager /Phosphoimager	BAS-1000	Fuji
Elektroporationsapparatur	Gene Pulser <sup>®</sup> II	BioRad
Fluorometer	CytoFluorII Plate Reader	PerSeptive
Geldokumentationsstation		MWG Biotech
Gelelektrophoresekammern		Werkstatt der Universität
Handmonitor	Contamat	Eberline
Heizblock		Boekel Scientific
Heizrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Heizschüttler	Thermomixer 5436	Eppendorf
Hybridisierungsofen		Bachhofer
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Luciferase Kamera		Hamamatsu
Netzgeräte	E323	Benedikt Heinemann
PCR-Geräte	MiniCycler <sup>™</sup> PTC- 150	MJ Research
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Real-time PCR Gerät	MyIQ	Biorad
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Schwingmühle	MM301	Retsch
Sequenzanalysegerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	UJ3S	Christ
Sterilbank, vertikales Gebläse	Microflow Biohazard	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	MSE
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	I 46	Labinco BV,
vonex	L40	Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA

# 2.2 Verbrauchmaterialien

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle	
Dialysis-Membran Typ8	Biomol, Hamburg	
Elektroporationsküvetten	BioRad	
Film, Cronex	Agfa, Belgien	
Fließpapier 3MM	Whatman	
Kunststoff Finwagmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner;	
Kunstston-Entwegmaterial	Roth; Sarstedt	
Micro Spin G25 Säule	Amersham, USA	
Miracloth	Calbiochem	
Parafilm M	American National Can <sup>TM</sup>	
Dflanzanarda	Einheitserde Werkverband	
Filalizellelue	Sinntal-Jossa	

.

# 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/ Lieferant	
	Hartmann Analytic,	
	Braunschweig	
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe	
Acrylamid: N,N'-	Both Konlamyha	
Methylenbisacrylamid	Roui, Karisrune	
Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf	
Alameticin	Sigma, Steinheim	
Albumin Fraktion V	AppliChem, Darmstadt	
Ameisensäure	Merck, Darmstadt	
Ampicillin	AGS	
Bakto Pepton	Difco	
Basta	AgrEvo, Düsseldorf	
Bromphenolblau	Roth	
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt	
Chloroform	Merck, Darmstadt	
Confidor	Bayer, Leverkusen	
Cycloheximid	Sigma, Steinheim	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim	
dNTPs	Roth, Karlsruhe	
Eisessig	Merck, Darmstadt	
Ethanol	Merck, Darmstadt	
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe	
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt	
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe	
Formamid	Roth, Karlsruhe	
Glukose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe	
Heringssperma DNA HSP	Sigma	
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Bio Tech Trade	
Kaliumacetat	Roth, Darmstadt	
Luciferin	Synchem	

2 Material

Chemikalie	Hersteller/Lieferant	
Magnesiumsulfat	Roth, Darmstadt	
Mercaptoethanol	Roth	
Murashige und Skoog Medium	Duchefa	
Natriumacetat	Merck, Darmstadt	
Orange G	Sigma	
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim	
Phenol gesättigt mit 0,1M Citrat-	Sigma Steinheim	
Puffer		
Phenylmethylsulfonylfluorid	Roth Karlsruhe	
(PMSF)		
Polydesoxyinosin-	Sigma	
desoxycytidylsäure (PolydI/dC)	Sigina	
Protease Inhibitor for plants	Sigma	
Roti-Quant	Roth, Karlsruhe	
Salzsäure	Merck, Darmstadt	
Select Agar	GIBCO BRL, Eggenstein	
Triton X-100	Roth	
Tween20	Roth	
X-Gal	Bio Tech Trade	
X-Gluc	Roth	

# 2.4 Kits

Kit	Hersteller/ Lieferant
MegaprimeTM DNA-labeling-system- Kit	Amersham
NucleoSpin Extract Kit	Macherey-Nagel
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Sequenzierkit Big Dye Terminator v3.1	Perkin-Elmer
Spin Miniprep Kit	Macherey-Nagel

# 2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller/ Lieferant
Advantage 2 Polymerase Mix	BD Biosciences
Bio-Taq	Bioline
Gateway-System BP-Mix	Invitrogen
Gateway-System LR-Mix	Invitrogen
iProof HighFidelity DNA-Polymerase	BIO-RAD
Klenow exo	MBI Fermentas
	GIBCO BRL
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	MBI Fermentas
Ribonuklease Inhibitor	MBI Fermentas

Enzym	Hersteller/ Lieferant
T4 DNA-Ligase	Promega

# 2.6 Nukleinsäuren

# 2.6.1 Grössenstandard

Größenstandard	Hersteller/Lieferant
GeneRuler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentast
PUC19Hpall	eigene Herstellung

2.6.2 Ol	igonukleotide für EMSA
Oligo- nukleotid	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
POsonso	5'-AATTCCACGTGTTGATACGAGTTATTTAGTATGTGACTCACTA
DOsense	AAGATCATTTATTTAGTATTTATCACATGGGGGTAGG-3′
DOonti	5'-CCTACCCCATGTGATAAATACTAAATAAATGATCTTTAGTG
БОани	AGTCACATACTAAATAACTCGTATCAACACGTGG-3′
UOsense	5'-GATCCGCTAGCGGATCTACCGGTTACCCAGCTTTCTTGTAC-3'
UOanti	5-´GGCCGGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGCTGGGTAAC
	CGGT-3′

# 2.6.3 Oligonukleotide

<b>Bezeich-</b>	Sequenz $5' \rightarrow 3'$
nung	
P 1	5'-TAGGGCCCGTCATAACGTGACTCCCTTAATTCTCATGTATG-3'
P 2	5'-TGGGCCCGCTAGCGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA
	CGC-3′
P 3	5′CTATATAAGGAAGTTCATTTCATTTGGAGAGGAACACTCAAT
	CTAAAGACCATCCTCTAGACAGAAAAC-3′
P 4	5'-TTTCGCCGTCTTCGTCTCTGCCATCAGCCACCGTTG-3'
P 5	5'-AGCTTCCTAGGAGGCCTGAATTCCCTGCAGGA-3'
P 6	5'-AGCTTCCTGCAGGGAATTCAGGCCTCCTAGGA-3'
P 7	5'-AACTGTTGGGAAGGGCGATC-3'
P 8	5'-AGAATCATCCAGGTCTGGAGATTGAGGACTC-3'
P 9	5'-TGGTAAATCAGTGGCGATACTGATGGAAGAG-3'
P 10	5'-GCAATCGATATTCGCACCATGCTTCTACTCCCGGGGCGATCGC
	ΤΤΑΑ ΤΑΤΟΤΤΑΤΟΑΤΤΑΤΟΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑΤΑ
P 11	5'-CCCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG
P 12	5'-GCGATCGCTTACTTGTACAGCTCGTCCA-3'
P 13	5'-GGAGCAATGAAAACATCTATGTG-3'
P 14	5'-ACTACAACAGCCACAACGTC-3'
P 15	5´-GGGACACACATCGTCAATG-3´
P 16	5'-GCTGCGACGCAACAATC-3'
P 17	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTATCGATCAATGA
	TGATCAATTAGTCACTTCAGAGAG -3'

2 Material

<b>Bezeich-</b>	Sequenz 5' $\rightarrow$ 3'
nung	
P 18	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAAAATATGGGTCA
	CTAATCTGCGTGTGTTTTTATAG-3′
P19	5'- CATTATGCAAGTTTACACAGGGATG-3'
P 20	5'-ATTGAAGGAAATCTGAGGTTAAGAC-3'
P 21	5'- CACTAATCTGCGTGTGTTTTTATAG-3'
P 22	5'-CATCTAGAACCATGAGCCCAGAACGACGCCC-3'
P 23	5'-TGCCCGTCACCGAGATTTGACTGCAGGA-3'
P 24	5'-CGCAGGAACCGCAGGAGTGGACG-3'
P 25	5-´GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTCAATGAAGTCTTC
	TTACGGTTCTTCCTCTAATG-3'
P 26	5'-GGGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATTAGTAGAAGCA
	TGGTGCGAATATCGATTG-3′
P 27	5-´ATCAAGGGAGAAATTCAGTTGTC-3´
P 28	5'-ACTTGGCTTACACTTTGTTTTCTC-3'
P 29	5'-ACTGGTTTAGGAGAGTTCTTTGG-3'
P 30	5'-ATGGATAGCTCGACTCAAACACC-3'
P 31	5'-TGAAACATTTGAGTCGTGGCTAC-3'
P 32	5'-CATGTCTTGTTGTAAAGTCTTCGAG-3'
P 33	5'-TTTCACCTAGAAGCTTTTGCTGG-3'
P 34	5'-ACCTTTACTGGCCTATCTAGAGG-3'
P 35	5'-GATGGAAAGAGCAATGGTGTGTG-3'
P 36	5'-TGGATTATGTGCAATCAAAATGC-3'
P 37	5'-CATAGGCTCCATCTCTGATAGTTC-3'
P 38	5'-GTCTGCAGAAGACCATTTTATTCATTTAATTTTATTAATAT
	TTTTTACTTTTCATTATTG-3′
P 39	5´-ACAAGCTTGAAGACGCTTTTTTCCAAGTAATAAATGGAGA-3´
P 40	5'-ACTTGTCCACTTCGTTCTTTCTTCG-3'
P 41	5'-CATCGTTAAGGCTTTGACCCAG-3'
P 42	5´-TTATCGTAACAATTAAAATATGG-3´
P 43	5'- ACGCCATTAACCTGATGTTCTGG-3'
P 44	5'- ATTGATGTGATATCTCCACTGAC-3'
P 45	5'-TCGCGATCCAGACTGAATGCCCAC-3'
P 46	5´-ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG-3´
P 47	5'-TTCACACAGGAAACAGCTATGAC-3'
P 48	5'- TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC-3'
P 49	5'-GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC-3'
P 50	5'-CTGAATTCCACGTGTATTCATTTAATTTTATTA-3'
P 51	5´-CTATCGATTATTCATTTAATTTTTATTA-3´
P 52	5'-TGATTGAGTCGTCTAAATGT-3'
P 53	5´-CTATCGATTTGATACGAGTTATTTAGTA-3´
P 54	5'-ATCGAGTATGCATATGATTG-3'
P 55	5´-AGTGTACCGACATATGCCATGTGATAAATACTAAAT-3´
P 56	5'-TCCACCTCGATATGTGCATC-3'

2	Material

2.6.4 Plasmide			
Vektor	Beschreibung	Resistenz	Hersteller/ Referenz
HBT-GUS/Nco	<i>GUS</i> -Gen für Nothern- Detektion	Ampicillin	THUROW, unveröffentlicht
JATY50A19	<i>pYLTAC17 Vektor</i> mit ~40 kb des ersten <i>A.thaliana</i> Chromosoms	Kanamycin	John Innes Centre Genome Laboratory, Norwich
pB2GW7	RB-tnos-BaR::pnos- 35S::attR1-cmR-ccdB- attR2-t35-RB	Spectinomycin	KARIMI, <i>et al.</i> (2005)
pB2GW7-35S::AtGLS	<i>pB2GW7</i> in den das <i>AtGLS</i> Gen mit Introns, 5'und 3' UTR, sowie 3'flankierder Sequenz kloniert wurde	Spectinomycin	diese Arbeit
pB2GW7- 35S::AtGLS:YFP	<i>pB2GW7-35S::AtGLS</i> mit dem <i>YFP</i> -Gen C- terminal fusioniert	Spectinomycin	diese Arbeit
pB2GW7- 35S::AtGLS <sub>ORF</sub>	<i>pB2GW7</i> in den der ORF der <i>GLS</i> rekombiniert wurde	Spectinomycin	diese Arbeit
pBsAtGLS (ORF)	<i>pBluescript</i> Vektor mit <i>AtGLS ORF</i>	Ampicillin	ABEL, unveröffentlicht
pCambia3300	LB-t35-BaR::35S-t35- AlcR::35S-tnos-AlcA- t35-RB	Kanamycin	HILTBRUNNER; CADDICK <i>et al.</i> , 1998
pCambia-AlcA::AtGLS	<i>pCambiaMCS</i> in den das <i>AtGLS</i> Gen mit Introns, <i>5'und 3' UTR</i> , sowie <i>3'flankierder</i> Sequenz kloniert wurde	Kanamycin	diese Arbeit
pCambiaMCS	<i>pCambia 3300</i> mit einer <i>MCS</i>	Kanamycin	diese Arbeit
pDONR201	attP1-CmR-ccdB-attP2	Kanamycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pENSG-YFP	LB-tnos-BAR-pnos-35S- YFP-attR1-cmR-ccdB- attR2-35S-RB	Ampicillin	MAYER, unveröffentlicht
pENTR-GLS (ABD)	Derivat von $pENTR$ - GLS (-1162 bis +3), das nur die Fragmente A, B und D des $GLS$ - Promotors enthält (siehe 4.4)	Kanamycin	diese Arbeit

2 Material 17			
Vektor	Beschreibung	Resistenz	Hersteller/ Referenz
pENTR-GLS (-1162/+3)	<i>pDONR201</i> in den der <i>AtGLS</i> Promotor (-1162 bis +3) rekombiniert wurde	Kanamycin	diese Arbeit
pENTR-GLS (-2166/+3)	<i>pDONR201</i> in den der <i>GLS</i> Promotor (-2166 bis +3) rekombiniert und verlängert wurde	Kanamycin	diese Arbeit
pFGC-A7	RNAi Vektor mit <i>PAT</i> -Gen	Kanamycin	THUROW, unveröffentlicht
pGateGUS	RB-attR1-CmR-ccdB- attR2::GUS-nosT 35S::BaR-LB	Spectinomycin	KUSHNIER, unveröffentlicht
pGateGUS-GLS (-1162/+3)	<i>pGateGUS</i> mit -1162 bis +3 Bp des <i>AtGLS</i> Promotors	Spectinomycin	diese Arbeit
pGateGUS-GLS(ABC)	<i>pGateGUS</i> ohne <i>attB2</i> mit den Fragmenten <i>A</i> , <i>B</i> und <i>C</i> des <i>GLS</i> Promotors (siehe 4.4)	Spectinomcin	diese Arbeit
pGateGUS-GLS(ABD)	<i>pGateGUS</i> mit den Fragmenten <i>BD</i> des <i>GLS- Promotors (siehe</i> 4.4)	Spectinomcin	diese Arbeit
pGEM/35S::GLS	<i>pGEM-T</i> mit Fusion aus dem 35S Promotor der <i>GLS</i>	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM/35S::GLS(REN)	Derivat von <i>pGEM/35S::GLS</i> mit <i>SmaI</i> und <i>AsiSI</i> Schnittstellen direkt vor dem Stop-Codon	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM/35S::GLS:YFP	In die Schnittstellen von <i>pGEM/35S::GLS(REN)</i> wurde das Gen <i>YFP</i> kloniert	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM/Aktin	<i>pGEM-T</i> mit Teil des <i>Aktin</i> Gens für Nothern- Detektion	Ampicillin	WEIGEL <i>et al.</i> (2001)
pGEM/AlcA::GLS	<i>pGEM-T</i> mit Fusion aus dem <i>AlcA</i> Promotor mit der <i>GLS</i>	Ampicillin	diese Arbeit
pGEM/GLS	<i>pGEM-T</i> mit 13 kb aus <i>JATY50A19</i> , die das <i>GLS</i> Gen enthalten	Ampicillin	diese Arbeit

2 Material			18
Vektor	Beschreibung	Resistenz	Hersteller/ Referenz
pGEM/LOX	<i>pGEM-T</i> dem ORF des <i>LOX2</i> -Gens für Nothern-Detektion	Ampicillin	GÄRTNER (2003)
pGEM/THI2.1	<i>pGEM-T</i> mit Teil der <i>THI2.1</i> Gens für Nothern-Detektion	Ampicillin	GÄRTNER (2003)
pGEM-T	MCS	Ampicillin	Promega GmbH, Mannheim
pGWB235	<i>attR1-CmR-ccdB-</i> <i>attR2::LUC</i> für stabile Transformation mit Hygromycin und Kanamycin Resistenz	Kanamycin	NAKAGAWA, unveröffentlicht
pGWB235-GLS (-2166/+3)	<i>pGWB 235</i> mit -2166 bis +3 Bp des <i>GLS</i> Promotors	Kanamycin	diese Arbeit
pGWB235-GLS(BCD)	Die Promtorfragemente B, C und D aus pENTR- GLS (BCD) in pGWB235 rekombiniert	Kanamycin	diese Arbeit
pKGW	RB-tnos-KmR::pnos- attR1-cmR-ccdB-attR2- RB	Spectinomycin	KARIMI, et al. (2005)
pKGW-PAT	RB-tnos-KmR::pnos- attR1-cmR-ccdB-attR2- PAT-tocs-RB	Spectinomycin	diese Arbeit
pkGW-PAT-35S	<i>pkGW-PAT</i> mit 35S Promotor	Spectinomycin	Diese Arbeit
pkGW-PAT-GLS (-2166/+3)	<i>pkGW-PAT</i> mit -2166 bis +3 Bp des <i>GLS</i> Promotors	Spectinomycin	diese Arbeit
pSK	MCS	Ampicillin	Stratagene, La Jolla
psK-GLS(-297/-138)	Teil des Promotors im <i>psK (-297 bis -138)</i> mit flankierenden <i>BpiI</i> - Restriktionsschnittstelle n für EMSA	Ampicillin	diese Arbeit
psK/35S::GLS(1.Exon)	<i>psK</i> mit Fusion aus dem 35S Promotor und einem Teil des 1. Exons der GLS	Ampicillin	diese Arbeit
psK/AlcA::GLS(1.Exon)	<i>psK</i> mit Fusion aus dem <i>AlcA</i> Promotor und einem Teil des 1. Exons der <i>GLS</i>	Ampicillin	diese Arbeit

2 N	Iaterial
-----	----------

Vektor	Beschreibung	Resistenz	Hersteller/ Referenz
psK-YFP	<i>psK</i> mit <i>YFP</i> -Gen in der <i>MCS</i>	Ampicillin	diese Arbeit
pTT-GLS(ABC)-GUS	<i>pTT-GUS</i> mit den Frag- menten <i>A</i> , <i>B</i> und <i>C</i> (siehe 4.4) des <i>AtGLS</i> - Promotors	Ampicillin	diese Arbeit
pTT-GUS	35S::GUS	Ampicillin	LENK 1997
pUC18-ENTRY2	attL1-MCS-attL2	Ampicillin	HORNUNG, unveröffentlicht
pUC18-ENTRY2-35S	attL1-35S-Promotor- attL2	Ampicillin	diese Arbeit
pUCA7	<i>35S-MCS-tocs</i> aus <i>pBINAR</i> im <i>pUC18</i>	Ampicillin	HÖFGEN und Willmitzer, 1990
PUCA7-PAT	<i>pUCA7</i> mit <i>PAT</i> -Gen	Ampicillin	diese Arbeit

# 2.6.5 Hybridisierungssonden

Sonde	Beschreibung	Referenz
Aktin	634 Bp des AKTIN2-ORFs gewonnen	WEIGEL <i>et al.</i> (2001)
	durch Amplifikation mit P 46 und P 47	
	sowie pGEM/Aktin als Template	
AtGLS	846 Bp des AtGLS-ORFs; gewonnen	diese Arbeit (siehe 3.2.9)
	durch Amplifikation mit P 46 und P 47	
	mit pGEM/GLS(Sonde) als Template	
GUS	1874 Bp des GUS-Gens, gewonnen	THUROW, unveröffentlicht
	durch Verdau des Plasmids HBT-	
	GUS/Nco mit PstI und NcoI	
LOX2	Der gesamte ORF des LOX2 Gens;	GÄRTNER (2003)
	gewonnen durch Amplifikation mit P 46	
	und P 47 sowie pGEM/LOX als	
	Template	
THI2.1	405 Bp des THI2.1- ORFs; gewonnen	GÄRTNER (2003)
	durch Amplifikation mit P 46 und P 47	
	sowie pGEM/THI2.1 als Template	

# 2.7 Organismen

# 2.7.1 Bakterien

Abkürzungen sind den jeweiligen Referenzen zu entnehmen.

2 Material		20
Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
Escherichia coli DH5α	F, gyrA96 (Nalr), recA1, endA1, thi-1, hsdR17 (rk- mk+), glnV44, deoR, D (lacZYA-argF) U169 [p80dD(lacZ)M15]	HANAHAN et al. (1983)
Escherichia coli SCS110	[F'traD36, proAB, lacI <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15], rpsL(str <sup>r</sup> ), thr, leu, endA, thi-1, lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, $\Delta$ (lac- proAB)	Stratagene
Agrobacterium tumefaciens GV3101	rif <sup>r</sup> , kan <sup>r</sup>	KONCZ und SCHELL (1986)
Escherichia coli DB3.1	F-, gyrA462, endA1, D(sr1-recA), mcrB, mrr, hsdS20 (rB-, mB-), supE44, ara-14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20(Smr), xyl-S, λ-leu, mtl-1	BERNARD und COUTURIER (1992)

#### 2.7.2 A. thaliana Pflanzen/Genotypen

Genotyp	Beschreibung	Referenz
35S::AtGLS	Das Konstrukt <i>pB2GW7</i> -	diese Arbeit
	35S::AtGLS in	
	salk_039864 transformiert	
35S::AtGLS:YFP	Das Konstrukt <i>pB2GW7</i> -	diese Arbeit
	35S::AtGLS:YFP in	
	salk_039864 transformiert	
35S::PAT	Das Konstrukt <i>pkGW-PAT-</i>	diese Arbeit
	35S in Col transformiert	
ABC::GUS	Das Konstrukt <i>pGateGUS</i> -	diese Arbeit
	GLS(ABC) in Col	
	transformiert	
ABD::GUS	Das Konstrukt <i>pGateGUS</i> -	diese Arbeit
	<i>GLS(ABD)</i> in Col	
	transformiert	
Acx1/5	Mutante mit einem Defekt	SCHILMILLER et al.
	in der JA-Synthese	(2006)
AlcA::At1g61120	Das Konstrukt <i>pCambia</i> -	diese Arbeit
	AlcA::AtGLS in	
	salk_039864 transformiert	
AtGLS::GUS	Das Konstrukt <i>pGateGUS</i> -	diese Arbeit
	<i>GLS</i> (-1162/+3) in Col	
	transformiert	
AtGLS::LUC	Das Konstrukt pGWB235-	diese Arbeit
	<i>GLS</i> (-2166/+3) in Col	

2 Material		21
Genotyp	Beschreibung	Referenz
AtGLS::PAT	Das Konstrukt <i>pkGW-PAT-GLS</i> (-2166/+3) in Col transformiert	diese Arbeit
BCD::LUC	Das Konstrukt <i>pGWB235-GLS(BCD)</i> in Col transformiert	diese Arbeit
C24	Ökotyp unbekannter Herkunft	KOLTERMANN
ceg#1	Mutante mit konstitutiver Expression des Gens AtGLS	diese Arbeit
ceg#2	Mutante mit konstitutiver Expression des Gens AtGLS	diese Arbeit
cet1	Mutante mit konstitutiver Expression des Gens <i>THI2.1</i>	HILPERT <i>et al.</i> (2001); NIBBE <i>et al.</i> , (2002) ; APEL
cet2	Mutante mit konstitutiver Expressiondes Gens <i>THI2.1</i>	HILPERT <i>et al.</i> (2001); NIBBE <i>et al.</i> , (2002) ; APEL
coil	Mutante mit Defekt in der JA-Signalkaskade	FEYS <i>et al.</i> (1994); XIE <i>et al.</i> (1998); TURNER
Columbia (Col)	Wildtyp	NASC Stock
dde2	Mutante mit einem Defekt in der JA-Biosynthese	PARK <i>et al.</i> (2002); VON MALEK
ein2	Mutante mit Defekt in der EthylenSignalkaskade	GUZMAN und ECKER (1990); NASC Stock
Ler	Ökotyp Landsberg	NASC Stock
NahG	Transgene Pflanze, die SA in Catechol umwandelt	GAFFNEY <i>et al.</i> (1993); LAWTON <i>et al.</i> , (1995); FRIEDRICH
No	Ökotyp Nossen	KOLTERMANN
npr1	Mutante mit einem Defekt in einer SA-Signalkaskade	CAO <i>et al.</i> , 1994; NASC Stock
opr3	Mutante mit einem Defekt in der JA-Synthese	STINTZI und BROWSE (2000); STINTZI
salk_039864	T-DNA Insertion im 6. Intron von <i>At1g61120</i>	NASC Stock; diese Arbeit
salk_078187	T-DNA Insertion im 8. Exon von At1g61120	NASC Stock; diese Arbeit
sid2	Mutante mit Defekt in der SA-Biosynthese	NAWRATH und METRAUX (1999); WILDERMUTH <i>et al.</i> (2001); AUSUBEL
Ws	Okotyp Wassilewskija	STINTZI

2 Material

2.7.3 Tabak Pflanzen/Genotypen		
Genotyp	Beschreibung	Referenz
Samsun NN (SNN)	Wildtyp	
35S::AtGLS(ORF)	Das Konstrukt <i>pB2GW7</i> -	diese Arbeit
	35S::AtGLSORF in SNN	
	Pflanzen transformiert	

#### 2.7.4 Insekten

Larven von *Plutella xylostella* im 3-4 Larvenstadium wurden freundlicherweise von D. Mennerich (Abteilung Agrarentomologie Prof. Dr. Vidal, Universität Göttingen) oder von T. Mitchell-Olds (Max Planck Institut für chemische Ökologie, Jena) zur Verfügung gestellt.

### 2.8 Nährmedien und Zusätze

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben mit H<sub>2</sub>Oultrapure (Wasseraufbereitungsanlage) angesetzt und unter folgenden Bedingungen autoklaviert: 15 min, 2 bar, 121°C.

LB Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,4
SOC Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugeben: 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20 mM Glucose
YEB Medium	5 g/l Beef-Extrakt; 1 g/l Hefe-Extrakt; 5 g/l Pepton; 0,5 g/l MgSO4; 5 g/l Saccharose

2.8.1 Medien für die Anzucht Bakterien

Für die Herstellung von Festmedien wurden 15 g/l bakteriologischer Agar zugesetzt.

<sup>2</sup> Material

2.8.2 Medien für	die Anzucht von Pflanzen
1MS Medium	4,4 g/l MS-Medium; 10 g/l Saccharose; 1g/l MES; 6,4 g/ Select
	AgarpH 5,7 mit KOH
2MC Modium	4,4 g/l MS-Medium; 20 g/l Saccharose; 6,4 g/ Select AgarpH 5,7
21v15 Ivieululli	mit KOH
	72 μM Fe-EDTA; 50 μM KCl; 50 μM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 10 μM MnSO <sub>4</sub> ; 2
	μM ZnSO <sub>4</sub> ;1,5 μM CuSO <sub>4</sub> ; 0,1 mM NaSiO <sub>3</sub> ; 0,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ;
hydroponisches	0,075 nM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ; 1,25 mM KNO <sub>3</sub> ; 0,75 mM MgSO <sub>4</sub> ; 1,5 mM
Medium	Ca(NO) <sub>3</sub> , die Lösungen wurde aus 1000 fach konzentrierten
	Stammlösungen angesetzt, es wurde Leitungswasser verwendet;
	auf Autoklavieren wurde verzichtet
SHI Medium	2 MS-Medium nach dem Autoklavieren dazu: 1 mg/l BAP, 200
	$\mu$ g/l NAA, 500 mg/l Cefotaxim oder 250 mg/l $\beta$ -Bactyl, sowie
	das entsprechende Selektionsantibiotikum/Herbizid

2.8.3 Zu	ısätze für	Medien
----------	------------	--------

Zusatz	Endkonzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100 mg/l	$100 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$
IPTG	60 µl pro Platte	26 mg/ml in DMF
Kanamycin	50 mg/l	$50 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$
Rifampicin	50 mg/l	$10 \text{ mg/ml in H}_2 \text{O mit HCl}$
Spectinomycin	10 mg/l	$10 \text{ mg/ml in H}_2\text{O}$
X-Gal	60 µl pro Platte	20 mg/ml in DMF
X-Gluc	2 mM	100 mM in DMF

# 2.9 Lösungen und Puffer

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit H<sub>2</sub>Oultrapure (Wasseraufbereitungsanlage) angesetzt.

2 Material

2.9.1 Standardlösungen und Puffer		
20 fach TAE	0,8 M TrisHCl; 0,2 M Na-Acetat; 20 mM EDTA; mit Essigsäure	
	pH 7,8 einstellen	
BOX	33 g Wasser und 67g Sucrose erwärmen, 5 mMol EDTA,	
DUA	je 0,42 g Bromphenolblau, Xylencyanol, OrangeG	
DNA-Ladepuffer	0 % Glycerin in 1 x TAE; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau;	
	0,2 % (w/v) Orange G	
	10 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer pH 7,0; 5 µl 1 M	
GUS-Färbepuffer	Kaliumhexacyanoferrat (II); 5 µl 1 M Kaliumhexacyanoferrat	
	(III); 1 µl 10 % Triton x-100; 100 µl X-Gluc (50 mg/ ml in DMF)	

## 2.9.2 Extraktion von Kernproteinen

	35 % Percoll; 0,5 M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH pH 7,2;
35% Percoll	10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Triton x-100; frisch dazugeben: 5 mM β-
	Mercaptoethanol; 0,2 mM PMSF
	75 % Percoll; 0,5 M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH pH 7,2;
75% Percoll	10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Triton x-100; frisch dazugeben: 5 mM β-
	Mercaptoethanol; 0,2 mM PMSF
Dialyzanuffan	100 mM KCl ; 20 mM HEPES pH 7,6 ; 0,2 mM EDTA pH 8,0;
Dialyseputter	10 % Glycerin; frisch dazugeben: 0,5 mM DTT; 0,2 mM PMSF
	1M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH pH 7,2; 10 mM MgCl <sub>2</sub>
Extraktionspuffer	mit H <sub>2</sub> O; frisch dazugeben: 5 mM $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,2 mM
-	PMSF
	0,5 M Hexylenglycol; 50 mM PIPES-KOH pH 7,2; 10 mM
Gradientenpuffer	MgCl <sub>2</sub> ; 1 % Triton x-100; frisch dazugeben: 5 mM β-
	Mercaptoethanol; 0,2 mM PMSF
	110 mM KCl ; 15 mM HEPES pH 7,6 ; 5 mM MgCl <sub>2</sub> ; frisch
Lysepuffer	dazugeben: 1 mM DTT; 0,2 mM PMSF; 10 µl/ml Protease-
	Inhibitor for plants

### 2.9.3 EMSA

10 fach TBE	1 M Tris; 0,83 M Borsäure; 100 mM EDTA
5 fach	250 mM Tris pH 7,4 ; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 250 mM KCl; 5 mM DTT;
Bindepuffer	30 % Glycerin
Auftragspuffer	250 μl Glycerin (100%); 210 μl Bindepuffer 5

### 2.9.4 RNA-Extraktion

Extraktionspuffer	380 ml/l Phenol mit 0,1 M Citratpuffer gesättigt; 0,8 M Guanidinthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat;
-	33,4 ml/l Na-Acetat (3M Stammlsg.) pH 5,2; 5 % Glycerin
Fällungspuffer	3,5g NaCl; 11,8g Natriumcitrat auf 50 ml mit Wasser auffüllen

# 2.9.5 Nothern-Blot Analyse/denaturierende RNA Gelelektrophorese

10 fach MEN	200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA; mit 1 M NaOH pH 7,0 einstellen
20 fach SSC	3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat
Hybridisierungs- Lsg.	0,5 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,2); 1 mM EDTA; 7 % SDS

2 Material

RNA- Auftragspuffer	40 mM EDTA (ph 8,0); 8 % Glycerin; 20 % 10 x MEN; 1,2 % Bromphenolblau/Xylencyanol; 57 % Formamid; 5 % Formaldehyd
STE	100 mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Stripping-Lsg	0,1 % SDS

# 2.9.6 Präparation pflanzlicher genomischer DNA

DNA Extraktionspuffer	350 mM Sorbit, 100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,5
Kernlysepuffer	200 mM Tris-Base, 50 mM EDTA, 2 M Natriumchlorid,
	2% Cetyltrimethylammoniumbromid
Sarcosyllsg.	5% (v/v) Sarcosyl.
Präparationspuffer	frisch angesetzt bestehend aus: 25% DNA Extraktionspuffer,
	25% Kernlysepuffer, 10% Sarcosyllösung, 40% Wasser,
	0,3 g Natriumbisulfit pro 10 ml Puffer

# 2.9.7 Alkalische Lyse von E. coli

Mini I	50 mM Glukose; 10 mM EDTA; 0,1 mg/ml RNAse; 25 mM Tris mit HCl pH 8,0 einstellen
Mini II	200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS
Mini III	3 M K-Acetat ; 5 % (v/v) Ameisensäure

### 2.9.8 Transformation von E. coli

Transformationspuffer	10 mM PIPES, 15 mM CaCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl, 55 mM
	MnCl <sub>2</sub> , pH 6,7 vor Zugabe von MnCl <sub>2</sub> eingestellt

# 2.10 Software

Programm	Verwendung	Hersteller
Vector NTI	Planung der Klonierungen,	Invitrogen GmbH
	Plasmid-Karten, Vergleich	
	mit	
	Sequenzchromatogrammen	
Tina 2.0	Bearbeitung der Nothern-	Raytest
	Blot Signale	Isotopenmessgeräte GmBH
Basreader	Einlesen der Nothern-Blot	Raytest
	Signale	Isotopenmessgeräte GmBH
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe Systems
Word XP	Textverarbeitung	Microsoft
Excel XP	Diagramme	Microsoft
	Auswertung der real-time	BIO-RAD
WiyiQ 2.0	PCR-Daten	DIO-RAD
	Darstellung der	
	Aminosäurehomologie-	
Treeview	Daten aus dem Programm	Roderic D.M. Page
	Clustal W in einem Baum-	
	Diagramm	

25

3 Methoden		26
Programm	Verwendung	Hersteller
Clustel W	Homologie-Vergleiche von	THOMPSON at al. 1004
	Aminosäure-Sequenzen	THOMPSON <i>et al.</i> , 1994
	Überlagerung und	
Wasabi 1.5	Auswertung der	Hamamatsu
	Luziferase-Bilder	

#### 3 Methoden

#### 3.1 Methoden zur Anzucht und Kultivierung von Organismen

#### **Bakterien** 3.1.1

Die Anzucht von E. coli erfolgte auf LB-Festmedium oder in LB-Flüssigmedium über Nacht bei 37°C.

Agrobacterium tumefaciens wurde auf YEB-Festmedium oder in YEB-Flüssigmedium bei 28°C über zwei bis drei Tage (Festmedium) oder ü. N. (Flüssigmedium) angezogen.

Die Medien enthielten entsprechende Antibiotika (siehe 2.8.3), um das Wachstum von Resistenztragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die Inkubation von Flüssigkulturen wurde im Schüttler bei 250 rpm durchgeführt.

#### 3.1.2 Pflanzen

#### 3.1.2.1 Kultivierung von N. tabacum

Tabakpflanzen wurden unter sterilen Bedingungen auf 2MS-Festmedium in Gläsern kultiviert. Die Anzucht erfolgte in Klimakammern bei 24°C am Tag und 22°C in der Nacht in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h/8 h. Subkultiviert wurden die Pflanzen durch Abschneiden und Umsetzen der Sprossspitze auf frisches Medium.

#### 3.1.2.2 A. thaliana auf Erde

Vor der Aussaat wurde die Erde einmal für 10 min bei 90°C gedämpft und mit Confidor (50 mg/l) und einem Dünger (0,5 ml/l Wuxal<sup>®</sup> Lsg.) gegossen. Die Samen wurden 1-2 Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert, um eine gleichmäßige Keimung zu erreichen. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer unter Langtagsbedingungen (22°C, ~140µmol/m2/s Par, 14 h Licht-, 10 h Dunkelphase). In den ersten zwei Wochen der Kultivierung erhielten die Pflanzen eine Haube mit Luftschlitzen.

#### 3.1.2.3 Oberflächensterilisation von A. thaliana-Samen

Die Oberflächensterilisation erfolgte in Anlehnung an CLOUGH und BENT (2000). Arabidopsis Samen wurden in Eppendorff-Cups mit geöffnetem Deckel in einem Exsikkator platziert. Ein Becherglas mit 100 ml konzentrierter Hypochloritlösung wurde dazugestellt und mit 5 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Der Exsikkator wurde rasch geschlossen und ein geringes Vakuum angelegt, um den Exsikkator luftdicht zu verschließen und eine Verdünnung des Chlorgases zu vermeiden. Nach 5 h war eine ausreichende Sterilisation erreicht.

#### 3.1.2.4 Sterile Anzucht von A. thaliana

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (siehe 3.1.2.3) und auf Petrischalen mit MS-Medium ausgelegt. Die Stratifizierung erfolgte für 2 Tage im Dunkeln bei 4°C. Anschließend wurden die Petrischalen in einer Klimakammer unter Langtagsbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) inkubiert.

#### 3.1.2.5 Kreuzung von A. thaliana Pflanzen

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 wurden. Alle Manipulationen wurden mit Hilfe eines Binokulars durchgeführt. Die zu kreuzende Knospe wurde mit einer feinen, weichen Federstahlpinzette so dicht wie möglich unterhalb der Kelchblätter ergriffen und festgehalten. 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 Pollenspendenden Pflanze 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 hängen geblieben war. In dieser Arbeit wurden für die Kreuzung vornehmlich männlich infertile Mutanten verwendet, die Entfernung der Pollen war in diesen Fällen von geringerer Bedeutung und die Blüten konnten in einem etwas älteren Stadium noch gut verwendet werden.

#### 3.1.2.6 Samengewinnung aus A. thaliana

Zur Ernte von Samen einzelner Pflanzen wurden *Aracons* (Lehle Seeds, RoundRock, USA) verwendet. Die Unterteile der *Aracons* wurden bei beginnender Blüte auf die Töpfe gestellt, die Blütenstände durch die zentrale Bohrung geführt und die Folien der Oberteile auf die Unterteile gesetzt. Nach dem Trocknen wurden die Blütenstände abgeschnitten und zur Aufbewahrung in Butterbrottüten gesteckt. Für die Samengewinnung aus vielen Pflanzen gleichzeitig (Aufbau der Screening-Population) wurden die Blütenstände der Pflanzen lediglich mit Hilfe von Holzstäben und Nelkenringen angebunden, um sie nach dem Abtrocknen der Samen auf einer Unterlage abzuschneiden und auf diese Weise die Samen zu ernten. Die *dde2*- und *opr3*-Mutanten wurden nachdem sich die ersten sterilen Schoten gezeigt hatten mit einer 4,8 mM Methyljasmonat-Lösung (in Wasser) besprüht.

#### 3.1.2.7 Hydroponische Anzucht von A. thaliana

Die hydroponische Anzucht wurde in Anlehnung an das von GIBEAUT *et al.* (1997) beschriebene Protokoll durchgeführt. In den Deckel eines Plastikcontainers mit 12 l Fassungsvermögen wurden Löcher geschnitten, in die der untere Teil eines Kaffeebechers aus Plastik eingesetzt werden konnte. In diesem Kaffeebecher befand sich ein weiteres Loch, in das ein Stück Steinwolle (1 cm Kantenlänge, 6 cm Länge) gesteckt wurde. Der Container wurde mit hydroponischem Medium gefüllt und der Deckel des Containers so eingesetzt, das der untere Teil der Steinwolle in das Medium ragte. Das Medium wurde über eine Aquarienpumpe ständig belüftet. Die Steinwolle wurde mit Medium befeuchtet und der obere Teil mit 10-15 Samen bestückt. Alternativ wurden auf die Steinwolle auch Keimlinge aus steriler Anzucht transferiert, in diesem Fall wurden kleine durchsichtige Plastikbecher mit Löchern als Hauben verwendet. Nach ca. zwei Wochen, wurden alle bis auf einen Keimling entfernt. Dieser wurde insgesamt 5-6 Wochen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht- und 16 h Dunkelphase) kultiviert bis eine Biomasse von ca. 5 g erreicht war. Zu diesem Zeitpunkt war noch kein Blütenstand zu erkennen. In diesem Stadium wurden die Pflanzen für weitere Experimente verwendet.

#### 3.1.2.8 Induktion der Genexpression in A. thaliana

Für Behandlung mit Induktoren der *AtGLS*-Expression wurden hydroponisch angezogenen Pflanzen samt Steinwolle und Kaffeebecher (3.1.2.7) einzeln in Falcon-Gefäße (für Genexpressionsstudien) oder ohne den Kaffeebecher in Bechergläser (für Analyse von Volatilen) überführt.

Die jeweiligen Gefäße enthielten zwischen 20 und 35 ml hydroponisches Medium, versetzt mit entweder Alamethicin oder Coronalon (freundlicherweise von W. Boland zur Verfügung gestellt) oder Cycloheximid in Endkonzentrationen von 5  $\mu$ g/ml in 0,1 % Ethanol (Alamethicin) oder 33  $\mu$ g/ml in

0,1 % Ethanol (Coronalon) oder 100 µg/ml (für Abbildung 4.17) bzw. 20 µg/ml (für alle weiteren Experimente) Cycloheximid in 0,1% Ethanol. Kontrollen enthielten jeweils 0,1 % Ethanol.

Für die Alamethicin-Induktion abgeschnittener Blätter wurden die Pflanzen wie angegeben auf Erde angezogen und nach 4-6 Wochen Blätter von der Basis abgetrennt und in kleine Bechergläser mit 10 ml Alamethicin-Lösung (5  $\mu$ g/ml) gestellt, so dass nur die Petiole in Kontakt mit dem Medium stand.

Für Induktion durch Raupenfraß durch *Plutella xylostella* wurden sechs Wochen alte auf Erde unter Kurztagsbedingungen angezogene Pflanzen verwendet. Die Wurzelballen wurden in Aluminiumfolie gehüllt und in 3 l Exsikkatoren gestellt. Ungefähr 50 Larven im 3.-4. Larvenstadium wurden auf eine Pflanze gesetzt und hatten nach 30 h ca. 40 % der gesamten Blattfläche gefressen.

Für Induktion des durch Alkohol induzierbaren Promoters wurden 3 Wochen alte auf Erde angezogene Pflanzen mit 5 ml 4,7% Ethanol besprüht, bevor die Duftsammlung begonnen wurde. Kontrollpflanzen wurden mit 5 ml Wasser besprüht.

### 3.1.2.9 Identifikation von T-DNA Insertionslinien in At1g61120

Geeignete T-DNA Insertionslinien wurden durch Suche in Datenbanken (u. a. http://signal.salk.edu/cgibin/tdnaexpress) identifiziert und entsprechende Samen bei NASC bestellt. Über eine PCR und anschließende Sequenzierung des PCR-Produktes wurde die Insertion lokalisiert und homozygote Pflanzen charakterisiert wie bei SESSIONS *et al.* (2002) beschrieben. Homozygote Pflanzen wiesen kein PCR-Produkt mehr auf, das charakteristisch für das Wildtyp-Allel des *At1g61120*-Gens ist, zeigten aber das für die T-DNA Insertion typische PCR-Produkt. Homozygote Pflanzen wurden einer Expressionsanalyse nach Applikation eines Induktors unterzogen.

#### 3.1.2.10 Selektion von homozygoten coil-Mutanten

Coil-Mutanten sind im homozygoten Zustand männlich infertil, das bedeutet, sie müssen immer neu aus einer heterozygoten Population selektiert werden. Dies geschah in Anlehnung an das von REYMOND *et al.*, (2000) beschriebene Protokoll. Es wurden Samen aus einer heterozygoten Population steril auf Platten mit 1 MS Medium und 50  $\mu$ M Methyljasmonat (aus einer 1:10000 Stammlösung in Ethanol) ausgesät. Nach ca. 1,5 Wochen sind homozygote *coil*-Mutanten, daran zu erkennen, dass sie grün sind und lange Wurzeln besitzen. Die heterozygoten und Wildtyp Pflanzen dagegen sind rot und zeigen ein stark verkürztes Wurzelwachstum. Die erfolgreiche Selektion kann leicht überprüft werden durch die Blütenstände der erwachsenen Pflanzen, diese sollten in homozygoten *coil*-Mutanten nur sterile Schoten enthalten.

### 3.2 Klonierung

#### 3.2.1 Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen des Typs II sequenzspezifisch gespalten werden. Je nach Enzym entstehen dabei 3'- oder 5'- überhängende ("sticky") oder glatte ("blunt") DNA-Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit zehnfach konzentrierten Restriktionspuffern der Firma MBI Fermentas eingestellt. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in "Units" (U) angegeben, wobei mit 1 U die Enzymmenge definiert ist, die 1  $\mu$ g  $\lambda$ -DNA (48500 bp) innerhalb von 60 Minuten unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die minimale Enzymmenge (U<sub>min</sub>), die 1  $\mu$ g einer Proben-DNA in einer Stunde komplett schneidet, errechnet sich nach folgender Formel:

$$U\min = \frac{bp[\lambda]xSchnittstellen[DNA]}{Schnittstellen[\lambda]xbp[DNA]}$$
 (bp[\lambda] = 48500)

Da Art und Reinheitsgrad der DNA die Enzymaktivität beeinflussen, wurde für einen vollständigen Verdau meist ein Überschuss an Restriktionsenzym eingesetzt oder die Reaktionszeit verlängert. Um unspezifische Reaktionen durch zu hohe Glycerinkonzentrationen in den Spaltungsansätzen zu vermeiden, wurden die Volumina so gewählt, dass der Anteil der Enzymlösung am Gesamtvolumen unter 10% lag. Die Inkubation der Restriktionsansätze erfolgte in der Regel bei 37°C, dem Temperaturoptimum
#### 3 Methoden

der meisten Enzyme. Ein partieller Verdau wurde durch eine Verwendung von Plasmid-DNA im Überschuss erreicht. Die optimale Menge der Plasmid-DNA wurde experimentell in parallelen Ansätzen mit unterschiedlichen DNA-Mengen bestimmt. Das partiell verdaute Fragment wurde aus einem Gel ausgeschnitten und eluiert.

## 3.2.2 Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert eine Phosphordiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Als Kosubstrat muss ATP in geeigneter Konzentration im Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde in 10-fachem molaren Überschuss zu der gespaltenen Vektor-DNA (50 fmol) zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP pH 7,5) mit 5 Units T4-DNA-Ligase. Bei schwierigeren Klonierungen wurde zusätzlich 5%(w/v) PEG 4000 im Reaktionsansatz verwendet. Die Ligationsansätze mit einem Endvolumen von 15  $\mu$ l wurden mindestens 1 h oder ü. N. bei Raumtemperatur inkubiert.

# 3.2.3 Das Gateway<sup>TM</sup>-Kloniersystem

Das Gateway<sup>TM</sup>-Kloniersystem erlaubt die schnelle Klonierung eines Gens oder eines anderen DNA-Fragments in verschiedene Plasmide. Die Integration des Gens in den gewünschten Vektor erfolgt dabei mit hoher Effizienz und hoher Spezifität, da Orientierung und Leseraster erhalten bleiben. Im Vergleich zur herkömmlichen Klonierung mit Restriktionsenzymen und Ligasen beruht diese Methoden auf der orts- oder sequenzspezifischen Rekombination des Bakteriophagen  $\lambda$  in das Wirtsgenom von *E. coli*. Die Integration des Phagengenoms in das Wirtsgenom basiert auf verschiedenen Erkennungssequenzen, der Phagen *att*P- und der Bakterien *att*B-sites. Für die Rekombination der *att*P-sites und der *att*B-sites werden eine vom Bakteriophagen  $\lambda$  codierte Integrase, sowie ein "Integration host factor" (IHF) des Bakteriums benötigt. Durch die Rekombination wird das Phagengenom in das Bakteriengenom integriert und die Rekombinationsstellen *att*P und *att*B bleiben mit einer leichten Veränderung flankierend im Phagengenom als *att*R-sites und *att*L-sites erhalten. Die *att*L- und *att*R-sites können wiederum genutzt werden, um das Phagengenom durch Rekombination aus dem Wirtsgenom freizusetzen und den lytischen Zyklus zu starten. Neben der Integrase und dem "Integration host factor" wird hierfür noch eine Excisionase benötigt. Unter dem Zusammenwirken dieser Faktoren rekombinieren die *att*R-sites und *att*L-sites miteinander und setzen das Phagengenom aus dem Wirtsgenom frei.

Die Ausgangsplasmide des Gateway<sup>TM</sup>-Systems zeichnen sich dadurch aus, dass zwischen den Rekombinationsstellen das *ccdB*-Gen inseriert ist, dessen Produkt toxisch für die Bakterien ist. Nur wenn dieses Gen bei der Rekombination durch das gewünschte DNA-Fragment erfolgreich ausgetauscht worden ist, können die Bakterien wachsen. Für die Amplifikation der Ausgangsvektoren, die das *ccdB*-Gen enthalten, existiert der *E. coli*-Stamm DB3.1, der aufgrund einer Mutation in der Gyrase gegenüber dem Produkt des *ccdB*-Gens resistent ist. Außerdem befindet sich ein Chloramphenicol-Resistenzgen in diesem Bereich.

Die BP-Reaktion, welche der Phagenintegration entspricht, dient zur Herstellung von Eingangsplasmiden, bei der *att*B-sites eines PCR-Produktes mit den *att*P-sites eines Donor-Vektors rekombiniert werden. Damit das PCR-Produkt in der richtigen Orientierung in den Vektor rekombiniert wird, gibt es zwischen den *att*B1- und *att*B2-sites wie zwischen den *att*P1 und *att*P2-sites DNA-Sequenz-Unterschiede, die dazu führen, dass *att*B1 immer mit *att*P1 und *att*B2 immer mit *att*P2 rekombiniert. Durch die Rekombination entsteht das Eingangsplasmid, ohne *ccd*B-Gen, jedoch mit dem eingefügten PCR-Produkt. Die Herstellung der Expressionsvektoren (LR-Reaktion) aus Eingangsplasmiden entspricht der Phagengenom-Excisionsreaktion. Hierbei rekombinieren die zwei *att*L-sites des Eingangsplasmids mit den *att*R-sites des Zielvektors. Auch hier bleibt durch geringfügige DNA-Sequenzunterschiede zwischen L1 und L2 sowie R1 und R2 die gewollte Orientierung der Inserts erhalten. Aus dem Expressionsvektor lässt sich das gewünschte Gen über eine weitere BP-Reaktion wieder in ein Eingangsplasmid rekombinieren.

Die Klonierung mit dem Gateway<sup>TM</sup>-Systems wurde nach Herstellerangaben durchgeführt (Invitrogen).

## 3.2.4 Klonierung von PCR-Produkten

Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer  $5' \rightarrow 3'$ -Polymeraseaktivität auch eine terminale Desoxynukleotidyl-Transferaseaktivität, welche häufig zu einer Addition von Desoxyadenosin (dA) am

#### 3 Methoden

3'-Ende des amplifizierten DNA-Moleküls führt. Die PCR-Produkte mit einem zusätzlichen überhängenden dA an den 3'-Enden können direkt in Vektoren kloniert werden, die komplementär dT-Überhänge an ihren 3'-Enden besitzen (MEAD *et al.*, 1991). In dieser Arbeit wurde der Vektor pGEM<sup>®</sup>-T von Promega für die Klonierung von PCR-Produkten benutzt. Das Plasmid war von dem Hersteller über die *EcoRV*-Schnittstelle linearisiert und mit terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase behandelt worden, so dass jeweils ein überhängendes Didesoxythymidin (ddT) an den 3'-Enden des geöffneten Vektors vorlag. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben.

## 3.2.5 Blau-Weiss Selektion

Eine wesentliche Erleichterung zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, welche nach der Transformation ein rekombinantes Plasmid tragen, bietet die Blau-Weiß-Selektion. Sie wird z. B. bei der Klonierung von PCR-Produkten mit dem Vektor pGEM<sup>®</sup>-T oder psK eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der  $\alpha$ -Komplementation des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase. Die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren ( $\alpha$ -Peptid) können zusammen mit einem inaktiven Enzym, dem die Aminosäuren 11 bis 14 fehlen, eine funktionierende  $\beta$ -Galaktosidase bilden. Das aktive Enzym hydrolysiert z. B. das Substrat X-Gal, das daraufhin durch Luftoxidation eine blaue Färbung zeigt. Bakterienstämme mit dem inaktiven Enzym können durch Aufnahme eines Plasmids, das die für das  $\alpha$ -Peptid codierende DNA trägt, X-Gal umsetzen. Als Induktor der Genexpression wurde IPTG eingesetzt. Die zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzten Agarplatten wurden kurz vor Gebrauch mit jeweils 50 µl der X-Gal und der IPTG-Stammlösungen beschichtet. Wird die das  $\alpha$ -Peptid codierende Sequenz durch Einbau von fremder DNA unterbrochen, so bleiben die Bakterienkolonien weiß. Bakterienklone, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und somit das  $\alpha$ -Peptid synthetisieren, sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

## 3.2.6 Hybridisierung von Oligonukleotiden zu Doppelsträngen

Jeweils 10  $\mu$ l der beiden komplementären, einzelsträngigen Oligonukleotide (100  $\mu$ M) wurden in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l in einem Schraubdeckel-Reaktionsgefäß vereint und zur Auflösung von Sekundärstrukturen 10 min bei 100°C im Wasserbad aufgekocht. Die Hybridisierung erfolgte beim langsamen Abkühlen des Wasserbades auf Raumtemperatur.

#### **3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (MULLIS und FALOONA, 1987) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Templates amplifiziert werden. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst denaturiert. Nach Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge an der Matrizen-DNA. Dieser Zyklus aus Denaturieren, Primeranlagerung und DNA-Synthese wird mehrfach wiederholt und führt exponentiell zu einer selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz. Die Länge und die Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus, sowie die Anzahl von Zyklen wurde durch den Schmelzpunkt der Primer und die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Zyklen starteten nach zweiminütiger Denaturierung bei 94°C. Die anschließende Denaturierung erfolgte in der Regel für 30s bei 92°C, das Primer-Annealing für 30s bei der für die Primer charakteristischen Temperatur und die Elongation für 1 min/kb bei 72°C. Die Schmelztemperatur T<sub>m</sub> eines Primers berechnet sich nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren GC-Gehalt (% GC), als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt. Es gibt verschiedene Formeln zur Berechnung der Schmelztemperatur, in dieser Arbeit wurde die Schmelztemperatur mit dem Programm Vector NTI berechnet.

#### 3.2.8 Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit Hilfe des BigDye<sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits von Perkin-Elmer. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977). Im Reaktionsansatz für die Amplifikation der zu sequenzierenden DNA (lineare PCR mit einem Primer) befinden sich neben den vier Desoxynukleotiden auch die entsprechenden Didesoxynukleotide (Terminatoren), welche bei Einbau einen Abbruch der DNA-Synthese herbeiführen. Die vier Terminatoren sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Nukleotid-spezifischen Kettenabbruchprodukte während der Elektrophorese im Analysegerät (Kapillarsequenzer ABI Prism 310 von Applied Biosystems) detektiert werden können.

Für die PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10  $\mu$ l wurden 500 ng – 1  $\mu$ g (je größer das Plasmid ist desto mehr DNA wurde eingesetzt) Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2  $\mu$ l RR-(ready reaction) Mix eingesetzt. Im Thermocycler wurden folgende Schritte 25 x durchlaufen: 10 s 95°C, 5 s 50°C und 4 min 60°C. Anschließend fand eine Ethanol-Fällung statt, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Hierzu wurde der Ansatz mit 9,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O und 30,5  $\mu$ l EtOH abs. versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand vollständig abgenommen, das DNA-Pellet mit 100  $\mu$ l 70 % (v/v) EtOH gewaschen, 1 min bei 95°C getrocknet und in 15  $\mu$ l TSR (Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer) resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 95°C für 2 min wurde die Probe sofort 2 min auf Eis gehalten und für die Sequenzanalyse im ABI Prism 310 in spezielle Sequenziergefäße überführt.

#### 3.2.9 Plasmide für Northern-Analyse und EMSA

Mit den Primern P 15 und P 16 und dem Plasmid *pBsAtGLS (ORF)* als Template wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das wie in 3.2.4 beschrieben in den *pGEM-T* Vektor kloniert wurde, was zu dem Konstrukt *pGEM/GLS (Sonde)* führte. Das Ergebnis der Klonierung wurde durch Sequenzierung mit den Primern P 46 und P 47 überprüft. Die gleichen Primer wurden zur Amplifikation der Sonden-DNA benutzt. Für das im EMSA verwendetet Fragment wurde mit den Primern P 38 und P 39 und dem Plasmid *pENTR-GLS* (-1162/+3) als *Template* ein PCR-Fragment amplifiziert, das wie in 3.2.4 beschrieben in den *psK*-Vektor kloniert wurde. Das Konstrukt wurde wie oben beschrieben sequenziert.

#### 3.2.10 Transgene Pflanzen 35S::AtGLS und AlcA::At1g61120

JATY50A19 wurde mit AatII geschnitten und die resultierenden Fragmente auf einem 0,7% Agarosegel aufgetrennt. Ein 13 kb großes Fragment, welches das Gen At1g61120 enthalten sollte wurde aus dem Gel isoliert und aufgereinigt. Das aufgereinigte Fragment wurde in die AatII Restriktionsstelle des *pGEM-T* Vektors kloniert, wodurch der Vektor *pGEM/GLS* erhalten wurde. Mit Hilfe einer rekombinaten PCR wurde der Blumenkohl Mosaik Virus Promotor (35S) beziehungsweise der AlcA-Promotor an den 5' untranslatierten Bereich (wie bei NCBI angegeben) fusioniert.

Dazu wurde zunächst in einer ersten PCR der CaMV 35S-Promotor aus dem pB2GW7 (-1011 bis +3) mit den Primern P1 und P3 amplifiziert. Für die Amplifikation des AlcA-Promotors (-298 bi +3) wurde der pCAMBIA3300 Vektor als Template eingesetzt, die verwendeten Primer waren in dieser PCR P2 und P3. Der Primer P3 enthält die ersten 36 Bp des AtGLS-5'UTR. Anschließend wurde die PCR-Produkte aus einem Agarose-Gel aufgereinigt und erneut für eine PCR mit dem jeweiligen Sense Primer (P1 oder P2) und dem Primer P4 eingesetzt, der einen Teil des ersten Exons (+ 302 Bp) des AtGLS-Gens enthält. Als Template wurde der Vektor pGEM/GLS eingesetzt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden in die MCS des Vektors *psK* kloniert, was jeweils zu den Konstrukten *psK/35S::GLS(1.Exon)* und psK/AlcA::GLS(1.Exon) führte. Die Fusion wurde beim ersten Konstrukt durch Sequenzierung mit dem Primer P 44 überprüft, während beim zweiten Konstrukt die Primer P 46 und P 47, verwendet wurden. Die Vektor pGEM/GLS wurde mit Bsp120I und Esp3I geschnitten, wodurch der gesamte AtGLS-Promotor sowie ein Teil des ersten Exons entfernt wurde. Die Konstrukte psK/35S::GLS(1.Exon) und psK/AlcA::GLS(1.Exon) wurden ebenfalls mit Bsp120I und Esp3I geschnitten (der Vektor psK/AlcA::GLS(1.Exon) wurde nur partiell verdaut) und die resultierenden Fragmente, die entweder den 35S oder den AlcA-Promotor mit einem Teil des ersten Exons des GLS-Gens enthielten, wurden in den Bsp120I/Esp31 geschnittenen pGEM/GLS kloniert. Dies führte jeweils zu den Konstrukten pGEM/35S::GLS und pGEM/AlcA::GLS. Der Erfolg der Klonierung wurde durch Sequenzierung mit den gleichen Primern überprüft, die für die Überprüfung der Fusion verwendet wurden. Das Konstrukt pGEM/35S::GLS wurde mit AatII/SacI geschnitten, wodurch ein Fragment mit dem 35S-Promotor fusioniert mit dem GLS-Gen sowie 2,4 kb einer 3' flankierenden Seguenz enthalten wurde, das in den AatII/SacI geschnittenen pB2GW7 kloniert wurde. Dies führte zu dem Konstrukt pB2GW7-35S::GLS. das für eine stabile Transformation verwendet wurde. Für den Transfer des AlcA::GLS Konstruktes in den Vektor pCambia 3300 wurde dieser mit einer zusätzlichen MCS ausgestattet. Dazu wurde der Vektor mit HindIII aufgeschnitten, und die zuvor hybridisierten Oligonukleotide P 5 und P 6 (siehe 3.2.6) wurden in den Vektor ligiert, was zu dem Plasmid pCambiaMCS führte. Die Orientierung der MCS wurde durch Sequenzierung mit dem Primer P 7 festgestellt. Das aus dem mit Nhel/PstI geschnittenen Vektor pGEM/AlcA::GLS erhaltene Fragment wurde in den XmaJI/Sdal geschnitten Vektor pCambiaMCS ligiert, was zu dem Konstrukt pCambia-AlcA::GLS führte. Dieses Konstrukt wurde für die stabile Transformation in A. thaliana verwendet.

#### 3.2.11 Transgene Pflanzen 35S::AtGLS<sub>ORF</sub>

Der Vektor *pBsAtGLS(ORF)* wurde als Template für die Amplifikation des 2,6 kb langen *AtGLS-ORFs* eingesetzt, wobei die Primer P 25 und P 26 verwendet wurden, die Rekombinationssequenzen für die Gateway-Technologie enthalten. Die PCR wurde mit der *proofreading*-Polymerase Advantage 2 durchgeführt. Nach den Angaben des Herstellers wurde mittels einer BP-Reaktion das amplifizierte Fragment in den *pDONR201* Vektor eingefügt. Durch Sequenzierung mit den Primern P 27 bis P 37 sowie den Primern P 48 und P 49 wurde sicher gestellt, das die verwendete Sequenz identisch mit der bei NCBI angegebenen ist. Nachfolgend konnte der *AtGLS-ORF* mit Hilfe einer LR-Reaktion in den binären Vektor *pB2GW7* rekombiniert werden. Dieses Konstrukt wurde in *A. thaliana* (Daten nicht gezeigt) und *N. tabacum* eingebracht.

#### 3.2.12 Transgene Pflanzen 35S::AtGLS:YFP

Mit Hilfe einer rekombinanten PCR wurden die Schnittstellen AsiSI und Smal direkt vor das Stop-Codon des AtGLS-Gens eingefügt. Dazu wurde eine PCR mit den Primern P 8 und P 10 sowie dem Vektor pGEM/35S::GLS als Template durchgeführt Das entstehende PCR-Produkt wurde aufgereinigt und für eine zweite PCR mit den Primern P 8 und P 9 sowie mit dem oben genannten Vektor als Template durchgeführt. Das entstehende Fragment wurde mit BshTI geschnitten und in den BshTI-geschnittenen Vektor *pGEM/35S::GLS* ligiert, das erhaltene Konstrukt wird als *pGEM/35S::GLS(REN)* bezeichnet. Die richtige Orientierung des Fragmentes wurde mit Hilfe einer Restriktionsanalyse bestimmt, und die Sequenz mit dem Primer P 13 überprüft. Das YFP-Gen wurde mit Hilfe der Primern P 11 und P 12 und dem Vektor pENSG-YFP als Template amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pSK kloniert und mit den Primern P 46 und P 47 sequenziert, was zu dem Plasmid pSK-YFP führte. Dieser Vektor wurde mit AsiSI/SmaI geschnitten und das erhaltene Fragment in den mit AsiSI/SmaIgeschnittenen pGEM/35S::GLS(REN) Vektor ligiert. Der Erfolg wurde durch Sequenzierung mit den Primern P 13 und P 14 überprüft. Das erhaltene Konstrukt (pGEM-35S::GLS:YFP) wurde mit AatII/SacI geschnitten und das erhaltene Fragment in den AatII/SacI geschnittenen pB2GW7 ligiert. Das daraus erhaltene Konstrukt (pB2GW7-35S::GLS:YFP) wurde für die stabile Transformation in Pflanzen verwendet.

#### 3.2.13 Transgene Pflanzen AtGLS::GUS

Genomische DNA wurde als *Template* für die Amplifikation (mit der Advantage 2 Polymerase) eines 1,2 kb langes *AtGLS*-Promotorfragmentes eingesetzt, wobei die Primer P 17 und P 18 verwendet wurden, die Rekombinationssequenzen für die Gateway- Technologie enthalten. Nach den Angaben des Herstellers wurde mittels einer BP-Reaktion das amplifizierte Fragment in den *pDONR201* Vektor eingefügt. Dies führte zu dem Konstrukt *pENTR-GLS*(+*1162*/+*3*), das mit den Primern P 19 bis P 21 sowie mit den Primern P 48 und P 49 sequenziert wurde. Es wurden solange Fragmente durch Klonierung ausgetauscht, bis die Sequenz mit der von NCBI angegeben übereinstimmte. Nachfolgend konnte mit Hilfe einer LR-Reaktion in den binären Vektor *pGateGUS* rekombiniert werden. Die Fusion zwischen dem *AtGLS*-Promotor und dem *GUS*-Gen wurde durch Sequenzierung mit dem Primer P 45 überprüft. Das entstandene Konstrukt (*pGateGUS-GLS*(+*1162*/+*3*)) wurde wie für die stabile Transformation von *A. thaliana* verwendet.

#### 3.2.14 Transgene Pflanzen AtGLS::PAT; 35S::PAT und AtGLS::LUC

Zunächst wurde der AtGLS-Promotor im Konstrukt pENTR-GLS(+1162/+3) um 1 kb verlängert. Dazu wurde mit den Primern P 40 und P 41 eine PCR (Advantage 2 Polymerase) mit genomischer DNA als Template durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde ungerichtet in den *pSK* kloniert (*psK-GLS* (-2166/-839)). Mit Hilfe einer Restriktionsanalyse wurde ein Klon selektiert, in dem sich das distale Ende des Promotors in direkter Nachbarschaft zur *Bsu151* Restriktionsschnittstelle in der MCS befand. Dieser Klon wurde mit den Primern P 46 und P 47 teilweise sequenziert. Die Konstrukte *pENTR-GLS*(+1162/+3) und *psK-GLS*(-2166/-839) wurden in den *dam*<sup>-</sup> Bakterienstamm SCS110 transformiert und aus den erhaltenen Bakterien erneut Plasmid isoliert. Diese Plasmide wurden mit *Bcll/Bsu151* geschnitten und das Fragment aus *psK-GLS*(-2166/-839) wurde in den *Bcll/Bsu151* geschnittenen *pENTR-GLS*(+1162/+3) Vektor ligiert; dies führte zu dem Konstrukt *pENTR-GLS* (-2166/+3). Für die transgenen *AtGLS::LUC* Pflanzen wurde der *AtGLS*-Promotor aus *pENTR-GLS* (-2166/+3) mit Hilfe der LR Reaktion nach Angaben des Herstellers in den Vektor *pGWB235* rekombiniert. Der Erfolg der Reaktion

wurde durch Restriktionsanalyse bestimmt. Das resultierende Konstrukt pGWB235-GLS (-2166/+3) wurde für die stabile Transformation in A. *thaliana* verwendet.

Für die transgenen AtGLS::PAT Pflanzen wurde zunächst ein geeignetes binäres Plasmid konstruiert. Dazu wurde das PAT-Gen mit den Primern P 22 und P 23 mit Hilfe des Templates pFGC-A7 amplifiziert. Durch die Überhänge des Primer wurden flankierend xbal und Pstl Restriktionsschnittstellen eingefügt. Das PCR-Produkt wurde mit xbaI und PstI geschnitten und in den XbaI/PstI geschnittenen Vektor PUCA7 ligiert. Das entstehende Konstrukt PUCA7-PAT wurde mit Xbal und HindIII geschnitten und in den Bcu/HindIII geschnittenen Vektor pKGW ligiert. Das Ergebnis der Klonierung (pKGW-PAT) wurde durch Sequenzierung mit den Primern P 24 und P 43 überprüft. Mit Hilfe der LR Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers das Promotorfragment aus pENTR-GLS(-2166/+3) in den Vektor pKGW-PAT rekombiniert, was zu dem Konstrukt pKGW-PAT-GLS(-2166/+3) führte. Dieses wurde für die stabile Transformation in Pflanzen verwendet. In den Vektor pKGW-PAT wurde ebenfalls der 35S-Promotor eingefügt. Dazu wurde der Vektor pUCA7 mit EcoRI und Smal verdaut und das erhaltene Fragment, welches den 35S-Promotor enthielt, wurde in den mit EcoRI/EcoRV geschnittenen Vektor pUC18ENTRY 2 ligiert. Das erhaltene Konstrukt (pUC18-ENTRY2-35S) wurde zusammen mit dem Vektor pKGW-PAT in einer LR-Reaktion eingesetzt. Dadurch gelangt der 35S-Promotor vor das PAT-Gen. Das Resultat dieser Klonierung (pkGW-PAT-35S) wurde für die Transformation von A. thaliana eingesetzt und führte zu transgenen 35S::PAT Pflanzen.

## 3.2.15 Transgene Pflanzen ABC::GUS und ABD::GUS

Für die ABC::GUS transgene Pflanzen wurde den Primern P 50 und P 52 und dem Vektor *pENTR-GLS* (-1162/+3) als Template wurde die Region des AtGLS-Promotors zwischen -295bp und -54 Bp amplifiziert. Über den Primer P 50 wurde eine *EcoRI* und eine *Eco72I*-Schnittstelle angefügt. Das PCR-Produkt wurde mit *EcoRI* geschnitten und in den *EcoRI/StuI* geöffneten *pTT-GUS*-Vektor ligiert. Die *StuI*-Schnittstelle im *pTT-GUS*-Vektor ist acht Bp von der TATA-Box entfernt. Anschließend wurde der entstandene Vektor *pTTGUS-GLS(ABC)* mit *Eco72I*- und *MunI* geschnitten und in den *MssI/MunI* geöffneten Vektor *pGateGUS* ligiert. Über eine anschließende Sequenzierung mit P 45 wurde die Klonierung überprüft. Das entstandene Konstrukt *pGateGUS-GLS(ABC)* wurde für die Transformation der Pflanzen verwendet.

Für die *ABD::GUS* transgene Pflanzen wurde den Primern P 51 und P 55 und dem Vektor *pENTR-GLS* (-1162/+3) als Template wurde die Region des *AtGLS*-Promotors zwischen –295bp und –113 Bp amplifiziert. Durch die Wahl der Primer enthielt das PCR-Produkt eine *NdeI* und *Bsu15I* Schnittstelle, nach Klonierung in den Vektor *pSK* (siehe 3.2.4) konnte das Fragment mit einem *Bsu15I/NdeI* Schnitt isoliert werden und in den *Bsu15I/NdeI* geschnittenen Vektor *pENTR-GLS* (-1162/+3) ligiert werden. Das erhaltene Konstrukt *pENTR-GLS*(*ABD*) wurde mit Hilfe der LR Reaktion nach dem Protokoll des Herstellers in den Vektor *pGateGUS* rekombiniert. Das daraus gewonnene Konstrukt *pGateGUS-GLS*(*ABD*) wurde mit dem Primer P 45 sequenziert und anschließend für die stabile Transformation in Pflanzen eingesetzt.

### 3.2.16 Transgene Pflanzen BCD::LUC

Das Promotorfragment -234 bis -172 wurde mit den Primern P 53 und P 54 amplifiziert. Der Vektor *pENTR-GLS* (-1162/+3) diente dabei als Template. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit *Bsu151* und *Nde1* geschnitten und in den *Bsu151/Nde1* geschnittenen Vektor *pENTR-GLS* (-1162/+3) ligiert. Das erhaltene Konstrukt (*pENTR-GLS(BCD)*) wurde mit Hilfe einer LR-Reaktion nach Angaben des Herstellers in den Vektor *pGWB235* rekombiniert. Das Ergebnis der Klonierung wurde durch Sequenzierung mit dem Primer P 56 überprüft. Das erhaltene Konstrukt *pGWB235-GLS(BCD)* wurde für die stabile Transformation in *A. thaliana* verwendet.

### **3.3** Methoden zur genetischen Manipulation

### 3.3.1 EMS Mutagenese

*Arabidopsis thaliana*-Samen wurden einer chemischen Mutagenese mit Methansulfonsäureethylester (EMS, Ethylmethansulfonat, Sigma) unterzogenen. Die Methode wurde in Anlehnung an das von BRENNER (2002) verwendete Protokoll durchgeführt. Da EMS eine flüchtige, stark mutagene Flüssigkeit ist, mussten alle Manipulationen in einem Schutzkasten aus Plastik durchgeführt werden.

Zusätzlich wurden Schutzhandschuhe aus Nitril in doppelter Schicht und Handschuhe, die bis zur Schulter reichten getragen. 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.

Jeweils 3g oder 5g A.. *thaliana* Samen wurden abgewogen und in einem 50 ml Falcon-Röhrchen mit 50 ml 0,1 % (w/w) Kaliumchlorid hydriert. Nach 24 h wurde die Lösung zweimal ausgetauscht (Samen wurden durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert) und anschließend mit 0,23% (v/v) EMS versetzt. Die Inkubation erfolgte für 12 h unter gleichmäßigem Schwenken (Intellimixer). Anschließend wurde die EMS-Lösung in einen bereitstehenden Becher mit kristallinem Natriumthiosulfat entsorgt und die Samen dreimal mit einer 100 mM Natriumthiosulfat-Lsg. gewaschen und damit das EMS deaktiviert. Die auf diese Weise hergestellten M1-Samen wurden anschließend in 151 einer 0,1% Agar-Lösung aufgenommen, in eine Spritzflasche abgefüllt und damit auf Erde ausgebracht. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Langtagsbedingungen. Einige der Pflanzen wiesen abweichend gefärbte Sektoren in den Blättern auf, was eine Indikation für eine erfolgreiche Mutagenese ist. Nach 6 Wochen wurde je ein Tablett Pflanzen zusammen geerntet. Die geernteten M2 Samen wurden weiterverwendet.

### 3.3.2 Neutronen Mutagenese

Die Methode wurde in Anlehnung an das von LI *et al.* 2001entwickelte Protokoll durchgeführt. 2 g Samen wurden in der Biological Irradiation Facility am Neutronen Zentrum in Budapest von Dr. Palfalvi mit einer Dosis von 60 Gy bestrahlt. Nach ca. zwei Wochen, (abhängig von der Abnahme der Strahlung), wurden die Samen in Wasser aufgenommen und für 24 h bei 4°C inkubiert und anschließend in 81 einer 0,1% Agar-Lösung aufgenommen, in eine Spritzflasche abgefüllt und damit auf Erde ausgebracht. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte unter Langtagsbedingungen. Einige der Pflanzen wiesen abweichend gefärbte Sektoren in den Blättern auf, was eine Indikation für eine erfolgreiche Mutagenese ist. Nach 6 Wochen wurde je ein Topf Pflanzen (~200 Pflanzen) zusammen geerntet. Die geernteten M2 Samen wurden weiterverwendet.

### 3.3.3 Herstellung kompetenter E. coli Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode von INOUE *et al.* (1990) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5 $\alpha$  verwendet. Von einer frisch ausgestrichenen Platte wurde zunächst eine Vorkultur in SOC-Medium angeimpft, die nach etwa 8 h Inkubation als Inokulum für eine 5 ml (SOC-Medium) Übernachtkultur diente. Die Übernachtkultur wurde am nächsten Tag in 300 ml SOC-Medium verdünnt und bis zu einer OD600 von 0,2 - 0,25 bei 37°C in einem 2 l Erlenmeyerkolben geschüttelt. Das weitere Wachstum der Zellen erfolgte dann bei einer Temperatur von 18°C. Bei einer OD600 von 0,4 - 0,5 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, Eppendorf-Kühlzentrifuge) pelletiert und in 90 ml eiskaltem, sterilem Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und in 30 ml Transformationspuffer aufgenommen. Es folgte der zweimalige Zusatz von je 1050  $\mu$ l DMSO, wobei die Zellen nach jeder Zugabe 5 min auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug 107 cfu/µg DNA.

#### 3.3.4 Transformation von E. coli

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage nackte DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode (HANAHAN, 1983) wurden *Escherichia coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. 200  $\mu$ l kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, dann erfolgte die Zugabe der Plasmid-DNA und Inkubation für 30 min auf Eis (Anheftung der DNA an die Zellen). Durch einen Hitzeschock der Zellen für 90 sek bei 42°C erfolgte die Aufnahme der DNA. Eine Regeneration der Zellen schloss sich nach Zugabe von 800  $\mu$ l LB-Medium für 60 min bei 37°C an. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert.

#### 3.3.5 Herstellung kompetenter A. tumefaciens Zellen

Die Transformation von Agrobacterium tumefaciens mit DNA erfolgte mittels Elektroporation (DOWER et al., 1988). Es wurde eine ü. N. Kultur der Bakterien in YEB-Medium verwendet und in 250 ml Medium verdünnt. Nachdem die Kultur bei 28°C eine OD600 von 0,5 erreicht hatte wurde sie durch

#### 3 Methoden

Zentrifugation (5 min, 5000 rpm) geerntet und die Zellen 3 mal in 4°C kaltem, sterilen Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 15% Glyzerin resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bis zur Verwendung bei –80°C gelagert werden.

#### 3.3.6 Gentransfer in A. tumefaciens

Zur Elektroporation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit der gewünschten DNA versetzt und in eine Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 2 mm) überführt. Die Transformation erfolgte im Elektroporator bei einer Spannung von 2,5 kV, Kapazität von 25  $\mu$ F und Widerstand von 400  $\Omega$ . Die Zellen wurden nach der Elektroporation mit 1 ml SOC-Medium versetzt und 1 h bei 28°C inkubiert. Nach der Regeneration wurden die Zellen auf Selektionsmedium ausplattiert und 2 - 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

#### 3.3.7 Agrobakterien vermittelter Gentransfer in A. thaliana

Die Transformation von Arabidopsis thaliana wurde in Anlehnung an CLOUGH und BENT (1998) durchgeführt. Dazu wurden Arabidopsis thaliana-Pflanzen auf Erde 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. Agrobacterium tumefaciens GV3101, die zuvor mit dem gewünschten binären Vektor transformiert worden waren, wurden zunächst in einer 10-ml-Vorkultur in YEB mit Rifampicin, Gentamycin sowie einem der Plasmid-Resistenz entsprechenden Antibiotikum angezogen. Aus der 10 ml Kultur wurden 9,8 ml abzentrifugiert und einer Plasmid Präparation mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit gemäß den Empfehlungen des Herstellers für Agrobakterien durchgeführt. Das gewonnene Plasmid wurde parallel zum entsprechenden Plasmid aus Escherichia coli mit Restriktionsenzymen verdaut, die zu möglichst verschiedenen und großen Fragmenten führen. Die beiden Restriktionsansätze wurden parallel auf ein Gel geladen und dokumentiert. Wenn die sich ergebenden Banden in beiden Fällen die gleiche Größe aufwiesen, wurde der Rest der Kultur in eine 25 ml Kultur überführt. Diese Vorkultur wurde nach Inkubation über Nacht vollständig in eine 400-ml-Hauptkultur überführt und diese erneut über Nacht kultiviert. Die Kultur wurde durch Zentrifugation für 30 min bei 2500 rpm in der Sorval Zentrifuge (Rotor SLA-3000) sedimentiert und in einer 5% Saccharose Lösung aufgenommen, so dass eine OD600 von 0,8 erreicht wird. Die Lösung wurde mit 0,05% Silvet-L77 versetzt und die Pflanzen kopfüber in die Lösung getaucht und etwas geschwenkt, um eine gute Benetzung zu erreichen. Die Pflanzen erhielten für einen Tag eine transparente Haube und wurden bis zum Abreifen der Samen unter Langtagsbedingungen kultiviert. Bei Selektion auf Basta-resistente Pflanzen, wurden die Samen auf Erde ausgebracht und ca. 5 Tage nach der Keimung mit einer 2 mM Phosphinotricin-Lsg. (Basta<sup>TM</sup>) besprüht. Die Behandlung wurde alle drei Tage wiederholt, nach ein bis zwei Wochen wurden sensitive Pflanzen gelb und sterben ab, während die transformierten Pflanzen grün blieben und weiter wuchsen. Die Selektion auf Kanamycin-Resistenz erfolgte durch sterile Aussaat auf 1 MS-Medium mit 50 mg/l Kanamycin. Transgene Pflanzen zeigen den gleichen Phänotyp, wie bei der Basta-Selektion. Eine Selektion homozygoter Linien geschah durch Aussaat der Nachkommen; waren nur noch resistente Nachkommen nachweisbar galt die Linie als homozygot.

#### 3.3.8 Agrobakterien vermittelter Gentransfer in N. tabacum

Die stabile Transformation von *Nicotiana tabacum* wurde über Agrobakterien-vermitteltem Gentransfer erreicht und erfolgt nach der Blattscheiben-Methode (modifiziert nach HORSCH *et al.*, 1985). Hierzu wurden Blätter von steril angezogenen Tabakpflanzen in 1-2 cm2 große Stücke zerteilt und für 2-3 min in eine Suspension aus *Agrobacterium tumefaciens* getaucht. Zur Herstellung der Suspension wurde 1 ml einer 2d-Kultur von zuvor mit einem binären Plasmid transformierten Agrobakterien in 20 ml YEB-Flüssigmedium verdünnt. Die Blattstücke wurden anschließend dreimal in sterilem Leitungswasser abgespült und mit sterilem Fließpapier abgetupft, um überschüssige Bakteriensuspension zu entfernen und danach mit der Blattunterseite auf MS-Festmedium gelegt. Es folgte eine zweitägige Inkubation der abgedunkelten Platten bei 24°C im Klimaschrank. Während dieser Kokultivierung können die Agrobakterien ihre T-DNA in die Pflanzenzellen transferieren, so dass eine stabile Integration der Fremd-DNA in das Pflanzengenom möglich wird. Nach dieser Phase wurden die Blattstücke auf SHI-Medium umgelegt und im Klimaschrank in einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16 h/8 h bei 28°C kultiviert. Die Hormone des Mediums induzieren die Bildung von Kallusgewebe, aus dem sich Sprossen regenerieren können. Die dem SHI-Medium beigefügten Antibiotika bzw. Herbiziden (in diesem Fall 6 mg/l DL-

#### 3 Methoden

Phosphinotricin, Duchefa) dienen zum einen dem Abtöten der Agrobakterien und zum anderen der Selektion transgener Pflanzenzellen. Das Umlegen der Blattstücke auf frisches SHI-Medium wurde in den ersten drei Wochen wöchentlich, anschließend 14-tägig bis zur Ausbildung von Sprossen wiederholt. Anschließend wurden die Spitzen von regenerierten Sprossen zur Bewurzelung auf hormonfreies MS-Medium mit Antibiotikazusatz umgesetzt.

## 3.4 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

## 3.4.1 Alkalische Lyse

Für die Präparation von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen wurde eine modifizierte alkalische Lyse zum Aufschluss von der Bakterien durchgeführt (LE GOUILL *et al.*, 1994). 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden in einer Tischzentrifuge (1 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur) pelletiert und die Zellen nach Dekantieren des Überstandes in 100  $\mu$ l Mini I resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu$ l Mini II und 200  $\mu$ l Chloroform. Nach einminütiger Inkubation wurden 150  $\mu$ l Mini III zur Neutralisation zugegeben, die Ansätze gevortext und die entstandenen Präzipitate durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt. Die obere, wässrige Phase (400  $\mu$ l) wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 2 Vol. eiskaltem Ethanol gemischt. Nach anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 rpm wurde die sedimentierte DNA mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50  $\mu$ l H<sub>2</sub>0 gelöst und konnte dann für Restriktionsanalysen (jeweils 2-5  $\mu$ l) eingesetzt werden.

# 3.4.2 Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits

Für Sequenzierreaktionen und Klonierungen wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen oder des Spin Miniprep Kits der Firma Macherey-Nagel isoliert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend vom Protokoll wurden stets 4 ml stationäre *E. coli*-Kultur eingesetzt und die DNA mit 35 µl Wasser eluiert.

# 3.4.3 Plasmidisolation in größerem Maßstab

Größere Mengen Plasmid-DNA mit hohem Reinheitsgrad wurden mit Hilfe der Midi- und Maxi-Kitts der Firma Qiagen isoliert. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

## 3.4.4 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen oder das NucleoSpin Extract Kit von der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

## 3.4.5 Präparation von genomischer DNA aus A. thaliana

100 mg Pflanzenmaterial wurden in der Schwingmühle in einem 2 ml Eppendorff-Gefäß zerkleinert, anschließend in 750  $\mu$ l Präparationspuffer aufgenommen. Die Suspension wurde gut durchmischt und 120 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 700  $\mu$ l Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) dazugegeben und die Lösung gut durchmischt. Nach der Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 2/3 bis 1 Volumen kaltes Isopropanol dazugegeben und der Ansatz gut durchmischt. Es folgte eine Zentrifugation von 5 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Die Zentrifugation wurde wiederholt, der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Die trockene DNA wurde in 50  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

# 3.4.6 RNA-Extraktion aus Pflanzen

Die Methode kann dazu verwendet werden aus dem selben Pflanzenmaterial sowohl RNA, als auch DNA und Proteine zu gewinnen (CHOMCZYNSKI, 1993 sowie CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987). Die Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion, die die Tatsache ausnutzt, dass RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden. Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer

inhibieren RNAsen und verhindern damit eine Degradation der RNA. Die Fällung der RNA mit Isopropanol, sowie den Salzen NaCl und Natriumcitrat dient der Einengung des Volumens. Nach dem Zerkleinern der Proben in der Schwingmühle unter flüssigem Stickstoff wurden pro 150 mg Material 1,3 ml Extraktionspuffer zugegeben. Die Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zufügen von 260  $\mu$ l Chloroform und erneutem Schütteln, wurden die Proben für 30-60 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Zu den 900  $\mu$ l Überstand wurden 325  $\mu$ l Fällungspuffer gegeben und invertiert. Nach Zugabe von 325  $\mu$ l Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 50 - 100  $\mu$ l Wasser aufgenommen.

#### 3.4.7 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der GeneQuant II verwendet. Da die Absorption von Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich bei 260 nm gemessen werden kann, ließ sich durch Anwendung des Lambert-Beer Gesetzes die Konzentration der DNA oder RNA bestimmen. Das Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge wird durch die Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems in den Heterozyklen der Basen hervorgerufen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht somit eine OD260 von

1,0 einer Nukleinsäure-Konzentration von 50  $\mu$ g/ml bei doppelsträngige DNA und 40  $\mu$ g/ml bei RNA. Im Vergleich zur Absorption bei der Wellenlänge 280 nm, bei der die aromatischen Seitenketten von Proteinen angeregt werden, lässt sich der Quotient aus der Absorption der Wellenlängen 260 / 280 nm als ein Maß für den Reinheitsgrad der DNA- oder RNA-Präparation darstellen. Der Reinheitsgrad sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Gemessen wurden 1:100 Verdünnungen der Präparationen um den linearen Messbereich des Photometers einzuhalten.

### 3.4.8 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA für analytische und präparative Zwecke wurde in horizontalen Agarosegelen (10 cm x 7 cm x 0,3 cm, 16 Taschen) mit 1 x TAE als Laufpuffer durchgeführt. Für DNA-Moleküle im Größenbereich von 300 bp bis 10 kb wurden Gele mit einer Konzentration von 1%(w/v) Agarose in 1 fach TAE benutzt. Für die Auftrennung kleinerer Moleküle wurden so genannte HEC-Gele (1 % (w/v) Agarose und 0,7 % (w/v) Hydroxyethylcellulose (HEC) in 1 x TAE) oder 3-4% (w/v) Agarose-Gele eingesetzt. Für die Analyse größerer Fragmente wurde 0,7% (w/v) Agarose verwendet. Die DNA-Proben wurden zunächst mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und bei 90-120 V über einem Zeitraum von 0,5-1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Der Verlauf der Elektrophoresefront konnte anhand der Farbmarker (Bromphenolblau und Orange G) verfolgt werden. Um die DNA im Anschluss an die Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Gel 10 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 mg/l EtBr) inkubiert, anschließend der Gelhintergrund kurz in Wasser entfärbt und der Bandenverlauf auf dem UV Transilluminator (302 nm) mit Hilfe der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

### 3.4.9 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Elektrophorese mit 1 x MEN als Puffersystem fand in horizontalen, formaldehydhaltigen Agarosegelen (1% (w/v) Agarose, 5,5% (v/v) Formaldehyd) statt. Die Gele hatten eine Größe von 15 cm x 10 cm x 1 cm und besaßen entweder 15 Taschen mit 90  $\mu$ l Probenvolumen oder 20 Taschen mit 60  $\mu$ l Probenvolumen. Vor dem Auftragen wurden jeweils 20  $\mu$ g der RNA mit RNAse-freiem Wasser auf gleiche Volumina gebracht und mit 3 x RNA-Auftragspuffer versetzt, welcher 1  $\mu$ g Ethidiumbromid pro Ansatz enthielt. Die RNA-Proben wurden anschließend durch Inkubation bei 65°C für 10 min denaturiert und bis zum Auftragen auf Eis gelagert. Die Elektrophorese erfolgte nach Beladen des Gels und dem vollständigen Auffüllen (mit 1 x MEN) der Taschen bei 12 Watt und 0,2 kVh. Als Laufpuffer wurde 1 x MEN verwendet, lediglich an das Gel angeschichtet, ohne es zu bedecken. Die Auftrennung der RNA wurde auf dem UV-Transilluminator mit Hilfe der Geldokumentationsanlage sichtbar gemacht.

## **3.5** Methoden zur Expressionsanalyse

## 3.5.1 Northern-Blot-Analyse

Ziel der Northern-Blot-Analyse ist die Bestimmung der Menge eines Transkriptes in der Pflanze. Dazu wird die gesamte RNA aus einer Pflanze isoliert, auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Kapillar-Blots auf eine Membran transferiert. Diese Membran wird mit einer für das zu analysierende Gen spezifischen DNA-Sonde inkubiert, die zuvor radioaktiv markiert wurde. Die radioaktive Sonde hybridisiert mit dem Transkript auf der Membran und kann nach der Entfernung überschüssiger Sonden-DNA sichtbar gemacht werden.

## 3.5.1.1 Kapillar-Blot

Mittels Kapillar-Blot wurde die durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurden zwei Lagen Fließpapier mit 10 fach SSC äquilibriert und so auf einer ebenen Plastikplatte aufgebracht, dass die Enden in ein 10 fach SSC-Pufferreservoir tauchten. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier gelegt. Die Kanten des Gels wurden mit Plastikstreifen abgedeckt. Die Nylonmembran (Hybond N+) wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt, mit drei Lagen Fließpapier und Papiertüchern bedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschwert. Der Kapillar-Blot erfolgte für mindestens 14 h. Die RNA wurde durch kurze UV-Bestrahlung auf dem Transilluminator und durch zweistündige Inkubation bei 80°C auf der Membranoberfläche fixiert.

## 3.5.1.2 Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion

Für die Herstellung radioaktiv markierter Hybridisierungssonden wird ein DNA-Fragment nach Restriktionsspaltung oder nach einer PCR aus einem Agarosegel eluiert. Die Markierungsreaktion erfolgte nach der *Random-Prime-Labeling*-Methode nach FEINBERG und VOGELSTEIN (1983) bei der Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die Matrizen-DNA binden: Die *annealten* Hexanukleotide dienen dann als Primer für die Neusynthese eines komplementären Stranges durch die Klenow-Polymerase unter Einbau von radioaktiven Nukleotiden. Die verwendete Klenow-Polymerase ist modifiziert, so dass sie keine Exonucleaseaktivität (exo-) mehr besitzt. Die Markierungsreaktion wurde mit Hilfe des MegaprimeTM DNA-labeling-system-Kits vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

# 3.5.1.3 Hybridisierung der Membran

Die Hybridisierung erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von CHURCH und GILBERT (1984). Alle Inkubationen erfolgten bei 65°C im Rotations-Hybridisierungsofen. Die zu hybridisierende Membran wurde in Hybridisierungsröhren überführt und 30 min in 10 ml Hybridisierungslsg. vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde nach 15-minütiger Denaturierung bei 100°C im Wasserbad zugegeben, nachdem die Hybridisierungslsg. einmal ausgetauscht wurde. Die Inkubation erfolgte für mindestens 14 h.

## 3.5.1.4 Waschen und Dokumentieren der Membran

Nach der Hybridisierung wurde die Membran standardmäßig einmal für 30 min mit Waschlösung I (2 fach SSC, 0,1% (w/v) SDS) im Rotations-Hybridisierungsofen und einmal für 30 min mit Waschlösung II (1 fach SSC, 0,1% (w/v) SDS) im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls mit 300 ml Waschlösung II im Bellydancer<sup>TM</sup> wiederholt, bis der Filter eine Strahlung von 20-100 counts/s aufwies. Durch Waschschritte unter Verwendung von Waschlösungen unterschiedlicher Salzkonzentrationen werden unspezifisch bindende Sondenmoleküle entfernt. Bei hohen Salzkonzentrationen. Nach dem Waschen wurde der Filter feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer Expositionskassette mit einem Bioimager-Screen für einige Stunden oder Tage exponiert. Die Auswertung des Screens erfolgte am Bioimager, die Daten wurden mit dem Programm Basread ausgelesen. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme TINA®2.0 benutzt. Eine

Normalisierung der Signale wurde über den Vergleich mit der dokumentierten Ethidiumbromidfärbung der RNA oder durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde für das Gen Aktin erzielt.

#### 3.5.1.5 Rehybridisierung der Membran

Die auf der Membranoberfläche fixierte RNA kann nacheinander mit mehreren verschiedenen Sonden hybridisiert werden. Dazu müssen die auf dem Filter befindlichen radioaktiven Sonden aus der vorhergehenden Hybridisierung durch Denaturierung der RNA-DNA-Hybride in Waschlösung bei hoher Temperatur abgelöst werden. Die Membran wurde durch Inkubation mit kochendheißer 0,1% iger SDS-Lösung für 15 min im Bellydancer<sup>TM</sup> bei 65°C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

#### 3.5.2 Real-time RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurde 1µg RNA eingesetzt, mit 20 pmol oligodT-primer und 200 pmol randomnonamer-primern versetzt und mit Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zum Denaturieren für 10 min auf 70°C erhitzt, anschließend für 5 min auf Eis gestellt. 4 µl 5xFirst-Strang-Synthse-Puffer, 2µl dNTPs (je 10 mM) und 1µl RNAse-Inhibitor (entsprechend 50 U) wurden zugegeben, bevor der Reaktionsansatz für 10 min auf 37°C erwärmt wurde. Anschließend wurden 0,5 µl (entsprechend 100 U) Reverse Transkriptase H<sup>-</sup> zugegeben und die Reaktion für 70 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70°C abgestoppt. Der cDNA-Ansatz wurde mit Wasser 1:10 verdünnt, von dieser Verdünnung wurde jeweils 1µl zu dem Master-Mix gegeben (pro Ansatz 2,5 µl 10x PCR-Puffer Bioline; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 µM dNTPs; 2,5µl se Primer-Mix (als QuantiTect Primer-Mix bei Qiagen erhältlich, Sequenz und Konzentration nicht bekannt); 0,1 fach Sybr Green; 10 nM Fluorescein; 0,25 U BioTaq DNA-Polymerase; mit Wasser auf 24 µl aufgefüllt). Nach 3 min primärer Denaturierung wurden 40 PCR-Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt: 20 sec 95°C Denaturierung; 20 sec 55°C Annealing; 40 sec 72°C Elongation Jeweils während der Annealing- und der Elongationsphase jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Anschließend erfolgte eine terminale Elongation für 4 min, nach der das PCR-Produkt für 1 min bei 95°C denaturiert wurde. Für 1 min erfolgte dann eine Renaturierung mit anschließender Schmelzkurven-Bestimmung, bei der die Temperatur in 0,5°C-Schritten bis auf 95°C erhöht wurde. Als Referenz wurde die Real-Time RT-PCR mit jeder cDNA, zusätzlich zu den dargestellten Primern, mit dem ebenfalls von Quiagen erhaltenen Primern für die PP2A-Untereinheit von *PDF2* (*At1g13320*) durchgeführt und mit der  $2^{-\Delta\Delta C}$ <sub>T</sub> –Methode (LIVAK und SCHMITTGEN, 2001) die relativen Transkript-Mengen bestimmt.

#### 3.5.3 Analyse der Promotoraktivität mit Reportergenen

Für die Analyse der Promotoraktivität wird der zu untersuchende Promotor mit einem Reportergen fusioniert und das entstandene Konstrukt transient oder stabil in Pflanzen transformiert. Die Expression des Reportergens unter der Kontrolle des zu analysierenden Promotors lässt sich dann über die katalytische Aktivität des entsprechenden Reporterproteins nachweisen. Diese Technik wird vor allem bei der Analyse Gewebe- oder Organspezifischer Promotoraktivität oder in Screening-Strategien verwendet. Bei einem Mutanten-Screen ist vor allem von Vorteil, das viele Pflanzen simultan und methodisch einfach getestet werden können.

#### 3.5.3.1 Luciferase

Das Luciferase-Gen (*LUC*) des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kann als Reportergen benutzt werden, um die Genexpression in Pflanzen visuell darzustellen (SCHNEIDER *et al.*, 1990). Die cDNA des *LUC*-Gens wurde von DE WET *et al.* (1987) kloniert. Die Methode beruht darauf, dass die Luciferase eine Reaktion katalysiert bei der Licht freigesetzt wird. Die Reaktion läuft in zwei Schritten ab, und benötigt Luciferin, ATP und Sauerstoff als Substrat.

1) Luciferase + Luciferin + ATP  $\rightarrow$  Luciferase + Luciferyl-AMP + PP

2) Luciferase + Luciferyl-AMP +  $O_2 \rightarrow$  Luciferase + Oxyluciferin + AMP +  $CO_2 + hv$ 

Wird ein Überschuss an Luciferin eingesetzt, ist die Menge des emittierten Lichtes proportional zur Menge der Luciferase in der Pflanze. Luciferin (1 mM in 0,01% TritonX-100) wurde auf transgene Pflanzen (*AtGLS::LUC* und *BCD::LUC*) gesprüht. Direkt im Anschluss wurden die Pflanzen in

Dunkelheit gestellt, um die Autofluoreszenz des Chlorophylls abzuschwächen. Nach ca. 5 – 10 min konnte die Luminiszenz der Pflanzen fotografiert werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Wasabi 1.5. Für die Ergebnisse in Kapitel 4.3.2 und 4.4 wurden hydroponisch angezogene Pflanzen, denen eine 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lsg. appliziert wurde fotografiert. Das in 4.3.3 beschriebene Screening-Verfahren wurde mit 14 Tage alten unter Langtagsbedingungen auf 1MS Platten (ca. 150 Samen pro Platte) angezogenen Keimlingen durchgeführt, die aus den in 3.3.2 beschriebenen M2 Samen angezogen wurden. Durch Vergleich mit dem Schwarz-Weiß Bild wurden Keimlinge mit starker (verglichen mit nicht mutagenisierten Pflanzen) konstitutiver LUC-Expression selektiert, auf Erde übergesetzt und bis zur Samenreife unter Langtagsbedingungen kultiviert. Die aus diesen Pflanzen gewonnen Samen wurden auf Erde ausgelegt, drei Wochen unter Langtagsbedingungen kultiviert und anschließend wie oben beschrieben mit Luciferin besprüht und fotografiert.

## 3.5.3.2 Phosphinotricinacetyltransferase

Das Gen Phosphinotricinacetyltransferase PAT vermittelt Resistenz gegen das Herbizid Phosphinotricin (Block *et al.*, 1987). Pflanzen mit dem *PAT*-Gen unter der Kontrolle des *AtGLS*-Promotors (*AtGLS::PAT*) sollten bei konstitutiver Aktivität des Promotors resistent gegen Phosphinotricin sein. Die in 3.3.1 beschriebenen Samen wurden auf Erde ausgesät (300 Samen pro Topf mit einem Durchmesser von 6 cm) und 5-7 Tage nach der Aussaat mit 2 mM Phosphinotricin (ca. 5 l Phosphinotricin-Lösung für 25 Tabletts mit je 30 Töpfen) besprüht. Die Behandlung wurde täglich wiederholt. Nach 1-2 Wochen waren die gesuchten Mutanten dadurch zu erkennen, dass sie grüner und größer waren, als nicht-mutagenisierte *AtGLS::PAT* Pflanzen. Gleichzeitig wurden Pflanzen mit dem *PAT*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *35S*-Promotors angezogen und parallel mit Phosphinotricin behandelt, um eine mögliche Überdosierung des Herbizids zu erkennen.

## **3.5.3.3** β-Glucoronidase (GUS)

Die Expression des *GUS*-Gens führt zur Bildung eines Enzyms, welches die  $\beta$ -glycosidische Bindungen von Glucuroniden hydrolysiert. Wird dem Enzym ein synthetisches Substrat angeboten, so kann die Spaltung mit der Freisetzung eines Farbstoffes gekoppelt werden. In diesem Fall wird das Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glucuronid (X-Gluc) durch  $\beta$ -Glucuronidase gespalten. Die freigesetzten Indolylderivate dimerisieren und werden durch Luftsauerstoff oxidiert, es bildet sich ein tiefblauer Indigofarbstoff. Die Inkubation pflanzlicher Gewebe mit dem X-Gluc- Substrat erlaubt einen Nachweis, in welchen Geweben das Reportergen exprimiert wird (Jefferson et al., 1987). Blüten, Blütenstände, Schoten und Blätter von *AtGLS:GUS*-Pflanzen wurden für 8 h in einem GUS-Färbepuffer inkubiert. Anschließend würde das Chlorophyll durch Waschen mit 70% Ethanol entfernt.

## 3.6 Sammlung und Analyse von Volatilen

Die Sammlung der Volatile erfolgte in Anlehnung an die bei THOLL et al. (2005) und CHEN et al. (2003b) beschriebenen Protokolle. Für die Sammlung von Volatilen nach Behandlung mit Alamethicin oder Coronalon wurden abgeschnittene Blätter oder intakte hydroponisch angezogene Pflanzen in Bechergläser mit der entsprechenden Induktionslösung gestellt und in 11 Exsikkatoren überführt. Für die in 4.1.4 und in 4.2.9 erzielten Resultate wurden die Pflanzen anstatt der Exsikkatoren in Bratschläuche (Melitta) eingehüllt. Emittierte Volatile wurden von 0-9 h und von 21-30 h während der Behandlung mit Hilfe der closed-loop Stripping Methode wie bei DONATH und BOLAND (1995) und BOLAND et al. (1984) beschrieben gesammelt. Zwischen den beiden Duftmessungen wurden die Exsikkatoren belüftet. Während der in 4.1.2 beschriebenen Induktion durch Raupenfraß wurden die Volatile von 21-30 h nach Beginn der Behandlung gesammelt. Für die Sammlung der Volatile wurden Super-Q-(25 mg) Filter verwendet. Für die Sammlungen der in 4.1.4 und in 4.2.9 beschrieben Volatile sowie der Volatile nach Raupenfraß wurden Aktivkohlefilter verwendet. Eluiert wurden die Volatile mit 100 µl (Super-Q) beziehungsweise 40 µl (Aktivkohlefilter) Dichlormethan, als Standard wurde 120 ng Nonyl-acetat zugegeben. Die Proben wurden anschließend mit Hilfe eines Hewlett-Packard 6890 Gaschromatographen verbunden mit einem Hewlett-Packard 5973 Massenspektrograph analysiert. Die Trennung fand auf einer (5%-phenyl)-methylpolysiloxane (DB5) Säule (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) mit Massen 30 m x 0.25 mm und einer Filmdicke von 0,25 µm statt. Helium wurde als Trägergas verwendet (Gasstrom-Rate 2 ml min<sup>-1</sup>). Das Injektionsvolumen betrug 2 µl. Der Temperatur-Gradient betrug 5°C/min im Intervall von 40°C (für 3 min konstant) bis 220°C. Für die in 4.2.9 gezeigten Resultate wurde die GC-Anlage 6890

von Agilent verwendet die an einen Massendetektor Typ 5973 (Agilent) gekoppelt ist. Der Helium-Gasstrom betrug 1 l/min und als Säule wurde das Modell CP8822 VF-23ms (Varian) mit den Maßen 30 m x 0,25 mm und einer Filmdicke von 0,25  $\mu$ m verwendet. Es wurden 2  $\mu$ l im injiziert. Der Temperaturgradient betrug 20°C/min im Intervall von 40°C (für 1 min konstant) bis 250°C. (*E,E*)-alpha-farnesen, MeSA, TMTT und wurden durch Vergleich der Retentionszeiten und Massenspektren mit Standards, Literaturangaben und Datenbanken (NIST, Wiley) bestimmt. Der (*E,E*)-geranyllinalool-Standard wurde von Acros Organics erworben oder wie bei HEFNER *et al.* (1998) beschrieben durch saure Hydrolyse von all-trans GGPP erhalten. Dafür wurden 100  $\mu$ l einer 50  $\mu$ M GGPP-Lsg mit 10  $\mu$ l einer 3M HCl Lösung versetzt und 20 min bei 30°C inkubiert. GL und Geranylgeraniol wurden mit Pentan extrahiert und der Pentan-Extrakt mit MgSO<sub>4</sub> getrocknet. Der TMTT-Standard wurde von W. BOLAND freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die Quantifizierung wurden repräsentative Einzel-Ionen Peaks integriert und mit dem entsprechenden Wert des Standards verglichen. Für die Resultate in 4.2.9 wurde nur das relative Verhältnis von GL zu TMTT ermittelt, dazu wurde das GL-Signal auf 100% gesetzt und das TMTT Signal dazu in Relation gesetzt.

#### **3.7** Proteinbiochemische Methoden

#### 3.7.1 Zellkernisolierung aus A. thaliana

Für die Zellkernisolierung werden A. thaliana Pflanzen verwendet, die im Kurztag gewachsen und etwa fünf bis sechs Wochen alt waren. Die Pflanzen sollten nicht blühen und die Blätter ohne Chlorosen und Verletzungen sein. Das Ernten des Blattmaterials erfolgte kurz nach dem Einschalten des Lichts in der Klimakammer. Alle Schritte erfolgten, soweit es möglich ist, im Kühlraum bei 4°C. 5g Blattmaterial wurden unter Stickstoff gemörsert, das Pulver wurde in Falcon-Röhrchen mit 20 ml Extraktionspuffer überführt und mit dem Stabmörser (Art-Miccra D-8) für 5 min (Stärke A bis B) weiter zerkleinert. Die Lösung wurde möglichst vollständig durch zwei Lagen Miracloth in ein Becherglas filtriert. Das Volumen wurde auf ein Endvolumen von 24 ml mit Extraktionspuffer eingestellt. Die Lösung wurde leicht gerührt und tropfenweise 1 ml Triton X-100 (25%) zugefügt und weitere 15-30 min inkubiert. Für einen Percollgradienten wurde 6ml 75% Percoll mit 6 ml 35% Percoll überschichtet und die Probe zugefügt. Der Gradient wurde bei 4°C und 3500 rpm zentrifugiert (Rotina-35R; Ausschwingrotor). Mit einer abgeschnittenen blauer Spitze wurden ca. 5 ml einer Kerne-enthaltenden Lösung aus der Interphase abgesaugt. Die erhaltene Lösung wurde mit Gradientenpuffer auf 20-25 ml aufgefüllt und die Klümpchen durch vorsichtiges Schwenken und Drehen gelöst. 6 ml 35 % Percoll wurden in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt und die Probe überschichtet. Es erfolgt eine Zentrifugation wie oben beschrieben für 10 min. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet in Gradientenpuffer mit 20% Glycerin aufgenommen. 8 µl Kerne enthaltende Lösung wurden für eine Dapifärbung mit 2 µl Dapi (einer 1:20 Verdünnung vom Stock (1mg/ml) mit Gradientenpuffer +Glycerin) versetzt und für 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Kerne unter UV-Licht mikroskopiert und die Ausbeute bestimmt. Kerne können bei -80°C für einige Tage gelagert werden.

#### 3.7.2 Präparation von Kernproteinen

Es werden Kerne wie unter 3.7.2 beschrieben verwendet. Alle Schritte erfolgten, soweit möglich, im Kühlraum bei 4 °C. Die Kerne wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 ml Gradientenpuffer versetzt und für 6 min bei 4.400 rpm (Rotina 35-R; *soft start and stop* Option) zentrifugiert und anschließend der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde mit 450 µl Lyse-Puffer versetzt und das Volumen bestimmt. Anschließend wurde 1/9 des gemessenen Volumens 4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Lsg. tropfenweise zugegeben und 30 min bei 4°C unter ständigem Drehen (Intellimixer; 1,25 rpm) inkubiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 55000 rpm (Ultrazentrifuge) für 90 min bei 4°C. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Volumen bestimmt. Es wurde (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pulverisiert und portionsweise 0,37 mg auf 1 ml Probe gegeben. Die Probe wurde für 2h bei 4°C gedreht (Intellimixer; 1,25 rpm) und anschließend für 45 min bei 15.000 rpm zentrifugiert (Rotina-35R). Das Pellet schwamm oben, die restliche Flüssigkeit wurde entfernt und zum Pellet wurde 65-100 µl Dialysepuffer gegeben. Die Probe wurde 15-30 min auf Eis inkubiert und das Pellet durch Schwenken gelöst. Der Deckel eines Eppendorff-Cups wurde mit einem Loch versehen, über das eine Dialysemembran gespannt war. In diese Cup wurde die Probe gefüllt und das Cup wurde umgekehrt (die Probe sollte sich im Deckel befinden) in einen Becher mit 250 ml Dialysepuffer gestellt. Zwischen Deckel und Lösung sollten sich keine Luftblasen befinden, durch einen

Schwimmer wurde das Cup an der Oberfläche gehalten. Die Probe wurde über Nacht dialysiert, nach dem Benetzen der Cup-Wände mit der Probe wurde in ausgetauschtem Dialysepuffer die Probe weitere 6 h dialysiert. Die Proteine wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C aufbewahrt.

#### 3.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinextrakten

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach BRADFORD (1979) beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blue G-250 (von 465 nm zu 595 nm) nach Bindung an ein Protein. Eine adäquate Menge des Proteinextraktes (1-2  $\mu$ l) wurde in die Vertiefung ("well") einer 96-"well"-Mikrotiterplatte vorgelegt mit Wasser auf ein Endvolumen von 20  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend mit 200  $\mu$ l verdünntem (1:5 mit H<sub>2</sub>O) Bradford-Reagenz (Roth) vermischt. Nach 5-minütiger Inkubation konnte die optische Dichte bei 595 nm im Spektralphotometer (MRX Dynex Plate Reader) bestimmt werden. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit BSA-Standards (1  $\mu$ g, 3  $\mu$ g, 6  $\mu$ g) erstellten Eichgerade ermittelt.

## 3.7.4 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragmentes für EMSA

Die Eigenschaft der Klenow-Polymerase, 3'-OH-Enden komplementär zum überhängenden 5'-Phosphat-Ende aufzufüllen, wurde genutzt, um die Sonden für Gelretardationsanalysen <sup>32</sup>P-radioaktiv zu markieren. Dafür wurden ca. 15 µg Plasmid-DNA (psK –GLS(-297/-138) mit BpiI in einem Volumen von 20 µl über Nacht verdaut. 5 µl der Reaktion wurden mit 1,5 µl 10 fach Klenow Puffer (MBI) und 5 µl [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (50 µCi) sowie 5 U Klenow-Polymerase (exo<sup>-</sup>) versetzt und 2-3 h bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde eine Micro Spin<sup>TM</sup> G25 Column (Amersham) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Die weitere Aufarbeitung des Fragmentes erfolgte mittels eines 5 % (v/v) nativen Polyacrylamidgels (5 ml 10 fach TBE, 5 ml Glycerin (100%), 28,33 ml Wasser, 6,25 ml Acrylamid (40%), zum Starten der Polymerisation 20 µl TEMED (100%) und 300 µl APS (10%) zugeben ), bei dem der gesamte Ansatz aufgetrennt wurde. Das gewünschte Fragment wurde schließlich durch Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm lokalisiert und ausgeschnitten. Die Sonde wurde aus dem PAA-Gel eluiert durch Inkubation des zerkleinerten Gelstückes über Nacht in 100 bis 500 µl TE-Puffer und anschließender Sedimentation der Gelstücke durch Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm (Tischzentrifuge). Die Strahlung der Sonde im Überstand wurde im Szintillationsmeßgerät quantifiziert.

### 3.7.5 Gelretardationsanalyse (EMSA)

DNA-Fragmente, an die Proteine binden, zeigen in einem nativen Polyacrylamidgel ein anderes Laufverhalten als ungebundene DNA. Der Protein-DNA-Komplex wandert aufgrund seines höheren Molekulargewichts weniger weit, verglichen mit dem proteinfreien Fragment. Diese Verzögerung im Laufverhalten wird als Retardierung oder "shift" bezeichnet. Man macht sich das Phänomen in Gelretardationsanalysen (Electrophoretic Mobility Shift Assay: EMSA) zunutze, um die spezifische Bindung von Proteinen an bestimmte DNA-Sequenzen nachzuweisen. Hierzu wird das entsprechende DNA-Fragment radioaktiv markiert und in einem geeigneten Puffer mit einem Proteinextrakt inkubiert. Nach Gelelektrophorese und Autoradiographie des Gels kann aus dem auftretenden Bandenmuster auf eine eventuelle Interaktion von Proteinen und DNA geschlossen werden.

Für dieses Experiment wurden 2-6  $\mu$ g native Kernproteinextrakte (siehe 3.7.2) verwendet. Die Bindereaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 26  $\mu$ l in 1 fach Bindepuffer. Die Proteinproben wurden in Gegenwart von 3  $\mu$ g polydI/dC (als Kompetitor für unspezifische DNA-Bindeproteine) für 10 min auf Eis vorinkubiert. Nach Zugabe von 4  $\mu$ l radioaktiv markiertem DNA-Fragment (siehe 3.7.4) pro Ansatz folgte eine zehnminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Proben wurden anschließend mit jeweils 10  $\mu$ l Auftragspuffer (200  $\mu$ l Glycerin (100%) mit 210  $\mu$ l 5 fach Bindepuffer ) versetzt und in einem nativen, 5 %-igem Polyacrylamidgel (5 ml 10xTBE, 5 ml Glycerin (100%), 28,33 ml Wasser, 6,25 ml Acrylamid (40%), zum Starten der Polymerisation 20  $\mu$ l TEMED (100%) und 300  $\mu$ l APS (10%) zugeben) bei 4°C gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde zuvor für 30 min bei 150 V ohne Proben einer Elektrophorese unterzogen. Die Elektrophorese der Proben erfolgte bei 30-40 V für 12 bis 16 h. Für die Autoradiographie wurde das Gel auf Fließpapier transferiert und unter Haushaltsfolie 2 h bei 80°C auf einem Vakuumgeltrockner getrocknet. Nach mindestens 2 Tagen Exposition auf einem IP-Screen erfolgte die Detektion der Signale im Bioimager (BAS-1000 von Fuji). Für die Auswertung wurden das Programm TINA<sup>®</sup>2.0 verwendet.

# 4 Ergebnisse

#### 4.1 Funktionelle Charakterisierung von *At1g61120*

# 4.1.1 *A. thaliana* emittiert TMTT und Geranyllinalool nach Behandlung mit Alamethicin

In *A. thaliana* wurde die Emission von TMTT nach Befall mit dem Herbivoren *P. rapae* festgestellt (VAN POECKE *et al.*, 2001), allerdings war das Ausmaß der Induktion sehr variabel. Für die in 1.7 genannten Ziele wurde jedoch ein Induktor benötigt, der zu einer reproduzierbaren und hohen Emission von TMTT führt. In Lima-Bohne ist der Elicitor Alamethicin ein guter Induktor der TMTT-Produktion (ENGELBERTH *et al.*, 2001).



Abbildung 4.1 GC-MS-Chromatogramm von Volatilen, die von A.. *thaliana* nach Behandlung mit dem Elicitor Alamethicin emittiert werden.

Die Volatilen wurden mit der *closed-loop*-Methode gewonnen (siehe 3.6.) Wildtyp Blätter wurden mit 5µg/ml Alamethicin induziert (unten), die Kontrolle (oben) wurde nur mit dem Lösungsmittel (0,1 % Ethanol) behandelt. Volatile wurden von 0 bis 9 h und von 20 bis 31 h nach Induktion gesammelt, die Ergebnisse des zweiten Intervalls sind dargestellt. In der Kontrolle sind Spuren von (*E*,*E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen (TMTT) aber kein Methylsalicylat (MeSA), (*E*,*E*)- $\alpha$ -Farnessen und Geranyllinalool (GL) zu detektieren. Daten wurden von D. Tholl erfasst.

Dabei handelt es sich um ein 20 Aminosäuren langes Peptid aus dem Pilz *Trichoderma viride*, das in der Zellmembran Kanäle formt, die für einwertige Kationen durchlässig sind (SANSOM, 1993; BREWER *et al.*, 1987; CAFISO, 1994). Die Wirkung von Alamethicin kann evtl. über diese Bildung von Kanälen erklärt werden, denn es wurde gezeigt, dass eine Veränderung der Kationen-Konzentration in der Zelle durch eine Elicitor-vermittelte Öffnung von Ionen-Kanälen zu einer Aktivierung von Abwehr-Genen führen kann (HAHLBROCK *et al.*, 1995; JABS *et al.*, 1997).

Um zu testen, ob Alamethicin auch in *A. thaliana* ein effizienter Elicitor der Terpenemission ist, wurde abgeschnittenen Blättern über die Petiole Alamethicin appliziert und Terpene über dem Luftraum gesammelt (siehe3.6). **Abbildung 4.1** zeigt, dass die TMTT-Emission durch die Behandlung mit Alamethicin deutlich steigt. In der Kontrolle sind nur Spuren des Terpens festzustellen, während die Alamethicinbehandelte Pflanze ein deutliches Signal zeigt. Die Emission des Terpens (E,E)- $\alpha$ -Farnesen ist ebenfalls erst nach der Behandlung nachweisbar.



**Abbildung 4.2** Massenspektrogramm von Geranyllinalool, das von *A. thaliana* Blättern emittiert wird (oben) und GL, welches durch saure Hydrolyse von all-trans GGPP erhalten wurde (unten). Daten wurden von D. Tholl erfasst

Ferner wird nach Alamethicin-Behandlung Methylsalicylat (MeSA) gebildet. Besonders interessant ist das Auftreten von Geranyllinalool (GL) in der mit Alamethicin behandelten Pflanze, das als Vorstufe von TMTT postuliert wurde (siehe 1.3). Das Massenspektrogramm des GL Signals ist identisch mit dem Spektrogramm von GL, welches durch saure Hydrolyse von all-trans GGPP gewonnen wurde (siehe **Abbildung 4.2**). Alamethicin ist somit ein effizienter Induktor der GL- bzw. TMTT-Produktion.

#### 4.1.2 Die Emission von TMTT korreliert mit der Expression von At1g61120

Da Alamethicin ein Induktor für die GL- bzw. TMTT-Synthese ist, sollte das Enzym, das einen limitierenden Schritt in der Synthese katalysiert, ebenfalls durch Alamethicin induzierbar sein. GGPP ist ein notwendiges Substrat für viele essentielle Stoffwechselwege, daher kann vermutet werden, dass das erste regulierte Enzym eine Diterpensynthase ist, die aus GGPP das Produkt Geranyllinalool bildet (siehe 1.3). In *A. thaliana* gibt es 32 Terpensynthasen (TPS) (AUBOURG *et al.*, 2002). Ausgehend von der Annahme, dass die Regulation auf der Ebene der Transkription stattfindet, wurden alle TPS mit RT-PCR daraufhin getestet, ob eine Steigerung des Transkriptes durch Behandlung mit Alamethicin erfolgt (CHEN *et al.*, 2003b).

Bei dieser Analyse fielen vier Gene besonders auf. Drei von ihnen (At2g24210, At4g16730, At4g16740) weisen eine große Homologie zu Monoterpensynthasen auf. At2g24210 und At4g16740 sind jeweils bereits als Myrcen/Ocimen-Synthase (BOHLMANN et al., 2000) bzw. Ocimen-Synthase (FALDT et al., 2003) charakterisiert worden. Die enzymatische Aktivität von At4g16730 ist unbekannt, allerdings spricht die Homologie zu den Monoterpensynthasen gegen eine Funktion als Diterpensynthase. Bei der vierten TPS handelt es sich um At1g61120, die eine größere Homologie zu den Diterpensynthasen des primären Stoffwechsels aufweist (AUBOURG et al., 2002). Diese Kriterien machen Atlg61120 zu einem viel versprechenden Kandidaten für die vermutete Geranyllinalool-Synthase. Um die Hypothese weiter zu untermauern, wurden verschiedene Bedingungen, die zur TMTT-Produktion führen, daraufhin untersucht, ob es unter diesen Bedingungen ebenfalls zur Steigerung des At1g61120-Transkriptes kommt. Bei den Bedingungen handelt es sich zum einen um eine Induktion mit dem Coronatin-Derivat Coronalon (SCHULER et al., 2004), zum anderen um eine Infektion mit dem Herbivoren Plutella xylostella. Diese beiden Reize wurden mit der bereits charakterisierten Alamethicin-Induktion verglichen. In **Abbildung 4.3** ist zu erkennen, dass Alamethicin, Coronalon und Infektion mit *P. xylostella* zur Emission von TMTT führen und gleichzeitig in der Lage sind, das Transkript des Gens *At1g61120* zu induzieren. Hier besteht also eine Korrelation zwischen dem Auftreten des Transkriptes und der TMTT Emission. *P. xylostella* ist auch in der Lage die Emission größerer Mengen GL zu induzieren, allerdings findet sich in dieser Probe auch die größte Menge TMTT. Das Fehlen von GL in den mit Alamethicin behandelten hydroponischen Pflanzen ist vermutlich darin begründet, dass hier die Synthese von GL weniger stark induziert ist und die geringeren Mengen effizient in TMTT umgesetzt werden, so dass es zu keiner Akkumulation von GL kommt.



Abbildung 4.3 Vergleich der Emission von Volatilen und der Expression von *At1g61120* in *A. thaliana* nach Behandlung mit den Elicitoren Alamethicin und Coronalon sowie nach Infektion mit *P. xylostella* 

(A) Emission der vier häufigsten Volatile. Alamethicin (5  $\mu$ g/ml) wurde über die Petiolen abgeschnittener Blätter verabreicht oder wie auch Coronalon (100  $\mu$ M) über die Wurzeln hydroponisch angezogener Pflanzen appliziert. Für die Infektion mit *P. xylostella* wurden 50 Raupen im 3. bis 4. Larvenstadium pro Pflanze verwendet. Volatile wurden von 21 bis 30 h nach Beginn der Behandlung gesammelt. Die Ergebnisse geben die Werte und Standardabweichnungen von drei Experimenten wieder. Daten wurden von D. Tholl erfasst.

(**B**) Northern-Blot-Analyse der *At1g61120*-Transkription in *Arabidopsis* Blättern nach Induktion mit Coronalon und Alamethicin (beides über die Wurzeln hydroponisch kultivierter Pflanzen appliziert) sowie nach Infektion mit *P. xylostella*.

4 Ergebnisse

# 4.1.3 *At1g61120* Insertionslinien zeigen keine Emission von TMTT und GL nach Induktion mit Coronalon

Für eine funktionelle Charakterisierung des Gens *At1g61120* wurden zwei T-DNA-Insertionslinien (*salk\_039864* und *salk\_078187*) im *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) bestellt. Aus den erhaltenen Samen wurden homozygote Pflanzen isoliert (siehe 3.1.2.9). In **Abbildung 4.4A** ist zu erkennen dass in *salk\_039864* die Insertion im 6. Intron liegt, während die Linie *salk\_078187* eine T-DNA Insertion im 8. Exon aufweist. Beiden Linien fehlt im Gegensatz zum Wildtyp das *At1g61120*-Transkript nach Induktion mit Coronalon (siehe **Abbildung 4.4B**). Die homozygoten T-DNA-Insertionslinien wiesen bis auf die fehlende Transkription von *At1g61120* keinen Phänotyp bezüglich des Wachstums (siehe 4.1.5), der Entwicklung oder der Blatt- und Blütenmorphologie auf. In Kooperation mit R. MUMM (Universität Wageningen, Niederlande) wurde in vorläufigen Studien gezeigt, dass die T-DNA-Insertionslinien verglichen mit dem Wildtyp eine geringere Attraktion auf den Parasitoid *Cotesia rubecula* ausüben (MUMM, unveröffentlicht).



Abbildung 4.4 Coronalon induzierte Expression von At1g61120 im Wildtyp und in zwei At1g61120-Insertionslinien

(A) Schematische Darstellung der Position der jeweiligen T-DNA Insertionen. Die Exons sind durch graue Boxen repräsentiert, während die Introns und die flankierenden Regionen durch eine schwarze Linie dargestellt sind. Schwarze Boxen symbolisieren die untranslatierten Bereiche des ersten und letzten Exons. Die zwei unabhängigen Insertionslinien sind als Box A und B gekennzeichnet.

(**B**) Northern-Blot-Analyse des *At1g61120*-Transkriptes in Wildtyp und T-DNA-Insertionslinien nach Applikation von 100  $\mu$ M Coronalon über die Wurzeln hydroponisch angezogener Pflanzen. Blätter der induzierten Pflanzen wurden nach 30 h geerntet.

Die Sammlung der Volatilen im Wildtyp und in *salk\_039864* (**Abbildung 4.5**) zeigt, dass in den induzierten *At1g61120*-Insertionslinien die Terpene TMTT und GL komplett fehlen, obwohl eine Induktion von (*E*,*E*)- $\alpha$ -Farnesen und MeSA zu erkennen ist. Eine Induktion unter gleichen Bedingungen im Wildtyp führt zu deutlicher Emission von TMTT und GL.



**Abbildung 4.5** Coronalon induzierte Emission von Volatilen im Wildtyp (oben) und der *At1g61120*-Insertionslinie *salk\_039864* (unten)

Die Sammlung von Volatilen erfolgte von 21 bis 30 h nach Gabe von 100  $\mu$ M Coronalon über die Wurzeln hydroponischer Pflanzen. MeSA: Methylsalicylat; TMTT: (*E*,*E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen; GL: Geranyllinalool; u: unidentifiziertes Terpen. Die gezeigten Chromatogramme sind für 93 m/z ausgewählt. Daten wurden von D. Tholl erfasst.

Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass At1g61120 eine Geranyllinalool-Synthase ist und dass das gebildete GL das Substrat für das Terpen TMTT darstellt. Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem vermuteten Mechanismus der TMTT-Synthese in der Lima-Bohne (BOLAND *et al.*, 1998; GABLER *et al.*, 1991). Weiterhin scheinen das Enzym für die TMTT-Synthese nicht redundant angelegt zu sein, da der Verlust von At1g61120-Transkript ausreicht, um die GL/TMTT-Produktion komplett zu unterbinden. Die fehlende Redundanz ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass es bis auf die Terpensynthasen für die Gibberelin-Biosynthese keine Gene mit einer ausgeprägten Homologie zum Gen Atlg61120 im Arabidopsis Genom gibt (AUBOURG et al., 2002).

## 4.1.4 Der Phänotyp der Insertionslinie kann durch ektopische Expression von *At1g61120* komplementiert werden

Für die *in-vitro* Charakterisierung des Enzyms wurde versucht das Gen in *E. coli* und der Hefe *H. polymorpha* heterolog zu exprimieren. In *H. polymorpha* kam es zu einer Akkumulation des Transkriptes aber nicht des Proteins. In Proteinextrakten aus beiden Organismen konnte keine Geranyllinaloolsynthase-Aktivität gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Als Alternative wurde *At1g61120* konstitutiv oder unter der Kontrolle eines Alkohol induzierbaren (CADDICK *et al.*, 1998; ROSLAN *et al.*, 2001) Promotors (*AlcA::At1g61120*) in *A.thaliana* exprimiert. Nur der gesamte Intron/Exon-Bereich zusammen mit den nativen 5<sup>-′</sup> und 3<sup>-′</sup> UTRs, nicht aber der isolierte ORF ohne Introns (Daten nicht gezeigt), führte abhängig von der Behandlung mit Ethanol (*AlcA::At1g61120*) zum Nachweis des Transkriptes (siehe **Abbildung 4.6**).



**Abbildung 4.6** Transkript-Analyse der *At1g61120*-Insertionslinie, die durch ektopische Expression von *At1g61120*-Transkript komplementiert wurde

(A) Schematische Darstellung des chimären Gens, welches zur Komplementation der Insertionslinie  $salk_{039864}$  benutzt wurde. Das Transgen (*AlcA::At1g61120*) besteht aus einem genomischen Fragment, das den 5 'UTR, die kodierende Region inklusive der Introns, den 3 'UTR sowie 2,4 kb der 3 'Sequenz unter der Kontrolle des Alkohol-induzierbaren Promoters (*AlcA*) umfasst. Die Exons sind durch graue Boxen dargestellt. 5' sowie 3' UTR sind durch schwarze Boxen symbolisiert. Die flankierenden Regionen sind durch eine schwarze Linie und dargestellt.

**(B)** *At1g61120*-Transkript-Analyse in Blättern der untransformierten Linie *salk\_039864* und der *AlcA::At1g61120*-Transformanten. Die Behandlung mit Ethanol erfolgte durch Sprühen mit 4,7% Ethanol direkt vor dem Beginn der Volatilen-Sammlung. Kontrollen wurden nur mit Wasser besprüht. Blattmaterial wurde 31 h nach Behandlung geerntet.

Eine transgene Linie (*AlcA::At1g61120*) mit starker *At1g61120*- Transkript-Akkumulation (siehe **Abbildung 4.6**) nach Behandlung mit Ethanol wurde für eine Analyse der emittierten Volatile ausgewählt.



Abbildung 4.7 GC-MS-Analyse der T-DNA-Insertionslinie *salk\_039864* und *AlcA::At1g61120*-Transformanten

Pflanzen wurden mit 4,7% Ethanol (EtOH) bzw. mit Wasser (K) direkt vor der Sammlung der Volatilen besprüht. Die Sammlung wurde für 30 h durchgeführt. IS: Interner Standard; TMTT: (*E*,*E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen; GL: Geranyllinalool; Die gezeigten Chromatogramme sind für 93 m/z ausgewählt.

In **Abbildung 4.7** ist zu erkennen, dass die Insertionslinie *salk\_039864*, in welche das das Transgen *AlcA::At1g61120* eingebracht wurde, abhängig von der Behandlung mit Ethanol sowohl GL als auch TMTT produziert. Die Alkohol-induzierte Expression von *At1g1120*-Transkript ist demnach hinreichend für die Synthese von GL bzw. TMTT. Es gibt außer der Expression von *At1g6110*-Transkript keine weiteren enzymatischen Schritte (Verfügbarkeit von Substrat, Synthese von TMTT aus GL), die für die TMTT-Produktion limitierend sind, auch wenn eine Feineinstellung der Konzentration der Metabolite durchaus möglich ist.

Damit wird deutlich, dass *At1g61120* das für die TMTT- bzw. GL-Synthese verantwortliche Gen ist und dass dessen Expression maßgeblich über die Emission dieser Terpene entscheidet. In den folgenden Kapiteln der Arbeit wird *At1g61120* deshalb als <u>ARABIDOPSIS THALIANA GERANYLLINALOOL SYNTHASE</u> (<u>AtGLS</u>) bezeichnet.

#### 4.1.5 Konstitutive *AtGLS*-Expression führt zu verlangsamten Wachstum

Wie in 1.5 bereits erläutert, ist die Expression von Genen, die der Abwehr von biotischem und abiotischem Stress dienen, häufig mit einem Fitnessverlust verbunden. Durch die konstitutive Expression von AtGLS-Transkript wurde versucht, die Fitnesskosten von diesem Teil der indirekten Abwehr abzuschätzen. In einer konkurrierenden Situation (viele Pflanzen auf engem Raum) zeigt sich, dass der Wildtyp bzw. die Insertionslinie *salk\_039864* deutlich mehr Biomasse entwickelt, als dies bei den konstitutiven AtGLS-Expressionslinien der Fall ist. Die Reduktion des Wachstums scheint dabei proportional zur gebildeten Menge des Transkriptes zu sein, da 35S::AtGLS #2 mehr Transkript aufweist und gleichzeitig eine stärkere Reduktion des Wachstum zeigt als 35S::AtGLS #1. Zusätzlich zeigen konstitutive AtGLS-Expressionslinien, die eine starke AtGLS-Transkript-Akkumulation aufweisen, Läsionen auf den Kotyledonen. Die Größe bzw. Stärke der Läsionen scheint ebenfalls proportional zur Stärke der Expression zu sein, da auch hier die Linie 35S::AtGLS #2 den stärkeren Phänotyp zeigt. Diese Läsionen findet man nicht reproduzierbar auf älteren Blättern. Bemerkenswert ist, dass das Auftreten von Läsionen unabhängig von der Funktionalität des COII-Proteins ist (siehe Abbildung 4.9). Es ist davon auszugehen, dass unter Freilandbedingungen, A. thaliana-Pflanzen mit einer konstitutiven TMTT- bzw. GL-Emission nicht konkurrenzfähig wären. Im Falle einer induzierten TMTT-Produktion in einem späteren Entwicklungsstadium, in dem der Pflanze mehr Ressourcen zur Verfügung stehen, fallen diese Fitnesskosten möglicherweise deutlich weniger ins Gewicht (DICKE und SABELIS, 1989).



Abbildung 4.8 Phänotyp von transgenen Pflanzen mit konstitutiver AtGLS-Expression

(A) Schematische Darstellung des chimären Gens, das zur konstitutiven Expression von AtGLS in der Insertionslinie *salk\_039864* benutzt wurde. Das Transgen 35S::AtGLS setzt sich zusammen aus einem genomischen Fragment, das die 5 *UTR*, die kodierende Region inklusive der Introns, die 3 *UTR* sowie 2,4 kb der 3 Sequenz unter der Kontrolle des konstitutiven Blumenkohl Mosaik Virus Promotors (35S) umfasst. Die Exons sind durch graue Boxen dargestellt. 5' sowie 3' *UTR* sind durch schwarze Boxen symbolisiert. Die flankierenden Regionen sind durch eine schwarze Linie und dargestellt.

(**B**) Analyse des *AtGLS*-Transkriptes in Blättern von zwei *35S::AtGLS*-Linien (#1 und #2) verglichen mit dem Wildtyp und der Insertionslinie *salk\_039864*. Blattmaterial wurde von 3 Wochen alten unbehandelten Pflanzen geerntet.

(C) Phänotyp von drei Wochen alten unter Langtagsbedingungen angezogenen Pflanzen (oben). Phänotyp 10 Tage alter Keimlinge des selben Genotyps (unten). Der gezeigte Phänotyp ist repräsentativ für mindestens sechs Linien mit starker *AtGLS*-Expression.



Abbildung 4.9 Abbildung von 15 Tage alten 35S::AtGLS-Pflanzen im coil-Hintergrund

35S::AtGLS-Pflanzen wurden mit *coi1*-Mutanten gekreuzt und auf Homozygotie bezüglich des 35S::AtGLS-Transgens selektiert. Diese Samen wurden auf Erde ausgelegt und nach 15 Tagen fotografiert (oberer Teil der Abbildung). Nach 5 Wochen wurde ein weiteres Foto vom Blütenstand der Pflanze gemacht (unterer Teil der Abbildung). Die zu erkennende Sterilität ist indikativ für eine homozygot vorliegende *coi1*-Mutation (*coi1/coi1*), während es sich bei der fertilen Pflanze entweder um eine heterozygote *coi1*-Pflanze (*coi1/wt*) oder eine Pflanze ohne Mutation im *coi1*-Gen handelt (wt/wt). Eine nicht entwickelte Schote, sowie die Läsionen auf den ersten Keimblättern sind mit weißen Pfeilen markiert.

## 4.1.6 AtGLS ist nicht im Chloroplasten lokalisiert

Für die Bestimmung der AtGLS-Lokalisation wurde das Transgen 35S::AtGLS am C-Terminus mit dem YFP-Gen fusioniert. Das erhaltene Transgen wurde in die Insertionslinie salk 039864 stabil transformiert und eine Linie mit starker AtGLS: YFP-Transkription, die in der Lage ist, GL und TMTT zu akkumulieren (Daten nicht gezeigt), wurde mit Hilfe eines konfokalen Laser Mikroskops analysiert. Es ist deutlich eine Fluoreszenz in den Zellen der 35S::AtGLS:YFP-Linie gegenüber der untransformierten Kontrolle zu erkennen. In der Zelle sind ovale Bereiche zu erkennen, die höchst wahrscheinlich die Chloroplasten repräsentieren, in denen keine Fluoreszenz zu sehen ist (siehe Abbildung 4.10). Die Hypothese, dass AtGLS nicht in den Chloroplasten lokalisiert ist, wird unterstützt durch das Fehlen eines plastidären Lokalisationssignals in diesem Protein (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/; EMANUELSSON et al., 2000). Die Fluoreszenz und damit das Fusionsprotein befindet sich vermutlich im Cytosol oder im endoplasmatischen Retikulum (ER). Für die Lokalisation im ER würde sprechen, dass sich dort ebenfalls zwei GGPP-Synthasen befinden (OKADA et al., 2000), die das Substrat GGPP für die AtGLS zur Verfügung stellen könnten. Es gibt keinen Transport von AtGLS in den Chloroplasten, deshalb ist

35S::AtGLS coi1/wt; wt/wt 35S::AtGLS coi1/coi1

anzunehmen, dass die Substrate für die GL-Synthese aus dem Mevalonat-Weg, dessen Enzyme im ER oder cytosolisch lokalisiert sind, stammen (siehe 1.3; NEWMAN und CHAPPELL, 1999).



salk\_039864 35S::AtGLS:YFP

Abbildung 4.10 Subzelluläre Lokalisation des *AtGLS:YFP*-Fusionsproteins in der Epidermis von *A. thaliana* 

(A) Schematische Darstellung des chimären Gens das zur Lokalisation von AtGLS in der Insertionslinie *salk\_039864* benutzt wurde. Das Transgen (*35S::AtGLS:YFP*) besteht aus einem genomischen Fragment, das die 5 'UTR, die kodierende Region inklusive der Introns, das oberhalb des Stop-Codons integrierte *YFP*-Gen, die 3 'UTR sowie 2,4 kb der 3'-Sequenz unter der Kontrolle des konstitutiven Blumenkohl Mosaik Virus Promotors (*35S*) umfasst. Die Exons sind durch graue Boxen dargestellt. 5' sowie 3' UTR sind durch schwarze Boxen symbolisiert. Die flankierenden Regionen sind durch eine schwarze Linie dargestellt.

(**B**, **C**) Die Fluoreszenz in Epidermiszellen von 4 Wochen alten auf Erde angezogenen Pflanzen der Insertionslinie *salk\_039864* (B) und der gleichen Linie, transformiert mit *35S::AtGLS:YFP* (C) ist dargestellt.

## 4.2 Expressionsmuster des *AtGLS*-Transkriptes

## 4.2.1 Eine funktionelle JA-Signalkaskade ist für die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes notwendig

Die Abwehr von Herbivoren ist in *A. thaliana*-Mutanten, die in der Oxylipin-Synthese bzw. Signalkaskade Defekte aufweisen stark geschwächt (siehe 1.5; BALDWIN *et al.*, 1997; KARBAN *et al.*, 2000). Dies korreliert mit der Expression vieler Gene nach Behandlung mit einem Oxylipin (STINTZI *et al.*, 2001; TAKI *et al.*, 2005). Die Transkription der *AtGLS* ist sowohl durch Infektion mit dem Herbivoren mit *P. xylostella* als auch durch das Coronatin-Derivat Coronalon induzierbar (siehe 4.1.2). Da Coronatin die Signalwirkung von Oxylipinen besitzt (WEILER *et al.*, 1994;

UPPALAPATI et al., 2005; FLIEGMANN et al., 2003), ist eine Beteiligung der JA-Signalkaskade zu vermuten. In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die JA-Signalkaskade für die Induktion des AtGLS-Transkriptes notwendig ist. Dazu wurden drei Mutanten aus der JA-Biosynthese ausgewählt die kein JA mehr produzieren können. Die JA-Biosynthese in A. thaliana beginnt mit der Bildung eines Peroxids aus α-Linolensäure mit Hilfe eines Enzyms aus der 13-Lipoxygenase (13-LOX) Familie. Das Peroxid 13-HPOT wird durch das Enzym ALLENOXID SYNTHASE (AOS) zu einem instabilen Epoxid umgewandelt, welches von einer Allenoxid Cyclase (AOC) zur zyklischen Oxophytodiensäure (OPDA) umgesetzt wird. OPDA wird von der OXOPHYTODIENSÄURE REDUKTASE 3 (OPR3) reduziert und durchläuft anschließend eine Reihe von ß-Oxidationen zur Jasmonsäure (MUELLER, 1997; SEMBDNER und PARTHIER, 1993). Eine der drei verwendeten Mutanten hat einen Defekt in dem Enzym AOS, sie wird als dde2 (delayed dehiscence 2) bezeichnet (VON MALEK et al., 2002; PARK et al., 2002). Der entsprechenden Pflanze fehlt sowohl OPDA als auch JA. Eine weitere Mutante (opr3) trägt eine Insertion im OPR3-Gen, wodurch die Pflanze zwar OPDA aber kein JA mehr bilden kann (STINTZI und BROWSE, 2000). Diese Mutante befindet sich im Ws-Hintergrund. Beide Mutanten sind männlich steril, dieser Phänotyp lässt sich aber durch exogene Zugabe von Methyljasmonat komplementieren. Bei der dritten Mutante handelt es sich um eine Doppel-Mutante in zwei Genen, die jeweils für die Acyl-CoA Oxidasen eins und fünf kodieren (acx1/5). Die Mutante hat einen Defekt in der  $\beta$ -Oxidation und weist kein JA nach Verwundung oder Befall mit Trichoplusia ni auf. Je nach Wachstumsbedingungen ist sie stärker oder schwächer männlich steril (SCHILMILLER et al., 2006).

**Abbildung 4.11** zeigt, dass für die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes die Anwesenheit von JA notwendig ist. In der *acx1/5*-Mutante ist ein wenig Transkript zu erkennen, was möglicherweise auf geringe Mengen JA zurückzuführen ist. Tatsächlich akkumuliert die Mutante JA nach Infektion mit *Alternaria brassicicola* (SCHILMILLER *et al.*, 2006), evtl. werden durch Applikation von Alamethicin geringe Mengen JA in dieser Mutante gebildet. Die fehlende Expression in der *opr3*-bzw. *acx1/5*-Mutante weist darauf hin, dass OPDA allein nicht in der Lage ist die *AtGLS*-Expression zu induzieren.

Eine weitere untersuchte Mutante (*coi1*) trägt einen Defekt in der JA-Signalkaskade. Sie ist ebenfalls steril, lässt sich aber im Gegensatz zu den JA-Biosynthese-Mutanten nicht

durch exogene Zugabe von Methyljasmonat komplementieren. Es handelt sich um ein F-Box-Protein, das vermutlich für die Erkennung und den Transfer negativer Regulatoren zum Proteasom verantwortlich ist (siehe 1.6; FEYS *et al.*, 1994; XIE *et al.*, 1998). Der überwiegende Anteil der durch MeJA und Herbivorie induzierten Genexpression findet in der *coil*-Mutante nicht mehr statt, was sich deutlich in der erhöhten Sensitivität der *coil*-Mutante gegenüber dem Befall mit Herbivoren äußert (MCCONN *et al.*, 1997; THOMMA *et al.*, 1998; BENEDETTI *et al.*, 1995). Abbildung 4.11 zeigt, dass *coil*-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp nach Behandlung mit Alamethicin nicht mehr in der Lage sind *AtGLS*-Transkript zu akkumulieren



**Abbildung 4.11** Induktion des *AtGLS*-Transkriptes in Blättern von Mutanten der JA-Signalkaskade bzw. Biosynthese nach Behandlung mit Alamethicin

(A) *coil*- und *dde*2-Mutanten sowie der Wildtyp (Col) wurden hydroponisch angezogen und für 6 h mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) bzw. mit 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt und anschließend für eine Transkript-Analyse geerntet. Wt: Wildtyp

(B) Hydroponisch angezogene *opr3*-Mutanten sowie der entsprechende Wildtyp (Ws) wurden für 31 h mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) bzw. 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt. *acx1/5*-Mutanten sowie der Wildtyp (Col) wurden wie unter (A) beschrieben behandelt und analysiert. Die Signale für die *acx1/5*-Mutanten (*acx*) und den entsprechenden Wildtyp wurden grafisch verstärkt, um die geringen Mengen *AtGLS*-Transkript in der *acx1/5*-Mutante sichtbar zu machen. Wt: Wildtyp

# 4.2.2 Genotypen mit konstitutiver *THI2.1*-Expression zeigen nur geringe Mengen *AtGLS*-Transkript

In 4.2.1 wurde gezeigt, dass die JA-Signalkaskade notwendig ist für die Expression von *AtGLS* ist. Im folgenden Experiment sollte ein Hinweis darauf gefunden werden, ob eine konstitutive Aktivierung der JA-Signalkaskade hinreichend für die *AtGLS*-Expression ist. NIBBE *et al.* (2002) beschrieben Mutanten, die oberhalb der Aktivierung der SA- und JA- Signalkaskaden ihre Wirkung entfalten. Diese Mutanten wurden als *cet1-4* (*constitutive expression of THI2.1*; HILPERT *et al.*, 2001)

bezeichnet. Sie haben erhöhte JA- und SA-Mengen und exprimieren das JAinduzierbare Gen *THI2.1* (BOHLMANN *et al.*, 1998c) ohne vorherige Stimulation. Zwei der vier Mutanten (*cet1* und *cet2*) haben gegenüber dem Wildtyp 20-40 fach erhöhte JA-Mengen (NIBBE *et al.*, 2002) und zeigten in unseren Händen ebenfalls eine konstitutive *THI2.1*-Expression (**Abbildung 4.12**). Diese Mutanten wurden auf eine konstitutive Expression des *AtGLS*-Transkriptes untersucht.



**Abbildung 4.12** AtGLS- und THI2.1-Transkript-Analyse in Mutanten mit konstitutiver THI2.1-Expression (*cet1* und *cet2*) verglichen mit Wildtyp-Pflanzen, die mit Alamethicin induziert wurden.

*Cet1* und *cet2*-Pflanzen sowie der Wildtyp (Wt) wurden für sechs Wochen hydroponisch angezogen, Blattmaterial wurde von unbehandelten Pflanzen geerntet. Zum Vergleich wurden Proben aus einem unabhängigen Experiment aufgetragen. Dabei handelt es sich um hydroponisch angezogene Wildtyp-Pflanzen, die für 31 h mit einer 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) behandelt wurden.

In **Abbildung 4.12** ist zu sehen, dass die beiden Mutanten *cet1* und *cet2* unbehandelt nicht in der Lage sind, ähnliche Mengen *AtGLS*-Transkript zu akkumulieren, wie der mit Elicitoren behandelte Wildtyp. Es ist nur eine leichte Expression von *AtGLS* verglichen zum unbehandelten Wildtyp zu sehen. Vermutlich reicht die Aktivierung der JA-Signalkaskade, die für die Expression von *THI2.1* ausreicht, nicht für die Expression des *AtGLS*-Transkriptes aus oder ein Faktor in *cet1* und *cet2* reprimiert die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes. Das Auffinden solcher Faktoren, die für eine unterschiedliche Induktion von Gruppen von Genen innerhalb der JA-Signalkaskade verantwortlich sind, würde zu einem tieferen Verständnis der Mechanismen führen, die distinkten Expressionsmustern zugrunde liegen. Zwei bereits charakterisierte Faktoren sind die Phytohormone SA und Ethylen, deren Auswirkung auf die *AtGLS*-Expression in 4.2.3 beschrieben ist.

# 4.2.3 Die Induktion von *AtGLS*-Transkript ist unabhängig von SA- und Ethylen-Signalkaskaden

Viele Oxylipin-induzierte Gene wie z. B. *PDF1.2* sind gleichzeitig durch SA reprimiert (GLAZEBROOK *et al.*, 2003; SPOEL *et al.*, 2003). Die SA-Repression benötigt in vielen Fällen ein funktionelles NPR1-Protein (SPOEL *et al.*, 2003). Andererseits ist die Emission von TMTT in der Tomate abhängig von der Anwesenheit von SA, auch wenn die Induktion über die JA-Signalkaskade verläuft (AMENT *et al.*, 2006). In der Lima-Bohne wurde gezeigt, dass SA einen positiven Einfluss auf die TMTT-Emission hat (siehe 1.5; KOCH *et al.*, 1999) und dass Behandlung mit MeSA sogar zur Emission von TMTT führen kann (OZAWA *et al.*, 2000). Da der *AtGLS*-Induktor Alamethicin zu einer Produktion von SA in *A.thaliana* führt (SCHULZE, 2005), ist eine Beteiligung von SA an der *AtGLS*-Transkript-Induktion denkbar.

Ob die Anwesenheit von SA einen Einfluss auf die Induktion von *AtGLS* hat wurde in der SA-Biosynthese Mutante *sid2* getestet. Hier ist das Enzym Isochorismat Synthase defekt, die Pflanze weist deshalb nur sehr geringe Mengen SA auf und ist suszeptibler gegenüber Pathogenen (NAWRATH und METRAUX, 1999; WILDERMUTH *et al.*, 2001).

Abbildung 4.13 zeigt, dass in der SA defizienten *sid2*-Mutante gegenüber dem Wildtyp die Induktion des AtGLS-Transkriptes etwas stärker ist, was auf einen leicht negativen Effekt von SA auf die Expression der AtGLS hindeutet. Die transgene NahG-Pflanze, die SA zu Catechol umwandeln kann (GAFFNEY et al., 1993), soll die Ergebnisse aus dem Experiment mit der sid2-Mutante unterstützen. Es gibt Hinweise darauf, dass Catechol selbst eine Signalwirkung hat (VAN WEES und GLAZEBROOK, 2003a), die meisten SA-induzierten Gene werden in der transgenen NahG-Pflanze allerdings nicht mehr exprimiert und die Pflanze ist ebenfalls suszeptibler gegenüber Pathogenen (GAFFNEY et al., 1993; LAWTON et al., 1995).Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, hat die Degradation von SA in der transgenen NahG-Pflanze keinen Einfluss auf die Induktion des AtGLS-Transkriptes. Die npr1-Mutante hat einen Defekt in einer der SAhier ist das Protein NPR1 funktionsunfähig, Signalkaskaden; das an Transkriptionsfaktoren bindet und dadurch vermutlich eine Aktivierung der Transkription ermöglicht (CAO et al., 1994). Die SA-Repression des JA-induzierten Gens PDF1.2 ist in dieser Mutante aufgehoben (SPOEL et al., 2003). Übereinstimmend mit dem geringen Effekt von SA kann ebenfalls keine Veränderung der *AtGLS*-Transkriptmengen in der *npr1*-Mutante gegenüber dem Wildtyp nach Behandlung mit Alamethicin festgestellt werden (siehe **Abbildung 4.13**)



Abbildung 4.13 Induktion des *AtGLS*-Transkriptes in Blättern von Mutanten der SA- und Ethylen-Signalkaskade bzw. Biosynthese nach Behandlung mit Alamethicin

(A) hydroponisch angezogene *sid2*-Mutanten sowie der entsprechende Wildtyp wurden mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) behandelt, von der Pflanze wurde nach 0, 6 und 31 h Material für eine Transkript-Analyse geerntet. Wt: Wildtyp

(**B**) *npr1*- und *ein2*-Mutanten, die transgenen *NahG*-Pflanzen sowie der Wildtyp wurden hydroponisch angezogen und für 6 h mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) bzw. mit 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt und anschließend für eine Transkript-Analyse geerntet. Wt: Wildtyp

Eine weiteres Phytohormon, das einen Einfluss auf die Expression von Oxylipininduzierten Genen hat, ist Ethylen (GLAZEBROOK *et al.*, 2003). Ein Beispiel ist die Expression von *PDF1.2*, die eine funktionelle Ethylen-Signalkaskade benötigt. (PENNINCKX *et al.*, 1998). In dem folgenden Experiment soll geklärt werden, welchen Einfluss die Ethylen-Signalkaskade auf die Expression von *AtGLS*-Transkript hat. In der Ethylen-Signalkaskade wurde eine Mutation im Protein EIN2 (GUZMAN *et al.*, 1990) für eine Analyse ausgewählt. Die Mutante (*ein2*) zeigt unter allen bisher charakterisierten Mutationen in der Ethylen-Signalkaskade die stärkste Insensitivität gegenüber Ethylen. Bei dem in der *ein2*-Mutante betroffenen Faktor handelt es sich um ein in der Membran befindliches Protein, das Homologie zu einem Metalltransporter aufweist, es handelt sich aber nicht um den direkten Rezeptor von Ethylen (ALONSO *et al.*, 1999). In **Abbildung 4.13** ist zu erkennen, dass in der *ein2*-Mutante die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes ähnlich effizient ist, wie im Wildtyp.

Zusammenfassend kann man sagen, dass weder die Ethylen- noch die SA-Signalkaskade einen starken Einfluss auf die *AtGLS*-Transkript-Induktion hat. Damit unterscheidet sich die *AtGLS*-Expression von der des Gens *VSP2*, das durch SA stark reprimierbar ist (SPOEL *et al.*, 2003). Der Mechanismus, der zur *AtGLS*-Expression führt, scheint auch anders zu sein, als die Transkriptinduktion von *PDF1.2*, die abhängig vom Protein EIN2 (PENNINCKX *et al.*, 1998) ist.

# 4.2.4 Die TMTT/GL-Synthese korreliert mit der *AtGLS*-Expression in Pflanzen mit Defekten in der SA-, JA- und Ethylen-Signalkaskade bzw. Biosynthese

In 4.1.2 konnte gezeigt werden, dass die AtGLS-Expression und die Synthese von GL bzw. TMTT unter verschiedenen Stressbedingungen korreliert. Zusammen mit dem Nachweis, dass die AtGLS-Expression für die GL- bzw. TMTT-Synthese sowohl notwendig (siehe 4.1.3) als auch ausreichend (siehe 4.1.4) ist, führte dies zu der Annahme, dass die Expression von AtGLS den wichtigsten Kontrollpunkt in der GLbzw. TMTT-Synthese darstellt. Im folgenden Experiment sollte die Induktion von GL und TMTT in Mutanten der JA-, SA- und Ethylen-Signalkaskade bzw. Biosynthese untersucht und mit den Expressionsdaten der AtGLS aus 4.2.1 und 4.2.3 verglichen werden, um erneut eine Korrelation zwischen AtGLS-Expression und TMTT- bzw. GL-Synthese herzustellen und evtl. außer der AtGLS-Transkription weitere regulierte Schritte zu finden. Abbildung 4.14 zeigt, dass die in der JA-Signalkaskade defekte coil-Mutante weder TMTT noch GL nach Induktion mit Alamethicin emittiert. Dies ist in guter Übereinstimmung mit der fehlenden AtGLS-Expression in dieser Mutante (siehe 4.2.1). Bemerkenswert ist, dass auch MeSA und (E,E)- $\alpha$ -Farnesen in der *coil*-Mutante fehlen. Es wurde bereits eine SA-Methyltransferase beschrieben, die mit Alamethicin induzierbar ist (CHEN et al., 2003a) evtl. erfolgt die Induktion dieses Enzyms COI1abhängig. Die TMTT- und GL-Emission in der ein2-Mutante scheint etwas höher zu sein als im entsprechenden Wildtyp, es konnte aber keine erhöhte Transkription der AtGLS beobachtet werden (siehe 4.2.3). Es ist nicht auszuschließen, dass ein Ethylen-Signal einen leicht negativen Effekt auf die Produktion von GGPP hat und es deshalb in der ein2-Mutante zu einer verstärkten Produktion von GL und damit auch von TMTT kommt. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Ethylen einen negativen Effekt auf einige Verwundungs-induzierte Gene ausübt (ROJO et al., 1999). Die Mutanten bzw. Transgenen, die kein SA akkumulieren können (sid2 und NahG) verhalten sich bezüglich ihrer TMTT und GL Emission ähnlich wie der entsprechende Wildtyp. Dies ist ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Expressionsdaten der AtGLS (siehe 4.2.3). In den Pflanzen findet sich allerdings kein Nachweis für MeSA; dies unterstreicht die Tatsache, dass den Pflanzen SA als Substrat für MeSA fehlt.



Abbildung 4.14 Quantifizierung der vier häufigsten Volatile in Pflanzen mit Defekten in der JA-, SAund Ethylen-Signalkaskade bzw. Biosynthese nach Gabe von Alamethicin

*Coi1-, ein2-* und *npr1-* Mutanten, eine transgene *NahG*-Pflanze sowie der Wildtyp (Wt) wurden auf Erde angezogen (E) und abgeschnittene Blätter wurden über die Petiolen mit einer Alamethicin-Lösung (5  $\mu$ g/ml) behandelt. *Sid2-*Mutanten und der Wildtyp (Wt) wurden hydroponisch angezogen (H) und über die Wurzeln mit einer Alamethicin-Lösung (5  $\mu$ g/ml) induziert. Die Sammlung der Volatile erfolgte 0 bis 9 h und 21 bis 30 h nach Induktion. Die Ergebnisse des zweiten Zeitintervalls sind dargestellt. Ergebnisse geben den Mittelwert und die Standardabweichung von drei Experimenten wieder. Daten wurden von D. Tholl erfasst. MeSA: Methylsalicylat; TMTT: (*E,E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen; GL Geranyllinalool

Auf das Terpen (E,E)- $\alpha$ -Farnesen hat das Fehlen von SA in der *sid2*-Mutante scheinbar einen positiven Einfluss, da sich im Gegensatz zum ebenfalls hydroponisch angezogenen Wildtyp (siehe auch 4.1.2) etwas Terpen im Duftprofil der *sid2*-Mutante befindet. In Bezug auf die transgene *NahG*-Pflanze scheint es aber keinen Einfluss von SA verglichen mit dem Wildtyp zu geben. Der Unterschied könnte zum einen in der Tatsache begründet sein, dass *NahG*- und *sid2*-Pflanzen unterschiedlich angezogen wurden. Zum anderen könnte das von der transgenen *NahG*-Pflanze erzeugte Catechol einen gegenläufigen Einfluss auf die Emission haben.

Bezüglich der indirekten Abwehr konnte gezeigt werden, dass die SA-defiziente transgene *NahG*-Pflanze eine schwächere Attraktion auf einen Insekteninteraktionspartner ausübt (VAN POECKE *et al.*, 2001). Wie in **Abbildung 4.14** zu sehen ist, hat das Fehlen von SA keinen Einfluss auf die GL- und TMTT-Emission. Es ist also zu vermuten, dass die Emission von GL und TMTT nicht allein die

Wahrnehmung durch ein Insekt bestimmt, sondern dass dabei noch andere Volatile eine wichtige Funktion haben. Ein Kandidat dafür ist das MeSA, das in den SA-defizienten Mutanten fehlt (siehe **Abbildung 4.14**). Viele Pflanzen wie z. B. Lima-Bohne (DICKE *et al.*, 1990), Tomate (DICKE *et al.*, 1998), Birne (SCUTAREANU *et al.*, 1997) und Kartoffel (BOLTER *et al.*, 1997) emittieren MeSA nach Befall mit einem Herbivoren, dies lässt auf eine konservierte Funktion von MeSA in der indirekten Abwehr schließen. Die *npr1*-Mutante verhält sich bezüglich der TMTT- und GL-Expression ähnlich wie der Wildtyp (siehe **Abbildung 4.14**), dies korreliert gut mit der Expression des *AtGLS*-Transkriptes in dieser Mutante (siehe 4.2.3). Die Emission von (E,E)- $\alpha$ -Farnesen-Emission gibt (s. o.), dann ist er Mechanismus vermutlich unabhängig von NPR1. Auffällig in der *npr1*-Mutante ist die starke Akkumulation von MeSA im Gegensatz zum Wildtyp. Der *npr1*-Mutante fehlt die *feedback* Regulation (RYALS *et al.*, 1996). Deshalb kommt es zu einer Akkumulation des MeSA-Substrates SA, die sich vermutlich direkt auf die MeSA-Menge auswirkt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Expression der *AtGLS* in allen Mutanten der JA-, SA- und Ethylen- Signalkaskade bzw. Biosynthese gut mit der Emission von TMTT und GL in diesen Mutanten korreliert und kein weiterer regulierter Schritt durch die hier analysierten Phytohormone erkennbar ist.

#### 4.2.5 *AtGLS* ist ein früh induziertes Gen

Für eine Analyse der Induktionskinetik von *AtGLS* wurden Pflanzen mit Alamethicin induziert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. In **Abbildung 4.15** sieht man, dass bereits 1,5 h nach der Applikation von Alamethicin deutlich *AtGLS*-Transkript zu sehen ist, damit ist *AtGLS* ein früh induziertes Gen im Gegensatz zur Terpensynthase *At4g16740*, die erst 6 h nach Gabe von Alamethicin eine Akkumulation des Transkriptes aufweist (GÄRTNER, unveröffentlicht). Die Menge des Transkriptes steigt kontinuierlich, je länger die Induktion dauert. Die frühe Induktion von *AtGLS* passt gut zur Akkumulation von GL und TMTT, die bereits im ersten Zeitintervall (0-9 h) nach Applikation von Alamethicin (siehe **Abbildung 4.16**) verstärkt auftritt. TMTT und GL verhalten sich dabei deutlich anders als (*E,E*)- $\alpha$ -Farnesen, das erst im zweiten Zeitintervall stärker akkumuliert.



Abbildung 4.15 AtGLS-Transkript-Analyse von sechs Zeitpunkten nach Applikation von Alamethicin

Northern-Blot-Analyse des *AtGLS*-Transkriptes in hydroponisch angezogenen *A. thaliana* Wildtyppflanzen, denen über die Wurzeln Alamethicin ( $5\mu g/ml$ ) bzw. 0,1% Ethanol (Kontrolle) appliziert wurde. Jede Probe repräsentiert eine unabhängige Pflanze, die nach den angegebenen Stunden (h) geerntet wurde.



Abbildung 4.16 Quantifizierung der vier häufigsten Volatile in zwei verschiedenen Zeitintervallen

Wildtyp-Blätter wurden mit einer Alamethicin-Lösung ( $5\mu$ g/ml) induziert. Volatile wurden von 0 bis 9 h und von 20 bis 31h nach Induktion gesammelt, die Volatile wurden in beiden Intervallen quantifiziert. Daten wurden von D. Tholl erfasst. MeSA: Methylsalicylat; TMTT: (*E*,*E*)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen; GL: Geranyllinalool

**4.2.6 Die Induktion der** *AtGLS***-Transkription benötigt keine Proteinbiosynthese** Für eine transkriptionelle Induktion, die bereits 1,5 h nach Behandlung mit einem Elicitor zu sehen ist (siehe 4.2.1) kann vermutet werden, dass alle benötigten Komponenten der Signalkaskade bereits präformiert in der Zelle vorliegen und nicht mehr neu synthetisiert werden müssen (siehe 1.6).

Diese Hypothese wurde durch Applikation des Proteinbiosyntheseinhibitors Cycloheximid und anschließender Behandlung mit Alamethicin getestet. Die Pflanzen wurden hydroponisch angezogen und eine Cycloheximid-Lösung (100 µg/ml) wurde über die Wurzeln appliziert, nach 2 h wurde die Lösung, in der die Wurzeln der Pflanzen standen, mit Alamethicin (5  $\mu$ g/ml) versetzt. Die Pflanzen wurden nach weiteren 6 h geerntet und die *AtGLS*-Transkriptmengen analysiert.



Abbildung 4.17 AtGLS- und LOX2-Transkript-Analyse nach Applikation von Cycloheximid und anschließender Alamethicin-Behandlung

Hydroponisch angezogenen Pflanzen wurden in eine Lösung mit 100  $\mu$ g/ml Cycloheximid (CHX) oder zur Kontrolle in eine Lösung mit 0,1% Ethanol (EtOH) gestellt. Nach 2 h Induktion wurde der Lösung Alamethicin in einer Endkonzentration von 5  $\mu$ g/ml (Ala) oder die entsprechende Menge Ethanol (EtOH) zugefügt. Blattmaterial wurde nach weiteren 6 h geerntet, und *AtGLS*-Transkript sowie *LOX2*-Transkript wurde mit Hilfe der Northern-Blot-Technik sichtbar gemacht.

Bemerkenswert ist, dass das *AtGLS*-Transkript allein durch Behandlung mit Cycloheximid deutlich induzierbar ist. Die Akkumulation von Transkript kann durch Zugabe von Alamethicin zwar noch gesteigert werden, aber Cycloheximid allein ist bereits ein besserer Induktor als Alamethicin (siehe **Abbildung 4.17**). Die Induktion durch Cycloheximid stellt eine interessante Parallele zu einigen Auxin induzierten Genen dar, wie z. B. die für die Ethylen Synthese wichtige ACC-Synthase (siehe 1.6; ABEL *et al.*, 1995b). Die Wirkung des Inhibitors wurde durch das fehlende Transkript von *LOX2*, welches für die Induktion der Transkription Proteinbiosynthese benötigt (JENSEN *et al.*, 2002), gezeigt. In Proben, die mit Cycloheximid vorbehandelt wurden, konnte im Gegensatz zu Proben, die ausschließlich mit Alamethicin behandelt waren, kein *LOX2*-Transkript nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 4.17**).

Es kann die Hypothese aufgestellt werden, dass ein negativer Regulator von COI1 erkannt wird und einem Proteasomen-vermittelten Abbau zugeführt wird. Die Wirkung von Cycloheximid besteht in diesem Modell in der Inhibition der Neusynthese des negativen Regulators (siehe 1.6). Um zu überprüfen, ob die Instabilität dieses Regulators auch in Abwesenheit eines Induktors von einem funktionalen COI1-Protein abhängt, wurde die Behandlung mit Cycloheximid in der *coi1*-Mutante durchgeführt. In
**Abbildung 4.18** ist zu erkennen, dass die mit Cycloheximid behandelte *coi1*-Mutante kein *AtGLS*-Transkript akkumulieren kann. Es ist demnach zu vermuten, dass die Instabilität des Regulators, der die *AtGLS*-Transkription reprimiert auf, auch ohne Anwesenheit eines Induktors vom COI1-Protein abhängt.

In einem weiteren Schritt wurde getestet, ob für die Wirkung von COI1 auf die Stabilität des negativen Regulators JA nötig ist. Dazu wurde die JA defiziente *dde2*-Mutante mit Cycloheximid behandelt. Wie **Abbildung 4.18** zeigt, ist die Induktion mit Cycloheximid in der *dde2*-Mutante stark vermindert; dies lässt darauf schließen, dass für die Wirkung von COI1 die Anwesenheit eines Oxylipins (vermutlich JA) nötig ist. Zusammenfassend kann man sagen, das die Cycloheximid induzierte Transkription ein funktionelles COI1-Protein und die Anwesenheit eines Oxylipins benötigt. Ein Modell, dass die hier gewonnen Ergebnisse berücksichtigt wird in 5.6 diskutiert.



Abbildung 4.18 AtGLS-Transkript-Analyse nach Behandlung von *coil-* und *dde2-*Mutante sowie Wildtyp mit Cycloheximid

(A) *dde2*-Mutanten sowie der Wildtyp (Wt) wurden hydroponisch angezogen und über die Wurzeln mit einer 20  $\mu$ g/ml Cycloheximid-Lösung (CHX) oder 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt. Nach 6 h wurde Blattmaterial geerntet und das *AtGLS*-Transkript analysiert.

(**B**) *coil*-Mutanten sowie der Wildtyp (Wt) wurden hydroponisch angezogen und über die Wurzeln mit einer 20  $\mu$ g/ml Cycloheximid-Lösung (CHX) bzw. einer 5 $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) oder einer 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt. Nach 6 h wurde Blattmaterial geerntet und das AtGLS-Transkript analysiert.

#### 4.2.7 AtGLS ist in Blüten und Schoten sowie an Wundrändern exprimiert

In 4.1.2 wurde gezeigt, dass die *AtGLS* in unbehandelten Blättern nicht exprimiert ist, aber dort durch verschiedene Elicitoren (Alamethicin, Coronalon, *P. xylostella*) induziert werden kann. In den folgenden Experimenten sollte ermittelt werden, ob es eine konstitutive Expression in anderen Organen (Blüte etc.) der Pflanze gibt.

Dazu wurde das Reportergen GUS unter der Kontrolle des AtGLS-Promotors exprimiert (AtGLS::GUS; siehe Abbildung 4.19). Um zu ermitteln, ob die wichtigsten regulatorischen Elemente in den für die Fusion ausgewählten 1162 bp des AtGLS-Promotors enthalten sind, wurden die transgenen Pflanzen mit den Induktoren Alamethicin und Cycloheximid behandelt und anschließend das endogene AtGLS-Transkript sowie das GUS-Transkript analysiert. Wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist verhält sich das GUS-Transkript ähnlich wie das AtGLS-Transkript bezüglich der Induktion mit Alamethicin und Cycloheximid. Es ist also davon auszugehen, dass alle wichtigen regulatorischen Elemente innerhalb von 1162 Bp oberhalb der putativen AtGLS-Transkriptionsstartstelle liegen. Allerdings sieht man in den Ethanol behandelten Pflanzen geringe Mengen GUS-Transkript, während das AtGLS-Transkript nicht detektierbar ist. Es ist nicht auszuschließen, dass der AtGLS-Promotor auch in unbehandelten Pflanzen leicht aktiv ist. Allerdings ist bezüglich der AtGLS eine Akkumulation des Transkriptes im Gegensatz zum GUS-Transkript nicht zu beobachten, vermutlich da das AtGLS-Transkript deutlich instabiler als das GUS-Transkript ist.



**Abbildung 4.19** *GUS*- und *AtGLS*-Transkript Mengen in *AtGLS::GUS*-Pflanzen (#14) nach Behandlung mit den Elicitoren Alamethicin (Ala) und Cycloheximid (CHX)

(A) Schematische Darstellung des AtGLS::GUS Konstruktes. Der AtGLS-Promotor (-1162 bis +3) wurde mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup> Technologie in den Vektor kloniert. Die *attB2*-Stelle ist Teil des 5 '*UTR* vor dem *GUS*-Gen.

(**B**) *GUS*- und *AtGLS*-Transkript-Analyse in transgenen *AtGLS*::*GUS*-Pflanzen nach Induktion mit einer 5  $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala), einer 20  $\mu$ g/ml Cycloheximid-Lösung (CHX) oder mit einer 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH). Blattmaterial wurde nach 31 h geerntet.



**Abbildung 4.20** Histologische GUS-Färbung von einer Schote (1), einer Blüte (2), einem Blütenstand (3) und einem verwundeten Blatt (4), die von einer *AtGLS::GUS*-Pflanze (#14) entnommen wurden.

Das Blatt wurde mit einem Skalpell verwundet, die anderen Organe wurden unbehandelt in die Färbelösung überführt und für 8 h inkubiert. Die Entfernung des Chlorophylls erfolgte durch Waschen in 70% Ethanol. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens 10 unabhängige *AtGLS::GUS*-Linien

In einem weiteren Schritt wurden Schoten, Blüten und Blätter unabhängiger AtGLS::GUS-Linien einer histologischen GUS -Färbung unterzogen. Dabei zeigt eine Blaufärbung jene Bereiche an, in denen das GUS-Protein exprimiert wird und ein farbloses Substrat in ein blaues und unlösliches Produkt umsetzt. Wie Abbildung 4.20 zeigt, ist der AtGLS-Promotor in den Hüllblättern, an der Spitze der Narbe und in den Staubblättern exprimiert. In den jungen ungeöffneten Blüten findet sich noch keine Expression in den Hüllblättern, wohl aber in einem späteren Entwicklungsstadium. Die Schoten zeigen nur an der Spitze und an der Basis eine AtGLS-Expression. Die Expression in diesen Organen korreliert gut mit der TMTT-Emission in Blütenständen (CHEN et al., 2003b). Verwundete Blätter zeigen nur direkt an den Wundrändern eine Aktivität des AtGLS-Promotors. Verwundete Pflanzen zeigen keine messbare Induktion von TMTT und GL (THOLL, unveröffentlicht); vermutlich reichen die induzierten Mengen AtGLS nicht für eine messbare TMTT- bzw. GL-Produktion aus. Eventuell sind die Mengen von AtGLS an den Wundrändern auch deutlich geringer als die GUS-Färbung vermuten lässt, da zum einen das GUS-Transkript (s. o.) und evtl. auch das GUS-Protein deutlich stabiler sind als das AtGLS-Transkript bzw. Protein. Zum anderen

ist an den Wundrändern die Zugänglichkeit des GUS-Enzyms zu seinem Substrat evtl. erhöht und die enzymatische Reaktion amplifiziert ein ursprünglich schwaches Signal stark. Eine histologische GUS- Färbung kann deshalb nur eine Aussage über die Qualität, nicht aber über die Quantität der Expression machen. Die Verwundungs-Vermittelte *AtGLS*-Expression ist im Gegensatz zur Induktion mit Alamethicin (siehe 4.2.1) nicht vom COI1-Protein abhängig (siehe **Abbildung 4.21**).

AtGLS::GUS coi1/wt; wt/wt AtGLS::GUS coi1/coi1



Abbildung 4.21 Histologische GUS-Färbung verwundeter Blätter von AtGLS::GUS-Pflanzen im coil-Hintergrund

AtGLS::GUS Pflanzen (Linie #14) wurden mit coil-Mutanten gekreuzt und auf Homozygotie bezüglich des AtGLS::GUS Transgens selektiert. Diese Samen wurden auf Erde ausgelegt. Nach 3 Wochen wurden Blätter mit einem Skalpell verwundet und für 8 h in der Färbelösung inkubiert. Die Entfernung des Chlorophylls erfolgte durch Waschen in 70% Ethanol (oberer Teil der Abbildung). Nach 5 Wochen wurde ein weiteres Foto vom Blütenstand der Pflanze gemacht (unterer Teil der Abbildung). Die zu erkennende Sterilität ist indikativ für eine homozygot vorliegende coil-Mutation (coil/coil), während es sich bei der fertilen Pflanze entweder um eine heterozygote coil-Pflanze (coil/wt) oder eine Pflanze ohne Mutation im coil-Gen handelt (wt/wt). Eine nicht entwickelte Schote ist mit einem weißen Pfeil markiert.

#### 4.2.8 Das *AtGLS*-Transkript weist einige Besonderheiten auf

Wie bereits in 4.1.4 erläutert, kam es in transgenen Pflanzen mit einem isolierten *AtGLS-ORF* (ohne Introns) unter der Kontrolle des konstitutiven *35S*-Promotors oder des Alkohol-induzierten *AlcA*-Promotors zu keiner Akkumulation des *AtGLS*-Transkriptes (Daten nicht gezeigt). Bei diesem Konstrukten handelte es sich um den isolierten *ORF* des *AtGLS*-Gens, der sich vom Start- bis zum Stop-Codon erstreckt; durch die Klonierung in die jeweiligen Vektoren wurde der ORF mit einer heterologen 5' und 3' UTR versehen (siehe **Abbildung 4.22**). In dieser Form wurde der *ORF* auch für die Expression in der Hefe *H. polymorpha* verwendet, die nach Einführung des *AtGLS-ORF*s Transkript akkumulierte (siehe 4.1.4). Um die Funktionalität des Konstruktes mit dem isolierten *AtGLS-ORF* unter der Kontrolle des *35S*-Promotors (*35S::AtGLS*ORF) zu beweisen, wurde dieses Konstrukt in *N. tabacum* eingeführt.



**Abbildung 4.22** *AtGLS*-Transkript-Analyse in *N. tabacum* Pflanzen transformiert mit dem isolierten *ORF* der *AtGLS* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors (*35S::AtGLS<sub>ORF</sub>*).

(A) Schematische Darstellung des für die Transformation von *N*.*tabacum* verwendeten Konstruktes 35S::AtGLS<sub>ORF</sub>. Der isolierte AtGLS-ORF ohne Introns mit 129 Bp einer heterologen 5 'UTR und einem 35S-Terminator steht unter der Kontrolle des Blumenkohl Mosaik Virus Promotors (35S). Die Klonierung wurde über das Gateway <sup>TM</sup> System durchgeführt, weshalb der ORF von attachment sites flankiert ist. Die graue Box symbolisiert den ORF, die weiße Box den 35S-Promotor und schwarze Boxen die attachment sites (attB1 und attB2), die graue Linie zeigt die Lage des 35S-Terminators an.

(B) Transgene *N. tabacum* (*N. t.*) Linien mit dem Konstrukt  $35S::AtGLS_{ORF}$  wurden zu vollständigen Pflanzen herangezogen von denen Material für eine *AtGLS*-Transkript-Analyse geerntet wurde. Dargestellt ist das Ergebnis einer Linie, deren Expression für sechs weitere Linien repräsentativ ist. Zum Vergleich wurde Blattmaterial einer untransformierten *N. tabacum Pflanze* (*N. t.*) und einer *A. thaliana* (*A. t.*) Pflanze (hydroponisch angezogen und für 31h mit 5 µg/ml Alamethicin behandelt) analysiert.

In Abbildung 4.22 sieht man, dass das Konstrukt mit dem konstitutiven Promotor im Gegensatz zu *A. thaliana* in *N. tabacum* zur Akkumulation eines Transkriptes führt. Das *AtGLS*-Transkript befindet sich nur in transformierten Pflanzen; es weist die gleiche Größe auf, wie das in *A. thaliana* induzierte Transkript. Das Konstrukt ist also vermutlich zumindest in *N. tabacum* funktionell. Vergleicht man das Konstrukt, das in *A. thaliana* zur konstitutiven Transkription der *AtGLS* führt (*35S::AtGLS*, siehe 4.1.5) mit dem Konstrukt, das nur in *N. tabacum* zur konstitutiven Expression führt, dann sieht man, dass der Unterschied in den Introns, der 5' und 3' UTR sowie in der 3' flankierenden Region liegt. Der Vektor und der *35S*-Promotor ist in beiden Fällen identisch. Dies weist darauf hin, dass die Transkription oder die Stabilisierung des Transkriptes in *A. thaliana* die Anwesenheit der 5' oder 3'UTR oder der Introns oder der 3'flankierenden Region benötigt.



**Abbildung 4.23** Analyse des *AtGLS*-Transkriptes in konstitutiven Expressionslinien (*35S::AtGLS*) nach Gabe von Alamethicin und Cycloheximid

Pflanzen transgener Expressionslinien (*35S::AtGLS*; #F, #R, #S, #W) wurden hydroponisch angezogen und über die Wurzeln mit einer 20  $\mu$ g/ml Cycloheximid-Lösung (CHX) bzw. einer 5 $\mu$ g/ml Alamethicin-Lösung (Ala) oder einer 0,1% Ethanol-Lösung (EtOH) behandelt. Nach 6 h wurde Blattmaterial der Cycloheximid-behandelten Pflanzen geerntet. Von den Alamethicin-behandelten Pflanzen wurde nach 6 und 31h Material geerntet und einer *AtGLS*-Transkript Analyse unterzogen.

Um die Theorie zu testen, dass es in *A. thaliana* Mechanismen gibt, die in Anwesenheit eines Induktors zur Stabilisierung des Transkriptes führen, wurden transgene *A. thaliana*-Linien (*35S::AtGLS*) im mit einer schwachen konstitutiven Expression der *AtGLS* aber ohne endogenes *AtGLS*-Transkript (*salk\_039864*; siehe 4.1.3) ausgewählt und mit den Induktoren Alamethicin und Cycloheximid behandelt.

In Abbildung 4.23 ist zu erkennen, dass sich das Transkript durch Gabe von Alamethicin und Cycloheximid deutlich verändert. Allerdings ist diese Veränderung nicht in allen Linien konsistent. In Linie #F zeigt sich eine Zunahme des Transkriptes nach 31 h Alamethicin Behandlung oder Gabe von Cycloheximid, die anderen Linien verhalten sich eher gegenläufig. Die auffälligste Veränderung ist aber das Auftreten zusätzlicher Banden in allen Pflanzen, die mit Alamethicin oder Cycloheximid oder bei Linie #W mit Ethanol behandelt wurden. Dabei könnte es sich um Spaltungsprodukte des ursprünglichen Transkriptes handeln, da beide Signale kürzere Transkripte repräsentieren. Da es sich um distinkte Banden handelt (außer in #W) ist davon auszugehen, dass die Spaltung immer an der gleichen Stelle erfolgt. Eventuell verhalten sich die Linien alle etwas unterschiedlich aufgrund der Tatsache, dass in den Linien jeweils andere Mengen des Transkriptes am Anfang der Behandlung vorlagen, die Schwellenwerte für die Aktivierung von Abbaumechanismen überschreiten. Bemerkenswert ist, dass solche zusätzlichen Signale niemals aufgetreten sind, wenn der Wildtyp mit Cycloheximid oder Alamethicin induziert wurde (siehe z. B. 4.2.6). Es sind auch niemals zusätzliche Signale in unbehandelten ektopischen Expressionlinien (35S::AtGLS #1 und #2; siehe 4.1.5) beobachtet worden. Dies lässt darauf schließen, dass sich das durch die ektopische Expression erzeugte AtGLS-Transkript von dem endogenen unterscheidet. Beide Transkripte sind ähnlich groß und führen zur Expression des gleichen Proteins (siehe 4.1.5), evtl. liegt der Unterschied in einem Faktor, der an die mRNA bindet und deren Stabilisierung oder Degradation ermöglicht. Dieser Unterschied äußert sich in der Degradation des ektopisch exprimierten Transkriptes im Gegensatz zum endogenen Transkript unter Stressbedingungen bzw. einer bestimmten Expressionsstärke. Um diesen Unterschied und den damit verbundenen Mechanismus zu charakterisieren, sind weitere Analysen notwendig. Es wäre z. B. möglich, die für die Stabilisierung oder den Abbau notwendigen Sequenzen zu kartieren und in einem weiteren Schritt putative Proteine zu finden, die an diese Sequenzen binden.

# **4.2.9** Die effiziente Umsetzung von Geranyllinalool zu TMTT braucht ein funktionelles COI1-Protein

In 4.1.4 konnte gezeigt werden, dass die ektopische Expression der *AtGLS* für die Synthese von sowohl GL als auch TMTT ausreicht. Dies bedeutet, dass keine Induktion notwendig ist, um GL zu TMTT umzuwandeln.

Wie in 4.2.1 gezeigt wurde, wird in der *coi1*-Mutante nach Alamethicin Induktion kein TMTT emittiert, weil die Pflanzen das *AtGLS*-Transkript nur in Abhängigkeit des COI1- Proteins akkumulieren können. Das Ziel des folgenden Experimentes ist es zu testen, ob lediglich die Synthese des *AtGLS*-Transkriptes COI1-abhängig ist, oder ob auch für den nachfolgenden Schritt, die Umwandlung zu TMTT, ein funktionelles COI1-Protein notwendig ist.

Dafür wurden die in 4.1.5 beschriebenen 35S::AtGLS-Pflanzen in die coil-Mutante eingekreuzt, wodurch der Effekt der coil-Mutation auf das AtGLS-Transkript aufgehoben wird. Wenn es keine weiteren von COI1 abhängigen Schritte gibt, sollte das Volatlilenprofil unverändert zur 35S::AtGLS-Pflanze sein.



Abbildung 4.24 Mengenverhältnis von TMTT und GL in einer 35S::AtGLS-Pflanze in einem homozygoten *coil*-Hintergrund (rechts) und einem heterozygoten *coil*-Hintergrund

Die verwendeten Pflanzen waren homozygot für das 35S::AtGLS-Transgen und wurden auf MeJA-Platten (siehe 3.1.2.10) auf den Status (hetero oder homozygot) der *coil*-Mutation getestet und anschließend auf Erde unter Kurztagsbedingungen angezogen. Die Volatilensammlung wurde für 31h durchgeführt. Die relativen Mengen an GL und TMTT wurden durch die Bestimmung der Flächen unter den jeweiligen Peaks ermittelt, der Wert für den GL Peak wurde dabei auf 100% gesetzt. Es sind zwei typische Diagramme dargestellt. Die Zahlen stellen den Quotienten aus dem GL-Peak und dem TMTT-Peak dar. Diese Werte und Standardabweichungen entsprechen drei unabhängigen Experimenten

In Abbildung 4.24 ist zu erkennen, dass dies nicht der Fall ist, homozygote *coil*-Mutanten akkumulieren zwar GL aber verglichen mit den heterozygoten *coil*-Mutanten sehr wenig TMTT. Dies weist darauf hin, dass die Umsetzung von GL zu TMTT abhängig vom COII-Protein von einem anderen Enzym als AtGLS katalysiert wird. Zusammen mit der Bestimmung weiterer Einflüsse auf das Verhältnis von GL und TMTT in ektopischen *AtGLS*-Exprimierern und der Annahme, dass es sich um ein Cytochrom handelt (siehe 1.3) ist es evtl. möglich, Kandidatengene aufgrund ihres Expressionsmusters zu ermitteln und ihre Rolle bei der TMTT-Synthese zu untersuchen.

#### 4.3 Neue Elemente der Signalkaskade, die zur *AtGLS*-Expression führt

## 4.3.1 *AtGLS*-Transkript ist in sechs Ökotypen von *A. thaliana* ähnlich gut exprimiert

Es wurde bereits in einigen Pflanzen wie Lima-Bohne (HOPKE *et al.*, 1994), Mais (WILLIAMS *et al.*, 2005) und Tomate (AMENT *et al.*, 2004) eine Emission von TMTT festgestellt. Dies legt eine wichtige und evolutiv konservierte Funktion dieses Terpens nahe. *A. thaliana* ist durch direkte Abwehr wie z. B. der Aktivierung von Glucosinolaten (HALKIER und GERSHENZON, 2006; BUROW *et al.*, 2006) vor Herbivoren geschützt, so dass der Verlust eines Volatils sich evtl. nicht deutlich auf die

Fitness auswirkt. Tatsächlich variiert das Spektrum emittierter Terpene in den verschiedenen Ökotypen von *A. thaliana*, z. B. findet man das Monoterpen Ocimen in den Ökotypen No (FALDT *et al.*, 2003) und Ws (THOLL, unveröffentlicht), aber nicht in Col (siehe 4.1.2). Die Vielfalt der natürlichen genetischen Diversität in verschiedenen Ökotypen kann evtl. für die Entdeckung neuer Faktoren, die die *AtGLS*-Expression beeinflussen, ausgenutzt werden. Für eine Analyse wurden sechs verschiedene Ökotypen ausgewählt und mit Alamethicin induziert.



Abbildung 4.25 AtGLS-Transkript in sechs verschiedenen Ökotypen nach Behandlung mit Alamethicin

Northern-Blot-Analyse des *AtGLS*-Transkriptes in hydroponisch angezogene Ökotypen von *A. thaliana*, die mit Alamethicin (5 µg/ml) über die Wurzeln induziert wurden. Von einer Pflanze wurde nach 0, 6 und 31 h geerntet. Col: Columbia; No: Nossen; C24: Herkunft unbekannt; Cvi: Cape Verdi Island; Ws: Wassilewskija

In **Abbildung 4.25** wird deutlich, dass keiner der Ökotypen eine stark veränderte Expression des *AtGLS*-Transkripts aufweist. Ausgehend von der Annahme, dass das vorhandene *AtGLS*-Transkript indikativ für die Fähigkeit der TMTT-Synthese ist, kann man annehmen, dass die Produktion von TMTT, im Gegensatz zu anderen Terpenen, in den verschiedenen Ökotypen konserviert ist und damit evtl. einen Fitnessgewinn für *A. thaliana* darstellt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass indirekte Abwehr auch unter Freilandbedingungen eine Rolle für *A. thaliana* spielt. Für eine statistisch relevante Aussage müssten allerdings deutlich mehr Ökotypen auf ihre Fähigkeit TMTT zu produzieren überprüft werden.

#### 4.3.2 Etablierung eines Screens nach Mutanten mit konstitutiver *AtGLS*-Expression

In 4.2 wurde die Expression des *AtGLS*-Gens in verschiedenen Genotypen von *A*. *thaliana* untersucht. Die Interpretation der Ergebnisse führte zur Postulierung eines negativen Regulators (siehe 4.2.6), der nach Stimulation von COI1 zum Proteasom

transferiert wird, wo er abgebaut wird. Die folgende Strategie verfolgte das Ziel Mutanten zu identifizieren, die einen Defekt in diesem negativen Regulator haben. Für die Identifikation des Regulators wurde nach Mutanten aus einer EMS- oder Neutronenmutagenisierten Population gesucht, die eine konstitutive Expression der *AtGLS* aufwiesen. Dabei wurde davon ausgegangen, dass ein funktionsunfähiger negativer Regulator eine ähnliche Wirkung auf die *AtGLS*-Expression erzielt wie eine Cycloheximid-Behandlung, durch die der Faktor nicht mehr akkumulieren kann (siehe 4.2.6).

Die Identifikation eines COII-abhängigen Regulators wurde bereits mehrfach versucht (siehe 1.6). Da sich das Expressionsmuster des *AtGLS*-Gens von vielen anderen Oxylipin-induzierten Genen (siehe 4.2.2 und 4.2.3) unterscheidet, besteht hier ein guter Ausgangspunkt für die Suche nach einem negativen Regulator. Tatsächlich weisen z. B. nur sehr wenige Gene eine Induktion mit Cycloheximid auf, die abhängig von COII ist (siehe 4.2.6). Unter 1200 Transkriptionsfaktoren, von denen viele durch Cycloheximid induzierbar sind, finden sich nur vier Faktoren deren Induktion die Anwesenheit des COII-Proteins erfordert (GÄRTNER, unveröffentlicht). Dieses Induktionsverhalten könnte darauf hinweisen, dass sich der für die *AtGLS*-Repression verantwortliche Regulator von anderen negativen Regulatoren der JA-Signalkaskade unterscheidet (siehe 5.6). Der Verlust eines solchen Regulators, der evtl. nur eine kleine Gruppe von Genen regelt, führt möglicherweise nicht zur Letalität der entsprechenden Pflanze. Ein solcher Faktor ist eventuell auch nicht redundant im Genom angelegt.

Um viele Pflanzen testen zu können, wurden zwei Reportersysteme verwendet, die eine methodisch einfache Ermittlung der *AtGLS*- Expression erlauben.

Dazu wurden 2,1 kb des *AtGLS*-Promotors mit den Reportergenen *Luciferase (LUC)* und *Phosphinotricinacetyltransferase (PAT)* fusioniert. Das Enzym Luciferase ist in der Lage das Substrat Luciferin umzusetzen, wobei Licht emittiert wird, das von einer sensitiven Kamera detektiert werden kann.

Die PAT ist ein Enzym, welches das Herbizid Phosphinotricin (Basta<sup>™</sup>) acetyliert und damit dessen Toxizität für die Pflanze aufhebt (BLOCK *et al.*, 1987).

Transgene Pflanzen mit dem *AtGLS::LUC* Konstrukt aktivieren nach Gabe eines Induktors den *AtGLS*-Promotor und emittieren Licht nach Applikation von Luciferin (RIGGS und CHRISPEELS, 1987; SOUTHERN *et al.*, 2006).





AtGLS::LUC

Abbildung 4.26 Luciferase Aktivität in AtGLS::LUC-Pflanzen nach Behandlung mit Alamethicin

(A) Schematische Darstellung des AtGLS::LUC-Konstruktes. Der AtGLS-Promotor (-2166 bis +3) wurde mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup> Technologie in den Vektor kloniert. Die *attB2* Stelle ist Teil der 5 'UTR vor dem *LUC*-Gen.

(**B**) Eine *AtGLS::LUC*-Pflanze (Linie #8) im Licht aufgenommen (schwarz-weiss) mit einer Darstellung des von der Pflanze emittierten Lichtes (Falschfarben). Im Farbverlauf von blau nach rot ist eine Zunahme der Lichtintensität dargestellt. Die Pflanze wurde hydroponisch angezogen und mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin behandelt. Es wurde eine Aufnahme direkt nach der Behandlung mit Alamethicin (0 h) und eine Aufnahme nach 6 h gemacht.

Die gesuchten mutagenisierten Pflanzen sollten diese Reaktion ohne vorherige Behandlung mit einem Elicitor zeigen.

In **Abbildung 4.26** ist zu erkennen, dass transgene *AtGLS::LUC*-Pflanzen abhängig vom Wirken des Elicitors Alamethicin Luciferase-Aktivität zeigten. Die Emission von Licht spiegelte damit gut die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes wieder, das ebenfalls durch Alamethicin induziert ist (siehe 4.1.2).

Das AtGLS::PAT-Reportersystem wurde durch Behandlung der entsprechenden Pflanzen mit Basta<sup>TM</sup> getestet. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4.27** dargestellt. Zunächst ist zu erkennen, das AtGLS::PAT Pflanzen allein durch Behandlung mit Basta<sup>TM</sup> gelb werden und sterben (**Abbildung 4.27 B**). Dieses Ergebnis entspricht den Erwartungen, da der AtGLS-Promotor ohne eine Behandlung mit einem Induktor für das AtGLS-Gen nicht aktiv sein sollte und damit das PAT-Gen, das Resistenz gegen Basta<sup>TM</sup> vermittelt, nicht exprimiert ist.



Abbildung 4.27 AtGLS::PAT, 35S::PAT und 35S::AtGLS nach Behandlung mit dem Herbizid Basta™

(A) Schematische Darstellung der in diesem Experiment verwendeten Konstrukte. Der AtGLS-Promotor (-2166 bis +3) wurde mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup> Technologie in den Vektor kloniert. Die *attB2* Stelle ist Teil der 5'UTR vor dem PAT-Gen (oben). Das Konstrukt 35S::PAT besitzt das PAT-Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors (unten). Das Konstrukt 35S::AtGLS ist in 4.1.5 beschrieben, die entsprechende T-DNA besitzt zusätzlich ein PAT-Gen unter Kontrolle des NOS-Promotors (nicht gezeigt)

(**B**) *AtGLS::PAT*-Pflanzen (Linie #6) wurden unter Langtagsbedingungen angezogen und 4 Tage nach der Keimung jeden Tag mit einer 2 mM Phosphinitricin-Lösung besprüht, das Foto wurde zwei Wochen nach der Keimung gemacht

(C) 35S::AtGLS-Samen (Linie #2 siehe 4.1.5) wurden mit Samen von AtGLS::PAT gemischt (C1) oder allein (C2) gesät. Anzucht und Behandlung erfolgte wie unter (B) beschrieben

(**D**) 35S::PAT-Samen (Linie #9) wurden mit Samen von AtGLS::PAT gemischt (D1) oder allein (D2) gesät. Anzucht und Behandlung erfolgte wie unter (B) beschrieben

Weiterhin ist in **Abbildung 4.27 D1** und **D2** zu erkennen, dass das gleiche *PAT*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven *35S*-Promotors eine Resistenz gegen Basta<sup>TM</sup> vermittelt. **Abbildung 4.27 C1** und **C2** zeigt, dass die *35S::AtGLS*-Pflanzen eine deutliche Resistenz gegenüber Basta<sup>TM</sup> aufweisen, da das in die Pflanze transformierte

deutliche Resistenz gegenüber Basta<sup>TM</sup> aufweisen, da das in die Pflanze transformierte Konstrukt das *PAT*-Gen als Selektionsmarker trägt (siehe 3.2.10). Obwohl sich die *35S::AtGLS*-Pflanzen unter den Selektionsbedingungen deutlich schlechter entwickeln als die *35S::PAT*-Pflanzen sind die *35S::AtGLS*-Pflanzen deutlich in einer Population Basta<sup>TM</sup>-sensitiver Pflanzen zu erkennen (**Abbildung 4.27 C1**). Der beobachtete Wachstumsnachteil der *35S::AtGLS*-Pflanzen ist nicht unerwartet, da er schon ohne Selektion sichtbar wurde (siehe 4.1.5). Es ist zu erwarten, dass Pflanzen mit konstitutiver *AtGLS*-Expression zwar kleiner sind, aber als grüne Pflanzen deutlich zu erkennen. Problematisch wird die Selektion evtl. wenn weitere Gene durch Wegfall eines negativen Regulators konstitutiv exprimiert werden und dadurch das Wachstum oder die Ergrünung der Pflanzen hemmen. Eine Verbesserung des Screens könnte darin bestehen, das Konstrukt *AtGLS::PAT* in eine *AtGLS*-Expression zu vermeiden.

Es war nicht möglich, durch die Induktion des chimären AtGLS::PAT-Gens eine reproduzierbar erhöhte Resistenz gegen Basta<sup>™</sup> zu erreichen (Daten nicht gezeigt). Dies liegt vermutlich vor allem daran, dass z. B. Alamethicin die Pflanze gelb werden lässt, was mit dem Phänotyp nach Behandlung mit Basta<sup>TM</sup> interferiert. Es wird davon ausgegangen, dass die PAT-Transkriptmengen in einer mit Cycloheximid behandelten AtGLS::PAT-Pflanze der PAT-Transkriptmengen entsprechen, die in einer putativen Mutante im AtGLS::PAT-Hintergrund durch Wegfall eines negativen Regulators (s. o.) entstehen. Durch Vergleich der Transkript-Mengen des PAT-Gens in AtGLS:: PAT-Pflanzen, die mit Cycloheximid behandelt wurden, mit Transkript-Mengen einer Basta<sup>TM</sup>-resistenten 35S::PAT-Pflanze, sollte ermittelt werden, ob die PAT-Transkriptmengen, die durch Cycloheximid induziert werden können ausreichen, um ein Überleben unter Selektionsbedingungen sicher zu stellen. Damit kann prognostiziert werden, ob eine putative Mutante, die eine konstitutive Aktivierung des AtGLS-Promotors aufweist, die Selektionsbedingungen überleben würde. Man sieht in Abbildung 4.28, dass eine mit Cycloheximid induzierte AtGLS::PAT (Linie #6)transgene Pflanze mehr Transkript akkumuliert als eine Basta<sup>TM</sup>-resistente 35S::PATtransgene Pflanze.



Abbildung 4.28 PAT-Transkriptmengen in AtGLS::PAT-Pflanzen nach Behandlung mit Cycloheximid im Vergleich zu PAT-Transkriptmengen in 35S::PAT-Pflanzen

*35S::PAT-* sowie *AtGLS::PAT-*Pflanzen wurden hydroponisch angezogen, Blätter von *35S::PAT-*Pflanzen wurden ohne Behandlung (K) geerntet. Die *AtGLS::PAT-*Pflanzen (Linie #6) wurden für 6 h mit einer 20 μg/ml Cycloheximid-Lösung (C) oder einer 0,1% Ethanol-Lösung (E) behandelt.

Es konnte gezeigt werden, dass das *PAT*-Transkript durch Behandlung mit Cycloheximid in *35S::PAT* -Pflanzen eher weniger ist, als in unbehandelten Pflanzen (CAMEHL, unveröffentlicht). Dies lässt darauf schließen, dass die beobachteten *PAT*-Transkriptmengen tatsächlich die Aktivität des Promotors widerspiegeln und nicht zusätzlichen Stabilisierungseffekten der RNA durch den Induktor unterliegen. Dies spricht dafür, dass eine putative Mutante im *AtGLS::PAT*-Hintergrund mit konstitutiver Aktivierung des *AtGLS*-Promotors in der Lage sein sollte, die Selektionsbedingungen zu überleben.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich die transgenen Pflanzen *AtGLS::LUC* (Linie #8) und *AtGLS::PAT* (Linie #6) als Reporterlinien für die *AtGLS-*Transkription eignen. Die Samen dieser Linien wurden vermehrt und anschließend entweder einer EMS-Mutagenese (*AtGLS::PAT*) oder einer Neutronenmutagenese (*AtGLS::LUC*) unterzogen. Die Verwendung des Mutagens EMS führt u. a. zur Alkylierung von Guanin und damit zu Punktmutationen in der genomischen DNA (KIM *et al.*, 2006), diese können neutral für die Funktion eines Proteins sein oder zu einem kompletten bzw. partiellen Verlust der Aktivität führen. Eine Aminosäure wird in 50% der Fälle durch eine Mutation ausgetauscht, aber zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation durch eine Mutation kommt es nur in 3% der Fälle (GREENE *et al.*, 2003).

Bei der Neutronenmutagenese werden durch Beschuss mit Neutronen große Bereiche (0,8 - 12 kb) aus dem Genom entfernt. Eine Mutation führt somit in den meisten Fällen

zum Verlust der Genfunktion, entweder durch komplette Entfernung des Gens oder durch eine Verschiebung des Leserasters (LI *et al.*, 2001).

Da der Phänotyp, der mit dem Verlust eines putativen Repressors verbunden ist, vermutlich rezessiv vererbt wird, wurden die mutagenisierten Samen ausgelegt und von den erhaltenen Pflanzen erneut Samen geerntet. A. thaliana ist eine selbstbestäubende Pflanze, weshalb sich in der erhaltenen Generation (F2) Pflanzen mit homozygoten Allelen einer Mutation befinden sollten. Die Samen von je ca. 200 Pflanzen (AtGLS::LUC) oder ca. 6000 Pflanzen (AtGLS::PAT) wurden zu einem sog. Pool zusammen geerntet; dies ergab 300 Pools für AtGLS::LUC und 60 Pools für AtGLS:: PAT. Diese Zusammenfassung erlaubt später im Fall des Auffindens einer Mutante eine Aussage darüber, ob zwei Mutanten vermutlich von der gleichen Mutterpflanze stammen und damit auch aus einem Pool sind oder unabhängige Mutationsereignisse darstellen und damit aus verschiedenen Pools stammen. Außerdem erlaubt die Methode, einen Pool noch einmal zu selektieren, wenn eine selektierte Pflanze abstirbt. In mehreren unabhängigen Pools wurden sowohl für die EMS- als auch für die Neutronenmutagenese Farb- und Formmutanten beobachtet. Bei den Farbmutanten wurden vor allem Pflanzen mit weißen Kotyledonen beobachtet, aber auch rote Pflanzen waren unter den selektierten Keimlingen zu sehen. Formmutanten hatten vor allem ein verzögertes Wachstum oder untypisch geformte Kotyledonen (Daten nicht gezeigt).

#### 4.3.3 Mutanten mit einer konstitutiven *AtGLS* Expression

Nach dem Screen (siehe 3.5.3.1 und 3.5.3.2) wurden die überlebenden Pflanzen (*AtGLS::PAT*) sowie die Pflanzen mit konstitutiver Emission von Licht nach Gabe von Luciferin (*AtGLS::LUC*) auf Erde angezogen und anschließend, soweit möglich, Samen geerntet. Die Samen wurden dann erneut ausgelegt und der ursprünglich beobachtete Phänotyp soweit möglich reproduziert. Pflanzen, deren Phänotyp (Überleben nach Behandlung mit Basta<sup>TM</sup> bzw. konstitutive Emission von Licht nach Luciferin-Behandlung) auch in dieser Generation sichtbar war, wurden auf ihre Genexpression überprüft.



Abbildung 4.29 Schematische Darstellung des Screening-Verfahrens und die dabei erhaltenen mutagenisierten Pflanzen

Der Ablauf und die Ergebnisse des Screens sind in Abbildung 4.29 dargestellt. Bei der Selektion von mutagenisierten Pflanzen mit konstitutiver Luciferase-Aktivität fällt besonders die hohe Anzahl von Kandidaten nach der ersten Selektion auf, unter denen sich nach weiterer Überprüfung sehr viele Falschpositive befanden. Ein Grund für diesen Befund scheint die hohe Sensitivität dieses Verfahrens zu sein, das zu einem positiven Signal führt, wenn die Pflanze einen leichten transienten Stress hatte. Dieser führt zur geringen Aktivierung des AtGLS-Promotors, ohne dass dafür eine genetische Ursache besteht. Tatsächlich zeigten zwei Kandidaten auch in der nächsten Generation eine konstitutive Emission von Licht nach Gabe von Luciferin (siehe Abbildung 4.30), aber dennoch war keine wesentlich erhöhte AtGLS-Transkriptmenge zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Selbst wenn die Ursache für die Luciferase-Aktivität in einer Mutation begründet ist, wurden in diesem Fall die AtGLS-Transkriptmengen nur marginal beeinflusst. Da diese Mutanten durch eine Neutronenmutagenese entstanden sind, ist eine Mutation im Promotor des chimären AtGLS::LUC Gens, die zu konstitutiver Promotor-Aktivität führt, nicht wahrscheinlich. Aus dem gleichen Grund handelt es sich vermutlich auch nicht um einen partiellen Verlust des negativen Regulators. Das heißt, dass vermutlich in beiden Mutanten keine zentralen Prozesse der Signalkaskade beeinflusst wurden, die zur AtGLS-Transkription führen.



**Abbildung 4.30** Foto von nicht mutagenisierten *AtGLS::LUC*-Pflanzen (oben) im Vergleich zu den Nachkommen zweier mutagenisierten Pflanzen (Linie #T links und Linie #W rechts) im Licht aufgenommen (schwarz-weiß) mit einer Darstellung des von den Pflanzen emittierten Lichtes (Falschfarben). Im Farbverlauf von blau nach rot ist eine Zunahme der Lichtintensität dargestellt. Die Pflanzen wurden im Langtag angezogen und nach 3 Wochen für die Aufnahme verwendet.

In der Population wurde eine weitere Mutante entdeckt, die eine konstitutive Luciferase-Aktivität aufwies. Die Pflanze war allerdings nicht fertil und konnte deshalb nicht weiter analysiert werden. Wie in Abbildung 4.31 zu sehen ist, wies die Pflanze ein stark verlangsamtes Wachstum auf und zeigte eine deutliche Rotfärbung der Blätter. Es war weiterhin ein deutliche Luciferase-Aktivität in dieser Mutante zu beobachten. Nachdem sich herausstellte, dass die Mutante nicht fertil ist, wurde eine weitere Mutante mit dem selben Phänotyp aus dem gleichen *Pool* selektiert. Es ist möglich, dass diese Mutante eine umfangreiche Aktivierung einer Signalkaskade aufweist, die auch für die Induktion der AtGLS verantwortlich ist. Die Aktivierung der gesamten Signalkaskade resultiert vermutlich in der Aktivierung vieler Gene, deren Expression Ressourcen kostet, die der Pflanze dann für das Wachstum fehlen. Alamethicin induziert die AtGLS-Transkription, löst im Gegensatz zu MeJA aber keine Rotfärbung der Blätter aus (Daten nicht gezeigt). Man würde also erwarten, dass die Induktion der AtGLS und die Induktion der Gene, die verantwortlich für die Rotfärbung der Blätter sind, voneinander unabhängig induziert werden können. Es ist deshalb nicht wahrscheinlich, dass beide durch den gleichen negativen Regulator kontrolliert werden. Es ist eher zu vermuten, dass ein Gen oberhalb von COI1 durch eine Mutation betroffen ist, die zur Erhöhung de JA-Mengen führt.



Abbildung 4.31 Phänotyp einer mutagenisierten Pflanze aus der AtGLS::LUC-Population

(A) nicht mutagenisierte *AtGLS::LUC*-Pflanze (Kontrolle) wurde zwei Wochen auf MS-Medium mit 1% Sucrose unter Langtagsbedingungen angezogen

(B) mutagene Pflanze aus der AtGLS::LUC-Population (Linie #B) wurde wie in A beschrieben angezogen.

(C) 8 Wochen alte auf Erde angezogene mutagenisierte Pflanze aus der *AtGLS::LUC*-Population (Linie #B). Der Durchmesser der Rosette betrug ca. 1 cm.

(**D**) Foto von nicht mutagenisierten *AtGLS::LUC*-Pflanzen wie unter A beschrieben (links durch einen weißen Pfeil markiert) im Vergleich zur mutagenisierten Pflanze wie unter B beschrieben (rechts) im Licht aufgenommen (schwarz-weiß) mit einer Darstellung des von den Pflanzen emittierten Lichtes (Falschfarben). Im Farbverlauf von blau nach rot ist eine Zunahme der Lichtintensität dargestellt.

Beim Screen nach Überlebenden im *AtGLS::PAT*-Hintergrund wurden nur sehr wenige mutagenisierte Pflanzen erhalten, die Anzahl der Falschpositiven war dementsprechend gering. Eine Pflanze, deren Nachkommen reproduzierbar resistent waren, zeigte ein verzögertes Wachstum und eine leichte Rotfärbung der Blätter. Diese Pflanze wies aber weder Transkript für das *PAT*-Gen noch für die *AtGLS* auf (Daten nicht gezeigt).

Zwei weitere mutagenisierte Linien, deren Nachkommen reproduzierbar resistent gegen Basta<sup>TM</sup> sind, zeigten eine erhöhte *AtGLS*-Expression. Diese werden im folgenden als AtGLS:: PAT ceg (constitutive expression of geranyllinalool synthase) bezeichnet und mit den Nummern AtGLS::PAT ceg#1 und AtGLS::PAT ceg#2 bezeichnet. Die Linie AtGLS::PAT ceg#1 zeigt einen deutlichen Phänotyp; die Blätter weisen auf den Kotyledonen Läsionen auf, sie wachsen langsamer und die Pflanze hat eine rötliche Blattfärbung (siehe Abbildung 4.32). Die AtGLS-Expression ist gegenüber AtGLS::PAT Pflanzen 100 fach induziert, allerdings ist die Menge an gebildetem Transkript deutlich geringer als bei einer mit Alamethicin behandelten Pflanze (siehe Abbildung 4.32). Die Linie AtGLS::PAT ceg#2 zeigt dagegen keinen offensichtlichen Phänotyp (Daten nicht gezeigt). Eine Transkript-Analyse zeigte allerdings, dass die unbehandelte Mutante eine 61 fach gesteigerte AtGLS-Transkriptmenge gegenüber einer unbehandelten AtGLS::PAT-Pflanze aufweist. Diese Mutante weist ähnliche AtGLS-Transkript-Mengen auf wie eine mit Alamethicin behandelten Pflanze (siehe Abbildung 4.33). Die Analyse dieser Mutanten könnte in Hinblick auf die Tatsache, dass es in EMS-mutageniserten Pflanzen auch zu einem partiellen Funktionsverlust kommen kann (siehe 4.3.2), der einen schwächeren Effekt zur Folge hat, interessant sein. Der nächste Schritt in der Analyse dieser Mutante bestände in der Kreuzung mit der coil-Mutante. Die Mutation in einem negativen Regulator sollte den Effekt unabhängig von COI1 zeigen.



**Abbildung 4.32** Phänotyp und *AtGLS*-Expression von Nachkommen einer mutagenisierten Pflanze (ceg#1) aus der *AtGLS::PAT*-Population

(A) Real-time-PCR-Analyse einer unbehandelten nicht mutagenisierten *AtGLS::PAT*-Pflanze im Vergleich zu der unbehandelten Mutante *AtGLS::PAT ceg*#1 und einer Wildtyp Pflanze die für 31h mit Alamethicin behandelt wurde. Auf der Y-Achse ist der Faktor zwischen der *AtGLS*-Transkriptmenge und der Transkript-Menge des Referenzgens *PP2A* (*At1g1320*) angegeben (für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe 3.5.2). Der Faktor zwischen der *AtGLS::PAT ceg*#1 ist über dem Pfeil angegeben

(B) Foto von drei Wochen alten auf Erde gewachsenen unbehandelten AtGLS::PAT (links) und AtGLS::PAT ceg#1 (rechts) Pflanzen

(C) Nahaufnahme von 2 Wochen alten AtGLS:: PAT Pflanzen

(D) Nahaufnahme von 2 Wochen alten AtGLS::PAT ceg#1 Pflanzen



**Abbildung 4.33** *AtGLS*-Expression von unbehandelten Nachkommen einer mutagenisierten Pflanze (*AtGLS::PAT ceg#2*) aus der *AtGLS::PAT*-Population

(A) Real-time-PCR-Analyse einer unbehandelten nicht mutagenisierten *AtGLS::PAT*-Pflanze im Vergleich zu einer unbehandelten Mutante (*AtGLS::PAT ceg#2*) und einer Wildtyp (Wt)- Pflanze die für 31h mit Alamethicin (Ala) behandelt wurde. Auf der Y-Achse ist der Faktor zwischen der *AtGLS*-Transkriptmenge und der Transkript-Menge des Referenzgens PP2A angegeben (für eine detaillierte Beschreibung der Methode siehe 3.5.2). Der Faktor zwischen der *AtGLS::PAT* und der *AtGLS::PAT ceg#2* ist über dem Pfeil angegeben.

(**B**) 3 Wochen alte *AtGLS::PAT*-(oben), *35S::PAT*-(links) und *AtGLS::PAT ceg #2*-(rechts) Pflanzen, die 6 Tage nach der Aussaat für 10 Tage täglich mit 2 mM Phosphinotricin besprüht worden sind.

#### 4.4 Kartierung regulatorischer Elemente im *AtGLS*-Promotor

Eine Möglichkeit, Faktoren in der für die *AtGLS*-Transkription verantwortlichen Signalkaskade zu finden, wurde in 4.3.2 beschrieben. In den folgenden Experimenten, die im Rahmen dieser Arbeit aber auch in den Diplomarbeiten von I. Camehl und L. Nagel durchgeführt wurden, sollte versucht werden eine Region im *AtGLS*-Promotor zu finden, die maßgeblich für die induzierte Expression der *AtGLS*-Transkription ist. Die Kenntnis einer solchen Region würde die Identifikation von Proteinen, die an den *AtGLS*-Promotor binden durch das Hefe-Ein-Hybrid-System ermöglichen.



Abbildung 4.34 Schematische Darstellung der Promotorderivate für die Kartierung regulatorischer Elemente

Das Reportergen GUS (nicht dargestellt) wurde unter der Kontrolle der einzelnen Derivate exprimiert. Einzelne Fragmente des AtGLS-Promotors sind farbig dargestellt und als A, B, C und D bezeichnet. Die Bezeichnung der Konstrukte richtet sich mit Ausnahme der Bezeichnung AtGLS::GUS (siehe 4.2.8) nach den darin enthaltenen Fragmenten (links). Schwarze Linien zwischen den Fragmenten zeigen Übergänge an, die im unveränderten AtGLS-Promotor nicht vorkommen. Es ist angegeben, ob das jeweilige Konstrukt in stabil transformierten Pflanzen zu einer Aktivierung des GUS-Transkriptes nach Behandlung mit Cycloheximid führte (+) oder nicht (-). Rechts sind die Arbeiten angegeben, in denen die jeweiligen Konstrukte analysiert worden sind. Das Fragment D enthält die TATA-Box (-31 bis -35). In den Konstrukten ABC::GUS und BBB::GUS wurde das Fragment D durch die Region -40 bis +23 des 35S-Promotors ersetzt. Für die Identifikation regulatorischer Elemente im *AtGLS*-Promotor wurden verschiedene Promotorderivate vor das Reportergen *GUS* kloniert und anschließend daraufhin getestet, ob die Induktion der Transkription mit den Elicitoren Cycloheximid und Alamethicin sowie nach Verwundung noch möglich ist. In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Induktion mit Cycloheximid gelegt um die cis-Elemente zu definieren, die für die Aktivierung des Promotors in Abwesenheit des Repressors notwendig sind. Die Promotorderivate ließen sich aber, soweit getestet, durch Alamethicin und Verwundung in gleicher Weise induzieren (CAMEHL, 2005; NAGEL, 2006).

In **Abbildung 4.34** sind die verschiedenen Promotorderivate dargestellt. Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass Elemente, welche für die Induktion mit Cycloheximid verantwortlich sind, sich innerhalb der ersten 295 Bp des Promotors befinden, da das Konstrukt *ABCD::GUS* noch zur Aktivierung des *GUS*-Transkriptes nach Behandlung mit Cycloheximid führt. Dieses Konstrukt verhält sich bezüglich der Cycloheximid- und Alamethicin-Behandlung sowie nach Verwundung genau wie das *AtGLS::GUS*-Konstrukt, das in 4.2.7 beschrieben wurde (CAMEHL, 2005). Eine Verkürzung des Promotors um das Fragment *A* im Konstrukt *BCD::GUS* führte nicht zu einem Verlust der Induzierbarkeit durch Cycloheximid. Weiterhin führt eine Fusion dieses Promotorderivates mit dem *LUC*-Gen zur Induktion der Reporteraktivität (Emission von Licht) nach Behandlung mit Alamethicin (siehe **Abbildung 4.35**). Wird der Promotor im Konstrukt *CD::GUS* allerdings um das Fragment B (62 Bp) verkürzt, geht die Induzierbarkeit mit Cycloheximid verloren. Daraus lässt sich schließen, dass das Fragment *B* für die Aktivierung der *GUS*-Transkription durch den Elicitor notwendig ist.



BCD::LUC

Abbildung 4.35 Luciferase-Aktivität in transgenen Pflanzen nach Behandlung mit Alamethicin

Foto von 12 unabhängigen transgenen *BCD::LUC*-Linien im Licht aufgenommen (schwarz weiß) mit einer Darstellung des von der Pflanze emittierten Lichtes (Falschfarben). Im Farbverlauf von blau nach rot ist eine Zunahme der Lichtintensität dargestellt. Die Pflanze wurde hydroponisch angezogen und mit 5  $\mu$ g/ml Alamethicin (Ala) behandelt. Es wurde eine Aufnahme direkt nach der Behandlung mit Alamethicin (0 h) und eine Aufnahme nach 6 h gemacht. Die Positionen der Pflanzen ist in beiden Aufnahmen identisch.



Abbildung 4.36 GUS-Transkript in stabilen transgenen ABD::GUS (siehe Abbildung 4.34)-Linien nach Behandlung mit Cycloheximid

10 Linien (#1-#10) wurden hydroponisch angezogen und über die Wurzeln mit einer Cycloheximid-Lösung ( $20 \mu g/ml$ ) behandelt. Blattmaterial wurde von einer Pflanze nach 0 h und 6 h geerntet. Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik wurde die *GUS*-Transkriptmenge bestimmt.



Abbildung 4.37 GUS-Transkript in stabilen transgenen ABC::GUS (siehe Abbildung 4.34)-Linien nach Behandlung mit Cycloheximid

14 Linien (#1-#14) wurden hydroponisch angezogen und über die Wurzeln mit einer Cycloheximid-Lösung (20  $\mu$ g/ml) behandelt. Blattmaterial wurde von einer Pflanze nach 0 und 6 h geerntet. Mit Hilfe der Northern-Blot-Technik wurde die *GUS*-Transkriptmenge bestimmt.

Das Fragment *C* hingegen ist nicht notwendig, denn es fehlt im Konstrukt *ABD::GUS*, das noch immer zu einer Aktivierung der Transkription nach Behandlung mit Cycloheximid führt (siehe **Abbildung 4.34** und **Abbildung 4.36**). Weiterhin konnte die Analyse zeigen, dass der Austausch des Fragmentes *D* durch den Bereich der TATA-Box im *35S*-Promotor, die im Konstrukt *ABC::GUS* vorgenommen wurde, nicht zum Verlust der Aktivierung der *GUS*-Transkription durch Cycloheximid führt (siehe **Abbildung 4.34** und **Abbildung 4.37**). Beide Promotor-Derivate (*ABC::GUS* und *ABD::GUS*) zeigen in einigen Linien bereits ohne die Gabe von Cycloheximid eine Expression. Die *GUS*-Transkriptinduktion findet in der überwiegenden Zahl der Linien

statt (bei ABD::GUS 9 von 10 Linien; bei ABC::GUS 13 von 14 Linien), allerdings in unterschiedlichem Ausmaß. Diese Phänomene sind bereits bei den anderen Promotorderivaten aufgefallen (NAGEL, 2006; CAMEHL, 2005) und unterstreichen die Notwendigkeit, mehrere Linien zu untersuchen. Vermutlich handelt es sich vor allem um Effekte, die mit dem Ort der T-DNA Insertion im Genom und evtl. mit der Anzahl der T-DNA Insertionen (SCHUBERT et al., 2004; DEAN et al., 1988; PEACH und VELTEN, 1991; HOBBS et al., 1990) zusammenhängen. Der Ort der Integration ist möglicherweise von besonderer Bedeutung in dieser Studie, da ein Vektor verwendet wurde, dessen right border in direkter Nachbarschaft zu dem zu analysierenden Promotor liegt, so dass in der transformierten Pflanze der genomische Kontext evtl. einen stärkeren Einfluss auf die Promotoraktivität hat. Zusammenfassend kann man aus diesen Beobachtungen schließen, dass alle Fragmente bis auf das Fragment B ersetzt oder entfernt werden können, ohne dass die Aktivierung der Transkription durch Cycloheximid verloren geht. Daraus ließe sich annehmen, dass das Fragment B nicht nur notwendig sondern auch hinreichend für die Aktivierung der GUS-Transkription nach Behandlung mit Cycloheximid ist. Allerdings führt die Fusion des multimerisierten Fragmentes B mit dem Bereich um die TATA-Box des 35S-Promotors im Konstrukt BBB:: GUS nicht zu einer Induzierbarkeit durch Cycloheximid (siehe Abbildung 4.34). Dies lässt prinzipiell zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen wäre es möglich, dass die Fusion des Fragmentes B mit dem Fragment aus dem 35S-Promotor in dieser Konstellation nicht zu einem induzierbaren Transkriptionskomplex führt. Der Grund dafür ist struktureller Natur und bedeutet nicht, dass für die AtGLS-Promotoraktivierung noch spezielle DNA-bindende Proteine benötigt werden, die nicht binden können, weil ihre Erkennungssequenz im BBB::GUS-Konstrukt fehlt. Zum anderen wäre es möglich, dass eine Erkennungssequenz für die Bindung eines Faktors fehlt. In diesem Fall muss aber gefordert werden, dass diese Sequenz sich sowohl in Fragment A als auch in Fragment D befindet und dass die Sequenz im einen Fragment vollständig durch die Sequenz im jeweils anderen ersetzt werden kann. Denn aus Abbildung 4.34 geht deutlich hervor, dass nur die Anwesenheit von Fragment A oder Fragment D für Aktivierung des GUS-Transkriptes durch Cycloheximid notwendig ist. In jedem Fall stellt das Fragment B einen für die Induktion der Transkription durch Cycloheximid notwendigen Bereich des AtGLS-Promotors dar.

Die Sequenz des Fragmentes *B* ist in **Abbildung 4.38** dargestellt, dabei fällt ein 11 Bp langes Motiv auf, dass sich in der Sequenz zweimal wiederholt.

Abbildung 4.38 Sequenz des Fragmentes B (-172 bis -234) im AtGLS Promotor

Zwei Motive mit identischer Sequenz sind in rot dargestellt.

Wie in **Abbildung 4.39** zu sehen ist, sind Kern-Proteine in einem *in-vitro*-Experiment tatsächlich in der Lage an ein *AtGLS*-Promotorfragment zu binden, das sich von -297 bis -138 Bp oberhalb der *AtGLS*-Transkriptionsstartstelle erstreckt und damit das Fragment *B* umfasst.



Abbildung 4.39 Fragment-Retardierung durch Zugabe von Kernproteinen und Kompetitionsanalyse des radioaktiv markierten *AtGLS*-Promotorfragmentes (-297 bis -138)

Kernproteine wurden wie in 3.7.2 beschrieben aus unbehandelten unter Kurztagsbedingungen gewachsenen Pflanzen isoliert. Das Fragment AtGLS (-297 bis -138) wurde radioaktiv markiert und mit (+) oder ohne (-) Kernproteine (KP) inkubiert. Außerdem wurde entweder Wasser (-) oder ein nicht radioaktiv markiertes Oligonukleotid dessen Sequenz dem Fragment *B* entspricht (BO; -172 bis -134) bzw. eine nicht im AtGLS-Promotor vorkommende Sequenz besitzt, die unspezifische DNA repräsentiert (UO), in 500- (500x) oder 5000- (5000x) fachem Überschuss zum radioaktiven Fragment zugesetzt. Die obere Bande repräsentiert einen DNA-Protein-Komplex, während die untere Bande die Lokalisation des freien radioaktive Fragmentes angibt.

Die Retardierung dieses Fragmentes kann durch Zugabe eines nicht radioaktiv markierten Oligonukleotides, dessen Sequenz dem Fragment *B* entspricht, aufgehoben werden, wenn das Oligonukleotid in 5000- fachen Überschuss zum radioaktiven Fragment vorliegt. Diese Kompetition ist mit einem Oligonukleotid, dessen Sequenz in keiner Beziehung zum *AtGLS*-Promotor besteht, nicht möglich. Dieser Befund spricht dafür, dass an Fragment *B* Proteine binden, die dann für die Retardierung des radioaktiven *AtGLS*-Promotorfragmentes nicht mehr zur Verfügung stehen.

Durch Vergleich der Promotorsequenz mit bereits bekannten cis-Elementen DAVULURI (http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/cite.jsp; al., 2003; et PALANISWAMY et al., 2006) wurde ein Element in Fragment B identifiziert (CACATG), das als notwendig für die Induktion eines durch Trockenstress und Abscisinsäure aktivierten Promotors charakterisiert wurde (ABE et al., 1997); hier kommt dieses Element zweimal im Promotor in direkter Nachbarschaft (mit 3 Bp Abstand) vor. Der Wegfall des einen Elementes führt zum Verlust der Induktion, während die Mutation des anderen Elementes eine gegenüber dem Wildtyp-Promotor verstärkte Induktion zu Folge hat. Die Elemente rekrutieren einen MYC-Transkriptionsfaktor an den Promotor (ABE et al., 1997). Im AtGLS-Promotor befindet sich dieses Element nur einmal im Fragment B und ein zweites Mal im Fragment C; das Fragment C ist allerdings nicht für die Cycloheximid-Induktion notwendig (s. o.).

Proteine, die an Fragment *B* binden, könnten dann in einem weiteren Schritt in einem Hefe-Ein-Hybrid-Screen identifiziert werden.

### 5 Diskussion

#### 5.1 *At1g61120* kodiert für eine (*E*,*E*)-Geranyllinalool Synthase

In dieser Arbeit wurde eine neue Diterpensynthase identifiziert, die die Synthese von (E,E)-Geranyllinalool katalysiert. Einen Beleg, dass das Gen At1g61120 für eine (E,E)-Geranyllinalool-Synthase (GLS) in A. thaliana kodiert, lieferte die Analyse von zwei Insertionslinien, die weder Atlg61120-Transkripte noch Geranyllinalool nach Behandlung mit dem Coronatin-Derivat Coronalon synthetisierten (siehe 4.1.3). Weiterhin führte die induzierte und konstitutive Expression von At1g61120 im gls-Hintergrund zu einer entsprechenden Emission von (E,E)-Geranyllinalool (GL) und (E,E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen (TMTT). Das Gen At1g61120 wurde daraufhin als AtGLS bezeichnet. Da die konstitutive Transkription des AtGLS-Gens für die Emission von TMTT und GL ausreicht, kann davon ausgegangen werden, dass die Expression des AtGLS-Gens den wichtigsten regulierten Schritt in der TMTT-Synthese darstellt. In Pflanzen wie Lima-Bohne (DE BOER et al., 2004) und Tomate (KANT et al., 2004) wird eine Beteiligung von TMTT an der indirekten Abwehr angenommen. Außerdem könnte TMTT eine wichtige Rolle in der Pflanzen-Pflanzeninteraktion spielen (ARIMURA et al., 2000). Die erstmalige Identifizierung einer GLS stellt einen wichtigen Schritt in der Aufklärung dieser Mechanismen und ihrer Regulation dar. Weiterhin stehen mit den gls-Insertionsmutanten und den transgenen Pflanzen, die AtGLS ektopisch exprimieren, jetzt Mittel zur Verfügung, den Beitrag von GL und TMTT bei der Pflanzen-Pflanzen- und Pflanzen-Insekteninteraktion in A. thaliana zu ermitteln.

#### 5.2 Reaktionsmechanismen und Substratspezifität der AtGLS

Durch die Detektion von GL und TMTT im Volatilenprofil von transgenen Pflanzen, die ektopisch *AtGLS*-Transkript exprimieren, wurde die durch Experimente in der Lima-Bohne (GABLER *et al.*, 1991; BOLAND *et al.*, 1998) gewonnene These, dass aus GL durch einen katalytischen Schritt TMTT entsteht, in *A. thaliana* bestätigt. Die Bildung von GL aus Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) ist analog zur Synthese des Monoterpens Linalool und des Sesquiterpenalkohols (*E*)-Nerolidol aus den jeweiligen Substraten GPP und FPP. Im Gegensatz zu einer GLS wurde eine Linalool Synthase Aktivität bereits in *Clarkia* (PICHERSKY *et al.*, 1994; PICHERSKY *et al.*, 1995; DUDAREVA *et al.*, 1996) und eine Nerolidol Synthase Aktivität in Mais (SCHNEE *et al.*, 2002; DEGENHARDT und GERSHENZON, 2000), Erdbeere (AHARONI *et al.*, 2004) und Gurke (BOUWMEESTER *et al.*, 1999) beschrieben. Die höchste Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz weist AtGLS mit einer Linalool- Synthase aus *Clarkia* auf (CSEKE *et al.*, 1998). Dies könnte bedeuten, dass AtGLS auch die Fähigkeit besitzt, Substrate wie GPP und FPP zu akzeptieren und daraus Linalool und Nerolidol zu bilden. Die Substratspezifität *in-vitro* konnte nicht ermittelt werden, da es nicht möglich war, rekombinantes Protein mit Hilfe von Standard-Expressionssystemen zu gewinnen. Die ektopische Expression der *AtGLS in-planta* führte allerdings ausschließlich zur Emission von GL und TMTT, was für eine Substratspezifität der AtGLS für GGPP spricht.

Die Analogie zur Linalool- und Nerolidol-Synthese zeigt sich u. a. in der Anwesenheit eines stark konservierten Aspartat reichen DDXXD-Motivs (BOHLMANN et al., 1998a; BOHLMANN et al., 1998b) in der C-terminalen Domäne der AtGLS. Dieses Motiv ist notwendig für die Bindung an die Diphosphatgruppe des Substrates, die über ein Mg<sup>2+</sup>-Kation vermittelt wird. Wie in Abbildung 5.1 dargestellt, wird die Diphosphatgruppe abgespalten und es bildet sich ein reaktives Carbokation-Intermediat. Die Verlagerung der entstehenden Doppelbindung führt zu einem stabileren tertiären Carbokation. Die positive Ladung am tertiären Carbokation führt zu einem nukleophilen Angriff durch ein Wassermolekül. Nach Abspaltung eines Protons bildet sich eine Alkoholgruppe, womit die Bildung von (E,E)-Geranyllinalool vervollständigt ist. Es ist nicht auszuschließen, dass sich alternativ ein Geranyllinalyldiphosphat als Intermediat bildet, das dann von der AtGLS oder einem anderen Enzym zum entsprechenden Alkohol hydrolysiert wird. Es sind allerdings analoge Intermediate weder bei der Linalool- noch bei der Nerolidol-Synthese beschrieben worden (PICHERSKY et al., 1995; DEGENHARDT und GERSHENZON, 2000), der Nachweis solcher Intermediate gelänge nur durch in-vitro-Experimente mit zellfreien Extrakten aus transgenen Pflanzen, die die AtGLS überexprimieren.



**Abbildung 5.1**Vermuteter Reaktionsmechanismus für die Bildung von (*E*,*E*)-Geranyllinalool (GL) aus Geranylgeranyldiphosphat (GGPP).

Die Bildung von GL aus GGPP wird von der AtGLS katalysiert, während die enzymatischen Schritte zur Umsetzung von GL zu TMTT noch nicht charakterisiert worden sind. Die gestrichelte Linie weist auf die mesomeren Grenzstrukturen hin. OPP: Diphosphatgruppe; OH: Alkohol Gruppe; OH<sub>2</sub>: Wasser

#### 5.3 Lokalisation der AtGLS

Während viele Diterpensynthasen in den Plastiden lokalisiert sind (THOLL, 2006), konnte für die AtGLS kein plastidäres Peptid in der Aminosäuresequenz identifiziert werden. (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/;EMANUELSSON *et al.*, 2000). Die daraus resultierende Vermutung, dass die AtGLS nicht in den Plastiden lokalisiert ist, konnte durch Analyse einer Protein-YFP-Fusion bestätigt werden. Die AtGLS verbleibt im Cytosol oder ER (siehe 4.1.6). Mindestens 2 der 12 GGPP Synthasen sind im ER lokalisiert (OKADA *et al.*, 2000), und die GGPP Menge, die von diesen Enzymen gebildet wird, scheint auch unter nicht induzierenden Bedingungen ausreichend für die GL-Synthese zu sein. Cytosol und ER sind die Kompartimente, in denen die Synthese von FPP hauptsächlich stattfindet (CUNILLERA *et al.*, 1996). AtGLS scheint nicht in der Lage zu sein, dieses FPP in Nerolidol umzusetzen (siehe 5.2), dies spricht zusätzlich für eine Spezifität der akzeptierten Substrate.

#### 5.4 Evolutionäre Aspekte des AtGLS-Ursprungs

Die AtGLS besteht aus 877 Aminosäuren und hat eine errechnete Masse von 101,9 kDa. Der Vergleich mit anderen Terpensynthasen ergibt, dass die AtGLS zu Diterpensynthase eine starke Ähnlichkeit aufweist. Monoterpensynthasen dagegen weisen einen deutlich größeren evolutionären Abstand zur AtGLS auf (siehe **Abbildung 5.2**). Die einzige Ausnahme bildet die LIS aus der Gattung *Clarkia*, die das Monoterpen Linalool bildet. Sie weist aber die größte Ähnlichkeit zur AtGLS auf. In *A. thaliana* dagegen gibt es nur zwei Diterpensynthasen, die eine hohe Ähnlichkeit zur AtGLS aufweisen. Das ist zum einen die Copalyldiphosphatsynthase (CPP) und die *ent*-Kauren-Synthase (KS). Beide Enzyme katalysieren Schritte in der Gibberillinbiosynthese und gehören damit zum Primärmetabolismus (AACH *et al.*, 1995; YAMAGUCHI *et al.*, 1998; SUN und KAMIYA, 1994).



Abbildung 5.2 Phylogenetischer Stammbaum abgeleitet aus dem Vergleich von 14 Terpensynthasen

AtGLS (At1g61120), LIS aus *Clarkia concinnia* (AF067602) und LIS aus *C. breweri* sowie ausgewählte Mono und Diterpensynthasen des primären und sekundären Stoffwechsels aus Angiospermen sind dargestellt. Alle Diterpensynthasen wurden in dieser Abbildung grün hinterlegt. AtGLS befindet sich in einer Gruppe mit Diterpensynthasen, die das 200 Aminosäure lange CDIS-Motiv besitzen. Die größte Ähnlichkeit besteht zu den LIS aus der Gattung *Clarkia*. Andere zur Analyse verwendete Gene sind: AtLIS (At1g611680), Myrcen/(E)-beta-Ocimen-Synthase (At3g25810), 1,8-Cineole-Synthase (At3g25820), Copalyldiphosphat (CPP)-Synthase (At4g02780) und die ent-Kauren (KS)-Synthase (At1g79460). Andere Mono und Diterpensynthase Gene kommen aus *Nicotiana tabacum, Rhizinus communis, Mentha citrata, Lycopersicon esculentum, Lactuca sativa* und *Oryza sativa*.

Die Sequenzanalyse wurde mit dem Programm ClustalX durchgeführt und mit Hilfe der *nearest neighbour-joining* Technik (FENG und DOOLITTLE, 1987; THOMPSON *et al.*, 1994) wurde der Stammbaum erstellt, der mit dem Programm Treeview dargestellt wurde. *Bootstrap* Werte, die höher als 600 aus 1000 Replikaten lagen, sind dargestellt.

Die Aminosäuresequenzen der LIS aus *C. breweri* (CbLIS) sowie die KS und die CPP sind mit der Sequenz der AtGLS in **Abbildung 5.3** verglichen. Es fällt auf, dass KS, CbLIS und AtGLS ein DDXXD-Motiv aufweisen, das indikativ für den in 5.2 beschriebenen Reaktionsmechanismus ist, der mit der Ionisierung des Substrates beginnt. Die CPP besitzt dieses Motiv nicht; sie weist dagegen ein DXDD-Motiv auf, das auf einen Reaktionsmechanismus, der mit der Protonierung des Substrates beginnt, hinweist. Andererseits akzeptiert die CPP genau wie die AtGLS das Substrat GGPP, während die KS nur Copalyldiphosphat als Substrat verwenden kann.

In AtGLS finden sich damit Eigenschaften kombiniert, die entweder in der KS oder der CPP präsent sind.



Abbildung 5.3 Sequenzvergleich der AtGLS mit anderen Terpensynthasen aus Arabidopsis und Clarkia breweri

Aminoäuresequenzvergleich der A. thaliana GLS (GLS, At1g61120) mit der Linalool Synthase aus C. breweri (LIS, U58314), der A. thaliana Copalyldiphosphat-Synthase (CPP, At4g02780) und der ent-Kauren-Synthase (KS, At1g79460). Ein schwarzer Hintergrund stellt identische Aminosäuren in mindestens drei der vier Sequenzen dar, ein grauer Hintergrund markiert Aminosäuren mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften. Eine kurze waagerechte Linie markiert die DXDD-Region, die charakteristisch für Terpensynthasen wie die CPP ist, die ihr Substrat zuerst protoniert. Eine weitere waagerechte Linie hebt das DDXXD-Motiv hervor, das von allen Terpensynthasen für einen Reaktionsmechanismus benötigt wird, in dem das Substrat zuerst ionisiert wird (siehe 5.2). Die gestrichelte Linie markiert ein ungefähr 200 Aminosäuren langes Motiv (CDIS), das charakteristisch für Terpensynthasen mit einer ursprünglichen Exon-Struktur ist.

In Abbildung 5.3 ist ein weiteres Motiv dargestellt, das ungefähr 200 Aminosäuren lang ist und sich am N-Terminus aller 4 Terpensynthasen befindet. Dabei handelt es sich um die von BOHLMANN et al., (1998a; 1998b) beschriebene CDIS- (conifer diterpene internal sequence) Region (siehe 1.4). Die CDIS-Region befindet sich in allen Terpensynthasen, die eine hohe Ähnlichkeit zur AtGLS aufweisen, während sie z. B. in den weniger ähnlichen Monoterpensynthasen aus A. thaliana (siehe Abbildung 5.2) abwesend ist. TRAPP und CROTEAU (2001) entwickelten nach dem Vergleich der Exon/Intron-Struktur aus verschiedenen Terpensynthasen die Hypothese, dass es einen ursprünglichen Terpensynthase-Vorläufer gab, der 15 Exons hatte und die CDIS-Region aufwies. Im Laufe der Evolution der Terpensynthasen ging bei vielen Genen die CDIS-Region verloren, und die Anzahl der Exons wurde immer stärker reduziert. Die meisten der bisher charakterisierten Terpensynthasen in rezenten Pflanzen weisen nur noch etwa 7 Exons auf. Die Organisation der Intron/Exon-Struktur in den evolutiv ursprünglichen Terpensynthasen (CPP, KS und LIS aus C. concinnia) sowie die Struktur der LIS aus A. thaliana ohne CDIS-Region und mit nur 7 Exons wurde in Abbildung 5.4 mit der Struktur der AtGLS verglichen. Es wird deutlich, dass die AtGLS mit ihrer CDIS-Region (siehe Abbildung 5.2) und 12 Exons zur Gruppe der evolutiv ursprünglichen Terpensynthasen gehört. Im Vergleich zum putativen TPS- Vorläufer und der CPP fehlen nur drei Exons am N-Terminus. Da sich am N-Terminus in den meisten Fällen das plastidäre Transitpeptid befindet und die CPP in den Plastiden lokalisiert ist (SUN et al., 1994), könnte es möglich sein, dass der Verlust dieser Exons in der AtGLS für das Verbleiben im Cytosol oder ER verantwortlich ist. Im Vergleich zur KS und zur CPP weisen AtGLS und die LIS aus C. concinnia ein verlängertes C-terminales Exon auf. Aus Abbildung 5.2 würde man schließen, dass die AtGLS und die LIS aus C. concinnia eine eigene Gruppe bilden, deren Ursprung direkt auf den TPS-Vorläufer zurückgeht, so dass KS und CPP mit der AtGLS keinen direkten gemeinsamen Vorfahren aufweisen. Dies wird unterstützt durch die geringe Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz von AtGLS zu KS und CPP. Allerdings ist die Anzahl der identischen Aminosäuren bei AtGLS und KS (25,6%) höher verglichen mit der Anzahl identischer Aminosäuren bei AtGLS und CPP (16,9%). Dies unterstützt ein Modell, das bei TRAPP und CROTEAU (2001) beschrieben wird. Die Hypothese dieses Autoren nimmt an, dass sich die AtGLS und KS aus einem direkten gemeinsamen Vorfahren entwickelt haben. CSEKE et al. (1998) schlugen vor, dass KS und AtGLS (früher als AtLIS beschrieben) komposite Gene sind, deren N-terminale Exons (1-10 bei KS bzw. 1-8 bei AtGLS) den jeweiligen CPP-Exons entsprechen, während die 4 C-terminalen Exons von einer TPS stammen, die ein DDXXD-Motiv besitzt und damit den entsprechenden Reaktionsmechanismus in die KS und AtGLS einbringt (s. o.). Dieses Modell findet Unterstützung in der Tatsache, dass die Anzahl der identischen Aminosäuren zwischen CPP und AtGLS beim Vergleich der 4 C-terminalen Exons (10,5%) geringer ist als beim Vergleich des gesamten Proteins (s. o.), während die Anzahl der identischen Aminosäuren zwischen AtGLS und KS unter diesen Bedingungen annähernd gleich ist. Dieser Hypothese folgend könnten AtGLS und KS einen gemeinsamen Vorgänger haben, der diese komposite Genstruktur aufwies. In wieweit die KS- und die AtGLS-Evolution miteinander in Verbindung steht, kann nicht abschließend geklärt werden, aber aufgrund der ursprünglichen Genarchitektur und des Vorhandenseins der CDIS-Region kann man davon ausgehen, dass die AtGLS und damit vermutlich auch die TMTT/GL-Synthese in der Evolutionsgeschichte sehr früh entstanden ist. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass evolutiv nicht sehr nah verwandte Pflanzen (Tomate, AMENT et al., 2006; Lima-Bohne, HOPKE et al., 1994; Mais, WILLIAMS et al., 2005) eine TMTT-Produktion aufweisen. Die Konservierung dieser Abwehr-Reaktion spricht für einen evolutiven Vorteil, den die TMTT/GL-Produktion für die Pflanze hat. Unterstützt wird diese Hypothese von dem Befund, dass sechs verschiedene A. thaliana Ökotypen in der Lage sind, AtGLS-Transkript nach Stimulation zu exprimieren (siehe 4.3.1). Es wäre interessant zu wissen, ob die GLS-Synthese in anderen Pflanzen auch von einem evolutiv ursprünglichen Gen katalysiert wird oder in einer zur AtGLS konvergenten Evolution aus einem Gen ohne CDIS und reduzierten Exons hervorgegangen ist. In dem in Abbildung 5.2 dargestellten phylogenetischen Stammbaum ist die Platzierung der LIS aus der Gattung Clarkia ungewöhnlich, da sie die einzige Monoterpensynthase aus Angiospermen darstellt, die die CDIS-Region besitzt und eine ursprüngliche Genarchitektur aufweist (siehe auch Abbildung 5.4). Ein Beitrag zum Verständnis dieses Phänomens liefert die Aufklärung der enzymatischen Aktivität der AtGLS von der vor dieser Arbeit angenommen wurde, dass sie ebenfalls für die Bildung von Linalool verantwortlich ist (CSEKE et al., 1998). Die AtGLS weist die höchste Ähnlichkeit zur LIS aus Clarkia bezüglich der Aminosäuresequenz auf, gleichzeitig wurde in dieser Arbeit die AtGLS als Diterpensynthase charakterisiert. Damit stellt die AtGLS formal ein Bindeglied

zwischen der LIS aus Clarkia und den Diterpensynthasen des Primärstoffwechsels dar. Bisher wurde zwar keine GLS in der Gattung Clarkia identifiziert, aber es wäre möglich, dass eine solche putative GLS und die LIS in Clarkia einen gemeinsamen Vorfahren haben, der wie die AtGLS eine ursprüngliche Genarchitektur und eine CDIS-Region aufwies. Eine andere Möglichkeit ist, dass in der Gattung Clarkia bzw. im entsprechenden Vorfahren ein Enzym vorhanden war, das eine GLS-Aktivität aufwies und das der AtGLS vermutlich sehr ähnlich war. Aus diesem putativen Vorläufer wurde durch Mutationen, die zur Verkleinerung der Substratbindetasche führten, eine Linalool-Synthase, die nur noch das kleinere Substrat GPP binden konnte (siehe Abbildung 5.4). Eine detaillierte Analyse der Unterschiede zwischen AtGLS und der LIS aus Clarkia könnte zu Aminosäuren führen, die für die Substratspezifität verantwortlich sind. Aus Abbildung 5.4 wird deutlich, dass die LIS aus Clarkia und die LIS aus A. thaliana eine andere Genarchitektur haben, dies äußert sich z. B. in der unterschiedlichen Anzahl der Exons, darüber hinaus fehlt der LIS aus A. thaliana im Gegensatz zur LIS aus Clarkia die CDIS-Region. Während die LIS aus Clarkia der AtGLS sehr ähnlich ist (s. o.), weist die LIS aus A. thaliana eine größere evolutive Distanz auf. Dies weist darauf hin, dass die beiden Linaloolsynthasen durch konvergente Evolution entstanden sind. Während die LIS aus Clarkia vermutlich direkt aus einer Diterpensynthase hervorgegangen ist (s. o.), entwickelte sich die LIS aus A. thaliana vermutlich erst später in der Stammesgeschichte aus einem Vorläufer, der bereits eine deutlich reduzierte Anzahl von Exons aufwies und keine CDIS-Region besaß.


Abbildung 5.4 Organisation der Intron/Exon-Struktur in evolutiv ursprünglichen Terpensynthasen (CPP, KS, AtGLS und LIS aus *C. concinnia*) im Gegensatz zur Intron/Exon-Struktur der LIS aus *A. thaliana* als Beispiel für eine evolutiv jüngere Terpensynthase (modifiziert nach TRAPP und CROTEAU, 2001).

Die Organisation der Intron/Exon-Struktur eines ursprünglichen Terpensynthase-Vorläufers der Gymnospermen und Angiospermen TPS ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Jede Box repräsentiert ein Exon, während die Introns durch eine graue Linie dargestellt sind. Die Farbgebung zeigt eine Homologie der jeweiligen Exons an, wie sie von TRAPP und CROTEAU vorgeschlagen wurde. Die Positionen, des konservierten DDXXD-Motivs und des DXDD-Motivs in der CPP sind dargestellt. Kodierung der Gene in *A. thaliana*: LIS (*At1g61180*), CPP (*At4g02780*), KS (*At1g79460*), GLS (*At1g61120*)

### 5.5 Regulation der TMTT-Synthese

TMTT wird von Pflanzen wie z. B. Lima-Bohne, Tomate und A. *thaliana* u. a. nach Befall mit einem Herbivoren emittiert (HOPKE *et al.*, 1994; AMENT *et al.*, 2004; VAN POECKE *et al.*, 2001). Die Regulation der Volatilen-Emission kann auf verschiedenen Ebenen wie z. B. der Verfügbarkeit von Substrat, der Aktivierung von Enzymen, der Induktion der Transkription von Biosynthesegenen, oder der Stabilisierung von Transkripten für Enzyme stattfinden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die wichtigste Regulation auf der Ebene der *AtGLS*-Transkription stattfindet. Die ektopische Expression von *AtGLS*-Transkript war ausreichend für die Produktion von GL und TMTT (siehe 4.1.4). Außerdem führten alle Bedingungen, die zur TMTT Synthese führten, auch zur Expression der *AtGLS*. Deshalb ist anzunehmen, dass es keinen weiteren Schritt gibt, der sich in Wildtyp Pflanzen limitierend auf die TMTTbzw. GL-Synthese auswirkt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass für die effiziente Umsetzung von GL zu TMTT ein funktionales COII-Protein benötigt wird (siehe 4.2.7). Entweder ein Enzym, das diesen Schritt katalysiert, ist konstitutiv exprimiert, braucht dafür aber das Protein COI1, oder dieses Enzym kann durch GL bzw. TMTT in Abhängigkeit von COI1 induziert werden. Parallel zu diesem Enzym scheint es ebenfalls eine enzymatische Aktivität in *A. thaliana* zu geben, die in der Lage ist, Nerolidol zu dem Homoterpen DMNT umsetzen, da die Expression einer Nerolidolsynthase aus Erdbeeren in *Arabidopsis* Mitochondrien zu einer Emission von DMNT führt (KAPPERS *et al.*, 2005). Ob die Bildung von TMTT aus GL und die Umsetzung von Nerolidol in DMNT von dem selben Enzym katalysiert wird, ist bisher noch nicht ermittelt worden.

Die Akkumulation des *AtGLS*-Transkriptes erfolgt vermutlich hauptsächlich durch die Aktivierung des *AtGLS*-Promotors, da der Promotor in der Lage ist, durch Fusion mit einem Reportergen die Expression des Reportertranskriptes durch die gleichen Reize zu induzieren, die auch die *AtGLS*-Transkriptexpression auslösen (siehe 4.2.7). Allerdings wurde in dieser Arbeit auch ein Experiment beschrieben, das zeigt, dass es zumindest in *AtGLS*-Überexpressionslinien zu einem posttranskriptionellen Abbau des *AtGLS*-Transkriptes kommt (siehe 4.2.8). Dieser Effekt scheint abhängig vom Vorhandensein eines Elicitors zu sein und ist vermutlich für das *AtGLS*-Transkript spezifisch, da er z. B. nicht bei konstitutiv exprimiertem *GUS*-Transkript beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu diesem Befund wurde eine Cycloheximid vermittelte Transkript-Stabilisierung bei Auxin-induzierten Genen beschrieben (KOSHIBA *et al.*, 1995).

Neben der induzierten *AtGLS*-Expression wurde auch eine konstitutive Aktivität des *AtGLS*-Promotors in der Narbe, den Staubblättern und Kelchblättern beobachtet sowie an der Spitze und Basis der Schoten (siehe 4.2.7). Das Expressionsmuster in den Blüten entspricht dem einer in *A. thaliana* charakterisierten Caryophyllen-Synthase sowie einer Linalool-Synthase. Beide sind exklusiv in Blüten exprimiert zeigen aber keine Induzierbarkeit durch Verwundung (CHEN *et al.*, 2003b; THOLL *et al.*, 2005). Es gibt eine Korrelation zwischen MeJA-induzierten Genen und Genen, die in den Kelchblättern exprimiert sind (www.genevestigator.ethz.ch/at; ZIMMERMANN *et al.*, 2004). Dies führt zu der Annahme, dass die *AtGLS*-Expression auf die konstitutive

Aktivität der JA-Signalkaskade in diesen Blütenorganen zurück zu führen ist. JAinduzierte Gene werden für die männliche Fertilität benötigt (MANDAOKAR *et al.*, 2003), was gut mit der Expression der *AtGLS* in den Staubblättern übereinstimmt.

Die Aufhebung der Induzierbarkeit durch Fusion der kodierenden AtGLS-Region mit dem konstitutiven Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor hat einen deutlich negativen Einfluss auf die Fitness der Pflanzen. Sie bleiben kleiner und zeigen Läsionen auf den ersten Keimblättern (siehe 4.1.5). Unter optimalen Wachstumsbedingungen ist dieser Phänotyp in einem späteren Entwicklungsstadium nicht mehr deutlich erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Bildung der Läsionen ist vermutlich nicht allein durch den Verbrauch von Ressourcen durch Emission von fixiertem Kohlenstoff zu erklären, da er sich auch dann zeigt, wenn die Pflanzen durch Zugabe von Sucrose zusätzlich versorgt werden (Daten nicht gezeigt). Eventuell führt die konstitutive Expression zu einer Verminderung der GGPP-Mengen im Cytosol bzw. ER, wodurch andere essentielle Prozesse wie z. B. Proteinfarnesylierung behindert werden, die dann zu dem beobachteten Phänotyp führen. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die Überexpression einer plastidären Diterpensynthase (Taxadien-Synthase) zu einer ausgebleicht wirkenden Pflanze führt. Dieser Phänotyp begründet sich vermutlich in der Abnahme der Substrate für die Chlorophyllbiosynthese (BESUMBES et al., 2004). Der Unterschied zwischen dem Läsionsphänotyp der AtGLS-Pflanzen und dem verminderten Chlorophyllgehalt in den plastidären Taxadiensynthase-Überexprimierern ist ein weiteres Indiz dafür, dass die AtGLS nicht in den Plastiden lokalisiert ist (siehe 5.2 und 4.1.6). Eine weitere Möglichkeit für die Ursache des Phänotyps ist, dass das produzierte Terpen ein Signal für die Pflanze darstellt, das zu Reaktionen führt, die in dem beobachteten Phänotyp resultieren. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt dass die Behandlung von Lima-Bohnen mit TMTT zu einer Expression von Abwehrgenen führt (ARIMURA et al., 2000). Allerdings verläuft die putative Signaltransduktion von GL/TMTT zu Genen, die für die Läsionen verantwortlich sind, nicht über COI1, da der Läsionsphänotyp unabhängig von COI1 ist (siehe 4.1.5). Außerdem würde durch dieses Ergebnis GL mehr als Signal für die Läsionen in Frage kommen, da TMTT kaum von 35S::AtGLS coil Pflanzen gebildet wird (siehe 4.2.9).

Die *AtGLS*-Transkription und die Emission von TMTT beruhen auf dem Vorhandensein des Phytohormons JA und dem F-Box Protein COI1, das einen zentralen Faktor in der JA-Signalkaskade darstellt (siehe 4.2.1). Erwartungsgemäß lässt sich die *AtGLS*- Transkription und die Emission von GL/TMTT mit dem Coronatin-Derivat Coronalon induzieren (siehe 4.1.2), das in der Lage ist viele durch Oxylipine (zu denen auch JA gehört) regulierte Gene zu induzieren (SCHULER *et al.*, 2004). Darüber hinaus kann durch Auswertung von öffentlichen Datenbanken (www.genevestigator.thz.ch/at; ZIMMERMANN *et al.*, 2004) festgestellt werden, dass Stressbedingungen, die zum Anstieg der JA-Mengen führen, wie die Behandlung mit *Alternaria brassicicola*, *Botrytis cinera* (THOMMA *et al.*, 1998; VIJAYAN *et al.*, 1998; PENNINCKX *et al.*, 1996) und Ozon (RAO *et al.*, 2000), ebenfalls die Transkription der *AtGLS* induzieren (VAN WEES *et al.*, 2003b; ZIMMERMANN *et al.*, 2004).

Viele JA-induzierte Gene werden auch durch Verwundung exprimiert (PARK *et al.*, 2002, TAKI *et al.*, 2005). Für den *AtGLS*-Promotor konnte ebenfalls eine Induktion durch Verwundung nachgewiesen werden (siehe 4.2.7), es war jedoch nicht möglich TMTT oder GL im Volatilenprofil von verwundeten *A. thaliana* Pflanzen zu zeigen (THOLL, unveröffentlicht).

Möglicherweise ist eine kontinuierliche Verwundung, wie sie von Herbivoren verursacht wird (MITHOFER et al., 2005), notwendig, um genug AtGLS-Transkript zu akkumulieren, so dass genug Enzym für eine messbare TMTT/GL-Produktion synthetisiert wird. Für den Nachweis der AtGLS-Promotoraktivität mit Hilfe der GUS-Enzymaktivität reicht evtl. aufgrund der höheren Stabilität des GUS-Proteins bzw. der GUS-mRNA bereits ein einzelnes Wundsignal aus. Bemerkenswert ist, dass die Induktion des AtGLS-Transkriptes durch Verwundung unabhängig vom COII-Protein ist (siehe 4.2.7). Geht man davon aus, dass die durch Herbivoren ausgelöste, genau wie die Alamethicin vermittelte, AtGLS-Expression COII-abhängig ist (siehe 4.2.1), dann wäre es möglich zwischen dem COI1-unabhängigen Verwundungssignal und dem durch einen Herbivoren verursachten COI1-abhängigen Signal zu unterscheiden. Viele Verwundungs-induzierte Gene sind COI1-unabhängig (REYMOND et al., 2000; TITARENKO et al., 1997) und für das Gen JR3 wurde spekuliert, dass es über einen Verwundungs-Vermittelten, JA-abhängigen und einen JA-unabhängigen Induktionsmechanismus reguliert wird (ROJO et al., 1998).

Viele JA-abhängige Reaktionen in Pflanzen werden durch andere Phytohormone wie Ethylen und SA beeinflusst (PENNINCKX *et al.*, 1998; SPOEL *et al.*, 2003). Damit gewinnt die Pflanze die Möglichkeit, verschiedene Reize bzw. Stressbedingungen zu integrieren und eine darauf angepasste Abwehrreaktion einzuleiten. Vermutlich erlauben bei der indirekten Abwehr solche Mechanismen einem Insekten-Interaktionspartner detailliertere Informationen über den Zustand der Pflanze zu erhalten. In 4.2.3 wurde deshalb versucht, den Einfluss von SA und Ethylen auf die Expression der AtGLS und die TMTT-Emission zu ermitteln. Dabei wurde festgestellt, dass es einen leicht negativen Einfluss von SA gibt, da Genotypen, die SA nicht mehr akkumulieren können, eine etwas effektivere Induktion des AtGLS-Transkriptes aufwiesen. Dieser Effekt ist allerdings schwach, so dass er auf der Ebene der TMTT/GL-Emission nicht mehr sichtbar ist. Dass dieser Effekt nur sehr schwach ausgeprägt ist, spiegelt sich auch in der Tatsache wieder, dass Alamethicin als effizienter Elicitor der AtGLS-Expression auch die Synthese von SA (SCHULZE, 2005) und MeSA (siehe 4.1.1) induziert. Im Gegensatz zu Tomate und Lima-Bohne (AMENT et al., 2006; KOCH et al., 1999) ist die GL- und TMTT-Emission in A. thaliana also weitgehend unabhängig von SA. Tomaten, die kein SA akkumulieren können, sind auch nicht in der Lage, TMTT zu emittieren, allerdings ist SA allein nicht ausreichend für die Induktion der TMTT-Synthese (AMENT et al., 2006). In der Lima- Bohne wird durch SA die Synthese von JA zugunsten von OPDA gehemmt. Da OPDA im Vergleich zu JA der bessere Induktor der TMTT-Synthese ist, wird durch SA indirekt die TMTT-Synthese gefördert (KOCH et al., 1999). Keiner dieser Mechanismen scheint in A. thaliana eine wichtige Rolle bei der Induktion der TMTT-Emission zu spielen und auch die Bedeutung von OPDA für die TMTT-Synthese ist in A. thaliana vermutlich deutlich geringer, da die OPDA-Mengen im Gegensatz zu den JA-Mengen in Arabidopsis nach Behandlung mit Alamethicin nicht ansteigen (SCHULZE, 2005). Da die opr3-Mutante, die noch OPDA besitzt aber kein JA, keine Expression von AtGLS nach Behandlung mit Alamethicin aufweist (siehe 4.2.1) kann man schließen, dass OPDA allein nicht in der Lage ist, die AtGLS-Transkription zu induzieren. Die Ethylen-Signalkaskade hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die AtGLS-Expression und die TMTT-Emission (siehe 4.2.3). Zusammenfassend kann man sagen, dass Mechanismen zur Modulation der TMTT/GL-Emission, die in Pflanzen wie Lima-Bohne und Tomate vorgefunden wurden, keine Wirkung in A. thaliana entfalten. In Bezug auf viele andere Abwehrreaktionen sind in A. thaliana allerdings Wechselwirkungen zwischen den Signalkaskaden beschrieben worden. Die Vielfalt der Wechselwirkungen wird z. B. deutlich, wenn man das Transkriptom nach Infektion von A. thaliana in Genotypen mit Defekten in der SA-, JA- und Ethylen-Signalkaskade mit Pseudomonas syringae

*macilicola* betrachtet (GLAZEBROOK *et al.*, 2003). Durch die Infektion werden etwa 1203 Gene induziert zu denen auch das *AtGLS*-Gen gehört. Davon lassen sich 1007 Gene in 9 Gruppen gemäß ihrer Abhängigkeit von Elementen der SA-, JA- und Ethylen-Signalkaskade einordnen (GLAZEBROOK, unveröffentlicht). In Übereinstimmung mit den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten ist die Expression des *AtGLS*-Transkriptes abhängig von COI1 aber unabhängig von der SA- und Ethylen-Signalkaskade. Dies trifft für 136 weitere Gene zu (GLAZEBROOK, unveröffentlicht), was erstaunlich ist, da gezeigt werden konnte, dass die JA-Synthese in *A. thaliana* Pflanzen durch die von *P. syringae* induzierten SA-Mengen reprimiert wird (SPOEL *et al.*, 2003). Zumindest für die Transkription der *AtGLS* wird JA benötigt (siehe 4.2.1), vermutlich ist in diesem Fall das von *P. syringae* produzierte Coronatin, das ein Elicitor der JA-Signalkaskade

für die Transkription der *AtGLS* wird JA benötigt (siehe 4.2.1), vermutlich ist in diesem Fall das von *P. syringae* produzierte Coronatin, das ein Elicitor der JA-Signalkaskade ist (WEILER *et al.*, 1994; UPPALAPATI *et al.*, 2005), in der Lage JA zu ersetzen. Diese Theorie könnte durch Verwendung eines Coronatin-defizienten *P. syringae* Stammes (BROOKS *et al.*, 2004) getestet werden. Auch wenn kein modulierender Faktor für die *AtGLS*-Expression identifiziert werden konnte, ist nicht ausgeschlossen, dass es noch unbekannte Faktoren gibt, die die *AtGLS* -Expression beeinflussen. Ein Hinweis darauf könnte die fehlende Expression in den *cet*-Mutanten sein (NIBBE *et al.*, 2002; HILPERT *et al.*, 2001), die konstitutiv das JA induzierte Gen *THI2.1* exprimieren und erhöhte JA-Mengen aufweisen (siehe 4.2.2). Andererseits spiegelt ein einfacher Induktionsmechanismus, der keine weiteren Signale integrieren kann, möglicherweise die Tatsache wieder, dass es sich bei der hier charakterisierten *AtGLS* um ein evolutiv sehr ursprüngliches Gen handelt (siehe 5.4).

### 5.6 Elemente der Signalkaskade die zur *AtGLS*-Expression führen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle Regulatoren der *AtGLS*-Transkription bereits präformiert in der Zelle vorliegen und nicht mehr neu synthetisiert werden müssen. Ferner konnte der Proteinbiosyntheseinhibitor Cycloheximid als effizienter Induktor der *AtGLS*-Transkription identifiziert werden (siehe 4.2.6). Dies ist in Übereinstimmung mit der Detektion des *AtGLS*-Transkriptes kurze Zeit (1,5 h) nach Beginn der Behandlung mit Alamethicin (siehe 4.2.5). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass das F-Box-Protein COI1 notwendig für die Induktion der *AtGLS*-Transkription ist (4.2.1). Die Funktion von COI1 besteht vermutlich darin, negative Regulatoren zu erkennen und der Proteasomen-vermittelten Degradation zuzuführen

(siehe 1.6). Viele Auxin-induzierte Gene lassen sich ebenfalls durch Cycloheximid induzieren (ABEL und THEOLOGIS, 1996). Der Mechanismus der Auxin-Wirkung ist im Vergleich zur JA-Signalkaskade gut charakterisiert worden (siehe 1.6). Es bestehen zwischen diesen beiden Signalkaskaden deutliche Parallelen; zum einen die Beteiligung von Proteindegradation an der Signalkaskade. Zum anderen die Tatsache, dass sowohl in der Auxin-Kaskade als auch in der JA-Kaskade F-Box-Proteine (COI1, JA-Signalkaskade; TIR1, Auxin-Signalkaskade) beteiligt sind, die vermutlich in der Signalkaskade eine ähnliche Funktionen erfüllen (siehe 1.6). Der Effekt von Cycloheximid wird in der Auxin-Signalkaskade dadurch erklärt, dass die Inhibition der Proteinbiosynhese die Neusynthese eines negativen Regulators behindert. Durch die Instabilität des Regulators und der Inhibition seiner Neusynthese sinkt dessen Menge, so dass die Repression des Regulators aufgehoben wird und es zur Transkription der Zielgene kommt (KOSHIBA et al., 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Instabilität des negativen Regulators, der die Expression der AtGLS reprimiert, von einem funktionalen COII-Protein abhängt. Dies wird dadurch möglich, dass COII den Regulator auch ohne eine Aktivierung der Signalkaskaskade zum Proteasom transferiert, wo der Regulator degradiert wird. Dieser Prozess ist ineffizient und führt nicht zu einer Abnahme des Regulators, sofern dieser ständig neu synthetisiert wird. Im Falle der Aktivierung der Signalkaskade könnte der negative Regulator z. B. durch eine Phosphorylierung derart modifiziert werden, dass die Erkennung durch COI1 oder der Transfer zum Proteasom sehr effizient erfolgt. Die Neusynthese des Regulators liefert der Pflanze jetzt weniger Protein, als durch die Degradation abgebaut wird. Daraus folgt, dass die Menge des negativen Regulators abnimmt und die Transkription des Zielgens erfolgen kann. In der Cycloheximid behandelten coil-Mutante ist die Neusynthese des Regulators zwar inhibiert, aber der COI1-vermittelte Transfer zum Proteasom ist nicht mehr möglich und somit nimmt die Menge des Repressors nicht ab und die Transkription der AtGLS findet nicht statt (siehe Abbildung 5.5). In einem weiteren Schritt wurde festgestellt, dass die Anwesenheit eines Oxylipins (vermutlich JA) ebenfalls notwendig für die Wirkung von Cycloheximid auf die AtGLS-Transkription ist (siehe 4.2.6). Dies kann dadurch erklärt werden, dass JA benötigt wird, um den Komplex zwischen dem putativen Regulator und COI1 zu stabilisieren (siehe Abbildung 5.5).



Abbildung 5.5 Modell, dass den Effekt von COI1 und JA auf die Induktion des *AtGLS*-Transkriptes erklärt

Ein Protein, dass einen negativen Effekt auf die *AtGLS*-Expression ausübt (R), weist eine COIIvermittelte Degradation auch unter Bedingungen auf, unter denen die JA-Signalkaskade nicht induziert ist. Permanente Proteinbiosynthese erneuert ständig die Menge des negativen Regulators (R). Durch die Aktivierung der JA-Signalkaskade wird die COII-abhängige Degradation beschleunigt. Die Inhibition der Proteinbiosynthese führt zu reduzierter Akkumulation von R und somit zu *AtGLS*-Expression. Der Komplex zwischen COII und R ist nur in Anwesenheit eines Oxylipins (O) stabil.

Diese Vermutung wird durch die Feststellung, dass analog zum oben beschriebenen Modell Auxin benötigt wird, um einen Komplex des F-BOX Proteins TIR1 mit einem negativen Regulator zu stabilisieren, unterstützt. Tatsächlich ist TIR1 der Rezeptor für Auxin, und nur in der Anwesenheit von Auxin bildet sich ein Komplex zwischen TIR und dem negativen Regulator, der daraufhin abgebaut wird (DHARMASIRI *et al.*, 2005; KEPINSKI und LEYSER, 2005). Ob ein ähnlicher Mechanismus auch in der JA-Signalkaskade von Bedeutung ist, konnte bisher noch nicht ermittelt werden. Die JA-Biosynthese ist vermutlich konstitutiv aktiv und kann durch äußere Reize stimuliert werden (FARMER und RYAN, 1992), es ist somit also möglich, dass auch im nichtinduzierten Zustand ein Oxylipin in der Pflanze vorhanden ist, dass den Abbau eines negativen Regulators ermöglicht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Cycloheximid ähnlich wie Alamethicin zur Synthese eines Oxylipins führt, das dann abhängig von COI1 seine Wirkung entfaltet. Dagegen spricht jedoch der Befund, dass nur 4 Transkriptionsfaktoren aus 1200 durch Cycloheximid COI1-abhängig induziert werden, obwohl viele der Transkriptionsfaktoren durch Cycloheximid im Wildtyp induziert werden können (GÄRTNER, unveröffentlicht). Sollte Cycloheximid diese Wirkung haben, dann wäre das induzierte Oxylipin nur für die Induktion einer sehr kleinen Gruppe von Genen verantwortlich. Geht man davon aus, dass die identifizierten Transkriptionsfaktoren nicht die gesamte JA-Signalkaskade repräsentieren, kann man vermuten, dass der putative negative Regulator für die *AtGLS*-Regulation Eigenschaften hat, die ihn von anderen Regulatoren, die für einen Großteil der JA-Signalkaskade verantwortlich sind, unterscheiden. Das Gen *JR3* weist in seinem Expressionsmuster Parallelen zur *AtGLS* auf. Es ist durch Cycloheximid, JA und Verwundung (siehe 5.5) induzierbar, allerdings fehlt die Induktion durch Cycloheximid in der *coi1*-Mutante (ROJO *et al.*, 1998). Dieses Gen wurde später als Auxin-Konjugat-Hydrolase beschrieben (DAVIES *et al.*, 1999).

Durch einen Screen nach Mutanten mit einer konstitutiven *AtGLS*-Expression sollte u. a. eine Mutante identifiziert werden, die einen Defekt in dem zuvor erläuterten negativen Regulator aufweist. Es konnten zwei Linien identifiziert werden, die eine erhöhte Expression der *AtGLS* gegenüber einer nicht mutagenisierten Kontrollpflanze aufwiesen. Allerdings ist die Expression geringer als in Pflanzen, die mit Alamethicin behandelt wurden (siehe 4.3.3). Da beide Linien aus einer EMS-mutagenisierten Population stammen, wäre es möglich, dass sie nur einen partiellen Verlust des negativen Regulators und deshalb auch nur eine verminderte Expression aufweisen. Möglicherweise führt der komplette Funktionsverlust des negativen Regulators zu einer massiven Transkription von Abwehrgenen, die das Überleben einer solchen Pflanze stark erschwert. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine Pflanze aus einer Neutronen-mutagenisierten Population mit einer konstitutiven Aktivierung des *AtGLS*-Promotors gefunden wurde, die ein extrem langsames Wachstum zeigte, steril war und eine intensive Rotfärbung aufwies (siehe 4.3.3).

Der nächste Schritt in der Analyse der erhaltenen Mutanten besteht in der Kreuzung in den *coil*-Hintergrund, um festzustellen, ob die Mutation unterhalb von COI1 wirksam sein kann und das mutierte Protein damit einen Kandidaten für einen mit COI1 interagierenden negativen Regulator darstellt.

Eine weitere Strategie, den Reaktionsmechanismus der *AtGLS*-Transkription aufzuklären, hatte zum Ziel, Proteine zu finden, die an den *AtGLS*-Promotor binden. Dafür war es zuerst einmal notwendig mit Hilfe verschiedener Derivate des *AtGLS*-

Promotors eine Region zu finden, die für die Regulation der Transkription maßgeblich ist. Es konnte eine Region von 62 Bp identifiziert werden, die als einzige Region für die Cycloheximid vermittelte Genexpression notwendig war. In dieser Region befinden sich zwei Motive von 11 Bp, die identisch sind. Außerdem wurde in einem EMSA gezeigt, dass Proteine an das 62-Bp-Fragment binden. Mit Hilfe einer Datenbank (http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/cite.jsp; DAVULURI al.. 2003; et PALANISWAMY et al., 2006) konnte ein Element (CACATG) in dieser Region (nicht innerhalb des 11 Bp Motivs) gefunden werden, das notwendig für die Aktivierung eines Trockenstress- und Abscisinsäure induzierten Promotors ist (ABE et al., 1997). Da die AtGLS-Transkription durch Verwundung COI1-unabhängig induziert ist und viele Verwundungsinduzierte Gene unabhängig von COI1 gleichzeitig durch Trockenstress induziert werden können (REYMOND et al., 2000) ist dieses Element möglicherweise ein Kandidat für die Aktivierung des Promotors durch Verwundung. Weitere Analysen werden zeigen, ob die COI1-unabhängige Verwundungs-vermittelte Promotoraktivierung durch das gleiche *cis*-Element erfolgt, wie die COI1-abhängige Aktivierung durch Cycloheximid und Alamethicin. Im Promotor von VSP1 wurde eine Region identifiziert, die für die Induktion mit JA notwendig und ausreichend ist (GUERINEAU et al., 2003). In dieser Region findet sich ein Element (ATTTAG), das auch in den zwei 11 Bp-Elementen des AtGLS-Promotors vorkommt. GUERINEAU et al. (2003), vermuten das für die JA-Induktion maßgebliche cis-Element allerdings an einer anderen Position in dieser Region. KIM et al. (1992) charakterisierten ein notwendiges Motiv (CAAT) in einem JA-induzierten Promotor, ein solches Element befindet sich auch im AtGLS-Promotor, allerdings ist es im Konstrukt ABD:: GUS, das zu einer Cycloheximid-vermittelten GUS-Transkription führt (siehe 4.4), nicht mehr enthalten.

Es wurden ähnliche Studien mit anderen Oxylipin induzierten Genen durchgeführt (ROUSTER *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 1992; HE und GAN, 2001; MENKE *et al.*, 1999; VAN DER FITS und MEMELINK, 2001), die dabei entdeckten Motive, wie z. B. das *JERE (jasmonate and elicitor responsive element)*-Element (MENKE *et al.*, 1999) sind nicht in der für die *AtGLS*-Expression notwendigen Promotor-Region enthalten. Es ist also gut möglich, dass die identifizierte Region für das Auffinden von neuen DNA-bindenden Proteinen geeignet ist.

### 6 Zusammenfassung

Die meisten Pflanzen emittieren nach Befall mit Herbivoren das volatile Terpen (E,E)-4,8,12-Trimethyltrideca-1,3,7,11-Tetraen (TMTT). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das im Arabidopsis thaliana Genom annotierte Gen At1g61120 für eine Geranyllinalool-Synthase (GLS) kodiert, deren Produkt (E,E)-Geranyllinalool, zu TMTT umgesetzt wird. Damit wurde zum ersten Mal ein Enzym beschrieben, das für die Synthese dieses von vielen Pflanzen emittierten Terpens verantwortlich ist. Das AtGLS-Gen besitzt die Exon/Intron-Struktur von "ursprünglichen" Diterpensynthasen, die bereits in einem gemeinsamen Vorläufer der Gymnospermen und Angiospermen vorkamen, was auf eine frühe Evolution der TMTT-Bildung hinweist. Die Annotierung des AtGLS-Gens als Diterpensynthase macht die ungewöhnliche Platzierung der Linalool-Synthase (LIS) aus Clarkia breweri im Terpensynthase-Stammbaum besser verständlich: Es kann nun spekuliert werden, dass CbLIS, eine Monoterpensynthase mit der Genstruktur einer "ursprünglichen" Diterpensynthase, aus einer GLS durch die Verkleinerung der Substratbindetasche hervorgegangen ist.

AtGLS ist im Gegensatz zu vielen Diterpensynthasen nicht in den Chloroplasten lokalisiert sondern verbleibt entweder im Cytosol oder im endoplasmatischen Retikulum. Insertionslinien ohne Expression von *AtGLS* synthetisieren weder TMTT noch GL, während transgene Pflanzen mit ektopischer Expression von *AtGLS* TMTT und GL sogar ohne Behandlung mit einem Induktor emittieren. Die Expression von *AtGLS* ist somit für die TMTT/GL-Synthese in *A. thaliana* sowohl notwendig als auch hinreichend. Die konstitutive Expression der *AtGLS* führt zu verlangsamtem Wachstum und Läsionen auf den ersten Keimblättern. Pflanzen mit veränderter *AtGLS*-Expression können nun genutzt werden, den Beitrag von TMTT an der Pflanzen-Pflanzen- sowie der Pflanzen-Insektenkommunikation zu ermitteln.

Die Regulation der TMTT/GL-Synthese findet hauptsächlich auf der Ebene der *AtGLS*-Expression statt. Während das Gen in der Blüte konstitutiv aktiv ist, wird es in Blättern nur unter induzierenden Bedingungen, wie Behandlung mit dem pilzlichen Elicitor Alamethicin oder Infektion mit Larven von *Plutella xylostella* transkribiert. Die Alamethicin-induzierte *AtGLS*-Transkription benötigt das

#### 6 Zusammenfassung

Phytohormon Jasmonsäure, sowie das F-Box Protein COI1, das bislang noch nicht charakterisierte negative Regulatoren der Jasmonsäure-Signalkaskade dem Proteasom zuleitet. Salizylsäure und die Ethylen-Signalkaskaden haben keinen Einfluss auf die Induktion. Der Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid induziert die *AtGLS*-Transkription ebenfalls nur in Gegenwart von JA und COI1, was auf die Existenz eines oder mehrerer instabiler negativer Regulatoren hindeutet, die in Gegenwart von Cycloheximid nicht mehr synthetisiert werden und durch das COI1-Protein in Anwesenheit von Jasmonsäure abgebaut werden.

Aufgrund dieser Modellvorstellung wurden in einem Mutantenscreen Pflanzen selektiert, die einen Defekt in dem postulierten Repressor aufweisen. Dazu wurde ein Resistenzgen gegen das Herbizid Basta<sup>TM</sup> unter die Kontrolle des *AtGLS*-Promotors gebracht und nach einer Mutagenese nach resistenten Pflanzen gescreent. Es wurden 2 Mutanten identifiziert, die das endogene *AtGLS*- und das transgene *AtGLS::PAT*-Transkript konstitutiv akkumulieren. Durch eine Promotordeletionsmutagenese konnte weiterhin eine Region von 62 Bp im *AtGLS*-Promotor identifiziert werden, die als einzige Region für die Cycloheximid-vermittelte Induktion notwendig ist.

### 7 Literaturverzeichnis

#### Aach, H., Böse G. and Graebe, J.E. (1995)

ent-Kaurene biosynthesis in a cell-free system from wheat (Triticum aestivum L.) seedlings and the localisation of ent-kaurene synthetase in plastids of three species. Planta 197, 333-342

### Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D. and Shinozaki, K. (1997).

Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. Plant Cell 9: 1859-1868

Abel, S. and Theologis, A. (1996).

Early genes and auxin action. Plant Physiol 111: 9-17.

### Abel, S., Nguyen, M.D. and Theologis, A. (1995a).

The PS-IAA4/5-like family of early auxin-inducible mRNAs in Arabidopsis thaliana. J Mol Biol 251, 533-549.

### Abel, S., Nguyen, M.D., Chow, W. and Theologis, A. (1995b).

ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1carboxylate synthase in Arabidopsis thaliana. Structural characterization, expression in Escherichia coli, and expression characteristics in response to auxin [corrected]. J Biol Chem 270, 19093-19099.

### Abel, S., Oeller, P.W. and Theologis, A. (1994).

Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 91, 326-330.

Aharoni, A., Giri, A.P., Verstappen, F.W., Bertea, C.M., Sevenier, R., Sun, Z.,
Jongsma, M.A., Schwab, W., and Bouwmeester, H.J. (2004).
Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry
species. Plant Cell 16, 3110-3131.

Alberts,B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Robert, K., und Walter P. (2002). Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science

Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S. and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. Science 284, 2148-2152.

Ament, K., Kant, M.R., Sabelis, M.W., Haring, M.A., and Schuurink, R.C. (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. Plant Physiol 135, 2025-2037.

# Ament, K., Van Schie, C.C., Bouwmeester, H.J., Haring, M.A., and Schuurink, R.C. (2006).

Induction of a leaf specific geranylgeranyl pyrophosphate synthase and emission of (E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraene in tomato are dependent on both jasmonic acid and salicylic acid signaling pathways. Planta 224, 1197-1208.

Arimura, G., Ozawa R., Shimoda T., Nishioka T., Boland W. and Takabayashi J. (2000).

Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. Nature 406, 512-515.

### Aubourg, S., Lecharny, A., and Bohlmann, J. (2002).

Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. Mol Genet Genomics 267, 730-745.

### Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebl, M., Harper, J.W. and Elledge, S.J. (1996).

SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. Cell 86, 263-274.

### Baldwin, I.T., and Preston, C.A. (1999).

The eco-physiologicl complexity of plant responses to insect herbivores. Planta 208, 137-145.

# Baldwin, I.T., Zhang, Z.P., Diab, N., Ohnmeiss, T.E., McCloud, E.S., Lynds, G.Y. Schmelz, E.A. (1997).

Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in Nicotiana sylvestris. Planta 201, 397-404

Beckers, G.J.M. and Spoel S.H. (2005)

Fine-Tuning Plant Defence Signalling: Salicylate versus Jasmonate. Plant Biol 8, 1-10

### Benedetti, C.E., Xie, D. and Turner, J.G. (1995).

Coil-dependent expression of an Arabidopsis vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. Plant Physiol 109, 567-572.

### Berger, S., Bell, E. and Mullet, J.E. (1996).

Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of AtVsp in Response to Methyl Jasmonate and Wounding. Plant Physiol 111, 525-531.

### Bernard, P., and Couturier, M. (1992).

Cell killing by the F plasmid ccdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complex. J Mol Biol 226, 735-745.

### Besumbes, O., Sauret-Gueto, S., Phillips, M.A., Imperial, S., Rodriguez-Concepcion, M., and Boronat, A. (2004).

Metabolic engineering of isoprenoid biosynthesis in Arabidopsis for the production of taxadiene, the first committed precursor of Taxol. Biotechnol Bioeng 88, 168-175.

Blechert, S., Brodschelm, W., Holder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.Q. and Zenk, M.H. (1995).

The octadecanoic pathway: signal molecules for the regulation of secondary pathways. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 4099-4105.

```
Block, M.D., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V.,
Movva, N.R., Thompson, C., Montagu, M.V. and Leemans, J. (1987).
```

Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. Embo J 6, 2513-2518.

#### Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C. and Apel,

**K.** (1998c). Wounding and chemicals induce expression of the Arabidopsis thaliana gene Thi2.1, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. FEBS Lett 437, 281-286.

### Bohlmann, J., Crock, J., Jetter, R., and Croteau, R. (1998a).

Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (E)-alpha-bisabolene synthase from grand fir (Abies grandis). Proc Natl Acad Sci U S A 95, 6756-6761.

#### Bohlmann, J., Martin, D., Oldham, N.J., and Gershenzon, J. (2000).

Terpenoid secondary metabolism in Arabidopsis thaliana: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)-beta-ocimene synthase. Arch Biochem Biophys 375, 261-269.

### Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G., and Croteau, R. (1998b).

Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 4126-4133.

### Boland, W., Gäbler, A., Gilbert, M., and Feng, Z. (1998).

Biosynthesis of C11 and C16 homoterpenes in higher plants: stereochemistry of the C-C-bond cleavage reaction. Tetrahedron 54, 14725-14736.

#### Boland, W., Ney, P., Jaenicke, L., and Gassmann, G. (1984).

A 'closed-loop-stripping' technique as a versatile tool for metabolic studies of volatiles. In Analysis of Volatiles, P. Schreier, ed (Berlin: Walter de Gruyter), pp. 371-373.

**Bolter, C.J., Dicke, M., van Loon, J.J.A., Visser, J.H.and Posthumus, M.A.** (1997) Attraction of Colorado Potato Beetle to Herbivore-Damaged Plants During Herbivory and After Its Termination J Chem Ecol 23, 1003-1023

### Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. and Prat, S. (2004).

Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and Arabidopsis. Genes Dev 18, 1577-1591.

**Bouwmeester, H.J., Verstappen, F.W., Posthumus, M.A., and Dicke, M.** (1999). Spider mite-induced (3S)-(E)-nerolidol synthase activity in cucumber and lima bean. The first dedicated step in acyclic C11-homoterpene biosynthesis. Plant Physiol 121,

173-180.

### Bradford, M.M. (1979).

A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal Biochem 72, 248-254.

### Brenner, W. (2002).

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. PhD Thesis, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland

### Brewer, D., Mason, F.G. and Taylor, A. (1987).

The production of alamethicins by Trichoderma spp. Can J Microbiol 33, 619-625.

### Broadway RM, Duffey SS (1988)

The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. J Insect Physiol 34, 1111-1117

### Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L. and Kunkel, B.N. (2004).

Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. Mol Plant Microbe Interact 17, 162-174.

### Burow, M., Muller, R., Gershenzon, J. and Wittstock, U. (2006).

Altered Glucosinolate Hydrolysis in Genetically Engineered Arabidopsis thaliana and its Influence on the Larval Development of Spodoptera littoralis. J Chem Ecol 32, 2333-2349.

### Caddick, M.X., Greenland, A.J., Jepson, I., Krause, K.P., Qu, N., Riddell, K.V., Salter, M.G., Schuch, W., Sonnewald, U., and Tomsett, A.B. (1998).

An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. Nat Biotechnol 16, 177-180.

### Cafiso, D.S. (1994).

Alamethicin: a peptide model for voltage gating and protein-membrane interactions. Annu Rev Biophys Biomol Struct 23, 141-165.

#### Camehl I. (2005).

Identifikation und Charkterisierung regulatorischer Elemente im Terpensynthase 28 Promotor. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland

#### Cane D.E., (1999)

Sesquiterpene biosynthesis: cyclization mechanisms. IN Cane DE (ed) Comprehensive natural products chemistry vol 2: Isoprenoids including carotinoids and steroids. Pergamon Press, Oxford, 154-200

### Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X. (1994).

Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. Plant Cell 6, 1583-1592.

### Chen, F., D'Auria, J.C., Tholl, D., Ross, J.R., Gershenzon, J., Noel, J.P. and Pichersky, E. (2003a).

An Arabidopsis thaliana gene for methylsalicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. Plant J 36, 577-588.

### Chen, F., Tholl, D., D'Auria, J.C., Farooq, A., Pichersky, E., and Gershenzon, J. (2003b).

Biosynthesis and emission of terpenoid volatiles from Arabidopsis flowers. Plant Cell 15, 481-494.

#### Chomczynski P. (1993).

A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. BioTechinques 15, 532-538

### Chomczynski P. und Sacchi N. (1987).

Single-Step Method of RNA isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem, 162, 156-159

#### Church G. M. und Gilbert W. (1984).

Genomic Sequencing. Proc Natl Acad Sci 81, 1991-1995

### Clarke, J.D., Volko, S.M., Ledford, H., Ausubel, F.M. and Dong, X. (2000).

Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in arabidopsis. Plant Cell 12, 2175-2190.

### **Clough, S. und Bent, A.** (2000).

Vapor-Phase Sterilization of Arabidopsis Seed. http://plantpath.wisc.edu/~afb/vapster.html

### Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998).

Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. Plant J. 16, 735-743.

**Cseke, L., Dudareva, N., and Pichersky, E.** (1998). Structure and evolution of linalool synthase. Mol Biol Evol 15, 1491-1498.

# **Cunillera, N., Arro, M., Delourme, D., Karst, F., Boronat, A., and Ferrer, A.** (1996). Arabidopsis thaliana contains two differentially expressed farnesyl-diphosphate synthase genes. J Biol Chem 271, 7774-7780.

### Davies, R.T., Goetz, D.H., Lasswell, J., Anderson, M.N. and Bartel, B. (1999).

IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. Plant Cell 11, 365-376.

# Davuluri, R.V., Sun, H., Palaniswamy, S.K., Matthews, N., Molina, C., Kurtz, M. and Grotewold, E. (2003).

AGRIS: Arabidopsis gene regulatory information server, an information resource of Arabidopsis cis-regulatory elements and transcription factors. BMC Bioinformatics 4, 25.

### De Boer, J.G., Posthumus, M.A., and Dicke, M. (2004)

Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. J Chem Ecol 30, 2215-2230

# De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Pare, P.W., Alborn, H.T., and Tumlinson, J.H. (1998).

Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. Nature, 393, 570-573

### **De Wet J. R., Wood K. V., DeLuca M., Helinski D. R. und Subramani S.** (1987). Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. Molecular and Cellular Biol 7, 725-737

### Dean, C., Jones, J., Favreau, M., Dunsmuir, P. and Bedbrook, J. (1988).

Influence of flanking sequences on variability in expression levels of an introduced gene in transgenic tobacco plants. Nucleic Acids Res 16, 9267-9283.

#### Degenhardt, J., and Gershenzon, J. (2000).

Demonstration and characterization of (E)-nerolidol synthase from maize: a herbivoreinducible terpene synthase participating in (3E)-4,8-dimethyl-1,3,7-nonatriene biosynthesis. Planta 210, 815-822.

### Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G. (2005).

Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in woundand methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. Plant Mol Biol 58, 497-513.

### Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. and Turner, J.G. (2002).

COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. Plant J 32, 457-466.

#### Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M. (2005).

The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435, 441-445.

#### Dicke, M., and Sabelis, M.W. (1989).

Does it pay plants to advertize for bodyguards? In Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants (SPB, the Hague: H. Lambers, M. L. Cambridge, H. Konings, T. L. Pons), pp. 341 - 358.

### Dicke, M., Takabayashi, J., Posthumus, M.A., Schütte, C. and Krips, O.E. (1998)

Plant-Phytoseiid Interactions Mediated by Herbivore-Induced Plant Volatiles: Variation in Production of Cues and in Responses of Predatory Mites Exp Appl Acaraol 22, 311-333

# Dicke, M., Van Beek, T.A., Posthumus, M.A., Dom, N.B., Van Bokhoven, H. and De Groot, A. (1990)

Isolation and identification of volatile kairomone that affects acarine predatorprey interactions Involvement of host plant in its production. J Chem Ecol 16, 381-396

### Donath, J., and Boland, W. (1995).

Biosynthesis of acyclic homoterpenes: Enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol percursor. Phytochemistry 39, 785-790.

### Dower W. J., Miller J. F. und Ragsdale C. W. (1988).

High efficiency transformation of *E. coli* with high voltage electroporation. Nucl Acids Res 16, 6127-6145

### Dudareva, N., Cseke, L., Blanc, V.M., and Pichersky, E. (1996).

Evolution of floral scent in Clarkia: novel patterns of S-linalool synthase gene expression in the C. breweri flower. Plant Cell 8, 1137-1148.

### Duffey S.S., Stout M.J. (1996).

Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. ACS Symposium Series 449, 166-197

### Ecker, J.R. and Davis, R.W. (1987).

Plant defense genes are regulated by ethylene. Proc Natl Acad Sci USA 84, 5202-5206.

### Eisenreich W., Schwarz M., Cartayrade A., Arigoni D., Zenk M.H., Bacher A., (1998).

The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms.

Chem Biol 5, R221-R233

### Ellis, C. and Turner, J.G. (2001).

The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. Plant Cell 13, 1025-1033.

#### Ellis, C., Karafyllidis, I. and Turner, J.G. (2002a).

Constitutive activation of jasmonate signaling in an Arabidopsis mutant correlates with enhanced resistance to Erysiphe cichoracearum, Pseudomonas syringae, and Myzus persicae. Mol Plant Microbe Interact 15, 1025-1030.

### Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. and Turner, J.G. (2002b).

The Arabidopsis mutant cev1 links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. Plant Cell 14, 1557-1566.

#### Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000).

Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol 300, 1005-1016.

### Engelberth, J., Koch, T., Schuler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., and Boland, W. (2001).

Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendril coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. Plant Physiol 125, 369-377.

### Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P. and Raskin, I. (1992).

Signal molecules in systemic plant resistance to pathogens and pests. Cell 70, 879-886.

**Faldt, J., Arimura, G., Gershenzon, J., Takabayashi, J., and Bohlmann, J.** (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in Arabidopsis thaliana. Planta 216, 745-751.

#### Farmer, E.E. and Ryan, C.A. (1992).

Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. Plant Cell 4, 129-134.

### Feinberg A. P. und Vogelstein B. (1983).

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132, 6-13

### Felton G.W. Korth K.L., Bi J.L., Wesley S.V., Huhmann D.V. Mathews M.C., Murphy J.B., Lamb C., Dixon R.A. (1999)

Inverse relationship between systemic resistence of plants to microorganisms and to insect herbivory. Current Biol 9, 317-320

#### Felton G.W., Donato K., Delvecchio R.J., Duffey, S.S. (1989).

Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. J Chem Ecol 15, 2667-2694

#### Feng, D.F., Doolittle, R.F. (1987)

Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. J Mol Evol 25, 351-60.

### Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N. and Deng, X.W. (2003).

The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. Plant Cell 15, 1083-1094.

### Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N. and Turner, J.G. (1994).

Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. Plant Cell 6, 751-759.

### Fliegmann, J., Schuler, G., Boland, W., Ebel, J. and Mithofer, A. (2003).

The role of octadecanoids and functional mimics in soybean defense responses. Biol Chem 384, 437-446.

### Fritzsche-Hoballah, M.E., and Turlings, T.C.J. (2001).

Experimental evidence that plants under caterpillar attack may benefit from attracting parasitoids. Evol. Ecol. Res. 3, 553-565.

### Gabler, A., Boland, W., Preiss, H., and Simon, H. (1991).

Stereochemical studies on homoterpene biosynthesis in higher plants; mechanistic, phylogenetic, and ecological aspects. Helv. Chim. Acta 74, 1773-1789.

### Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J. (1993).

Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. Science 262, 754-756.

### Gärtner, K. (2003).

Simultane Analyse der Expression von 1400 Transkriptionsfaktoren mit Hilfe der Array-Technologie. Hausarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien.

### Gershenzon, J. (1994)

Metabolic costs of terpenoid accumulation in higher plants. J Chem Ecol 20, 1281-1328

### Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R., and Seemann, J.R. (1997).

Maximal biomass of Arabidopsis thaliana using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. Plant Physiol 115, 317-319.

# Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., and Katagiri, F. (2003).

Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. Plant J 34, 217-228.

7 Literaturverzeichnis

Gray, W.M., del Pozo, J.C., Walker, L., Hobbie, L., Risseeuw, E., Banks, T., Crosby, W.L., Yang, M., Ma, H. and Estelle, M. (1999). Identification of an SCF ubiquitin-ligase complex required for auxin response in Arabidopsis thaliana. Genes Dev 13, 1678-1691.

### Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M. (2001).

Auxin regulates SCF(TIR1)-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature 414, 271-276.

# Greene, E.A., Codomo, C.A., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Till, B.J., Reynolds, S.H., Enns, L.C., Burtner, C., Johnson, J.E., Odden, A.R., Comai, L. and Henikoff, S. (2003).

Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. Genetics 164, 731-740.

### Guerineau, F., Benjdia, M. and Zhou, D.X. (2003).

A jasmonate-responsive element within the A. thaliana vsp1 promoter. J Exp Bot 54, 1153-1162.

### Guzman, P., and Ecker, J.R. (1990).

Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. Plant Cell 2, 513-523.

# Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. and Schmelzer, E. (1995).

Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. Proc Natl Acad Sci U S A 92, 4150-4157.

### Halkier, B.A. and Gershenzon, J. (2006).

Biology And Biochemistry Of Glucosinolates. Annu Rev Plant Biol 57, 303-333.

### Hanahan D. (1983)

Studies of transformation of E.coli with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580

### He, Y. and Gan, S. (2001).

Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in Arabidopsis. Plant Mol Biol 47, 595-605.

#### Hefner, J., Ketchum, R.E., and Croteau, R. (1998).

Cloning and functional expression of a cDNA encoding geranylgeranyl diphosphate synthase from Taxus canadensis and assessment of the role of this prenyltransferase in cells induced for taxol production. Arch Biochem Biophys 360, 62-74.

### Hilpert, B., Bohlmann, H., op den Camp, R.O., Przybyla, D., Miersch, O., Buchala, A. and Apel, K. (2001).

Isolation and characterization of signal transduction mutants of Arabidopsis thaliana that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions. Plant J 26, 435-446.

### Hobbs, S.L., Kpodar, P. and DeLong, C.M. (1990).

The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants. Plant Mol Biol 15, 851-864.

#### Höfgen, R. and Willmitzer, L. (1990).

Biochemical and genetic analysis of different patatin isoforms expressed in various organs of potato (Solanum tuberosum). Plant Sci 66, 221-230.

#### Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., and Boland, W. (1994).

Herbivore-induced volatiles: the emission of acyclic homoterpenes from leaves of Phaseolus lunatus and Zea mays can be triggered by a beta-glucosidase and jasmonic acid. FEBS Lett: 352, 146-150.

### Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T. (1985).

A simple and general method for transferring genes into plants. Science 227, 1229-1231.

#### Howe, G.A. and Schilmiller, A.L. (2002).

Oxylipin metabolism in response to stress. Curr Opin Plant Biol 5, 230-236.

### Inoue H., Nojima H. und Okayama H. (1990).

High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene 96, 23

### Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1997).

Elicitor-stimulated ion fluxes and O2- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 4800-4805.

### Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W. (1987).

GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. Embo J 6, 3901-3907.

### Jensen, A.B., Raventos, D., Mundy, J. (2002).

Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in Arabidopsis. Plant J 29, 595-606.

## Kahl, J., Siemens, D.H., Aerts, R.J., Gäbler, R., Kühnemann, F., Preston, C.A. and Baldwin, I.T. (2000).

Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. Planta 210, 336-342

Kant, M.R., Ament, K., Sabelis, M.W., Haring, M.A., and Schuurink, R.C. (2004). Differential timing of spider mite-induced direct and indirect defenses in tomato plants. Plant Physiol 135, 483-495.

## Kappers, I.F., Aharoni, A., van Herpen, T.W., Luckerhoff, L.L., Dicke, M., and Bouwmeester, H.J. (2005).

Genetic engineering of terpenoid metabolism attracts bodyguards to Arabidopsis. Science 309, 2070-2072.

### Karban, R., Baldwin, I.T., Baxter, K.J., Laue, G. and Felton, G.W. (2000)

Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. Oecologia 125, 66-71

### Karimi, M., De Meyer, B., and Hilson, P. (2005).

Modular cloning in plant cells. Trends Plant Sci 10, 103-105.

**Kepinski, S. and Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature 435, 446-451.

### Kessler, A., and Baldwin, I.T. (2001).

Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. Science **291**, 2141-2144.

### **Kim, S.R., Choi, J.L., Costa, M.A. and An, G.** (1992). Identification of G-Box Sequence as an Essential Element for Methyl Jasmonate Response of Potato Proteinase Inhibitor II Promoter. Plant Physiol 99, 627-631.

### Kim, Y., Schumaker, K.S. and Zhu, J.K. (2006).

EMS mutagenesis of Arabidopsis. Methods Mol Biol 323, 101-103.

### Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. and Takabayashi, J. (2006).

Analysis of defensive responses activated by volatile allo-ocimene treatment in Arabidopsis thaliana. Phytochemistry 67, 1520-1529.

### Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., and Boland, W. (1999).

Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. Plant Physiol 121, 153-162.

### Koncz C., Schell J., 1986

The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carries by a novel type of Agrobacterium binary vector. Mol Gen Genet 204, 383-396

### Koshiba, T., Ballas, N., Wong, L.M., Theologis A. (1995)

Transcriptional regulation of PS-IAA415 and PS-IAA6 early gene expression by indolacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (Pisum sativum). J Mol Biol 253, 396-413

### Koyama T., Ugura K., (1999)

Isopentenyl diphosphate isomerase and prenyltransferases. IN Cane DE (ed) Comprehensive natural products chemistry vol 2: Isoprenoids including carotinoids and steroids.

Pergamon Press, Oxford, 69-96.

### Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B. and Wasternack, C. (2000).

Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. Plant Physiol 123, 177-188.

### Kunkel, B.N. and Brooks, D.M. (2002).

Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. Curr Opin Plant Biol 5, 325-331.

# Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., and Ryals, J. (1995).

Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. Mol Plant Microbe Interact 8, 863-870.

#### Le Gouill, C., Parent, J.-L., Rola-Pleszczynski, M., and Stankova, J. (1994).

Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. Anal Biochem 219, 164

# Li, X., Song, Y., Century, K., Straight, S., Ronald, P., Dong, X., Lassner, M. and Zhang, Y. (2001).

A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. Plant J 27: 235-242.

### Lichtenthaler H.K. (1999)

The 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathyway of isoprenoid biosynthesis in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50, 47-65

### Livak K.J. and Schmittgen, T.D. (2001).

Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C}$ <sub>T</sub> Method. Methods 25, 402-408

### Lorenzo, O. and Solano, R. (2005).

Molecular players regulating the jasmonate signalling network. Curr Opin Plant Biol 8, 532-540.

### Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J. and Solano, R. (2003).

ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. Plant Cell 15, 165-178.

### Maleck K., Dietrich R.A. (1999)

Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? Trends Plant Sci 4, 215-219

### Mandaokar, A., Kumar, V.D., Amway, M., and Browse, J. (2003).

Microarray and differential display identify genes involved in jasmonate-dependent anther development. Plant Mol Biol 52, 775-786.

### Martin, W.R., Morgan, P.W., Sterling, W.L. and Meola, R.W. (1988)

Stimulation of ethylene production in cotton by salivary enzymes of the cotton fleahopper (Heteroptera: Miridae). Environ Entomol 17, 930-935

### McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E. and Browse, J. (1997).

Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 5473-5477.

#### McMillan J., Beale M.H., (1999)

Diterpene biosynthesis.

IN: Cane DE (ed) Comprehensive natural products chemistry vol 2:Isoprenoids including carotinoids and steroids.Pergamon Press, Oxford: 217-244

### Mead, D.A., Pey, K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A., and Smith, L.M. (1991).

A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. Biotechnology 9, 657-662.

### Menke, F.L., Champion, A., Kijne, J.W. and Memelink, J. (1999).

A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2- domain transcription factor, ORCA2. Embo J 18, 4455-4463.

#### Miller B., Oschinski C, Zimmer W. (2001)

First isolation of an isoprene synthase gene from poplar and succesfull expression of the gene in Escherichia coli.

Planta 213, 483-487

### Mithofer, A., Wanner, G., and Boland, W. (2005).

Effects of feeding Spodoptera littoralis on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. Plant Physiol 137, 1160-1168.

### Mueller, M.J. (1997)

Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. Physiologia Plantarum 100, 653-663

### Mullis, K.B., and Faloona, F.A. (1987).

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155, 335-350.

### Nagel L. (2006).

Funktionelle Charakterisierung regulatorischer Elemente im Terpensynthase 28 Promotor. Diplomarbeit, Georg-August-Universität Göttingen, Deutschland

### Nawrath, C., and Metraux, J.P. (1999).

Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell 11, 1393-1404.

### Newman J.D, Chappell J. (1999)

Isoprenoid biosynthesis in plants: Carbon portioning within the cytoplasmatic pathway. Crit Rev Biochem Mol Biol 34, 95-106

### Nibbe, M., Hilpert, B., Wasternack, C., Miersch, O. and Apel, K. (2002).

Cell death and salicylate- and jasmonate-dependent stress responses in Arabidopsis are controlled by single cet genes. Planta 216, 120-128.

### Okada, K., Saito, T., Nakagawa, T., Kawamukai, M., and Kamiya, Y. (2000).

Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in Arabidopsis. Plant Physiol 122, 1045-1056.

### Ozawa, R., Arimura, G., Takabayashi, J., Shimoda, T. and Nishioka, T. (2000).

Involvement of jasmonate- and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. Plant Cell Physiol 41, 391-398.

# Palaniswamy, S.K., James, S., Sun, H., Lamb, R.S., Davuluri, R.V. and Grotewold, E. (2006).

AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. Plant Physiol 140, 818-829.

# Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2002).

A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. Plant J 31, 1-12.

### Pauw, B. and Memelink, J. (2004).

Jasmonate-Responsive Gene Expression. J Plant Growth Regul 23, 200-210

### Peach, C. and Velten, J. (1991).

Transgene expression variability (position effect) of CAT and GUS reporter genes driven by linked divergent T-DNA promoters. Plant Mol Biol 17, 49-60.

### Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F. (1996).

Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. Plant Cell 8, 2309-2323.

# Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F. (1998).

Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. Plant Cell 10, 2103-2113.

### Pichersky, E., Lewinsohn, E., and Croteau, R. (1995).

Purification and characterization of S-linalool synthase, an enzyme involved in the production of floral scent in Clarkia breweri. Arch Biochem Biophys 316, 803-807.

### Pichersky, E., Raguso, R.A., Lewinsohn, E., and Croteau, R. (1994).

Floral Scent Production in Clarkia (Onagraceae) (I. Localization and Developmental Modulation of Monoterpene Emission and Linalool Synthase Activity). Plant Physiol 106, 1533-1540.

### Pré, M. (2006).

Functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transription factors in Arabidopsis thaliana. PhD Thesis, Leiden University, Netherlands

### Rao, M.V., Lee, H., Creelman, R.A., Mullet, J.E. and Davis, K.R. (2000).

Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. Plant Cell 12, 1633-1646.

### Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E. (2000).

Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. Plant Cell 12, 707-720.

### Rieske, L.K., and Raffa, K.F. (1995).

Ethylene emission by a deciduous tree, Tilia Americana in response to feeding by introduced basswood thrips, Thrips calcaratus. J Chem Ecol 21, 187-197

### Riggs, C.D. and Chrispeels, M.J. (1987).

Luciferase reporter gene cassettes for plant gene expression studies. Nucleic Acids Res 15, 8115.

### Rojo, E., Leon, J. and Sanchez-Serrano, J.J. (1999).

Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in Arabidopsis thaliana. Plant J 20, 135-142.

### Rojo, E., Solano, R. and Sánchez-Serrano J.J. (2003)

Interactions Between Signaling Compounds Involved in Plant Defense. J Plant Growth Regul 22, 82-98

### Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G. and Sanchez-Serrano,

**J.J.** (1998). Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and - independent wound signal transduction pathways in Arabidopsis thaliana. Plant J 13, 153-165.

Roslan, H.A., Salter, M.G., Wood, C.D., White, M.R., Croft, K.P., Robson, F., Coupland, G., Doonan, J., Laufs, P., Tomsett, A.B., and Caddick, M.X. (2001). Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in Arabidopsis thaliana. Plant J 28, 225-235.

### **Rouster, J., Leah, R., Mundy, J. and Cameron-Mills, V.** (1997). Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. Plant J 11, 513-523.

**Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W.M., Hobbie, L., Turner, J. and Estelle, M.** (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. Genes Dev 12, 198-207.

# Ruegger, M., Dewey, E., Hobbie, L., Brown, D., Bernasconi, P., Turner, J., Muday, G. and Estelle, M. (1997).

Reduced naphthylphthalamic acid binding in the tir3 mutant of Arabidopsis is associated with a reduction in polar auxin transport and diverse morphological defects. Plant Cell 9, 745-757.

# Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. and Hunt, M.D. (1996).

Systemic Acquired Resistance. Plant Cell 8, 1809-1819.

### **Ryan C.A.** (1990)

Protease Inhibitors in plants: Genes for improving defence against insects and pathogens. Ann Rev Phyopath 28: 45-449

### Sabelis, M.W., Janssen, A., and Kant, M.R. (2001).

Ecology. The enemy of my enemy is my ally. Science 291, 2104-2105

### Sanger, F., Nickler, S., and Coulson, A.R. (1977).

DNA-sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74, 5463-5467.
#### Sansom, M.S. (1993).

Structure and function of channel-forming peptaibols. Q Rev Biophys 26, 365-421.

#### Schilmiller, A.L., Koo, A.J.K. and Howe, G.A. (2006)

Functional Diversification of Acyl-CoA Oxidases in Jasmonic Acid Biosynthesis and Action. Plant Physiol, in press

#### Schnee, C., Kollner, T.G., Gershenzon, J., and Degenhardt, J. (2002).

The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage. Plant Physiol 130, 2049-2060.

#### Schneider M., Ow D. W. und Howell S. H. (1990).

The pattern of firefly luciferase expression in transgenic plants. Plant Mol Biol 14, 935-947

### Schubert, D., Lechtenberg, B., Forsbach, A., Gils, M., Bahadur, S. and Schmidt, R. (2004).

Silencing in Arabidopsis T-DNA transformants: the predominant role of a gene-specific RNA sensing mechanism versus position effects. Plant Cell 16, 2561-2572.

# Schuler, G., Mithofer, A., Baldwin, I.T., Berger, S., Ebel, J., Santos, J.G., Herrmann, G., Holscher, D., Kramell, R., Kutchan, T.M., Maucher, H., Schneider, B., Stenzel, I., Wasternack, C., and Boland, W. (2004).

Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. FEBS Lett 563, 17-22.

Schulze B. (2005).

Oxylipins and their involvement in plant response to biotic and abiotic stress. PhD Thesis, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Deutschland

#### Schwarz, M.K., 1994

Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte. PhD Thesis, ETH Zürich, Switzerland

### Scutareanu, P., Drukker, B., Bruin, J., Maarten, Posthumus, A. and Sabelis, M.W. (1997)

Volatiles from Psylla-Infested Pear Trees and Their Possible Involvement in Attraction of Anthocorid Predators J Chem Ecol 23, 2241-2260

#### Sembdner, G., and Parthier, B. (1993)

The Biochemistry and the Physiological and Molecular Actions of Jasmonates Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 44, 569-589

Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S. and Choi, Y.D. (2001).

Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 4788-4793.

Serino, G., Su, H., Peng, Z., Tsuge, T., Wei, N., Gu, H. and Deng, X.W. (2003). Characterization of the last subunit of the Arabidopsis COP9 signalosome: implications for the overall structure and origin of the complex. Plant Cell 15, 719-731.

Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., McElver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., Clarke, J.D., Cotton, D., Bullis, D., Snell, J., Miguel, T., Hutchison, D., Kimmerly, B., Mitzel, T., Katagiri, F., Glazebrook, J., Law, M., and Goff, S.A. (2002).

A high-throughput Arabidopsis reverse genetics system. Plant Cell 14, 2985-2994.

Southern, M.M., Brown, P.E. and Hall, A. (2006). Luciferases as reporter genes. Methods Mol Biol 323, 293-305.

#### Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., van Loon, L.C., Dong, X., and Pieterse, C.M. (2003).

NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. Plant Cell 15, 760-770.

#### Staswick, P.E. and Tiryaki, I. (2004).

The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. Plant Cell 16, 2117-2127.

#### Staswick, P.E., Su, W. and Howell, S.H. (1992).

Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. Proc Natl Acad Sci U S A 89, 6837-6840.

#### Staswick, P.E., Tiryaki, I. and Rowe, M.L. (2002).

Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. Plant Cell 14, 1405-1415.

#### Staswick, P.E., Yuen, G.Y. and Lehman, C.C. (1998).

Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus Pythium irregulare. Plant J 15, 747-754.

#### Stintzi, A., and Browse, J. (2000).

The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A 97, 10625-10630.

#### Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. and Farmer, E.E. (2001).

Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 12837-12842.

#### Sun, T.P. and Kamiya, Y. (1994).

The Arabidopsis GA1 locus encodes the cyclase ent-kaurene synthetase A of gibberellin biosynthesis. Plant Cell 6, 1509-1518.

#### Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K., Shibata, D., Kobayashi, Y., and Ohta, H. (2005).

12-oxo-phytodienoic Acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. Plant Physiol 139, 1268-1283.

#### Tholl, D. (2006).

Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. Curr Opin Plant Biol 9, 297-304.

#### Tholl, D., Chen, F., Petri, J., Gershenzon, J., and Pichersky, E. (2005).

Two sesquiterpene synthases are responsible for the complex mixture of sesquiterpenes emitted from Arabidopsis flowers. Plant J 42, 757-771.

#### Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A. and 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 U S A 95, 15107-15111.

#### Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994)

CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.

#### Tiryaki, I. and Staswick, P.E. (2002).

An Arabidopsis mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant axr1. Plant Physiol 130, 887-894.

#### Titarenko, E., Rojo, E., Leon, J. and Sanchez-Serrano, J.J. (1997).

Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in Arabidopsis thaliana. Plant Physiol 115, 817-826.

#### Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G. and Guilfoyle, T.J. (2001).

AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. Plant Cell 13, 2809-2822.

#### Trapp S.C., Croteau R.B. (2001)

Genomic organisation of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications.

Genetics 158, 811-832

### Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W. and Bender, C.L. (2005).

The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. Plant J 42, 201-217.

#### van der Fits, L. and Memelink, J. (2001).

The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. Plant J 25, 43-53.

#### van Loon, J.J.A., De Boer, J.G., and Dicke, M. (2000).

Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. Entomol. Exp. Appl. 97, 219-227.

#### van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. (1998)

Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36, 453-483

#### van Poecke, R.M., Posthumus, M.A., and Dicke, M. (2001)

Herbivore-induced volatile production by Arabidopsis thaliana leads to attraction of the parasitoid Cotesia rubecula: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. J Chem Ecol 27, 1911-1928.

#### van Poecke, R.M.P. and Dicke M. (2002)

Induced parasitoid attraction by Arabidopsis thaliana: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. J Exp Bot 53, 1793-1799

#### van Wees, S.C. and Glazebrook, J. (2003a).

Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to Pseudomonas syringae pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. Plant J 33, 733-742.

#### van Wees, S.C., Chang, H.S., Zhu, T., and Glazebrook, J. (2003b).

Characterization of the early response of Arabidopsis to Alternaria brassicicola infection using expression profiling. Plant Physiol 132, 606-617.

#### Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J. and Browse, J. (1998).

A role for jasmonate in pathogen defense of arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A 95, 7209-7214.

#### von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., and Keller, B. (2002).

The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Planta 216, 187-192.

#### Walling LL (2000)

The myriad plant responses to herbivores. J Plant Growth Regul 19, 195-216

#### Weber, H., Vick, B.A. and Farmer, E.E. (1997).

Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. Proc Natl Acad Sci U S A 94, 10473-10478.

#### Weigel, R.R., Bäuscher, C., Pfitzner, A.J.P., and Pfitzner, U.M. (2001).

NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel familiy of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. Plant Mol Biol, in press.

# Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U. and Bublitz, F. (1994).

The Pseudomonas phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. FEBS Lett 345, 9-13.

#### Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001).

Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature 414, 562-565.

## Williams, L., 3rd, Rodriguez-Saona, C., Pare, P.W., and Crafts-Brandner, S.J. (2005).

The piercing-sucking herbivores Lygus hesperus and Nezara viridula induce volatile emissions in plants. Arch Insect Biochem Physiol 58, 84-96.

#### Williams, M.E., Foster, R. and Chua, N.H. (1992).

Sequences flanking the hexameric G-box core CACGTG affect the specificity of protein binding. Plant Cell 4, 485-496.

#### Wise ML., Croteau R., (1999)

Monoterpene biosynthesis. IN Cane DE (ed) Comprehensive natural products chemistry vol 2: Isoprenoids including carotinoids and steroids. Pergamon Press, Oxford: 97-153

#### Xiao, S., Dai, L., Liu, F., Wang, Z., Peng, W. and Xie, D. (2004).

COS1: an Arabidopsis coronatine insensitive1 suppressor essential for regulation of jasmonate-mediated plant defense and senescence. Plant Cell 16, 1132-1142.

#### Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998)

COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science 280, 1091-1094.

# Xu Y., Chang P.F.L., Liu D., Narasimhan M.L., Raghothama K.G., Hasegawa P.M., Bressan R.A. (1994)

Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. Plant cell 6, 1077-1085

### Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. and Xie, D. (2002).

The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. Plant Cell 14, 1919-1935.

#### Yamaguchi, S., Sun, T., Kawaide, H. and Kamiya, Y. (1998).

The GA2 locus of Arabidopsis thaliana encodes ent-kaurene synthase of gibberellin biosynthesis. Plant Physiol 116, 1271-1278.

#### Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. Plant Physiol 136, 2621-2632.

### 8 Anhang

#### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
λ	Bakteriophage Lambda
μ	micro (x 10 <sup>-6</sup> )
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
35S	Blumenkohlmosaikvirus Promotor
А	Adenosin
A. thaliana	Arabidopsis thaliana
aa	Amino acid
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
acx	Acyl-CoA-oxidase
Ala	Alamethicin
aos	Allene oxide synthase
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	auxin response factor
Ask1	Arabidopsis shaggy related protein kinase
AtCul1	Arabidopsis thaliana Cullin 1
AtGLS	Arabidopsis thaliana Geranyllinalool Synthase
AtLIS	Arabidopsis thaliana Linalool Synthase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AtRbx1	Arabidopsis thaliana ring-box protein1
att	attachment sites
AUX/IAA	Auxin/Indoleacetic acid
AXR1	Auxin resistent 1
BaR	Basta <sup>TM</sup> -Resistenz
Вр	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin

8 Anhang	
C. breweri	Clarkia breweri
C. rubecula	Cotesia rubecula
ca.	cirka
CaMV	CauliflowerMosaicVirus
CbLIS	Clarkia breweri Linalool Synthase
ccdB	coupled cell division Region B
CDIS	conifer diterpene internal sequence
cDNA	Kopie-DNA von RNA-Sequenzen
ceg	constitutive expression of geranyllinalool synthase
cet	constitutive expression of THI2.1
Ci	Curie
CmR	Chloramphenicolresistenz
coil	coronatine insensitive 1
Col	Columbia
COP9	constitutive photomorphogenic 1
cpm	Zählimpulse pro Minute
CPP	Copalyldiphosphat-Synthase
CVI	Cape Verdi Island
dde2	delayed dehiscence 2
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMNT	4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dT	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast extract and tryptone
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ein2	Ethylene insensitive 2
EMSA	Electromobility Shift Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERF1	Ethylene-Response-Factor 1
et al	et alii; und andere
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol

			XXX
.t			

G	Guanosin
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GL	(E,E)-Geranyllinalool
GPP	Geranyldiphosphat
GUS	β-Glucoronidase
h	Stunde(n)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
IPP	Isopentenyldiphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
JA	Jasmonsäure
jar1	jasmonate resistent 1
JERE	JA- and elicitor-responsive element
jin1	Jasmonate insensitive 1
k	kilo (x 10 <sup>3</sup> )
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
KmR	Kanamycin Resistenz
KS	Kauren-Synthase
1	Liter
LB	left border
LBM	Luria/Bertani-Medium
LIS	Linalool-Synthase
LOX2	Lipoxygenase 2
Lsg.	Lösung
LUC	Luciferase
m	milli (x 10 <sup>-3</sup> )
Μ	molar
m/z	Masse/Ladungszahl
MCS	multiple cloning site, Polylinker
MeJA	Methyljasmonat

8 Anhang

f

F

g

FPP

femto (x 10<sup>-15</sup>)

Farnesyldiphosphat

Farad

Gramm

8 Anhang	
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat
MEP	2-C-Methylerythritol-4-Phosphat
MeSA	Methysalicylat
min	Minute(n)
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Skoog Medium
MW	Molekulargewicht
n	nano (x 10 <sup>-9</sup> )
<i>N.t.</i>	Nicotiana tabacum
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
No	Nossen
nos	Nopalin-Synthase
nosT	Nopalin-Synthase Terminator
npr1, NPR1	nonexpresser of PR gene 1 (= Nichtexprimierer von PR-1)
ocs	Octopin-Synthase
OD	optische Dichte
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm
OPDA	Oxophytodiensäure
OPR3	OPDA Reduktase 3
ORF	open reading frame (= offenes Leseraster)
р	pico (x $10^{-12}$ )
P. lunatus	Phaseolus lunatus
P. rapae	Pieris rapae
P. xylostella	Plutella xylostella
PAA	Polyacrylamid
PAT	Phosphinotricinacetyltransferase
PCR	polymerase chain reaction (= Polymerasekettenreaktion)
pDEST	Destination-Vektor
PDF1.2	plant defensin 1.2
pDONOR	Donor-Vektor
PEG	Polyethylenglycol
pENTR	Entry-Vektor
pН	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration

8 Anhang		XLI
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	
pnos	Nopalin-Synthase Promotor	
polydI/dC	Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure	
PR1	Pathogenesis related 1	
RB	right border	
Rif	Rifampicin	
RNA	Ribonukleinsäure	
RNAse	Ribonuklease	
RNAse A	Ribonuklease A	
rpm	Umdrehungen pro Minute	
RR-Mix	Ready Reaction Mix von Perkin-Elmer	
rRNA	ribosomale RNA	
S	Sekunde(n)	
S. exigua	Spodoptera exigua	
S. O.	siehe oben	
SA	Salizylsäure	
SCF	Skp1 Cullin F-Box	
SDS	Natriumdodecylsulfat	
SGT1b	Suppressor of G2 Allele of Skp1	
SHI	Shoot induction Medium	
Sid2	SA induction deficient 2	
Skp1	Shaggy kinase in Schizosaccharomyces pombe 1	
SNN	Tabakkultivar Samsun NN	
SSC	Standard saline citrate buffer	
STE	Salt Tris EDTA	
Т	Thymin	
TAE	Tris-acetat-EDTA-Puffer	
Taq	Thermus aquaticus	
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer	
TEMED	(N,N,N´,N´)-Tetramethylethylendiamin	
THI2.1	Thionin 2.1	
TIR1	Transport Inhibitor Response 1	
TMTT	(E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen	
tocs	Terminator der Octopin-Synthase	
TPS	Terpensynthase	

8 Anhang	
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer
U	Unit (=Einheit) der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (= nichttranslatierter Bereich der mRNA)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen
VSP2	Vegetative storage Protein 2
Ws	Wassilewskija
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Glucuronid
YFP	yellow flourescent protein
z. B.	zum Beispiel

#### 8.2 Aminosäuren

Α	Alanin
С	Cystein
D	Asparaginsäure
Е	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
Н	Histidin
Ι	Isoleucin
Κ	Lysin
L	Leucin
М	Methionin
Ν	Asparagin
Р	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
Т	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin
Х	beliebige oder unbekannte Aminosäure

#### Danksagung:

Auf den letzten Seiten möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die durch ihr Wirken zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Zunächst möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Gatz für das Vertrauen bedanken, das sie mir die Jahre über entgegen gebracht hat und für die vielen Ressourcen, die mir zur Verfügung gestanden haben. Außerdem möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken an nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen zu können, wodurch ich die Möglichkeit hatte meinen Horizont zu erweitern.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser für die Übernahme des Korreferats und manches ermutigende Gespräch.

Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Dorothea Tholl bedanken, die mich mit den Terpensynthasen erst in Kontakt gebracht hat und einige der biochemischen Messungen in dieser Arbeit durchführte; diese Kooperation hat das Projekt erst möglich gemacht.

Bei ihrem damaligen Abteilungsleiter Prof. Dr. Gershenzon möchte ich mich für die Diskussionsbereitschaft bedanken und für die Anregungen zu dem mit dieser Arbeit verbundenen Manuskript.

Prof. Dr. Boland möchte ich für seine Bereitschaft danken, mir ein Gutachten auszustellen sowie für die Materialien, wie dem TMTT-Standard und dem Coronalon, die meine Arbeit erheblich einfacher gemacht haben.

Corinna und Guido, euch danke ich ganz herzlich für euer Engagement und die eingebrachte Erfahrung, ohne die sich alle Arbeitsabläufe ungleich schwieriger gestalten würden.

Weiterhin möchte ich mich bei Benjamin Fode, Iris Camehl, Leonie Nagel und Nina Behnke bedanken, den besten Diplomanden, die sich ein Doktorand wünschen kann. Danke, dass Ihr mein Arbeitsleben so bunt und abwechslungsreich gemacht habt.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die großartige Arbeitsatmosphäre danken und die Solidarität, die mir während dieser Zeit entgegengebracht wurde. Besonders bedanken möchte ich mich bei Hella Tappe, die in schwierigen Zeiten u. a. gute Ratschläge zum Abbau von Stress für mich hatte. Ein großes Dankeschön gilt den technischen Assistenten Anna Herrman, Annette Gunkel, Larissa Kunz und Ronald Scholz, die immer bereit waren mich zu unterstützen. Vielen Dank Anna, dass Du besonders in der letzten Phase der Arbeit ein paar unangenehme Arbeiten im Isotopenlabor für mich gemacht hast. Bei Ronald möchte ich mich für die vielen Tricks und Kniffe bedanken, die ich von ihm lernen konnte. Annette, Dir möchte ich für die vielen mühseligen Arbeiten danken, die Du viel sorgsamer und korrekter erledigt hast, als ich es je hätte machen können.

Ivo Feussner und Cornelia Göbel danke ich sehr für die Unterstützung bei der Messung der untersuchten Terpene.

Den Gärtnern Felicitas Glasenapp und Uwe Wedemeyer danke ich für die vielen Tabletts mit Erde, die im Besonderen in Rahmen eines genetischen Screens angesetzt werden mussten.

Bei Eva, Yvonne, Ben, Hella, Katja, Iris, Miriam und Ulli möchte ich mich bedanken, dass sie mich trotz meiner Tendenz in der Freizeit über die Arbeit zu sprechen an ihren Freizeitaktivitäten wie Partys, Bowlen, Kino und vielem mehr haben teilnehmen lassen.

Antje und Helen, Euch möchte ich danken für die Bereitschaft mir zuzuhören, meine Sorgen zu verstehen und mir Mut zu machen, meinen Weg weiter zu gehen.

Katrin Dir möchte ich für die vielen gemeinsamen Jahre danken, in denen Du mir viel Freude am Leben geschenkt und meinen Weg geebnet hast.

Meiner Schwester möchte ich besonders für ihre Unterstützung mit den Abbildungen in dieser Arbeit danken. Außerdem hat sie den Umschlag dieser Arbeit entworfen. Ich war in der glücklichen Lage eine Schwester zu haben, die so etwas kann; niemand sonst hätte soviel Zeit dafür geopfert.

Meinem Vater möchte ich dafür danken, dass er an mich geglaubt hat, als die Entscheidung getroffen werden musste, welche weiterführende Schule ich besuchen sollte. Ohne diese Entscheidung hätte ich die vorliegende Arbeit nicht schreiben können.

Der letzte Absatz dieser Arbeit gehört meiner Mutter, ohne Deine prägende Wirkung auf meinen Charakter und Deine Fürsorge wäre ich nicht an diesem Punkt in meinem Leben angekommen; vielen Dank.

### Lebenslauf:

	Marco Herde	
Persönliche Angaben	Diplom-Biologe	
	Geboren am 18.02.1978 in Alfeld/Leine	
1984 - 1990	Grundschule/Orientierungsstufe	
1990 - 1997	Gymnasium Alfeld	
1997	Abitur	
1997 - 1998	Zivildienst im St. Bernward Krankenhaus	
1998 - 2003	Studium im Fachbereich Biologie an der Georg-August Universität in Göttingen	
2003	Diplomprüfung	
Oktober 2001	Förderung durch die Studienstiftung des deutschen Volkes	
2003 - 2006	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für "Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze" des Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzen- wissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. C. Gatz	

### Identifikation und Regulation einer durch Insektenfraß induzierbaren Geranyllinalool-Synthase in Arabidopsis thaliana



Marco Herde

Göttingen 2006