

**Charakterisierung von zwei *Arabidopsis thaliana*  
Mutanten mit erhöhter *PR1*-Expression**

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

vorgelegt von  
Miriam Heupel  
aus Kassel

Göttingen 2006

D 7

Referent:

Prof. Dr. Christiane Gatz

Korreferent:

PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Tag der mündlichen Prüfung:

06.07.2006



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	<b>Pflanzliche Abwehrmechanismen gegen biotischen Stress</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Die lokale Pathogenabwehr der Pflanze .....	2
1.1.2	Systemisch erworbene Resistenz .....	3
1.1.3	Beteiligung des <i>as-1</i> -Elementes an der Stressantwort.....	8
1.2	<b>Suizidsystem zur Identifizierung von Mutanten der Salizylsäure-abhängigen Signaltransduktion</b> .....	<b>10</b>
1.3	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	<b>13</b>
2.1	<b>Geräte</b> .....	<b>13</b>
2.2	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>14</b>
2.3	<b>Chemikalien</b> .....	<b>14</b>
2.4	<b>Kits</b> .....	<b>15</b>
2.5	<b>Enzyme</b> .....	<b>16</b>
2.6	<b>Nucleinsäuren</b> .....	<b>16</b>
2.6.1	Primer.....	16
2.6.2	Plasmide.....	17
2.6.3	Hybridisierungssonden .....	18
2.6.4	DNA Fragmentlängenstandarts.....	18
2.7	<b>Organismen</b> .....	<b>19</b>
2.7.1	Bakterien.....	19
2.7.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen.....	19
2.8	<b>Nährmedien und Zusätze</b> .....	<b>20</b>
2.8.1	Nährmedium für Bakterien .....	20
2.8.2	Nährmedien für Pflanzen .....	20
2.8.3	Zusätze .....	21
2.9	<b>Standartlösungen und Puffer</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>22</b>
3.1	<b>Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen</b> .....	<b>22</b>
3.1.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	22
3.1.2	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i> .....	22
3.1.3	Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen .....	22
3.1.4	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	22

3.1.4.1	Anzucht auf Erde .....	22
3.1.4.2	Anzucht in Sterilkultur.....	23
3.1.5	Oberflächensterilisation von Samen .....	23
3.1.6	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	23
3.1.7	Samengewinnung aus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	24
3.1.8	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen mit Pseudomonaden.....	24
3.1.8.1	Bestimmung des Bakterienwachstums in Pflanzen nach Infiltration .	24
3.1.8.2	Bestimmung des Bakterienwachstums in Pflanzen nach „Dippen“ ...	25
3.1.8.3	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation.....	25
3.1.9	Induktion der Genexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen .....	25
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>26</b>
3.2.1	Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA .....	26
3.2.1.1	Analytische Mengen .....	26
3.2.1.1.1	Alkalische Lyse.....	26
3.2.1.1.2	Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit .....	26
3.2.1.2	Präperative Mengen .....	26
3.2.1.2.1	DNA-Elution aus Agarosegelen .....	27
3.2.2	Methode zur Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> .....	27
3.2.2.1	Schnellextraktion für eine anschließende PCR.....	27
3.2.3	Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren .....	27
3.2.3.1	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren .....	27
3.2.3.2	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	28
3.2.3.2.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	28
3.2.3.2.2	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.....	28
3.2.3.3	Sequenzierung von DNA .....	29
3.2.3.4	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	29
3.2.3.5	Modifizierte RT-PCR .....	30
3.2.3.6	Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren.....	31
3.2.3.6.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	31
3.2.3.6.2	Ligation.....	31
3.2.3.7	Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen.....	32
3.2.3.7.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	32
3.2.3.7.2	Transformation von <i>E. coli</i> .....	32
3.2.3.7.3	Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen .....	33
3.2.3.7.4	Gentransfer in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	33
3.2.3.7.5	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	33
3.2.3.8	Northern-Blot Analyse.....	34
3.2.3.8.1	Isolierung von RNA aus Pflanzen mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit .....	34
3.2.3.8.2	Isolierung von RNA aus Pflanzen mit der Trizolmethode .....	34
3.2.3.8.3	Kapillar Blot .....	35

3.2.3.8.4	Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments .....	35
3.2.3.8.5	Hybridisierung des Filters .....	35
3.2.3.8.6	Waschen der Northern-Blot-Membran .....	36
3.2.3.8.7	Rehybridisierung .....	36
3.2.4	Transkriptionsfaktoranalyse mit REGIA Array Filtern .....	36
3.2.4.1	Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden .....	36
3.2.4.2	Hybridisierung und Waschen der REGIA Array Filter .....	37
3.2.4.3	Auswertung der Arrays mit der Software Arrayvision .....	37
3.2.4.4	Amplifikation der Gene aus dem REGIA Array .....	38
<b>3.3</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.3.1	Bestimmung der Oberflächenpermeabilität von Blättern .....	38
3.3.2	Luciferase-Assay .....	38
<b>3.4</b>	<b>Trockenstressanalyse von Pflanzen .....</b>	<b>39</b>
3.4.1	Messung der Transpirationsrate .....	39
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Auswahl der zu analysierenden EMS-Mutanten .....</b>	<b>40</b>
4.1.1	Linie <i>ana41</i> .....	40
4.1.2	Linie <i>ana38#8</i> .....	41
<b>4.2</b>	<b>Analyse des Reportergens <i>Deacetylase</i> .....</b>	<b>42</b>
4.2.1	Expression des <i>Deacetylase</i> -Gens .....	42
4.2.2	Test der <i>Deacetylase</i> -Aktivität .....	43
<b>4.3</b>	<b>Biotischer Stress .....</b>	<b>46</b>
4.3.1	Expression von SA-induzierbaren Genen .....	46
4.3.1.1	Analyse der Rückkreuzungen mit 5GuDe .....	48
4.3.1.2	Vergleich der <i>PRI</i> -Expression in <i>aca41</i> und <i>aca38#8</i> mit den <i>cpr</i> - Mutanten .....	51
4.3.2	Bestimmung der Salizylsäuremengen .....	52
4.3.3	Expression des <i>ICS1</i> -Gens .....	54
4.3.4	Infektion mit dem bakteriellen Pathogen <i>Pseudomonas syringae</i> .....	58
4.3.4.1	Beobachtung des Phänotyps .....	58
4.3.4.2	Bestimmung des Bakterienwachstums in der Pflanze .....	59
4.3.5	Expression von <i>PDF1.2</i> in <i>aca41</i> und <i>cpr5</i> .....	62
<b>4.4</b>	<b>Makroarray-Analyse .....</b>	<b>63</b>
<b>4.5</b>	<b>Abiotischer Stress .....</b>	<b>69</b>
4.5.1	Oxidativer Stress .....	69
4.5.1.1	Expression von Markergenen .....	69
4.5.1.2	Analyse der Genexpression im <i>NahG</i> -Hintergrund .....	71
4.5.1.3	Resistenz gegen oxidativen Stress .....	73
4.5.1.4	Induzierbarkeit von <i>ICS1</i> durch oxidativen Stress .....	76

---

4.5.1.5	Analyse der Glutathionmengen in <i>aca41</i> .....	78
4.5.2	Trockenstress .....	80
4.5.2.1	Beobachtung der Austrocknungstoleranz .....	80
4.5.2.2	Expression von <i>rd29A</i> während des Trockenstresses .....	83
4.5.2.3	Analyse der Cuticula .....	85
4.5.2.4	Bestimmung der Stomataanzahl .....	86
4.5.2.5	Expression von <i>CNGC4</i> .....	87
4.5.2.6	Messung der Transpirationsrate .....	88
4.5.2.7	Einfluss von Abscisinsäure auf die Genexpression in <i>aca41</i> .....	89
4.5.2.8	Vererbbarkeit der Trockentoleranz in den Folgegenerationen .....	91
4.5.2.9	Analyse der Kreuzung <i>aca41</i> x <i>NahG</i> auf ihre Trockentoleranz .....	94
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>96</b>
<b>5.1</b>	<b>Das Suizidgen ist in beiden Mutantenlinien nicht funktionell</b> .....	<b>96</b>
<b>5.2</b>	<b>Konstitutive Expression von PR-Genen</b> .....	<b>97</b>
<b>5.3</b>	<b>Resistenz von <i>aca41</i> gegen Bakterieninfektion</b> .....	<b>102</b>
<b>5.4</b>	<b>Reaktion der Mutanten auf oxidativen Stress</b> .....	<b>104</b>
<b>5.5</b>	<b>Reaktion der Mutanten auf Trockenstress</b> .....	<b>107</b>
<b>5.6</b>	<b>Hypothetisches Modell der Mutationen in <i>aca41</i> und <i>aca38#8</i></b> .....	<b>111</b>
<b>5.7</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>127</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Abwehrmechanismen gegen biotischen Stress

Um zu überleben müssen Pflanzen in der Lage sein, sich an verschiedene Umweltbedingungen anzupassen. Bedingungen, die abiotischen Stress in den Pflanzen erzeugen, sind Trockenheit, Kälte, Hitze, Salinität, Veränderung der Lichtintensität, Sauerstoffmangel im Wurzelbereich und Luftverschmutzung. Zusätzlich können Pflanzen aber auch biotischen Stressen, wie zum Beispiel Viren, Bakterien, Pilzen oder Insekten, ausgesetzt sein.

Zum Schutz gegen Pathogenbefall haben Pflanzen sowohl allgemeine als auch sehr spezifische Abwehrmechanismen entwickelt. Zu den allgemeinen Abwehrmechanismen gehören physikalische Barrieren wie die Kutikula und die Zellwände der Pflanzen, sowie chemische Barrieren in Form von antimikrobiellen Substanzen. Spezifische Abwehrmechanismen treten dann in Kraft, wenn das Pathogen diese Barrieren überwunden hat. Dadurch wird ein Netzwerk aus intra- und interzellulären Signaltransduktionen sowie eine Aktivierung bestimmter Gene induziert, die das Ausbreiten des Pathogens verhindern sollen (DELANEY, 1997).

Ob eine Pflanze gegen ein bestimmtes Pathogen resistent ist, hängt davon ab, wie schnell die Erkennung des Pathogens erfolgt und wie effektiv die Abwehrmechanismen aktiviert werden. Suszeptible Pflanzen haben eine langsame und schwache Abwehr, so dass die Vermehrung und Ausbreitung des Pathogens zum Tod der Pflanze führen kann. In diesem Fall wird das Pathogen als virulent bezeichnet und die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen als kompatibel.

### 1.1.1 Die lokale Pathogenabwehr der Pflanze

Bei resistenten Pflanzen unterscheidet man zwei unterschiedliche Resistenzmechanismen, die nach dem Befall mit einem Pathogen aktiviert werden können, die wirtsspezifische und die nichtwirtsspezifische Resistenz. Bei der wirtsspezifischen Resistenz wird das Avirulenzprotein (avr) eines Pathogens durch spezifische Pflanzenresistenzproteine (R) erkannt und dadurch eine schnelle Abwehr induziert (Gen-für-Gen Modell, FLOR, 1955; VAN DER BIEZEN und JONES, 1998). Häufiger tritt die nichtwirtsspezifische Resistenz auf, bei der keine avr/R Interaktion stattfindet. Statt dessen werden die Pathogene durch bestimmte konservierte Strukturen, sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular pattern), von der Pflanze erkannt. PAMPs sind normalerweise für den bakteriellen Stoffwechsel und/oder die Pathogenität wichtig und kommen daher in derselben Form in verschiedenen Pathogenen vor. Beispiele für PAMPs sind Chitin, Lipopolysaccharide, Peptide oder Flagellin. Mit Hilfe von speziellen Rezeptoren werden die PAMPs von der Pflanze erkannt und die Abwehr induziert (KIM *et al.*, 2005; PARKER, 2003). Daher laufen ähnliche biochemische Prozesse wie bei der wirtsspezifischen Erkennung ab, so dass die angreifende Pathogene schnell abgewehrt werden können.

Nach der Erkennung des Pathogens werden direkt an der Infektionsstelle Abwehrmechanismen aktiviert. Als eine der ersten Reaktionen erfolgt in der Pflanze im Rahmen der HR (hypersensitive response) ein sogenannter oxidativer „burst“, bei dem sehr schnell hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden (APOSTOL *et al.*, 1989; LAMB und DIXON, 1997). Die Bildung der ROS geschieht im Apoplasten durch eine NADPH-abhängige Oxidase, welche mit NADPH als Elektronendonator die Entstehung von Superoxid aus Sauerstoff katalysiert (SAGI und FLUHR, 2001). Das im Apoplasten gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffundiert in die Zellen und löst dort die Pflanzenabwehr und den programmierten Zelltod aus (DANGL und JONES, 2001). Die Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erfolgt während einer inkompatiblen Interaktion von Pflanze und Bakterium in zwei Phasen. Auf eine erste, sehr schnelle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulation folgt eine zweite, sehr lang anhaltende H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion. Im Verlauf dieser hypersensitiven Antwort entstehen nekrotische Läsionen am Infektionsort, die auf einen lokalen programmierten Zelltod zurückzuführen sind (LAM *et al.*, 2001). Bei einer kompatiblen Interaktion, in der das Pathogen die Pflanzenabwehr durchdringt,

erfolgt nur die erste Phase der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Akkumulation und es entstehen keine nekrotischen Läsionen (BAKER und ORLANDI, 1995).

Zusätzlich zur ROS Bildung werden bei der Abwehr pflanzliche Schutzgene induziert, die zum Beispiel für Glutathion *S*-Transferasen und Proteinase-Inhibitoren codieren, und es erfolgt ein Anstieg des Glutathiongehaltes in den befallenen Blättern (NOCTOR *et al.*, 2002). Oft kommt es auch zur Änderung der Ionenflüsse über den Membranen und zur Verstärkung der Zellwände durch Kallose, Lignin und Suberin Einlagerungen (VAN LOON *et al.*, 1999). Dadurch wird die Ausbreitung und Vermehrung der Pathogene verhindert. Parallel werden an den infizierten Stellen und später auch in der ganzen Pflanze *PR*-Gene (*pathogenesis-related*) exprimiert (KOMBRINK und SOMSSICH, 1997). Die Funktion der *PR*-Proteine ist noch weitgehend unbekannt, aber für einige wurde *in vitro* antimikrobielle Aktivität nachgewiesen (VAN LOON *et al.*, 1999).

Die systemische Expression der *PR*-Gene ist ein Hinweis auf die Etablierung eines molekularer Schutzschildes, welches die gesamte Pflanze über einen langen Zeitraum gegen eine Vielzahl von Pathogenen schützt.

### 1.1.2 Systemisch erworbene Resistenz

Unter einer systemischen Pathogenresistenz (SAR: systemic acquired resistance) versteht man eine lang anhaltende Resistenz gegen ein breites Spektrum von Mikroorganismen, in Pflanzen, die eine Erstinfektion überlebt haben. Auf molekularer Ebene wird die SAR durch die gesteigerte Expression verschiedener *PR*-Gene charakterisiert. Das wichtigste Signalmolekül der systemischen Resistenz ist die Salizylsäure, welche als Signal für die Induktion der SAR dient. So zeigten MALAMY *et al.* (1990), dass in Tabakpflanzen nach der Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus sowohl im lokalen als auch im systemischen Gewebe die Salizylsäurekonzentration anstieg und dies mit der Induktion von *PR*-Genen korrelierte. In Pflanzen, die keine Erstinfektion erlebt haben, kann durch exogene Zugabe von Salizylsäure eine SAR ausgelöst und die gleiche Gruppe von *PR*-Genen induziert werden (KLESSIG und MALAMY, 1994; WARD *et al.*, 1991). Dass Salizylsäure als endogenes Signal für die SAR benötigt wird, zeigten

GAFFNEY *et al.* (1993), indem sie das bakterielle *NahG*-Gen in Pflanzen exprimierten. *NahG* codiert für eine Salizylat-Hydroxylase, die eine Umwandlung von Salizylsäure zu Catechol katalysiert. Diese Pflanzen akkumulierten nach einer Pathogeninfektion nur geringe Mengen an Salizylsäure und waren nicht in der Lage, *PR*-Gene zu induzieren oder eine SAR zu etablieren.

### **Das systemische Signal der SAR:**

JENNS und KUC (1979) zeigten in Pfropfungsexperimenten, dass in den lokalen Blättern ein systemisches Signal für die SAR produziert wird. Über die Natur dieses Signals gibt es verschiedene Theorien.

Lange Zeit wurde vor allem Salizylsäure als systemisches Signal diskutiert. Studien mit „*in vivo*“ <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-markierter Salizylsäure zeigten, dass 69% der Salizylsäure in systemischen Geweben in den infizierten Blättern gebildet und von dort aus exportiert wurden (SHULAEV *et al.*, 1995). Allerdings gibt es auch Studien, die zeigen, dass Salizylsäure nicht das systemische Signal sein kann. In Experimenten mit Tabakpflanzen wurde auf eine *NahG*-exprimierende Pflanze eine Wildtyppflanze aufgepfropft. Obwohl der *NahG* exprimierende Teil keine Salizylsäure akkumulieren konnte, wurde nach einer Infektion dieses Pflanzenteils das SAR Signal produziert und nach oben in den Teil der Wildtyppflanze transportiert (VERNOOIJ *et al.*, 1994).

In neueren Studien werden Moleküle auf Lipid-Basis als mobiles Signal der SAR diskutiert. In *dir1* (*defective in induced resistance 1*) Mutanten findet eine normale lokale Abwehr der Pathogene statt, aber sie entwickeln keine SAR (MALDONADO *et al.*, 2002). Das Wildtyp DIR1 Protein hat Sequenzähnlichkeiten zu Lipidtransferproteinen und ist wahrscheinlich im Apoplasten lokalisiert. Ein anderes Protein, welches an der Bildung eines systemischen Signals beteiligt sein könnte, ist CDR1 (*constitutive disease resistance 1*). Die Überexpression von CDR1, einer im Apoplasten lokalisierten Aspartat-Protease, führt zur erhöhten SA-Mengen und einer konstitutiven *PR1*-Expression. Es wird vermutet, dass durch die Aktivität von CDR1 ein mobiles Signal gebildet wird, das die Abwehrantwort im systemischen Gewebe auslösen kann. Unterstützt wird dieses Modell durch die Tatsache, dass durch die Inokulation der Zellflüssigkeit von CDR1-überexprimierenden Pflanzen in Wildtyppflanzen sowohl die lokale als auch die systemische Abwehr ausgelöst wird (SUZUKI *et al.*, 2004).

### **Die Rolle der Salizylsäure in der SAR:**

Obwohl Salizylsäure wahrscheinlich nicht als systemisches Signal dient, bleibt sie eine wesentliche Komponente der SAR. Die Synthese der Salizylsäure während der SAR erfolgt über den Isochorismat-Weg. Pflanzen mit einer Mutation im *ICS1* (*Isochlorismate-Synthase 1*)-Gen, zum Beispiel *sid2* und *eds16*, können nach einer Infektion nur 5-10% der Salizylsäuremengen von Wildtyppflanzen akkumulieren und zeigen eine eingeschränkte basale und systemische Resistenz (WILDERMUTH *et al.*, 2001). Normalerweise erfolgt nach Pathogenbefall sowohl im lokalen als auch im systemischen Gewebe eine Induktion der *ICS1*.

Die Kontrolle der Salizylsäuresynthese ist ein wichtiger regulatorischer Schritt in der Aktivierung der SAR. Zu den Mutanten, die nach Pathogenbefall nur geringe Mengen an Salizylsäure bilden können, gehören die *eds1* (*enhanced disease susceptibility 1*) und *pad4* (*phytoalexin deficient 4*) Mutanten, die beide einen Defekt in einem Lipase-ähnlichen Protein haben (FALK *et al.*, 1999; JIRAGE *et al.*, 1999). Normalerweise verstärken EDS1 und PAD4 nach einer Pathogeninfektion ihre eigene Expression durch eine positive Rückkopplung, und die erhöhten Mengen an EDS1 und PAD4 induzieren dann eine verstärkte Salizylsäureproduktion (FEYS *et al.*, 2001). In den *eds1*- und *pad4*-Mutanten führt die Infektion mit Pathogenen, die einen EDS1-unabhängigen Signaltransduktionsweg induzieren, zu einer normalen HR, aber nicht zur Akkumulation von Salizylsäure oder einer Ausbildung der SAR (ZHOU *et al.*, 1998). Auf der Suche nach Komponenten, die in der Signaltransduktionskette oberhalb von *ICS1* agieren, wurden Mutanten mit konstitutiv erhöhten Salizylsäuremengen identifiziert. Die Mutanten *cpr1*, *cpr5* und *cpr6* (*constitutive expresser of PR genes*) zeigen eine konstitutive *ICS1*-Expression und eine erhöhte Resistenz gegen Pathogene. Die Mutanten *ssi4* und *scn1* haben Mutationen in *R*-Genen, die zu einer konstitutiven lokale Abwehr führen und somit wahrscheinlich einen Schritt in der Signalkette oberhalb der SA Synthese beeinflussen (SHIRANO *et al.*, 2002). Ein anderes *R*-Gen, *RPS4*, induziert ebenfalls die Salizylsäuresynthese, benötigt dazu aber EDS1 und PAD4. Eine weitere Komponente in der Regulation der Salizylsäuremengen sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die zusammen mit Salizylsäure in einer Rückkopplungs-Schleife reguliert werden. Auf der einen Seite bindet Salizylsäure an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifizierende Enzyme wie Katalasen und Ascorbat-Peroxidasen (APX),

wodurch die Aktivität der Enzyme gehemmt wird. Dadurch steigen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Mengen an und induzieren eine Signaltransduktionskette, die zur *PR*-Gen Expression und zur Abwehrreaktion der Pflanze führt (CHEN *et al.*, 1993; DURNER und KLESSIG, 1995). Auf der anderen Seite zeigten spätere Studien, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Signalkette oberhalb von Salizylsäure steht. Tabakpflanzen, die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt wurden, zeigten eine Dosis-abhängige Salizylsäureakkumulation und *PRI*-Expression (NEUENSCHWANDER *et al.*, 1995). Es wird vermutet, dass in systemischen Geweben niedrige Salizylsäuremengen und die Entstehung von geringen ROS Mengen („microburst“) zusammenwirken, um eine SAR zu induzieren (DRAPER, 1997).

### **Weitere Komponenten der SAR:**

Bei der Suche nach weiteren Komponenten des Salizylsäure-abhängigen Signalwegs wurde das NPR1/NIM1 (nonexpressor of PR genes / non immunity) Protein identifiziert (CAO *et al.*, 1994). *npr1* Mutanten können nach Pathogeninfektion oder Behandlung mit Salizylsäure nur geringe *PRI*-mRNA Mengen akkumulieren und keine SAR etablieren. Da *npr1* Mutanten außerdem hohe endogene Salizylsäuremengen haben, scheint NPR1 für eine Rückkopplungs-Regulation der Salizylsäuresynthese wichtig zu sein (CAO *et al.*, 1997). NPR1 hat zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen, eine Region mit vier Ankyrinmotiven, eine BTB/POZ-Domäne (broad-complex, tramtrack, bric-a-brac / poxvirus, zinc finger), und eine putative Kernlokalisationssequenz. Normalerweise wird *NPR1* in geringen Mengen in der ganzen Pflanze exprimiert. Nach Pathogenbefall oder SA-Behandlung steigen die mRNA Mengen auf das zwei- bis dreifache an. Eine Überexpression von *NPR1* führt zu einer erhöhten Resistenz der Pflanze aber nicht zur konstitutiven Expression der *PR*-Gene (CAO *et al.*, 1998). Außerdem reicht eine erhöhte Expression von *NPR1* nicht aus, um eine SAR auszulösen, da eine zusätzliche Aktivierung des Proteins nötig ist.

Um weitere Komponenten der Signaltransduktionskette zu finden, wurde in verschiedenen „Yeast-two-Hybrid“-Analysen nach Interaktionspartnern für NPR1 gesucht. Eine Gruppe von Interaktionspartnern waren die Mitglieder der TGA Familie, die zur Klasse der pflanzlichen bZIP-Transkriptionsfaktoren gehören. Sie besitzen eine basische DNA-Bindedomäne und eine Leucin-reiche Region, welche eine  $\alpha$ -Helix bildet und für die Dimerisierung der Faktoren nötig ist. TGA-Faktoren binden als

Dimere an *as-1* (*activating sequence*) oder *as-1*-ähnliche Promotorelemente (KATAGIRI *et al.*, 1989), die in vielen Genen, die an der Pflanzenabwehr beteiligt sind, vorkommen. Zum Beispiel konnte LEBEL *et al.* (1998) in der Promotorregion von *PR1* zwei *as-1* ähnliche Elemente nachweisen, die als Bindungsstellen für TGA-Faktoren dienen.

Die Bedeutung der TGA-Faktoren für die Ausbildung der SAR zeigten Studien von ZHANG *et al.* (2003) an *tga6-1 tga2-1 tga5-1* Knock-Out Pflanzen. Durch die Behandlung mit INA konnte in den Mutanten weder eine *PR*-Gen Expression noch eine Pathogenresistenz induziert werden. Auch die Infektion mit avirulenten Pseudomonaden führte zu keiner systemischen Resistenz. Das zeigt, dass diese drei TGA-Faktoren wie NPR1 als positive Regulatoren der SAR dienen.

TGA-Faktoren und NPR1 werden in der Pflanze konstitutiv exprimiert, aber eine Interaktion findet nur nach Induktion mit Salizylsäure statt. NPR1 existiert im Cytosol in einer oligomeren Form, die durch intermolekulare Disulfid-Brücken zwischen den einzelnen Monomeren gebildet wird. MOU *et al.* (2003) zeigten, dass durch Induktion mit INA oder durch Infektion mit Pseudomonaden die Cysteinreste der Disulfid-Brücken reduziert werden und NPR1 dadurch von der oligomeren Form zu Monomeren umgewandelt wird. Als Monomer kann NPR1 in den Kern gelangen und dort mit den TGA-Faktoren interagieren, um die *PR*-Gen Expression zu induzieren.

Eine weitere wichtige Komponente im SAR-Signalweg ist das SNI1-Protein, das als Suppressor von NPR1 entdeckt wurde. Die rezessive *sni1* (*suppressor of npr1-1, inducible 1*) Mutante stellt im *npr1* Hintergrund die Induzierbarkeit der *PR*-Gene durch Salizylsäure und die Resistenz bei Pathogenbefall wieder her (LI *et al.*, 1999). Da die *sni1* Mutante ohne Induktion der SAR normale Salizylsäuremengen und nur eine leicht erhöhte Expression der *PR*-Gene aufweist, wird davon ausgegangen, dass *sni1* in der Signaltransduktionskette unterhalb von *npr1* agiert. Ein mögliches Modell könnte sein, dass SNI1 ein negativer Regulator der *PR*-Gen Expression und der SAR ist, dessen reprimierende Wirkung durch NPR1 aufgehoben wird. Da SNI1 über keine DNA-Bindedomänen verfügt, scheint seine reprimierende Wirkung nicht durch direkte Bindung an bestimmte Promotoren stattzufinden, sondern durch Interaktion mit anderen Faktoren. Als mögliche Interaktionspartner werden zur Zeit WRKY Faktoren diskutiert (DURRANT und DONG, 2004), da unter anderem im *PR1*-Promotor W-Box (WRKY

binding sites) Motive vorhanden sind (LEBEL *et al.*, 1998). NOUTOSHI *et al.* (2005) konnten in Gelretardationsanalysen zeigen, dass das WRKY-Protein SLH1 (sensitive to low humidity1) an die W-Box des *PcPRI-1* Gens aus Petersilie bindet. Weiterhin konnten sie in *Arabidopsis slh1*-Mutanten, in denen die WRKY-Domäne von *SLH1* mutiert ist, eine erhöhte konstitutive *PRI*-Expression nachweisen.

Dass in der *sn1/npr1* Doppelmutante eine geringe basale Expression der *PR*-Gene vorhanden ist und ihre Expression durch Induktion gesteigert werden kann, ist ein Hinweis, dass neben der NPR1 vermittelten Inaktivierung von SNI1, auch noch ein SA-abhängiger aber NPR1-unabhängiger Signalweg für die Induktion der *PR*-Gene vorhanden ist. Als mögliche Kandidaten für die NPR1-unabhängige Regulation der *PR*-Gen Expression, wird die Familie der *Whirly* (*Why*) Transkriptionsfaktoren diskutiert (DESVEAUX *et al.*, 2002). In Kartoffel konnte DESVEAUX *et al.* (2004) zeigen, dass StWhy1 spezifisch an den *PRI0a* Promotor bindet. In *Arabidopsis* wird durch Salizylsäurebehandlung sowohl in Wildtyp-Pflanzen als auch in *npr1*-Mutanten die DNA-bindende Aktivität von *AtWhy1* induziert. *atwhy1*-Mutanten zeigen nur noch eine reduzierte DNA-Bindung, die SA-induzierte *PRI*-Expression ist vermindert und die Pflanzen sind susceptibler gegen Infektion mit *P. parasitica*. Die NPR1-unabhängige Induktion von *AtWhy1* und die verminderte *PRI*-Expression in der *atwhy1*-Mutante deuten darauf hin, dass *AtWhy1* für die NPR1-unabhängige *PRI*-Expression wichtig sein könnte.

### 1.1.3 Beteiligung des *as-1*-Elementes an der Stressantwort

Das *as-1*-Element (*a*ctivating *s*equences-1) ist ein wichtiges *cis*-Element in den Promotoren vieler Salizylsäure- und/oder Pathogen-aktivierter Gene. Es wurde erstmals 1989 als funktionelles *cis*-Element im *35S*-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus identifiziert (BENFEY *et al.*, 1989). Eine stabile Integration des *35S*-Promotors in das pflanzliche Genom, führt zu einer erhöhten Expression der nachgeschalteten Reportergene (ODELL *et al.*, 1985). Bei einem Minimalpromotor, in dem die Sequenzen stromaufwärts der Position -90 deletiert (*35S(-90)*) wurden, erfolgte die Expression des Reportergens nur noch in Wurzel- und Sprossspitzen oder in Auxin-

bzw. Salizylsäure-induzierten Blättern (BENFEY und CHUA, 1990; QIN *et al.*, 1994). Dieses gewebespezifische und induzierbare Expressionsmuster ist auf das 17 bp lange *as-1*-Element zurückzuführen, welches aus zwei imperfekten Palindromen besteht, die von der Konsensussequenz TGACGTCA abgeleitet sind:

5'- TGACGTAAgggaTGACGCA-3'

*as-1*-ähnliche Elemente sind auch in den Promotoren anderer pflanzenpathogener Viren, wie dem *Figwort Mosaic Virus* (BOUCHEZ *et al.*, 1989) und dem *Commelina Mottle Virus* (MEDBERRY *et al.*, 1992), und in Bakterien (*Agrobacterium tumefaciens*) gefunden worden.

In Pflanzen wurden *as-1*-ähnliche Elemente in den Promotoren von Genen identifiziert, die an der Abwehrreaktion der Pflanze beteiligt sind. Dabei können diese Gene bezüglich ihrer Kinetik nach Salizylsäureinduktion in zwei Klassen eingeteilt werden. Die frühen Gene, wie *GST1* oder *GST6* (*Glutathion-S-Transferase*) aus *Arabidopsis*, werden sehr schnell nach Salizylsäurestimulus exprimiert. Sie benötigen für ihre Induktion keine Proteinneusynthese (YANG *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 1996) und sind außer durch Salizylsäure auch durch Auxin induzierbar (QIN *et al.*, 1994; LIU und LAM, 1994). BLANCO *et al.* (2005) zeigten, dass die frühen Gene in zwei Gruppen eingeteilt werden können: In der ersten Gruppe befinden sich Proteine, die am Schutz der Zelle beteiligt sind, wie zum Beispiel Glutathion *S*-Transferasen oder Glycosyltransferasen. Zu der zweiten Gruppe gehören Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, wie zum Beispiel Proteinkinasen. Während die Gene der zweiten Gruppe für ihre Expression nach SA-Stimulus NPR1 benötigen, erfolgt die Induktion der Gene aus der ersten Gruppe NPR1-unabhängig. Promotoranalysen der frühen Gene zeigten, dass nur in den Promotoren der NPR1-unabhängig regulierten Gene *as-1*-ähnliche Elemente vorkommen. Dabei beträgt der Abstand zwischen den palindromischen Symmetrieachsen des *as-1*-ähnlichen Elementes 12 bp.

Späte Abwehrgene, wie *PRI*, benötigen eine Proteinneusynthese für ihre Aktivierung und werden erst im späteren Zeitverlauf der Induktion exprimiert (UKNES *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den frühen Abwehrgenen können sie nicht durch Auxin induziert werden und der Abstand zwischen den palindromischen Symmetrieachsen des *as-1*-ähnlichen Elementes ist nicht konserviert.

Während der Pflanzenabwehr spielt auch chemischer Stress eine große Rolle, der zum Beispiel während des oxidativen „burst“ entsteht. Da Glutathion *S*-Transferasen cytotoxische Produkte detoxifizieren können und so das Gewebe vor oxidativen Schäden schützen (DANIEL, 1993; LEVINE *et al.*, 1994), könnten *as-1*-ähnliche Elemente auch durch oxidativen Stress induzierbar sein. GARRETON *et al.* (2002) konnten zeigen, dass oxidative Spezies die Salizylsäure-induzierte Aktivierung der *as-1*-ähnlichen Elemente vermitteln.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass *as-1*-ähnliche Elemente sowohl bei der Regulation der frühen als auch der späten SA-induzierbaren Gene eine funktionelle Bedeutung haben. Da sie sowohl durch Salizylsäure als auch durch oxidativen Stress induzierbar sind, können isolierte *as-1*-ähnliche Elemente in Verbindung mit einem Minimalpromotor genutzt werden, um in Pflanzen Untersuchungen über eine Transkriptionsaktivierung von Reportergenen durch einen dieser Stimuli durchzuführen.

## 1.2 Suizidsystem zur Identifizierung von Mutanten der Salizylsäure-abhängigen Signaltransduktion

BRENNER (2002) entwickelte im Rahmen seiner Dissertation ein konditionales Suizidsystem, mit dessen Hilfe *Arabidopsis* Mutanten identifiziert werden sollten, in denen der Signaltransduktionsweg zwischen Salizylsäurestimulus und der Induktion der frühen Abwehrgene unterbrochen ist. Dabei wurde das *as-1*-Element als einziges *cis*-Element in einem Minimalpromotor verwendet, um die Transkription des Suizidgens in ähnlicher Weise wie frühe Abwehrgene zu steuern. Die gesuchten Mutanten wären daran zu erkennen, dass sie Bedingungen überleben, in denen die nicht mutierten Pflanzen sterben, da durch die Mutation das Suizidgen unter der Kontrolle des Minimalpromotors nicht mehr induziert werden kann.

Als Suizidgen wurde eine Aminosäuredeacetylase aus *Stenotrophomonas spec.* verwendet (BARTSCH *et al.*, 1996). Dieses Enzym setzt das ungiftige Pro-Herbzid N-Acetyl-Phosphinothricin (NAcPT) durch Hydrolyse in das giftige Herbizid Phosphinothricin (BASTA) um (BARTSCH *et al.*, 1996; KRIETE *et al.*, 1996). Phosphinothricin hemmt in den Pflanzen die Glutaminsynthetase, welche essentiell für

die Stickstoffassimilation und die Detoxifizierung von Produkten der Photorespiration ist.

Für die Selektion wurde die Deacetylase unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors aus fünf *as-1* Elementen exprimiert. Um zwischen einer Mutation im *Deacetylase*-Gen (*Deac*) und einer Mutation in der Signaltransduktionskette unterscheiden zu können, wurde als zweites Reportergen die  $\beta$ -*Glucuronidase* (*Gus*) unter der Kontrolle des gleichen Promotors in die Pflanzen transformiert. In den daraus entstandenen homozygoten 5GuDe-Pflanzen (5 x *as-1* Gus, 5 x *as-1* Deac) zeigte sich, dass der 5 x *as-1* Promotor eine starke Hintergrundaktivität aufwies. Dadurch war die Expression der Deacetylase auch im uninduzierten Zustand schon so stark, dass in Gegenwart von NAcPT alle Pflanzen starben. Dieses Problem löste BRENNER (2002) durch eine differentielle Selektionsstrategie. Dabei wurden parallel zu den mutagenisierten Pflanzen, die mit Salizylsäure induziert wurden, zwei nicht mutagenisierte Kontrollgruppen mit NAcPT behandelt. Eine dieser Kontrollgruppen wurde ebenfalls induziert, die andere nicht. Die Selektion wurde beendet, wenn die induzierte Kontrollgruppe abgestorben war, die uninduzierte aber noch lebte.

Aus dieser Selektion gingen 60 Überlebende hervor, von denen zwölf Pflanzen nach einer Transkriptionsanalyse als potentielle Signaltransduktionsmutanten identifiziert wurden. In allen zwölf Pflanzen war die Induktion der Reportergene *Deacetylase* und  $\beta$ -*Glucuronidase* deutlich reduziert.

Aus diesen zwölf Pflanzen wurden zwei für eine weitere Analyse im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt (Kapitel 4.1).

### 1.3 Zielsetzung

Um genauere Kenntnisse über den Salizylsäure-abhängigen Signaltransduktionsweg, der während der Pathogenantwort der Pflanzen aktiviert wird, zu gewinnen, müssen die beteiligten Komponenten identifiziert werden.

Daher entwickelte BRENNER (2002) ein Suizidsystem, mit dessen Hilfe Pflanzen identifiziert wurden, die voraussichtlich eine Mutation im Signalweg zwischen Salizylsäurestimulus und der Induktion der Abwehrgene hatten. Durch eine genaue Analyse dieser Pflanzen könnten neue Komponenten der SA-abhängigen Signaltransduktion entdeckt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zwei der Pflanzen, die den Suizidscreen überlebt hatten, genauer zu charakterisieren.

Im ersten Schritt wurden die Ergebnisse von BRENNER dahin gehend überprüft, ob es sich bei den Pflanzen tatsächlich um Signaltransduktionsmutanten handelt.

Im zweiten Schritt wurden die Phänotypen der Pflanzen sowohl im uninduzierten Zustand als auch nach Reaktion auf verschiedene Stressfaktoren analysiert.

Weiterhin wurden die Nachkommen der Kreuzungen von den Mutanten mit *NahG*-Pflanzen analysiert, um die Bedeutung der Salizylsäure für die Phänotypen zu untersuchen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten		Gilson
Bioimager /Phosphoimager	BAS-1000	Fuji
Elektroelutionsapparatur		Werkstatt der Universität
Elektroporationsapparatur	Gene Pulser® 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
Hybridisierungsöfen		Bachhofer
Hybridisierungswasserbad	Belly Dancer	Stovall
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Luciferase Kamera		Hamamatsu
Mörsergerät	MM301	Retsch
Netzgeräte	E323	Benedikt Heinemann
Netzgeräte	EC 105	EC Apparatus Corporation
PCR-Geräte	MiniCycler™ PTC-150	MJ Research
Peristaltikpumpe	Cyclo 1	Roth
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Real-time PCR Gerät	MJMini	Biorad
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Sequenzanalysegerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Spektralphotometer für Mikrotiterplatten	MRX Dynex Plate Reader	Dynex
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	UJ3S	Christ
Sterilbank, horizontales Gebläse	Microflow Laminar	Nunc
Sterilbank, vertikales Gebläse	Microflow Biohazard	Nunc

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Szintillationsmeßgerät		Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
Ultraschallgerät	Soniprep 150	MSE
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Elektroporationsküvetten	BioRad
Fließpapier 3MM	Whatman
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner; Roth; Sarstedt
Mikrotiterplatten	Roth
Nylon-Membran Hybond N <sup>+</sup>	Amersham
Parafilm M	American National Can <sup>TM</sup>
PVDF-Membran Immobilon <sup>TM</sup> -P	Millipor

## 2.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller / Lieferant
Abcisinsäure	Sigma
Agarose SeaKem LE	Biozym
Ampicillin	AGS
Bakto Pepton	Difco
Bromphenolblau	Roth
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] dATP ; 800 Ci/mmol	Hartmann Analytic
[ $\alpha$ - <sup>33</sup> P]	Hartmann Analytic
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DNTPs	MBI; Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid	Roth
HEPES	Roth
Heringsperma-DNA (HSP)	Sigma

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Hydroxyethyl-Cellulose medium vis. (HEC)	Fluka
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Bio Tech Trade
Jasmonsäure	Aldrich
Kanamycin	Sigma
Luciferin	Synchem
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth
Murashige und Skoog Medium	Duchefa
Orange G	Sigma
Phenol	AppliChem
Phenylmethansulfonylchlorid (PMSF)	Fluka
Polydesoxyinosin-desoxycytidylsäure (PolydI/dC)	Sigma
Rifampicin	Duchefa
Salicylsäure (SA)	Merck
Select Agar	Life Technologies
Streptomycin	Duchefa
Triton X-100	Roth
Tween20	Roth
X-Gal	Bio Tech Trade
X-Gluc	Roth

## 2.4 Kits

<b>Kit</b>	<b>Hersteller / Bezugsquelle</b>
BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin-Elmer Corporation
DNeasy Kit	Quiagen
ET-Mix	ABI PRISM™
Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek
Megaprime™ DNA Labelling Systems	Amersham Life Science
Nucleo Spin® Extrakt II	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Plasmid	Macherey-Nagel
pGEM®-T Vector System	Promega
Qiagen Plasmid Preparation Kits (Midi, Maxi)	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

## 2.5 Enzyme

Enzym	Hersteller / Bezugsquelle
AmpliTaq <sup>®</sup> DNA Polymerase, FS	ABI PRISM <sup>™</sup>
Immolase	Bioline
Klenow-DNA-Polymerase exo <sup>-</sup>	MBI Fermentas
MolTaq	Molzym
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas
RNase A (DNase-frei)	Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

## 2.6 Nucleinsäuren

### 2.6.1 Primer

Die Primer wurden von den Firmen OPERON Biotechnologies, GIBCO BRL sowie MWG synthetisiert.

Die Schmelzpunkte ( $T_m$ ) errechnen sich nach folgender Formel:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC-Gehalt}) - 650 / n \quad (n = \text{Anzahl der Nukleotide})$$

Primer	Sequenz 5' → 3'	$T_m$ [°C]
CNGC4 fwd	GGG GTC AGA GAA AAT CAG AAC	60,6
CNGC4 rev	ACG AAC AGG GCC TAT ATA CAC	60,6
GST11 fwd	CTCCACCTTGCTTTAAGAACA	59,4
GST11 rev	GAGGTCATCGCCACTTTATTC	60,9
nahG anti	TCG GTG AAC AGC CAC TTG CAC	62,4
nahG sense	GCC TTA GCA CTG GAA CTC TG	62,4
ICS1-2 fwd	GCT GTT TCT TCT CTC GTC CG	60,1
ICS1 rev	CTG CCC TAG TTA CAA CCC GAA AAG	64,6
Oligo(dt)	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT	39,9
PR2 fwd	CCT CTC AGC CTT GTA ATA GCT TCC	61,8
PR2 rev	GCC CAC AAG TCT CTA AGG ATT AGT	61,2
PR5 fwd	CTC CAG TAT TCA CAT TCT CTT CCT CG	65,5
PR5 rev	ACC CGA CTG TAT CTA ACT CGA AGC	64,1
RD22 fwd	GGTGGCTAAGAAGAACGCAC	62,5
RD22 rev	CACACAACATGAGTCTCCGG	62,5
RD29a fwd	TTA CAC CAA ACC CAC TGA ATC	58,6
RD29a fwd	TTA CAC CAA ACC CAC TGA ATC	58,6
Rev23	TTC ACA CGG AAA CAG CTA TGA C	62,4
Uni24	ACG ACG TTG GTA AAA CGA CGG CCA G	71,9
WRKY25 fwd	TTC TTG GTT CTT CCG GCG TTG	62,6
WRKY25 rev	CTC TCT CGT CTG CTG CGG ATC	66,5

## 2.6.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pCIB200-NahG	Binärer Vektor, enthält die Codierregion des <i>NahG</i> -Gens inseriert zwischen einem 2 x 35S-Promotor und dem <i>tml-3'</i> Terminator, <i>km<sup>r</sup></i>	Syngenta
pGEM-GST11	<i>GST11</i> -Gen aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pGEM-T (pGEM® 52f (+) Vektor mit Eco RV linearisiert, an beiden 3' Enden ein Thymidin angehängt), <i>amp<sup>r</sup></i>	WEIGEL, unveröffentlicht
pGEM-PDF1.2	pGEM-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>PDF1.2</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	HERDE, unveröffentlicht
pGEM-T	PGEM-5Zf(+)-Derivat, nach Linearisierung mit EcoRV wurden dT-Überhänge an die 3'-Enden angehängt, Klonier- und Sequenziervektor, <i>amp<sup>r</sup></i>	Promega
pSK-T	Klonier- und Sequenziervektor, <i>lacZα</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	KRIETE, unveröffentlicht
pSK-AtPR1	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>PR1</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	BRENNER, 2002
pSK-CNGC4	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>CNGC4</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pSK-(-90)Deac	-90-Fragment des CaMV 35S-Promotors vor dem Deacetylasegen aus <i>Stenotrophomonas spec</i> und dem ocs-Terminator, <i>amp<sup>r</sup></i>	BRENNER, 2002
pSK-ICS1	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>ICS1</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pSK-RD22	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>RD22</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pSK-RD29a	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>RD29a</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	diese Arbeit
pSK-WRKY25	pSK-T-Derivat, enthält die Codierregion der <i>WRKY25</i> -cDNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>amp<sup>r</sup></i>	diese Arbeit

### 2.6.3 Hybridisierungssonden

Sonde	Eigenschaften	Referenz
CNGC4	2025 bp Fragment mit den Primern CNGC4 fwd / CNGC4 rev aus dem Plasmid pSK-CNGC4 amplifiziert	diese Arbeit
DEAC	990 bp <i>Eco</i> 91I Fragment aus pSK-(-90) Deac	BRENNER, 2002
GST11	700 bp Fragment mit den Primern GST11 fwd / GST11 rev aus pGEM-AtGST11 amplifiziert	WEIGEL, unveröffentlicht
ICS1	1578 bp Fragment mit den Primern ICS1-2 fwd / ICS1 rev aus pSK-ICS1 amplifiziert	WEIGEL, unveröffentlicht
PDF1.2	731 bp Fragment mit den Primern uni24 / rev 23 aus pGEM-PDF2.1 amplifiziert	diese Arbeit
PR-1	500 bp <i>Eco</i> RI-Fragment aus pSK-AtPR1	BRENNER, 2002
RD22	307 bp Fragment mit den Primern RD22 fwd / RD22 rev aus pSK-RD22 amplifiziert	diese Arbeit
RD29a	1031 bp Fragment mit den Primern RD29a fwd / RD29a rev aus pSK-RD29a amplifiziert	diese Arbeit
ZAT7	696 bp Fragment mit den Primern uni24 / rev23 aus der REGIA Stammsammlung (pUC-Derivat) amplifiziert	diese Arbeit
ZAT12	678 bp Fragment mit den Primern uni24 / rev23 aus der REGIA Stammsammlung (pUC-Derivat) amplifiziert	diese Arbeit
WRKY25	1092 bp Fragment mit den Primern WRKY25 fwd / WRKY25 rev aus pSK-WYRKY25 amplifiziert	diese Arbeit

### 2.6.4 DNA Fragmentlängenstandarts

Als Fragmentlängenstandard wurde der MassRuler™ DNA Ladder Mix der Firma MBI Fermentas verwendet.

Fragmentgrößen in bp:

10000 / 8000 / 6000 / 5000 / 4000 / 3500 / 3000 / 2500 / 2000 / 1500 / 1200 / 1031 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

## 2.7 Organismen

### 2.7.1 Bakterien

Bakterienstamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , <i>gyrA96</i> (Nalr), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>glnV44</i> , <i>deoR</i> , D ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 [p80dD( <i>lacZ</i> )M15]	HANAHAH (1983)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 (pLARR3)	pLAFR3	INNES et al., 1993
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato DC3000 (pABL18) avr Rpt2	pABL18	INNES et al., 1993
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola ES4326	pLAFR3	WHALEN et al., 1991
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. maculicola ES4326 avrRpt2	pLH12	WHALEN et al., 1991

### 2.7.2 *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

Pflanze	Beschreibung	Referenz
Columbia, Col-0	Wildtyp	NASC Stock Nr. N1092, NASC 2002
<i>aca38#8</i>	F2-Generation der Linie <i>ana38</i> (BRENNER, 2002) aus der EMS-Mutagenese von 5GuDe	diese Arbeit
<i>aca41=ana41</i>	Eine der Linien aus der EMS-Mutagenese von 5GuDe	BRENNER, 2002
<i>cpr5-2</i>	Mutante, die das <i>PR5</i> -Gen konstitutiv exprimiert	BOWLING et al., 1997
<i>ICS1::LUC</i>	Transgene Pflanze im Col-0 Hintergrund, die die Codierregion des <i>Luciferase</i> -Gens unter der Kontrolle des <i>ICS1</i> -Promotors exprimiert	Jonathan Jones
<i>NahG</i>	Transgene Col-0 Pflanze, die das <i>NahG</i> -Gen (Salizylhydroxylase, baut SA zu Catechol ab) exprimiert	GAFFNEY et al., 1993
<i>npr1-1</i>	Mutante, die eine Punktmutation im <i>NPRI-1</i> Gen hat	CAO et al., 1994

<b>Pflanze</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
5GuDe	Transgene Linie im Col-0 Hintergrund, die die Codierregion der <i>Deacetylase</i> und des <i>GUS</i> Gens unter der Kontrolle von 5 <i>as-I</i> -Elementen exprimiert	BRENNER, 2002
5GuDe x <i>ICS1::LUC</i>	Kreuzung zwischen 5GuDe und <i>ICS1::LUC</i> (Donorpflanze)	diese Arbeit
<i>aca41</i> x <i>ICS1::LUC</i>	Kreuzung zwischen <i>aca41</i> und <i>ICS1::LUC</i> (Donorpflanze)	diese Arbeit
<i>aca41</i> x <i>NahG</i>	Kreuzung zwischen <i>aca41</i> und <i>NahG</i> (Donorpflanze)	diese Arbeit
<i>cpr5</i> x <i>ICS1::LUC</i>	Kreuzung zwischen <i>cpr5</i> und <i>ICS1::LUC</i> (Donorpflanze)	diese Arbeit

## 2.8 Nährmedien und Zusätze

### 2.8.1 Nährmedium für Bakterien

**dYT-Medium** 20 g/l Trypton; 10 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

**King's B-Medium** 10 g/l Proteose-Pepton Nr.3; 1,5 g/l di-Kaliumhydrogenphosphat; 15 g/l Glyzerin; pH 7 mit HCl; nach dem Autoklavieren zugeben: 5 ml/l 1M MgSO<sub>4</sub>; Antibiotika nach Bedarf

**LB-Medium** 10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl

**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

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

### 2.8.2 Nährmedien für Pflanzen

**2 MS-Medium** 4,4 g/l MS-Medium; 20 g/l Saccharose; pH 5,8 mit KOH

### 2.8.3 Zusätze

Zusatz	Endkonzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100 mg/l	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Gentamycin	25 mg/l	25 mg/ml in H <sub>2</sub> O
IPTG	60 µl pro Platte	26 mg/ml in DMF
Kanamycin	50 mg/l	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Rifampicin	50 mg/l	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O mit HCl
Spektomycin	10 mg/l	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Streptomycin	100mg/l	20 mg/ml in H <sub>2</sub> O
Tetracyclin	10 mg/l	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
X-Gal	60 µl pro Platte	20 mg/ml in DMF
X-Gluc	2 mM	100 mM in DMF

### 2.9 Standardlösungen und Puffer

**SSC (20 x)**      2 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl

**TAE (20 x)**      0,8 M Tris, 2,3 % (v / v) Essigsäure, 20 mM EDTA

**TE**                10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5

## **3 Methoden**

### **3.1 Anzucht und Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen**

Die Medien für die Anzucht von *Escherichia coli* und *Pseudomonas syringae* enthielten entsprechende Antibiotika, um das Wachstum von Resistenz-tragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die Inkubation von Flüssigkulturen wurde im Schüttler bei 250 rpm durchgeführt.

#### **3.1.1 Anzucht von *Escherichia coli***

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

#### **3.1.2 Anzucht von *Pseudomonas syringae***

Die Anzucht der Bakterien erfolgte in King's B-Medium (KING et al., 1954) bei 28°C für 2 Tage.

#### **3.1.3 Dauerhafte Lagerung von Bakterienkulturen**

150 µl einer Bakterienkultur wurden mit 850 µl sterilem 87% Glycerin versetzt und gründlich gemischt. Diese Glycerinkulturen können bei -80°C über mehrere Jahre gelagert werden.

#### **3.1.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen**

##### **3.1.4.1 Anzucht auf Erde**

Vor der Aussaat wurde die Erde einmal für 30 min bei 90°C gedämpft. 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 entweder unter Langtags- (16 h Licht, 8 h Dunkel) oder unter Kurztags- (8 h Licht, 16 h Dunkel) Bedingungen.

### 3.1.4.2 Anzucht in Sterilkultur

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (Kapitel 3.1.5) 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.

Für die Paraquat-Behandlung wurde MS-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Paraquat verwendet.

### 3.1.5 Oberflächensterilisation von Samen

Die Oberflächensterilisation erfolgte in Anlehnung an CLOUGH und BENT (1998 und 2000).

*Arabidopsis* Samen wurden in geeigneten Gefäßen (Kunststoff, 0,5 – 50 ml) mit geöffnetem Deckel in einem Exsikkator platziert. Ein Becherglas mit etwa 100 ml konzentrierter Hypochloritlösung wurde dazugestellt und mit 5 mL konzentrierter Salzsäure versehen. Der Exsikkator wurde rasch geschlossen und ein geringes Vakuum angelegt, um den Exsikkator luftdicht zu verschließen, und eine Verdünnung des Chlorgases zu vermeiden. Nach 4 h war eine ausreichende Sterilisation erreicht.

### 3.1.6 Kreuzung von *Arabidopsis 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. Für eine Kreuzung wurden daher junge, kräftige Blütenstände ausgewählt, an denen bereits zwei bis drei Blüten geöffnet waren. Von diesen Blütenständen wurden oberhalb der geöffneten Blüten zwei bis drei noch geschlossene Knospen für die Kreuzung verwandt. Alle Manipulationen wurden mit Hilfe eines Binokulars beobachtet.

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 Donorpflanze wurde dann ein frisches Staubblatt entnommen und der Pollen auf dem Pistill der emaskulierten Blüte abgestreift. Anschließend wurde mit dem Binokular überprüft, ob Pollen auf dem Pistill hängen geblieben war und wenn nötig die Bestäubung mit einem neuen Staubblatt wiederholt. Die gekreuzten Knospen wurden durch Entfernen der unterhalb liegenden Blüten und der oberhalb befindlichen ein bis zwei Knospen isoliert und der gekreuzte Blütenstand mit einem kleinen Umhängeschild markiert.

### 3.1.7 Samengewinnung aus *Arabidopsis thaliana*

Zur Ernte von Samen einzelner Pflanzen wurden Aracons (Lehle Seeds, RoundRock, TX, 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. Bei fortschreitender Samenreife wurden die Pflanzen aus der Klimakammer entfernt und im Gewächshaus getrocknet. Nach dem Trocknen wurden die Blütenstände abgeschnitten und zur Aufbewahrung in Butterbrottüten gesteckt.

### 3.1.8 Infektion von *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit Pseudomonaden

Zur Bestimmung der Verbreitung von Pathogenen innerhalb einer Pflanze werden die Mikroorganismen isoliert und ihre Kolonienzahl durch Titern ermittelt, indem die Bakterien auf einem semi-selektiven Medium ausgezählt werden (modifiziert nach KNOCHE und DUVICK, 1987). Zur Quantifizierung des Bakterienwachstums wurden von den Pseudomonaden ü.N. Vorkulturen angezogen, abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT) und die optische Dichte bestimmt.

#### 3.1.8.1 Bestimmung des Bakterienwachstums in Pflanzen nach Infiltration

Für die Infiltration wurden die Pseudomonaden auf eine Dichte von  $5 \times 10^5$  cfu / ml mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> verdünnt. Eine Blatthälfte wurde mit einer 1 ml-Spritze ohne Nadel von der Blattunterseite infiltriert. Das Volumen einer Inokulation betrug ca. 10 µl.

Das Bakterienwachstum wurde zu den Zeitpunkten 0 Tage (etwa 1 h nach der Behandlung) und 3 Tage nach Infektion aufgenommen. Von 9 infizierten Pflanzen wurden die Infektionsflächen (Ø 0,5 cm) infiltrierter Blatthälften ausgestochen, zusammengefasst und in 240 µl 10 mM MgCl<sub>2</sub> homogenisiert. Die homogenisierten Proben wurden jeweils kurz gemischt und in einer Verdünnungsreihe (Tag 0: 1:10, 1:50, 1:250, 1:500; Tag 3: 1:100, 1:500, 1:5000, 1:50000) auf King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 28 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien ausgezählt. Es wurden die Bakterienzahlen der gleichen Linien gemittelt und die Standardabweichung ermittelt.

### 3.1.8.2 Bestimmung des Bakterienwachstums in Pflanzen nach „Dippen“

Für diese Methode wurden die Pseudomonaden auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$  cfu / ml mit 10mM  $MgCl_2$  verdünnt und 0,002% Silwett zugegeben. Anschließend wurden Netzballen mit ca. 20 3 Wochen alten Pflanzen in diese Bakteriensuspension getaucht.

Am Infektionstag und nach 3 Tagen wurden von jeder Linie 8-12 Blättchen geerntet und zusammen in 1 ml 10 mM  $MgCl_2$  für 15min geschüttelt. Die Proben wurden dann in einer Verdünnungsreihe (Tag 0: 1:10, 1:50; Tag 3: 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000) auf King's B-Medium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Platten wurden 2 Tage bei 28 °C inkubiert und die Anzahl der Kolonien ausgezählt.

Bei einigen Experimenten wurden die Pflanzen sowohl einen Tag vorher als auch am Morgen des Infektionstages mit 0,1 mM Salizylsäure vorbehandelt.

### 3.1.8.3 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit Pseudomonaden für eine RNA-Isolation

Die Infektion von *A. thaliana* mit Pseudomonaden erfolgte durch Dippen der Blätter in eine Suspension mit Pseudomonaden von einer  $OD_{600} = 0,2$  in 10 mM  $MgCl_2$  mit 0,002% Silwett. Die Pflanzen wurden anschließend bei hoher Luftfeuchtigkeit unter einer Haube kultiviert.

### 3.1.9 Induktion der Genexpression in *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

*Arabidopsis thaliana* in Erdkultur wurden durch Besprühen mit wässrigen Lösungen mittels handelsüblicher Sprühflaschen, die in der Lage waren, einen feinen Sprühnebel zu erzeugen, besprüht, bis die Pflanzen gut benetzt waren. Die Induktionslösungen wurden für jede Sprühbehandlung frisch hergestellt.

Folgende Konzentrationen wurden verwendet:

1 mM Salizylsäure; 100  $\mu$ M 2,4-D; 0,1 mM ABA; 1 mM Luciferin; 200 mg/l N-Acetylphosphinothricin

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Methoden zur Isolierung von Plasmid-DNA**

#### **3.2.1.1 Analytische Mengen**

##### **3.2.1.1.1 Alkalische Lyse**

Zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken wurde eine modifizierte alkalische Lyse der Bakterien (BIRNBOIM & DOLY, 1979; ISH-HOROWICZ & BURKE, 1981) vorgenommen. 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden pelletiert (1 min, 13000 rpm) und die Zellen nach Dekantieren des Überstandes in 100 µl Lösung I resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte im alkalischen Milieu durch Zugabe von 200 µl Lösung II. Nach Invertieren wurde zur Neutralisation 150 µl Lösung III zugegeben, der Ansatz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation (5 min, 15000 rpm, 4°C) sedimentiert. Die obere, wässrige Phase wurde zur Präzipitation der DNA mit 2,5 Volumen Ethanol (-20°C) gemischt und 1 h bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 10 min, 15000 rpm, 4°C zentrifugiert. Die pelletierte DNA wurde mit 70% Ethanol gewaschen und für 10 min im gekühlten SpeedVac Concentrator getrocknet. Die gewonnene DNA wurde in 100 µl TE gelöst und kann zur Restriktionsanalyse eingesetzt werden

##### **3.2.1.1.2 Plasmidisolierung mit dem QIAprep Spin Miniprep-Kit**

Für Sequenzierreaktionen wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen isoliert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend vom Protokoll wurden stets 3 ml stationäre *E. coli*-Kultur eingesetzt und die DNA mit 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert.

##### **3.2.1.2 Präperative Mengen**

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

### 3.2.1.2.1 DNA-Elution aus Agarosegelen

Für die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (Kapitel 3.2.3.2.1) wird der QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

## 3.2.2 Methode zur Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis*

### 3.2.2.1 Schnellextraktion für eine anschließende PCR

100 mg Pflanzenmaterial wurden in 200 µl Microprep Puffer (25% DNA Extraktionspuffer (350 mM Sorbit, 100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 7,5), 25% Kernlysepuffer (200 mM Tris-Base, 50 mM EDTA, 2 M Natriumchlorid, 2% Cetyltrimethylammoniumbromid), 10% Sarcosyllösung (5% w/v), 40% Wasser, 0,3 g Natriumbisulfid / 10 ml Puffer) aufgenommen und mit der Bohrmaschine zerkleinert. Anschließend wurden 550 µl Microprep Puffer dazugegeben. Die Suspension wurde gut durchmischt und 30-120 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 700 µl 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 µl TE aufgenommen.

## 3.2.3 Methoden zur Charakterisierung von Nukleinsäuren

### 3.2.3.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der GeneQuant II der Firma Pharmacia verwendet. Da die Absorption von Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich bei 260 nm gemessen werden kann, ließ sich hierdurch die Konzentration der DNA bestimmen. Das Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge wurde durch die Anregung des  $\pi$ -Elektronensystems in den Heterozyklen der Basen hervorgerufen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht somit eine  $OD_{260}$  von 1,0 einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg / ml bei dsDNA und 40 µg / ml bei RNA. Im Vergleich zur Absorption bei der Wellenlänge 280 nm, bei der die aromatischen Seitenketten von Proteinen angeregt werden, lässt sich nun 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 werden 1:100 Verdünnungen der Präparationen um den linearen Messbereich des Photometers einzuhalten.

### 3.2.3.2 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.2.1 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 (40 mM Tris-HCl pH 8,0; 1,15 % (v/v) Essigsäure; 1 mM EDTA) als Laufpuffer durchgeführt. Für DNA-Moleküle im Größenbereich von 500 bp bis 14 kb wurden Gele mit einer Konzentration von 1 % (w/v) Agarose in 1 x TAE benutzt. Für die Auftrennung kleinerer Moleküle wurden sogenannte HEC-Gele (1 % (w/v) Agarose und 0,7 % (w/v) Hydroxyethylcellulose (HEC) in 1 x TAE) eingesetzt (PERLMAN und HALVORSON, 1987). Die DNA-Proben wurden zunächst mit 1/5 Volumen Probenpuffer (5 x Probenpuffer: 20 x TAE, 66,6 % Glycerin, jeweils eine Spatelspitze Bromphenolblau, Xylencyanol FF und Orange G) versetzt und bei 90-120 V über einem Zeitraum von 0,5-1,5 Stunden elektrophoretisch aufgetrennt. Der Verlauf der Elektrophoresefront konnte anhand der Farbmarder 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 in H<sub>2</sub>O) inkubiert, anschließend der Gelhintergrund kurz in H<sub>2</sub>O entfärbt und der Bandenverlauf auf dem UV-Transilluminator (302 nm) mit Hilfe der Geldokumentationsanlage dokumentiert.

#### 3.2.3.2.2 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Elektrophorese fand in horizontalen, formaldehydhaltigen Agarosegelen (1% (w/v) Agarose, 5,5% (v/v) Formaldehyd) statt mit 1 x MEN (20 mM MOPS; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA, pH 7,0 mit NaOH) als Puffersystem. Die Gele hatten eine Größe von 15 cm x 10 cm x 1 cm und besaßen 15 „große“ (90 µl Probenvolumen) oder 20 „kleine“ (60 µl Probenvolumen) Taschen. Vor dem Auftragen wurden jeweils 5-10 µg der RNA mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf gleiche Volumina gebracht und mit 3 x RNA-Probenpuffer (3 x MEN; 3,7% (v/v) Formaldehyd; 43% (v/v) Formamid; 10% (v/v) Glycerin; 4 mM EDTA; 0,1% (v/v) gesättigte Bromphenolblaulösung) versetzt, welcher 1 µg 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 für 0,2 kWh. 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.

### 3.2.3.3 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen erfolgten mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits von Perkin-Elmer. Das Prinzip beruht auf der Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977).

#### Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 600 ng Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl RR- (ready reaction) Mix eingesetzt. Im Thermocycler wurden folgende Schritte 25 mal durchlaufen: 20 sec 95°C, 15 sec 50°C und 2 min 60°C. Anschließend fand eine Ethanol-Fällung statt, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Hierzu wurde der Ansatz mit 9,5 µl H<sub>2</sub>O und 30,5 µl EtOH abs. versetzt und 1 h bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min (Biofuge) wurde der Überstand vollständig abgenommen, das DNA-Pellet mit 150 µl 70 % (v/v) EtOH gewaschen, 1 min bei 95°C getrocknet und in 20 µl TSR (Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer) resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 95°C für 2 min wurde die Probe sofort 5 min auf Eis gestellt und für die Sequenzanalyse im ABI Prism 310 in spezielle Sequenziergefäße überführt.

### 3.2.3.4 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (MULLIS & FALOONA, 1987) werden Nukleinsäure-Bereiche definierter Länge und Sequenz ausgehend von geringsten Mengen an DNA-Molekülen (Template-DNA) *in vitro* amplifiziert. Zunächst werden die beiden Stränge der Template-DNA thermisch aufgeschmolzen (Denaturierung). Anschließend binden zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotide (Primer) antiparallel an die 5'-Randbereiche der zu amplifizierenden Zielsequenz (Annealing). Die hitzestabile *Taq*-Polymerase katalysiert im nächsten Schritt die komplementäre Polymerisation von Nukleotiden an die freie 3'-OH-Gruppe der Primer (Elongation). Bei mehrfacher Wiederholung der Reaktionsfolge aus DNA-Denaturierung, Annealing und Elongation kommt es exponentiell zu einer selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz, die durch die Oligonukleotide flankiert wird. Da die eingesetzten Oligonukleotide später Bestandteile des Amplifikationsproduktes sind, kann man durch modifizierte Primer z.B. Restriktionsschnittstellen in die Randbereiche der amplifizierten DNA einfügen. Ein Standard-PCR-Ansatz (20µl) enthielt Matrizen-DNA (10 ng Plasmid-DNA oder 50 ng Pflanzen-DNA), jeweils 20 pmol der beiden Primer, dNTPs (0,2 mM je Nukleotid) und 2,5 U *Taq*-Polymerase in 1 x *Taq*-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,55; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 16 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Die Amplifikation wurde in einem Thermocycler mit folgenden Programmen durchgeführt:

### Programm 1

	Erste Denaturierung:	1 min	94°C		
10 Zyklen	[	Denaturierung:	30 sek	94°C	
		Annealing:	30 sek	60°C	
		Elongation:	1 min	72°C	
20 Zyklen	[	Denaturierung:	30 sek	94°C	
		Annealing:	30 sek	60°C	
		Elongation:	1 min	72°C	+ 10 sek / Zyklus
		Finale Elongation:	7 min	72°C	

Programm 1 wurde als Standardprogramm verwendet, wobei die Annealingtemperatur gegebenenfalls an die verwendeten Primer angepasst wurde.

#### 3.2.3.5 Modifizierte RT-PCR

Die RT-PCR ist neben dem Northern-Blot eine sehr empfindliche Methode, um die Menge der mRNA eines Gens in einer Probe abzuschätzen. Dafür wird RNA in cDNA mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA Polymerase) *in vitro* transkribiert. Der Startpunkt der Reaktion kann durch einen für das Gen spezifischen Antisense Primer bestimmt werden. Anschließend erfolgt eine PCR mit spezifischen Sense und Antisense Primern (der Antisense Primer ist meist identisch mit dem der RT-Reaktion), als Template der PCR dient die in der ersten Reaktion gewonnene cDNA. Das Prinzip dieser Methode ist, dass mRNA, die in einer Probe häufig ist, statistisch öfter in cDNA umgeschrieben wird. Damit steht von dieser cDNA Spezies mehr Template für die nachfolgende Amplifikation in der PCR zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde die RT-PCR nicht verwendet, um Aufschluss über die Menge der jeweiligen mRNA in der Ausgangsprobe zu erhalten, sondern um spezifische Hybridisierungssonden für eine Northern-Blot Analyse herzustellen.

Dazu wurde RNA verwendet, in der das gewünschte Gen vermutlich angereichert war, zum Beispiel durch Induktion mit SA oder anderen Stimuli. In einem 11 µl Ansatz wurden 1 µg RNA (Kapitel 3.2.3.8.2) und 15 pmol Antisense Primer gemischt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Auf Eis erfolgte die Zugabe von 4 µl 5 x Reaktionspuffer für Reverse Transkriptase, 2 µl 10mM dNTPs, 1 µl Ribonuclease Inhibitor und 1 µl Wasser. Nach 5 min Inkubation bei 37°C wurde 1 µl Reverse Transkriptase (200 U) zugegeben, und der Ansatz für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch 10 min Erhitzen bei 70°C abgestoppt. Von der erhaltenen cDNA wurden 2,5 µl für eine PCR Reaktion mit genspezifischen Primern eingesetzt, um das gewünschte Fragment zu amplifizieren.

### 3.2.3.6 Methoden zur Modifikation von Nukleinsäuren

#### 3.2.3.6.1 Restriktionsspaltung von DNA

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 µg λ-DNA (48500 bp) innerhalb von 60 Minuten unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet. Die minimale Enzymmenge ( $U_{\min}$ ), die 1 µg einer Proben-DNA in einer Stunde komplett schneidet, errechnet sich nach folgender Formel:

$$U_{\min} = \frac{\text{bp } [\lambda\text{-DNA}] \times \text{Schnittstellen [DNA]}}{\text{Schnittstellen } [\lambda\text{-DNA}] \times \text{bp [DNA]}} \quad (\text{bp } [\lambda] = 48500)$$

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 der meisten Enzyme.

#### 3.2.3.6.2 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 molarem 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 3 Units T4-DNA-Ligase. Die Ligationsansätze mit einem Endvolumen von 15 µl wurden mindestens 1 h bei RT inkubiert.

### 3.2.3.7 Transformation von Mikroorganismen und Pflanzen

Da weder *E. coli* noch *A. tumefaciens* über ein natürliches System zur Aufnahme nackter DNA aus dem umgebenden Medium verfügen, müssen Bakterienzellen mit geeigneten Verfahren kompetent gemacht werden.

#### 3.2.3.7.1 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) Übernachtskultur diente. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Tag in 300 ml SOC-Medium verdünnt und bis zu einer OD<sub>600</sub> 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 OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, Eppendorf-Kühlzentrifuge) pelletiert und in 90 ml eiskaltem, sterilem 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) 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/ $\mu$ g DNA.

#### 3.2.3.7.2 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 *E. 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.

### 3.2.3.7.3 Herstellung kompetenter Agrobakterien-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 OD<sub>600</sub> von 0,5 erreicht hatte wurde sie durch Zentrifugation (5 min, 5000 rpm) geerntet und die Zellen 3 mal in 4°C sterilem kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml 15% Glycerin resuspendiert, zu je 50 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen können bis zur Verwendung bei -80°C gelagert werden.

### 3.2.3.7.4 Gentransfer in *Agrobacterium 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 µF und Widerstand von 400 W. 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.

### 3.2.3.7.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

#### "Floral-dip" Transformation

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde eine einfache Methode entwickelt (CLOUGH und BENT, 1998; BENT, 2000). Pflanzen, die gerade begonnen haben zu blühen, werden in Medium mit den entsprechenden Agrobakterien und einem Benetzungsmittel (SilwettL-77) getaucht. Dabei scheinen sich entwickelnde Eizellen das bevorzugte Ziel produktiver Transformationen zu sein (BENT, 2000). Aus diesen Zellen entstehen heterozygote Samen. Für die Transformation wurden pro Topf (Ø 6 cm) bis zu 20 Samen ausgesät. Weniger, aber stärkere Pflanzen pro Topf erhöhen die Transformationsrate. Die Pflanzen wurden bis zur Blüte angezogen. Die ersten Blüten wurden abgeschnitten, um die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anzuregen.

Die Anzucht der Agrobakterien-Vorkultur erfolgte in 25 ml YEB mit entsprechenden Antibiotika über Nacht. Anschließend wurde eine 400 ml YEB-Hauptkultur mit der ü.N.-Kultur beimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 2.0 wachsen gelassen. Die Bakterien wurden bei 1000 x g für 10 min pelletiert und in 5% Saccharose bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,8 resuspendiert. Die Pflanzen wurden für einige Sekunden bis zur Rosette in die Agrobakterien-Lösung gedippt und dabei leicht bewegt. Anschließend wurden sie zurück in die Klimakammer gestellt, 1-2 Tage mit einer Haube abgedeckt und bis zur Samenreife (2-3 Wochen) weiterkultiviert.

Die Pflanzen trockneten im Anschluss in Papiertüten trocknen. Die trockenen Pflanzen wurden dann vorsichtig mit den Fingern zerrieben, um die Schötchen aufzubrechen. Die Samen wurden durch Sieben grob von den übrigen Pflanzenteilen getrennt und können bei RT trocken gelagert werden.

### 3.2.3.8 Northern-Blot Analyse

Im Northern-Blot-Verfahren (SAMBROCK *et al.*, 1989) wird die zu analysierende RNA durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.2.3.2.2) aufgetrennt und mittels Kapillar-Blot auf eine Nylonmembran transferiert. Die auf der Membran immobilisierte RNA kann nun durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (siehe Kapitel 3.2.3.8.5) analysiert werden.

#### 3.2.3.8.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen mit dem Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit

Zur RNA-Präparation aus *Arabidopsis*-Blättern wurde der Invisorb® Spin Plant RNA Mini Kit der Firma Invitex verwendet. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des Herstellerprotokolls. Zur Extraktion wurde der DCT-Puffer verwendet. Eingesetzt wurden 150 mg Material.

#### 3.2.3.8.2 Isolierung von RNA aus Pflanzen mit der Trizolmethode

Die Methode kann dazu verwendet werden aus demselben Pflanzenmaterial sowohl RNA, als auch DNA und Proteine zu gewinnen (CHOMCZYNSKI, 1993 sowie CHOMCZYNSKI und SACCHI, 1987). In diesem Fall wurde das Protokoll auf die RNA-Gewinnung in Pflanzen optimiert. Das normalerweise verwendete Trizol (Gibco, BRL) wurde durch den Extraktionspuffer ersetzt (Mengenangaben nach AFGC 2002). 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 Aufmörsern der Proben unter flüssigem Stickstoff werden pro 150 mg Material 1,3 ml Trizol (380 ml/l Phenol mit 0,1M Citratpuffer pH 4,3 gesättigt; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 33,4 ml Na-Acetat, 3M, pH5,2; 5% Glycerin) zugegeben. Die Proben werden für 20 min bei RT geschüttelt. Nach Zufügen von 260 µl Chloroform und erneutem Schütteln, werden die Proben für 30-60 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Zu den 900 µl Überstand werden 325 µl

HSPB (1,2 M NaCl; 0,8 M tri-Natrium-Citrat) gegeben und invertiert. Nach Zugabe von 325 µl Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei RT werden die Ansätze erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wird in 40 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 3.2.3.8.3 Kapillar Blot

Mittels Kapillar-Blot wurde die durch eine denaturierende Agarosegelelektrophorese aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Dazu wurden zwei Lagen Fließpapier mit 10 x SSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH 7,0 mit HCl) äquilibriert und so auf einer ebenen Glasplatte aufgebracht, dass die Enden in ein 10 x SSC-Pufferreservoir tauchten. Das RNA-Gel wurde luftblasenfrei mit der Oberseite nach unten auf das Fließpapier gelegt. Die Kanten des Gels wurden mit Haushaltsfolie abgedeckt. Die Nylonmembran (Hybond N+ von Amersham) wurde luftblasenfrei auf das Gel gelegt, mit zwei Lagen Fließpapier und Papiertüchern bedeckt und mit einem Gewicht (ca. 500 g) gleichmäßig beschwert. Der Kapillarblot 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.

### 3.2.3.8.4 Herstellung eines radioaktiv markierten DNA-Fragments

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 wird mit Hilfe des Megaprime™ DNA labeling system Kits von Amersham Pharmacia vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

### 3.2.3.8.5 Hybridisierung des Filters

Die Hybridisierung erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von CHURCH und GILBERT (1984). Alle Inkubationen erfolgten bei 65°C im Rotations-Hybridisierungsöfen. Die zu hybridisierende Membran wurde in Hybridisierungsröhren überführt und 60 min in 10 ml Church-Lösung (1 mM EDTA, 7% (w/v) SDS, 0,5 M NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,2) vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde nach 15-minütiger

Denaturierung bei 100°C im Wasserbad zugegeben. Die Inkubation erfolgte für mindestens 14 h.

#### **3.2.3.8.6 Waschen der Northern-Blot-Membran**

Nach der Hybridisierung wurde die Membran standardmäßig zweimal für 5 min mit Waschlösung I (2 x SSC, 0,1% (w/v) SDS) im Rotations-Hybridisierungssofen und zweimal für 10 min mit Waschlösung II (1 x SSC, 0,1% (w/v) SDS) im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Durch Waschschrte unter Verwendung von Waschlösungen unterschiedlicher Salzkonzentrationen werden unspezifisch bindende Sondenmoleküle entfernt. Bei hohen Salzkonzentrationen ist die Stabilität unspezifischer DNA-RNA-Hybride größer als bei geringen 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 (BAS-1000 von Fuji). Für die Quantifizierung wurden die Programme PCBAS®2.09 und TINA®2.0 der Firma raytest Isotopenmessgeräte benutzt. Eine Normalisierung der Signale wurde über den Vergleich mit der dokumentierten Ethidiumbromidfärbung der RNA (Kapitel 3.2.3.2.2) erzielt.

#### **3.2.3.8.7 Rehybridisierung**

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 zweimal 30 min im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Danach war der Filter für eine erneute Hybridisierung einsetzbar.

### **3.2.4 Transkriptionsfaktoranalyse mit REGIA Array Filtern**

#### **3.2.4.1 Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden**

Die Herstellung der radioaktiv markierten cDNA-Sonden erfolgt nach dem Protokoll für die Verwendung der REGIA Array Filter. Damit nur mRNA in cDNA transkribiert wird, verwendet man einen Oligo(dT)-Primer, dieser hybridisiert mit dem Poly-Adenin-Schwanz der mRNA und der entstehende Doppelstrang dient als Startpunkt für die Aktivität der reversen Transkriptase, sie baut dann bei der cDNA-Synthese neben nicht radioaktiv markierten Nukleotiden auch [ $\alpha^{33}$  P]-dCTP.

Für die Herstellung radioaktiv markierter cDNA werden 30 µg RNA (Kapitel 3.2.3.8.2.) zusammen mit 100 µM Oligo (dt) Primer in einem Gesamtvolumen von 20 µl für 2 min auf 70°C erwärmt und anschließen auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurden zu dem Ansatz 5 µl M-MuLV RT Puffer, 1 µl dNTP-Mix (dATP, dGTPd TTP jeweils 10 mM und dCTP 0,1 mM), 1 µl RNase Inhibitor, 5 µl P<sup>33</sup> dCTP (10 µCi / µl) und 1 µl Reverse Transkriptase gegeben und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden bei 42°C für 60 min inkubiert und anschließen bei 70°C für 10 min, um die Reaktion abzustoppen. Nach Zugabe von 50 µl Wasser, wurde die Probe auf eine Sephadex-Säule gegeben und für 2 min bei 2700 rpm zentrifugiert. Die aufgereinigte Sonde wurde mit 100 µl Heringssperma-DNA versetzt, für 10 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt.

#### **3.2.4.2 Hybridisierung und Waschen der REGIA Array Filter**

Die Hybridisierung und das Waschen der REGIA Array Filter erfolgte im Wesentlichen nach der selben Methode wie beim Northern Blot (Kapitel 3.2.3.8.5 und 3.2.3.8.6). Abweichend davon wird allerdings die radioaktiv-markierte Sonde mit Heringssperma-DNA versetzt und die Exposition des Filters erfolgte mindestens 4 Tage oder auch länger.

#### **3.2.4.3 Auswertung der Arrays mit der Software Arrayvision**

Zunächst wurden die radioaktiven Signale als Bild-Datei (Fuji-Bas) in das Programm eingelesen. Dann wurde eine Matrix über das Bild gelegt, die dem Programm angibt, in welchem Bereich die Stärke des radioaktiven Signals gemessen werden und welchem Gen dieser Wert zugeordnet werden sollte. Für jedes Bild musste die Matrix neu manuell angepasst werden, was durch eine automatische Erkennung der Signale durch das Programm erleichtert wurde. Nach der Anpassung der Matrix konnte das Programm die Stärke des radioaktiven Signals in diesem Bereich messen und zum Hintergrund des Filters in Beziehung setzen.

Es wurden parallel zwei Filter, die mit der RNA verschiedener Pflanzen hybridisiert wurden, eingelesen und bearbeitet. Das Programm war dann in der Lage, das Wertepaar des gleichen Fragmentes aus beiden Filtern miteinander zu verrechnen. Es wurde zur Auswertung die Differenz aus der Stärke des Signals in der Probe und der Kontrolle verwendet (Induktion/Repression =  $\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Kontrolle}}$ ). Im Falle der Induktion war der Wert positiv und die Induktion war um so stärker, je größer der Wert war, bei der Repression galt genau das Gegenteil. In einer Darstellung, die als Elemental Display bezeichnet wird, stellte das Programm jedes Gen als Punkt dar. Die Färbung des Punktes zeigte die jeweilige Induktion oder Repression bzw. Konstitutivität eines Faktors, die jeweiligen Schwellenwerte für eine Einfärbung konnten frei festgesetzt werden.

Die weitere Analyse der Mikroarray-Ergebnisse wurde mit dem Programm „Genevestigator“ der ETH Zürich durchgeführt (<http://www.genevestigator.ethz.ch/>).

### 3.2.4.4 Amplifikation der Gene aus dem REGIA Array

Die Expression der Transkriptionsfaktoren, die anhand der Arrayauswertung als interessant eingestuft wurden, mussten anschließen in Northern-Blot Analysen nachgetestet werden. Dafür war es nötig Hybridisierungs sonden für die entsprechenden Transkriptionsfaktoren herzustellen. Entweder konnte dies über eine RT-PCR (Kapitel 3.2.3.5) gemacht werden oder es wurde die REGIA Bakterienstammsammlung benutzt. Diese Bakterien enthalten alle auf dem Array vorkommenden Gene in einem pUC-Derivat, so dass sie mit den Primern uni24 und rev23 in einer PCR Reaktion amplifiziert werden konnten.

## 3.3 Biochemische Methoden

### 3.3.1 Bestimmung der Oberflächenpermeabilität von Blättern

Um die Permeabilität der Cuticula zu untersuchen, wurde die Geschwindigkeit gemessen, mit der Chlorophyll aus den Rosettenblättern austritt (AHARONI *et al.*, 2004). Dazu wurde die Rosette in 30 ml 80% Ethanol im Dunkeln unter Schütteln inkubiert. Alle 10 min wurde 1 ml der Lösung entnommen und die Absorption bei 664 nm und 647 nm bestimmt. Je schneller der Chlorophyllgehalt anstieg, desto durchlässiger war die Membran der untersuchten Pflanze. Nach der Formel von LOLLE *et al.* (1997) wurde die genaue Chlorophyllmenge pro g Frischgewicht berechnet :

Chlorophyllmenge ( $\mu\text{mol/g}$ ) =  $(7,93 (A_{664}) + 19,53 (A_{647})) / \text{g Frischgewicht}$

### 3.3.2 Luciferase-Assay

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  $\longleftrightarrow$  Luciferase + Luciferyl-AMP + PP<sub>i</sub>
- 2) Luciferase + Luciferyl-AMP + O<sub>2</sub>  $\longleftrightarrow$  Luciferase + Oxyluciferin + AMP + CO<sub>2</sub> +  $h\nu$

Wird ein Überschuss an Luciferin eingesetzt, ist die Menge des emittierten Lichtes proportional zur Menge der Luciferase in der Pflanze.

In dieser Arbeit wurde Luciferin (1 mM in 0,01% TritonX-100) auf transgene Pflanzen gesprüht, die das Luciferase Gen unter der Kontrolle des *ICS1*-Promotors exprimieren. Direkt im Anschluss wurden die Pflanzen in Dunkelheit gestellt, um die Autofluoreszenz des Chlorophylls abzuschwächen. Nach ca. 5 – 10 min konnte die Lumineszenz der Pflanzen fotografiert werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm Wasabi 1.5.

### 3.4 Trockenstressanalyse von Pflanzen

Die Resistenz von Pflanzen gegen Austrocknung wurde getestet, indem bei adulten Pflanzen das Gießen eingestellt wurde. Während des laufenden Experimentes mussten die Pflanzen mehrmals in der Klimakammer umgestellt werden, um ein ungleichmäßiges Austrocknen der Pflanzen auf Grund von Windströmungen zu vermeiden. Entweder wurde der Phänotyp der Pflanzen fotografisch dokumentiert oder der Wasserverlust der Pflanzen durch Wiegen analysiert. Für letzteres wurde die Erde mit Frischhaltefolie abgedeckt, um einen Feuchtigkeitsverlust über die Erdoberfläche zu verhindern, und jeden Tag das Gewicht der Pflanzen (mit Topf und Erde) bestimmt.

#### 3.4.1 Messung der Transpirationsrate

Die Bestimmung der genauen Transpirationsrate eines Blattes wurde in Würzburg im Labor von Prof. Rieder (Lehrstuhl für Botanik II – Ökophysiologie und Vegetationsökologie) durchgeführt. Nach CHEN *et al.* (2004) wurde die Transpiration von abgeschnittenen Blättern gemessen und die Transpirationsrate berechnet als Wasserverlust pro Sekunde pro Blattfläche ( $\text{g Wasser m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Pflanzen gründlich gegossen, damit die Blätter mit Wasser gesättigt und die Stomata zu Beginn des Versuches geöffnet waren. Anschließend wurden einzelne ausgewachsene Blätter abgeschnitten und deren Stengel kurz in Wachs getaucht, um dort einen Flüssigkeitsverlust zu verhindern. Danach wurde das Blatt sofort in ein geschlossenes System mit einer Luftfeuchtigkeit von 0 % transferiert, welches sich auf einer Mikrowaage befand. Die Mikrowaage war mit einem Computersystem verbunden, wodurch alle 10 min das Gewicht des Blattes ermittelt wurde. Nach Abschluss des Experimentes wurde die Blattfläche und das Trockengewicht des Blattes bestimmt. Mit diesen Daten konnte dann die Transpirationsrate berechnet werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswahl der zu analysierenden EMS-Mutanten

Aus den zwölf *Arabidopsis* Linien, die BRENNER (2002) als potentielle Signaltransduktionsmutanten beschrieb (Kapitel 1.2) und die daher nicht in der Lage sein sollten, die „frühen“ Abwehrgene zu aktivieren, wurden zwei Linien für die weitere Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt. Bei diesen Linien handelte es sich um die Nachkommen der Pflanzen, die den Mutagenesecscreen überlebt hatten. Die Linien *ana41* und *ana38* wurden als echte Salizylsäure-Signaltransduktionsmutanten bezeichnet, da die Induktion der Reportergene *Deacetylase* (*Deac*) und  $\beta$ -*Glucuronidase* (*GUS*) im Vergleich zur transgenen Ausgangslinie 5GuDe nach SA-Behandlung signifikant verändert war. Dies korrelierte mit einer in beiden Mutantenlinien veränderten Induktion der Abwehrgene *GST6* und *PR1* nach SA-Behandlung.

Zunächst wurde in dieser Arbeit geklärt, ob es sich bei *ana41* und *ana38* um homozygote Linien handelt. Weiterhin wurde geprüft, ob der NAcPT-resistente Phänotyp (Kapitel 1.2) auf der geringen Induktion der *Deacetylase* oder auf einer Mutation im Gen selbst beruht.

#### 4.1.1 Linie *ana41*

Die Linie *ana41* erwies sich als homozygot, da alle Pflanzen von BRENNER (2002) und alle Nachkommen in den folgenden zwei Generationen den selben Phänotyp hatten. Dabei wurde einerseits auf den Wachstumsphänotyp geachtet und andererseits auf die Expression des Abwehrgens *PR1* (Kapitel 4.3.1). Die Größe der Pflanzen war sowohl unter Langtagsbedingungen als auch unter Kurztagsbedingungen im Vergleich zu 5GuDe deutlich reduziert (Abbildung 1), obwohl *ana41* als eine Mutante ohne auffälligen Wachstumsphänotyp beschrieben worden war. Alle folgenden Versuche wurden mit der F2-Generation der Ausgangslinie von *ana41* durchgeführt.



**Abbildung 1:** Wachstum von *ana41* im Vergleich zur transgenen Ausgangslinie. Die Pflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagsbedingungen kultiviert.

#### 4.1.2 Linie *ana38#8*

Die Nachkommen der Überlebenden des Mutagenescreens der Linie *ana38* bildeten eine heterozygoten Population. Bei Beobachtung des Wachstums der Pflanzen fielen drei unterschiedliche Phänotypen auf. Es gab Pflanzen mit gelblichen Blättern, aber normaler Größe, Pflanzen, die aussahen wie 5GuDe, und Pflanzen, mit sehr kleinem Wuchs und krausen Blättern. Letztere wurden *ana38#8* genannt (Abbildung 2), und mit den F2-Nachkommen dieser Pflanzen wurde weitergearbeitet. In der F2-Generation zeigten alle Pflanzen den krausen Wachstumsphänotyp.



**Abbildung 2:** Wachstum von *ana38#8* im Vergleich zur transgenen Ausgangslinie. Die Pflanzen wurden sechs Wochen unter Kurztagsbedingungen kultiviert.

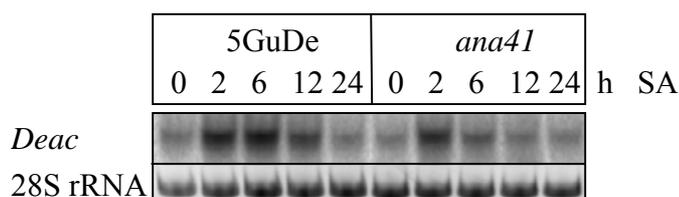
## 4.2 Analyse des Reportergens *Deacetylase*

### 4.2.1 Expression des *Deacetylase*-Gens

Um zu untersuchen, ob die beiden Mutanten-Linien Signaltransduktionsmutanten sind oder ob nur das *Deacetylase*-Gen mutiert ist, wurde zunächst die Induzierbarkeit des Gens überprüft.

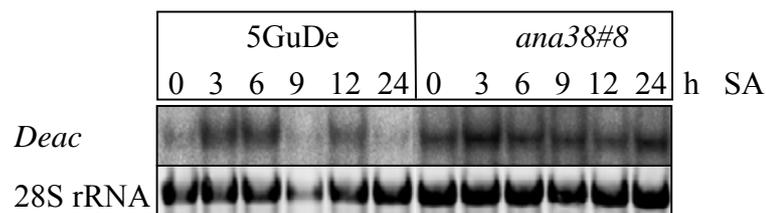
Beide Pflanzenlinien wurden mit Salizylsäure induziert und die Expression der *Deacetylase* über einen Zeitraum von 24h dokumentiert.

In der Mutantenlinie *ana41* ließ sich eine Induktion der *Deacetylase* nach 2h nachweisen. Das Signal war allerdings schwächer als in der Kontrolllinie 5GuDe, in der die Expression der *Deacetylase* auch noch zu späteren Zeitpunkten nachweisbar war (Abbildung 3). Das stimmt mit den Daten aus der Arbeit von BRENNER überein, in der gezeigt wurde, dass die *Deacetylase* in *ana41* nur schwach induzierbar ist.



**Abbildung 3: Expression der *Deacetylase* in der Mutante *ana41*. Northern-Blot Analyse der Linie *ana41* sowie der Ausgangslinie nach 24-stündiger Inkubation mit 0,1 mM SA. Für jeden RNA-Extrakt wurden die Blätter von je zwei 3 Wochen alten Langtagspflanzen geerntet. Es wurden 10 µg RNA aufgetragen.**

In der Mutantenlinie *ana38#8* wurde ebenfalls die Expression der *Deacetylase* nach Induktion mit Salizylsäure getestet. Im Gegensatz zur Linie *ana41* wurde in *ana38#8* das *Deacetylase*-Gen konstitutiv exprimiert, eine zusätzliche Induktion durch Salizylsäure war nach 3h erkennbar (Abbildung 4). Obwohl die konstitutive Expression der *Deacetylase* in der Arbeit von BRENNER (2002) nicht beobachtet wurde, ist auch in dieser Mutante das Gen wie beschrieben kaum durch Salizylsäure induzierbar. Es könnte sich also auch hier um eine Signaltransduktionsmutante handeln.



**Abbildung 4: Expression der *Deacetylase* in der Mutanten *ana38#8*. Die Versuchsdurchführung erfolgte wie in Abbildung 3 beschrieben.**

#### 4.2.2 Test der Deacetylase-Aktivität

Um zu überprüfen, ob die Mutantenlinie *ana41* den Suizidtest (Kapitel 1.2) auf Grund der geringeren Expression der *Deacetylase* überlebt hatte oder weil das Enzym nicht funktionsfähig war, wurde der Test mit F1-Pflanzen der Rückkreuzung von *ana41* mit 5GuDe durchgeführt.

Durch die Kreuzung von *ana41* mit 5GuDe, liegt in der daraus folgenden F1-Generation eine Kopie des intakten *Deacetylase*-Gens aus 5GuDe vor. Nach Induktion mit Salizylsäure und der Behandlung mit NAcPT gibt es für die F1-Generation zwei Möglichkeiten. Überlebt die F1-Generation die Behandlung, könnte es sich bei *ana41* um eine dominante Signaltransduktionsmutante handeln, da dann die *Deacetylase* aus 5GuDe nur schwach induziert wäre und daher nicht zum Absterben der Pflanzen führt. Überlebt die F1-Generation den Screen nicht, gibt es wiederum zwei Möglichkeiten. Entweder ist die *Deacetylase* in *ana41* mutiert, weswegen *ana41* überlebt aber die F1-Generation auf Grund des intakten *Deacetylase*-Gens aus 5GuDe stirbt, oder es handelt sich um eine rezessive Signaltransduktionsmutante.

Für die Analyse wurden Pflanzen der F1-Generationen, *ana41* und die transgene Ausgangslinie 5GuDe im Alter von zwei Wochen dreimal wöchentlich mit Salizylsäure und NAcPT besprüht. Durch Salizylsäure wird die *Deacetylase* Expression induziert und das NAcPT wird von der *Deacetylase* in das giftige Herbizid BASTA umgewandelt, wodurch die Pflanzen sterben. Sobald die 5GuDe Pflanzen erste Anzeichen des Absterbens zeigten, wurde die Behandlung eingestellt.

Dass die F1-Generation *ana41* x 5GuDe wie die Kontrollpflanze 5GuDe die Behandlung mit den beiden Reagenzien nicht überlebte (Abbildung 5), spricht dafür, dass entweder die Mutation im Signaltransduktionsweg rezessiv oder die *Deacetylase* mutiert ist.

Um diese beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, wurde die F1-Generation der Kreuzung von *ana41* mit *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Landsberg (*Ler*) untersucht, die bereits aus anderen Experimenten vorlag. Da der Wildtyp über keine Kopie der *Deacetylase* verfügt, liegt in der F1-Generation nur die *Deacetylase* aus *ana41* vor und die eventuelle Mutation in der Signaltransduktionskette. Handelt es sich um eine rezessive Mutation in der Signaltransduktionskette und die *Deacetylase* ist intakt, überlebt die F1-Generation die Behandlung nicht. Wäre allerdings die *Deacetylase* selbst mutiert, würden alle Pflanzen überleben.

Da die F1-Generation *ana41* x *Ler* die Behandlung mit Salizylsäure und NAcPT überlebte (Abbildung 5), muss man davon ausgehen, dass die *Deacetylase* in *ana41* mutiert und nicht funktionsfähig ist.



**Abbildung 5: Nachweis der Deacetylase-Aktivität. Die Pflanzen wurden zwei Wochen nach der Keimung dreimal wöchentlich mit 0,2 mg/ml NAcPT und 1 mM SA besprüht bis das Absterben der 5GuDe Pflanzen deutlich sichtbar wurde.**

Auch mit den F1-Generationen der Kreuzungen von *ana38#8* x 5GuDe und *ana38#8* x *Ler* wurde der Suizidtest durchgeführt. Wie in dem Test mit *ana41* überlebten nur *ana38#8* und die F1 Linie *ana38#8* x *Ler* die Behandlung mit Salizylsäure und NAcPT (Abbildung 6). Also ist auch in *ana38#8* das *Deacetylase*-Gen so mutiert, dass es nicht mehr funktionell ist. Daher konnte die Mutante den Screen trotz konstitutiver Expression der *Deacetylase* überleben.



**Abbildung 6: Nachweis der Deacetylase-Aktivität. Die Pflanzen wurden zwei Wochen nach der Keimung dreimal wöchentlich mit 0,2 mg/ml NAcPT und 1 mM SA besprüht bis das Absterben der 5GuDe Pflanzen deutlich sichtbar wurde.**

Da nach BRENNER die Expression endogener Abwehrgene nach Salizylsäureinduktion in den Mutanten im Vergleich zu 5GuDe verändert war und in dieser Arbeit eine veränderte Expression der *Deacetylase* gezeigt werden konnte, wurde die Analyse der Mutanten trotz mutiertem Reporter gen fortgesetzt.

## 4.3 Biotischer Stress

### 4.3.1 Expression von SA-induzierbaren Genen

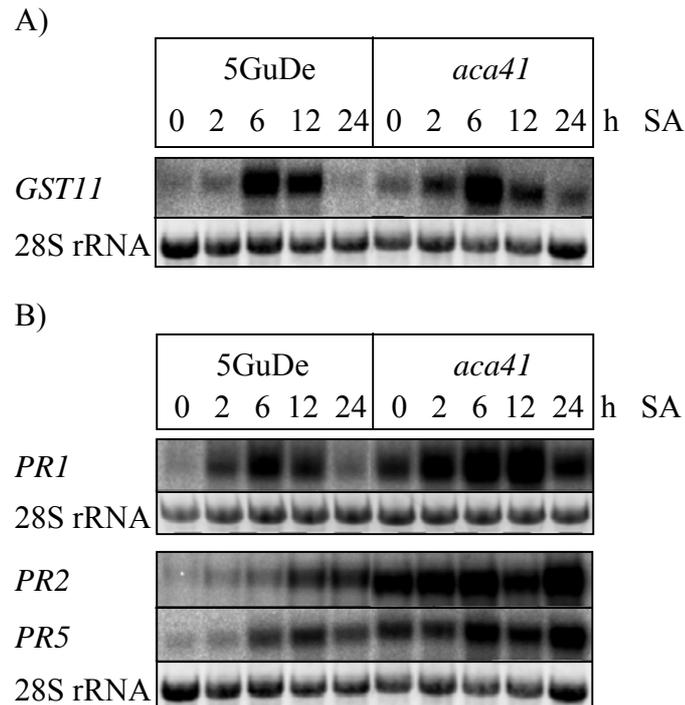
In den Linien *ana41* und *ana38* wurde in der Arbeit von BRENNER (2002) sowohl die Expression der frühen Abwehrgene (z.B. *GST6*) als auch der späten Abwehrgene (z.B. *PR1*) getestet. Beide Gene waren in den Mutanten durch Zugabe von Salizylsäure nur leicht induzierbar. Um dieses Ergebnis zu reproduzieren, wurden die F2-Generationen der Linien *ana41* und *ana38#8* mit Salizylsäure induziert und die Genexpression über einen Zeitraum von 24h beobachtet. Als frühes Abwehrgen wurde *GST11* anstelle von *GST6* gewählt. Zusätzlich zu *PR1* wurde die Expression von *PR2* und *PR5* analysiert.

#### *ana41*

Die Expression von *GST11* war in *ana41* und in 5GuDe durch Salizylsäure nach 2h induzierbar und war nach 6h am stärksten. Allerdings wurde in *ana41* *GST11* schwach konstitutiv exprimiert, was besonders gut zu den Zeitpunkten 0h und 24h sichtbar war (Abbildung 7 A).

Die späten Abwehrgene *PR1*, *PR2* und *PR5* waren in *ana41* sehr stark konstitutiv exprimiert, während in der Kontrolllinie 5GuDe eine normale Induzierbarkeit der Gene durch Salizylsäure beobachtet werden konnte. Die Expression von *PR1* und *PR5* konnte bei *ana41* durch die Zugabe von Salizylsäure noch gesteigert werden (Abbildung 7 B).

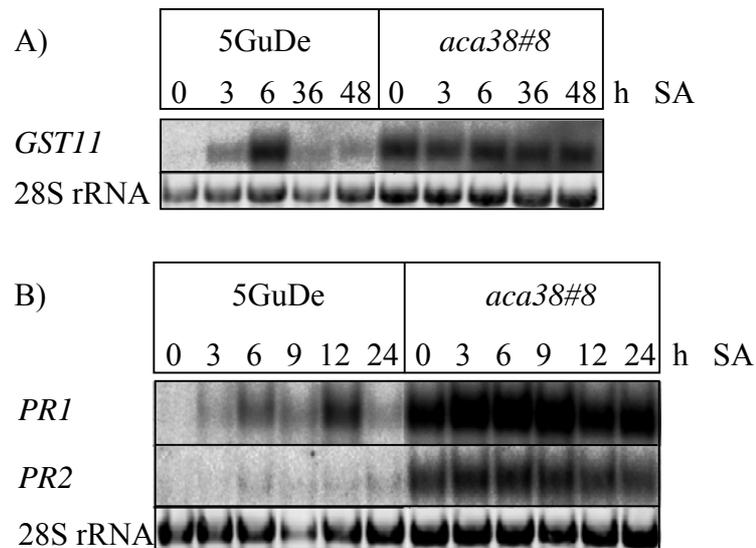
Es handelt sich also bei *ana41* nicht um eine Mutante, in der die Salizylsäure abhängige Signaltransduktion reprimiert ist. Stattdessen scheint es sich um eine Mutante zu handeln, in der der Salizylsäure-abhängige Signalweg konstitutiv angeschaltet ist, was zur dauerhaften Expression der Abwehrgene führt. Deshalb wurde die Mutante in Anlehnung an ihren alten Namen in *aca41* (as-1-element constitutive active) umbenannt und wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit unter diesem Namen geführt.



**Abbildung 7:** Expression von SA-induzierbaren Genen in *aca41*. 3 Wochen alte Langtagspflanzen wurden mit 1 mM SA besprüht und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Für die Northern-Blot Analyse wurden 5 µg RNA eingesetzt. A) Hybridisierung des Filters mit *GST11* B) Hybridisierung der Filter mit *PR1*, *PR2* und *PR5*.

### *ana38#8*

In *ana38#8* wurde ebenfalls die Expression des frühen Abwehrgens *GST11* und der späten Abwehrgene *PR1* und *PR2* nach Induktion mit Salizylsäure analysiert. Alle drei Gene waren schon zum Nullzeitpunkt so stark exprimiert, dass eine weitere Steigerung der Expression durch Zugabe von Salizylsäure kaum möglich war (Abbildung 8). Nur bei *PR1* war durch Salizylsäurebehandlung noch eine leichte Expressionssteigerung sichtbar. Also scheint es sich bei dieser Mutante, wie bei *aca41*, um eine Linie zu handeln, in der der Salizylsäure-abhängige Abwehrweg konstitutiv angeschaltet ist. Dementsprechend wurde auch der Name von *ana38#8* in *aca38#8* umgeändert.



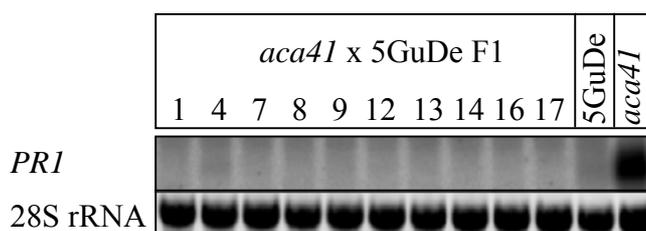
**Abbildung 8: Expression von SA-induzierbaren Genen in *aca38#8*. 3 Wochen alte Lantagspflanzen wurden mit 1 mM SA besprüht und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Für die Northern-Blot Analyse wurden 5 µg RNA eingesetzt. A) Hybridisierung des Filters mit *GST11* B) Hybridisierung des Filters mit *PR1* und *PR2*.**

#### 4.3.1.1 Analyse der Rückkreuzungen mit 5GuDe

Um zu klären, ob es sich bei der konstitutiven Expression der Abwehrgene in den Linien *aca41* und *aca38#8* um einen dominanten oder rezessiven Phänotyp handelt, wurden beide Linien mit der Ausgangslinie 5GuDe rückgekreuzt. Dazu wurde der Pollen der Mutantenlinien auf den Stempel der 5GuDe Pflanzen übertragen (Kapitel 3.1.6). Sowohl die daraus folgende F1- als auch die F2-Generation, wurden auf ihre *PR1*-Expression hin untersucht.

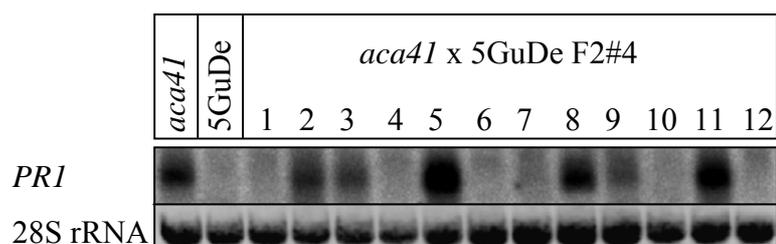
##### *aca41*

Zunächst wurden die F1-Pflanzen im Alter von drei Wochen ohne vorherige Induktion geerntet und die *PR1*-Expression analysiert. In keiner der F1-Pflanzen war eine *PR1*-Expression nachweisbar (Abbildung 9). Es handelt sich bei der konstitutiven *PR1*-Genexpression also um einen rezessiven Phänotyp.



**Abbildung 9:** Analyse der *PR1*-Expression in der F1-Generation der Kreuzung *aca41* x 5GuDe. Verwendet wurde das Blattmaterial 3 Wochen alter uninduzierter Pflanzen. Es wurden 5  $\mu$ g RNA eingesetzt.

Die analysierten F1-Pflanzen wurden bis zur Samenreife weiter kultiviert, um auch die nachfolgende F2-Generation auf ihre *PR1*-Expression zu testen. Auch hier wurden uninduzierte Pflanzen geerntet und die *PR1*-Expression einzelner Nachkommen im Northern-Blot analysiert (Abbildung 10). Insgesamt wurden 114 F2-Pflanzen verschiedener F1-Linien getestet, um eine ausreichende Statistik zu gewährleisten. Von diesen 114 Pflanzen zeigten 24 Pflanzen eine *PR1*-Expression, was ungefähr 25% entspricht. Die *PR1*-Expression war dabei immer deutlich stärker als in der Kontrolllinie 5GuDe, allerdings teilweise schwächer als in der Ausgangslinie *aca41* (zum Beispiel in Linie 3 und 9, Abbildung 10). Nur in 8 der 114 Linien war das Signal der *PR1*-Expression vergleichbar stark wie in *aca41*.



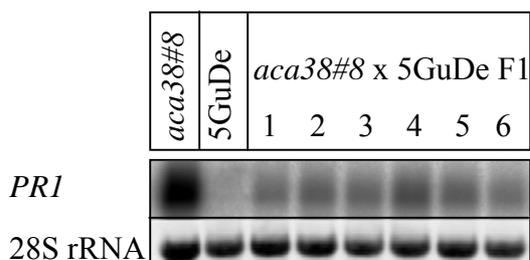
**Abbildung 10:** Expressionsanalyse einer F2-Linie der Kreuzung *aca41* x 5GuDe. Untersucht wurden die Nachkommen der F1-Linie 4 (Abbildung 9). Es wurden 10  $\mu$ g RNA aus uninduziertem Pflanzenmaterial eingesetzt.

Es könnte also sein, dass zwei Mutationen nötig sind, um eine konstitutive *PR1*-Expression in derselben Stärke wie in *aca41* zu induzieren. Nur wenn in der F2-Generation beide Mutationen aus *aca41* vorlägen, würde man ein starkes *PR1*-Signal erhalten, bei der Vererbung nur einer der Mutationen, wäre die Stärke der *PR1*-Expression reduziert.

Insgesamt bestätigte die Analyse der F2-Generation, dass es sich bei der konstitutiven *PR1*-Expression um einen rezessiven Phänotyp handelt.

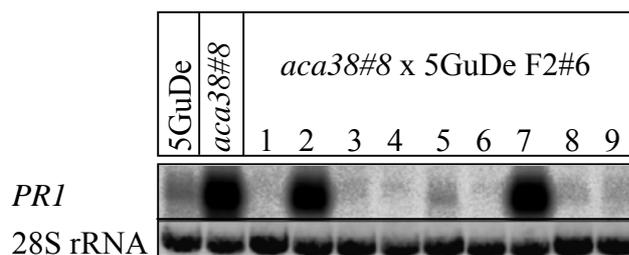
### *aca38#8*

Auch die F1-Pflanzen der Rückkreuzung von *aca38#8* mit 5GuDe wurden auf ihre *PR1*-Expression im uninduzierten Zustand hin analysiert. Dafür wurde das Blattmaterial einzelner Pflanzen geerntet, die fünf Wochen lang im Kurztag gewachsen waren. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der *PR1*-Expression in *aca38#8* um einen rezessiven Phänotyp handelt. Es war zwar ein schwaches Signal in den F1-Pflanzen erkennbar, aber im Vergleich zur Stärke des *PR1*-Signals in *aca38#8* konnte das als Hintergrund vernachlässigt werden (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Analyse der *PR1*-Expression in der F1-Generation der Kreuzung *aca38#8* x 5GuDe. Verwendet wurde das Blattmaterial 5 Wochen alter uninduzierter Pflanzen aus dem Kurztag. Es wurden 5 µg RNA eingesetzt.**

Weiterhin wurden zwei F2-Linien, die aus der Selbstbefruchtung der F1-Pflanzen hervorgegangen waren, auf ihre *PR1*-Expression untersucht. Insgesamt zeigten 12 von 56 uninduzierten F2-Pflanzen (circa 25%) ein konstitutives *PR1*-Signal, das dem der Ausgangslinie *aca38#8* entsprach. Ebenfalls 25% der Pflanzen zeigten wieder den kleinen, krausen Wachstumsphänotyp der Ausgangslinie (ohne Abbildung), der in der F1-Generation nicht auftrat. Die Linien *aca38#8* x 5GuDe F2#6.2 und 6.7 wuchsen klein und kraus, und nur in diesen Linien konnte das *PR1*-Signal nachgewiesen werden (Abbildung 12). Auch in weiteren Analysen der F2-Generation zeigte sich, dass nur in Pflanzen mit dem Wachstumsphänotyp von *aca38#8* eine konstitutive *PR1*-Expression nachweisbar war. Die *PR1*-Expression scheint also mit dem andersartigen Wuchs der Pflanzen zu korrelieren.



**Abbildung 12:** Beispiel einer Expressionsanalyse der F2-Generation der Kreuzung *aca38#8* x 5GuDe. Es wurden die uninduzierten Nachkommen der F1 Linie 6 (Abbildung 11) untersucht. Dazu wurden 10 µg RNA eingesetzt.

#### 4.3.1.2 Vergleich der *PR1*-Expression in *aca41* und *aca38#8* mit den *cpr*-Mutanten

Eine konstitutive *PR1*-Expression wie sie in *aca41* und *aca38#8* gefunden wurde, war bereits für andere Mutanten-Linien beschrieben worden. In den Linien *cpr1* (constitutive expresser of *PR* genes), *cpr5* und *cpr6* wurden eine konstitutive *PR1*-Genexpression und konstitutiv erhöhte Salizylsäuremengen nachgewiesen (BOWLING *et al.*, 1994; BOWLING *et al.*, 1997 und CLARKE *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob die Stärke der *PR1*-Expression in *aca41* und *aca38#8* mit der Expressionsstärke in den *cpr*-Mutanten vergleichbar ist, wurden die *cpr*-Mutanten parallel mit den *aca*-Mutanten und 5GuDe als Kontrolle ausgelegt und in zwei unabhängigen Experimenten Blätter von nicht behandelten Pflanzen geerntet. Die *PR1*-Expression wurde anschließend durch eine Northern-Blot Analyse nachgewiesen.

Die *PR1*-Expression in *aca41* und *aca38#8* war mit der Expressionsstärke von *cpr5* vergleichbar, die von den *cpr*-Mutanten die stärkste *PR1*-Expression zeigte (Abbildung 13).

In beiden Mutantenlinien ist also die *PR1* Menge nicht nur signifikant im Vergleich zur Kontrollpflanze erhöht, sondern ist durchaus vergleichbar mit den *PR1* Mengen in bereits beschriebenen Mutantenlinien.

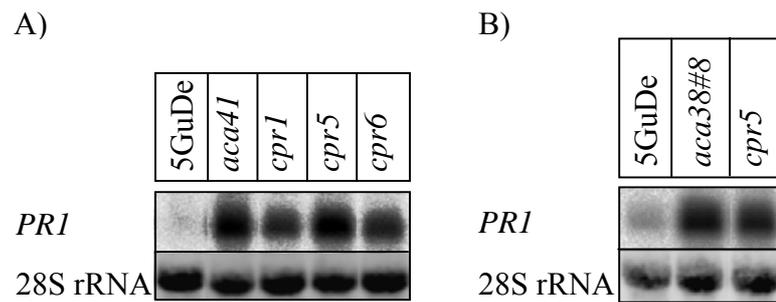


Abbildung 13: *PRI*-Expression in den *aca*-Mutanten im Vergleich zu den *cpr*-Mutanten. Für die RNA wurde das Blattmaterial von je zwei uninduzierten Kurztagpflanzen vereinigt und je 10 µg RNA für die Northern-Blot Analyse eingesetzt. A) Vergleich der *PRI*-Expressionsstärke von *aca41* und *cpr1*, *cpr5* und *cpr6* B) Vergleich der *PRI*-Expressionsstärke von *aca38#8* und *cpr5*.

#### 4.3.2 Bestimmung der Salizylsäuremengen

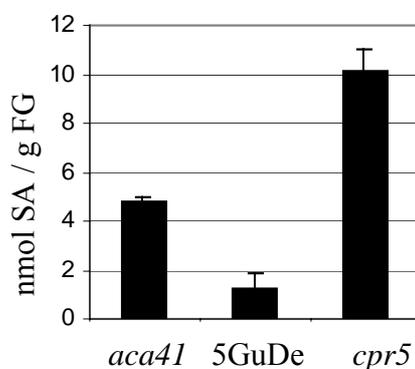
Nachdem gezeigt wurde, dass *aca41* und *aca38#8* erhöhte *PRI* Mengen exprimieren, wurde nach Gründen für diese erhöhten Expression gesucht. Normalerweise wird das *PRI*-Gen über einen Salizylsäure-abhängigen Signaltransduktionsweg induziert, zum Beispiel nach Befall mit Bakterien oder anderen Pathogenen. In den *cpr*-Mutanten hingegen sind auch ohne äußeren Einfluss die Salizylsäuremengen in den Pflanzen so stark erhöht, dass sie zu einer konstitutiven Expression von *PRI* führen. Daher wurden vermutet, dass auch in *aca41* und *aca38#8* die endogenen Salizylsäuremengen konstitutiv erhöht sein könnten. Um die Mengen an endogener Salizylsäure zu bestimmen, wurden die Pflanzen unter Langtagsbedingungen angezogen und ohne eine vorherige Behandlung geerntet. Die Messungen der endogenen Salizylsäuremengen wurden im Institut für Biochemie der Pflanze in Göttingen und in der GSF in München durchgeführt.

##### *aca41*

Die endogenen Mengen an freier Salizylsäure in *aca41* wurden in vier Parallelproben bestimmt und der Mittelwert gebildet. Als Kontrollen wurden sowohl die Salizylsäuremengen der Ausgangslinie 5GuDe als auch von *cpr5* bestimmt. *cpr5* diente

dabei als Positivkontrolle, da die Menge an freier Salizylsäure ca. 30-fach gegenüber dem Wildtyp erhöht sein sollte (BOWLING *et al.*, 1997).

Diese 30-fach Erhöhung der endogenen Salizylsäurewerte von *cpr5* konnte unter unseren Versuchsbedingungen nicht reproduziert werden. Im Vergleich zu 5GuDe wurde in *cpr5* eine 8-fache Erhöhung der Salizylsäuremenge gemessen und in *aca41* eine 4-fach Erhöhung (Abbildung 14). Auch wenn die Werte aus der Literatur nicht erreicht wurden, konnte für *aca41* und für *cpr5* nachgewiesen werden, dass die Mengen an freier Salizylsäure in beiden Linien im Vergleich zu 5GuDe erhöht sind. Diese Mengen könnten ausreichen, um eine konstitutive Expression von *PRI* zu induzieren.

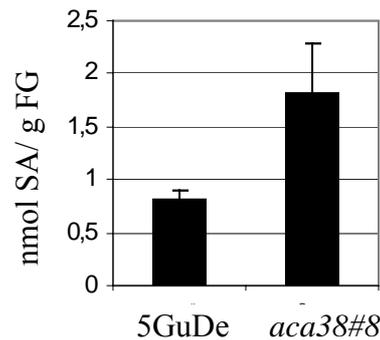


**Abbildung 14: Bestimmung der Mengen an freier Salizylsäure.** Für die Messungen wurden 3 Wochen alte Langtagspflanzen verwendet. Es wurden vier Parallelproben gemessen, wobei für jede Probe 10-15 Pflanzen vereinigt wurden. Die Messungen wurden von Dr. C. Göbel (Biochemie der Pflanze, Albrecht-von-Haller Institut für Pflanzenwissenschaften, Göttingen) durchgeführt.

### *aca38#8*

Auch für die Mutante *aca38#8* wurden die Mengen an freier Salizylsäure im uninduzierten Zustand bestimmt. Als Kontrolle diente 5GuDe und es wurden zwei unabhängige Messungen durchgeführt. Die Mengen an freier Salizylsäure sind in *aca38#8* doppelt so hoch wie in 5GuDe (Abbildung 15). Da die Pflanzen unter anderen Bedingungen angezogen wurden und die Messungen in einem anderen Institut erfolgten, konnten die Werte nicht direkt mit den Messwerten von *aca41* und *cpr5* verglichen werden.

Aber in allen drei Mutanten sind die Mengen an freier Salizylsäure erhöht, was zur konstitutiven Expression von Salizylsäure induzierbaren Genen führen könnte.



**Abbildung 15: Bestimmung der Mengen an freier Salizylsäure in *aca38#8*.** Es wurden zwei unabhängige Messungen in der Abteilung von Prof. Dr. G. Bahnweg (GSF, München) durchgeführt. Dabei wurde jeweils eine Probe gemessen, die aus dem vereinigten Blattmaterial von 2-3 Langtagspflanzen bestand.

#### 4.3.3 Expression des *ICS1*-Gens

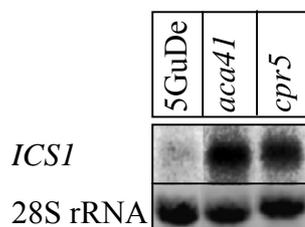
WILDERMUTH *et al.* (2001) haben durch Untersuchungen an *sid2* (*SA induction deficient*)-Mutanten gezeigt, dass die Salizylsäure, die während der Abwehrreaktion der Pflanze gegen Bakterien gebildet und für die SAR benötigt wird, durch die Isochorismat-Synthase (*ICS1*) synthetisiert wird. *ICS1* katalysiert die Reaktion von Chorismat, einem Produkt des Shikimat-Signalwegs, zu Isochorismat, der direkten Vorstufe der Salizylsäure. *sid2* (*SA induction deficient*)-Mutanten haben eine Mutation im *ICS1*-Gen, wodurch die Funktion der Chorismat-bindenden Domäne zerstört ist. WILDERMUTH *et al.* (2001) zeigten, dass *sid2*-Mutanten sowohl nach Infektion mit virulenten als auch mit avirulenten Pathogenen suszeptibler als der Wildtyp waren und weder Salizylsäure akkumulieren noch *PR*-Genen exprimieren konnten. Weiterhin führte die Infektion mit avirulenten Pseudomonaden nicht zur Ausbildung einer SAR. Ein zweites Salizylsäure bildendes Enzym, die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (*PAL*), sorgt für eine gewisse Grundmenge an Salizylsäure in den Pflanzen und spielt im Rahmen des Zelltodes eine Rolle.

Um herauszufinden, welches Enzym für die Salizylsäureproduktion in *aca41* und *aca38#8* verantwortlich ist, wurde erneut das Blattmaterial uninduzierter Pflanzen geerntet und in einer Northern-Blot Analyse die Expression von *ICS1* und *PAL* untersucht. Dabei zeigte sich, dass das *PAL*-Gen sowohl in der Kontrollpflanze als auch

in den Mutanten gleich stark exprimiert wurde (ohne Abbildung). Deshalb erschien es unwahrscheinlich, dass dieser Syntheseweg in den Mutantepflanzen eine Rolle spielt.

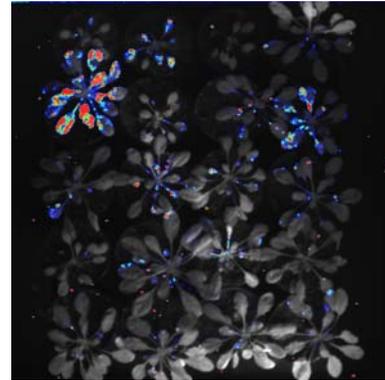
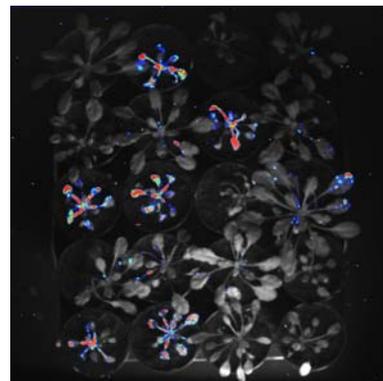
### *aca41*

Die *ICSI*-Expression unterschied sich allerdings deutlich in den Mutanten und der Kontrollpflanze. Während 5GuDe im uninduzierten Zustand kein *ICSI* exprimiert, war in *aca41* und *cpr5* ein deutliches Signal erkennbar. Diese konstitutiv erhöhten Mengen an Isochorismat-Synthase in der Pflanze sorgen anscheinend für eine andauernde Produktion von Salizylsäure und damit auch für die konstitutive Expression der *PR*-Gene.



**Abbildung 16: Expression von *ICSI* in den Mutanten *aca41* und *cpr5*. Die RNA wurde aus dem Blattmaterial drei Wochen alter uninduzierter Pflanzen gewonnen. Als Kontrollpflanze diente 5GuDe. Es wurden 10 µg RNA eingesetzt.**

Da die Stärke der *PRI*-Genexpression in der F2-Generation der Rückkreuzung von *aca41* mit 5GuDe in den einzelnen Individuen unterschiedlich ausfiel (Kapitel 4.3.1.1), wurde untersucht, ob die Stärke des *ICSI*-Signals in der F2-Generation ebenfalls variiert. Dazu wurde *aca41* mit *ICSI::LUC*-Pflanzen gekreuzt, die das *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle des *ICSI*-Promotors exprimieren. Werden *ICSI::LUC*-Pflanzen, in denen der *ICSI*-Promotor induziert ist, mit Luciferin behandelt, wird dieses durch die Luciferase abgebaut und dabei Licht emittiert. Das Leuchten der Pflanzen kann mit einer Digitalkamera festgehalten werden. Es wurde erwartet, dass die Pflanzen der F2-Generation, in denen die Mutation aus *aca41* vorliegt, nach der Behandlung mit Luciferin leuchten. Als Positivkontrolle wurde parallel die F2-Generation der Kreuzung *cpr5* x *ICSI::LUC* analysiert (Abbildung 17).

A) *aca41* x *ICSI::LUC*B) *cpr5* x *ICSI::LUC*

**Abbildung 17: *ICSI*-Expression in uninduzierten 5 Wochen alten Pflanzen der F<sub>2</sub>-Generation der Kreuzung von *aca41* bzw. *cpr5* mit *ICSI::LUC*. Die Pflanzen wurden mit 1 mM Luciferin besprüht. A) Lichtbild und Luminiszenzbild von *aca41* x *ICSI::LUC* B) Lichtbild und Luminiszenzbild von *cpr5* x *ICSI::LUC*.**

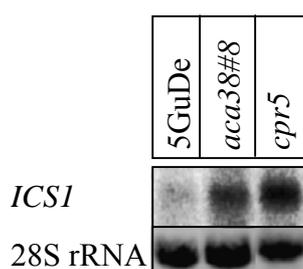
Ist ein rezessives Gen für die *ICSI*-Expression verantwortlich, müssten ca. 19% der F<sub>2</sub>-Pflanzen leuchten. Zwar läge in 25% der Pflanzen die Mutation homozygot vor, aber von diesen 25% besitzen wiederum nur 75% das *ICSI::LUC* Konstrukt in homo- oder heterozygoter Form. Von den 103 analysierten F<sub>2</sub>-Pflanzen der Kreuzung *cpr5* x *ICSI::LUC* leuchteten 19, was knapp 19% entspricht (Beispiel: Abbildung 17 B). Das zeigt sowohl, dass in *cpr5* eine rezessive Mutation für die *ICSI*-Expression verantwortlich ist als auch, dass die Stärke der Lichtemission nicht davon abhängt, ob *ICSI::LUC* homo- oder heterozygot vorliegt.

Von den 62 analysierten F2-Pflanzen der Kreuzung *aca41* x *ICS1::LUC* leuchteten 10 Pflanzen, was ca. 16% entspricht. Außerdem variierte die Stärke der Lichtemission in den Pflanzen der F2-Generation und nur zwei Pflanzen leuchteten sehr intensiv (Beispiel: Abbildung 17 A). Es scheint also, dass die Stärke der *ICS1*-Expression genauso wie die Stärke der *PR1*-Expression in der F2-Generation nicht homogen ist.

Es ist also wahrscheinlich, dass in *aca41* zwei Mutationen oberhalb von *ICS1* zusammen wirken müssen, um die *ICS1*-Expression zu induzieren. Dabei könnte es ein, dass eine der Mutationen ausreicht, um ein schwaches *ICS1*-Signal zu induzieren. Eine zweite Mutation, die alleine nicht zur *ICS1*-Expression führt, könnte nötig sein, um das *ICS1*-Signal der ersten Mutation zu verstärken, damit es der Expression in *aca41* entspricht. Da die Stärke des *ICS1*-Signals die endogenen Salizylsäuremengen und damit auch die Expression von Abwehrgenen beeinflusst, könnte das erklären, warum in der F2-Generation *aca41* x 5GuDe *PR1* unterschiedlich stark exprimiert wurde.

### *aca38#8*

Die *ICS1* Mengen in uninduzierten *aca38#8* Pflanzen waren ebenfalls erhöht und mit den *ICS1* Mengen in *cpr5* vergleichbar (Abbildung 18). Also könnten auch in *aca38#8* wie in *aca41* die hohen Mengen an freier Salizylsäure über einen *ICS1*-abhängigen Weg gebildet werden.



**Abbildung 18:** Expression von *ICS1* in den Mutanten *aca38#8* und *cpr5*. Die RNA wurde aus dem Blattmaterial drei Wochen alter uninduzierter Pflanzen gewonnen. Es wurden 10 µg RNA eingesetzt.

#### 4.3.4 Infektion mit dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae*

Hohe Salizylsäuremengen und eine konstitutive Expression vom *PR*-Genen sind beides Merkmale der systemischen Pathogenresistenz (SAR: systemic aquired resistance), die zu einer erhöhten Resistenz gegen Befall mit virulenten Bakterien führt. Daher wurde untersucht, ob die SA-Mengen und die *PR*-Gen Expression in *aca41* mit einer erhöhten Resistenz gegen Pseudomonadeninfektion korreliert. Es wurde sowohl das Erscheinungsbild der Pflanzen nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* untersucht, als auch das Wachstum der Bakterien in der Pflanze bestimmt. Die Analysen wurden nur mit *aca41* durchgeführt, da die Größe der *aca38#8* Pflanzen für diese Versuche nicht ausreichte.

##### 4.3.4.1 Beobachtung des Phänotyps

Um die Größe der Läsionen nach einer Infektion mit *Pseudomonas syringae* in der Pflanze zu beobachten, wurden *aca41* und als Kontrolle 5GuDe mit dem virulenten *P. syringae* Stamm DC3000 infiziert. Dazu wurden die Bakterien in mehreren unabhängigen Versuchen in je ein Blatt von 4-10 Pflanzen mit der Spritze infiltriert und die Größe der Läsionen nach drei Tagen dokumentiert.

Dabei zeigte sich, dass die Größe der Läsionen in *aca41* und in 5GuDe sehr ähnlich war (Abbildung 19). Es scheint also, als ob beide Linien gleich stark auf die Infektion mit den Bakterien reagieren und *aca41* trotz der erhöhten SA-Mengen keinen Vorteil hat.



**Abbildung 19:** *aca41* und Kontrolllinie nach Infektion mit *Pseudomonas syringae*. Bei 6 Wochen alten Kurztagspflanzen wurde je ein Blatt mit dem *P. syringae* Stamm DC3000 (OD 0,01) infiltriert. Nach drei Tagen wurden die infizierten Blätter abgeschnitten und fotografiert.

#### 4.3.4.2 Bestimmung des Bakterienwachstums in der Pflanze

Das Bakterienwachstum in der Pflanze wurde mit zwei unterschiedlichen Methoden am Tag der Infektion und nach drei Tagen bestimmt.

Für die erste Methode wurden sechs Wochen alte Kurztagspflanzen verwendet und die Bakterien mit einer Spritze in die Blätter der einzelnen Pflanzen injiziert. Dieser Versuch wurde dreimal durchgeführt, zweimal erfolgte die Infektion mit den Stämmen *P. syringae* pv *maculicola* ES3426 und ES3426*avrRpt2* (Abbildung 20 A) und einmal mit den Stämmen *P. syringae* DC3000 und DC3000*avrRpm1* (ohne Abbildung). In allen drei Versuchen war nach der Infektion mit den virulenten Stämmen kein Unterschied des Bakterienwachstums in *aca41* und 5GuDe feststellbar. Allerdings war nach der Infektion mit dem avirulenten Stamm ES3426*avrRpt2* das Wachstum in *aca41* um den Faktor 12 im Vergleich zu 5GuDe reduziert. Es scheint also, als ob die endogenen Salizylsäure- und *PRI*-Mengen in *aca41* nicht ausreichen, um eine erhöhte Abwehr gegen virulente Pseudomonaden zu gewährleisten. Warum die Abwehr gegen avirulente Stämme erhöht war, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Bei der zweiten Infektionsmethode wurden drei Wochen alte, dicht ausgesäte Pflanzen für die Infektion in eine Bakterienlösung mit dem virulenten *P. syringae* Stamm ES3426 getaucht, und anschließend das Bakterienwachstum bestimmt. Zusätzlich zu *aca41* und 5GuDe wurde das Bakterienwachstum parallel auch in *cpr5* und *npr1* (non-expressor of PR genes) durchgeführt. Außerdem wurde ein Teil der Pflanzen vorher mit

Salizylsäure besprüht, um eine SAR auszulösen. In *cpr5* wurde auch ohne vorherige SA-Behandlung ein 10-fach geringeres Bakterienwachstum als in Wildtyppflanzen erwartet (BOWLING *et al.*, 1997), da in dieser Mutante die SAR konstitutiv aktiviert ist. Die *npr1* Mutanten hingegen sollte susceptibler gegenüber den Bakterien sein und nur schwach auf eine SA-Behandlung reagieren, da in dieser Mutante Salizylsäure nicht in der Lage ist, eine SAR auszulösen (ZHANG und SHAPIRO, 2002).

Der Versuch wurde sechsmal durchgeführt und der Mittelwert bestimmt (Abbildung 20 B). In der unbehandelten *cpr5* Mutante war das Bakterienwachstum wie erwartet um den Faktor 10 im Vergleich zu 5GuDe reduziert. In *aca41* war das Bakterienwachstum um den Faktor 5 reduziert, was dem vorherigen Experiment widerspricht. Durch eine Vorbehandlung der Pflanzen mit Salizylsäure konnte in allen Linien die Abwehr gesteigert werden. Dadurch wuchsen in 5GuDe, *aca41* und *cpr5* nach Salizylsäurebehandlung ungefähr gleich viel Bakterien, während in der *npr1* Mutante ein deutlich höheres Bakterienwachstum nachweisbar war.

In diesem Versuch zeigten *aca41* und *cpr5* ohne SA-Vorbehandlung eine deutliche Verminderung des Bakterienwachstums im Vergleich zu 5GuDe, welche allerdings in *aca41* nicht so signifikant wie in *cpr5* war.

Es könnte also sein, dass das Abwehrverhalten von *aca41* von der Art der Infektion abhängt. Da durch den kleinen Wuchs von *cpr5* keine Infektion mit der Spritze möglich war, ließ sich nicht klären, ob die Abwehr von *cpr5* durch diese Methode, ähnlich wie in *aca41*, schwächer wäre als in Abbildung 20 B.

Allerdings entspricht eine Bakterieninfektion über die Oberfläche der Pflanzen, wie beim „Dipping“, eher den natürlichen Bedingungen als ein direktes Einspritzen der Bakterien in die Pflanze. Daher spiegeln die Ergebnisse von Abbildung 20 B mehr das Abwehrverhalten der Pflanzen unter realen Umständen wieder als die Ergebnisse der Infiltration. Deshalb kann man sagen, dass sowohl *aca41* als auch *cpr5* resistenter gegen eine Infektion mit virulenten Pseudomonaden sind als 5GuDe. Eine mögliche Erklärung für die effektivere Pathogenabwehr von *cpr5* liefern die endogenen Salizylsäuremengen, die in *cpr5* doppelt so hoch wie in *aca41* sind (Kapitel 4.3.2).

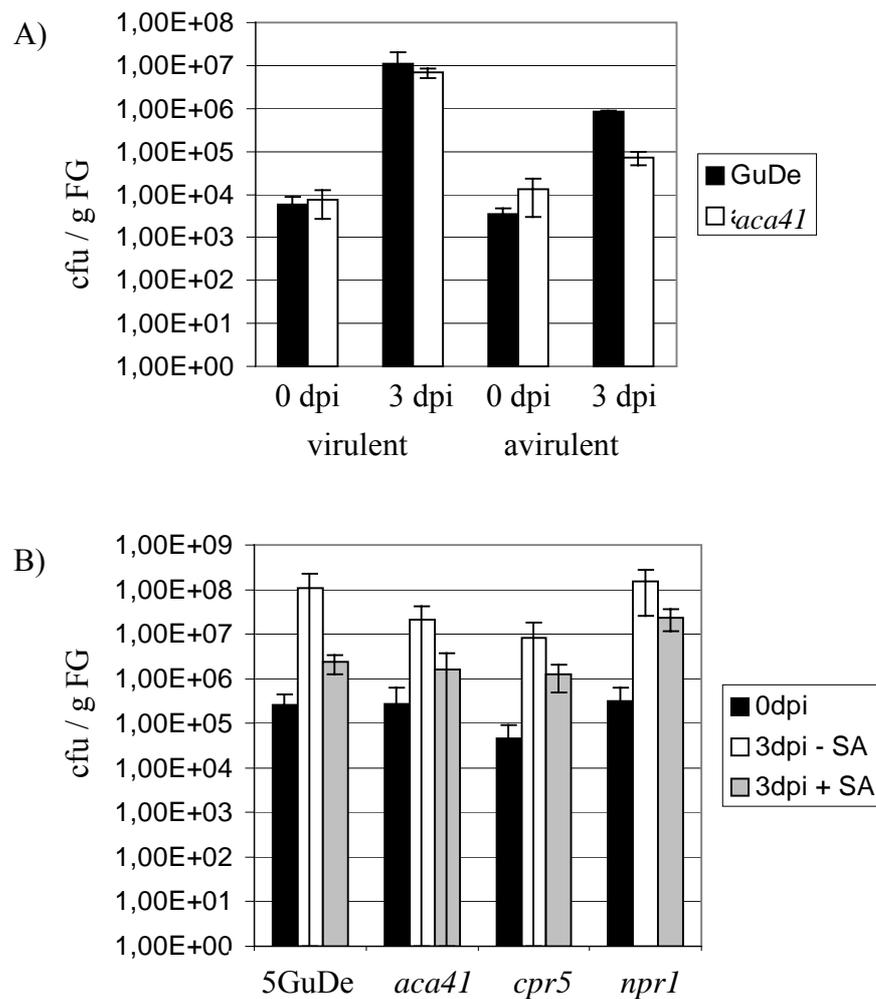


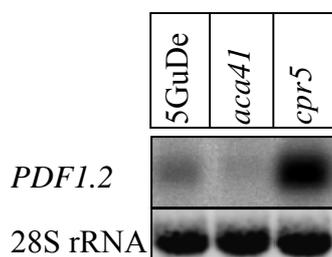
Abbildung 20: Bestimmung des Bakterienwachstums in verschiedenen Mutantenlinien. A) 6 Wochen alte Kurztagspflanzen wurden per Spritze mit dem *P. syringae* Stamm ES3426 bzw. ES3426*avrRpt2* infiziert (Kapitel 3.1.8.1). B) 3 Wochen alte Langtagspflanzen wurden durch „Dippen“ mit dem *P. syringae* Stamm ES3426 infiziert (Kapitel 3.1.8.2). Ein Teil der Pflanzen wurde vor der Infektion mit 1 mM SA besprüht.

### 4.3.5 Expression von *PDF1.2* in *aca41* und *cpr5*

Neben Salizylsäure können auch andere Signalmoleküle, wie zum Beispiel Jasmonsäure (JA) oder Ethylen (ET), an der Pflanzenwehr beteiligt sein (GLAZEBROOK, 2001). Daher wurde untersucht, ob die Mutation in *aca41* neben dem SA-Weg auch den JA/ET-Signalweg beeinflusst.

Dazu wurde die Expression von *PDF1.2*, einem Markergen für Jasmonsäure, in uninduzierten 5GuDe, *aca41* und *cpr5* Pflanzen untersucht (Abbildung 21). Die *cpr5* Mutante diente als Positivkontrolle, da bei ihr neben dem Salizylsäureweg auch der JA/ET-Signalweg dauerhaft aktiviert ist, was durch die konstitutive Expression von *PDF1.2* deutlich wird (BOWLING *et al.*, 1997).

Da nur in *cpr5* ein deutliches *PDF1.2* Signal detektierbar war, scheint also nur in *cpr5* aber nicht in *aca41* der JA/ET-Weg aktiviert zu sein. Die höher Resistenz bei Pathogenbefall von *cpr5* im Vergleich zu *aca41* könnte also nicht nur auf die höheren Salizylsäuremengen in *cpr5* zurückgeführt werden, sondern auch auf die Expression von Abwehrgenen durch den JA/ET-Signalweg.



**Abbildung 21:** Expression von *PDF1.2* in uninduzierten Pflanzen. Verglichen wurde die *PDF1.2*-Expression von 5GuDe und *aca41* mit der von *cpr5*. Es wurden je 10 µg RNA von drei Wochen alten, nicht behandelten Langtagspflanzen eingesetzt.

## 4.4 Makroarray-Analyse

Die Mutation in *cpr5* ist sowohl für die Aktivierung des SA- als auch des JA/ET-Signaltransduktionswegs verantwortlich, während in *aca41* anscheinend nur der SA-Weg aktiviert ist. Um herauszufinden, ob in *aca41* wirklich nur der SA-Signalweg beeinflusst ist oder ob auch hier pleiotrophe Effekte auftreten, wurde eine Makroarray-Analyse durchgeführt.

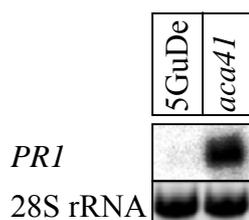
Es wurden REGIA-Arrayfilter verwendet, auf denen 1200 Transkriptionsfaktoren gespottet sind.

Um eine Aussage über die Gene treffen zu können, die konstitutiv in den Pflanzen exprimiert werden, wurde die Genexpression von uninduzierten 5GuDe und *aca41* Pflanzen verglichen. Falls ausschließlich der SA-Weg in *aca41* beeinflusst ist, sollten nur Salizylsäure-induzierbare Gene konstitutiv exprimiert werden. Sind noch andere Signalwege von der Mutation betroffen, müssten auch SA-unabhängige Gene induziert sein.

### Analyse der verwendeten RNA

Um RNA für die Makroarray-Analyse zu gewinnen, wurde das Blattmaterial von 10-12 Pflanzen geerntet und vereinigt, die unter Langtagsbedingungen gewachsen waren. In einer Northern-Blot Analyse wurde sowohl die Qualität der gewonnenen RNA überprüft als auch die Stärke des *PRI*-Signals getestet. In *aca41* konnte die *PRI*-Expression nachgewiesen werden, während in 5GuDe kein *PRI*-Signal detektierbar war (Abbildung 22). Die Pflanzen waren also nicht durch äußere Einflüsse vorinduziert und die RNA konnte für die weiteren Analysen verwendet werden.

Dazu wurde die RNA beider Pflanzen in cDNA umgeschrieben (Kapitel 3.2.3.5), radioaktiv markiert und die REGIA-Filter mit den so entstanden Sonden hybridisiert. Der Screen wurden für vier Tage exponiert und anschließend die Signale mit der Software Arrayvision ausgewertet (Kapitel 3.2.4.3).



**Abbildung 22:** Northern-Blot Analyse der Pflanzen für den Makroarray. Die RNA wurde aus dem vereinigten Blattmaterial von 10-12 *aca41* bzw. 5GuDe Pflanzen gewonnen. Es wurden 10 µg RNA eingesetzt und die Hybridisierung erfolgte mit der *PR1* Sonde.

### Ergebnis der Array-Analyse

Für die Auswertung wurden im Programm Arrayvision die Kriterien für eine Induktion der Gene solange verändert, bis zum einen die Mehrzahl aller Zwillinge (zwei Stellen auf dem Filter, die das gleiche Fragment tragen) sichtbar war und zum anderen maximal 70 Faktoren induziert erschienen. Ein Transkriptionsfaktor wurde als nicht induziert bezeichnet, wenn die Differenz aus dem Signal von *aca41* und 5GuDe unter 5 lag oder der Faktor augenscheinlich keine Induktion aufwies. Dabei wurden sowohl Gene berücksichtigt, die in *aca41* stärker induziert waren als in 5GuDe (Tabelle 1) als auch Gene, die in *aca41* reprimiert waren (Tabelle 2).

**Tabelle 1:** Liste der Gene, die in *aca41* stärker exprimiert waren als in 5GuDe. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, deren Expression mindestens um den Faktor 5 verstärkt war. Angegeben sind die Namen der Gene und die dazugehörigen AGI-Codes.

10fach	At2g14610	Arabidopsis thaliana putative pathogenesis-related PR-1 protein
	At3g46090	Arabidopsis thaliana zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT7)
	At3g56560	Arabidopsis thaliana no apical meristem (NAM) family protein
5fach	At1g75040	Arabidopsis thaliana pathogenesis-related protein 5 (PR-5)
	At2g42360	Arabidopsis thaliana zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
	At3g46070	Arabidopsis thaliana zinc finger (C2H2 type) family protein
	At4g23810	Arabidopsis thaliana WRKY family transcription factor (WRKY53)
	At5g59820	Arabidopsis thaliana zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT12)
	At2g17040	Arabidopsis thaliana no apical meristem (NAM) family protein

**Tabelle 2: Liste der Gene, die in *aca41* im Vergleich zu 5GuDe reprimiert sind. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, deren Expression mindestens um den Faktor 5 verstärkt war. Angegeben sind die Namen der Gene und die dazugehörigen AGI-Codes.**

10fach	At3g61910	Arabidopsis thaliana no apical meristem (NAM) family protein
	At1g63040	Arabidopsis thaliana putative AP2/EREBP transcription factor
5fach	At2g01150	Arabidopsis thaliana zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
	At5g51990	Arabidopsis thaliana putative AP2/EREBP transcription factor
	At2g45650	Arabidopsis thaliana MADS-box protein (AGL6)
	At1g61110	Arabidopsis thaliana no apical meristem (NAM) family protein
	At1g09530	Arabidopsis thaliana phytochrome interacting factor 3 (PIF3)

Zunächst fiel auf, dass nur wenige Gene in *aca41* im Vergleich zu 5GuDe induziert oder reprimiert waren. Die gefundenen Gene wurden dahin gehend untersucht, nach welchen Stressinduktionen sie in anderen Arrayanalysen induziert wurden. Zu diesem Zweck wurde eine *in silico* Analyse mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser der ETH Zürich durchgeführt. In Abbildung 23 ist eine Auswahl der verschiedenen Stressinduktionen dargestellt. Die verwendeten Farben spiegeln die Richtung der Regulation wider. Ein rotes Kästchen bedeutet eine erhöhte Expression, ein grünes Kästchen entspricht einer niedrigeren Expression. Die Farbintensität gibt die Stärke der Regulation an. Je heller der Farbton, desto stärker die Regulation des jeweiligen Gens.

Die Gene, die in *aca41* stark exprimiert waren, werden durch biotische Stresse, wie Befall mit *P. syringae* oder *M. persicae*, und durch verschiedene Hormone induziert, aber kaum durch abiotischen Stress (Abbildung 23 A). Dabei war ca. die Hälfte der Gene durch Salizylsäure induzierbar, darunter typische SA-induzierbare Gene, wie *PR1* und *PR5*. Außerdem wurden in *aca41* drei Transkriptionsfaktoren verstärkt exprimiert, die durch oxidativen Stress induzierbar sind: *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25* (war nur um den Faktor 2 induziert). Nach RIZHSKY *et al.* (2004) wird als Antwort auf oxidativen Stress gleichzeitig die Expression der Zink-Finger-Proteine *Zat12* und *Zat7* und des putativen WRKY Transkriptionsfaktors *WRKY25* erhöht. Die weitere Analyse dieser Gene wird in Kapitel 4.5.1 beschrieben. Die Gene, die in *aca41* reprimiert waren, werden hauptsächlich durch abiotische Stresse wie Kälte, Salzstress und osmotischen Stress induziert (Abbildung 23 B).

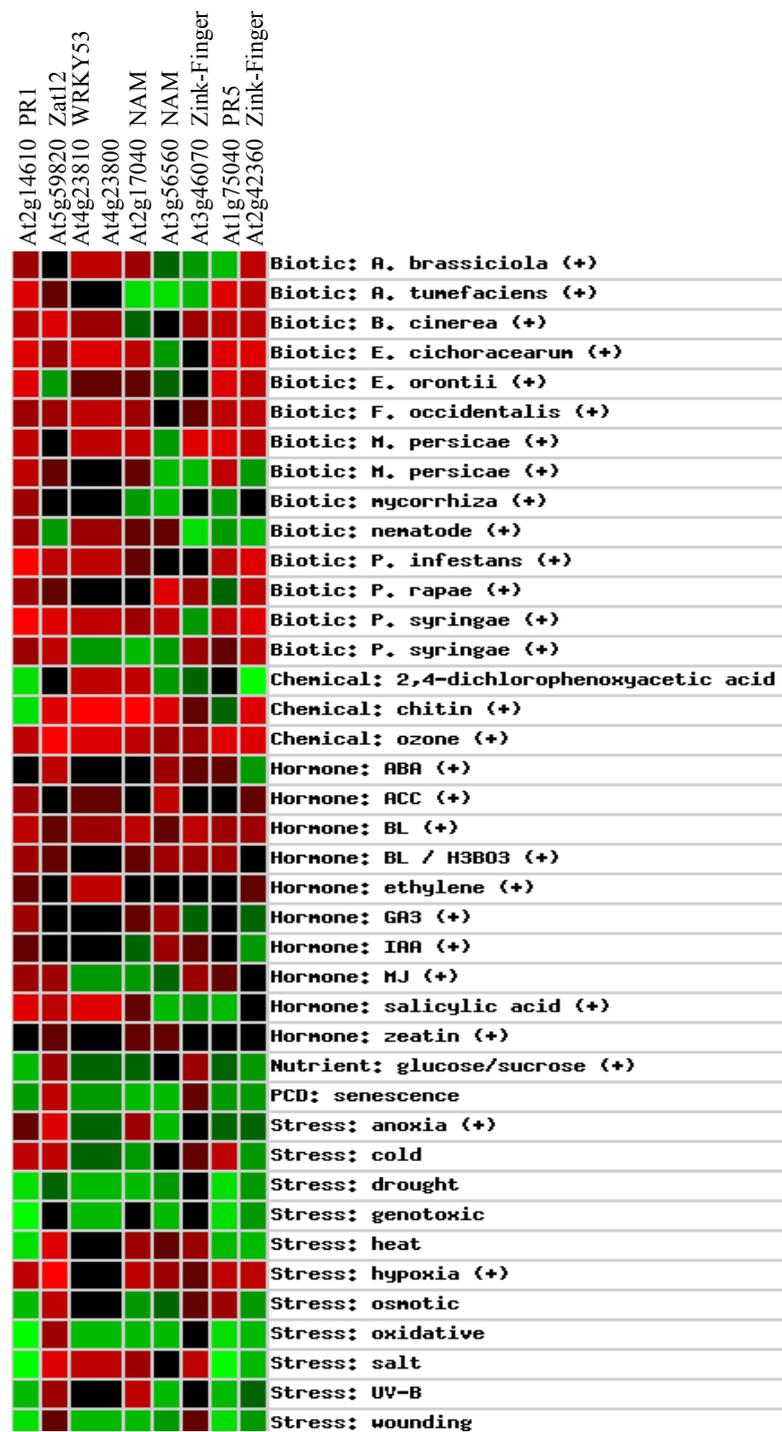
Mit Hilfe der Datenbank des Genevestigator/Metaanalyzers wurde untersucht, ob die in *aca41* induzierten Gene auch in *cpr5* konstitutiv exprimiert werden. Es zeigte sich, dass alle in *aca41* induzierten Gene auch in *cpr5* hochreguliert sind (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Liste der Gene, die in *aca41* und in *cpr5* konstitutiv exprimiert sind. Vergleich der Ergebnisse aus der Arrayanalyse mit *aca41* und der Datenbankanalyse mit *cpr5*.**

<i>aca41</i>	<i>cpr5</i>		
10fach	60fach	At2g14610	PR-1 protein
	18fach	At3g56560	NAM family protein
5fach	15fach	At1g75040	PR-5 protein
	15fach	At2g42360	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
	2fach	At3g46070	zinc finger (C2H2 type) family protein
	5fach	At4g23810	WRKY53 protein
	5fach	At5g59820	ZAT12 protein
	18fach	At2g17040	NAM family protein

Da nicht alle der in *aca41* konstitutiv exprimierten Gene SA-induzierbar sind (Abbildung 23 A), könnte es sein, dass die Mutation mehr als einen Signaltransduktionsweg in *aca41* beeinflusst und dadurch Gene auch unabhängig vom SA-Signalweg induziert werden.

A)



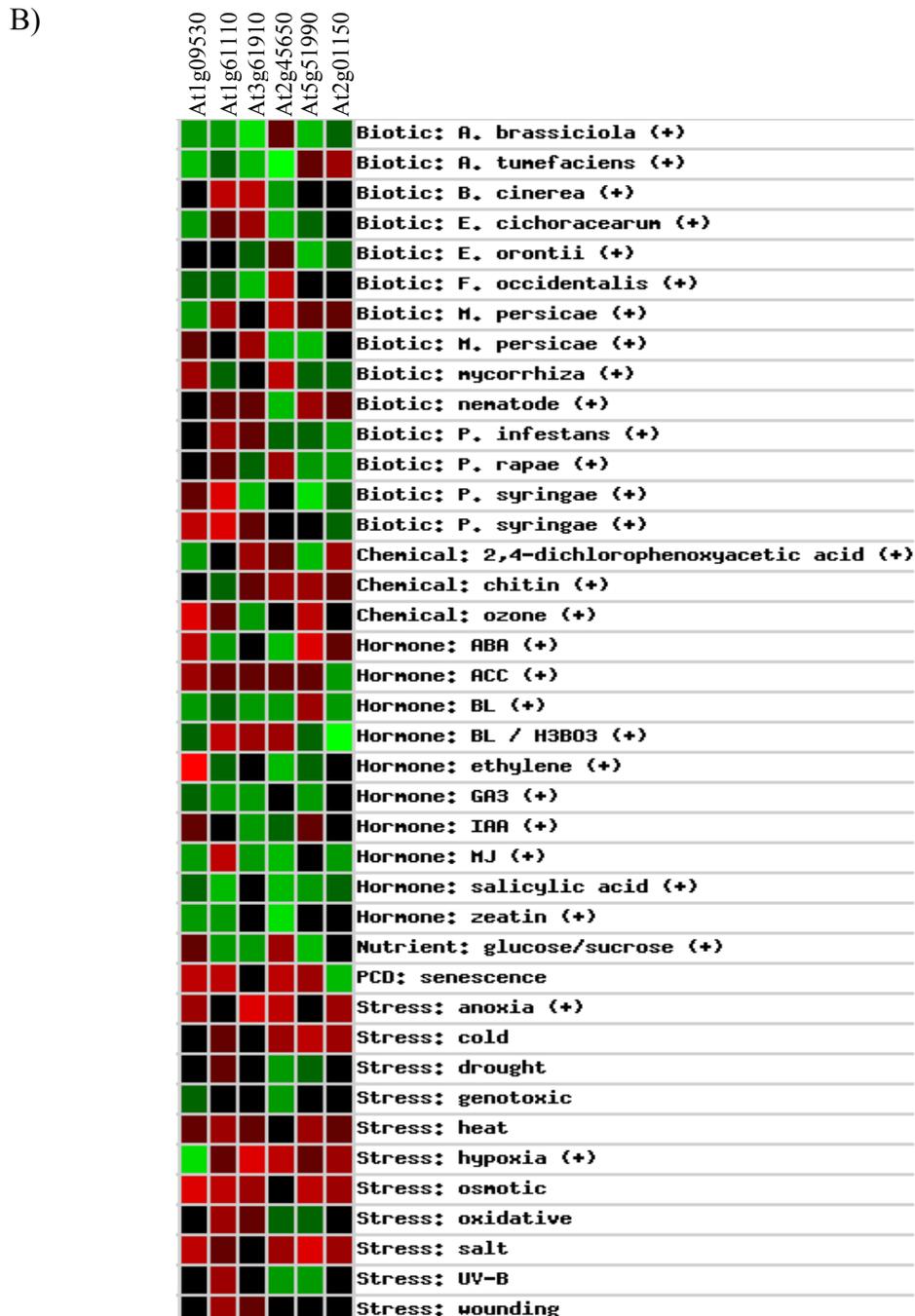


Abbildung 23: Darstellung der Expressionsstärke nach verschiedenen Stressen. Die Analyse wurde mit dem Programm Genevestigator/Metaanalyser durchgeführt. In allen Abbildungen konnten nur die Gene berücksichtigt werden, die auch in der Genevestigator-Datenbank erfasst sind. Ein rotes Kästchen bedeutet eine verstärkte Expression, ein grünes Kästchen eine schwächere Expression und ein schwarzes Kästchen bedeutet, dass kein Unterschied in der Regulation des Gens vorhanden wird. Die Intensität der Farbe gibt die Stärke der Regulation wieder A) In dieser Abbildung sind die Gene dargestellt, deren Expression in *aca41* verstärkt war. B) In dieser Abbildung sind die Gene dargestellt, deren Expression in *aca41* reprimiert war.

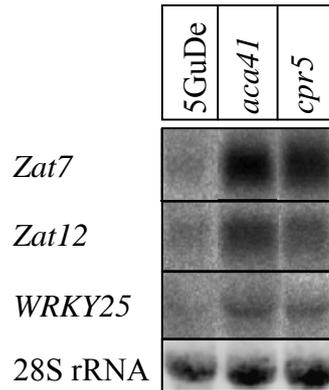
## 4.5 Abiotischer Stress

### 4.5.1 Oxidativer Stress

Bei der Transkriptionsfaktoranalyse von uninduzierten 5GuDe und *aca41* Pflanzen mit Hilfe des REGIA-Arrays, wurden drei durch oxidativen Stress induzierbare Gene identifiziert (Kapitel 4.4). Um die Arrayresultate zu unterstützen, wurde zunächst die Expression der Gene *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25* in einer Northern-Blot Analyse überprüft. Anschließend wurde getestet, ob die Expression dieser Transkriptionsfaktoren zu einer erhöhten Resistenz der Pflanzen bei oxidativen Stress führt.

#### 4.5.1.1 Expression von Markergenen

Um die Arrayergebnisse zu verifizieren, wurden 5GuDe, *aca41* und *cpr5* Pflanzen unter Langtagsbedingungen angezogen und ohne vorherige Induktion geerntet. Das Blattmaterial von 2-3 Pflanzen wurde vereinigt und mit der gewonnenen RNA eine Northern-Blot Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25*. Alle drei Gene wurden nicht in der Kontrolllinie 5GuDe, aber in *aca41* und *cpr5* exprimiert (Abbildung 24). Damit konnten die Ergebnisse der Arrayanalyse bestätigt und auch für *cpr5* eine konstitutive Expression dieser Stressgene nachgewiesen werden.

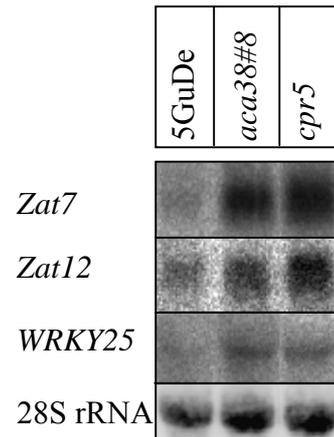


**Abbildung 24:** Expressionsanalyse einiger oxidativer Stressgene in uninduzierten Mutanten-Linien. Es wurden je 10 µg RNA von 3 Wochen alten nicht behandelten Langtagspflanzen eingesetzt. Der Filter wurde mit den Sonden *Zat7*, *Zat12* und *WRKY25* hybridisiert.

### *aca38#8*

Obwohl mit der Linie *aca38#8* keine Arrayanalysen durchgeführt wurden, wurde die Expression der oxidativen Stressgene auch in dieser Linie getestet. Da *aca41* und *aca38#8* aus einem Mutagenese-Screen hervorgegangen waren und die Expression der Abwehrgene *PR1* und *PR2* sehr ähnlich war, wurde vermutet, dass auch eine ähnliche Expression von *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25* möglich ist.

Für die Northern-Blot Analyse wurden die Pflanzen wie oben beschrieben angezogen und geerntet. Als Kontrollen dienten 5GuDe und *cpr5*. Es konnte gezeigt werden, dass in *aca38#8* alle drei Transkriptionsfaktoren konstitutiv exprimiert werden (Abbildung 25). Allerdings ist die Expression von *Zat12* nur schwach, während die von *Zat7* und *WRKY25* stärker ist.



**Abbildung 25: Expressionsanalyse einiger oxidativer Stressgene in uninduzierten Mutanten-Linien.** Es wurden je 10 µg RNA von 3 Wochen alten nicht behandelten Langtagspflanzen eingesetzt. Der Filter wurde mit den Sonden *Zat7*, *Zat12* und *WRKY25* hybridisiert.

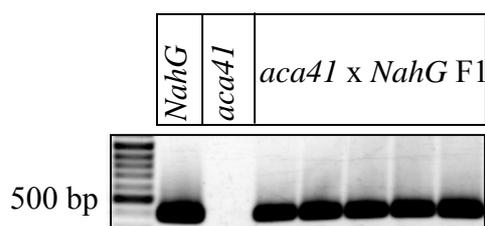
#### 4.5.1.2 Analyse der Genexpression im *NahG*-Hintergrund

Die Arrayanalyse zeigte, dass sowohl *PR1* als auch *Zat12* durch Salizylsäure induziert werden können (Abbildung 23 A). Falls in *aca41* aber auch noch andere Signalwege zu einer Induktion von Genen führen, könnte es sein, dass beide Gene auch unabhängig von den endogenen Salizylsäuremengen exprimiert werden. Um das herauszufinden, wurde *aca41* mit der transgenen *NahG* Pflanze gekreuzt. *NahG* Pflanzen exprimieren konstitutiv das *NahG*-Gen von *Pseudomonas putida*, welches für eine Salizylat-Hydroxylase codiert. Dieses Enzym baut Salizylsäure zu Catechol ab, wodurch selbst nach Induktion, z.B. mit Pathogenen, die Salizylsäuremengen in den Pflanzen extrem gering sind (VAN WEES und GLAZEBROOK, 2003). In Pflanzen der Kreuzung *aca41* x *NahG* sollten also auch die Salizylsäuremengen stark reduziert sein. Exprimieren die Pflanzen trotzdem noch *PR*- oder *Zat*-Gene, würde das unabhängig von den endogenen Salizylsäuremenge erfolgen.

### Kreuzung von *aca41* mit *NahG*

Für die Kreuzung von *aca41* und *NahG* wurde der Pollen von *NahG* Pflanzen auf den Stempel von *aca41* übertragen. Da das *NahG*-Gen einfach per PCR nachzuweisen ist, konnte so in der F1-Generation der Erfolg der Kreuzung überprüft werden.

Dazu wurde das Blattmaterial von fünf *aca41* x *NahG* F1 Pflanzen geerntet. Per PCR mit den Primern *nahG* sense und *nahG* anti wurde das *NahG*-Gen in allen getesteten Pflanzen nachgewiesen (Abbildung 26).



**Abbildung 26:** PCR-Analyse der F1-Generation der Kreuzung *aca41* x *NahG*. Die Reaktion wurde mit den Primern *nahG* sense und *nahG* anti durchgeführt. Es wurden jeweils 50 ng genomische DNA aus Blättern für die PCR eingesetzt. Das 1%ige Agarosegel wurde mit jeweils 10 µl PCR-Ansatz beladen.

Eine dieser F1-Pflanzen wurde bis zur Samenreife gebracht und die daraus folgende F2-Generation für weitere Analysen eingesetzt.

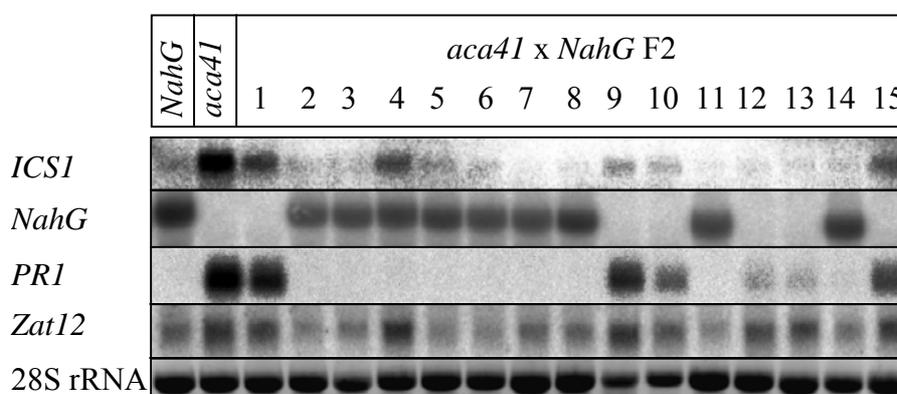
### Analyse der Genexpression in der F2-Generation

Insgesamt wurden 30 F2-Pflanzen auf ihre Genexpression hin untersucht. Bei den Ergebnissen muss man berücksichtigen, dass in einer F2-Generation immer 25% der Pflanzen nur Genmaterial von einem der beiden Eltern haben. Da die Phänotypen von *aca41* alle rezessiv sind, können in maximal 25% aller analysierten F2 Pflanzen die gewünschten Merkmale auftreten. Der *NahG* Phänotyp ist dominant, wodurch in 75% aller F2-Pflanzen Salizylsäure zu Catechol abgebaut wird.

Analysiert wurde die Expression von *ICS1*, *NahG*, *PR1* und *Zat12* (Abbildung 27). Da *ICS1* in der Signalkette oberhalb von Salizylsäure steht, wird seine Expression von *NahG* nicht beeinflusst. Aber eine erhöhte *ICS1* Expression ist ein Hinweis, dass diese Pflanzen verstärkt Salizylsäure produzieren. Von 15 Pflanzen hatten drei eine erhöhte *ICS1* Expression. Zwei von diesen Pflanzen (1 und 15) exprimierten kein *NahG*. In

Pflanze 4, die ebenfalls *ICSI* exprimierte, war *NahG* nachweisbar. In dieser Pflanze wurden also die entstehenden Salizylsäuremengen gleich wieder abgebaut. Nur in Pflanzen mit *ICSI* Expression aber ohne *NahG* wurde *PR1* exprimiert. *Zat12* hingegen wurde auch in Pflanze 4 exprimiert, in der *NahG* nachweisbar war.

Die *PR1* Expression war also wie erwartet Salizylsäure abhängig, da sie nur in Pflanzen ohne *NahG* Nachweis erfolgte. *Zat12* scheint Salizylsäure unabhängig zu sein, da eine *Zat12* Expression sowohl in Pflanzen mit *NahG* erfolgte als auch in Pflanzen ohne *ICSI* Expression (Linie 12 und 13). In Linie 4 könnte *Zat12* durch einen Nebeneffekt des Catechols, das eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion in Pflanzen vermittelt, induziert sein (VAN WEES und GLAZEBROOK, 2003).



**Abbildung 27: Expressionsanalyse in der F2-Generation der Kreuzung *aca41* x *NahG*.** Es wurde Blattmaterial von 15 uninduzierten F2 Pflanzen geerntet, als Kontrollen dienten die Ausgangslinien. Es wurden 10 µg RNA eingesetzt. Die Hybridisierung des Filters erfolgte mit den Sonden *ICSI*, *NahG*, *PR1* und *ZAT12*.

#### 4.5.1.3 Resistenz gegen oxidativen Stress

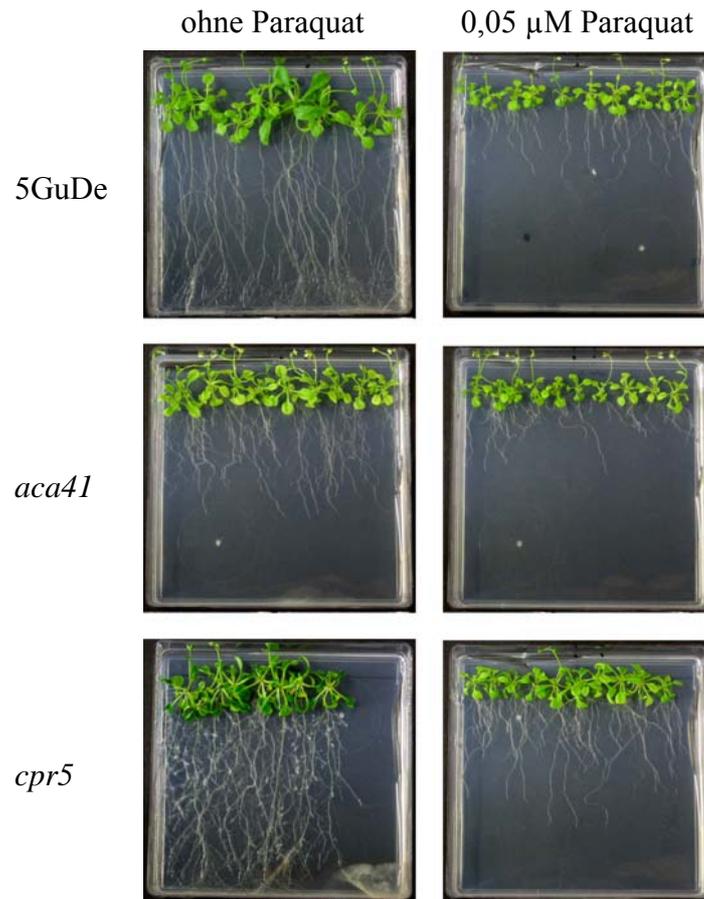
Die Transkriptionsfaktoren *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25*, die normalerweise durch oxidativen Stress induziert werden, werden in *aca41*, *aca38#8* und *cpr5* konstitutiv exprimiert. RIZHSKY *et al.* (2004) konnten zeigen, dass transgene Pflanzen, die *Zat12* oder *Zat7* überexprimieren, resistenter gegen oxidativen Stress sind als Wildtyppflanzen. Dabei spielt *Zat12* nach der Induktion durch oxidativen Stress die wichtigste Rolle, da in Knock-Out-*Zat12* Pflanzen weder *Zat7* noch *WRKY25* induziert werden können.

Um die Resistenz gegen oxidativen Stress zu testen, wurde ein Plattenassay mit Keimlingen durchgeführt. Die Pflanzen wurden auf 2MS-Medium angezogen und nach einer Woche auf MS-Platten mit 0,05  $\mu\text{M}$  Paraquat, einer Superoxid-erzeugenden Substanz, übertragen. Um das Wurzelwachstum beobachten zu können, standen die Platten aufrecht in der Klimakammer. Nach weiteren drei Wochen wurden die Pflanzen zunächst fotografiert und anschließend aus dem MS-Medium gezogen, um die Wurzellänge genau zu messen. Je resistenter eine Pflanze gegen oxidativen Stress ist, desto länger werden die Wurzeln. Als Kontrolle für die normale Wurzellänge ohne Stress, wurden Pflanzen auf senkrechten MS-Platten ohne Paraquat angezogen.

### *aca41*

Das Wurzelwachstum von *aca41* wurde mit 5GuDe und *cpr5* verglichen. Während die Wurzeln von *cpr5* auf den Kontrollplatten dieselbe Länge hatten wie die Wurzeln von 5GuDe, waren die Wurzeln von *aca41* deutlich verkürzt (Abbildung 28). Durch Paraquat war bei allen Pflanzen eine Verringerung der Wurzellänge feststellbar.

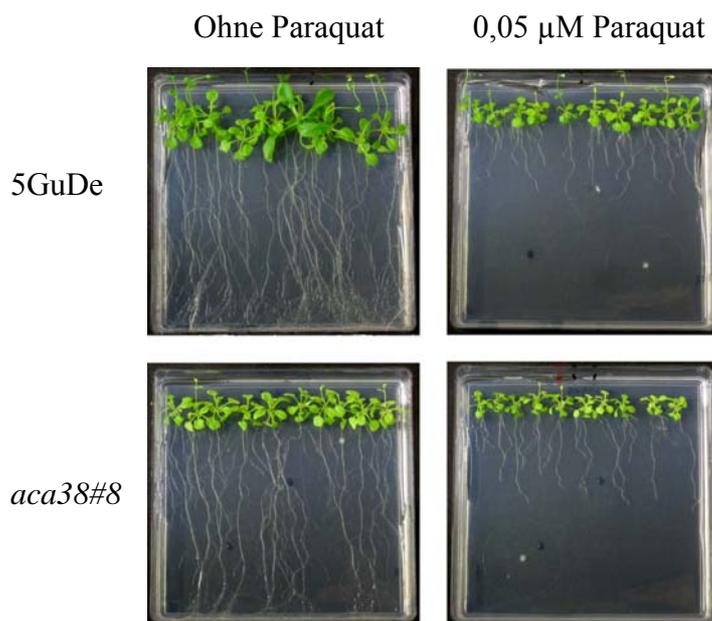
Im Vergleich zur jeweiligen Ausgangslänge der Wurzeln ist das Wachstum durch Paraquat bei 5GuDe um 74%, das von *aca41* um 42% und das von *cpr5* um 55% reduziert worden. Sowohl *aca41* als auch *cpr5* sind demnach resistenter gegen den Einfluss von Paraquat als die Wildtyppflanze, da die Länge der Wurzel weniger stark reduziert war. Nach diesem Ergebnis könnte die konstitutive Expression von *Zat12* in *cpr5* und *aca41* Pflanzen für eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress verantwortlich sein.



**Abbildung 28: Wurzelwachstum mit und ohne oxidativen Stress.** Die Keimung der Pflanzen erfolgte auf 2 MS-Platten. Nach 7 Tagen wurden die Keimlinge auf 2 MS-Platten ohne und mit 0,05  $\mu$ M Paraquat gesetzt und die Platten senkrecht in die Klimakammer gestellt. Nach drei Wochen wurden die Pflanzen fotografiert und anschließend die Wurzellänge gemessen.

### *aca38#8*

Auch mit der Linie *aca38#8* wurde eine Analyse der Wurzellänge durchgeführt. Sowohl ohne als auch mit Paraquat war das Wachstum der Wurzeln von *aca38#8* und von 5GuDe identisch (Abbildung 29). In beiden Fällen wurde das Wurzelwachstum durch Paraquat um 74% reduziert. *aca38#8* ist somit nicht resistent gegen oxidativen Stress. Da die Expression von *Zat12*, dem wichtigsten Auslöser einer Abwehr gegen oxidativen Stress, in *aca38#8* schwächer als in *cpr5* oder *aca41* ist, könnte es sein, dass die Transkriptmenge in *aca38#8* nicht ausreicht, um eine Resistenz zu vermitteln.

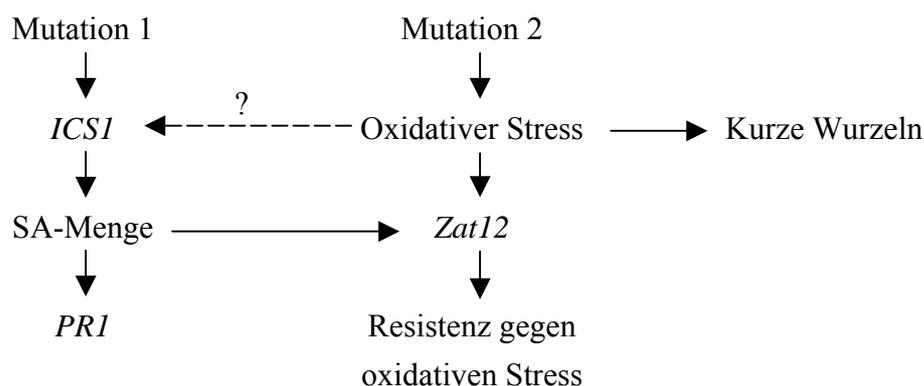


**Abbildung 29:** Wurzelwachstum von *aca38#8* mit und ohne oxidativen Stress. Der Versuch wurde wie unter Abbildung 28 beschrieben durchgeführt.

#### 4.5.1.4 Induzierbarkeit von *ICS1* durch oxidativen Stress

Wahrscheinlich sind in *aca41* mehrere Mutationen vorhanden, von denen eine an der Abwehr gegen Pathogenbefall beteiligt ist, während die andere eine Resistenz gegen oxidativen Stress vermitteln. Dabei könnte Mutation 1 oberhalb von *ICS1* zur Akkumulation von Salizylsäure führen, wodurch die *PR*-Gene induziert werden. Mutation 2 könnte oxidativen Stress in der Pflanze erzeugen, der zur Expression von *Zat12* führt und für die kurzen Wurzeln in *aca41* verantwortlich ist (Abbildung 30).

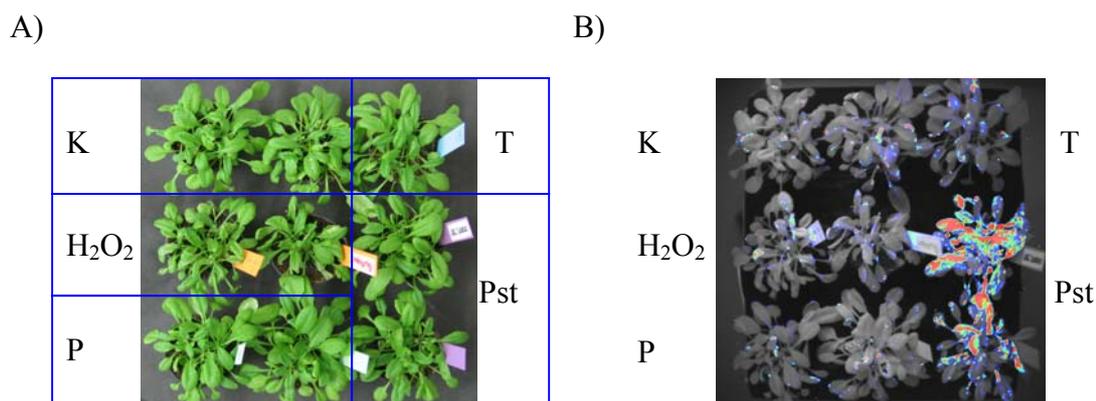
Da die Analysen der *ICS1*- (Kapitel 4.5.1.1) und *PRI*-Expression (Kapitel 4.3.1.1) darauf hindeuten, dass eine Mutation nicht ausreicht, um beide Gene in der gleichen Stärke wie in *aca41* zu exprimieren, könnte es sein, dass zusätzlich zu Mutation 1 auch Mutation 2 die Expression dieser Gene beeinflusst.



**Abbildung 30: Hypothetisches Modell der Mutationen in *aca41*.**

Mit Hilfe der *ICSI::LUC*-Pflanzen (Kapitel 3.3.2) wurde untersucht, ob *ICSI* durch oxidativen Stress induziert werden kann. 5 Wochen alte *ICSI::LUC*-Pflanzen wurden mit  $H_2O_2$  oder mit Paraquat besprüht, um oxidativen Stress in der Pflanze auszulösen. Als Positivkontrolle wurden einige Pflanzen mit *P. syringae* DC3000 infiziert, da bekannt ist, dass diese Behandlung eine *ICSI*-Expression induziert. Als Negativkontrolle blieben einige Pflanzen unbehandelt, bzw. wurden mit einer entsprechenden Konzentration Tween, dem Lösungsmittel der Paraquatinduktion, besprüht. Einen Tag nach der Induktion wurden die Pflanzen mit Luciferin behandelt und die Lumineszenz der Pflanzen beobachtet (Abbildung 31).

Nur die Pflanzen, die vorher mit Bakterien infiziert worden waren, leuchteten. Die Pflanzen, die mit oxidativen Stress erzeugenden Chemikalien behandelt wurden, leuchteten nicht. Es wurde also weder durch die Behandlung mit Paraquat noch mit  $H_2O_2$  eine Induktion des *ICSI*-Promotors ausgelöst. Um endogen in den Pflanzen oxidativen Stress zu erzeugen, wurden die Pflanzen nicht mehr gegossen. Pflanzen, die unter Trockenstress leiden, bilden reaktive Sauerstoff-Moleküle und leiden somit unter oxidativen Stress (INGRAM und BARTELS, 1996). Als die ersten Pflanzen zu welken begannen, wurde erneut eine Behandlung mit Luciferin durchgeführt. Es leuchteten aber wieder nur die Pflanzen, die vorher mit *P. syringae* infiziert worden waren (keine Abbildung). Nach diesem Versuch scheint *ICSI* nicht durch oxidativen Stress induzierbar zu sein.



**Abbildung 31:** ICSI-Expression in der Pflanze nach verschiedenen Stimuli. 5 Wochen alte *ICSI::LUC*-Pflanzen wurden mit 10  $\mu$ M Paraquat (P), 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder 0,2 % Tween (Lösungsmittel der Paraquatinduktion) (T) besprüht, einige Pflanzen wurden dem *P. syringae* Stamm DC3000 (OD 0,2) infiziert (Pst). Nach einem Tag wurden die Pflanzen mit 1 mM Luciferin besprüht. A) Lichtbild der Pflanzen B) Luminiszenzbild.

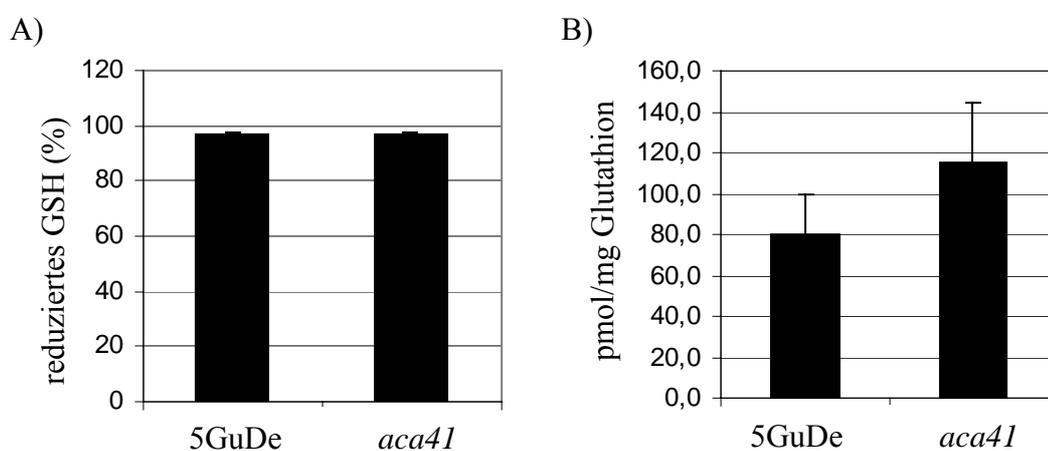
#### 4.5.1.5 Analyse der Glutathionmengen in *aca41*

Im Gegensatz zu anderen antioxidierenden Komponenten der Pflanze wird Glutathion nicht nur durch oxidativen Stress sondern auch als Antwort auf Pathogenbefall induziert und akkumuliert in der Pflanze (EDWARDS *et al.*, 1991). Im Glutathionpool liegt Glutathion normalerweise zu 96% in reduzierter Form (GSH) vor. Nur extremer oxidativer Stress führt kurzfristig zu einer Oxidation des Pools, so dass ca. 20% des Glutathions in oxidierte Form (GSSG) vorliegen (VANACKER *et al.*, 2000; SMITH *et al.*, 1984). MOU *et al.* (2003) zeigten, dass durch die Behandlung mit INA, einem funktionellem Analogon der Salizylsäure, die Glutathionmengen in Pflanzen erhöht werden können. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob in *aca41* die Glutathionmengen und/oder den Redox-Zustand des Glutathionpools im Vergleich zu 5GuDe verändert sind.

Um sowohl die Gesamtmenge an Glutathion als auch den Redox-Status des Glutathionpools im Grundzustand der Pflanzen zu untersuchen, wurde Blattmaterial von uninduzierten *aca41* und 5GuDe Pflanzen geerntet. Die Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Trockeneis nach Heidelberg in das Institut für Pflanzenwissenschaften geschickt, wo die Messung der Proben erfolgte.

Der Redoxzustand des Glutathionpools, also das Verhältnis von reduziertem GSH zu oxidiertem GSSG, war in *aca41* und 5GuDe gleich (Abbildung 32 A) und entsprach dem normalen Redox-Status in uninduzierten Pflanzen. Dafür traten signifikante Unterschiede in der Menge des Gesamtglutathions auf. Während in 5GuDe 80 pmol Gesamtglutathion pro mg Blatt gemessen wurden, waren es in *aca41* 115 pmol Glutathion pro mg Blattmaterial (Abbildung 32 B). Es könnte sein, dass in *aca41* die endogenen Salizylsäuremengen zu einem Anstieg der Glutathionmenge führen.

Da die Messung allerdings nur einmal durchgeführt wurde, müsste das Experiment noch einmal mit unabhängig angezogenen Pflanzen wiederholt werden, um eine sichere Aussage treffen zu können.



**Abbildung 32: Messung der Glutathiongesamtmenge und des Redox-Status des Glutathionpools in *aca41* und 5GuDe. Analysiert wurden je 20 uninduzierte Pflanzen, die sechs Wochen unter Kurztagsbedingungen gewachsen waren. A) Bestimmung des Verhältnisses von GSH zu GSSG B) Bestimmung der Gesamtmengen an Glutathion in den Pflanzen. Die Messungen wurden im Labor von Dr. M. Wirtz (Heidelberger Institut für Pflanzenwissenschaften) durchgeführt.**

## 4.5.2 Trockenstress

Im Laufe der Untersuchungen von *aca41* und *aca38#8* fiel auf, dass beide Mutanten oft noch grün und gesund waren, während 5GuDe Pflanzen schon die ersten Zeichen von Wassermangel zeigten. Um dieses Phänomen genauer zu analysieren, wurden gezielt Trockenstressexperimente an beiden Mutantenlinien durchgeführt.

### 4.5.2.1 Beobachtung der Austrocknungstoleranz

Da sowohl *aca41* als auch *aca38#8* im ausgewachsenen Zustand kleiner sind als 5GuDe, musste zunächst ausgeschlossen werden, dass dieser Größenunterschied bei der Austrocknungstoleranz eine Rolle spielt. Deshalb wurden zunächst alle Trockenstressexperimente an zwei Wochen alten Pflanzen durchgeführt. In diesem Wachstumsstadium war kein Größenunterschied zwischen den Mutanten und 5GuDe feststellbar.

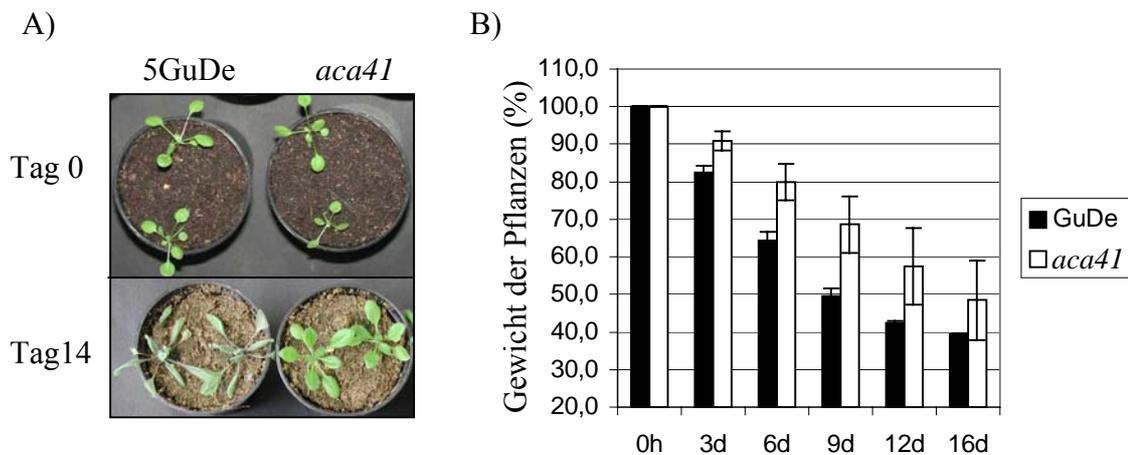
#### *aca41*

Im Alter von zwei Wochen wurden *aca41* und 5GuDe nicht mehr gegossen und die Pflanzen jeden Tag nach den ersten Anzeichen von Wassermangel untersucht. Bei 5GuDe waren die Blätter nach 7-8 Tagen schlaff, während die Turgeszenz der Blätter von *aca41* zu diesem Zeitpunkt noch nicht reduziert war. Das Experiment wurde so lange weitergeführt, bis 5GuDe deutlich vertrocknet war. Nach 14 Tagen waren die 5GuDe Pflanzen abgestorben, während die Blätter von *aca41* immer noch turgeszent waren (Abbildung 33 A). Damit war bestätigt, dass unabhängig von der Größe der Pflanzen *aca41* deutlich länger ohne Wasser leben konnte als 5GuDe.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Geschwindigkeit des Wasserverlustes durch die Blätter während eines Trockenstressexperimentes analysiert. Dazu wurden die Töpfe von drei Wochen alten Langtagpflanzen mit Frischhaltefolie umwickelt, um einen Feuchtigkeitsverlust über die Erde auszuschließen. Anschließend wurden die Pflanzen noch ein letztes Mal gründlich gegossen und der gesamte Topf mit Pflanze gewogen. Während des Trockenstressexperimentes wurden die Pflanzentöpfe jeden Tag zur

gleichen Zeit gewogen bis 5GuDe abgestorben war. Das Experiment wurde unabhängig voneinander zweimal durchgeführt, wobei jedes Mal drei Parallelpflanzen analysiert wurden. Da über die Erdoberfläche keine Flüssigkeit austreten konnte, entspricht die gemessene Gewichtsabnahme dem Wasserverlust über die Pflanzenblätter. Für die Auswertung wurde das Anfangsgewicht der Pflanzen gleich 100% gesetzt (Abbildung 33 B). Es wurde deutlich, dass der Wasserverlust in *aca41* langsamer als in 5GuDe war. Besonders zwischen Tag 6 und Tag 12 sind die *aca41* Pflanzen noch 20% schwerer als 5GuDe. Dies könnte ein Hinweis sein, warum zu diesem Zeitpunkt 5GuDe bereits welkt, während *aca41* noch voll turgeszent ist. Erst nach 16 Tagen war der Flüssigkeitsverlust in *aca41* so hoch wie in 5GuDe nach 9 Tagen. Zu diesem Zeitpunkt war 5GuDe allerdings schon verwelkt.

Es konnte gezeigt werden, dass bei *aca41* weniger Wasser über die Blätter verdunstet wird als bei 5GuDe und daher *aca41* einen längeren Zeitraum ohne Wasser überlebt.



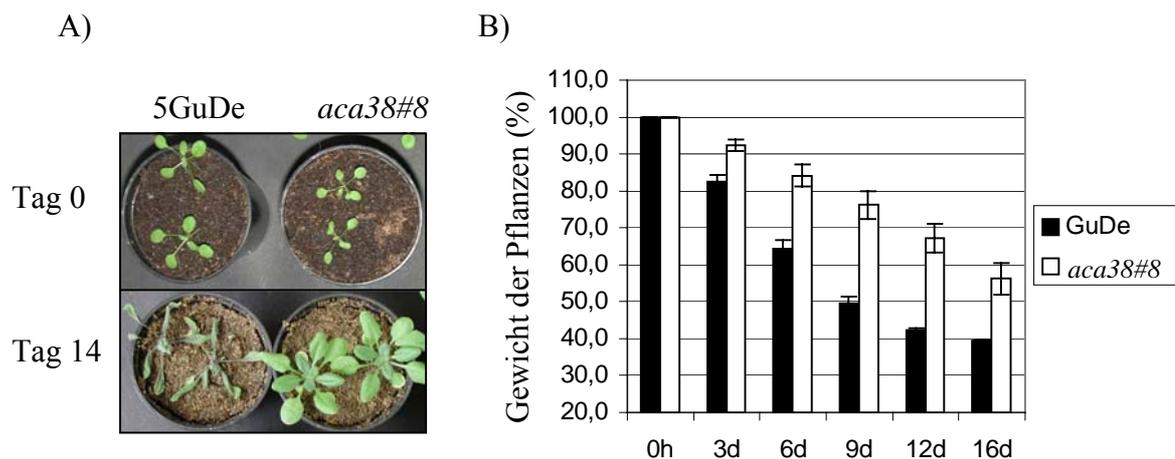
**Abbildung 33: Trockenstressresistenz in *aca41*.** A) Beobachtung des Phänotyps nach 14 Tagen ohne Wasser B) Bestimmung des Gewichts der Pflanzen während eines Trockenstress-experimentes (Kapitel 3.4). Die Daten ergeben sich aus den Werten zweier unabhängiger Experimente.

**aca38#8**

Das Austrocknungsverhalten von *aca38#8* wurde auf dieselbe Weise getestet wie bei *aca41*. Zunächst wurde die Trockentoleranz von zwei Wochen alten Pflanzen untersucht (Abbildung 34 A). Dabei zeigte sich, dass auch *aca38#8* nach 14 Tagen ohne Wasser noch turgeszent war, während die Kontrollpflanzen vertrocknet waren.

Der gemessene Gewichtsverlust während des Trockenstressexperimentes war sogar noch geringer als bei *aca41* (Abbildung 34 B). Nach 16 Tagen hat *aca38#8* immer noch mehr Wasser gespeichert als 5GuDe nach 9 Tagen. Außerdem hatte *aca38#8* nach 12 Tagen noch 68% seines ursprünglichen Gewichtes, während *aca41* nur noch 58% des Anfangsgewichtes hatte.

*aca38#8* kann also auch deutlich länger ohne Wasser leben als der Wildtyp und ist vielleicht sogar etwas trockenstressresistenter als *aca41*.



**Abbildung 34: Trockenstressresistenz in *aca38#8*.** A) Beobachtung des Phänotyps nach 14 Tagen ohne Wasser B) Bestimmung des Gewichts der Pflanzen während eines Trockenstressexperimentes (Kapitel 3.4). Die Daten ergeben sich aus den Werten zweier unabhängiger Experimente.

Um zu analysieren, wie effizient die geringe Wasserverdunstung über die Blattoberflächen die Mutanten vor der Austrocknung schützt, wurden je eine Mutante zusammen mit einer 5GuDe Pflanze in einem Topf kultiviert. Als Kontrolle dienten je zwei 5GuDe bzw. zwei Mutanten in einem Topf. Nach 13 Tagen ohne Wasser waren die 5GuDe Pflanzen vertrocknet, während *aca38#8* und *aca41*, die zu zwei in einem Topf wuchsen, turgeszent waren. Die Mutanten, die zusammen mit 5GuDe kultiviert

worden waren, zeigten deutliche Anzeichen des Welkens (Abbildung 35). Es scheint also, als ob die erhöhte Trockentoleranz der Mutanten damit zusammenhängt, dass sie sparsamer als 5GuDe mit dem vorhandenen Wasser umgehen und daher länger überleben. Wachsen die Mutanten hingegen mit 5GuDe Pflanzen, die das Wasser aus der Erde schnell verbrauchen, zusammen in einem Topf, welken sie zum selben Zeitpunkt wie 5GuDe.



**Abbildung 35: Trockentressresistenz der Mutanten *aca38#8* und *aca41* bei direkter Konkurrenz durch 5GuDe. Vergleich des Phänotyps der Mutanten, die zu zweit in einem Topf wuchsen, mit den Mutanten, die zusammen mit 5GuDe in einem Topf wuchsen.**

#### 4.5.2.2 Expression von *rd29A* während des Trockenstresses

Um die Theorie zu stützen, dass die Mutanten weniger Wasser verbrauchen als 5GuDe und daher erst später unter Trockenstress leiden, wurde die Expression von *rd29A* in *aca38#8* und *aca41* analysiert. Die Expression von *rd29A* kann durch Dehydration, hohe Salzkonzentrationen, niedrige Temperaturen und ABA induziert werden (NARUSAKA *et al.*, 2003).

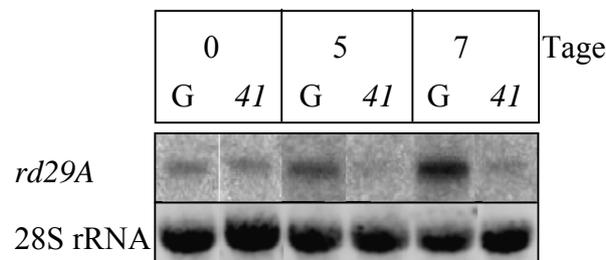
Um die Genexpression zu untersuchen, wurden die Trockenstressexperimente im Langtag durchgeführt und nach 0, 5 und 7 Tagen Blattmaterial für die Northern-Blot Analyse geerntet. Das Experiment wurde sowohl mit *aca41* als auch mit *aca38#8* dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

**aca41**

Die Expression von *rd29A* war nach 5 Tagen ohne Wasser in 5GuDe deutlich erhöht und stieg bis Tag 7 noch weiter an. In *aca41* war weder nach 5 noch nach 7 Tagen eine *rd29A*-Expression feststellbar (Abbildung 36).

Die *rd29A* Induktion zeigt, dass 5GuDe bereits nach 5 Tagen unter Trockenstress leidet, während *aca41* selbst nach 7 Tagen auch auf genetischer Ebene keine Anzeichen von Trockenstress zeigt.

Dieses Ergebnis unterstützt die Vermutung, dass *aca41* sparsamer mit seinem Wasserhaushaltet als der Wildtyp, und deshalb erst später unter Wassermangel leidet und länger überlebt.



**Abbildung 36:** Expression von *rd29A*, einem Trockenstress-responsiven Gen, in *aca41*. 0, 5 und 7 Tage nach Beginn des Trockenstressexperiments unter Langtagsbedingungen wurde das Blattmaterial der Mutanten *aca41* (41) und der transgenen Kontrollpflanzen 5GuDe (G) geerntet. Für die Northern-Blot Analyse wurden 10 µg RNA eingesetzt.

**aca38#8**

Das Expressionsmuster von *rd29A* in den Trockenstressexperimenten mit *aca38#8* entsprach dem von *aca41*. Während in 5GuDe *rd29A* durch den Trockenstress nach 5 und 7 Tagen induziert war, konnte es zu diesen Zeitpunkten in *aca38#8* nicht nachgewiesen werden (Abbildung 37).

Wie *aca41* verbraucht also auch *aca38#8* weniger Wasser, gerät daher erst später unter Wassermangelbedingungen und kann so länger überleben.



**Abbildung 37: Expression von *rd29A* in *aca38#8*. Der Versuch wurde auf die gleiche Weise durchgeführt wie in Abbildung 36 beschrieben.**

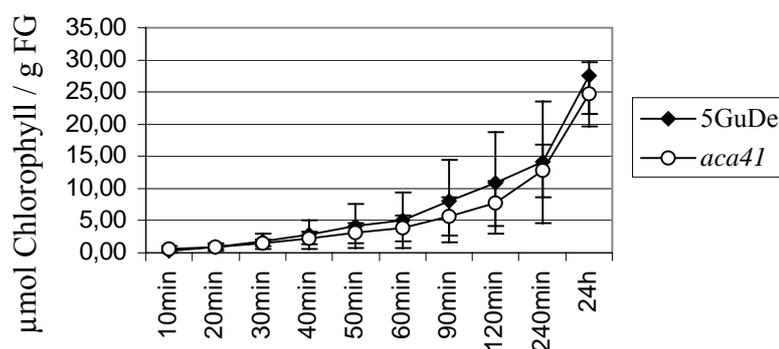
#### 4.5.2.3 Analyse der Cuticula

Pflanzen verlieren Wasser sowohl durch Öffnung der Stomata während der Photosynthese als auch durch die Verdunstung über die Blattoberfläche. Um die unkontrollierte Wasserdampfabgabe über die Blattoberfläche möglichst gering zu halten, ist die Epidermis der Blätter von einer Cuticula überzogen.

Ein möglicher Grund für die erhöhte Trockenstressresistenz von *aca41* könnte eine verringerte Permeabilität der Cuticula sein. Für die Analyse der Cuticula wurden Rosetten ganzer Pflanzen in 80% Ethanol inkubiert (Kapitel 3.3.1) und die Konzentration des ausgetretenen Chlorophylls bestimmt. Je schneller das Chlorophyll aus den Blättern austritt, desto dünner und durchlässiger ist die Cuticula (AHARONI *et al.*, 2004). Der Versuch wurde siebenmal mit jeweils zwei Parallelproben durchgeführt. Zunächst wurde alle 10 Minuten, später jede halbe Stunde die Chlorophyllmenge bestimmt. Der Mittelwert aller Versuche zeigt, dass das Chlorophyll in 5GuDe und *aca41* mit derselben Geschwindigkeit aus den Blättern austrat (Abbildung 38). Da

zwischen den einzelnen Versuchen die gemessenen Chlorophyllmengen zu den angegebenen Zeitpunkten stark schwankten, ergaben sich relativ hohen Standardabweichungen.

Nach diesem Experiment unterscheidet sich die Durchlässigkeit der Cuticula in *aca41* nicht von der des Wildtyps. Also liegt die erhöhte Trockenstressresistenz von *aca41* wahrscheinlich nicht an einer Veränderung der Cuticula, sondern hat vermutlich andere Gründe.



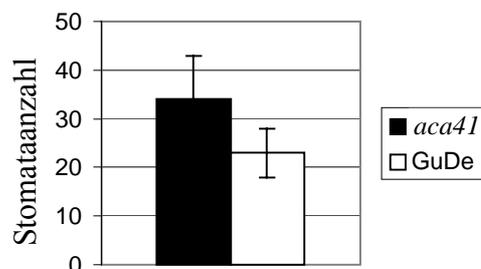
**Abbildung 38:** Analyse der Permeabilität der Cuticula von *aca41*. Die Rosetten von drei Wochen alten Pflanzen wurden in 80% Ethanol inkubiert und der Chlorophyllgehalt zu den angegebenen Zeitpunkten in der Ethanollösung photometrisch bestimmt.

#### 4.5.2.4 Bestimmung der Stomataanzahl

Eine weitere Möglichkeit für die Trockentoleranz der Mutante könnte eine veränderte Anzahl der Stomata sein. Je weniger Stomata pro Blattfläche eine Pflanze hat, desto geringer ist der Flüssigkeitsverlust über die Stomata und die Pflanze könnte länger mit weniger Wasser leben.

Um die Anzahl der Stomata unter dem Mikroskop auszählen zu können, wurden Blätter von *aca41* und 5GuDe einen Tag lang in einer Fixierlösung inkubiert. Dadurch verloren die Blätter ihre Farbe und die Stomata waren besser zu erkennen. Es wurden ausgewachsene Blätter von acht verschiedenen Pflanzen pro Linie verwendet und pro Blatt zwei verschiedene Stellen bei 400facher Vergrößerung ausgezählt und die Werte gemittelt. Es zeigte sich, dass die Blätter von *aca41* eine größere Anzahl Stomata pro

Fläche hatten als 5GuDe (Abbildung 39). Da sich allerdings die Standardabweichungen beider Linien überschneiden, ist der Unterschied nicht signifikant. Das spricht dafür, dass die Anzahl der Stomata vermutlich keinen Einfluss auf die erhöhte Trockenresistenz der Linie *aca41* hat.



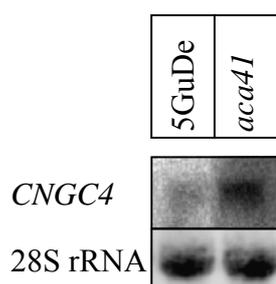
**Abbildung 39:** Auszählung der Stomata in *aca41* im Vergleich zu 5GuDe. Unter dem Mikroskop wurden die Stomata von ausgewachsenen Blättern gezählt. Von 8 Pflanzen wurden je zwei Blätter genommen und von diesen je zwei verschiedene Bereiche ausgezählt. Die Stomata wurden in dem gesamten Bereich ausgezählt, der bei 400facher Vergrößerung unter dem Mikroskop sichtbar war.

#### 4.5.2.5 Expression von *CNGC4*

Da in *aca41* die Stomataanzahl im Vergleich zu 5GuDe nicht signifikant verändert war, könnte es sein, dass die Öffnungsweite der Stomata in *aca41* verändert ist. PEI *et al.* (2000) vermuteten, dass bei der Abscisinsäure-vermittelten Schließung der Stomata  $H_2O_2$  für die Aktivierung von Kalzium-Kanälen in den Stomata verantwortlich ist. Ein Kalzium-Kanal, der vermutlich an der Regulation der Stomata beteiligt ist, ist der *CNGC4* (cyclic nucleotide-gated channel)-Kanal. In Arrayanalysen von Knock-Out-*Apx1* (ascorbate peroxidase) Pflanzen, die hohe Mengen an  $H_2O_2$  akkumulieren, wurde eine erhöhte *CNGC4* Expression gefunden. In diesen Pflanzen ist auch die Reaktion der Stomata verändert. Bei einem Transfer der Pflanzen vom Dunkeln ins Licht, sind Knock-Out-*Apx1* Pflanzen nicht in der Lage ihre Stomata vollständig zu öffnen. PNUELI *et al.* (2003) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der erhöhten *CNGC4* Expression und dem veränderten Stomataverhalten.

Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit die *CNGC4* Expression in uninduzierten Pflanzen analysiert. Die *CNGC4* Expression war in *aca41* im Vergleich zu 5GuDe leicht erhöht (Abbildung 40). Dieses Ergebnis ist ein Indiz, dass in *aca41* das Verhalten

der Stomata verändert ist. Es könnte sein, dass sich in *aca41* wie in der beschriebenen Knock-Out-*Apx1* Linie die Stomata nicht weit öffnen. Dadurch wäre dann unter gleichen Wachstumsbedingungen der Wasserverlust in *aca41* geringer als in 5GuDe. Gleichzeitig könnte die geringere Öffnungsweite der Stomata der Grund für den etwas kleineren Wachstumsphänotyp von *aca41* sein. Denn durch den niedrigeren Gasaustausch bei leicht geschlossenen Stomata, wäre die Leistung der Photosynthese und damit der Energiegewinn und Produktion von Biomasse in *aca41* gegenüber 5GuDe reduziert.



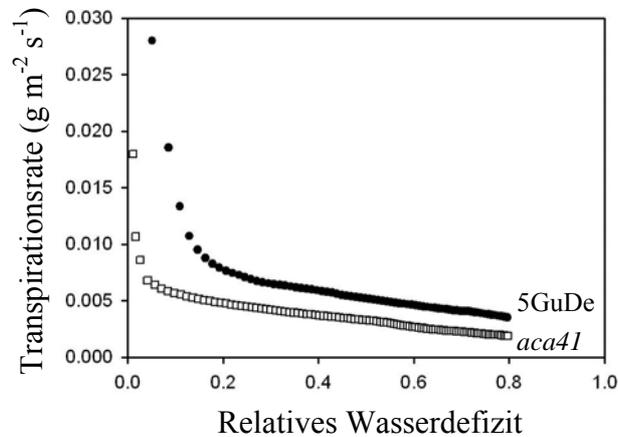
**Abbildung 40: Expression von *CNGC4* in uninduzierten Pflanzen. Verglichen wurde die *CNGC4* Expression der Mutante *aca41* im Vergleich zu 5GuDe. Es wurden je 10  $\mu$ g RNA von 3 Wochen alten, nicht behandelten Langtagspflanzen eingesetzt.**

#### 4.5.2.6 Messung der Transpirationsrate

Eine genaue Messung der Transpirationsrate von *aca41* und 5GuDe wurde durch eine Kooperation mit der Universität Würzburg ermöglicht (Kapitel 3.4.1). Mit Hilfe der dortigen Apparatur wurde der Gewichtsverlust von abgeschnittenen Blättern alle 10 Sekunden automatisch registriert. Zusammen mit dem Anfangsgewicht, dem Trockengewicht und der Blattfläche konnte daraus die Transpirationsrate der Blätter pro Fläche und Zeiteinheit berechnet werden. Man erhält eine Grafik in der die Transpirationsrate gegen das relative Wasserdefizit der Blätter aufgetragen ist (Abbildung 41).

Zu Beginn der Aufzeichnung ist die Transpirationsrate sehr hoch, da zu diesem Zeitpunkt die Stomata der Blätter noch geöffnet sind. Wenn das Wasserdefizit in den Blättern größer wird, beginnen sich die Stomata zu schließen, wodurch die Transpirationsrate abnimmt. Am Ende der Messung sind die Stomata geschlossen und

es gibt nur noch einen Wasserverlust über die Cuticula, die sogenannte minimale Transpirationsrate.



**Abbildung 41: Bestimmung der Transpirationsrate von *aca41*.** Es wurde der Wasserverlust einzelner Blätter von 5 Wochen alten Kurztagspflanzen bestimmt und daraus die Transpirationsrate berechnet (Kapitel 3.4.1).

Es wurden zwei unabhängige Messungen für 5GuDe und *aca41* durchgeführt, die beide dasselbe Ergebnis zeigten. Es gab zwei wichtige Unterschiede im Vergleich von *aca41* und 5GuDe. Zum einen reagierte *aca41* früher auf das einsetzende Wasserdefizit und schloss daher die Stomata eher als 5GuDe. Zum anderen ist die minimale Transpirationsrate in *aca41* nur halb so hoch wie in 5GuDe. Allein dadurch ist *aca41* in der Lage doppelt so lange wie 5GuDe mit einem bestimmten Wasservorrat auszukommen. Zusammen könnten diese beiden Phänomene zu einer erhöhten Trockenresistenz von *aca41* führen.

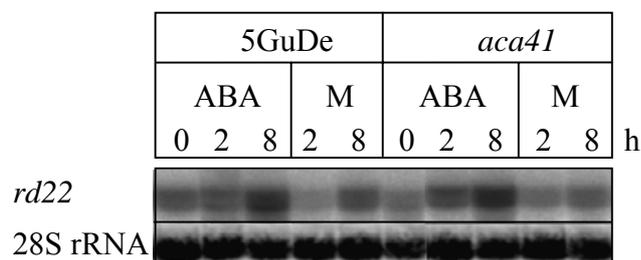
#### 4.5.2.7 Einfluss von Abscisinsäure auf die Genexpression in *aca41*

Die Hauptfunktion des Pflanzenhormons Abscisinsäure (ABA) besteht in der Regulation der Pflanzenantwort auf verschiedene abiotische Stresse. Bei Trockenheit, Kälte oder hohen Salzkonzentrationen akkumulieren Pflanzen erhöhte Mengen an ABA (HU *et al.*, 2005). Bei Wassermangel akkumuliert ABA in den Nebenzellen der Stomata, wodurch diese ihren Turgor verlieren und die Spaltöffnungen sich schließen (BRAY, 1997).

Falls in *aca41* konstitutiv erhöhte Mengen an ABA vorliegen, könnte das zu einem veränderten Öffnungsmodus der Stomata führen. Die Stomata könnten eine geringere Öffnungsweite haben, was zu einem geringern Wasserverlust in *aca41* führen würde.

Um zu erfahren, ob die endogenen ABA Mengen in *aca41* erhöht sind, wurde die Expression von *rd22*, einem ABA-responsiven Gen, untersucht (GOH *et al.*, 2003). Dazu wurden drei Wochen alte Langtagspflanzen mit ABA besprüht bzw. zur Kontrolle mit dem Lösungsmittel von ABA in entsprechender Verdünnung. Sowohl von den unbehandelten Pflanzen (0 Stunden) als auch 2 und 8 Stunden nach der Induktion wurde Blattmaterial geerntet. Man erkennt bei 5GuDe und *aca41* eine leichte Hintergrundexpression in den unbehandelten und den Kontrollpflanzen (Abbildung 42). 2 Stunden nach ABA Induktion ist nur in *aca41* eine leichte Induktion von *rd22* erkennbar, während nach 8 Stunden in beiden Linien ein deutliches *rd22* Signal detektierbar ist.

In *aca41* wird *rd22* demnach nicht konstitutiv exprimiert, statt dessen sind sich die Expressionsmuster von *aca41* und von 5GuDe nach der ABA Behandlung sehr ähnlich. Es ist also nicht wahrscheinlich, dass in *aca41* konstitutiv erhöhte ABA-Mengen vorhanden sind, die ein verändertes Verhalten der Stomata verursachen. Allerdings könnte das leichte *rd22* Signal in *aca41*, 2 Stunden nach Induktion, ein Anzeichen dafür sein, dass *aca41* sensitiver auf ABA reagiert als 5GuDe. Da bei Trockenstress ABA das Signal für die Schließung der Stomata ist, könnte eine schnellere Reaktion auf ansteigende endogene ABA-Mengen in *aca41* zu einer schnelleren Schließung der Stomata führen.



**Abbildung 42: Expression von *rd22*, einem ABA-responsiven Gen. Die Pflanzen wurden mit 0,1 mM ABA bzw. dem Lösungsmittel Methanol (1:1000) besprüht und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es wurden je 10 µg RNA aufgetragen.**

#### 4.5.2.8 Vererbbarkeit der Trockentoleranz in den Folgegenerationen

Parallel zu den Analysen, in denen nach möglichen Gründen für die Trockentoleranz der Pflanzen gesucht wurde, erfolgte eine Untersuchung der Rückkreuzungen von *aca41* und *aca38#8* mit 5GuDe auf ihre Trockentoleranz. Durch die Analyse der jeweiligen F2- und F3-Generationen wurde geklärt, wie stabil die Trockenstressresistenz vererbt wird und ob es sich um einen rezessive oder dominanten Phänotyp handelt.

##### *aca41*

Die Trockenstressexperimente wurden im Kurztag an 4-5 Wochen alten Pflanzen der F2-Generation *aca41* x 5GuDe durchgeführt. Als Kontrolllinien dienten in jedem Experiment sowohl 5GuDe als auch *aca41* Pflanzen. Die F2-Pflanzen galten dann als trockenstressresistent, wenn sie zu dem Zeitpunkt, zu dem alle 5GuDe Pflanzen vertrocknet waren, noch ebenso turgeszent waren wie *aca41*. Insgesamt wurden vier unabhängige Trockenstressexperimente mit jeweils 28 F2-Pflanzen durchgeführt. Es zeigte sich, dass bei jedem Experiment nur 1-3 F2-Pflanzen den Trockenstress genauso gut überlebten wie *aca41* (ohne Abbildung). Allerdings gab es auch einige wenige 5GuDe Pflanzen, die trockenstressresistent erschienen. Daher war es möglich, dass es sich auch bei den anscheinend trockenstresstoleranten F2-Pflanzen nur um zufällig Überlebende handelte und nicht um echte trockenstressresistente Mutanten.

Um auszuschließen, dass es sich bei den selektierten F2-Pflanzen nur um zufällig Überlebende handelt, wurden die Nachkommen von drei vermutlich trockenstressresistenten F2-Pflanzen einem erneuten Trockenstressexperiment unterzogen. Keine der analysierten F3-Pflanzen war so trockenstressresistent wie *aca41*. Einige vertrockneten zwar etwas langsamer als 5GuDe aber trotzdem deutlich schneller als *aca41* (ohne Abbildung).

Der Phänotyp der Trockenstressresistenz konnte in rückgekreuzten Pflanzen also nicht stabil vererbt werden. Wäre nur ein rezessives Gen für diesen Phänotyp verantwortlich, hätten 25% der F2-Generation resistent sein müssen und die Nachkommen dieser Pflanzen zu 100%. Es ist also wahrscheinlich, dass mehr als eine Mutation für die

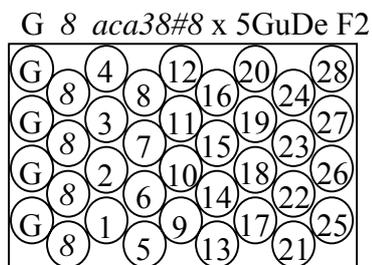
Trockenstressresistenz verantwortlich ist, und dass diese Mutationen nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit zusammen vererbt werden.

### *aca38#8*

Auch mit den F2-Pflanzen der Rückkreuzung von *aca38#8* x 5GuDe wurden vier unabhängige Trockenstressexperimente im Kurztag durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle F2-Pflanzen, die genauso klein und kraus wuchsen wie *aca38#8*, trockenstressresistent waren. Es gab aber auch pro Experiment 2-3 trockenstressresistente Pflanzen ohne auffälligen Wachstumsphänotyp (Abbildung 43). Es war also möglich trockenstressresistente F2-Pflanzen mit normalem Wuchs zu erhalten, aber nicht kleine, krause F2-Pflanzen, die empfindlich waren gegen Wassermangel.

Die Trockenstressresistenz wurde bei *aca38#8* mit einer Häufigkeit von 25% vererbt, was für einen rezessiven Phänotyp spricht, der nach den Mendelschen-Regeln vererbt wird.

A)



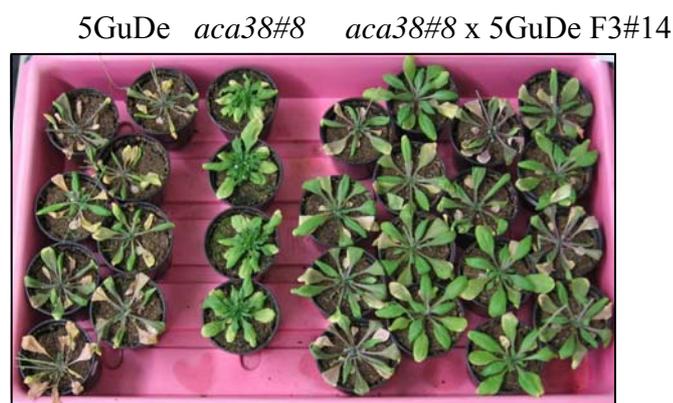
B)

G 8 *aca38#8* x 5GuDe F2

**Abbildung 43:** Trockenstressexperiment mit der F2-Generation der Kreuzung *aca38#8* x 5GuDe. A) Schema der Pflanzenverteilung auf dem Tablett: 5GuDe (G), *aca38#8* (8), F2 *aca38#8* x 5GuDe (Nummern von 1-28) B) Zustand der Pflanzen nach 11 Tagen ohne Wasser unter Kurztagsbedingungen. Trockenstressresistent sind die Pflanzen F2#2, 6, 7, 9, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 27.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die verschiedenen Phänotypen einer Mutante voneinander zu trennen. Da die Trockenstressresistenz anscheinend von dem andersartigen Wuchs segregieren konnte, wurden von den trockenstresstoleranten Pflanzen mit Wildtypwuchs Samen geerntet. Die daraus entstandene F3-Generation wurde erneut auf ihre Fähigkeit ohne Wasser auszukommen getestet. Insgesamt wurden drei verschiedene F3-Generationen untersucht.

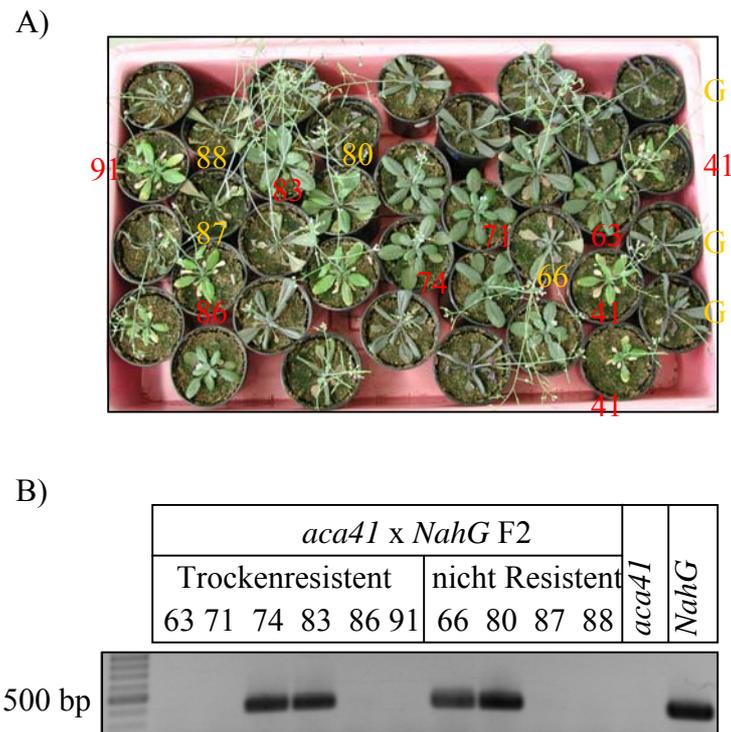
Es zeigte sich, dass die Trockenstressresistenz in allen F3-Generationen nicht mehr so stark ausgeprägt war, wie in der F2-Generation oder der Ausgangslinie. Außerdem war der Phänotyp der Pflanzen nicht homogen, da einige schneller vertrockneten als andere. Insgesamt könnte man sagen, dass sich die F3-Pflanzen intermediär verhielten, da die Mehrheit der Pflanzen schneller vertrockneten als *aca38#8* aber langsamer als 5GuDe. (Abbildung 44). Es war nicht möglich eine F3-Linie zu finden, in der die Resistenz gegen Wassermangel so deutlich war wie in *aca38#8*.



**Abbildung 44:** Trockenstressexperiment mit der F3-Generation der Kreuzung *aca38#8* x 5GuDe. Zustand der Pflanzen nach 12 Tagen ohne Wasser unter Kurztagsbedingungen. Während der Durchführung des Experimentes standen die Pflanzen ungeordnet auf dem Tablett, um ein ungleichmäßiges Austrocknen auf Grund des Standortes zu verhindern.

#### 4.5.2.9 Analyse der Kreuzung *aca41* x *NahG* auf ihre Trockentoleranz

Um zu untersuchen, ob die Austrocknungstoleranz von *aca41* Salizylsäure-abhängig ist, wurden der Phänotyp von Pflanzen der F2-Generation der Kreuzung *aca41* x *NahG* bei Wassermangel analysiert. Dazu wurden insgesamt 80 Pflanzen in zwei unabhängigen Experimenten getestet. Drei Wochen alten Langtagspflanzen wurde je ein Blatt für eine DNA-Extraktion abgeschnitten und anschließend das Gießen der Pflanzen eingestellt. Nach 12 Tagen ohne Wasser waren alle *NahG* Pflanzen vertrocknet, während alle *aca41* und ca. 10% der F2-Generation noch keine Anzeichen des Welkens zeigten. Abbildung 45 A zeigt exemplarisch einige überlebende F2-Pflanzen (rot markiert). Sowohl von einigen trockenstressresistenten als auch von einigen vertrockneten F2-Pflanzen wurde eine DNA Analyse durchgeführt (Abbildung 45 B), um das *NahG*-Gen nachzuweisen. In einigen der überlebenden F2-Pflanzen war *NahG* nachweisbar, in anderen nicht. Das gleiche galt für die F2-Pflanzen, die empfindlich auf den Wasserstress reagierten. Die erhöhte Toleranz bei Wassermangel könnte demnach unabhängig von den Salizylsäuremengen in der Pflanze sein. Allerdings wäre es auch möglich, dass die Trockenstressresistenz, wie die Expression von *Zat12* (Kapitel 4.5.1.2), durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch das Catechol in den *NahG*-Pflanzen beeinflusst worden ist.



**Abbildung 45: Analyse der F2-Generation der Kreuzung *aca41* x *NahG*. Untersucht wurden 3 Wochen alte Langtagspflanzen auf ihre Austrocknungstoleranz. A) Pflanzen nach 12 Tagen ohne Wasser (rot: trockenresistent (41=*aca41*), gelb: vertrocknete Pflanzen (G=*NahG*); außerdem wurden einige F2-Pflanzen der Kreuzung *aca41* x *NahG* in den entsprechenden Farben gekennzeichnet) B) Nachweis des *NahG* Gens in den markierten Pflanzen aus Versuch A mit PCR. Die Reaktion wurde mit den Primern *nahG* sense und *nahG* anti durchgeführt. Es wurde jeweils 50 ng genomische DNA aus Blättern für die PCR eingesetzt. Das 1%ige Agarosegel wurde mit jeweils 10 µl PCR-Ansatz beladen.**

## 5 Diskussion

Während der Pathogenabwehr der Pflanze wird ein Salizylsäure-abhängiger Signaltransduktionsweg aktiviert, der zur Expression einer Reihe von Abwehrgenen führt. Die Promotoren einiger Abwehrgene enthalten als funktionelle *cis*-Elemente *as-1* ähnliche Sequenzen. Um neue Komponenten dieses Signalwegs zu identifizieren, wurde mit Hilfe eines konditionierbaren Suizidsystems nach Pflanzen gesucht, in denen der Signalweg zwischen Salizylsäurestimulus und der Induktion von Genen, mit *as-1* ähnlichen Promotorelementen, mutiert ist (BRENNER, 2002). Insgesamt überlebten 60 Pflanzen die Bedingungen des Suizidtests, von denen 12 Pflanzen von BRENNER als mögliche Signaltransduktionsmutanten eingestuft wurden.

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei dieser Mutanten, *ana41* und *ana38* (*as-1 not active*), für eine genauere Charakterisierung ausgewählt. Beide Mutantenlinien wurden zunächst bis zur F2-Generation herangezogen, damit alle nachfolgenden Arbeiten mit homozygoten Linien durchgeführt werden konnten, und in *aca41* und *aca38#8* (*as-1 constitutiv active*) umbenannt (Kapitel 4.3.1).

### 5.1 Das Suizidgen ist in beiden Mutantenlinien nicht funktionell

Als Suizidgen verwendete BRENNER die *Deacetylase* unter der Kontrolle eines Minimalpromotors mit 5 x *as-1* Elementen, damit die Expression des Gens durch Salizylsäure induzierbar war. Durch gleichzeitige Behandlung der Pflanzen mit Salizylsäure und NAcPT wird die *Deacetylase* induziert und katalysiert die Reaktion von NAcPT in ein für Pflanzen giftiges Herbizid, wodurch die Pflanze abstirbt. Wird die SA-abhängige Expression der *Deacetylase* durch eine Mutation im Signalweg verhindert, überleben die Pflanzen den Suizidtest.

Laut BRENNER war die Expression der *Deacetylase* in den Mutanten nach Behandlung mit Salizylsäure im Vergleich zur Kontrolllinie 5GuDe deutlich reduziert. Um dieses

Ergebnis zu reproduzieren, wurde in den Linien *aca41* und *aca38#8* im Rahmen dieser Arbeit die *Deacetylase*-Expression nach Salizylsäureinduktion analysiert. Für beide Linien ließ sich das Ergebnis von BRENNER dahin gehend bestätigen, dass die Transkriptmenge der *Deacetylase* durch Salizylsäure nur geringfügig gesteigert werden konnte. Allerdings war in Linie *aca38#8* schon im uninduzierten Zustand eine deutliche Expression der *Deacetylase* erkennbar. (Kapitel 4.2.1.).

Die konstitutive Expression der *Deacetylase* in Linie *aca38#8* warf die Frage auf, warum die Pflanzen trotz der hohen *Deacetylase*-Expression den Suizidscreen überlebt hatten. Daher wurde in einem neuen Suizidscreen die Funktionalität der *Deacetylase* in beiden Linien überprüft. Es stellte sich heraus, dass in beiden Mutanten die *Deacetylase* nicht mehr funktionell war und die Mutanten deshalb das Auswahlverfahren von BRENNER überlebt hatten.

Unabhängig von der Funktion der *Deacetylase*, war in beiden Mutantenlinien die Expression der *Deacetylase* im Vergleich zur Kontrolllinie signifikant verändert. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass in beiden Linien eine Mutation im Salizylsäure-abhängigen Signalweg vorliegt, die zu einer veränderten Expression von Genen mit *as-1* ähnlichen Promotorelementen führt.

## 5.2 Konstitutive Expression von *PR*-Genen

Auf Grund der veränderten Expression der *Deacetylase*, stellte sich die Frage, in wie weit die Expression von endogenen Abwehrgenen nach Salizylsäurestimulus in den Mutanten beeinflusst ist.

Nach der Arbeit von BRENNER war die Expression der Abwehrgene *GST6* und *PR1* in Linie *ana41* und Linie *ana38* nach Salizylsäurebehandlung nur schwach induzierbar, wobei *PR1* schon in uninduzierten Pflanzen deutlich exprimiert war. Aus diesem Ergebnis schloss er, dass in beiden Linien eine Mutation die Salizylsäure-abhängige Induktion von Genen, die ein *as-1* ähnliches Element im Promotor haben, verhindert. Bei der Reproduktion des Experimentes in dieser Arbeit zeigte sich, dass sowohl *GST11* als auch *PR1*, *PR2* und *PR5* in Linie *aca41* und *aca38#8* konstitutiv exprimiert wurden. Durch Zugabe von Salizylsäure konnte die Expression der Gene weiter gesteigert

werden (Kapitel 4.3.1). Es scheint also in beiden Linien eine Mutation im Salizylsäure-abhängigen Signaltransduktionsweg zu geben, welche zu einer konstitutiven Expression von Salizylsäure-abhängigen Genen führt.

In der Literatur wurden bereits mehrere Mutanten mit konstitutiver Expression von Abwehrgenen beschrieben, darunter *acd2*, *lds1*, *mpk4* und die *cpr*-Mutanten. In den rezessiven *cpr1*- und *cpr5*-Mutanten (*constitutive expresser of PR genes*) und in der dominanten *cpr6*-Mutante ist die SAR dauerhaft aktiviert, was durch erhöhte SA-Mengen, die konstitutive Expression der *PR*-Gene und eine verstärkte Resistenz gegen Pilz- und Bakterienbefall deutlich wird (BOWLING *et al.*, 1994; BOWLING *et al.*, 1997; CLARKE *et al.*, 1998). In *cpr5* und *cpr6* ist neben dem SA-Signalweg auch der Jasmonsäure (JA) / Ethylen (ET)-Signalweg dauerhaft aktiviert, wodurch *PDF1.2* konstitutiv exprimiert wird (BOWLING *et al.*, 1997; CLARKE *et al.*, 1998). Als einzige der *cpr*-Mutanten hat *cpr5* anomale Trichome und zeigt das Auftreten von spontanen Läsionen (BOCH *et al.*, 1998; BOWLING *et al.*, 1997). KIRIK *et al.* (2001) zeigten, dass *CPR5* für ein neues putatives Transmembranprotein codiert, dessen cytoplasmatischer N-terminus ein Kernlokalisationsmotiv enthält. Auf Grund dieser Sequenzanalyse spekulierten die Autoren, dass *CPR5* ähnlich wie Membran-gebundene Transkriptionsfaktoren funktionieren könnte, die in der Membran verankert sind, aber nach einem Stimulus abgespalten werden und so in den Kern gelangen können.

Spontane Läsionen wie in *cpr5* treten auch in der *acd2* (*accelerated cell death 2*)- und *lds1* (*lesion simulating disease resistance response 1*)-Mutante auf (GREENBERG *et al.*, 1994; DIETRICH *et al.*, 1994). In beiden Mutanten erfolgt die Bildung der Läsionen abhängig vom Alter der Pflanzen und steht im direkten Zusammenhang mit der Expression von Markern der SAR. Nur *acd2*-Mutanten mit Läsionen haben erhöhte SA-Mengen, eine konstitutive *PR*-Gen Expression und sind resistent gegen virulente Pseudomonaden (DIETRICH *et al.*, 1994). Auch in der *lds1*-Mutante korreliert das Auftreten von spontanen Läsionen mit der konstitutiven Expression von *PR*-Genen. Im Gegensatz zur *acd2*-Mutante war allerdings in *lds1* die Pathogenabwehr auch in Pflanzen ohne Läsionen erhöht (GREENBERG *et al.*, 1994). *LSD1* gehört zu einer neuen Unterfamilie der Zink-Finger Proteine, in der die einzelnen Zink-Finger Motive untereinander eine starke Homologie aufweisen (Dietrich *et al.*, 1997). Die *mpk4* (*MAP*

*Kinase 4*)-Mutante zeigt ebenfalls eine konstitutive SAR mit erhöhten SA-Mengen und einer verstärkten Resistenz gegen Bakterien. Zusätzlich ist in der Mutante der JA-Signalweg unterbrochen, was dadurch gezeigt wurde, dass *PDF1.2* nach Induktion mit JA nicht exprimiert wird. Damit scheint MPK4 nicht nur für die SAR, sondern auch für die Expression von JA-abhängigen Genen nötig zu sein (PETERSEN *et al.*, 2000).

Auf Grund der bekannten Mutationen mit konstitutiver *PR*-Gen Expression, stellte sich die Frage, ob es sich bei *aca41* oder *aca38#8* um eine der bereits beschriebenen Mutanten handelt. Da weder bei *aca41* noch bei *aca38#8* spontane Läsionen auftreten, ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei einer der beiden Mutanten dieser Arbeit um eine *cpr5*, *acd2* oder *lsd1*-Mutante handelt. Dass *aca41* nicht mit der *cpr5*-Mutante identisch ist, wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass in uninduzierten *aca41* Pflanzen kein *PDF1.2*-Signal detektiert werden kann (Kapitel 4.3.5). Das deutet darauf hin, dass in *aca41* der JA/ET-Weg anders als in *cpr5* nicht dauerhaft aktiviert ist. Der Wuchs von *mpk4* wurde ähnlich wie in *aca38#8* als klein und kraus beschrieben (PETERSEN *et al.*, 2000). Da aber in *aca38#8* *PDF1.2* durch JA Behandlung induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt), scheint es sich bei *aca38#8* nicht um die *mpk4*-Mutante zu handeln.

Um die Stärke des konstitutiven *PR1*-Signals in *aca41* und *aca38#8* mit der Genexpression in bereits beschriebenen Mutanten zu vergleichen, wurde eine Northern-Blot Analyse mit uninduzierten *aca41*, *aca38#8*, *cpr1*, *cpr5* und *cpr6* durchgeführt. Die Stärke des *PR1*-Signals in der *cpr5* Mutante, die von allen drei *cpr*-Mutanten die stärkste *PR1*-Gen Expression aufwies, war mit der Signalstärke in *aca41* und *aca38#8* vergleichbar (Kapitel 4.3.1.2).

Als mögliche Ursache für die konstitutive Expression der *PR*-Gene in *aca41* und *aca38#8* wurden dauerhaft erhöhte Salizylsäuremengen vermutet. Die Messung der endogenen Salizylsäuremengen in uninduzierten Pflanzen zeigte, dass in *aca41* die Salizylsäuremengen 4-fach höher waren als in 5GuDe. Als Positivkontrolle wurden die Salizylsäuremengen von *cpr5* gemessen, die laut BOWLING *et al.* (1997) ca. 30-fach höher sein sollten als im Wildtyp. In dieser Arbeit waren die Salizylsäuremengen in *cpr5* nur 8-fach höher als in 5GuDe, womit der Literaturwert nicht erreicht wurde.

Trotzdem konnte gezeigt werden, dass sowohl in *cpr5* als auch in *aca41* die Salizylsäuremengen deutlich höher als in 5GuDe waren (Kapitel 4.3.2). In *aca38#8* waren die Salizylsäuremengen nur doppelt so hoch wie in 5GuDe. Die Messung erfolgte allerdings in einem anderem Labor als die Messungen an *aca41* und *cpr5*, so dass die Ergebnisse nicht untereinander verglichen werden konnten.

Kreuzungsexperimente von *aca41* mit *NahG*-Pflanzen, die Salizylsäure zu Catechol abbauen, zeigten, dass die *PRI*-Expression in *aca41* von den endogenen SA-Mengen abhängig ist (Abbildung 27). Daher ist es wahrscheinlich, dass auch in *aca38#8* die endogenen Mengen an Salizylsäure für die konstitutive *PR*-Gen Expression verantwortlich sind.

WILDERMUTH *et al.* (2001) zeigten, dass nach Pathogenbefall die Isochorismat-Synthase (*ICS1*) das entscheidende Enzym für die Bildung der Salizylsäure ist. Sowohl *aca41* und *aca38#8* als auch *cpr5* exprimierten im uninduzierten Zustand konstitutiv das *ICS1*-Gen (Kapitel 4.3.3). Es ist also wahrscheinlich, dass in beiden Mutantenlinien die Salizylsäure über einen *ICS1*-abhängigen Weg gebildet wird, in den Pflanzen akkumuliert und so zu einer konstitutiven Expression der Abwehrgene führt.

Da in *aca41* wahrscheinlich ein bisher unbekanntes Gen oberhalb von *ICS1* mutiert ist, wäre es interessant dieses Gen zu kartieren, um neue Kenntnisse über den Signaltransduktionsweg der zur *ICS1*- und damit auch zur *PRI*-Expression führt, zu gewinnen. Vor einer Kartierung sollte allerdings geklärt werden, ob die Mutation rezessiv oder dominant vererbt wird, und ob wirklich nur eine Mutation für die beobachteten Phänotypen verantwortlich ist. Daher wurde in *aca41* sowohl die *PRI*- als auch die *ICS1*-Expression in verschiedenen Rückkreuzungsexperimenten untersucht.

Die Analyse der F1- und F2-Generation der Rückkreuzung von *aca41* mit 5GuDe zeigte, dass es sich bei der konstitutiven *PR*-Gen Expression um einen rezessiven Phänotyp handelt (Kapitel 4.3.1.1). Während in der F1-Generation kein *PRI*-Signal detektierbar war, zeigten 25% der F2-Pflanzen eine *PRI*-Gen Expression. Allerdings war in 2/3 dieser F2-Pflanzen die *PR*-Gen Expression deutlich schwächer als in der Ausgangslinie. Es könnte also sein, dass nicht nur eine Mutation für die konstitutive *PR*-Gen Expression verantwortlich ist, sondern noch eine weitere Mutation die Expression beeinflusst. Diese zweite Mutation dürfte nicht in der Lage sein, alleine die

*PR*-Gen Expression zu induzieren, da sonst mehr als 25% der F2-Pflanzen ein *PR*-Signal zeigen müssten. Statt dessen dürfte sie nur die *PR1*-Expression, die durch die erste Mutation ausgelöst wird, verstärken. Liegen in einer F2-Pflanze beide Mutationen gleichzeitig vor, würde ein *PR1*-Signal in der gleichen Stärke wie in *aca41* induzieren werden.

Mit Hilfe der F2-Generation der Kreuzung von *aca41* mit *ICS1::LUC* Pflanzen wurde die Vererbung der konstitutiven *ICS1*-Expression analysiert (Kapitel 4.3.3). Dabei zeigte sich, dass nur 16% der F2-Pflanzen *ICS1* konstitutiv exprimierten und nur vereinzelte Pflanzen eine wirklich starke *ICS1*-Expression zeigten.

Das unterstützt die Vermutung, dass in *aca41* zwei Mutationen zusammenwirken müssen, von denen aber nur eine in der Lage ist, die *ICS1*-Expression zu induzieren, während die andere Mutation eine verstärkende Wirkung hat. Beide Mutationen scheinen im Signalweg oberhalb von *ICS1* zu liegen, da in den F2-Pflanzen einer Kreuzung beide Mutationen vorhanden sein müssen, um eine *ICS1*-Expression wie in *aca41* zu induzieren. Nur in dem Fall wird so viel Salizylsäure gebildet, um eine *PR1*-Expression in vergleichbarer Stärke wie in *aca41* zu induzieren. Dass 25% aller F2-Pflanzen *PR1* exprimieren, aber nicht bei 25% ein *ICS1*-Signal detektierbar war, könnte daran liegen, dass die Methode der Luminiszenz nicht sensitiv genug ist, um eine sehr schwache *ICS1*-Expression nachzuweisen.

Um den Signalweg oberhalb von *ICS1* weiter zu untersuchen, müssten zunächst mit Hilfe von Rückkreuzungen beide Mutationen voneinander segregiert werden und anschließend das Gen, das die *ICS1*-Expression induzieren kann, kartiert werden.

In Linie *aca38#8* wurde nur die Vererbung des *PR1*-Signals untersucht. Bei der Analyse der F1-Generation der Kreuzung von *aca38#8* mit 5GuDe fiel auf, dass nicht nur die *PR*-Gen Expression, sondern auch der kleine, krause Wachstumsphänotyp der Pflanzen, ein rezessiver Phänotyp ist. Alle Pflanzen der F1-Generation sahen im Wuchs aus wie 5GuDe und hatten im uninduzierten Zustand keine *PR1*-Gen Expression. In der F2-Generation trat in 25% der Pflanzen sowohl wieder der kleine, krause Wuchs auf als auch eine konstitutive *PR*-Gen Expression in der gleichen Stärke wie in *aca38#8*. Dabei war das *PR1*-Signal nur in den kleinen, krausen Pflanzen nachweisbar. Es scheint also, dass die konstitutive *PR*-Gen Expression mit dem andersartigen Wuchs der Pflanzen zusammen vererbt wird. Daher muss entweder eine Mutation für beide Phänotypen

verantwortlich sein, oder die Informationen für die beiden Phänotypen liegen auf sehr eng benachbarten Stellen auf dem Chromosom und werden daher zusammen vererbt.

### 5.3 Resistenz von *aca41* gegen Bakterieninfektion

Die Merkmale der systemischen Resistenz, wie hohe SA-Mengen und konstitutive Expression der *PR*-Gene, sind in *aca41* vorhanden. Allerdings treten in *aca41* im Gegensatz zu anderen Mutanten mit konstitutiver SAR kaum pleiotrophe Effekte, wie zum Beispiel die Entwicklung von spontanen Läsionen, auf. Die Mutation in *aca41* scheint also in der Signalkette näher an ICS1 zu liegen als in den anderen Mutanten. Daher stellte sich die Frage, ob die Mutationen in *aca41* ausreichen, um eine erhöhte Resistenz bei Pathogenbefall auszulösen.

Um diese Frage zu beantworten, wurde in der vorliegenden Arbeit die Abwehr von *aca41* gegen Befall mit *Pseudomonas syringae* untersucht. Die Pathogenabwehr von *aca38#8* wurde nicht analysiert, da die Pflanzen auf Grund ihres kleinen Wuchses nicht für eine Infektion mit Bakterien geeignet waren. Wurden die Bakterien mit einer Spritze unmittelbar in die Blätter injiziert, zeigte *aca41* nach drei Tagen genauso große Läsionen wie 5GuDe (Kapitel 4.3.4.1). Bei der Bestimmung der Bakterienmenge in den Pflanzen drei Tage nach Infektion, konnte ebenfalls kein Unterschied zwischen dem Bakterienwachstum in *aca41* und 5GuDe festgestellt werden. Nur nach Infektion mit einem avirulenten Pseudomonaden-Stamm schien *aca41* resistenter zu sein als 5GuDe, da die Menge der Bakterien um den Faktor 12 reduziert waren.

Wurden die Pflanzen zur Infektion in eine Bakterienlösung mit virulenten Pseudomonaden getaucht, waren Unterschiede im bakteriellen Wachstum zwischen Mutante und 5GuDe erkennbar. Als Kontrolle für eine effektive Abwehr wurde das Bakterienwachstum in der *cpr5*-Mutante analysiert, die auf Grund der konstitutiven SAR ein 10-fach reduziertes Bakterienwachstum in Vergleich zum Wildtyp aufweisen sollte (BOWLING *et al.*, 1997). Tatsächlich war das Bakterienwachstum in *cpr5* drei Tage nach Infektion um den Faktor 10 reduziert. In *aca41* war das Bakterienwachstum im Vergleich zu 5GuDe reduziert, aber nicht so deutlich wie in *cpr5*.

Durch Behandlung der Pflanzen mit Salizylsäure vor der Pathogeninfektion konnte in allen drei Linien die Abwehr gesteigert werden, so dass das Bakterienwachstum nach drei Tagen in 5GuDe, *aca41* und *cpr5* gleich stark gehemmt war. Selbst im Fall von *cpr5* führte also die durch exogenen Stimulus ausgelöste SAR noch zu einer Verstärkung der Abwehrreaktion. CLARKE *et al.* (1998) zeigte, dass Wildtyppflanzen nach INA-Behandlung, einem funktionellen Analogon der Salizylsäure, eine stärkere Pathogenresistenz aufwiesen als die *cpr6*-Mutante. Auch in *cpr5* ist die Resistenz gegen Pseudomonaden etwas geringer als in mit INA-behandelten Wildtyppflanzen (BOWLING *et al.* 1997). Es scheint also, als ob exogen applizierte Salizylsäure eine effektivere SAR auslöst als endogen erhöhte SA-Mengen.

Von beiden Infektionsmethoden die in dieser Arbeit angewendet worden sind, entspricht es eher dem natürlichen Verlauf einer Infektion, wenn die Bakterien nur auf die Oberfläche der Pflanzen aufgebracht werden, wie es beim Eintauchen in eine Bakterienlösung der Fall ist. Daher kann man davon ausgehen, dass *aca41* unter realen Bedingungen resistenter als 5GuDe, aber susceptibler als *cpr5*, ist. Nur bei starkem Pathogendruck, wie er zum Beispiel durch das direkte Einspritzen der Bakterien in das Gewebe entsteht, bricht die Abwehr von *aca41* zusammen.

Eine mögliche Erklärung für die bessere Resistenz von *cpr5* könnten die höheren endogenen Salizylsäuremengen sein. Da allerdings laut SUMMERMATTER *et al.* (1995) die SA-Mengen in systemischen Blättern nach Infektion mit Pseudomonaden ca. um den Faktor 4-5 ansteigen, sollten die SA-Mengen in *aca41* ausreichen, um eine konstitutive SAR zu vermitteln. Daher ist es wahrscheinlicher, dass die Abwehrmechanismen die in *cpr5* zusätzlich durch den JA/ET-Weg induziert werden, für die effektivere Abwehr verantwortlich sind.

Die *cpr5*-Mutante ist ein Beispiel dafür, dass eine einzelne rezessive Mutation verschiedene, scheinbar von einander unabhängige, Phänotypen und Signaltransduktionsketten beeinflussen kann. Bisher deuten die Untersuchungen an *aca41* darauf hin, dass ausschließlich der SA-Weg von den Mutationen betroffen ist. Um herauszufinden, ob vielleicht andere bisher in *aca41* unentdeckte Signaltransduktionswege beeinflusst sind, wurden in einer Arrayanalyse die Expression von Transkriptionsfaktoren in uninduzierten *aca41* und 5GuDe Pflanzen verglichen (Kapitel

4.4). Wäre in *aca41* nur der Salizylsäuresignalweg von der Mutation beeinflusst, dürfte ausschließlich die Expression von Salizylsäure-induzierbaren Genen in *aca41* konstitutiv hochreguliert sein. Es stellte sich heraus, dass nur ca. die Hälfte der in *aca41* konstitutiv exprimierten Gene nach Analyse mit dem Programm Genvestigator/Metaanalyser durch Salizylsäure induzierbar sind (Abbildung 23 A). Das würde bedeuten, dass in *aca41* neben dem SA-Weg auch noch andere Signalwege von den Mutationen betroffen sind, die zur Induktion von Genen führen. Allerdings wird die Aussagekraft dieses Experimentes durch zwei Tatsachen geschwächt. Zum einen scheinen durch die Auswertung mit dem Programm Arrayvision einige SA-induzierbare Gene zu fehlen. Zum Beispiel ist *WRKY6* laut Array in *aca41* nicht exprimiert, obwohl es sich um ein SA-induzierbares Gen handelt, das in *aca41* konstitutiv exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Zum anderen gehört laut Genvestigator/Metaanalyser-Analyse *PR5* nicht zu den SA-induzierbaren Genen. Da *PR5* aber durch Salizylsäure induziert werden kann (Abbildung 7 B), könnte es sein, dass auch anderen Gene durch SA induzierbar sind, obwohl die Auswertung mit dem Datenprogramm etwas anderes ergeben hat. Es wäre also möglich, dass in *aca41* nur der SA-Weg beeinflusst ist. Dafür würde auch sprechen, dass die Expression aller in *aca41* reprimierten Gene, durch Salizylsäure gehemmt werden kann (Abbildung 23 B).

## 5.4 Reaktion der Mutanten auf oxidativen Stress

Durch den Vergleich uninduzierter *aca41* und 5GuDe Pflanzen im Array wurden drei Gene, *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25*, identifiziert, die in *aca41* konstitutiv exprimiert werden (Kapitel 4.4). Durch anschließende Northern-Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass diese drei Gene nicht nur in *aca41*, sondern auch in *aca38#8* und *cpr5* konstitutiv exprimiert werden (Kapitel 4.5.1.1). RIZHSKY *et al.* (2004) zeigten, dass *Zat12* für die Expression von *Zat7* und *WRKY25* essentiell ist, da in Knock-Out *Zat12*-Pflanzen weder *Zat7* noch *WRKY25* induziert werden können. Allerdings führte eine Überexpression von *Zat12* nicht zu einer konstitutiven Expression der anderen beiden Gene, woraus RIZHSKY *et al.* (2004) schlossen, dass noch ein weiterer Stimulus für die Expression von *Zat7* und *WRKY25* nötig sein muss.

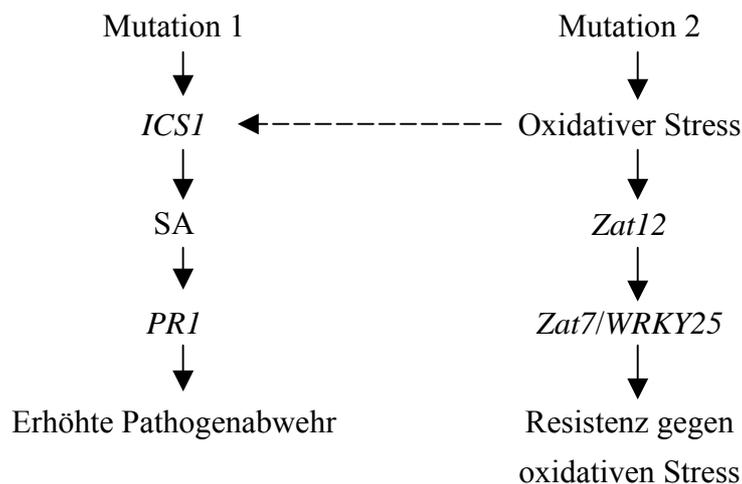
Die Analyse von *Zat12* mit dem Programm Genvestigator/Metaanalyser hatte ergeben, dass *Zat12* zu den SA-induzierbaren Genen gehört (Abbildung 23 A). Um zu analysieren, ob *Zat12* in *aca41* SA-abhängig induziert wird, wurde die Expression von *Zat12* in der F2-Generation der Kreuzung von *aca41* mit *NahG* untersucht (Kapitel 4.5.1.2). Nach diesem Experiment scheint die *Zat12*-Expression nicht Salizylsäure-abhängig zu sein. Zum einen erfolgt die Expression von *Zat12* in Pflanzen, die *NahG* exprimieren, d. h. Salizylsäure zu Catechol abbauen. Zum anderen wird *Zat12* auch in Pflanzen ohne *ICS1*-Expression, d. h. ohne erhöhte Salizylsäuremengen, exprimiert. Obwohl also *Zat12* zu den Salizylsäure-induzierbaren Genen gehört, scheint es in *aca41* über einen anderen Signalweg induziert zu werden.

In den Untersuchungen von RIZHSKY *et al.* (2004) wurde gezeigt, dass *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25* durch oxidativen Stress induziert werden können und die Überexpression von *Zat12* zu einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress führt. Es könnte also sein, dass eine der Mutationen in *aca41* oxidativen Stress erzeugt und dadurch die Expression von *Zat12*, *Zat7* und *WRKY25* induziert. Die Expression dieser Gene müsste in *aca41*, *aca38#8* und *cpr5* zu einer erhöhten Resistenz gegen oxidativen Stress führen. Durch Bestimmung der Wurzellänge von *aca41*, *aca38#8*, *cpr5* und 5GuDe, die auf Medium mit und ohne Paraquat, einer Superoxid-erzeugenden Substanz, wuchsen, wurde untersucht, ob die Mutanten resistenter gegen oxidativen Stress als 5GuDe sind. Zunächst fiel aber bei dem Vergleich der Wurzellängen nicht gestresster Pflanzen auf, dass die Wurzeln von *aca41* auch ohne oxidativen Stress deutlich kürzer waren als die Wurzeln der anderen Pflanzen (Abbildung 28). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass *aca41* tatsächlich dauerhaft unter leichtem oxidativen Stress leidet und dadurch die Expression der *Zat*-Gene induziert wird.

Durch Bestimmung der Wurzellänge von Pflanzen die auf Medium mit Paraquat wuchsen, konnte gezeigt werden, dass sowohl *aca41* als auch *cpr5*, aber nicht *aca38#8*, eine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress aufweisen (Kapitel 4.5.1.2). Es könnte also sein, dass *Zat12* in *aca41* und *cpr5* die höhere Toleranz gegenüber oxidativen Stress vermittelt. Da in *aca38#8* die Expression von *Zat12* schwächer war als in den beiden anderen Linien, wäre es möglich, dass in *aca38#8* die *Zat12* Mengen nicht ausreichen, um eine erhöhte Resistenz auszulösen.

Durch Untersuchungen an *ICS1::LUC*-Pflanzen wurde versucht in *aca41* eine Verbindung zwischen der Resistenz gegen oxidativen Stress und der konstitutiven *ICS1*-Expression und den damit verbundenen erhöhten SA-Mengen herzustellen (Kapitel 4.5.1.4). Um zu klären, ob *ICS1* durch oxidativen Stress induzierbar ist, wurden die Pflanzen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Paraquat behandelt. Durch beide Behandlungen konnte *ICS1* nicht induziert werden. Nach diesem Ergebnis ist es also nicht wahrscheinlich, dass die Mutation, die in *aca41* oxidativen Stress erzeugt und die Expression der *Zat*-Gene induziert, auch die Expression von *ICS1* induzieren kann. Wie schon bei den Expressionsanalysen von *PR1* und *ICS1* vermutet, scheint es in *aca41* zwei Mutationen zu geben, von denen eine die Expression der Gene induziert, während die andere Mutation eher eine unterstützende Wirkung hat. Es könnte also sein, dass es sich bei der Mutation, die den oxidativen Stress erzeugt, um dieselbe Mutation handelt, die auch die Expression von *ICS1* und *PR1* verstärken aber nicht alleine induzieren kann (Abbildung 46).

Durch Analysen von Pflanzen der Rückkreuzung von *aca41* mit 5GuDe wäre es möglich herauszufinden, ob die Resistenz gegen oxidativen Stress und die *ICS1*-Expression unabhängig voneinander vererbt werden können und wie stark die Phänotypen dann noch ausgeprägt sind.



**Abbildung 46: Hypothetisches Modell der zwei Mutationen in *aca41*.**

MITTLER *et al.* (1999) zeigte, dass Tabakpflanzen, die oxidativem Stress ausgesetzt wurden, bei einer anschließenden Pseudomonadeninfektion nur eine verringerte Abwehrreaktion aufwiesen. Falls *aca41* also tatsächlich dauerhaft unter leichtem oxidativem Stress leidet, könnte das dazu beitragen, dass die Resistenz gegen Bakterienbefall in *aca41* trotz konstitutiver Expression der *PR*-Gene nicht besonders stark ausgeprägt ist.

## 5.5 Reaktion der Mutanten auf Trockenstress

Während der Untersuchungen an *aca41* und *aca38#8* fiel auf, dass beide Mutanten eine erhöhte Toleranz gegen Austrocknung zeigten. Da die Möglichkeit bestand, dass eine weitere Mutation für diese Trockentoleranz verantwortlich ist, wurden Analysen durchgeführt, um neue Erkenntnisse über die Vermittlung der Trockentoleranz in *Arabidopsis* zu gewinnen.

Dazu wurden zunächst in mehreren unabhängigen Experimenten sowohl die Geschwindigkeit des Welkens als auch der Wasserverlust über die Blätter gemessen (Kapitel 4.5.2.1). Beide Mutanten waren nach 14 Tagen ohne Wasser noch turgeszent, während 5GuDe zu diesem Zeitpunkt verwelkt war. Die Messung des Gewichts der Pflanzen während eines Trockenstressexperimentes deutete darauf hin, dass beide Mutantenlinien einen geringeren Wasserverbrauch haben, da ihre Gewichtsabnahme deutlich langsamer erfolgte als die von 5GuDe (Abbildung 33, Abbildung 34). Die geringere Größe der Mutanten spielte bei der veränderten Trockentoleranz keine Rolle, da die Versuche an jungen Pflanzen durchgeführt wurden, die alle die gleiche Größe hatten.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass *aca41* und *aca38#8* den vorhandenen Wasservorrat langsamer aufbrauchen und dadurch länger ohne neue Zugabe von Wasser leben können, war die Beobachtung des Welkverhaltens der Mutanten, wenn sie zusammen mit 5GuDe in einem Topf wuchsen (Abbildung 35). In diesem Fall welkten die Mutanten zum gleichen Zeitpunkt wie 5GuDe. Da 5GuDe das vorhandene Wasser aus

der Erde relativ schnell verbrauchte, hatte die jeweilige Mutante insgesamt weniger Wasser zur Verfügung und der geringere Verbrauch bot keinen Überlebensvorteil mehr. Dass die Mutanten durch ihren sparsameren Verbrauch des Wasservorrates erst zu einem späteren Zeitpunkt unter Trockenstress geraten, konnte auch auf genetischer Ebene gezeigt werden. Dafür wurde die Expression von *rd29A*, einem Gen das unter anderem durch Dehydration induziert wird, in *aca41*, *aca38#8* und 5GuDe analysiert (YAMAGUCHI-SHINOZAKI und SHINOZAKI, 1992). Während in 5GuDe schon nach 5 Tagen ohne Wasser *rd29A* induziert war, wurde in den Mutanten selbst nach 7 Tagen kein *rd29A*-Expression detektiert (Abbildung 36, Abbildung 37). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutanten, durch ihren geringeren Wasserverbrauch, unter Trockenstressbedingungen nicht nur später welken, sondern tatsächlich auch erst später unter Wassermangel leiden als 5GuDe.

### **Gründe für die Trockentoleranz in *aca41***

Der Wasserverlust in Pflanzen erfolgt im wesentlichen über die Cuticula und durch die Spaltöffnungen während der Transpiration. Ein möglicher Grund für den geringeren Wasserverbrauch der Mutanten könnte eine verringerte Wasserverdunstung sein, zum Beispiel durch die Veränderung der Zusammensetzung der Cuticula, der Stomataanzahl oder der Spaltöffnungsweite.

Da die Anzahl der Stomata in 5GuDe und *aca41* vergleichbar war (Abbildung 39), wurde das Schließverhalten der Stomata in *aca41* als möglicher Grund für die Trockentoleranz genauer untersucht. Eines der ersten Signalmoleküle bei beginnendem Trockenstress ist das Hormon Abscisinsäure (ABA), welches die Schließung der Stomata induziert. Bei diesem Vorgang führen erhöhte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen zur Akkumulation von Kalzium im Cytosol, wodurch Ionen-Exportkanälen geöffnet, der Turgor gesenkt und damit die Stomata geschlossen werden (BLATT, 2000; SCHRÖDER *et al.*, 2001). *CNGC4* codiert für einen Kanal, der am Kalzium-Signalweg und an der Regulation der Stomata beteiligt ist. PNUELI *et al.* (2003) zeigten, dass in Knock-Out-*Apx1* Pflanzen, in denen die endogenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen erhöht sind, *CNGC4* verstärkt exprimiert wird und die Pflanzen ihre Stomata nicht vollständig öffnen können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in *aca41* *CNGC4* konstitutiv exprimiert wird (Abbildung 40). Als mögliche Ursache für die *CNGC4* Expression

käme der oxidative Stress in *aca41* in Frage, der in der Mutante zu erhöhten  $H_2O_2$ -Mengen wie in der Knock-Out-*Apx1* Pflanze führen und dadurch die Expression von *CNGC4* induzieren könnte. Durch die verstärkte Expression von *CNGC4* wären die Stomata ähnlich wie in der Knock-Out-*Apx1* Pflanze beeinflusst und würden sich nicht mehr vollständig öffnen. Das würde zu einem geringeren Wasserverlust durch die Transpiration führen und die Pflanzen könnten länger als 5GuDe mit einem bestimmten Wasservorrat überleben. Eine verminderte Transpiration würde zu einer geringeren Photosyntheserate führen, was ein Grund für den kleineren Wuchs von *aca41* sein könnte.

Um weitere Anhaltspunkte für das Schließverhalten der Stomata unter Trockenstressbedingungen zu finden, wurde in *aca41* die Expression von *rd22*, einem ABA-responsiven Gen, untersucht (ABE *et al.*, 1997). Nach Behandlung mit ABA erfolgte die Expression von *rd22* in *aca41* schneller als in 5GuDe (Abbildung 42). Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass *aca41* sensitiver auf erhöhte ABA-Mengen reagiert als 5GuDe. Würden also bei einsetzendem Trockenstress die endogenen ABA-Mengen ansteigen, könnte *aca41* schneller darauf reagieren und dem entsprechend auch schneller die Spaltöffnungen schließen, um Wasserverlust zu vermeiden.

Das genaue Schließverhalten der Stomata von *aca41* und 5GuDe konnte durch Messung der Transpirationsrate unter Trockenstressbedingungen analysiert werden (Abbildung 41). Dabei zeigte sich, dass *aca41* schneller auf das einsetzende Wasserdefizit reagierte und daher die Stomata früher schloss als 5GuDe. Zusätzlich war die minimale Transpirationsrate, d. h. die Wasserverdunstung bei geschlossenen Stomata über die Cuticula, in der Mutante nur halb so hoch wie in 5GuDe. Dadurch verdunstet in 5GuDe das Wasser doppelt so schnell wie in *aca41*. Nach diesem Experiment scheint also die Cuticula von *aca41* verändert und daher weniger Wasserdurchlässig zu sein.

Dem widersprechen Versuche, bei denen die Permeabilität der Cuticula analysiert wurde (Abbildung 38). Dazu wurden die Pflanzen in Ethanol inkubiert und die Geschwindigkeit mit der das Chlorophyll in die Lösung diffundierte ermittelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede der Permeabilität der Cuticula in *aca41* und 5GuDe festgestellt werden. Da allerdings die Messwerte der einzelnen Versuche stark variierten, könnte es sein, dass diese Methode nicht geeignet war, um Aufschluss über die Eigenschaften der Cuticula zu gewinnen. Daher scheint die Messung der

Transpirationsrate die bessere Methode zu sein, da sich das Ergebnis der geringeren minimalen Transpirationsrate in *aca41* reproduzieren ließ, was dafür spricht, dass die Cuticula von *aca41* tatsächlich weniger permeabel als die von 5GuDe ist.

Insgesamt scheint *aca41* schneller auf einen beginnenden Trockenstress zu reagieren, vielleicht durch die höhere Sensitivität gegenüber Abscisinsäure, und dadurch die Stomata schon sehr früh zu schließen. Zusammen mit der geringen Wasserverdunstung über die Cuticula, führt das zu einem sehr niedrigen Wasserverbrauch. *aca41* kann daher länger mit einer bestimmten Wassermenge überleben als 5GuDe und die Merkmale des Trockenstresses, wie Verlust der Turgeszenz oder auch die Expression von Trockenstress-induzierten Genen, erfolgt erst später.

### **Vererbung der Trockentoleranz und der Einfluss von Salizylsäure:**

In Trockenstressexperimenten mit der F2-Generation der Kreuzung *aca41* x *NahG* wurde der Einfluss von Salizylsäure auf die Austrocknungstoleranz untersucht. Im Rahmen des Experimentes gab es sowohl trockenstressresistente F2-Pflanzen mit und ohne *NahG* Transkript, als auch suszeptible Pflanzen mit und ohne *NahG* Transkript (Abbildung 45). Deshalb scheint Salizylsäure nicht für die Vermittlung der Trockenstressresistenz wichtig zu sein. Allerdings könnte es sein, dass auch Catechol, das Abbauprodukt der Salizylsäure, indirekt die Trockentoleranz erhöht. Durch die Akkumulation von Catechol entstehen reaktive Sauerstoffspezies (SCHWEIGERT *et al.*, 2001; VAN WEES und GLAZEBROOK, 2003) und diese könnten als Signalmolekül dienen, um die Schließung der Stomata zu induzieren. Pflanzen ohne *NahG* Transkript, die suszeptibel auf den Trockenstress reagierten, könnten zu den 75% der F2-Pflanzen gehören, in denen die Mutation aus *aca41* gar nicht oder nur heterozygot vorliegt. Um sicher zu sein, dass Salizylsäure nicht für die Vermittlung der Trockentoleranz nötig ist, müsste das Experiment mit einer Kreuzung von *aca41* mit der *sid2* (*SA-induction deficient*)-Mutante wiederholt werden. Die *sid2*-Mutanten hat eine Mutation im *ICSI*-Gen und ist deshalb nicht in der Lage Salizylsäure zu bilden (NAWARATH und METRAUX, 1999). Wenn in der F2-Generation der Kreuzung von *aca41* x *sid2* trockenstressresistente Pflanzen mit einer Mutation im *ICSI*-Gen auftreten würden, dann wäre Salizylsäure für diesen Phänotyp nicht relevant.

Wie schon bei der Expression von *ICS1*, zeigten deutlich weniger als 25% der F2-Pflanzen eine erhöhte Trockentoleranz (Kapitel 4.5.2.8). Diese geringe Häufigkeit mit der die Trockentoleranz in der F2-Generation der Kreuzung *aca41* x 5GuDe vererbt wird, weist darauf hin, dass auch für die Trockenstressresistenz in *aca41* mehr als eine Mutation verantwortlich ist.

Bei der Analyse der Trockenstressresistenz in der F2-Generation der Kreuzung von *aca38#8* x 5GuDe stellte sich heraus, dass alle Pflanzen mit kleinem, krausen Wuchs, aber auch einige Pflanzen mit „normalem“ Wuchs eine erhöhte Trockentoleranz hatten (Abbildung 43). Bei der Analyse der Nachkommen der trockenresistenten F2-Pflanzen mit Wildtypwuchs, war die Toleranz gegen Wassermangel in verschiedenen Pflanzen unterschiedlich stark ausgeprägt, aber insgesamt immer deutlich schwächer als in *aca38#8* (Abbildung 44). Es könnte also sein, dass auch in *aca38#8* mehr als eine Mutation für eine hohe Trockentoleranz nötig ist. Allerdings wäre es ebenfalls möglich, dass es sich bei der analysierten F3-Generation um Nachkommen von Pflanzen handelte, die den Test nur zufällig überlebt hatten. Das würde auch erklären, warum in der F3-Generation keine wirklich trockenstressresistenten Pflanzen mehr identifiziert werden konnten. In diesem Fall gäbe es in *aca38#8* wahrscheinlich nur eine Mutation, die auf der einen Seite für den Wuchstyp verantwortlich ist und auf der anderen Seite für die Aktivierung des SA-Signalwegs und die erhöhte Trockentoleranz.

## **5.6 Hypothetisches Modell der Mutationen in *aca41* und *aca38#8***

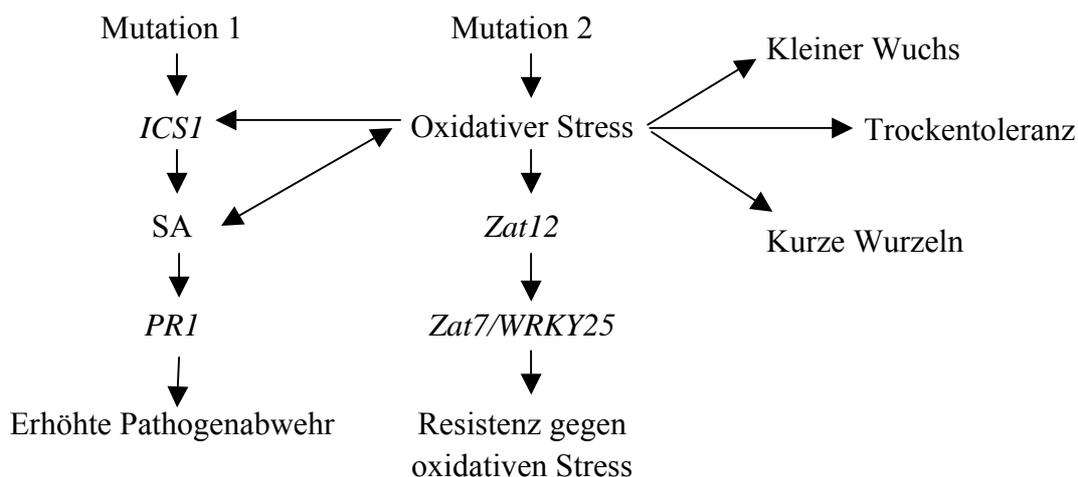
### ***aca41***

Alle bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass in *aca41* mehrere Mutationen vorhanden sind. Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass alleine in der mutierten *Deacetylase* drei Basenaustausche nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt), was ein Anzeichen für eine hohe Mutationsrate ist.

Ein mögliches Modell postuliert in *aca41* zwei Mutationen, die sich teilweise gegenseitig beeinflussen (Abbildung 47). Mutation 1 liegt oberhalb von *ICS1* in der

Signaltransduktionskette und induziert die *ICSI*-Expression und damit auch die Bildung von Salizylsäure und die *PR1*-Expression. Da die Mutation die *ICSI*-Expression induziert ohne, wie in der *cpr5*-, *acd2*- oder *lsd1*-Mutante beschrieben, in der Pflanze spontane Läsionen auszulösen, scheint die Mutation in *aca41* im Signalweg unterhalb der Mutationen der anderen beschriebenen Mutanten zu liegen, da weniger Phänotypen beeinflusst werden.

Zusätzlich reicht alleine die Mutation 1 in rückgekreuzten Pflanzen der F2-Generation nicht aus, um eine *ICSI*- und *PR1*-Expression in der gleichen Stärke wie in *aca41* zu vermitteln. Daher ist es wahrscheinlich, dass noch eine zweite Mutation, die vermutlich leichten oxidativen Stress in der Pflanze erzeugt (Mutation 2 aus Abbildung 47), diesen Signalweg positiv beeinflusst, ohne selbst die Expression von *ICSI* oder *PR1* auslösen zu können. Dafür führt Mutation 2 zur Expression der *Zat*-Gene und von *WRKY25*.



**Abbildung 47: Hypothetisches Modell der Mutationen in *aca41* und ihr Einfluss auf die verschiedenen Phänotypen.**

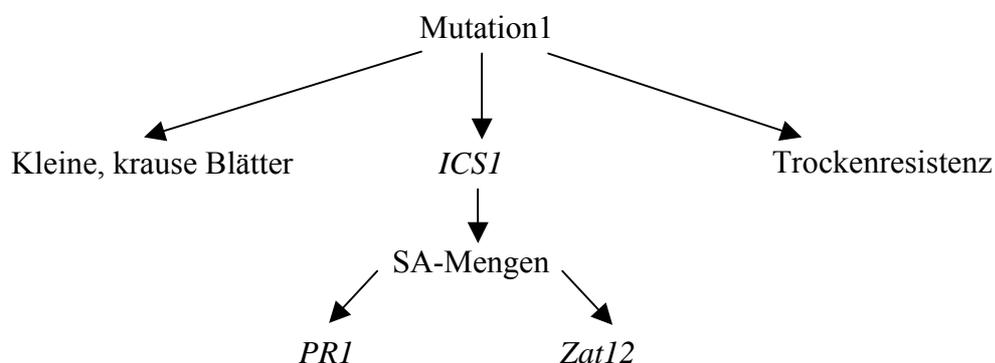
Durch eine Rückkopplungsschleife könnten sich zusätzlich die SA-Mengen und der oxidativen Stress gegenseitig positiv beeinflussen. KLESSIG *et al.* (2000) zeigten, dass SA mit einigen ROS-detoxifizierenden Enzymen wie Katalasen oder Ascorbat-Peroxidasen interagieren kann, was zum Verlust ihrer Enzymaktivität führt und zum Anstieg von ROS in der Pflanze führen könnte. Studien an Tabakpflanzen zeigte, dass durch Behandlung der Pflanzen mit  $H_2O_2$  sowohl die Akkumulation von Salizylsäure als auch die Expression von *PR*-Genen ausgelöst werden konnte (LEON *et al.*, 1995).

Daher wäre es möglich, dass sich in *aca41* die SA-Mengen und der oxidative Stress gegenseitig verstärken und dadurch die *ZAT12*-Expression verstärkt und die Resistenz gegen oxidativen Stress auslöst wird. Da auch die Vererbung der Trockenstressresistenz von zwei Mutationen abhängt, könnte es sein, dass nur der verstärkte oxidative Stress, der durch beide Mutationen zusammen induziert wird, die Trockenstressresistenz und damit verbunden den etwas kleineren Wuchs auslösen kann.

### *aca38#8*

In *aca38#8* scheint nur eine Mutationen vorhanden zu sein. Dabei würde die Mutation wie in *aca41* den Signalweg oberhalb von *ICS1* beeinflussen. Allerdings müsste sich die Mutation an einer anderen Stelle des Signalwegs befinden, da in *aca38#8* zusammen mit der *ICS1*- und *PR1*-Expression auch immer der kleine, krause Wuchstumsphänotyp vererbt wird. Da die Genexpression in der F2-Generation immer in der selben Stärke wie in *aca38#8* erfolgt, muss es keine zweite Mutation wie in *aca41* geben, die diese Genexpression noch positiv beeinflusst.

Weiterhin hat *aca38#8* keine erhöhte Resistenz gegen oxidativen Stress, woraus man schließen kann, dass die *Zat12*-Expression in *aca38#8* ausschließlich durch die erhöhten SA-Mengen erfolgt. Da auch die Trockenstressresistenz wie die *PR1*-Expression zusammen mit dem Wuchstumsphänotyp vererbt wird, kann man davon ausgehen, dass eine Mutation für alle drei Phänotypen verantwortlich ist.



**Abbildung 48: Hypothetisches Modell der Mutationen in *aca38#8* und ihr Einfluss auf die verschiedenen Phänotypen.**

## 5.7 Ausblick

### *aca41*

Um die Hypothese zu stützen, dass mehrere Mutationen für den Phänotyp von *aca41* verantwortlich sind, müssten die F2- oder spätere Generationen der Kreuzungen *aca41* x 5GuDe weiter darauf hin untersucht werden, ob und in welcher Kombination die Phänotypen von *aca41* zusammen vererbt werden.

Für die Analyse, welche Phänotypen tatsächlich SA-abhängig sind, wäre es gut *aca41* mit der bereits erwähnten *sid2*-Mutante zu kreuzen. Da in dieser Mutante kein SA gebildet werden kann und keine Nebeneffekte durch Catechol wie in der *NahG*-Mutante entstehen, könnte mit dieser Kreuzung besser der Einfluss von SA untersucht werden.

Letztendlich wäre es interessant, Mutation 1 und Mutation2 voneinander zu trennen, und das Gen der Mutation 1 zu kartieren, um damit weiter zur Aufklärung des Signalwegs oberhalb von ICS1 beizutragen.

### *aca38#8*

Da viele der Experimente im Bezug auf Trockenstress und Pathogenabwehr nur mit *aca41* durchgeführt wurden, wäre es interessant, diese Experimente mit *aca38#8* zu wiederholen, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten zu *aca41* aufzuzeigen. Denn einerseits ähneln sich die Phänotypen beider Mutanten, andererseits scheint in *aca38#8* nur eine Mutation vorhanden zu sein, die aber auch den Wuchsphänotyp beeinflusst.

Auch hier müssten also noch weitere Analysen mit Kreuzungen von *aca38#8* x *ICS1::LUC* durchgeführt werden, um zu analysieren, ob das krause Wachstum immer mit der *ICS1*-Expression und der Trockentoleranz zusammen vererbt wird.

Außerdem wäre auch hier eine Analyse von *aca38#8* x *sid2*-Pflanzen hilfreich, um zu klären, ob alle Phänotypen von der erhöhten *ICS1*-Expression abhängig sind oder ob die Mutation soweit oberhalb in der Signaltransduktionskette liegt, dass die Trockentoleranz und der Wuchs *ICS1*-unabhängig sind.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der Abwehrreaktion der Pflanze gegen Pathogene steigen die Mengen endogener Salizylsäure an, wodurch eine Reihe von Abwehrgenen aktiviert wird, die in ihrem Promotor als funktionelle *cis*-Elemente *as-1* ähnliche Sequenzen enthalten. BRENNER (2002) stellte transgene Pflanzen her, die ein Suizidgen unter der Kontrolle von 5 x *as-1* Elementen exprimierten. Nach einer Mutagenese wurden in einem Salizylsäure-abhängigen Suizidscreen Pflanzen selektiert, die das Suizidgen nicht mehr exprimieren und daher den Test überleben sollten. Bei diesen Pflanzen sollte es sich um Mutanten handeln, in denen der Signaltransduktionsweg zwischen Salizylsäurestimulus und Expression der frühen Abwehrgene unterbrochen ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Mutanten, die den Suizidtest überlebt hatten, genauer charakterisiert. Bei einer Überprüfung des Suizidgens, stellt sich heraus, dass dieses nicht mehr funktionell war und die Mutanten deshalb die Selektion überlebt hatten.

Durch Expressionsanalysen der beiden Mutantenlinien *aca41* und *aca38#8* mit und ohne Salizylsäureinduktion wurde deutlich, dass der Signaltransduktionsweg zwischen Stimulus und Abwehrgenexpression nicht unterbrochen war, sondern dass verschiedene Abwehrgene konstitutiv exprimiert wurden.

Trotz der konstitutiven Expression der Abwehrgene zeigte *aca41* im Vergleich zu Kontrollpflanzen nach Infektion mit virulenten Bakterienstämmen nur eine leicht erhöhte Resistenz.

Durch Makroarrayanalysen wurden in *aca41* drei konstitutiv exprimierte Gene identifiziert, die normalerweise durch oxidativen Stress induziert werden und deren Expression eine Resistenz gegen oxidativen Stress vermittelt. Wachstumsversuche auf Paraquat, einer Superoxid erzeugenden Substanz, zeigten, dass *aca41* eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativen Stress aufweist. Obwohl in *aca38#8* dieselben oxidativen Stressgene wie in *aca41* konstitutiv exprimiert wurden, führte dies nicht zu einer erhöhten Resistenz von *aca38#8* gegenüber oxidativen Stressbedingungen.

Weiterhin zeigten sowohl *aca41* als auch *aca38#8* einen geringeren Wasserverbrauch als 5GuDe. Durch Messung der Transpirationsrate, konnte für Linie *aca41* gezeigt

werden, dass sie unter Wassermangelbedingungen ihre Stomata schneller schließt und dass ihre minimale Transpirationsrate (Verdunstung über die Cuticula) im Vergleich zur Kontrollpflanze verringert war.

Durch Kreuzung der Linie *aca41* mit der *NahG*-Pflanze, wurde die Abhängigkeit der verschiedenen Phänotypen vom Salizylsäuregehalt in der Pflanze untersucht. Da *NahG* für eine Salizylat-Hydroxylase codiert, die Salizylsäure in Catechol umwandelt, können in diesen Pflanzen keine erhöhten Salizylsäuremengen akkumulieren. Es konnte gezeigt werden, dass in *aca41* die Expression der *PR*-Gene Salizylsäure abhängig, aber sowohl die Expression der oxidativen Stressgene als auch die erhöhte Austrocknungstoleranz Salizylsäure unabhängig war.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abe H., Yamaguchi-Shinozaki K., Iwasaki T. und Hosokawa D.** (1997): Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*, 9:1859-1868

**Aharoni A., Dixit S., Jetter R., Thoenes E., van Arkel G. and Pereira A.** (2004): The SHINE clade of AP2 domain transcription factors activates wax biosynthesis, alters cuticle properties, and confers drought tolerance when overexpressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16:2463-2480

**Apel K. und Hirt H.** (2004): Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biology*. 55:373-399

**Apostol I, Heinstein P. F. und Low P. S.** (1989): Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. Role in defense and signal transduction. *Plant Phys.*, 90:106-116

**Baker M. A. und Orlandi E. W.** (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathologie*, 33:299-321

**Bartsch K., Kriete G., Broer I. und Pühler A.** (1996): Novel genes coding for amino acid deacetylases with specificity for N-Acetyl-Phosphinothricin, their isolation and their use. Patent No. WO 98/27201. *Hoechst Schreing Agrevo GmbH*, EUR

**Benfey P. N., Ren L. und Chua N.-H.** (1989): The CaMV 35S enhancer contains at least two domains which can confer different developmental and tissue specific expression patterns. *EMBO J.*, 8:2195-2202

**Benfey P. N. und Chua N.-H.** (1990): The cauliflower mosaic virus 35S promotor: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 250:959-966

**Bent A. F.** (2000): *Arabidopsis* in plant transformation. Uses, mechanisms and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.*, 124:1540-1547

**Birnboim H. C. und Doly J.** (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7:1513-1523

**Blanco F., Garreton V., Frey N., Dominguez C., Perez-Acle T., Van der Straeten D., Jordana X. und Holoigue L.** (2005): Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biology*, 59:927-944

**Blatt M. R.** (2000): Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biology*, 16:221-241

**Boch J., Verbsky M. L., Robertson T. L., Larkin J. C. und Kunkel B. N.** (1998): Analysis of resistance gene-mediated defense responses in *Arabidopsis thaliana* plants carrying a mutation in *CPR5*. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 12:1196-1206

**Bouchez D., Tokuhsa J. G., Llewellyn D. J., Dennis E. S. und Ellis, J. G.** (1989): The *ocs* element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.*, 8:4197-4204

**Bowling S. A., Guo A., Cao H., Gordon A. S., Klessig D. F. und Dong X.** (1994): A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6:1845-1857

**Bowling S. A., Clarke J. D., Liu Y., Klessig D. F. und Dong X.** (1997): The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell*, 9:1573-1584

**Bray E. A.** (1997): Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science*, 2:48-54

**Brenner W.** (2002): Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen

**Cao H., Bowling S. A., Gordon A. S. und Dong X.** (1994): Characterization of an *Arabidopsis* Mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 6:1583-1592

**Cao H., Glazebrook J., Clark J. D., Volko S. und Dong X.** (1997): The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, 88:57-63

**Cao H., Li X. und Dong X.** (1998): Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:6531-6536

**Chen G., Sagi M., Weining S., Krugman T., Fahima T., Korol A. B. und Nevo E.** (2004): Wild barley *eib1* mutation identifies a gene essential for leaf water conservation. *Planta*, 219:684-693

**Chen S. X. und Schopfer P.** (1999): Hydroxylradical production in physiological reactions. A novel function of Peroxidase. *Eur. J. Biochem.*, 260:726-735

**Chen W., Chao G. und Singh K. B.** (1996): The promotor of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant Journal*, 10:955-966

**Chen Z., Sliva H. und Klessig D. F.** (1993): Active oxygene species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, 262:1883-1888

- Chomczynski P.** (1993): A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of RNA, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *BioTechniques*, 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., Liu Y., Klessig D. F. und Dong X.** (1998): Uncoupling *PR* gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterisation of the dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell*, 10:557-569
- Clarke J. D., Aarts N., Feys B. J., Dong X. und Parker J. E.** (2001): Constitutive disease resistance requires *EDS1* in the *Arabidopsis* mutants *cpr1* and *cpr6* and is partially *EDS1*-dependent in *cpr5*. *Plant Journal*, 26:409-420
- Clough S. und Bent A.** (2000): Vapor-Phase Sterilization of *Arabidopsis* Seed. <http://plantpath.wisc.edu/~afb/vapster.html>.
- Clough S. J. und Bent A. F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16:735-743
- Daniel, V.** (1993): Glutathion S-transferases: gene structure and regulation of expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 24:337-384
- Dangl J. L. und Jones J. D. G.** (2001): Plant pathogen and integrated defense responses to infection. *Nature*, 411:826-833
- Delaney T. P.** (1997): Genetic dissection of acquired resistance to disease. *Plant Phys.*, 113:5-12
- Desveaux D., Allard J., Brisson N. und Sygusch J.** (2002): A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat. Struct. Biol.*, 9:512-517
- Desveaux D., Subramaniam R., Despres C., Mess J.-N., Levesque C., Fobert P. R., Dangl J. L. und Brisson N.** (2004): A "whirly" transcription factor is required for salicylic-acid-dependent disease resistance in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*, 6:229-240
- 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(2):725-737
- Dietrich R. A., Delaney T. P., Uknes S. J., Ward E. R., Ryals J. A. und Dangl J. L.** (1994): *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*, 77:565-577

- Dietrich R. A., Richberg M. H., Schmidt R., Dean C. und Dangl J. L.** (1997): A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* *LSD1* gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*, 88:685-694
- 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
- Draper J.** (1997): Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci.*, 2:162-165
- Durner J. und Klessig D. F.** (1995): Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:11312-11316
- Durrant W. E. und Dong X.** (2004): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43:185-209
- Edwards R., Blount J. W. und Dixon R. A.** (1991): Glutathione and elicitation of the phytoalexin response in legume cultures. *Planta*, 184:403-409
- Falk A., Feys B. J., Frost L. N., Jones J. D. G., Daniels M. J. und Parker J. E.** (1999): *EDS1*, an essential component of *R* gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:3292-3297
- Feinberg A. P. und Vogelstein B.** (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, 132:6-13
- Feys B. J., Moisan L. J., Newman M.-A. und Parker J. E.** (2001): Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.*, 20:5400-5411
- Flor H. H.** (1955): Host-parasite interactions in flax rust – its genetic and other implications. *Phytopathology*, 45:680-685
- Gaffney T., Friedrich L., Vernooij B., Negretto D., Nye G., Uknes S., Ward E., Kessmann H. und Ryals J.** (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, 261:754-756
- Garretón V., Carpinelli J., Jordana X. und Holuigue L.** (2002): The *as-1* promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Phys.*, 130:1516-1526
- Glazebrook J.** (2001): Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* – 2001 status. *Curr. Opin. Plant Biology*, 4:301-308
- Goh C.-H., Nam H. G. und Park Y. S.** (2003): Stress memory in plants: a negative regulation of stomatal response and transient induction of *rd22* gene to light in abscisic acid-entrained *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 36:240-255

**Greenberg J. T., Guo A., Klessig D. F. und Ausubel F. M.** (1994): Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, 77:551-563

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

**Hu X., Jiang M., Zhang A. und Lu J.** (2005): Abscisic acid-induced apoplastic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation up-regulates the activities of chloroplastic and cytosolic antioxidant enzymes in maize leaves. *Planta*

**Ingram J. und Bartels D.** (1996): The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47:377-403

**Innes R. W., Bent A. F., Kunkel B. N., Bisgrove S. R. und Staskawicz B. J.** (1993): Molecular analysis of avirulence gene *avrRpt2* and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J. Bacteriol.*, 175:4859-4869

**Inoue H., Nojima H. und Okayama H.** (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96:23

**Ish-Horowicz D. und Burke J. F.** (1981): Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res.*, 9:2989-2998

**Jenns A. E. und Kuc J.** (1979): Graft transmission of systemic acquired resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotricho lagenarium* and tobacco necrosis virus. *Phytopathology* 7:753-756

**Jirage D., Tootle T. L., Reuber T. L., Frost L. N. und Feys B. J.** (1999): *Arabidopsis thaliana* *PAD4* encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signalling. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:13583-13588

**Katagiri F., Lam E. und Chua N.-H.** (1989): Two tobacco DNA-binding proteins with homology to the nuclear factor CREB. *Nature* 340:727-730

**Kim M. G., da Cunha L., McFall A. J., Belkhadir Y., DebRoy S., Dangl J. L. und Machey D.** (2005): Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*, 121:749-759

**King E. O., Ward M. K. und Raney D. E.** (1954): Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44:301-307

**Kirik V., Bouyer D., Schöbinger U., Bechtold N., Herzog M., Bonneville J.-M. und Hülkamp M.** (2001): *CPR5* is involved in cell proliferation and cell death control and encodes a novel transmembrane protein. *Current Biology*, 11:1891-1895

- Klessig D. F. und Malamy J.** (1994): The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol. Biol.*, 26:1439-1458
- Klessig D. F., Durner J., Noad R., Navarre D. A. und Wendehenne D.** (2000): Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:8849-8855
- Knoche H. und Duvick, J. P.** (1987): The role of fungal toxins in plant disease. *Brit Mycol. Soc. Symp. Ser.* 13:158-192
- Kombrink E. und Somssich I. E.** (1997): Pathogenesis-related proteins and plant defense. *The Mycota, Springer-Verlag, Berlin*, 107-128
- Kriete G., Niehaus K., Perlick A. M., Puhler A. und Broer I.** (1996): Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. *Plant Journal*, 9:809-818
- Lam E., Kato N. und Lawton M.** (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411:848-853
- Lamb C. J. und Dixon R. A.** (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.*, 48:251-275
- Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J. und Ward E.** (1998): Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 16:223-233
- Leon J., Lawton M. A. und Raskin I.** (1995): Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 108:1673-1678
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R. und Lamb C.** (1994): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583-593
- Li X., Zhang Y., Clarke J. D., Li Y. Und Dong X.** (1999): Identification and cloning of a negative regulator of systemic acquired resistance, SNI1, through a screen for suppressors of *npr1-1*. *Cell*, 98:329-339
- Liu X. und Lam E.** (1994): Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.*, 269:668-675
- Lolle S. J., Hsu W. und Pruitt R. E.** (1998): Genetic analysis of organ fusion in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 149:607-619
- Malamy J., Carr J. P., Klessig D. F. und Raskin I.** (1990): Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science*, 250:1002-1004

- Maldonado A. M., Doerner P., Dixon R. A., Lamb C. J. und Cameron R. K.** (2002): A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 419:399-403
- Medberry S. L., Lockhart B. E. L. und Olszewski N. E.** (1992): The commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell* 4:185-192
- Mittler R., Herr E. H., Orvar B. L., van Camp W. und Willekens H.** (1999): Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infections. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96:14165-14170
- Mou Z., Fan W. und Dong X.** (2003): Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, 113:935-944
- Mullis K. B. und Faloona F. A.** (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155:335-350
- Narusaka Y., Nakashima K., Shinwari Z. K., Sakuma Y., Furihata T., Abe H., Narusaka M., Shinozaki K. und Yamaguchi-Shinozaki K.** (2003): Interaction between two *cis*-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stress. *Plant Journal*, 34: 137-148
- Nawarath C. und Metraux J.-P.** (1999): Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR2* and *PR5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*, 11:1393-1404
- Neuenschwander U., Vernooij B., Friedrich L., Uknes S., Kessman H. und Ryals J.** (1995): Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant Journal*, 8:227-233
- Noctor G., Gomez L., Vanacker H. und Foyer C. H.** (2002): Interaction between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J. of Exp. Botany*, 53:1283-1304
- Noutoshi Y., Ito T., Seki M., Nakashita H., Yoshida S., Marco Y., Shirasu K. und Shinozaki K.** (2005): A single amino acid insertion in the WRKY domain of the *Arabidopsis* TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant Journal*, 43:873-888
- Odell G. T., Nagy F. und Chua N.-H.** (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313:810-812
- Parker J. E.** (2003): Plant recognition of microbial patterns. *Trends in Plant Science*, 8:245-247

**Pei Z.-M., Murata Y., Benning G., Thomine S. und Klusener B.** (2000): Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic signaling in guard cells. *Nature*, 406:731-734

**Perlmann D. C. und Halvorson H. O.** (1987): Improved resolution of DNA fragments in polysaccharid-supplemented agarose gels. *Analytical Biochem.*, 163:247-256

**Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H. B., Lacy M., Austin M. J., Parker J. E., Sharma S. B., Klessig D. F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A. B. und Mundy J.** (2000): *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell*, 103:1111-1120

**Pnueli L., Liang H., Rozenberg M. und Mittler R.** (2003): Growth suppression, altered stomatal responses, and augmented induction of heat shock proteins in cytosolic ascorbate peroxidase (*Apx1*)-deficient *Arabidopsis* plants. *Plant Journal*, 34:187-203

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

**Rizhsky L., Davletovas S., Liang H. und Mittler R.** (2004): The zinc finger protein Zat12 is required for Cytosolic Ascorbate Peroxidase 1 expression during oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. of Biol. Chem.*, 12:11736-11743

**Sagi M. und Fluhr R.** (2001): Superoxide production by plant homologues of the gp91phox NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Phys.*, 126:1281-1290

**Sambrook J., Fritsch E. F. und Maniatis T.** (1989): Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

**Sanger F., Nicklen S. und Coulson A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74:5463-5467

**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

**Schroeder J. I., Allen G. J., Hugouvieux V., Kwak J. M. und Waner D.** (2001): Guard cell signal transduction. *Annu. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biology*, 52:627-658

**Schweigert N., Zehnder A. J. B. und Eggen R. I. L.** (2001): Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environmental Microbiol.*, 3:81-91

**Shirano Y., Kachroo P., Shah J. und Klessig D. F.** (2002): A gain-of-function mutation in an *Arabidopsis* toll interleukin 1 receptor-nucleotide binding site-leucine-rich repeat type *R* gene triggers defense responses and results in enhanced disease resistance. *Plant Cell*, 14:3149-3162

**Shulaev V., Leon J. und Raskin I.** (1995): Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell*, 7:1691-1701

**Smith I. K., Kendall A. C., Keys A. J., Turner J. C. und Lea P. J.** (1984): Increased levels of glutathione in a catalase-deficient mutant of barley. *Plant Science Letters*, 37:29-33

**Summermatter K., Sticher L. und Metraux J.-P.** (1995): Systemic responses in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology*, 108:1379-1385

**Suzuki H., Xia Y., Cameron R., Shadle G., Blount J., Lamb C. und Dixon R. A.** (2004): Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J. of Exp. Botany*, 55:169-179

**Uknes S., Dincher S., Friedrich L., Negretto D., Williams S., Thompson-Taylor H., Potter S., Ward E. und Ryals J.** (1993): Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell*, 5:159-169

**Vanacker H., Carver T. L. W. und Foyer C. H.** (2000): Early H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Phys.*, 123:1289-1300

**Van der Biezen E. A. und Jones J. D.** (1998): Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends. Biochem. Sci.*, 23:454-456

**Van Loon L. C. und Van Strien E. A.** (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55:85-97

**Van Wees S. C. und Glazebrook J.** (2003): Loss of non-host resistance of *Arabidopsis NahG* to *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant Journal*, 33:733-742

**Vernooij B., Friedrich ., Morse A., Reist R. und Kolditz-Jawhar R.** (1994): Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, 6:959-965

**Ward E. R., Uknes S. J., Williams S. C., Dincher S. S., Wiederhold D. L., Alexander D. C., Ahl-Goy P., Metraux J.-P. und Ryals J. A.** (1991): Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 3:1085-1094

- Whalen M. C., Innes R. W., Bent A. F. und Staskawicz B.** (1991): Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, 3:49-59
- Wildermuth M. C., Dewdney J., Wu G. und Ausubel F. M.** (2001): Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414:562-565
- Yamaguchi-Shinozaki K. und Shinozaki K.** (1992): A novel *Arabidopsis* DNA binding protein contains the conserved motif of HMG-box proteins. *Nucleic Acids Res.*, 20:6737
- Yang K. Y., Kim E. Y., Kim C. S., Guh J. O., Kim K. C. und Cho B. H.** (1998): Characterization of a glutathione S-transferase gene *ATGST1* in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*, 17:700-704
- Zhang C. und Shapiro A. D.** (2002): Two pathways act in an additive rather than obligatorily synergistic fashion to induce systemic acquired resistance and *PR* gene expression. *BMC Plant Biology* 2(9)
- Zhang Y., Tessaro M. J., Lassner M. und Li X.** (2003): Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors *TGA2*, *TGA5*, and *TGA6* reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell*, 15:2647-2653
- Zhou N., Tootle T. L., Tsui F., Klessig D. F. und Glazebrook J.** (1998): *PAD4* functions upstream from salicylic-acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10:1021-1030

## 8 Abkürzungen

ABA	Abscisinsäure
<i>aca</i>	<i>as-1 constitutive active</i>
<i>acd2</i>	<i>accelerated cell death 2</i>
amp	Ampicillin
<i>ana</i>	<i>as-1 nicht aktiv</i>
APS	Ammoniumpersulfat
APX	Ascorbat Peroxidase
<i>as-1</i>	<i>activating sequence-1</i>
<i>avr</i>	Avirulenzgen
bidest.	bidestilliert
bp	Basenpaare
BTB/POZ	broad-complex, <i>tramtrack</i> , <i>bric-a-brac</i> / poxvirus, zinc finger
BTH	Benzothiadiazol
bZIP	basischer Leucin-Zipper
bzw.	beziehungsweise
C	Formelzeichen für Kapazität
C	Cytosin
ca.	circa
CAMV	Blumenkohlmosaikvirus „Cauliflower Mosaic Virus“
cDNA	komplementäre DNA
cfu	kolonienbildende Einheit
CNGC4	Cyclic nucleotide gated channel 4
cpr	<i>constitutive expresser of PR genes</i>
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
Da	Dalton
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
Deac	Deacetylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>dir1</i>	<i>defective in induced resistance</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid

---

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>eds1</i>	<i>enhanced disease susceptibility 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERD1	Early responsive to dehydration 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
β-Gal	β-Galaktosidase
GSH	Reduzierte Form des Glutathion
GSSG	Glutathion Disulfat (Oxidierter Form des Glutathion)
GST	Glutathion S-Transferase
5GuDe	Transgene Pflanzen mit 5 x as-1 <i>Deac</i> und 5 x as-1 <i>Gus</i>
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
H	Histidin
HEC	Hydroxyethyl-Cellulose
HR	hypersensitive response (= hypersensitive Reaktion)
HSP	Heringsperma-DNA
ICS1	Isochlorismate Synthase 1
INA	2,6-Dichloroisoinicotinsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JA	Jasmonsäure
kb	kiloBasen
Kit	Produkt mit allen Komponenten, die man für einen Versuch braucht.
<i>km<sup>r</sup></i>	Kanamycin-Resistenzgen
λ	Bakteriophage Lambda
<i>lacZ</i>	β-Galactosidase-Gen
LB	Luria-Bertani Broth
LEA	Late embryo abundant
Ler	Landsberg erecta
Leu	Leucin

LiAc	Lithiumacetat
<i>lsd1</i>	<i>lesion simulating disease resistance response 1</i>
LUC	Luciferase
MCS	multiple Klonierungsstelle
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
<i>mpk4</i>	<i>MAP Kinase 4</i>
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Murashige und Skoog Medium
MU	Methylumbelliferon
MUG	Methylumbelliferyl- $\beta$ D-Glucuronid
NAcPT	N-Acetyl-Phosphinothricin
<i>NahG</i>	Gen, dass für die Salizylat-Hydroxylase codiert
NLS	Kernlokalisationsignal
NPR1	<i>nonexpressor of PR genes 1</i>
OD	optische Dichte
<i>pad4</i>	<i>phytoalexin deficient 4</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Poly(A)-	Polyadenyl-
PR	pathogenesis-related
Primer	Oligonukleotid, das als Startfragment für eine DNA-Synthese dient
R	Formelzeichen für Widerstand
RD	Reponsive to dehydration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reactive oxygen species (= reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAI	salicylic acid-insensitiv (= Salicylsäure-insensitiv)
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde(n)
<i>sn1l</i>	<i>Suppressor of npr1-1, inducible</i>

---

ss	einzelsträngig (single stranded)
T	Thymin
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N' - Tetraethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trp	Tryptophan
U	definierte Enzym-Einheit (unit)
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-Galactopyranosid

## **Danksagung:**

Frau Prof. Dr. Christiane Gatz gilt mein Dank für die Bereitstellung des Themas, die intensive Betreuung, die Bereicherung meiner Arbeit mit neuen Ideen und Vorschlägen und besonders für die Möglichkeit der Kooperation mit anderen Universitäten.

Herrn PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für das tolle Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft bei großen und kleinen Problemen, insbesondere bei Tanja, Katrin, Marco, Hella, Corinna und Guido. Corinna und Hella haben sich darüber hinaus als Lektoren meiner Arbeit verdient gemacht. Guido sei speziell für seinen Einsatz bei der Behebung von Computerproblemen gedankt.

Ein großes Dankeschön meinen Eltern, die mich während meines Studiums und meiner Promotion immer unterstützt haben. Außerdem danke ich Karsten für seine Unterstützung in schwierigen Phasen und für nächtlichen Geleitschutz in den Kellergewölben der Botanischen Anstalten.

Die Messungen der endogenen Salizylsäuremengen wurden von C. Göbel (Universität Göttingen) und im Labor von Prof. Dr. G Bahnweg (GSF, München) durchgeführt. Die Bestimmung der Glutathionmengen erfolgte im Labor von Dr. M. Wirtz (Universität Heidelberg). Die Transpirationsrate von Pflanzen wurde unter Anleitung von Dr. M. Burghart im Labor von Prof. Dr. M. Riederer (Universität Würzburg) ermittelt. Die Methode der Bestimmung des Bakterienwachstums in Pflanzen nach Inokulation wurde im Labor von Dr. N. Schlaich (Universität Aachen) erlernt.

## Lebenslauf:

### **Persönliche Daten :**

Name: Miriam Christiane Heupel  
Geburtsdatum: 23.12.1975  
Geburtsort: Kassel  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### **Schulbildung:**

1982-1986 Grundschole Obervellmar  
1986-1995 Friedrichsgymnasium Kassel  
Abschluss: Abitur

### **Studium:**

1996-2002 Diplomstudiengang Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen.  
Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Suche neuer Interaktionspartner der TGA-Faktoren“  
2002-2006 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für „Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze“ des Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzenwissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen