

**Analyse zweier differentiell regulierter Terpensynthesen
in *Arabidopsis thaliana***

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

vorgelegt von
Karin Gärtner
aus Clausthal-Zellerfeld

Göttingen 2008

D7

Referent:

Prof. Dr. Christiane Gatz

Korreferent:

PD. Dr. Wolfgang Dröge-Laser

Tag der mündlichen Prüfung:

30.04.08

We are each of us angels with only one wing, and we can only fly by embracing one another. ~Luciano de Crescenzo

1.1 Inhaltsverzeichnis

1.1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	II
2	Abkürzungsverzeichnis	1
3	Einleitung	7
3.1	<i>Abwehr gegen Fraßfeinde in Pflanzen</i>	7
3.2	<i>Terpene in Arabidopsis thaliana</i>	8
3.3	<i>Terpene als Kommunikationsmöglichkeit zwischen Pflanze und Pflanze und Pflanze und Insekt</i>	9
3.4	<i>Pflanzenhormone regulieren wichtige induzierbare Prozesse in der Pflanzenabwehr</i>	10
3.5	<i>Funktion des COII-Proteins</i>	14
3.6	<i>Die Ethylen-Signalkaskade</i>	18
3.7	<i>Zielsetzung</i>	20
4	Material	22
4.1	<i>Geräte</i>	22
4.2	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	23
4.3	<i>Chemikalien</i>	23
4.4	<i>Kits</i>	24
4.5	<i>Enzyme</i>	24
4.6	<i>Nukleinsäuren</i>	24
4.6.1	<i>Größenstandard</i>	24
4.6.2	<i>Primer</i>	25
4.6.3	<i>Plasmide</i>	25
4.7	<i>Organismen</i>	26
4.7.1	<i>Bakterien</i>	26
4.7.2	<i>A. thaliana Pflanzen/Genotypen</i>	27
4.7.3	<i>Pilze</i>	27
4.7.4	<i>Insekten</i>	28
4.8	<i>Nährmedien und Zusätze</i>	28
4.8.1	<i>Medien für die Anzucht von Bakterien</i>	28
4.8.2	<i>Medien für die Anzucht von Pilzen</i>	28
4.8.3	<i>Medien für die Anzucht von Pflanzen</i>	28
4.8.4	<i>Zusätze für Medien</i>	29

4.9	<i>Lösungen und Puffer</i>	29
4.9.1	Standardlösungen und Puffer.....	29
4.9.2	RNA-Extraktion.....	29
4.9.3	Nothern-Blot Analyse/denaturierende RNA Gelelektrophorese	29
4.9.4	Alkalische Lyse von <i>E. coli</i>	30
4.9.5	Transformation von <i>E. coli</i>	30
4.10	<i>Software</i>	30
5	Methoden	31
5.1	<i>Methoden zur Anzucht und Kultivierung von Organismen</i>	31
5.1.1	Bakterien.....	31
5.1.2	Pilze	31
5.1.3	Pflanzen	31
5.1.3.1	<i>A. thaliana</i> auf Erde	31
5.1.3.2	Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> -Samen	31
5.1.3.3	Sterile Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Platten	31
5.1.3.4	Sterile Anzucht von <i>A. thaliana</i> auf Erde.....	32
5.1.3.5	Samengewinnung aus <i>A. thaliana</i>	32
5.1.3.6	Hydroponische Anzucht von <i>A. thaliana</i>	32
5.2	<i>Induktion der Genexpression in A. thaliana</i>	32
5.2.1	Induktion mit Chemikalien	32
5.2.2	Induktion mit Bakterien.....	33
5.2.3	Induktion mit Pilzen.....	33
5.2.4	Induktion mit Raupen	33
5.2.5	Selektion von homozygoten <i>coiI</i> -Mutanten.....	33
5.2.6	Selektion von homozygoten <i>JAZ</i>	34
5.3	<i>Klonierung</i>	34
5.3.1	Restriktionsspaltung.....	34
5.3.2	Ligation.....	34
5.3.3	Klonierung von PCR-Produkten.....	35
5.3.4	Blau-Weiß Selektion.....	35
5.3.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	35
5.3.6	Sequenzierung.....	36
5.4	<i>Methoden zur genetischen Manipulation</i>	36
5.4.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	36
5.4.2	Transformation von <i>E. coli</i>	37
5.5	<i>Präparation und Analyse von Nukleinsäuren</i>	37
5.5.1	Alkalische Lyse.....	37
5.5.2	Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits.....	37
5.5.3	DNA-Elution aus Agarosegelen	38
5.5.4	RNA-Extraktion aus Pflanzen	38
5.5.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	38
5.5.6	Auftrennung von DNA in Agarosegelen	39
5.5.7	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen.....	39

5.6	<i>Methoden zur Expressionsanalyse</i>	39
5.6.1	Northern-Blot-Analyse	39
5.6.1.1	Kapillar-Blot	40
5.6.1.2	Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion	40
5.6.1.3	Hybridisierung der Membran.....	40
5.6.1.4	Waschen und Dokumentieren der Membran	40
5.6.1.5	Rehybridisierung der Membran	41
5.6.2	Real-time RT-PCR.....	41
5.6.3	Transkriptomanalyse mit 'ARIZONA-Gesamtgenomarrays'	41
5.6.3.1	Amplifikation der eingesetzten RNA	42
5.6.3.2	Indirekte Markierung der aRNA.....	42
5.6.3.3	Hybridisierung der ARIZONA „whole genome arrays“	43
6	Ergebnisse	44
6.1	<i>Expressionsmuster der Terpensynthasegene TPS4 und AtGLS in Arabidopsis thaliana</i>	44
6.1.1	Fraß durch <i>Plutella xylostella</i> Larven induziert die Expression des <i>AtGLS</i> -Gens, nicht aber des <i>TPS4</i> -Gens.....	45
6.1.2	Eine funktionelle JA- Signalkaskade ist für die Induktion des <i>TPS4</i> -Transkriptes notwendig.....	46
6.1.3	SA-Biosynthese und Signalwege haben nur einen geringen Einfluss auf die Transkriptmengen der beiden Terpensynthesen	47
6.1.4	Exogene Gabe von Jasmonsäure führt nicht zu effizienter Induktion des <i>TPS4</i> - und des <i>AtGLS</i> -Transkripts.....	50
6.1.5	<i>TPS4</i> ist durch den Elicitor Alamethicin induzierbar, benötigt aber zusätzlich einen Verwundungsstimulus.....	51
6.1.6	Pseudomonaden induzieren die Transkriptakkumulation beider Terpensynthesen	53
6.1.7	Jasmonsäurekonjugate induzieren die Expression beider Terpensynthesen..	55
6.1.8	Einfluss von JAR1 auf die Induzierbarkeit der beiden Terpensynthesen.....	59
6.1.9	Verwundung führt zur lokalen Akkumulation von <i>AtGLS</i> - und <i>TPS4</i> -Transkript.....	61
6.1.10	Bei <i>TPS4</i> handelt es sich um ein sekundäres, Coronalon induzierbares Gen	62
6.1.11	Einfluss von MYC2 auf die Expression der <i>AtGLS</i>	64
6.1.12	Generieren Raupen ein Signal unabhängig von Verwundung?	65
6.1.13	Beteiligung der JAZ-Repressoren an der Regulation der <i>AtGLS</i>	67
6.2	<i>Funktionelle Charakterisierung von TMTT in Arabidopsis thaliana</i>	68
6.2.1	Die Genexpression in <i>35S::AtGLS</i> -Pflanzen ist fast identisch mit der Genexpression von Pflanzen, die in Gegenwart von <i>35S::AtGLS</i> -Pflanzen gewachsen sind	69
6.2.2	In einer Reproduktion des Experimentes lässt sich die Expression der induzierten Gene durch Real-time-RT-PCR nachweisen	71
6.2.3	Auch in einem unsterilen System lassen sich die Ergebnisse per Real-time-RT-PCR reproduzieren	73
6.2.4	Exogenes TMTT wirkt induzierend auf die untersuchten Gene.....	75
6.2.5	Einfluss von <i>AtGLS</i> Überexpression auf <i>Botrytis cinerea</i> Infektion	75

6.2.6	Einfluss von <i>AtGLS</i> -Überexpression auf <i>Plutella xylostella</i> induzierte Abwehrgene	79
7	Diskussion	82
7.1	<i>Differentielle Regulation zweier Terpensynthesen</i>	82
7.2	<i>Einfluss der unterschiedlichen Modulationsmechanismen auf die Expression der Terpensynthesen durch Alamethicin.....</i>	84
7.3	<i>Plutella xylostella induziert die Expression der Terpensynthesen im Gegensatz zu Pseudomonas syringae differentiell.....</i>	85
7.4	<i>Welche Reize sind für die Induktion der Terpensynthesen ausreichend?</i>	87
7.5	<i>Modell zu der Induktion der AtGLS.....</i>	88
7.6	<i>TPS4-Expression im Vergleich zur AtGLS-Expression</i>	92
7.7	<i>TMTT spielt eine Rolle in Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation</i>	93
7.8	<i>Durch TMTT induzierte Gene sind an der Abwehr gegen Pilze beteiligt.....</i>	94
7.9	<i>Durch TMTT induzierte Gene sind an der Abwehr gegen Raupen beteiligt</i>	96
8	Zusammenfassung	97
9	Literaturverzeichnis	99

2 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
λ	Bakteriophage Lambda
μ	micro (x 10 ⁻⁶)
Ω	Ohm
°C	Grad Celsius
32P	Phosphorisotop der relativen Masse 32
35S	Blumenkohlmosaikvirus Promotor
aaO	Absidic aldehyde oxidase
ABA	Abszisionsäure
aba2	Abscisic acid 2
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
acx	Acyl-CoA-oxidase
Ala	Alamethicin
aos	Allene oxide synthase
ARF	auxin response factor
Ask1	<i>Arabidopsis</i> shaggy related protein kinase
AtCul1	<i>Arabidopsis thaliana</i> Cullin 1
AtCOR	<i>A. thaliana</i> coronatine-induced
AtGLS	<i>Arabidopsis thaliana</i> Geranylinalool Synthase
AP2	Apetala 2
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AUX/IAA	Auxin/Indoleacetic acid
AXR1	Auxin resistant 1
Bp	Basenpaar
BrAct	Botrytis Aktin
bzw.	beziehungsweise
<i>C. breweri</i>	<i>Clarkia breweri</i>
<i>C. rubecula</i>	<i>Cotesia rubecula</i>
ca.	cirka

CaMV	CauliflowerMosaicVirus
cDNA	Kopie-DNA von RNA-Sequenzen
CHX	Cycloheximid
coi1	coronatine insensitive 1
Col	Columbia
COP9	constitutive photomorphogenic 1
Cor	Coronatin
Con	Coronalon
cpm	Zählimpulse pro Minute
CTR	Constitutive triple response
dde2	delayed dehiscence 2
DMNT	4,8-dimethyl-1,3,7-nonatrien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dYT	double yeast extract and tryptone
EBF	EIN3 BINDING F-BOX1
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EIL	EIN3-like
ein	Ethylene insensitive
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERF1	Ethylene-Response-Factor 1
et al	et alii; und andere
ETR	<i>ETHYLENE RESPONSE</i>
ERS	<i>ETHYLENE RESISTANT</i>
ET	Ethylen
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f	femto (x 10 ⁻¹⁵)
F	Farad
g	Gramm
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GL	(E,E)-Geranylinalool
GLP	Germin like Protein
GUS	β-Glucoronidase

h	Stunde(n)
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-Ethansulfonsäure]
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
JA	Jasmonsäure
JA-ILE	Jasmonat-Isoleucin Konjugat
JA-LEU	JA-Leucin Konjugat
JAZ	jasmonate-ZIM-domain
Jas1	Jasmonate associated 1
jar1	jasmonate resistant 1
JERE	JA- and elicitor-responsive element
jin1	Jasmonate insensitive 1
JR	JA responsive
k	kilo (x 103)
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Km	Kanamycin
KmR	Kanamycin Resistenz
l	Liter
LBM	Luria/Bertani-Medium
LOX2	Lipoxygenase 2
Lsg.	Lösung
m	milli (x 10 ⁻³)
M	Molar
MAP	Mitogen-activated protein
MAPKKK	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MKK9	MAP kinase kinase 9 (MAP s.o.)
MPK3/6	MAP kinase 3/6 (MAP s.o.)
m/z	Masse/Ladungszahl
mcs	multiple cloning site, Polylinker
MeJA	Methyljasmonat
MEN	MOPS-EDTA-Natriumacetat
MeSA	Methsalicylat
min	Minute(n)
mm	Millimeter

MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Skoog Medium
MW	Molekulargewicht
MYC	Myelocytomatosis
n	nano (x 10 ⁻⁹)
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Center
nosT	Nopalins-Synthase Terminator
npr1, NPR1	nonexpresser of PR gene 1 (= Nichtexprimierer von PR-1)
No-0	Nossen -0
ocs	Octopin-Synthase
OD	optische Dichte
OD600	optische Dichte bei 600 nm
OPDA	Oxophytodiensäure
ORA	Octadecanoid responsive Arabidopsis AP2/ERF factors
OPR3	OPDA Reduktase 3
ORF	open reading frame (= offenes Leseraster)
OSM	Osmotin
p	pico (x 10 ⁻¹²)
<i>P. lunatus</i>	<i>Phaseolus lunatus</i>
<i>P. rapae</i>	<i>Pieris rapae</i>
<i>P. xylostella</i>	<i>Plutella xylostella</i>
PCR	polymerase chain reaction (= Polymerasekettenreaktion)
PDF1.2	plant defensin 1.2
PEG	Polyethylenglycol
PEARLI	Erste Beschreibung von PEARLI4 in Plant Gene Register PGR95-098
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pnos	Nopalins-Synthase Promotor
PR1	Pathogenesis related 1
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase A	Ribonuklease A
rpm	Umdrehungen pro Minute

RR-Mix	Ready Reaction Mix von Perkin-Elmer
RT	Reverse Transkription
rRNA	ribosomale RNA
s	Sekunde(n)
S	Svedberg, Sedimentationskoeffizient
<i>S. exigua</i>	<i>Spodoptera exigua</i>
s. o.	siehe oben
SA	Salizylsäure
SCF	Skp1 Cullin F-Box
SCF ^{COI1}	Skp1 Cullin mit COI1 als F-Box Protein
SDS	Natriumdodecylsulfat
SGT1b	Suppressor of G2 Allele of Skp1
Sid2	SA induction deficient 2
Skp1	Shaggy kinase in <i>Schizosaccharomyces pombe</i> 1
SSC	Standard saline citrate buffer
STE	Salt Tris EDTA
TAIR	The arabidopsis information resource
TAE	Tris-acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TEMED	(N,N,N',N')-Tetramethylethylendiamin
TF	Transcription factor
THI	Thionin
TIR1	Transport Inhibitor Response 1
TMTT	(E,E)-4,8,12-trimethyltrideca-1,3,7,11-tetraen
TPS	Terpensynthase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSR	Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer
U	Unit (=Einheit) der Enzymaktivität
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslated region (= nichttranslatierter Bereich der mRNA)
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
Vol.	Volumen

VSP	Vegetative storage Protein
Ws	Wassilewskija
WRKY	Gruppe von Transkriptionsfaktoren mit der konservierten Aminosäuresequenz WRKYGQK
Wt	Wildtyp
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid
z. B.	zum Beispiel
ZIM	Zinc-finger inflorescens meristem

3 Einleitung

3.1 Abwehr gegen Fraßfeinde in Pflanzen

Pflanzen sind fast überall auf der Erde vertreten und als Primärproduzenten sind sie die Basis aller Nahrungsketten. Von den geschätzten sechs Millionen Insektenarten sind die Hälfte Herbivore und bilden damit die größte Gruppe aller Fraßfeinde der Pflanzen (Schoonhoven, 2005). Als Konsequenz daraus haben Pflanzen effiziente Abwehrmechanismen entwickelt, wobei direkte Abwehrmechanismen von indirekten unterschieden werden. Direkte Abwehr besteht zum Beispiel aus giftigen Sekundärmetaboliten, beispielsweise Glucosinolaten (bei Brassicaceae), die in der Vakuole gespeichert werden können. Aber auch Strukturen wie Stacheln, die einen mechanischen Schutz bilden (Potter and Kimmerer, 1988), werden als Teil der direkten Abwehr betrachtet. Viele dieser Strategien beruhen auf einer konstitutiven Expression von Genen und bedürfen nicht erst eines Schädlingsbefalls der Pflanze, um induziert zu werden. Zur direkten Abwehr gehören aber auch viele induzierbare Prozesse, wie zum Beispiel die Synthese von Proteinaseinhibitoren, die im Darm des Herbivoren aktiv bleiben und die Aufnahme von Nährstoffen verhindern oder erschweren. Dies führt zu einem geringeren Wachstum der Fraßfeinde und damit zu einer geringeren Fraßschädigung, was der Pflanze einen zeitlichen Vorteil verschafft, um ihr Reproduktionsprogramm abzuschließen (Ryan, 1990; Chen et al., 2005; Chen et al., 2007). Weitere induzierbare Strategien der direkten Abwehr sind die Akkumulation von giftigen Sekundärmetaboliten, Lectinen und Proteasen, die die Insekten schädigen oder ihre Entwicklung verlangsamen (Ryan, 1990; Peumans and Vandamme, 1995; Karban, 1997; Walling, 2000).

Die indirekte Abwehr der Pflanzen wird auch als tritrophe Interaktion bezeichnet (van Loon et al., 2000). Dabei bildet die von einem Herbivoren befallene Pflanze flüchtige Substanzen, die von Raubinsekten wahrgenommen werden können. Diese Karnivore oder Parasitoide werden zur Fraßstelle gelockt und töten die fressenden Insekten oder legen ihre Eier in sie. Durch die sich entwickelnden Larven werden die Herbivore in ihrer Entwicklung stark geschädigt und fressen weniger, wodurch die Pflanze einen zeitlichen Vorteil erhält. Für einige Terpene ist bekannt, dass sie durch Fraß induziert werden und Raubinsekten anlocken (Pare and Tumlinson, 1999; De Boer et al., 2004).

3.2 Terpene in *Arabidopsis thaliana*

Unter Laborbedingungen konnte gezeigt werden, dass auch die Modellpflanze *A. thaliana* von Mechanismen der indirekten Abwehr profitieren kann (van Loon et al., 2000). Ferner konnte van Poecke (van Poecke and Dicke, 2002) zeigen, dass Mutanten in Signaltransduktionswegen von *A. thaliana* und Wildtyppflanzen unterschiedlich gut in der Lage waren, Raubinsekten anzulocken. Da dieses Phänomen mit der unterschiedlichen Induzierbarkeit von flüchtigen Terpenen korrelierte, stellen diese gute Kandidaten für die in der indirekten Abwehr wirksamen flüchtigen Signale dar. In dem Genom von *Arabidopsis thaliana* gibt es 40 Terpensynthasegene, von denen acht vermutlich Pseudogene sind, da sie eine Verschiebung des Leserasters oder ein frühes Stopcodon enthalten (Aubourg et al., 2002). Dagegen ist das emittierte Terpenspektrum in *Arabidopsis* relativ klein; von Blättern werden vor allem das Sesquiterpen alpha-Farnesen, die Monoterpene Myrcen und Ocimen sowie das Homoterpen TMTT emittiert (Van Poecke et al., 2001; Faldt et al., 2003; Herde, 2006);. Das Gen *At2g24210* wurde von (Bohlmann et al., 2000) als verantwortlich für die Synthese von Myrcen und Ocimen charakterisiert. *At4g16740/TPS4* wurde als Ocimen-Synthase beschrieben (Faldt et al., 2003). Transkript des *TPS4*-Gens und Emission von Ocimen korrelieren nach Gabe von JA sowie nach Verwundung in dem No-0 Ökotyp von *Arabidopsis*. Befall der Pflanzen mit *Pieris rapae* Larven führte zu keiner Akkumulation von *TPS4*-Trankript, obwohl geringe Mengen an Ocimen im Luftraum über den Pflanzen gemessen wurden. Im Gegensatz dazu konnte in Col-0 Pflanzen nach Befall mit *Pieris rapae* zwar das Transkript der *TPS4*, aber kein Ocimen über den Pflanzen nachgewiesen werden (Van Poecke et al., 2001). In Col-0 korreliert dagegen die Expression des *TPS4*-Gens mit der Emission von alpha-Farnesen nach Gabe des Elicitors Alamethicin in abgeschnittenen Blättern, während nach Befall mit Larven von *Plutella xylostella* weder alpha-Farnesen noch *TPS4*-Transkript nachgewiesen werden kann. Die Expression der Terpensynthasegene sowie die Emission der Terpene variieren also in *Arabidopsis thaliana* je nach verwendetem Ökotypen und appliziertem Stress. Diese Varianz wurde innerhalb von Ökotypen in *Arabidopsis thaliana* auch schon für andere Sekundärmetabolite beschrieben (Kliebenstein et al., 2001). Ocimen ist eines der häufigsten Monoterpene, welches von Pflanzen nach Verletzung oder Befall mit Herbivoren emittiert wird (Pare and Tumlinson, 1999) Ocimen-Emission in *Arabidopsis* ist

ein weiterer Hinweis darauf, dass die tritrophe Interaktion auch in dieser nur wenige Terpene emittierenden Modellpflanze eine Rolle spielt.

Auch für die Bildung von TMTT konnte das verantwortliche Enzym, die AtGLS, beschrieben werden (Herde et al., 2008). Die AtGLS katalysiert die Umsetzung von Geranylgeranyl-Diphosphat zu Geranylinalool, welches anschließend zu TMTT abgebaut wird. Ob die Umsetzung zu TMTT einer Regulation unterliegt oder ob sie spontan abläuft, konnte bisher noch nicht geklärt werden. TMTT wird von vielen Pflanzen emittiert, zum Beispiel von Mais, Lima-Bohne und Tomate (Hopke et al., 1994; Ament et al., 2004; Williams et al., 2005), was eine konservierte Funktion dieses Terpens in der Abwehr gegen Herbivore vermuten lässt.

3.3 Terpene als Kommunikationsmöglichkeit zwischen Pflanze und Pflanze und Pflanze und Insekt

In vielen Pflanzen fungieren Terpene als Botenstoffe, die die Kommunikation zwischen verschiedenen Pflanzen, zwischen Pflanzen und Insekten, aber auch innerhalb verschiedener Blätter einer Pflanze vermitteln. Terpene können bestäubende Insekten, Früchte fressende Tiere (und damit Träger von Samen) und Feinde herbivorer Insekten anlocken (Takabayashi and Dicke, 1996; Pare and Tumlinson, 1999; Dudareva and Pichersky, 2000; Pichersky and Gershenzon, 2002). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Limabohnen das Homoterpen TMTT verstärkt bilden, wenn sie von der Milbe *Tetranychus urticae* befallen werden, woraufhin der Fraßfeind von *T. urticae*, die Raubmilbe *Phytoseiulus persimilis*, bevorzugt diese Pflanzen aufsucht. Diese Anlockung konnte auch durch exogene Gabe von TMTT erzielt werden. Andere Fraßschädlinge dagegen induzieren die Synthese von vergleichsweise geringeren Mengen TMTT, was mit einer verminderten Attraktion der befallenen Pflanzen korrelierte. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass TMTT zumindest in der Lima-Bohne eine Rolle bei der Pflanzen-Insekten-Kommunikation spielt. Weiterhin ist das von der Lima-Bohne emittierte TMTT für die Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation von Bedeutung. Werden Blätter der Lima-Bohne mit TMTT inkubiert, so lässt sich die erhöhte Expression von Resistenzgenen wie *PR2* und *PR3* nachweisen (Arimura et al., 2000). Volatile aus von Käfern befallenen Lima-Bohnen führen zu einer erhöhten Fitness von Nachbarpflanzen. Diese zeigten in Feldversuchen einen schnelleren Wuchs sowie einen geringeren Schaden durch Herbivore als Pflanzen,

die den befallenen Pflanzen nicht ausgesetzt waren. Weiterhin wurde gezeigt, dass Volatile auch in anderen Blättern derselben Pflanze Abwehrreaktionen auslösen können (Heil and Silva Bueno, 2007).

Das Monoterpen (E)- β -Ocimen ist eine Komponente vieler Blütendüfte (Knudsen et al., 1993) und eines der am häufigsten durch Verwundung und Herbivorenbefall induzierten Terpene (Pare and Tumlinson, 1999). Es wird nach Raupenfraß von vielen Pflanzenspezies wie Mais (Turlings et al., 1990), Baumwolle (Loughrin et al., 1994; Rose et al., 1996; Pare and Tumlinson, 1997), Gurke (Takabayashi et al., 1994), Lima-Bohne (Dicke et al., 1999; Horiuchi et al., 2001), Kartoffel (Bolter et al., 1997) und Tabak (De Moraes et al., 1998; Kessler and Baldwin, 2001) emittiert. Es wird angenommen, dass (E)- β -Ocimen in diesen Pflanzenspezies zu den emittierten Düften gehört, die Fraßfeinde der Herbivore anlocken. Weiterhin wurde herausgefunden, dass Ocimen in der Lage ist, die Expression von Abwehrgenen zu stimulieren (Arimura et al., 2000; Arimura et al., 2002), so dass auch eine Bedeutung von Ocimen für die Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation sehr wahrscheinlich ist.

3.4 Pflanzenhormone regulieren wichtige induzierbare Prozesse in der Pflanzenabwehr

Die Expression von Genen, die der Abwehr von biotischem oder abiotischem Stress dienen, ist oft mit einem Fitnessverlust der Pflanzen verbunden, da die Pflanze Ressourcen, die sie ungestresst in die Entwicklung eingebunden hätte, für die Abwehr verbraucht. Dies zeigt sich unter anderem in einer geringeren Wachstumsrate und geringerer Samenproduktion (Gershenzon, 1994; van Hulten et al., 2006). Deshalb werden die Mechanismen der indirekten (hier ist die Induzierbarkeit auch deshalb zwingend, damit das Raubinsekt eine befallene Pflanze von einer nicht befallenen unterscheiden kann) und zum Teil auch der direkten Abwehr erst durch den Befall mit Fraßfeinden induziert. An der induzierten Abwehr gegen Fraßfeinde und Pathogene sind in *Arabidopsis thaliana* vor allem die Phytohormone Jasmonsäure (JA), Ethylen (ET) und Salizylsäure (SA) beteiligt (Reymond and Farmer, 1998; Pieterse and van Loon, 1999; Glazebrook, 2001; Katagiri, 2004).

SA hat vor allem eine wichtige Bedeutung bei der Abwehr gegen biotrophe Pathogene, während JA und Ethylen eine große Rolle in der Resistenz gegen nekrotrophe Pilze und Herbivore spielen (Maleck and Dietrich, 1999; Beckers and Spoel, 2006).

Abhängig von der Art des biotischen Stresses findet eine komplexe, differentielle Änderung des *Arabidopsis* Transkriptomts statt. So führen das bakterielle Pathogen *Pseudomonas syringae*, der nekrotrophe Pilz *Alternaria brassicicola*, der Herbivor *Frankliniella occidentalis* und Raupen von *Pieris rapae* zur JA-Biosynthese und der Induktion JA-abhängiger Gene. Das Muster der unterschiedlichen JA-induzierbaren Gene ist jedoch für jedes Pathogen anders und zeigt, dass viele regulatorische Prozesse zusammenspielen, um die Antwort der Pflanze optimal auf die Herausforderungen der Umwelt abzustimmen (De Vos et al., 2005).

Für das Phytohormon JA konnte bisher in vielen Pflanzenspezies wie Tomate (Howe et al., 1996; Li et al., 2004b; Cooper and Goggin, 2005), Tabak (Kessler et al., 2004), *Medicago* (Gao et al., 2007) und *Arabidopsis* (McConn et al., 1997; Ellis et al., 2002; Zarate et al., 2007) eine besonders wichtige Rolle in der induzierten Abwehr gegen kauernde und Phloem-saugende Insekten nachgewiesen werden. Mutanten in der JA-Biosynthese oder -Signalkaskade zeigen eine höhere Anfälligkeit gegenüber Herbivore, was sich sowohl auf die direkte (Baldwin et al., 1997; Karban et al., 2000) als auch auf die indirekte Abwehr auswirkt (van Poecke and Dicke, 2002). So konnten die Larven von *Pieris rapae* beispielsweise auf den Jasmonat-insensitiven *coi1-1*-Mutanten von *Arabidopsis* mehr an Gewicht zunehmen und induzierten wesentlich weniger an der Abwehr beteiligte Gene, als dies bei Wildtyppflanzen der Fall war (Reymond et al., 2004). Auch an der Emission von Volatilen, die in der indirekten Abwehr eine Rolle spielen, konnte eine wichtige Beteiligung des Oktadekanoidweges nachgewiesen werden (Thaler et al., 2002; van Poecke and Dicke, 2002). Für die Limabohne konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Intermediate des Oktadekanoidweges für die differenzielle Emission von Volatilen verantwortlich sind. Die JA-Vorstufe OPDA führte in dieser Pflanze zur Emission von zwei Homoterpenen, während JA vor allem die Freisetzung von Monoterpenen induzierte (Koch et al., 1999). In der Lima-Bohne wird das Verhältnis von OPDA zu JA über die vorhandenen SA-Mengen reguliert, indem SA unterhalb von OPDA den Oktadekanoidweg blockiert (Engelberth et al., 2001). An diesem Beispiel zeigt sich, dass auch andere Phytohormone eine wichtige Rolle in der Insektenabwehr spielen.

Der Antagonismus in der Pflanzenabwehr zwischen den beiden Phytohormonen SA und JA konnte auch in *A. thaliana* nachgewiesen werden (Kunkel and Brooks, 2002). Dabei blockiert SA sowohl die Biosynthese von JA als auch den JA-Signalweg. So konnte zum

Beispiel gezeigt werden, dass erhöhte SA-Mengen nach Pseudomonadeninfektion über das Gen *NPR1* die Akkumulation von JA verhindern (Spoel et al., 2003; Dong, 2004).

Mit Hilfe der *npr1*-Mutante, in der der SA-Signalweg unterbrochen ist, konnte eine erhöhte Resistenz gegen Raupen von *Spodoptera littoralis* gezeigt werden (Cao et al., 1994). Larven von *Trichoplusia ni* haben ebenfalls auf *npr1*-Mutanten und auf SA-defizienten *sid2-1*-Mutanten weniger an Gewicht zugenommen als auf Wildtyppflanzen. Vermutlich aktivieren einige Herbivore den SA-Signalweg, um dadurch die JA-induzierbaren Abwehrprozesse zu unterdrücken und die Pflanzen damit anfälliger zu machen (Stotz et al., 2002).

Die Bedeutung der Interaktion zwischen SA und JA konnte auch für Pathogene nachgewiesen werden. So haben *coi1-1*-Mutanten, die in dem JA-Signalweg blockiert sind, eine höhere Resistenz gegen das Pathogen *Peronospora parasitica* als Wildtyppflanzen, vermutlich wegen einer Hyperaktivierung der SA-induzierbaren Prozesse in JA-Signalwegmutanten (Zimmerli et al., 2004). *coi1-20*-Mutanten zeigen eine höhere Resistenz gegen *Pseudomonas syringae pv tomato* DC3000, die auch auf die hyperaktivierte SA-Abwehr in dieser Mutante zurückgeführt wird (Kloek et al., 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass auch SA-Abwehr von JA unterdrückt wird. Pseudomonaden produzieren Coronatin, ein strukturell mit JA-Konjugaten verwandtes JA-Analog, und inhibieren dadurch die SA-Signalkaskade. Der Vergleich mit Pseudomonadenstämmen, die kein Coronatin bilden können, zeigt, dass sich das Unterdrücken der SA-Antwort der Pflanze negativ auf ihre Abwehr gegen Pseudomonaden auswirkt (Brooks et al., 2005; Thilmony et al., 2006). Auch auf Genexpressionsebene zeigt sich dieser Antagonismus. Die Expression des Gens *WRKY70* wird durch SA induziert und durch JA reprimiert. Sobald *WRKY70* ektopisch exprimiert wird, werden SA-abhängige *PR*-Gene induziert, während Pflanzen mit reduzierten Mengen dieses Transkriptionsfaktors JA-induzierbare Gene wie *AtCOR1* und *VSP* konstitutiv exprimieren (Li et al., 2004a).

Auch für das Phytohormon ET konnte eine wichtige Rolle in der Stressabwehr nachgewiesen werden, wobei der Einfluss je nach Art des Herbivoren variieren kann. *Spodoptera littoralis* verursacht weniger Schaden an Ethylen-insensitiven *ein2-1*-Mutanten als an Wildtyppflanzen, während Befall mit Larven von *Plutella xylostella* an beiden Genotypen eine gleich hohe Schädigung verursacht (Stotz et al., 2000).

Für die Expression des Pflanzendefensins *PDF1.2* ist eine funktionelle JA- wie auch Ethylen-Signalkaskade notwendig, ein Beispiel dafür, dass Ethylen und JA synergistisch wirken können (Penninckx et al., 1998). Ein weiteres Beispiel für diesen Synergismus ist der ERF1-Transkriptionsfaktor, der durch Ethylen oder JA induziert werden kann, aber ebenfalls beide Signalwege für die Induktion benötigt (Lorenzo et al., 2003). Andere Beispiele belegen, dass es auch einen antagonistischen Effekt zwischen JA und Ethylen geben kann. So werden die Wund- und JA-induzierbaren Gene *VSP* und *JR* durch Ethylen-Signalwege reprimiert (Rojo et al., 1998; Rojo et al., 2003), wobei eine Beteiligung des Transkriptionsfaktors ERF1 an der Regulation vermutet wird.

Mit Hilfe eines genomweiten Ansatzes und Signalkaskademutanten wurde die Beteiligung der Phytohormone JA, SA und ET an der Antwort auf Infektion mit Pseudomonaden untersucht. Dadurch konnte ein komplexes Signalnetzwerk belegt werden, das jedoch nicht alle beobachteten Induktionsmuster erklären kann (Glazebrook et al., 2003). Dies zeigt die Komplexität der Variationsmöglichkeiten in der Pflanzenantwort.

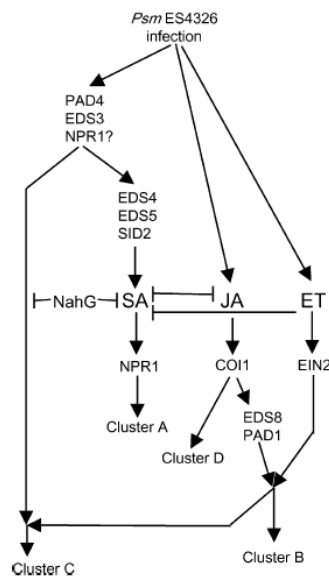


Abbildung 3.4-1 Signalnetzwerk nach Pseudomonadeninfektion, entnommen aus Glazebrook et al., 2003

Als weiteres an der Herbivorenabwehr beteiligtes Hormon wurde in letzter Zeit Abszisionsäure (ABA) beschrieben. So wird die Expression JA/ET-induzierbaren Abwehrgene *PDF1.2* und *PR4* durch Gabe von ABA reduziert, während ABA-Signalwegmutanten erhöhte Transkriptmengen dieser Gene aufweisen (Anderson et al., 2004). JA-induzierbare Gene wie *VSP2* verhielten sich dagegen genau gegensätzlich. In

Arabidopsis thaliana wurde festgestellt, dass ABA nach Insektenfraß zum Beispiel die Induktion des Resistenzgens *VSP2* verstärkt, was ebenfalls auf einen Synergismus zwischen JA und ABA hinweist. Die *PDF1.2*-Transkriptmengen verhielten sich gegensätzlich, was aufzeigt, dass ABA antagonistisch zu JA/ET-induzierbaren Prozessen wirkt. Die Larven von *Spodoptera littoralis* nehmen auf *aba2-1* Mutanten mehr an Gewicht zu als auf Wildtyppflanzen, was zeigt, dass die veränderte Genexpression auch einen Einfluss auf die Abwehr der Pflanze hat (Bodenhausen and Reymond, 2007).

3.5 Funktion des COI1-Proteins

Für die meisten aller untersuchten JA-vermittelten Antworten der Pflanze ist das COI1-Protein von entscheidender Bedeutung (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Das COI1-Protein wurde in einem Versuchsansatz gefunden, bei dem nach Mutanten gesucht wurde, die insensitive gegenüber dem bakteriellen Virulenzfaktor Coronatin sind, welches eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Jasmonsäurekonjugaten besitzt. So sind *coil-1*-Mutanten männlich steril, insensitive gegenüber Jasmonaten und zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen und Herbivoren (Feys et al., 1994; Uppalapati et al., 2005). COI1 ist ein F-Box-Protein, welches einen Teil des SCF (skip-cullin-F-box)-Komplexes darstellt, was ein erster Hinweis darauf war, dass Ubiquitin-vermittelte Protein-Degradation eine Rolle in JA-Signalwegen spielt (Xie et al., 1998). Diese Hypothese wurde dadurch bestätigt, dass in Pflanzen, die in den anderen Komponenten des SCF-Komplexes defizient sind, die JA-Antwort gestört ist (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Feng et al., 2003). Durch die temperaturabhängig konditionalen *coil-16*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass das COI1-Protein auch eine Rolle in der Antwort auf Salzstress spielt (Ellis and Turner, 2002), an der vor allem das Phytohormon Abszissinsäure (ABA) beteiligt ist (Zhu, 2002). Auch die Inhibierung der Keimung durch ABA ist in den *coil-16*-Mutanten beeinträchtigt. COI1 ist jedoch nicht an allen Antworten auf ABA beteiligt, da einige ABA-induzierbare Gene nach Salzstress und ABA-Gabe in den *coil-16*-Mutanten ebenso wie im Wildtyp induzierbar sind. Welche Proteine jedoch mit COI1 interagieren können und dann über das 26S-Proteasom abgebaut werden und wie dieser Abbau Jasmonsäuresignalwege beeinflusst, war lange unbekannt. Erst kürzlich konnte die genaue Bedeutung des COI1-Proteins in der JA-Antwort geklärt werden. Mehrere Gruppen haben herausgefunden, dass die bisher uncharakterisierten *Arabidopsis thaliana* ZIM-

Domänenfaktoren eine wichtige Rolle in der Antwort auf Jasmonsäure spielen. Der Name leitet sich von *Zinc-finger inflorescens meristem* (ZIM) ab. Diese Faktoren wurden JAZ (jasmonate-ZIM-domain)-Faktoren genannt und haben bei vielen Mitgliedern außer der 28 Aminosäuren großen ZIM- noch eine Jas (*jasmonate associated 1*)-Domäne als Gemeinsamkeit. Die Transkripte vieler dieser Faktoren akkumulieren bereits 0,5 Stunden nach einem Jasmonsäurestimulus in JA-defizienten *opr3*-Mutanten (Stintzi and Browse, 2000; Mandaokar et al., 2006). Sowohl für die Faktoren JAZ1 als auch JAZ3 konnte gezeigt werden, dass sie, wenn das C-terminale Jas-Motiv deletiert ist, einen dominant negativen Effekt auf Jasmonat-induzierte Signalwege besitzen. Weiterhin konnte für eine Form des JAZ10-Faktors, die eine Deletion in dem Jas-Motiv besitzt, gezeigt werden, dass sie an der Repression der Expression wund- und JA-induzierbarer Gene beteiligt ist (Yan et al., 2007). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte für mehrere der JAZ-Faktoren gezeigt werden, dass sie in Gegenwart von Jasmonaten abhängig von dem 26S-Proteasom und von dem COI1-Protein abgebaut werden. Die in der Jas-Domäne deletierten JAZ1-Faktoren dagegen zeigen sich gegen den Abbau resistent, was sich mit den Beobachtungen, dass sich Pflanzen, die den deletierten JAZ1-Faktor exprimieren insensitiv gegenüber Jasmonaten verhalten, deckt. Die Interaktion zwischen JAZ1 und dem COI1-Protein kann jedoch nur in der Gegenwart von JA beobachtet werden, wobei so geringe Mengen wie 50 nM Jasmonat ausreichend sind, die Bindung zu stabilisieren (Thines et al., 2007). Die Tatsache, dass Jasmonate für die Stabilisierung der Bindung benötigt werden, zeigt, dass COI1 analog zu TIR1 in der Auxin-Antwort den Rezeptor für das beteiligte Phytohormon darstellt. Mehrere getestete Jasmonate haben gezeigt, dass weder MeJA, OPDA noch die Aminosäurekonjugate JA-TRP und JA-PHE die Bindung von JAZ1 an das COI1-Protein fördern können, nur das Konjugat JA-ILE und in einem weit geringeren Maß JA-LEU hat zu der Bildung eines stabilen JAZ1-COI1-Komplexes geführt. Damit ist JA-ILE für den durch JAZ1 regulierten Teil der JA Antwort das einzig bekannte effiziente JA-Derivat.

Für die Biosynthese von JA-ILE ist das JAR1-Protein notwendig, in *jar1*-Mutanten sind die Mengen an JA-ILE in uninduzierten Keimlingen auf ca. 18% reduziert. Die Bedeutung von JA-ILE konnte dadurch weiter bestätigt werden, dass in der *jar1*-Mutante die Inhibierung des Wurzelwachstums durch JA beeinträchtigt ist, nicht aber die durch JA-ILE (Staswick and Tiryaki, 2004). Damit konsistent ist die Beobachtung, dass die *jar1*-Mutante

nicht mehr in der Lage ist, nach Jasmonatbehandlung den Repressor JAZ1 abzubauen (Chini et al., 2007).

Obwohl *jar1*-Mutanten nur geringe Mengen an JA-ILE aufweisen, sind sehr viele der JA-induzierbaren Gene (*MYC2*, *AOS*, *VSP*, *PDF1.2* und *OPR3*) unverändert durch Verletzung in der *jar1*-Mutante exprimiert (Chung et al., 2008; Suza and Staswick, 2008). JAR1 ist nicht das einzige ILE an JA konjugierende Enzym in *Arabidopsis* (Staswick and Tiryaki, 2004). Diese partielle Redundanz erklärt, warum nach Verletzung viele JA-induzierbare Gene auch in der *jar1*-Mutante induziert werden können. Dieser Befund spricht außerdem dafür, dass für viele JA-induzierbare Gene geringere Mengen an JA-ILE für eine Induktion ausreichen. Ein Unterschied zur Wundinduktion zeigt sich nach Gabe von MeJA: Die Proteinmengen von VSP sind in der *jar1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp deutlich reduziert (Staswick et al., 1992). Vermutlich werden durch Verwundung die anderen konjugierende Enzyme aktiviert und damit höhere Mengen an JA-ILE gebildet, als nach Gabe von JA oder MeJA.

Als Folgerung dieser Experimente ist anzunehmen, dass die Wirkung von MeJA in Wildtyppflanzen darauf beruht, dass MeJA in der Pflanze zu JA umgesetzt wird und dann zu JA-ILE konjugiert werden kann.

Da herausgefunden wurde, dass JAZ3 mit MYC2, einem Transkriptionsfaktor der an der Induktion vieler JA-responsiver Gene beteiligt ist (Boter et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Lorenzo and Solano, 2005), interagieren kann, wurde die Grundlage für ein Modell geschaffen (siehe Abbildung 3.5-1), welches erklärt, wie die COI1-abhängige Induktion JA-responsiver Gene funktioniert. In der nicht gestressten Pflanze wird in Abwesenheit von JA der MYC2-Transkriptionsfaktor durch JAZ-Repressoren (gezeigt für JAZ3) gebunden und dadurch reprimiert. Durch die geeigneten Stressbedingungen wird die JA-Biosynthese und die Konjugation von JA an die Aminosäure ILE induziert. Durch JA-ILE wird die Bindung der JAZ-Repressoren an das COI1-Protein gefördert, und die Faktoren können über den SCF^{COI1}-Komplex durch das 26S-Proteasom abgebaut werden. Dadurch wird der MYC2-Transkriptionsfaktor freigegeben und führt zur Induktion JA-abhängiger Gene. Der MYC2-Faktor ist an vielen Prozessen, die JA benötigen, beteiligt, wie zum Beispiel an der Wundantwort, der Antwort auf Insektenfraß und der Antwort auf oxidativen Stress.

Andererseits ist die *jin1*-Mutante fertil (Lorenzo et al., 2004), was bedeutet, dass es auch Jasmonat-Signalwege gibt, die unabhängig von MYC2 induziert werden können.

Durch die Interaktion mit dem COI1-Protein werden die JAZ-Faktoren abgebaut, gleichzeitig werden aber ihre Transkripte akkumuliert. So ist zum Beispiel der *JAZ3*-Promotor selbst ein Ziel des MYC2-Transkriptionsfaktors. Auf diese Weise reprimiert sich das *JAZ3*-Gen durch sein eigenes Produkt; wird jedoch der JAZ3-Faktor abgebaut, wird neues Transkript induziert, um wieder JAZ3-Faktoren nachzubilden und so ein zu starkes Reagieren auf Stress zu verhindern (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007).

Viele der *JAZ*-Repressorgene werden durch Verwundung, oxidativen Stress, Salzstress und bakterielle und pilzliche Pathogene induziert, alles Bedingungen, unter denen JA-Signalwege eine wichtige Rolle spielen. Da es aber *JAZ*-Transkripte gibt, die durch Jasmonsäure, Verwundung oder Herbivore nicht induziert werden, besitzen sie eventuell nicht-redundante Funktionen in anderen Bereichen der Stressantwort (Chung et al., 2008).

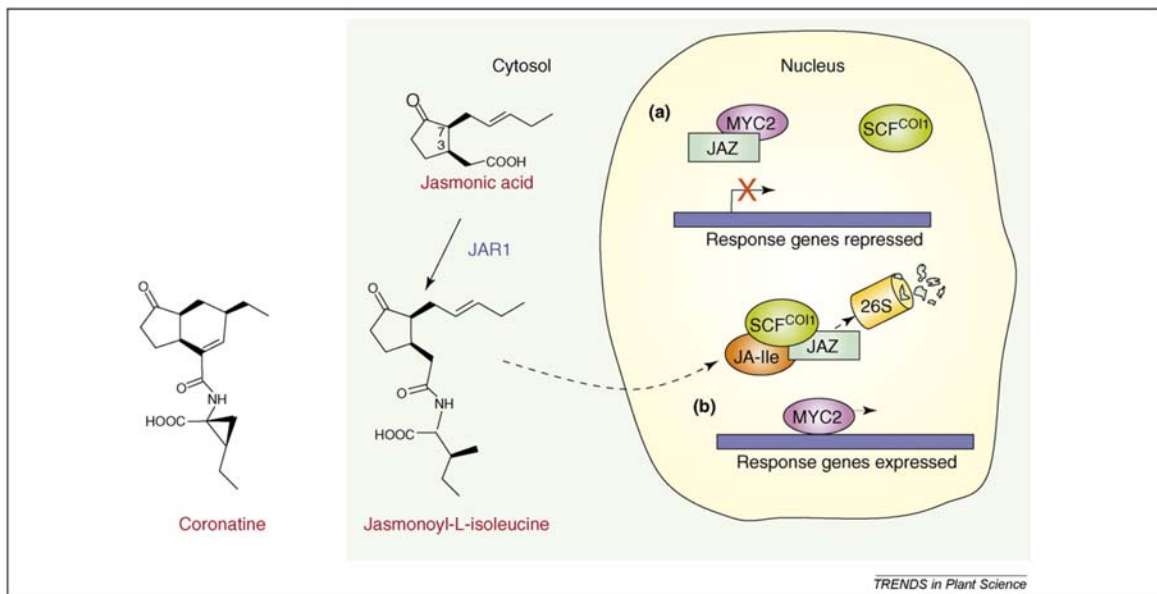


Abbildung 3.5-1: Mechanismus der Induktion JA-abhängiger Gene, entnommen aus Staswick, 2008

Warum MeJA, OPDA und JA selbst nicht die COI-JAZ Interaktion stabilisieren, erscheint kontrovers zu bisherigen Studien, da es viele Hinweise darauf gab, dass auch diese Moleküle Signalwirkung besitzen (Seo et al., 2001; Stintzi et al., 2001; Farmer et al., 2003; Mandaokar et al., 2006; Walter et al., 2007). Für diese scheinbare Diskrepanz gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum einen wurde bisher nur der JAZ1-Faktor auf seine Interaktion mit dem COI1-Protein in Gegenwart unterschiedlicher Jasmonate untersucht.

Es ist also möglich, dass die Bindung anderer JAZ-Faktoren an das COI1-Protein durch andere Jasmonate gefördert wird. Weiterhin ist auch möglich, dass andere, bisher unbekannte Repressoren über den SCF^{COI1}-Komplex abgebaut werden, deren Bindung an COI1 durch andere Jasmonate stabilisiert wird.

3.6 Die Ethylen-Signalkaskade

Die Ethylensignalkaskade beginnt mit der Wahrnehmung des Hormons durch Membrangebundene Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum. In *Arabidopsis thaliana* ist eine Rezeptorfamilie gefunden worden, die aus fünf Mitgliedern besteht, die Ethylen *in planta* binden können: *ETHYLENE RESPONSE1 (ETR1)*, *ETHYLENE RESPONSE2 (ETR2)*, *ETHYLENE INSENSITIVE4 (EIN4)*, *ETHYLENE RESISTANT1 (ERS1)*, und *ETHYLENE RESISTANT2 (ERS2)* (Chang et al., 1993; Hua et al., 1998; Sakai et al., 1998). Alle fünf Rezeptoren interagieren mit dem reprimierend auf die Ethylensignalkaskade wirkenden Protein CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1). In Abwesenheit von ET wird die Ethylensignalkaskade über CTR1 reprimiert; sobald die Rezeptoren dagegen ET gebunden haben, wird diese aktive Reprimierung beendet (Hua and Meyerowitz, 1998). CTR1 ist eine Raf-like Kinase, deren genaue Aktivität bisher noch unbekannt ist; vermutet wird jedoch, dass durch Bindung von ET der gesamte Rezeptor/CTR1-Komplex in eine inaktive Konformation überführt wird (Gao et al., 2003). Neuere Studien haben gezeigt, dass CTR1 zwei verschiedene MAP-Kinase-Kaskaden in der Funktion einer MAPKKK reguliert. Die MKK9-MPK3/6-Kaskade wirkt sich direkt auf den Phosphorylierungszustand von EIN3 (ETHYLEN INSENSITIV3), einem an der Ethylenantwort beteiligten Transkriptionsfaktor, aus und wird benötigt, um EIN3 akkumulieren zu können. Es ist bekannt, dass CTR1 die MAP-Kinasekaskade MKK9-MPK3/6 inhibiert, über welchen Mechanismus ist jedoch zurzeit noch nicht geklärt. Eine weitere Komponente des Ethylensignalwegs, deren genaue Funktion bis heute nicht geklärt ist, ist das EIN2-Protein. EIN2 (ETHYLEN INSENSITIV2) ist ein positiver Regulator, der für die gesamte bisher untersuchte Ethylenantwort benötigt wird (Alonso et al., 1999) und für den bisher postuliert wurde, dass er dem Transkriptionsfaktor EIN3 und anderen Mitgliedern der EIN3-Familien übergeordnet wirkt (Chao et al., 1997). Die EIN3-LIKE-Transkriptionsfaktorfamilie besteht ebenfalls aus positiven Regulatoren der ET-Antwort und aktiviert vermutlich eine Kaskade an weiteren Transkriptionsfaktoren (Solano

et al., 1998). Wie für viele Hormone ist auch an der ET-Antwort das 26S-Proteasom beteiligt. EIN3 wird über die F-Box-Proteine EBF1 und EBF2 in Abwesenheit von Ethylen abgebaut, während Anwesenheit von Ethylen den Transkriptionsfaktor stabilisiert (Guo and Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003).

Neuere Studien haben gezeigt, dass die Stabilität des EIN3-TF von seinem Phosphorylierungszustand abhängig ist. Eine Phosphorylierung an der Position T174 stabilisiert den Faktor, während eine Phosphorylierung an T592 zu einem vermehrten Abbau von EIN3 führt. Um EIN3 komplett zu stabilisieren, muss also T174 phosphoryliert und T592 dephosphoryliert vorliegen. Für die Phosphorylierung an T174 ist direkt die MPK6 verantwortlich. Vermutlich gibt es eine zweite, über CTR1 aktivierte MAP-Kinasekaskade, die für die Phosphorylierung an T592 verantwortlich ist, die EIN3 in der Abwesenheit von Ethylen instabil hält. So konnte ein Modell erstellt werden, das die Bedeutung der MK-Kaskade in dem Ethylensignalweg erklärt (Yoo et al., 2008).

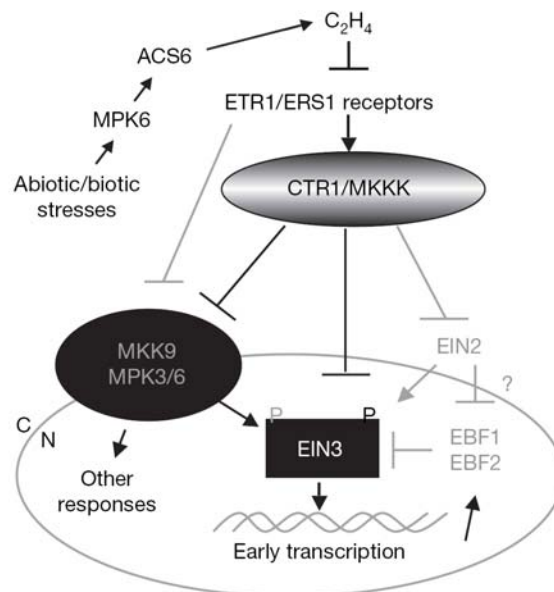


Abbildung 3.6-1: Mechanismus der Ethylen-Signalkaskade, entnommen aus Yoo et al. 2008

Für EIN2 wird angenommen, dass es eventuell die Aktivität der beiden F-Box-Proteine EBF1 und EBF2 modifiziert und so die Stabilität von EIN3 beeinflussen kann.

Für *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass EIN3, EIL1 (EIN3-LIKE1) und EIL2 (EIN3-LIKE2) an eine Promotorregion des ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 (ERF1) binden können und dadurch seine Transkription induzieren. ERF1 ist seinerseits ein an GCC-

Boxen bindender Transkriptionsfaktor, der verantwortlich für die Induktion der Expression einer Gruppe ET-responsiver Gene ist, wie zum Beispiel *PDF1.2* und *PR4* (Solano et al., 1998). ERF1 benötigt für seine Expression funktionelle ET- sowie JA-Signalwege, wirkt induzierend auf JA/ET-induzierbare Gene und reprimierend auf JA-induzierbare Gene wie *THI2.1* und *VSP*. Damit ist ERF1 ein Faktor, der an dem Synergismus zwischen JA und ET beteiligt ist (Lorenzo et al., 2003). Antagonistisch zu ERF1 wirkt MYC2, der JA-induzierbare Gene induziert und JA/ET-induzierbare Gene reprimiert (Dombrecht et al., 2007).

Auch für einige AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren ist bekannt, dass sie an der Induktion JA/ET-induzierbarer Gene beteiligt sind. In *Arabidopsis thaliana* wurden einige Oktadekanoid responsive AP2/ERF-Faktoren (ORA) charakterisiert, die in der Ethylenantwort eine Rolle spielen. Überexpressionslinien des ORA59 beispielsweise zeigen erhöhte Transkriptmengen JA/ET-induzierbarer Gene, wie zum Beispiel *PR4* und *PDF1.2*. Damit weisen ERF1 und ORA59 redundante Funktionen auf. Pflanzen mit reduzierten *ORA59*-Transkriptmengen sind weder durch Gabe von ET noch von JA oder einer Kombination aus beiden in der Lage, *PDF1.2*-Transkript zu exprimieren, was zeigt, dass der ORA59 benötigt wird, um das JA- und ET-Signal zu integrieren (Zarei, 2007).

3.7 Zielsetzung

Terpene sind wichtige Sekundärmetabolite, die an der Pflanzen-Insekten und Pflanzen-Pflanzen-Interaktion beteiligt sind. *Arabidopsis thaliana* verfügt über ein geringes Terpenspektrum, dessen Zusammensetzung jedoch je nach Stressbedingungen variiert wird (siehe auch 3.2).

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte analysiert werden, ob in *Arabidopsis thaliana* unter unterschiedlichen Stressbedingungen wie Befall mit Pilzen, Bakterien, Insekten, Verwundung und Behandlung mit dem Elicitor Alamethicin die Expression von Terpensynthasegenen differentiell reguliert ist. Beispielhaft wurde hierfür die Expression der Gene *TPS4* und *GLS* durch real time RT-PCR-Analysen verglichen. Das *TPS4*-Gen kodiert für eine Monoterpensynthase, die für die Bildung von Ocimen im Ökotyp No-0 bzw. von alpha-Farnesen im Ökotyp Col-0 verantwortlich ist. Die *GLS* ist eine Diterpensynthase, die die Synthese der TMTT-Vorstufe Geranylinalool katalysiert. Nach

der Erstellung des Expressionsprofils sollte durch die Analyse der Induktion der Gene in verschiedenen Signaltransduktionsmutanten von *Arabidopsis* sowie durch pharmakologische Experimente ermittelt werden, durch welche Phytohormonkombinationen die beiden Gene induziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die funktionelle Bedeutung von TMTT für die Pflanzen-Pflanzen-Interaktion ermittelt werden. Dazu sollten genomweite Transkriptionsanalysen von Pflanzen durchgeführt werden, die in direkter Nachbarschaft von Pflanzen, die aufgrund konstitutiver GLS-Expression erhöhte Mengen von TMTT emittieren, angezogen wurden. Die Induzierbarkeit der Gene sollte durch exogene Gabe von TMTT verifiziert werden. Die Auswertung des Transkriptionsprofils sollte zur Identifikation von Genen führen, die durch ein volatiles Signal induziert werden können und somit potentiell wichtige Zielgene für die Pflanzen-Pflanzen Interaktion bzw. für die durch diese Interaktion vermittelte Abwehrreaktion darstellen. Dadurch sollten Arbeitshypothesen aufgestellt werden, welche Bedeutung die induzierten Gene für die Fitness der Pflanze haben können.

4 Material

4.1 Geräte

Geräte	Modell	Hersteller/Bezugsquelle
Autoklav	3870 ELV	Tuttnauer
Automatische Pipetten		Gilson
Bellydancer™		Stovall
Bioimager /Phosphoimager	BAS-1000	Fuji
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
Inkubationsschränke		WTC binder; Memmert
Kühlzentrifuge	Sorvall RC 5B Plus	DuPont
Netzgeräte	E323	Benedikt Heinemann
PCR-Geräte	MiniCycler™ PTC-150	MJ Research
pH-Meter	HI 9321	Hanna Instruments
Photometer	Unikon 720 LC	Kontron
Real-time PCR Gerät	MyIQ	Biorad
RNA-/DNA-Calculator	GeneQuant II	Pharmacia
Scanner	ScanJet 4c	Hewlett Packard
Schwingmühle	MM301	Retsch
Sequenzanalysegerät	ABI PRISM 310	Perkin-Elmer
Standzentrifuge mit Ausschwingrotor	UJ3S	Christ
Sterilbank	Microflow Biohazard	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus Christ
Tischzentrifuge, kühlbar	5403	Eppendorf
UV-Transilluminator	FLX-20 M	Vilber Lourmat
Vortex	L46	Labinco BV, Niederlande
Wasseraufbereitungsanlage	Option 4, Maxima	ELGA

4.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller / Bezugsquelle
Fließpapier 3MM	Whatman
Kunststoff-Einwegmaterial	Biozym; Eppendorf; Greiner; Roth; Sarstedt
Micro Spin G25 Säule	Amersham, USA
Parafilm M	American National Can™
Pflanzenerde	Einheitserde Werkverband Sinntal-Jossa

4.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller/ Lieferant
[$\alpha_{32}\text{P}$]-dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
1,4 Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
Agarose SeaKem LE	Biozym, Hess. Oldendorf
Alameticin	Sigma, Steinheim
Ameisensäure	Merck, Darmstadt
Ampicillin	AGS
Bakto Pepton	Difco
Basta	AgrEvo, Düsseldorf
Bromphenolblau	Roth
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Confidor	Bayer, Leverkusen
Cycloheximid	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim
dNTPs	Roth, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glukose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe
Heringssperma DNA HSP	Sigma
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Bio Tech Trade
Kaliumacetat	Roth, Darmstadt

Chemikalie	Hersteller/ Lieferant
Magnesiumsulfat	Roth, Darmstadt
Murashige und Skoog Medium	Duchefa
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma
Phenol gesättigt mit 0,1M Citrat-Puffer	Sigma, Steinheim
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Select Agar	GIBCO BRL, Eggenstein
Triton X-100	Roth
Tween20	Roth
X-Gal	Bio Tech Trade

4.4 Kits

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

4.5 Enzyme

Enzym	Hersteller/ Lieferant
Bio-Taq	Bioline
Klenow exo ⁻	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme	GIBCO BRL MBI Fermentas New England Biolabs
Reverse Transkriptase	MBI Fermentas
Ribonuklease Inhibitor	MBI Fermentas
T4 DNA-Ligase	Promega

4.6 Nukleinsäuren

4.6.1 Größenstandard

Größenstandard	Hersteller/Lieferant
GeneRuler DNA-Ladder Mix	MBI Fermentast
PUC19 <i>HpaII</i>	eigene Herstellung

4.6.2 Primer

Die Primer wurden von den Firmen OPERON Biotechnologies, GIBCO BRL sowie MWG synthetisiert. Real-Time-PCR-Primer wurden bei Qiagen als QuantiTect-Primer-assaysTM bestellt. Erhaltenes PCR-Produkt wurde in den pSK-T-Vektor ligiert und mit UNI oder REV-Primer sequenziert. Die Primer für das sequenzierte PCR-Produkt wurden so gewählt, dass die Annealingtemperatur bei ca. 55°C liegt und möglichst keine Sekundärstrukturen entstehen.

Primer	Sequenz 5' → 3'
REV	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC
UNI	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
PP2Asense	AAGCAGCGTAATCGGTAGG
PP2Aanti	GCACAGCAATCGGGTATAAAG
TPS4sense	GAGAGAGACACGACATGAACCCTATC
TPS4anti	CGTCTTGCTCCACCAACTAGAGAG
AtGLSsense	CTTGTGTTGTAGCACTTCAGAAA
AtGLSanti	GATAGCGAACCAACGAGGAT
VSP2sense	CAAACATAACAATAAACCATACCATAA
VSP2anti	GCCAAGAGCAAGAGAAGTGA
PR4sense	CAACAATGCGGTCGTCAAG
PR4anti	GCCCACTCCCAACAAT
PDF1.2sense	CTTGTTCTCTTTGCTGCTTTC
PDF1.2anti	CATGTTTGCTCCTTCAAG
PEARLIsense	CCCTAAGCGCAGTGCAAAG
PEARLIanti	CCATCAGCTCAACCATGTTGC
GLP3sense	CGAGGCCGGTAAATGCAAAG
GLP3anti	GCCCATCAGGTTACTCTTGC
ATOSM34sense	AATACAGTACACGGGTTGTTGC
ATOSM34anti	TATCTCACTTGTCGATGGATT
<i>B. cinerea</i> Aktin sense	CTTCGTGTAGCACCAGAGGA
<i>B. cinerea</i> Aktin anti	TCAACACGAGCAATGGCG
APRR5	Sequenz unbekannt, Bestellnummer: QT00837690
GRP7	Sequenz unbekannt, Bestellnummer: QT00754194
T20H2.19	Sequenz unbekannt, Bestellnummer: QT00861980
FSD1	Sequenz unbekannt, Bestellnummer: QT00814730

4.6.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pSK-T	Klonier- und Sequenziervektor, <i>lacZα</i> , <i>amp^r</i>	Kriete, unveröffentlicht

4.7 Organismen

4.7.1 Bakterien

Abkürzungen sind den jeweiligen Referenzen zu entnehmen.

Bakterienstamm	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F ⁻ , gyrA96 (Nalr), recA1, endA1, thi-1, hsdR17 (rk-mk+), glnV44, deoR, D (lacZYA-argF) U169 [p80dD(lacZ)M15]	(HANAHAN, 1983)
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000	Originalstamm, Rif-resistent	(Brooks et al., 2004) Barbara Kunkel
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, AK7E2 cmaA:Tn5 Mutante	COR-, CFA+, CMA- Rif + Spec resistant	(Brooks et al., 2004) Barbara Kunkel
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, DB4G3 cfa6: Tn5 Mutante	COR-, CFA-, CMA+ Rif + Kan resistant	(Brooks et al., 2004) Barbara Kunkel
<i>Pseudomonas syringae</i> DC3000, DB29 cmaA cfa6 Doppelmutante	COR-, CFA- CMA- Rif + Spec + Kan resistant	(Brooks et al., 2004) Barbara Kunkel

4.7.2 *A. thaliana* Pflanzen/Genotypen

Genotyp	Beschreibung	Referenz
<i>35S::AtGLS</i>	Das Konstrukt <i>pB2GW7-35S::AtGLS</i> in <i>salk_039864</i> transformiert	(Herde, 2006)
<i>aa03</i>	Mutante mit einem Defekt in der ABA-Synthese	(Seo et al., 2003); NASC
<i>acx1/5</i>	Mutante mit einem Defekt in der JA-Synthese	(Schilmiller et al., 2007); Howe
<i>coi1</i>	Mutante mit Defekt in der JA-Signalkaskade	(Feys et al., 1994; Xie et al., 1998) Turner
Columbia (Col)	Wildtyp	NASC Stock
<i>dde2</i>	Mutante mit einem Defekt in der JA-Biosynthese	(Park et al., 2002); Von Malek
<i>ein2</i>	Mutante mit Defekt in der EthylenSignalkaskade	(Guzman and Ecker, 1990) NASC Stock
<i>gl1</i>	Mutante mit Defekt in der Trichomentwicklung	(Guzman and Ecker, 1990; Oppenheimer et al., 1991) Stintzi
<i>jin1</i>	Mutante mit einem Defekt in dem MYC2-TF	(Berger et al., 1996); Berger
<i>NahG</i>	Transgene Pflanze, die SA in Catechol umwandelt	(Gaffney et al., 1993; Lawton et al., 1995) Friedrich
<i>npr1</i>	Mutante mit einem Defekt in einer SA-Signalkaskade	(Cao et al., 1994) NASC Stock
<i>opr3</i>	Mutante mit einem Defekt in der JA-Synthese	(Stintzi and Browse, 2000); Stintzi
<i>JAZ1Δ3A-GUS</i>	Transgene die einen JAZ1-Faktor mit einer Deletion in der Domäne 3 exprimiert, der einen JA-insensitiven Phänotyp verursacht	(Thines et al., 2007); Browse
<i>tga2,5,6-triple</i>	Mutante mit Defekten in den TFs TGA2, TGA5 und TGA6	(Zhang et al., 2003); Zhan
<i>pad3</i>	Mutante mit einem Defekt in der Phytoalexinbiosynthese	(Zhou et al., 1999); Glazebrook
<i>sid2</i>	Mutante mit Defekt in der SA-Biosynthese	(Nawrath and Metraux, 1999; Wildermuth et al., 2001); Ausubel

4.7.3 Pilze

Der Stamm B1.26 von *Botrytis cinerae* wurde von Prof. Dr. Von Tiedemann zur Verfügung gestellt.

4.7.4 Insekten

Larven von *Plutella xylostella* im 3.-4. Larvenstadium wurden freundlicherweise von D. Mennerich (Abteilung Agrarentomologie Prof. Dr. Vidal, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt.

4.8 Nährmedien und Zusätze

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit H_2O *Ultrapure* (Wasseraufbereitungsanlage) angesetzt und unter folgenden Bedingungen autoklaviert: 15 min, 2 bar, 121°C.

4.8.1 Medien für die Anzucht von Bakterien

LB Medium	1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) NaCl pH 7,4
KB Medium	
SOC Medium	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; nach dem Autoklavieren sterilfiltriert zugeben: 10 mM $MgCl_2$; 10 mM $MgSO_4$; 20 mM Glucose

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

4.8.2 Medien für die Anzucht von Pilzen

Malzextrakt	48 g/l Malzextrakt; 2 g/l Hefeextrakt (MERCK)
PD Broth	12 g/l PDB (SIGMA)

4.8.3 Medien für die Anzucht von Pflanzen

2MS Medium	4,4 g/l MS-Medium; 20 g/l Saccharose; 6,4 g/l Select Agar; pH 5,7 mit KOH
hydroponisches Medium	72 μ M Fe-EDTA; 50 μ M KCl; 50 μ M H_3BO_3 ; 10 μ M $MnSO_4$; 2 μ M $ZnSO_4$; 1,5 μ M $CuSO_4$; 0,1 mM $NaSiO_3$; 0,5 mM KH_2PO_4 ; 0,075 mM Na_2MoO_4 ; 1,25 mM KNO_3 ; 0,75 mM $MgSO_4$; 1,5 mM $Ca(NO)_3$, die Lösung wurde aus 1000 fach konzentrierten Stammlösungen angesetzt, es wurde Leitungswasser verwendet; auf Autoklavieren wurde verzichtet

4.8.4 Zusätze für Medien

Zusatz	Endkonzentration [mg/l]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100 mg/l	100 mg/ml in H ₂ O
IPTG	40 µl pro Platte	26 mg/ml in DMF
Kan	50 mg/l	50 mg/ml in H ₂ O
Rif	50 mg/l	10 mg/ml in H ₂ O mit HCl
Spec	10 mg/l	10 mg/ml in H ₂ O
X-Gal	40 µl pro Platte	20 mg/ml in DMF

4.9 Lösungen und Puffer

Alle Medien wurden, soweit nicht anders angegeben, mit H₂Oultrapure (Wasseraufbereitungsanlage) angesetzt.

4.9.1 Standardlösungen und Puffer

20 fach TAE	0,8 M TrisHCl; 0,2 M Na-Acetat; 20 mM EDTA; mit Essigsäure pH 7,8 einstellen
BOX	33 g Wasser und 67g Sucrose erwärmen, 5 mMol EDTA, je 0,42 g Bromphenolblau, Xylencyanol, OrangeG
DNA-Ladepuffer	0 % Glycerin in 1 x TAE; 0,2 % (w/v) Bromphenolblau; 0,2 % (w/v) Orange G

4.9.2 RNA-Extraktion

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

4.9.3 Nothern-Blot Analyse/denaturierende RNA Gelelektrophorese

10 fach MEN	200 mM MOPS; 50 mM Na-Acetat; 10 mM EDTA; mit 1 M NaOH pH 7,0 einstellen
20 fach SSC	3 M NaCl; 300 mM Na-Citrat
Hybridisierungs-Lsg.	0,5 M NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 7,2); 1 mM EDTA; 7 % SDS
RNA-Auftragspuffer	40 mM EDTA (ph 8,0); 8 % Glycerin; 20 % 10 x MEN; 1,2 % Bromphenolblau/Xylencyanol; 57 % Formamid; 5 % Formaldehyd
STE	100 mM NaCl; 10 mM TrisHCl pH 8,0; 1 mM EDTA
Stripping-Lsg	0,1 % SDS

4.9.4 Alkalische Lyse von *E. coli*

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

4.9.5 Transformation von *E. coli*

Transformationspuffer	10 mM PIPES, 15 mM CaCl ₂ , 250 mM KCl, 55 mM MnCl ₂ , pH 6,7 vor Zugabe von MnCl ₂ eingestellt
------------------------------	--

4.10 Software

Programm	Verwendung	Hersteller
Vector NTI	Planung der Klonierungen, Plasmid-Karten, Vergleich mit Sequenzchromatogrammen	Invitrogen GmbH
Tina 2.0	Bearbeitung der Nothern-Blot Signale	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Basreader	Einlesen der Nothern-Blot Signale	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe Systems
Word XP	Textverarbeitung	Microsoft
Excel XP	Diagramme	Microsoft
MyIQ 2.0	Auswertung der real-time PCR-Daten	BIO-RAD

5 Methoden

5.1 Methoden zur Anzucht und Kultivierung von Organismen

5.1.1 Bakterien

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

Die Medien enthielten entsprechende Antibiotika (siehe 0), um das Wachstum von Resistenz-tragenden Bakterien unter Selektionsdruck zu gewährleisten. Die Inkubation von Flüssigkulturen wurde im Schüttler bei 250 rpm durchgeführt.

5.1.2 Pilze

Botrytis cinerea wurde nach (Thomma et al., 1999) auf Potato Dextrose Agar- (PDA) Platten durchgeführt. Zum Überführen auf neue Platten wurde ein Stück aus einer gut bewachsenen Platte auf eine frische Platte aufgelegt. Das Wachstum erfolgte innerhalb von drei Wochen im Dunkeln bei 22-24°C, bei 4°C konnten die Platten gelagert werden.

5.1.3 Pflanzen

5.1.3.1 *A. thaliana* auf Erde

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

5.1.3.2 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

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

5.1.3.3 Sterile Anzucht von *A. thaliana* auf Platten

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (siehe 5.1.3.2) 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.

5.1.3.4 Sterile Anzucht von *A. thaliana* auf Erde

Die Samen wurden vor der Aussaat oberflächensterilisiert (siehe 5.1.3.2) und Erde in Plastikgefäßen ausgelegt, die vorher 2x autoklaviert wurde. Die Stratifizierung erfolgte für 2 Tage im Dunkeln bei 4°C. Anschließend wurden Plastikgefäße in einer Klimakammer unter Kurztagsbedingungen (9 h Licht, 15 h Dunkel) inkubiert.

5.1.3.5 Samengewinnung aus *A. thaliana*

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

5.1.3.6 Hydroponische Anzucht von *A. thaliana*

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

5.2 Induktion der Genexpression in *A. thaliana*

5.2.1 Induktion mit Chemikalien

Für Behandlung mit Induktoren der *AtGLS*-Expression wurden hydroponisch angezogenen Pflanzen samt Steinwolle und Kaffeebecher (5.1.3.6) einzeln in Falcon-Gefäße (für Genexpressionsstudien) oder ohne den Kaffeebecher in Bechergläser (für Analyse von Volatilen) überführt. Die jeweiligen Gefäße enthielten zwischen 20 und 35 ml hydroponisches Medium, versetzt mit entweder Alamethicin oder Coronalon (freundlicherweise von W. Boland zur Verfügung gestellt) oder Cycloheximid in

Endkonzentrationen von 5 µg/ml in 0,1 % Ethanol (Alamethicin) oder 33 µg/ml in 0,1 % Ethanol (Coronalon) 20 µg/ml Cycloheximid in 0,1 % Ethanol. Kontrollen enthielten jeweils 0,1 % Ethanol.

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

5.2.2 Induktion mit Bakterien

Zur Infektion von *Arabidopsis* wurden von den Pseudomonaden ü.N. Vorkulturen angezogen und abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min, RT). Die Pseudomonaden wurden auf eine Dichte von 5×10^5 cfu / ml mit 10 mM MgCl₂ verdünnt. Eine Blatthälfte wurde mit einer 1 ml-Spritze ohne Nadel von der Blattunterseite inokuliert. Das Volumen einer Inokulation betrug ca. 10 µl.

5.2.3 Induktion mit Pilzen

Platten mit *Botrytis cinerea* wurden wie unter 5.1.2 inkubiert.

Um die Pilze zur Sporulation zu bringen, wurden Teile des Pilzmyzels von den PDA-Platten auf Malz-Extrakt-Platten überführt. Die Platten wurden bis zum vollständigen Bewachsen im Dunkeln bei 20-24°C gelagert (~7-12 Tage). Die Sporulation der Pilze wurde unter UV-Licht induziert (24 h). Anschließend wurden die Platten bis zur Sporenbildung weiter im Dunkeln inkubiert (~4-7 Tage). Sporulierende Pilzhyphen wurden mit 5 ml PDB abgeschabt und durch drei Lagen Mullbinde gefiltert. Nach dem Auszählen in einer Thomma-Zählkammer wurde die Sporenlösung auf 1×10^6 Sporen/ ml eingestellt. Die Sporen wurden zum Vorkeimen im PDB-Medium vor der Infektion 2-3 h im Licht stehen gelassen. Für die Infektion wurden 7 Wochen alte Pflanzen verwendet, die unter sterilen Bedingungen in geschlossenen Plastikschaalen auf Erde gewachsen waren. Auf die Blätter dieser Pflanzen wurden jeweils 2 µl Sporenlösung aufgetropft und die Schalen anschließend wieder verschlossen, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten. Das Wachstum der Pilze auf den Pflanzen wurde nach 48 h mit einer Digitalkamera dokumentiert. Das dokumentierte Pflanzen-Material wurde zur weiteren Analyse (RNA) geerntet.

5.2.4 Induktion mit Raupen

Für Induktion durch Raupenfraß durch *Plutella xylostella* wurden auf Hydroponik unter Kurztagsbedingungen angezogene Pflanzen verwendet. Je nach Larvenstadium wurden ca. 5 Raupen auf die Rosette einer Pflanze gesetzt.

5.2.5 Selektion von homozygoten *coil*-Mutanten

Coil-Mutanten sind im homozygoten Zustand männlich infertil, was bedeutet, dass sie stets neu aus einer heterozygoten Population selektiert werden müssen. Dies geschah in Anlehnung an ein bereits beschriebenes Protokoll (Reymond et al., 2000). Es wurden Samen aus einer heterozygoten Population steril auf Platten mit 1 MS Medium und 50 µM Methyljasmonat (aus einer 1:10000 Stammlösung in Ethanol) ausgesät. Nach ca. 1,5 Wochen sind homozygote *coil*-Mutanten, daran zu erkennen, dass sie grün sind und lange

Wurzeln besitzen. Die heterozygoten und Wildtyppflanzen dagegen sind rot und zeigen ein stark verkürztes Wurzelwachstum. Die erfolgreiche Selektion kann leicht überprüft werden durch die Blütenstände der erwachsenen Pflanzen, diese sollten in homozygoten *coil*-Mutanten nur sterile Schoten enthalten.

5.2.6 Selektion von homozygoten *JAZ*

JAZ1A3A-GUS-Transgene sind selbst im heterozygoten Zustand männlich steril und werden durch Auftupfen von Wildtyppollen vermehrt. Auf Kanamycinplatten (50 mg/l) kann dann nach heterozygoten *JAZ1A3A-GUS*-Transgenen selektiert werden. Wildtyppflanzen keimen unter diesen Bedingungen nicht oder sterben nach wenigen Tagen ab.

5.3 Klonierung

5.3.1 Restriktionsspaltung

Doppelsträngige DNA kann mit Hilfe von Restriktionsenzymen des Typs II sequenzspezifisch gespalten werden. Je nach Enzym entstehen dabei 3'- oder 5'-überhängende („sticky“) oder glatte („blunt“) DNA-Enden. Die für die verschiedenen Restriktionsenzyme optimalen Reaktionsbedingungen wurden mit zehnfach konzentrierten Restriktionspuffern der Firma MBI Fermentas eingestellt. Die Aktivität von Restriktionsendonukleasen wird in „Units“ (U) angegeben, wobei mit 1 U die Enzymmenge definiert ist, die 1 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:

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

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

5.3.2 Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert eine Phosphordiesterbindung zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-OH-Gruppen. Als Co-Substrat muss ATP in geeigneter Konzentration im

Puffermedium vorliegen. Das zu inserierende DNA-Fragment wurde in 10-fachem molaren Überschuss zu der gespaltenen Vektor-DNA (50 fmol) zugegeben. Die Ligation erfolgte im Ligationspuffer (40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP pH 7,5) mit 5 Units T4-DNA-Ligase. Die Ligationsansätze mit einem Endvolumen von 15 µl wurden mindestens 1 h oder ü. N. bei Raumtemperatur inkubiert.

5.3.3 Klonierung von PCR-Produkten

Die *Taq*-Polymerase besitzt neben ihrer 5'→3'-Polymeraseaktivität auch eine terminale Desoxynukleotidyl-Transferaseaktivität, welche häufig zu einer Addition von Desoxyadenosin (dA) am 3'-Ende des amplifizierten DNA-Moleküls führt. Die PCR-Produkte mit einem zusätzlichen überhängenden dA an den 3'-Enden können direkt in Vektoren kloniert werden, die komplementär dT-Überhänge an ihren 3'-Enden besitzen (Mead et al., 1991). In dieser Arbeit wurde der Vektor pGEM[®]-T von Promega für die Klonierung von PCR-Produkten benutzt. Das Plasmid war von dem Hersteller über die *EcoRV*-Schnittstelle linearisiert und mit terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase behandelt worden, so dass jeweils ein überhängendes Didesoxythymidin (ddT) an den 3'-Enden des geöffneten Vektors vorlag. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben.

5.3.4 Blau-Weiß Selektion

Eine wesentliche Erleichterung zur Identifizierung von *E. coli*-Kolonien, welche nach der Transformation ein rekombinantes Plasmid tragen, bietet die Blau-Weiß-Selektion. Sie wird z. B. bei der Klonierung von PCR-Produkten mit dem Vektor pGEM[®]-T oder pSK eingesetzt. Das Verfahren beruht auf der α-Komplementation des Enzyms β-Galaktosidase. Die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren (α-Peptid) können zusammen mit einem inaktiven Enzym, dem die Aminosäuren 11 bis 14 fehlen, eine funktionierende β-Galaktosidase bilden. Das aktive Enzym hydrolysiert z. B. das Substrat X-Gal, das daraufhin durch Luftoxidation eine blaue Färbung zeigt. Bakterienstämme mit dem inaktiven Enzym können durch Aufnahme eines Plasmids, das die für das α-Peptid codierende DNA trägt, X-Gal umsetzen. Als Induktor der Genexpression wurde IPTG eingesetzt. Die zur Blau-Weiß-Selektion eingesetzten Agarplatten wurden kurz vor Gebrauch mit jeweils 40 µl der X-Gal und der IPTG-Stammlösungen beschichtet. Wird die das α-Peptid codierende Sequenz durch Einbau von fremder DNA unterbrochen, so bleiben die Bakterienkolonien weiß. Bakterienklone, die kein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben und somit das α-Peptid synthetisieren, sind an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

5.3.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (Mullis et al., 1986) können unter Verwendung zweier gegenläufiger Primer spezifische Sequenzen eines DNA-Templates amplifiziert werden. Die als Matrize dienende Template-DNA wird zunächst denaturiert. Nach Anlagerung der Primer an die komplementären Sequenzen der DNA-Einzelstränge synthetisiert eine hitzestabile DNA-Polymerase komplementäre DNA-Stränge an der Matrizen-DNA. Dieser Zyklus aus Denaturieren, Primeranlagerung und DNA-Synthese

wird mehrfach wiederholt und führt exponentiell zu einer selektiven Anreicherung der DNA-Sequenz. Die Länge und die Temperatur der einzelnen Schritte eines Zyklus sowie die Anzahl von Zyklen wurde durch den Schmelzpunkt der Primer und die Länge der zu amplifizierenden Sequenz bestimmt. Die Zyklen starteten nach zweiminütiger Denaturierung bei 94°C. Die anschließende Denaturierung erfolgte in der Regel für 30 s bei 92°C, das Primer-Annealing für 30 s bei der für die Primer charakteristischen Temperatur und die Elongation für 1 min/kb bei 72°C. Die Schmelztemperatur T_m eines Primers berechnet sich nach einer empirischen Formel, die sowohl den relativen molaren GC-Gehalt (% GC) als auch die Länge der Oligonukleotide (n) berücksichtigt. Es gibt verschiedene Formeln zur Berechnung der Schmelztemperatur, in dieser Arbeit wurde die Schmelztemperatur mit dem Programm Vector NTI berechnet.

5.3.6 Sequenzierung

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). Im Reaktionsansatz für die Amplifikation der zu sequenzierenden DNA (lineare PCR mit einem Primer) befinden sich neben den vier Desoxynukleotiden auch die entsprechenden Didesoxynukleotide (Terminatoren), welche bei Einbau einen Abbruch der DNA-Synthese herbeiführen. Die vier Terminatoren sind mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so dass die Nukleotid-spezifischen Kettenabbruchprodukte während der Elektrophorese im Analysegerät (Kapillarsequencer ABI Prism 310 von Applied Biosystems) detektiert werden können.

Für die PCR-Reaktion mit einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 500 ng – 1 µg (je größer das Plasmid ist, desto mehr DNA wurde eingesetzt) Plasmid-DNA, 5 pmol Primer und 2 µl RR-(ready reaction) Mix eingesetzt. Im Thermocycler wurden folgende Schritte 25 x durchlaufen: 10 s 95°C, 5 s 50°C und 4 min 60°C. Anschließend fand eine Ethanol-Fällung statt, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Hierzu wurde der Ansatz mit 9,5 µl H₂O und 30,5 µl EtOH abs. versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm für 30 min in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand vollständig abgenommen, das DNA-Pellet mit 100 µl 70% (v/v) EtOH gewaschen, 1 min bei 95°C getrocknet und in 15 µl TSR (Template Suppression Reagent von Perkin-Elmer) resuspendiert. Nach dem Denaturieren bei 95°C für 2 min wurde die Probe sofort 2 min auf Eis gehalten und für die Sequenzanalyse im ABI Prism 310 in spezielle Sequenziergefäße überführt.

5.4 Methoden zur genetischen Manipulation

5.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung kompetenter Zellen nach einer modifizierten Methode (Inoue et al., 1990) wurden Bakterien des *E. coli*-Stammes DH5a 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 OD₆₀₀ von 0,2 - 0,25 bei 37°C in einem 2 l Erlenmeyerkolben geschüttelt.

Das weitere Wachstum der Zellen erfolgte dann bei einer Temperatur von 18°C. Bei einer OD600 von 0,4 - 0,5 wurden die Bakterien durch Zentrifugation (4000 rpm, 4°C, Eppendorf-Kühlzentrifuge) pelletiert und in 90 ml eiskaltem, sterilem Transformationspuffer vorsichtig resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut pelletiert und in 30 ml Transformationspuffer aufgenommen. Es folgte der zweimalige Zusatz von je 1050 µl DMSO, wobei die Zellen nach jeder Zugabe 5 min auf Eis inkubiert wurden. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Transformationseffizienz betrug 107 cfu/µg DNA.

5.4.2 Transformation von *E. coli*

Kompetente *E. coli*-Zellen sind in der Lage, DNA aus dem Umgebungsmedium aufzunehmen. Mit Hilfe der nachfolgenden Methode (Hanahan, 1983) wurden *Escherichia coli*-Zellen mit Plasmid-DNA transformiert. 200 µl 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 µl LB-Medium oder SOC-Medium für 60 min bei 37°C an. Danach wurde der Transformationsansatz auf LB-Selektionsmedium ausplattiert und bei 37°C ü. N. inkubiert.

5.5 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

5.5.1 Alkalische Lyse

Für die Präparation von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen wurde eine modifizierte alkalische Lyse zum Aufschluss der Bakterien durchgeführt (Legouill et al., 1994). 1,5 ml einer stationären *E. coli*-Kultur wurden in einer Tischzentrifuge (1 min, 13.000 rpm, Raumtemperatur) pelletiert und die Zellen nach Dekantieren des Überstandes in 100 µl Mini I resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 200 µl Mini II und 200 µl Chloroform. Nach einminütiger Inkubation wurden 150 µl Mini III zur Neutralisation zugegeben, die Ansätze gevortext und die entstandenen Präzipitate durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt. Die obere, wässrige Phase (400 µl) wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und zur Fällung der Plasmid-DNA mit 2 Vol. eiskaltem Ethanol gemischt. Nach anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 13.000 rpm wurde die sedimentierte DNA mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl H₂O gelöst und konnte dann für Restriktionsanalysen (jeweils 2-5 µl) eingesetzt werden.

5.5.2 Plasmidpräparation mit Spin Mini-Prep Kits

Für Sequenzierreaktionen und Klonierungen wurde hochreine Plasmid-DNA mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep-Kits der Firma Qiagen oder des Spin Miniprep Kits der Firma Macherey-Nagel isoliert. Die Präparation erfolgte nach Herstellerangaben. Abweichend

vom Protokoll wurden stets 4 ml stationäre *E. coli*-Kultur eingesetzt und die DNA mit 35 µl Wasser eluiert.

5.5.3 DNA-Elution aus Agarosegelen

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

5.5.4 RNA-Extraktion aus Pflanzen

Die Methode kann dazu verwendet werden, aus demselben Pflanzenmaterial sowohl RNA als auch DNA und Proteine zu gewinnen (Chomczynski and Sacchi, 1987; Chomczynski, 1993). Die Methode basiert auf einer Phenol/Chloroform Extraktion, die die Tatsache ausnutzt, dass RNA sich besser in der hydrophilen, wässrigen Phase löst, während Chlorophyll und andere Bestandteile besser in der hydrophoben Chloroform-Phase gelöst werden. Die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer inhibieren RNAsen und verhindern damit eine Degradation der RNA. Die Fällung der RNA mit Isopropanol sowie den Salzen NaCl und Natriumcitrat dient der Einengung des Volumens. Nach dem Zerkleinern der Proben in der Schwingmühle unter flüssigem Stickstoff wurden pro 150 mg Material 1,3 ml Extraktionspuffer zugegeben. Die Proben wurden für 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Zufügen von 260 µl Chloroform und erneutem Schütteln wurden die Proben für 30-60 min bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Zu den 900 µl Überstand wurden 325 µl Fällungspuffer gegeben und invertiert. Nach Zugabe von 325 µl Isopropanol und 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Ansätze erneut zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde in 50 - 100 µl Wasser aufgenommen.

5.5.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrationsbestimmung wurde der GeneQuant II verwendet. Da die Absorption von Nukleinsäuren in einer wässrigen Lösung im UV-Bereich bei 260 nm gemessen werden kann, ließ sich durch Anwendung des Lambert-Beer Gesetzes die Konzentration der DNA oder RNA bestimmen. Das Absorptionsmaximum bei dieser Wellenlänge wird durch die Anregung des π -Elektronensystems in den Heterozyklen der Basen hervorgerufen. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht somit eine OD₂₆₀ von 1,0 einer Nukleinsäure-Konzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA 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 der Quotient aus der Absorption der Wellenlängen 260 / 280 nm als ein Maß für den Reinheitsgrad der DNA- oder RNA-Präparation darstellen. Der Reinheitsgrad sollte idealerweise zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Gemessen wurden 1:100 Verdünnungen der Präparationen, um den linearen Messbereich des Photometers einzuhalten.

5.5.6 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

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

5.5.7 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um das Ausbilden von Sekundärstrukturen zu verhindern. Die Elektrophorese mit 1 x MEN als Puffersystem fand in horizontalen, formaldehydhaltigen Agarosegelen (1 % (w/v) Agarose, 5,5 % (v/v) Formaldehyd) statt. Die Gele hatten eine Größe von 15 cm x 10 cm x 1 cm und besaßen entweder 15 Taschen mit 90 µl Probenvolumen oder 20 Taschen mit 60 µl Probenvolumen. Vor dem Auftragen wurden jeweils 20 µg der RNA mit RNase-freiem Wasser auf gleiche Volumina gebracht und mit 3 x RNA-Auftragspuffer 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 und 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.

5.6 Methoden zur Expressionsanalyse

5.6.1 Northern-Blot-Analyse

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

5.6.1.1 Kapillar-Blot

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

5.6.1.2 Radioaktive DNA-Fragmente für die Northern-Detektion

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

5.6.1.3 Hybridisierung der Membran

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

5.6.1.4 Waschen und Dokumentieren der Membran

Nach der Hybridisierung wurde die Membran standardmäßig einmal für 30 min mit Waschlösung I (2 fach SSC, 0,1 % (w/v) SDS) im Rotations-Hybridisierungssofen und einmal für 30 min mit Waschlösung II (1 fach SSC, 0,1 % (w/v) SDS) im Hybridisierungsschüttler bei 65°C gewaschen. Dieser Schritt wurde gegebenenfalls mit 300 ml Waschlösung II im Bellydancer™ wiederholt, bis der Filter eine Strahlung von 20-100 counts/s aufwies. Durch Waschschr itte 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, die Daten wurden mit dem Programm Basread ausgelesen. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die Programme TINA@2.0 benutzt. Eine Normalisierung der Signale wurde über den Vergleich mit der dokumentierten

Ethidiumbromidfärbung der RNA oder durch Hybridisierung mit einer DNA-Sonde für das Gen Aktin erzielt.

5.6.1.5 Rehybridisierung der Membran

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

5.6.2 Real-time RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg RNA eingesetzt, mit 20 pmol oligodT-primer und 200 pmol random-nonamer-primern versetzt und mit Wasser auf 12,5 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde zum Denaturieren für 10 min auf 70°C erhitzt, anschließend für 5 min auf Eis gestellt. 4 µl 5xFirst-Strang-Synthase-Puffer, 2 µl dNTPs (je 10 mM) und 1 µl RNase-Inhibitor (entsprechend 50 U) wurden zugegeben, bevor der Reaktionsansatz für 10 min auf 37°C erwärmt wurde. Anschließend wurden 0,5 µl (entsprechend 100 U) Reverse Transkriptase H zugegeben und die Reaktion für 70 min bei 42°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 70°C abgestoppt. Der cDNA-Ansatz wurde mit Wasser 1:10 verdünnt, von dieser Verdünnung wurde jeweils 1 µl zu dem Master-Mix gegeben (pro Ansatz 2,5 µl 10x PCR-Puffer Bioline; 2 mM MgCl₂; 100 µM dNTPs; 2,5 µl Primer-Mix (als QuantiTect Primer-Mix bei Qiagen erhältlich, Sequenz und Konzentration nicht bekannt); 0,1 fach Sybr Green; 10 nM Fluorescein; 0,25 U BioTaq DNA-Polymerase; mit Wasser auf 24 µl aufgefüllt). Nach 3 min primärer Denaturierung wurden 40 PCR- Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt: 20 sec 95°C Denaturierung; 20 sec 55°C Annealing; 40 sec 72°C Elongation. Jeweils während der Annealing- und der Elongationsphase jedes Zyklus wurde die Fluoreszenz gemessen. Anschließend erfolgte eine terminale Elongation für 4 min, nach der das PCR- Produkt für 1 min bei 95°C denaturiert wurde. Für 1 min erfolgte dann eine Renaturierung mit anschließender Schmelzkurven-Bestimmung, bei der die Temperatur in 0,5°C-Schritten bis auf 95°C erhöht wurde. Als Referenz wurde die Real-Time RT-PCR mit jeder cDNA, zusätzlich zu den dargestellten Primern, mit dem ebenfalls von Qiagen erhaltenen Primern für die *PP2A*-Untereinheit von *PDF2 (Atlg13320)* durchgeführt und mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode (Livak and Schmittgen, 2001) die relativen Transkript-Mengen bestimmt.

5.6.3 Transkriptomanalyse mit 'ARIZONA-Gesamtgenomarrays'

Die für die Transkriptomanalysen verwendeten Microarrays stammen von der Abteilung Pflanzenwissenschaften der Universität Arizona und wurden durch Spotten des für diesen Zweck von der Firma Operon käuflichen Oligonukleotid-Satzes „Arabidopsis Genome Oligo Set Version 3.0“ auf Glaträger erstellt. Die für die Hybridisierung dieser Microarrays verwendete RNA wurde zunächst mit dem Kit „Amino Allyl MessageAmp™

II aRNA Amplification Kit“ der Firma Ambion zu aRNA amplifiziert und dabei indirekt fluoreszenzmarkiert.

5.6.3.1 Amplifikation der eingesetzten RNA

Die Amplifikation der RNA wurde mit dem Kit der Firma Ambion im Wesentlichen nach Herstellerangaben, jedoch mit kleineren Ansätzen durchgeführt.

2,75 µl RNA (454,545 ng/µl) wurden mit 0,25 µl T7 Oligo(dT) Primer im PCR-tube für 10 min auf 70°C erhitzt, kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Für die reverse Transkription wurde ein Mastermix (0,5 µl 10x First strand buffer; 1 µl dNTP mix; 0,25 µl RNase Inhibitor; 0,25 µl Arrayscript Polymerase pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 2 µl zu den RNA-Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 2 h bei 42°C inkubiert.

Für die Zweitstrang-Synthese wurde ein Mastermix (15,75 µl RNase-freies Wasser; 2,5 µl 10x Second strand buffer; 1 µl dNTP mix; 0,5 µl DNA Polymerase; 0,25 µl RNase H pro Ansatz) angesetzt, davon jeweils 20 µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 2h bei 16°C inkubiert.

Die Proben wurden mit 75 µl RNase freiem Wasser aufgefüllt, die Aufreinigung der cDNA fand mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll statt. Die Elution der cDNA fand mit 2x 10 µl auf 55°C vorgewärmtem Wasser statt, und die eluierte cDNA wurde in der Vakuumentrifuge auf ein Volumen von 3,75 µl eingengt.

Für die *in vitro* Transkription wurde ein Mastermix (0,75 µl Aminoallyl-UTP; 1 µl ATP Lösung; 1 µl CTP Lösung; 1 µl GTP Lösung; 0,5 µl UTP Lösung; 1 µl 10x reaction buffer; 1 µl T7 Enzym Mix pro Ansatz) angesetzt, davon wurden jeweils 6,25 µl zu den Proben geben, durch Pipettieren gemischt und 16 h bei 37°C inkubiert.

Die Proben wurden mit 90 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die aRNA wurde mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der aRNA fand mit 2 mal 50 µl auf 60°C vorgewärmtem Wasser statt.

Die Konzentration der eluierten aRNA wurde mit dem Nanodrop gemessen, und Qualität der aRNA wurde im Bioanalyser getestet.

5.6.3.2 Indirekte Markierung der aRNA

Während der folgenden Arbeitsschritte wurden die Proben vor Licht geschützt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Für die indirekte Markierung wurden je 7,5 µg der Aminoallyl-aRNA auf ein Volumen von 14 µl gebracht und mit 2 µl 1 M Na₂CO₃ (pH9) und 4 µl Cy5 bzw. Cy3 für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Kupplungsreaktion wurde dann durch Zugabe von 35 µl 100 mM Natriumacetat (pH 5,2) gestoppt.

Die Proben wurden mit 45 µl RNase-freiem Wasser aufgefüllt und die fluoreszenzmarkierte aRNA wurde mit den dafür vorgesehenen Säulen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Elution der fluoreszenzmarkierten aRNA fand mit 2 mal 50 µl auf 60°C vorgewärmtem Wasser statt. Anschließend wurde am Nanodrop gemessen, wie viel pmol Fluorophore pro µl eingebaut wurden.

Je nach Ausbeute wurden für die Hybridisierung Proben mit 150-300 pmol Fluoreszenzfarbstoff eingesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass beide auf einen Array hybridisierte Proben gleichviel pmol Fluoreszenzfarbstoff enthielten. Die für einen Array

verwendeten Volumen Cy3 und Cy5 markierter aRNA wurden vereinigt, 1 μl polyA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 1 μl tRNA (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugeben, und das ganze wurde in einer Vakuumzentrifuge zur Trockne eingengt.

5.6.3.3 Hybridisierung der ARIZONA „whole genome arrays“

Vor der Verwendung wurden die ARIZONA „whole genome arrays“ „hydratisiert“, d.h. sie wurden dreimal kurz über ein 60°C Wasserbad gehalten, so dass ihre Oberfläche leicht beschlug. Dabei laufen die aufgrund von Pufferresten hygroskopischen Spots etwas auseinander, werden dadurch größer und lassen sich später besser auswerten. Anschließend wurden die Oligonukleotide durch Bestrahlung mit 120 Millijoule UV-Licht kovalent an die Oberfläche des Glaträgers gebunden.

Danach wurden die Arrays 4 Minuten mit 0,1 % SDS, 3 mal 2 Minuten mit H₂O (demin) und dann 30 Sekunden in 100 % Ethanol gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Die Vorhybridisierungslösung bestand aus 300 μl 20x SSC, 575 μl H₂O, 100 μl 10 % BSA und 25 μl 20 % SDS.

Zur Vorhybridisierung wurden 80 μl Vorhybridisierungslösung auf ein Deckglas geben, der Array umgedreht an das Deckglas gehalten und mit dem nun durch Adhäsion anhaftenden Deckglas angehoben. Anschließend wurde der Array mit Deckglas in die Hybridisierungskassette geschlossen und 1 h bei 42°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurden die getrocknete aRNA in 9 μl H₂O resuspendiert und 1 μl 10x fragmentation buffer wurde zugegeben. Dann wurde 15 min bei 70°C inkubiert und 1 μl fragmentation stop zugegeben.

Zu jeder Probe wurden 56,4 μl einer Hybridisierungslösung (350 μl Formamid; 210 μl 20x SSC; 70 μl 50X Denhardts; 17,5 μl 20 % SDS; 52,5 μl H₂O) geben, das ganze gevortext, 5 min auf 95°C erhitzt und 5 min bei 10.000g abzentrifugiert.

Die vorhybridisierten Glaträger wurden mit H₂O gewaschen, und die in der Hybridisierungslösung aufgenommene aRNA wurde dann zwischen Glaträger und einem darauf platzierten Liftslip laufengelassen. Der Glaträger mit Probe wurde in wasserdichte Hybridisierungsgefäße eingeschlossen und anschließend über Nacht bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Glaträger 5 min bei 37°C mit 0,5x SSC + 1 % SDS, 2x 5 Minuten bei RT mit 0,5x SSC + 1 % SDS, 4x 5 Minuten bei RT mit 0,5x SSC und 5 min bei RT mit 0,1x SSC gewaschen und anschließend durch Abzentrifugieren oder Abpusten getrocknet.

Das Auslesen der Fluoreszenzsignale sowie die Integration der erhaltenen Datensätze wurde von den Mitarbeitern des Transkriptomanalyselabors der Universität Göttingen übernommen.

6 Ergebnisse

6.1 Expressionsmuster der Terpensynthasegene *TPS4* und *AtGLS* in *Arabidopsis thaliana*

Pflanzen produzieren Sekundärmetabolite, um sich gegen biotischen und abiotischen Stress zu verteidigen. Eine Klasse der Sekundärmetabolite sind die Terpene, hydrophobe, aus Isopreneinheiten bestehende Moleküle (Trapp and Croteau, 2001). Terpene mit einem geringen Molekulargewicht werden als Volatile emittiert und können als chemische Signale in der Pflanzen-Insekten-Interaktion agieren. In der tritrophen Interaktion werden Parasitoide von einer Pflanze angelockt, die von dem Herbivoren befallen ist, der ihm als Nahrung dient (van Loon et al., 2000). Dabei können abhängig von der Art des Herbivors Unterschiede in dem Duftprofil auftreten. In Lima-Bohnen können unterschiedliche volatile Bouquets pharmakologisch induziert werden. JA induziert hauptsächlich die Emission von Monoterpenen, während OPDA- Akkumulation durch Alamechingabe zur Emission von zwei Homoterpenen führt (Koch et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation von zwei Terpensynthasegenen in *Arabidopsis thaliana* analysiert, einer Mono- und einer Diterpensynthase. Wenn die differentielle Induzierbarkeit dieser Terpensynthasen auch in *Arabidopsis thaliana* gegeben ist, können die Vorteile dieser Modellpflanze ausgenutzt werden, um die Mechanismen der Modulation der Antwort aufzuklären. Diese zwei Gene wurden ausgewählt, weil beide durch die Gabe von Alamechingin in abgeschnittenen Blättern induziert werden. Das *AtGLS*-Gen kodiert für eine Terpensynthase, die einen wichtigen Schritt für die Synthese des Terpens TMTT katalysiert, nämlich die Bildung von Geranylgeranyl-Diphosphat (GGPP) (Herde, 2006). Die Funktion des *TPS4*-Gens ist in dem Col-0 Ökotyp noch nicht beschrieben worden, jedoch wurde bisher in diesem Ökotyp stets eine Korrelation zwischen der Genexpression von *TPS4* und der Emission von alpha-Farnesen festgestellt (Dorothea Tholl, persönliche Kommunikation).

6.1.1 Fraß durch *Plutella xylostella* Larven induziert die Expression des *AtGLS*-Gens, nicht aber des *TPS4*-Gens

Untersuchungen in *Arabidopsis thaliana* haben gezeigt, dass der Elicitor Alamethicin aus dem Pilz *Trichoderma viridae* in der Lage ist, *AtGLS*-Transkription und Emission von TMTT zu induzieren (Herde, 2006). Alamethicin ist ein 20 Aminosäuren langes Peptid, das in der Zellmembran Kanäle formt, die für zweiwertige Kationen durchlässig sind (Brewer et al., 1987; Sansom, 1993; Cafiso, 1994). Die Wirkung von Alamethicin ist eventuell auf die Bildung dieser Kanäle zurückzuführen, da Veränderungen der Kationenkonzentration in der Zelle durch Elicitor-vermittelte Öffnung von Ionenkanälen zu einer Aktivierung von Abwehrgenen führen können (Hahlbrock et al., 1995; Jabs et al., 1997).

Ein weiterer Stimulus, der zu erhöhten Transkriptmengen von *AtGLS* sowie TMTT Emission führt, ist der Befall durch den Herbivoren *Plutella xylostella*.

Die Emission von alpha-Farnesen dagegen konnte nur in Alamethicin-behandelten Blättern festgestellt werden, nicht aber in dem Luftraum über den mit Raupen infizierten Pflanzen (Herde, 2006).

Um zu untersuchen, ob die Expression des *TPS4*-Gens mit der Farnesen-Emission korreliert, wurden Pflanzen mit Larven von *Plutella xylostella* infiziert und abgeschnittene Blätter über die Petiolen mit Alamethicinlösung induziert.

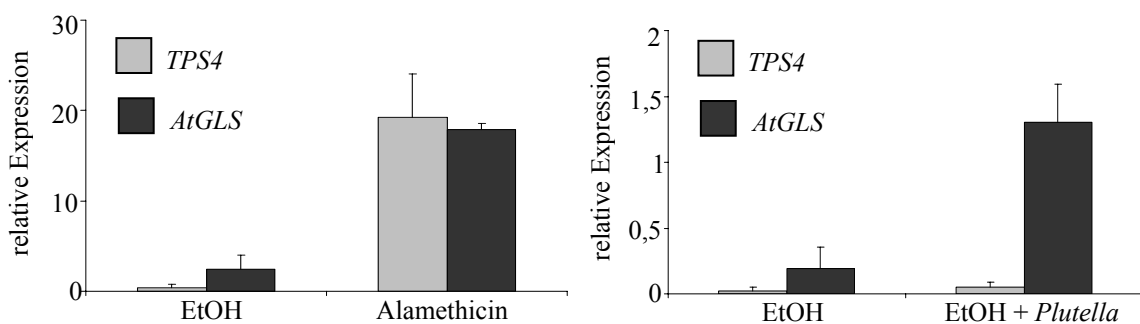


Abbildung 6.1-1: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene nach Induktion mit Alamethicin oder Fraß durch *Plutella xylostella* Larven durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden abgeschnittene Blätter von sieben Wochen alten, auf Hydroponik angezogenen Col-0 Pflanzen verwendet. Die Petiolen wurden entweder nur in hydroponische Lösung mit 0,1 % EtOH gestellt oder die Blätter zusätzlich mit Larven von *Plutella xylostella* besetzt oder in Alamethicinlösung (5 μ M) gestellt. 24 h nach der Behandlung wurde das Blattmaterial geerntet. Es wurden jeweils drei Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Es zeigt sich, dass die Expression des *TPS4*-Gens mit der Emission von alpha-Farnesen korreliert. Beide Terpensynthasegene werden durch die Gabe von Alamethicin in abgeschnittenen Blättern induziert. Es lässt sich weiterhin eine deutliche Induzierbarkeit des *AtGLS*-Gens durch Raupenbefall zeigen, während sich für das *TPS4*-Gen keine Steigerung der Transkriptmengen durch Raupenbefall im Vergleich zu abgeschnittenen Blättern zeigt. Die leichte Induktion, die man nachweisen kann, könnte nur der durch den Fraß verursachten Verwundung zuzuschreiben sein. Es stellt sich die Frage, ob die Raupen ein Signal produzieren, welches zur Induktion des *AtGLS*-Gens ausreicht, nicht aber zur Induktion des *TPS4*-Gens, also ein spezifisches Signal für das *TPS4*-Gen fehlt. Alternativ dazu besteht die Möglichkeit, dass Raupen zwar alle benötigten Signale generieren, gleichzeitig aber aktiv die Induktion des *TPS4*-Gens drücken können.

6.1.2 Eine funktionelle JA- Signalkaskade ist für die Induktion des *TPS4*-Transkriptes notwendig

Da das *AtGLS*-Transkript durch Alamethicin nur abhängig von einem funktionellen Oktadekanoidweg induzierbar ist, ist wahrscheinlich, dass zur Induktion des *TPS4*-Transkriptes mit Alamethicin ebenfalls ein funktioneller Oktadekanoidweg sowie eine funktionelle JA Signalkaskade benötigt werden. Um diese Hypothese zu testen, wurden zwei Mutanten im JA- Biosyntheseweg (*aos* und *acx1,5*) sowie eine Mutante in der JA-Signalkaskade (*coil-1*) mit Alamethicin induziert und mit Wildtyppflanzen verglichen. Die *aos*-Mutante (auch *dde2*) ist in der Synthese von Allenoxid inhibiert und kann deshalb weder OPDA noch JA bilden (Park et al., 2002; von Malek et al., 2002). Die *acx1,5*-Mutante ist im Oktadekanoidweg unterhalb von OPDA inhibiert, weshalb man mit ihr die von OPDA induzierten Effekte untersuchen kann (Schillmiller et al., 2007).

COI1 ist ein F-box-Protein, welches eine wichtige Rolle in der Induktion JA-responsiver Gene spielt (Feys et al., 1994; Xie et al., 1998; Devoto et al., 2002; Devoto et al., 2005). Kürzlich wurde herausgefunden, dass COI1 der Rezeptor für JA-ILE ist (Chini et al., 2007).

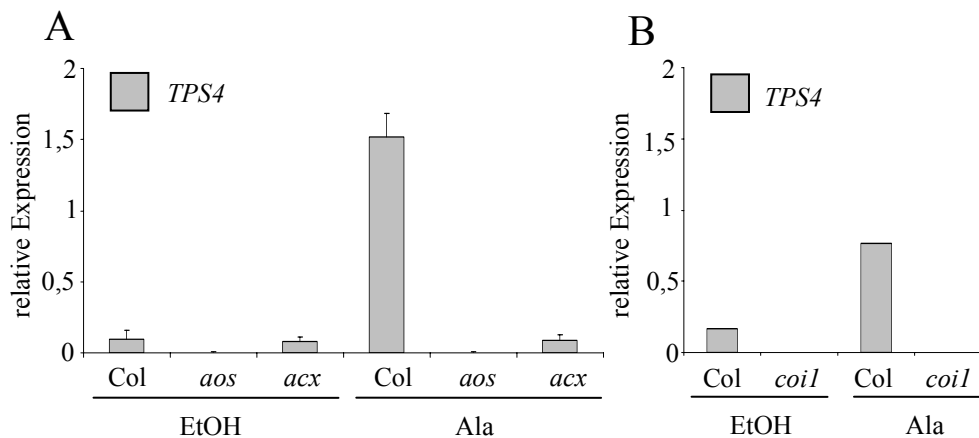


Abbildung 6.1-2: Vergleich der Expression von *TPS4*-Transkript nach Alamethicininduktion in Col-0 Pflanzen und Mutanten im Oktadekanoidweg durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden abgeschnittene Blätter von sechs Wochen alten, auf Erde angezogenen Col-0 Pflanzen sowie *aos*- und *acx1,5*- und *coi1*-Mutanten verwendet. Die Petiolen wurden für 24 h in Alamethicinlösung (5 µg/ml) oder EtOH (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle gestellt. Es wurden jeweils zehn Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten. Für das Experiment in den *coi1*-Mutanten sind die Ergebnisse einer Probe gezeigt.

Abbildung 6.1-2 zeigt, dass für *TPS4*-Induktion sowohl der Oktadekanoidsyntheseweg nicht unterbrochen sein darf als auch die JA-Signalkaskade über das COI- Protein benötigt wird. Da auch in der *acx1,5*-Mutante für beide Gene durch Alamethicin keine Induktion mehr erreicht werden kann, ist das notwendige Signal kein frühes Oktadekanoid, wie z.B. OPDA, sondern ein spätes, wie zum Beispiel Jasmonsäure oder eines ihrer Derivate.

6.1.3 SA-Biosynthese und Signalwege haben nur einen geringen Einfluss auf die Transkriptmengen der beiden Terpensynthesen

Viele Oktadekanoid-induzierbare Gene unterliegen der Beeinflussung durch andere Phytohormone. So sind zum Beispiel Gene wie *PDF1.2*, deren Expression abhängig von JA und Ethylen ist, gleichzeitig durch SA reprimierbar. Für die Repression von *PDF1.2*-Expression ist das NPR1-Protein notwendig (Spoel et al., 2003). Auch Terpensynthesen zeigen eine Beeinflussung durch mehrere Phytohormone. Für die TMTT-Emission wird in der Lima Bohne sowohl JA als auch SA benötigt (Engelberth et al., 2001).

Da Alamethicin sowohl zu erhöhten JA- als auch SA-Gehalten führt (Schulze, 2005), besteht die Möglichkeit, dass SA auch zur Induktion des *TPS4*-Gens benötigt wird. Der Einfluss von SA wurde deshalb auf die Induzierbarkeit des *TPS4*-Gens in SA-Synthese-

und SA-Signalwegmutanten untersucht. Die *sid2*-Mutante weist einen Defekt in der Isochorismatsynthese auf, weshalb diese Mutante nur sehr geringe Mengen an SA akkumuliert und sich gegenüber Pathogenen deutlich suszeptibler verhält (Nawrath and Metraux, 1999; Wildermuth et al., 2001). In der *nahG*-Transgenen wird SA zu Catechol umgewandelt, weshalb die meisten SA-induzierbaren Gene in diesen Pflanzen nicht mehr exprimiert werden (Gaffney et al., 1993; Lawton et al., 1995). Als drittes wurde die *npr1*-Mutante verwendet, die einen Defekt in der SA-Signalkaskade aufweist, da das NPR1 Protein für die Expression SA-induzierbarer Gene benötigt wird (Cao et al., 1994).

Für das *AtGLS*-Gen konnte bereits gezeigt werden, dass SA keinen drückenden Effekt auf die Induktion hat und kein Einfluss durch Ethylen besteht. Deshalb wäre durch Ethylen oder SA eine differenzielle Induktion der beiden Terpensynthasegene möglich. Aus diesem Grund wurde auch der Effekt von Ethylen auf das *TPS4*-Transkript nach Alamethicingabe in Col-0 WT-Pflanzen und Ethylen insensitiven *ein2*-Mutanten (Guzman and Ecker, 1990) über die Petiolen untersucht.

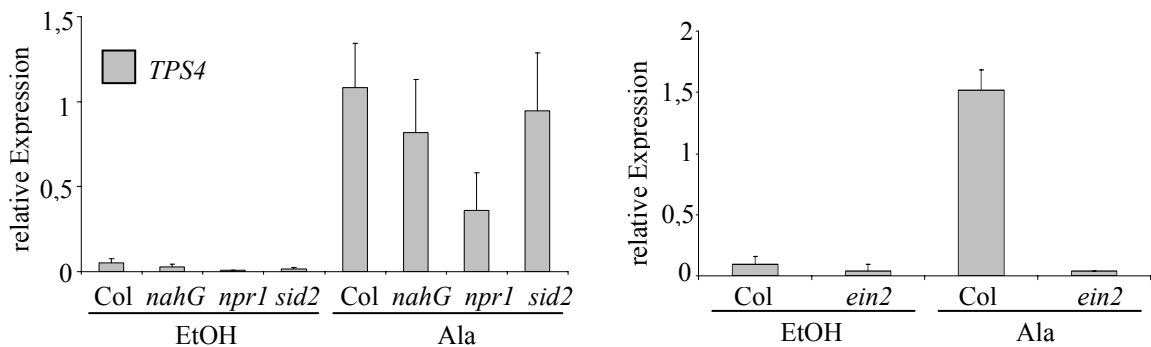


Abbildung 6.1-3: Vergleich der Expression von *TPS4*-Transkript nach Alamethicininduktion in Col-0 Pflanzen und Pflanzen mit verändertem SA-Gehalt sowie Mutanten im SA- und ET-Signalweg durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden abgeschnittene Blätter von sechs Wochen alten, auf Erde angezogenen Col-0 Pflanzen sowie *npr1*-, *sid2*- und *ein2*-Mutanten sowie *NahG*-Transgenen verwendet. Die Petiolen wurden für 24 h in Alamethicinlösung (5 µg/ml) oder EtOH (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle gestellt. Es wurden jeweils zehn Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Auf die Induktion des *TPS4*-Transkripts durch Alamethicin hat der verminderte Gehalt an SA in der *sid2*-Mutante keinen Einfluss, das Transkript ist gleich stark induzierbar wie im Wildtyp (Abbildung 6.1-3). Ein ähnliches Ergebnis erhält man für die *nahG*-Transgene, *TPS4*-Expression ist auch in dieser Pflanze gegenüber dem Wildtyp nicht verändert, was

darauf schließen lässt, dass SA weder einen negativen noch einen positiven Einfluss auf Transkription der *TPS4* hat. Für *TPS4* zeigt sich eine geringere Alamethicin-Induzierbarkeit in der *npr1*-Mutante, da jedoch weder *sid2* noch *nahG* einen Einfluss auf *TPS4*-Transkript hatten, scheint dieser Einfluss SA-unabhängig zu sein.

Im Gegensatz zu SA lässt sich durch inhibierte Ethylen-Signalwege eine deutliche Beeinflussung der *TPS4*-Induzierbarkeit in den *ein2*-Mutanten erkennen. *ein2*-Mutanten sind ebenso wenig in der Lage, *TPS4*-Transkript zu akkumulieren, wie die verwendeten Mutanten im Oktadekanoidweg (Abbildung 6.1-2), was einen deutlichen Unterschied zur Expression des *AtGLS*-Gens und damit einen möglichen Mechanismus für differentielle Induktion der beiden Gene unter den entsprechenden Bedingungen darstellt.

Es ist möglich, dass *P. xylostella* Larven über einen anderen Mechanismus Genexpression induzieren als Alamethicin. Eventuell können sie über eines der Phytohormone einen reprimierenden Einfluss auf *TPS4*-Transkription ausüben. Deshalb wurde die Induktion durch *P. xylostella* in Col-0 Pflanzen mit der in Mutanten in diversen Phytohormon-Biosynthese- und Signalkaskademutanten verglichen. Zusätzlich zu den in Abbildung 6.1-2 und Abbildung 6.1-3 verwendeten Mutanten wurde hier noch die in der Abzinsäure(ABA)- Biosynthesemutante *aa03* (Seo et al., 2003) verwendet, um einen möglichen hemmenden Einfluss von ABA auf die *TPS4*-Transkription untersuchen zu können.

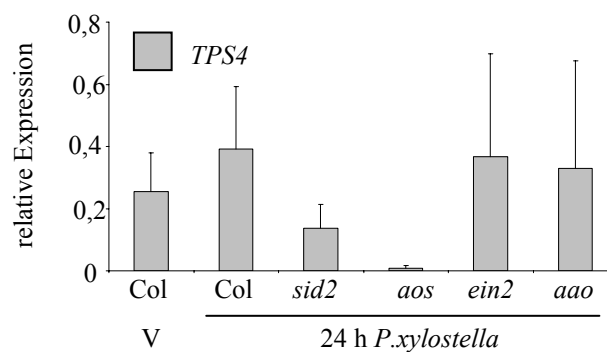


Abbildung 6.1-4: Vergleich der Expression von *TPS4*-Transkript nach *P. xylostella*-Fraß in Col-0 Pflanzen und Pflanzen mit verändertem SA-, JA- oder ABA-Gehalt sowie Mutanten im ET-Signalweg durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, auf Hydroponik angezogene Col-0 Pflanzen sowie die angegebenen Mutanten verwendet. Einige Col-0 Pflanzen wurden an jedem zweiten Blatt mit einer Pinzette gequetscht, um die Induktion durch Verwundung (V) mit der durch Raupenfraß vergleichen zu können. Die anderen Pflanzen wurden mit ca. je fünf *P. xylostella* Larven besetzt. Nach 24 h wurden die gesamten Rosetten geerntet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von jeweils drei biologischen Replikaten.

Wie man in Abbildung 6.1-4 erkennen kann, wirkt *P. xylostella* Fraß auf das *TPS4*-Transkript weder in Col-0 Pflanzen noch in einer der verwendeten Mutanten stärker induzierend als Verwundung. Im Vergleich zur Induktion durch Alamethicin führt Verwundung nur zu einer marginalen Induktion von *TPS4* (vergleiche hierzu Kapitel 6.1.9), deshalb können die mit *P. xylostella* behandelten Pflanzen (Col-0 und Mutanten) als nur sehr schwach induziert betrachtet werden, was in Übereinstimmung mit den in Abbildung 6.1-1 gezeigten Ergebnissen ist.

Sofern *P. xylostella* in der Lage ist, die Expression des *TPS4*-Gens zu unterdrücken, erfolgt diese Repression unabhängig von SA, ET oder ABA. Gleichzeitig sieht man, dass für die schwache Induktion durch Verwundung vermutlich nur der Oktadekanoidweg benötigt wird, da nur die *aos*-Mutante stark reduzierte Transkriptmengen im Vergleich zu Col-0 aufweist.

6.1.4 Exogene Gabe von Jasmonsäure führt nicht zu effizienter Induktion des *TPS4*- und des *AtGLS*-Transkripts

Das Ergebnis, dass für die Induktion der Terpensynthesen JA-Bildung als auch JA-Signalwege benötigt werden, legt nahe, dass das benötigte Signal Jasmonsäure oder eines ihrer Derivate ist. Methyljasmonat ist ein volatiles JA-Konjugat, welches in *Arabidopsis* auch endogen gebildet werden kann (Seo et al., 2001). Weiterhin besitzt *Arabidopsis* auch Esterasen, die den Methylester wieder in die freie Jasmonsäure umwandeln, so dass anstatt von Jasmonsäure auch Methyljasmonat zur Induktion verwendet werden kann (Stuhlfelder et al., 2004; Han et al., 2006). Da Methyljasmonat über den Luftraum appliziert werden kann, ist dies eine sehr wenig invasive Methode der Induktion. Um zu testen, ob das Vorhandensein von JA zur Induktion der Terpensynthesen ausreicht, wurden auf Erde angezogene Pflanzen mit Methyljasmonat in geschlossenen Gläsern inkubiert. Das Methyljasmonat wurde auf der Innenseite der Deckel der Gläser appliziert, so dass die Induktion mit dieser flüchtigen Substanz über den Luftraum stattfand. Als Kontrolle für die Induktion wurde in der Real-time-RT-PCR zusätzlich zu den Terpensynthesen das Transkript von *VSP2*, einem typischen JA-induzierbaren Gen, analysiert.

Da für effiziente *TPS4*-Induktion durch Alamethicin Ethylensignalwege benötigt werden, wurden die Pflanzen in einem weiteren Experiment zusätzlich mit ACC, einer Ethylenvorstufe, induziert. ACC (50 µg/ml) wurde dabei direkt auf die Blätter gesprüht,

bis diese gut benetzt waren. Als Kontrolle für die Induktion mit ACC wurde *PR4* als typischer JA/Ethylenmarker verwendet.

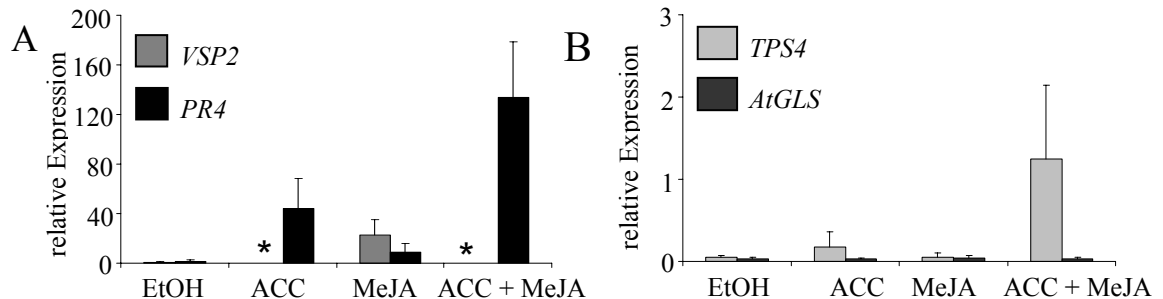


Abbildung 6.1-5: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene und der Gene *VSP2* und *PR4* nach Induktion mit MeJA, mit ACC oder mit einer Kombination aus beidem durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sechs Wochen alte, auf Erde angezogene Col-0 Pflanzen verwendet, die in geschlossenen Gläsern für 24 h mit 10 µl MeJA (100µM), ACC (50 µg/ml) oder einer Kombination aus beiden induziert wurden, als Kontrolle wurden die Pflanzen mit 0,1 % iger Ethanollösung behandelt. Aufgrund der verschiedenen Skalierung ist die Expression der Gene *PR4* und *VSP2* in A dargestellt, während die Expression von *TPS4* und *AtGLS* in den gleichen Proben in B gezeigt ist. Ein * markiert, dass die Expression des betreffenden Gens in der markierten Probe nicht untersucht wurde. Es wurden jeweils 5 Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Die *VSP2*-Induktion zeigt, dass die Induktion mit MeJA für ein typisches JA-induzierbares Gen ausreicht, während weder das *TPS4*- noch das *AtGLS*-Gen durch die Gabe von MeJA eine Induktion zeigt. Die kombinierte Gabe von ACC und MeJA hat keinen Einfluss auf die Expression des *AtGLS*-Gens. Dagegen wirkt die Kombination aus ACC und MeJA aber induzierend auf *TPS4*-Transkription.

6.1.5 *TPS4* ist durch den Elicitor Alamethicin induzierbar, benötigt aber zusätzlich einen Verwundungsstimulus

Duftmessungen nach Alamethicingabe lassen vermuten, dass für die Induktion des *TPS4*-Gens zusätzlich noch ein Verwundungsreiz benötigt wird, da Alamethicingabe über die Petiolen in abgeschnittenen Blättern zur Emission von alpha-Farnesen führt, Gabe über die Wurzeln intakter hydroponisch angezogener Pflanzen jedoch nicht.

Um diese Hypothese zu testen wurden hydroponisch angezogene Pflanzen über die Wurzel mit Alamethicin induziert, ohne die Pflanzen zu verwunden oder nachdem die Hälfte der Blättern mit einer Pinzette quer zur Blattmittelrippe verletzt wurden. Zum Vergleich mit den Duftdaten wurden einzelne Blätter mit ihren Petiolen in Alamethicinlösung gestellt.

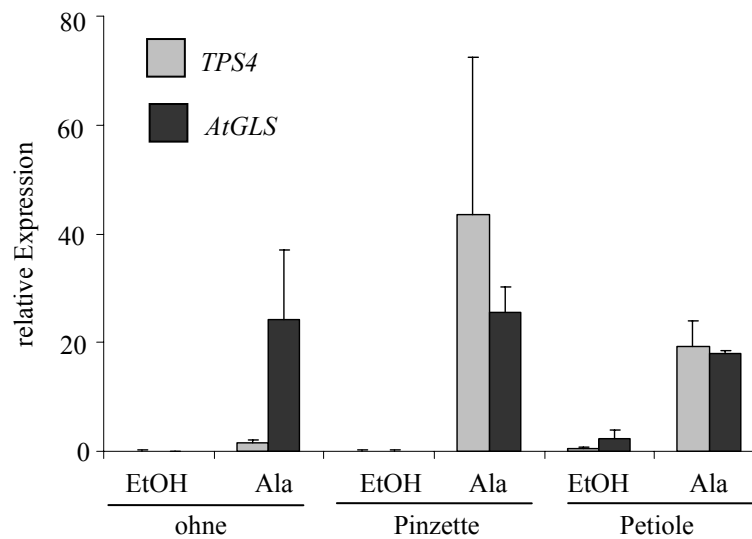


Abbildung 6.1-6: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene nach Induktion mit Alamethicin in Kombination mit verschiedenen Arten der Verwundung durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogenen Col-0 Pflanzen verwendet. Entweder wurden die unverletzten Pflanzen über die Wurzeln mit 5 μg/ml Alamethicin induziert (ohne), oder die Pflanzen wurden vorher an ca. jedem zweiten Blatt mit einer Pinzette quer über die Blattfläche gequetscht (Pinzette), oder aber es wurden Blätter abgeschnitten und über die Petiolen mit Alamethicin induziert (Petiole). Als Kontrolle wurde die Alamethicinlösung durch 0,1 %ige Ethanollösung bei gleicher Behandlung der Pflanzen ersetzt. Nach 24 h wurde das Blattmaterial geerntet, für das Experiment mit Petiolen wurden jeweils 2-3 Blätter vereint, für die über die Wurzel gefütterten Pflanzen wurden die gesamten Rosetten verarbeitet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung zweier biologischer Replikate.

Wie man in Abbildung 6.1-6 erkennen kann, führt Alamethicingabe nur in Verbindung mit einer Verwundung der Blätter zur Induktion des *TPS4*-Gens. Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob das Alamethicin über die Wurzeln oder direkt über die Petiolen aufgenommen wurde.

Da Alamethicin selbst zu erhöhten Jasmonatgehalten (Schulze, 2005) in der Pflanze führt, kann es nicht der JA-Anteil der Wundantwort sein, der zur Induktion von *TPS4* zusätzlich benötigt wird. Ein weiteres Phytohormon, welches an der Wundantwort beteiligt ist und deshalb ein guter Kandidat zur Induktion des *TPS4*-Gens ist, ist Ethylen (Enyedi et al., 1992). Die Behandlung mit Ethylen führt oft zur Induktion von Genen, die auch durch Verwundung induziert werden (Ecker and Davis, 1987), außerdem wurde in Abbildung 6.1-5 gezeigt, dass nach gemeinsamer Applikation von ACC und MeJA die Gehalte an *TPS4*-Transkript durch zusätzliche Verletzung nicht mehr verändert werden können.

Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass Ethylen die Komponente der Wundantwort ist, die für die Induktion des *TPS4*-Transkripts benötigt wird.

Untersucht man die Kinetik der *TPS4*-Induktion durch Alamethicin, fällt auf (Abbildung 6.1-7), dass das *TPS4*-Transkript deutlich später als *AtGLS* induzierbar ist, was darauf hinweisen könnte, dass es sich bei *TPS4* im Gegensatz zur *AtGLS* um ein sekundäres Gen handelt, welches zu seiner Induktion Proteinbiosynthese benötigt.

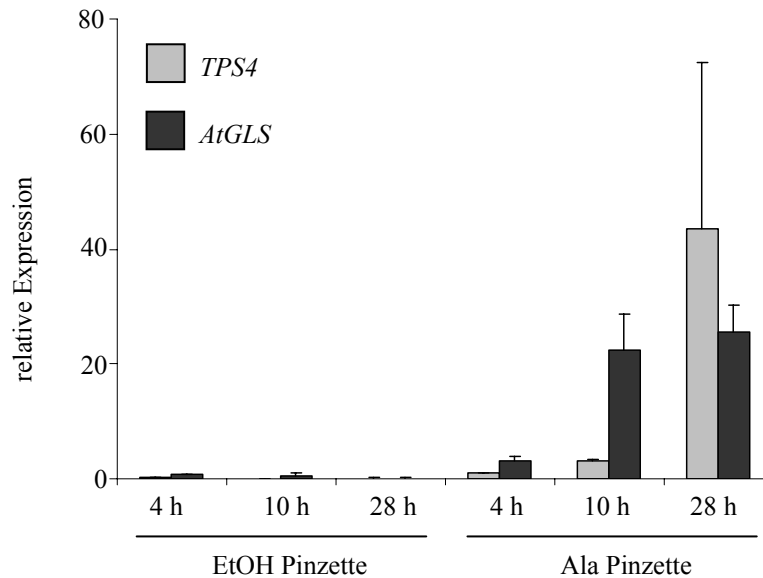


Abbildung 6.1-7: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene nach unterschiedlich langer Induktion mit Alamethicin in Kombination mit Verwundung durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen verwendet, die für die angegebenen Zeiträume mit 5 µg/ml Alamethicinlösung über die Wurzeln induziert wurden. Kontrollpflanzen wurden mit 0,1 %iger Ethanollösung induziert. Zusätzlich wurde die Hälfte der Blätter quer über die Blattfläche mit einer Pinzette gequetscht. Es wurden jeweils die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

6.1.6 Pseudomonaden induzieren die Transkriptakkumulation beider Terpensynthasen

Das synthetische JA-Derivat Coronalon ist ein starker Induktor für *AtGLS*-Expression (Schuler et al., 2004). Coronalon hat eine strukturelle Ähnlichkeit zu Coronatin, welches als Virulenzfaktor in Pseudomonaden produziert wird, unter anderem, um ein Schließen der Stomata zu verhindern und über den SA-JA-*crosstalk* die SA-Antwort der Pflanze zu unterdrücken (Brooks et al., 2005; Melotto et al., 2006; Schulze-Lefert and Robatzek, 2006; Thilmony et al., 2006). Des Weiteren ergaben die Auswertungen von öffentlich

zugänglichen Transkriptomanalysen (Quelle: <https://www.genevestigator.ethz.ch/at>), dass eine Induktion von *AtGLS*-Transkript nach Pseudomonadeninfektion festgestellt werden kann. Um herauszufinden, ob der Befall mit den Pseudomonaden oder nur das von ihnen produzierte Coronatin zur Induktion führt, wurden *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit zwei verschiedenen Pseudomonadenstämmen infiziert, die sich in ihrer Fähigkeit, Coronatin zu produzieren, unterscheiden. Die verwendeten Stämme waren der Wildtypstamm *P. syringae* DC3000 sowie die Mutante *P. syringae* DC3000 *cmaA/cfa6*, die beide Coronatinvorstufen nicht mehr synthetisiert (Brooks et al., 2004). Um eine Infektion der Pflanzen zu ermöglichen, wurden die Pseudomonaden in die Blätter infiltriert.

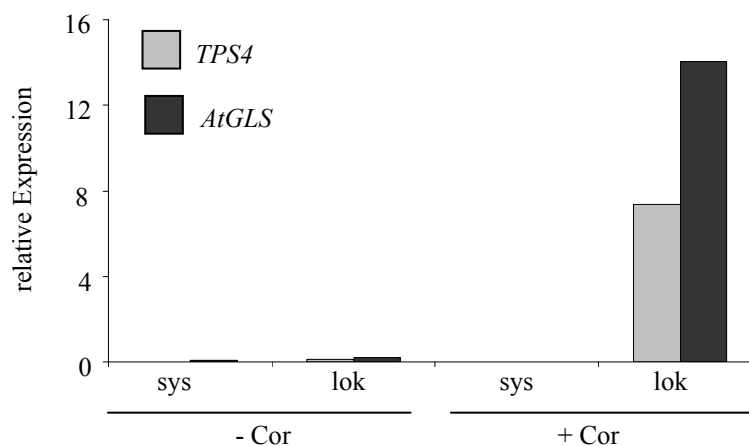


Abbildung 6.1-8: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene nach Infiltration von verschiedenen *Pseudomonas syringae* Stämmen durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sechs Wochen alte, auf Erde angezogenen Col-0 Pflanzen verwendet, in deren Blätter jeweils ca. 10 µl des Wildtypstamms *Pseudomonas syringae* DC 3000 (+ COR) oder des Coronatin-defizienten Stamms *Pseudomonas syringae* DC 3000 *cmaA cfa6* (- COR) mit einer OD von 0,05 infiltriert wurden. Jeweils drei Blätter wurden 48 Stunden nach Infektion getrennt nach systemischen und lokalen Blättern geerntet.

Wie man deutlich erkennen kann, induziert nur der Stamm die Expression der beiden Terpensynthasegene, der in der Lage ist, Coronatin zu produzieren. Die Induktion ist für beide Terpensynthasen nur in den lokal infiltrierten Blättern nachweisbar, das heißt, dass Coronatin weder ein mobiles Signal ist, noch zur Bildung eines mobilen Signals führt. Coronatin in Kombination mit Pseudomonadenbefall ist also ausreichend, die Expression beider Terpensynthasegene zu induzieren.

6.1.7 Jasmonsäurekonjugate induzieren die Expression beider Terpensynthesen

Mehrere wissenschaftliche Arbeiten aus den letzten Monaten legen nahe, dass viele JA-induzierbare Prozesse letztlich auf das aktive JA-Derivat JA-ILE zurückzuführen sind. So ist zum Beispiel das COI1-Protein nur in Gegenwart von JA-ILE in der Lage, zum Abbau des JAZ1-Repressors zu führen und damit JA-Signalwege zu aktivieren, Methyljasmonat oder Jasmonsäure selbst können diese Aufgabe nicht erfüllen (Thines et al., 2007). In dieser Arbeit wurde bisher gezeigt, dass Coronatin, ein JA-ILE ähnliches, von Pseudomonaden synthetisiertes JA-Derivat, in der Lage ist, Transkription der Terpensynthesen zu aktivieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das synthetische JA-Derivat Coronalon, welches dem Coronatin strukturell nachempfunden wurde, zur Induktion von *AtGLS* führt (Herde, 2006). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu JA-ILE ist davon auszugehen, dass für die Induktion der Terpensynthesen JA-ILE als Signal benötigt wird. Anders als für *VSP2* reicht die Begasung mit MeJA nicht aus, um die Terpensynthesen zu induzieren. Die Frage, die sich stellt ist, ob es Unterschiede in der Qualität des JA-Signals gibt, das heißt für einige Prozesse wie *VSP2*-Induktion reicht JA-ILE für die Induktion aus, während für andere besondere JA-Derivate benötigt werden, oder ob es einen quantitativen Unterschied gibt, das heißt JA-ILE ist das einzig wirksame Oktadekanoid, es werden nur je nach Gen unterschiedliche Mengen benötigt, um induzierend zu wirken.

Um das zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an Jasmonsäure und JA-Derivaten über die Wurzel hydroponisch angezogener Pflanzen gegeben und die Genexpression von *AtGLS*, *TPS4* und *VSP2* verglichen.

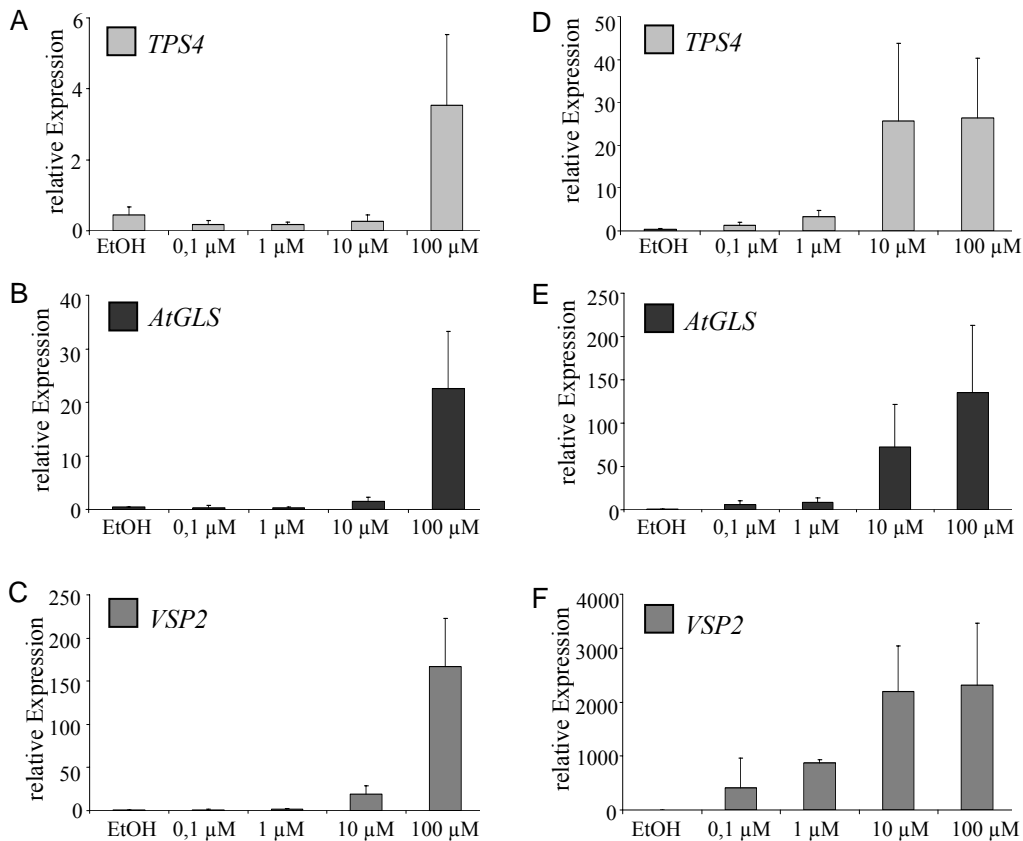


Abbildung 6.1-9: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene und des *VSP2*-Gens nach Induktion mit Coronalon bzw. Coronatin durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen verwendet, die über die Wurzeln mit (A-C) Coronalon- bzw. (D-F) Coronatinlösung mit den angegebenen Konzentrationen für 24 h induziert wurden. Als Kontrolle wurden die Pflanzen mit einer 0,1 %igen Ethanollösung induziert. Es wurden die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei biologischen Replikaten.

Aus Abbildung 6.1-9 lässt sich klar erkennen, dass alle drei Gene sehr gut durch Coronatin induzierbar sind. Für *TPS4* und *VSP2* ist die maximale Expression schon bei 10 µM Coronatinlösung erreicht, während für die *AtGLS* 100 µM Coronatin noch zu einer stärkeren Induktion führen. *VSP2* und *TPS4* sind also ein wenig sensitiver gegenüber Coronatin als die *AtGLS*.

Für Coronalon dagegen scheinen alle drei Gene eine etwa gleich hohe Sensitivität zu besitzen.

In einem weiteren Experiment wurde die Effektivität der Induktoren JA, JA-ILE und Coronatin verglichen. Um eine Aktivierung des Oktadekanoidweges durch einen positiven *feed-back-loop* zu verhindern, wurde das Experiment diesmal in der *aos*-Mutante durchgeführt, so dass nur der Effekt des exogen applizierten Induktors beurteilt werden kann.

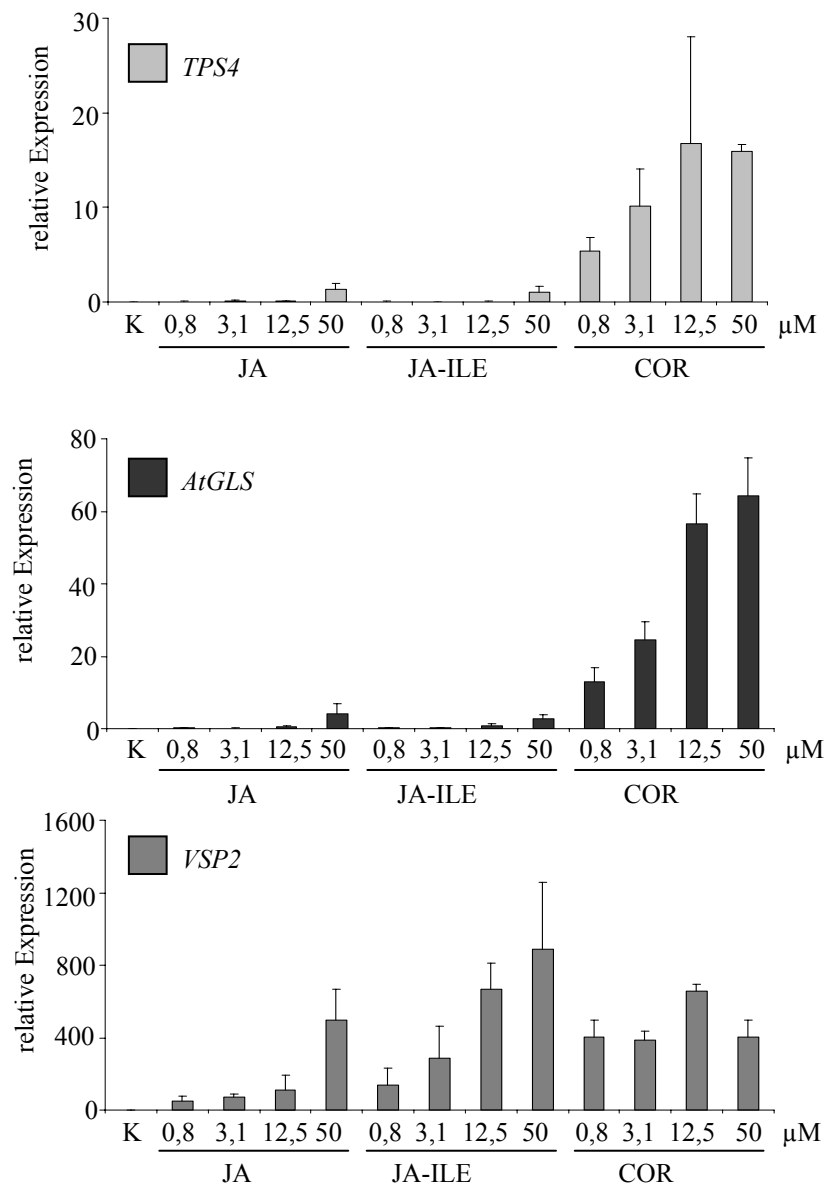


Abbildung 6.1-10: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene und des *VSP2*-Gens nach Induktion mit JA, JA-ILE bzw. Coronatin durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden Blätter von sechs Wochen alten, auf Erde angezogenen *aos*-Mutanten verwendet. Die Petiolen wurden für 24 h in die Lösungen (COR: Coronatinlösung) mit den angegebenen Konzentrationen gestellt. Als Kontrolle (K) wurden die Petiolen mit einer 0,1 %igen Ethanollösung induziert. Es wurden jeweils vier Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Es ist deutlich zu erkennen, dass *VSP2* sehr gut durch JA und JA-ILE induziert werden kann. Vermutlich wird das applizierte JA in der Pflanze zu dem aktiven Derivat JA-ILE umgesetzt. Coronatin ist ebenfalls ein guter Induktor der *VSP2*-Transkription, ist jedoch nicht effektiver als die Induktion mit 12,5 μ M JA-ILE. Für die beiden Terpensynthasegene dagegen sind weder JA noch JA-ILE gute Induktoren, selbst mit 50 μ M von einer der beiden Substanzen ist die Induktion geringer als mit der niedrigsten

Coronatinkonzentration 0,8 μM . Es ist möglich, dass Coronatin von den Pflanzen schlechter abgebaut werden kann als das endogene JA-ILE und deshalb länger in den Zellen vorliegt und dadurch stärker induzierend wirkt. Das *VSP2*-Gen könnte einfach sensitiver reagieren, und schon bei geringeren Induktormengen gut induziert werden. Mit 50 μM Coronatin wird aber für das *VSP2*-Gen eine schlechtere Induktion erreicht, als mit 50 μM JA-ILE. Für die Terpensynthasegene kehrt sich dieses Verhältnis um, hier ist schon 0,8 μM Coronatin effektiver als 50 μM JA-ILE. Diese Beobachtung legt nahe, dass Coronatin und JA-ILE auch einen qualitativen Unterschied zeigen, Coronatin ist der bessere Induktor für die beiden Terpensynthasen, JA-ILE ist dagegen effektiver in der Induktion des *VSP2*-Gens. Eventuell wird also durch Alamethicininduktion nicht das bezüglich der Expression von Terpensynthasegenen relativ ineffektive JA-ILE, sondern ein strukturell dem Coronatin näher verwandtes JA-Derivat gebildet.

In Abbildung 6.1-9 ist zu erkennen, dass *TPS4*-Transkript durch Coronalon und Coronatin auch ohne Verwundung der Blätter induziert werden kann. Daraus lassen sich zwei verschiedene Hypothesen aufstellen: Entweder induziert die Behandlung mit den beiden Induktoren die Ethylenbiosynthese oder Ethylensignalwege, oder aber die beiden Substanzen benötigen für die Induktion der *TPS4*-Expression kein Ethylen, was dann einen Unterschied zur Induktion durch Alamethicin darstellen würde.

Um zu untersuchen, ob Ethylensignalwege durch Coronatin induziert werden, wurde die Expression der beiden Gene *PDF1.2* und *PR4* in Coronatin-behandelten Proben untersucht.

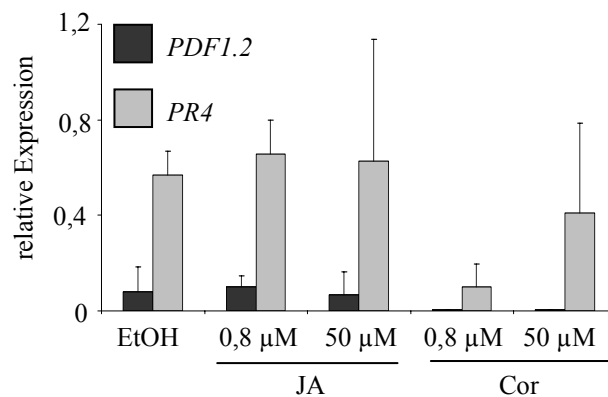


Abbildung 6.1-11: Vergleich der Transkriptmengen des *PDF1.2*- und des *PR4*-Gens nach Induktion mit JA, JA-ILE bzw. Coronatin durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden Blätter von sechs Wochen alten, auf Erde angezogenen *aos*-Mutanten verwendet. Die Petiolen wurden in die Lösungen (COR: Coronatinlösung) mit den angegebenen Konzentrationen gestellt. Als Kontrolle wurden die Petiolen mit einer 0,1 %igen Ethanolösung induziert. Es wurden jeweils vier Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

Abbildung 6.1-11 zeigt, dass weder *PDF1.2* noch *PR4* durch Behandlung mit Coronatin induziert wird. Entweder reagieren diese beiden Gene mit einer anderen Kinetik als *TPS4* auf die Behandlung mit Coronatin, oder aber es sind weder Ethylenbiosynthese noch – Signalwege induziert worden. Eventuell wirkt Coronatin auf *TPS4*-Expression also über einen Ethylen-unabhängigen Signalweg.

6.1.8 Einfluss von JAR1 auf die Induzierbarkeit der beiden Terpensynthesen

Für viele Jasmonat-induzierbare Gene wurde herausgefunden, dass sie durch das JA-Derivat JA-ILE induziert werden. Für die Synthese von JA-ILE wird das Enzym JAR1 benötigt, welches Aminosäuren an Jasmonsäure konjugiert. In der *jar1* Mutante sind die JA-ILE-Gehalte in ungestressten Pflanzen auf ca. 18% des Wildtypniveaus reduziert, was sich in der Induzierbarkeit JA-ILE abhängiger Gene nach Gabe von MeJA widerspiegelt (Staswick and Tiryaki, 2004). Aus diesem Grund wurde die Induzierbarkeit der beiden Terpensynthesen in der *jar1*-Mutante mit der im Wildtyp Col-0 verglichen. Dafür wurden die Pflanzen mit Alamethicin induziert und verletzt, um bestmögliche Bedingungen für die *TPS4*-Induktion zu haben. Als Kontrolle wurden die Transkriptmengen von *VSP2* bestimmt.

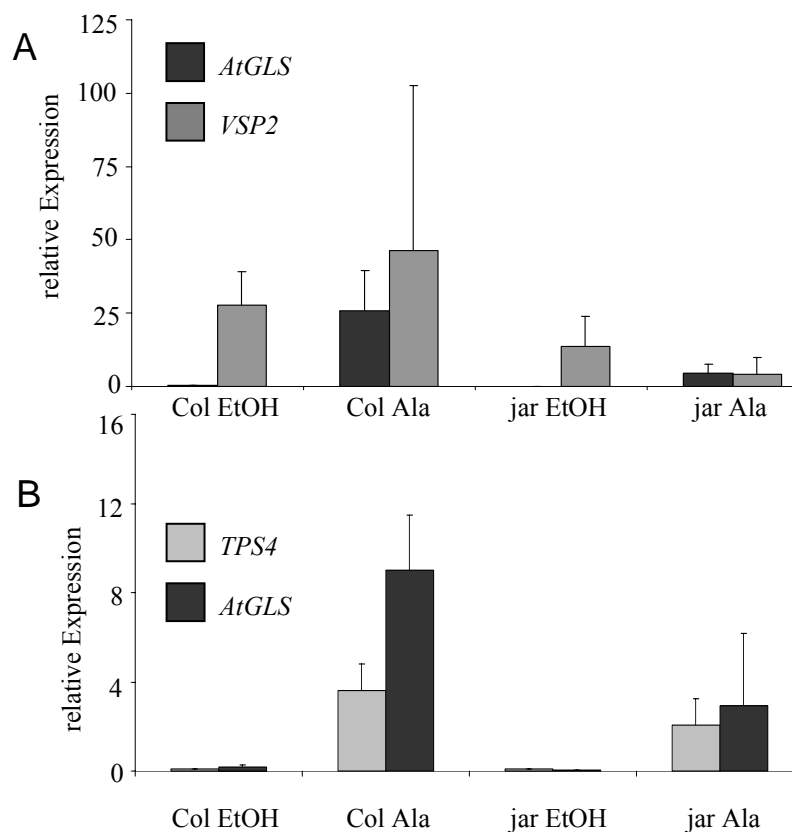


Abbildung 6.1-12: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene und des *VSP2*-Gens nach Induktion mit Alamethicin in Col-0 Pflanzen und *jar1*-Mutanten durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen und *jar1*-Mutanten verwendet. Die Pflanzen wurden über die Wurzeln für 24 h mit Alamethicin (5 µg/ml) induziert, als Kontrolle wurde eine 0,1 %ige Ethanollösung verwendet. Zusätzlich wurde ca. jedes zweite Blatt quer zur Blattfläche mit einer Pinzette gequetscht. Es wurden die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind in Abbildung B jeweils Mittelwert und Standardabweichung von mindestens 2 biologischen Replikaten (EtOH Behandlung) bzw. mindestens vier biologischen Replikaten (Ala Behandlung). Für Abbildung A wurde ca. die doppelte Anzahl an biologischen Replikaten aus demselben Experiment verwendet.

Wie man in Abbildung 6.1-12 erkennen kann, ist die Induzierbarkeit beider Terpensynthasen und von *VSP2* durch Alamethicin in der *jar1*-Mutante reduziert. Dabei sind die beiden Terpensynthasegene noch exprimiert, wobei nicht unterschieden werden kann, ob ein anderes Jasmonsäurederivat induzierend wirkt oder aber die noch in der *jar1*-Mutante vorhandenen JA-ILE-Mengen für die Induktion verantwortlich sind. *VSP2* wird sogar in der *jar1*-Mutante durch Alamethicin gedrückt, was vermutlich daran liegt, dass in dieser Mutante der SA drückende Einfluss auf die *VSP2*-Expression stärker ist als die Induktion durch die geringen Mengen an JA-ILE.

6.1.9 Verwundung führt zur lokalen Akkumulation von *AtGLS*- und *TPS4*-Transkript

Bei Verwundung entstehen an den Wundrändern hohe Mengen an JA und JA-Derivaten, wie zum Beispiel JA-ILE (Suza et al., 2008). Promotor-GUS-Fusionen zeigen, dass der *AtGLS*-Promotor an den Verwundungsrändern induziert wird, jedoch konnte bisher an Wundrändern weder *AtGLS* Transkript nachgewiesen werden noch konnte nach Verwundung TMTT im Luftraum über den Pflanzen gemessen werden (Herde, 2006).

Da in einem GUS-Assay die Proteine über einen längeren Zeitraum stabil bleiben, sollte in einem Experiment mit mehreren Zeitpunkten geprüft werden, ob und wann *AtGLS* Transkript nach Verwundung nachweisbar ist. Dabei wurden hydroponisch angezogene Pflanzen verwendet, da sie einen besonders geringen Hintergrund an *VSP2* Expression haben, dessen Transkriptmengen als Kontrolle für ein wundinduzierbares Gen bestimmt wurden. Mit einer Pinzette wurden jeweils große Bereiche der Blätter quer zur Hauptblattader gequetscht, und es wurden nach den angegebenen Zeitpunkten jeweils die gequetschten Bereiche und der Bereich bis zu 3 mm um die Verwundungsstellen geerntet.

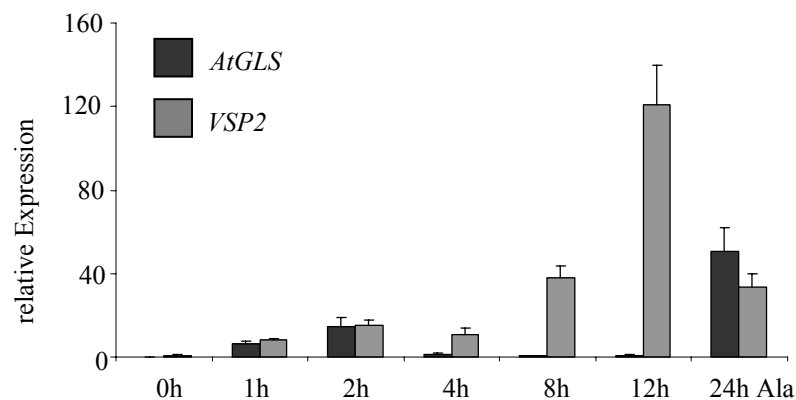


Abbildung 6.1-13: Vergleich der Transkriptmengen des *AtGLS*- und des *VSP2*-Gens nach Verletzung in Col-0 Pflanzen durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen verwendet, die an jedem Blatt quer über die Blattfläche mit einer Pinzette gequetscht wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils die verwundete Fläche zweier Blätter inklusive ca. 3mm des Blattmaterials darum herum geerntet und aufgearbeitet. Als Kontrolle wurde die cDNA einer Pflanze verwendet, die auf dieselbe Weise verletzt und zusätzlich über die Wurzeln für 24 h mit Alamethicin induziert wurde, bei dieser Pflanze wurde die gesamte Rosette aufgearbeitet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung dreier technischer Replikate (PCR-Reaktion). Zwei verschiedene biologische Replikate zeigen dabei ähnliche Ergebnisse.

Für das *AtGLS*-Gen erkennt man, dass es zu den frühen Zeitpunkten deutlich wundinduzierbar ist, die Expression ist aber zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar, während das *VSP2*-Gen auch zu späteren Zeitpunkten induziert bleibt. Dieses

transiente, lokale Ansteigen des Transkripts sorgt dafür, dass die GUS-Daten eine Wundinduktion anzeigen, die Mengen reichen jedoch nicht aus, um messbare Mengen an Duft zu synthetisieren (Tholl, persönliche Kommunikation).

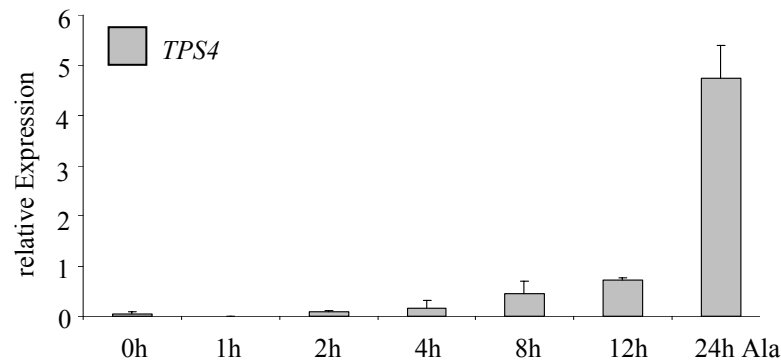


Abbildung 6.1-14: Analyse der Transkriptmengen des *TPS4*-Gens nach Verletzung in Col-0 Pflanzen durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen verwendet, die an jedem Blatt quer über die Blattfläche mit einer Pinzette gequetscht wurden. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurde jeweils die verwundete Fläche zweier Blätter inklusive ca. 3mm des Blattmaterials darum herum geerntet und aufgearbeitet. Als Kontrolle wurde die cDNA einer Pflanze verwendet, die auf dieselbe Weise verletzt und zusätzlich über die Wurzeln für 24 h mit Alamethicin induziert wurde, bei dieser Pflanze wurde die gesamte Rosette aufgearbeitet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung dreier technischer Replikate (PCR-Reaktion). Zwei verschiedene biologische Replikate zeigen dabei ähnliche Ergebnisse

In Abbildung 6.1-14 erkennt man, dass *TPS4*-Expression durch Verwundung nur sehr leicht induziert wird und nicht die Stärke der Induktion mit Alamethicin erreicht. Dennoch ist eine deutliche Transkriptsteigerung zu erkennen, die eventuell zu späteren Zeitpunkten noch weiter zunehmen würde. Material von späteren Zeitpunkten ist jedoch nach einer solch massiven Verletzung für Transkript-Analysen nicht mehr geeignet.

Die spätere Reaktion auf Verwundung im Vergleich zu der *AtGLS* macht deutlich, dass es sich bei *TPS4* um ein spätes Gen handelt, während *AtGLS* zu den frühen Genen gehört.

6.1.10 Bei *TPS4* handelt es sich um ein sekundäres, Coronalon induzierbares Gen

Die *AtGLS* ist durch Alamethicin schon nach 1,5 h gut induziert (Herde, 2006) während die *TPS4* in bisherigen Experimenten eine deutlich spätere Induzierbarkeit gezeigt hat (Abbildung 6.1-7). Auch die Transkript Akkumulation nach Verletzung beginnt für das *TPS4*-Gen erst später, hält aber länger an als für das *AtGLS*-Gen. Deshalb sollte durch Vorbehandlung mit dem Proteinbiosyntheseinhibitor Cycloheximid (CHX) getestet werden, ob für *TPS4*-Induktion die Neusynthese von Proteinen benötigt wird.

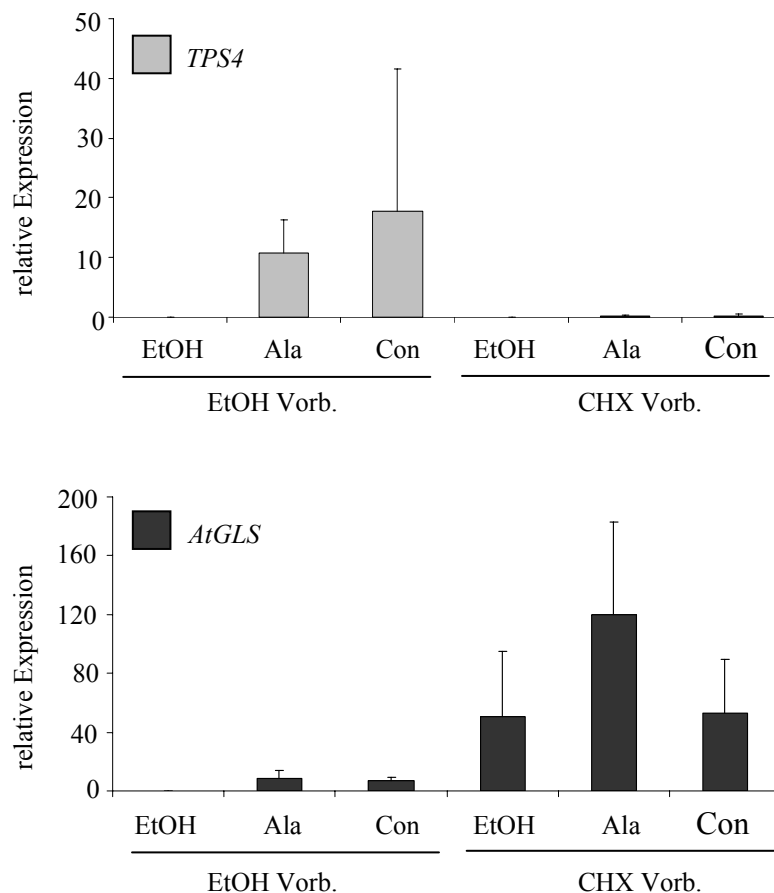


Abbildung 6.1-15: Vergleich der Transkriptmengen der beiden Terpensynthasegene nach Induktion mit Alamethicin und Coronalon nach CHX-Vorbehandlung durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden abgeschnittene Blätter von sechs Wochen alten, auf Erde angezogenen Col-0 Pflanzen verwendet. Die Petiolen wurden für 24 h mit 20 µg/ml Cycloheximid (CHX) induziert, anschließend wurden sie für 24 h in Alamethicinlösung (Ala, 5 µg/ml) oder Coronalonlösung (Con, 100 µM) gestellt. Als Kontrollen wurden alle Lösungen jeweils durch 0,1 %ige Ethanollösung ersetzt. Es wurden jeweils drei Blätter zu einer Probe vereint. Bis auf die Ethanolkontrolle, von der nur eine Probe vorhanden war, sind Mittelwert und Standardabweichung dreier biologischer Replikate dargestellt.

Das *TPS4*-Transkript ist genau wie das *AtGLS*-Transkript durch das Jasmonsäurederivat Coronalon induzierbar. Diese Induzierbarkeit zeigt sich jedoch sowohl mit Coronalon als auch mit Alamethicin nicht mehr, wenn die Pflanzen mit Cycloheximid vorbehandelt wurden. Das bedeutet, dass für Induktion des *TPS4*-Gens Proteinbiosynthese benötigt wird, was auch ihre im Vergleich zur *AtGLS*-Genexpression gezeigte Verzögerung der Antwort auf Alamethicin erklärt.

Für die *AtGLS* dagegen reicht CHX, wie bei Herde 2006 beschrieben, als Induktor aus, weder Proteinbiosynthese noch ein zusätzlicher Reiz werden für die Induktion benötigt.

6.1.11 Einfluss von MYC2 auf die Expression der *AtGLS*

Die *jin1*-Mutante besitzt eine Mutation in dem MYC2 Transkriptionsfaktor, der als entscheidend für die Induktion JA-respansiver Gene beschrieben wurde. MYC2 wird in uninduziertem Zustand durch Repressoren aus der Familie der JAZ-Proteine reprimiert und kann erst nach deren Degradierung seine Zielgene aktivieren (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007). In dem folgenden Experiment sollte getestet werden, ob MYC2 für die unterschiedlichen Induktionen der *AtGLS* benötigt wird. Dafür wurde die CHX-Induktion, Alamethicin-Induktion und die Wundinduktion der *AtGLS* in *jin*-Mutanten und Wildtyppflanzen verglichen.

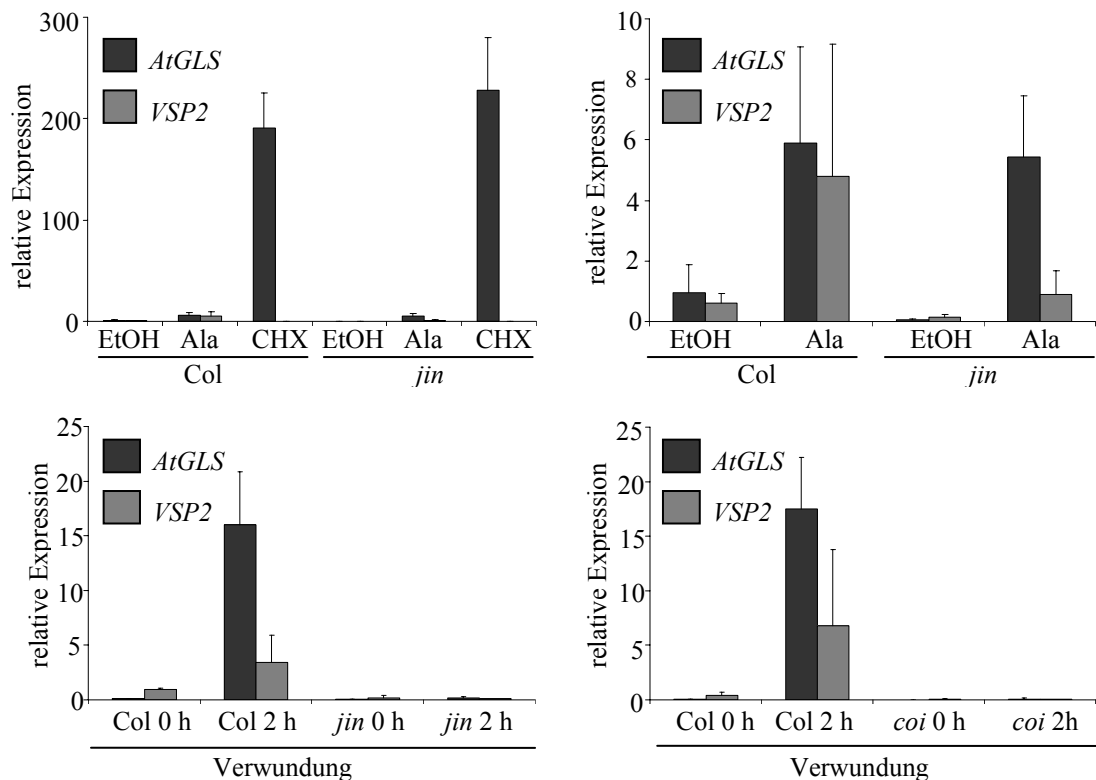


Abbildung 6.1-16: Vergleich der Transkriptmengen des *AtGLS*- und des *VSP2*-Gens nach unterschiedlichen Induktionen in Col-0 Pflanzen sowie *coi1*- und *jin1*-Mutanten durch Real-time-RT-PCR-Analyse

Es wurden sieben Wochen alte, hydroponisch angezogene Col-0 Pflanzen, sowie *jin1*- und *coi1*- Mutanten verwendet. Für die Alamethicininduktion (Ala) wurden die Pflanzen für 24 h über die Wurzeln mit 5 µg/ml Alamethicinlösung induziert, für die Cycloheximid-Induktion (CHX) wurden die Pflanzen für 24 h mit einer 20 mg/l konzentrierten CHX-Lösung induziert. Als Kontrolle für beides wurde Pflanzen verwendet, die in einer 0,1 %igen Ethanolösung inkubiert wurden. Es wurden jeweils die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Die Pflanzen für das Verwundungsexperiment wurden mit einer Pinzette quer zur Blattader verwundet, nach 2 h wurde nur das verwundete Material von jeweils drei Blättern und ein Bereich von ca. 3mm um die Verwundungstellen geerntet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von mindestens vier biologischen Replikaten.

Für die *jin*-Mutante zeigt sich eine sehr interessante Veränderung der Induzierbarkeit, verglichen mit dem Wildtyp. Alamethicin- sowie Cycloheximidinduktion bleiben von dem Fehlen des MYC2 Transkriptionsfaktors unbeeinflusst, während in der im gesamten JA-Signalweg blockierten *coil*-Mutante *AtGLS* nicht mehr induziert werden kann (Herde, 2006). Das heißt, JA-Signalwege über COI1 werden benötigt, nicht aber der Transkriptionsfaktor MYC2. Für die Wundantwort dagegen zeigt sich, dass *AtGLS*-Expression sowohl auf einem funktionellen COI1-Protein als auch auf dem MYC2 Transkriptionsfaktor beruht. Es gibt also zwei verschiedene Wege, den Promotor der *AtGLS* zu aktivieren, von denen nur einer über den MYC2-TF läuft.

6.1.12 Generieren Raupen ein Signal unabhängig von Verwundung?

In der *jin*-Mutante bietet sich eine Gelegenheit, das Signal, welches durch *P. xylostella* Fraß entsteht, näher aufzuschlüsseln. Da bis auf Verletzung alle anderen Induktionen in der *jin*-Mutante noch *AtGLS*-Expression induzieren können, ist es interessant zu untersuchen, wie sich das Transkript der *AtGLS* nach *P. xylostella* Fraß in der *jin*-Mutante verhält. Induzieren Raupen kein anderes Signal außer dem einer permanenten Verwundung, so sollten Raupen in der *jin*-Mutante nicht mehr in der Lage sein, *AtGLS* zu induzieren. Induzieren sie jedoch auch unabhängig von einem Verwundungsreiz, zum Beispiel durch den Kontakt der Zellen mit Raupenspeichel, dann sollte *AtGLS* eventuell auch in der *jin*-Mutante durch Raupenfraß induzierbar sein. Um den Verwundungsreiz von dem Fraß der Raupen zu trennen, wurden in einem Experiment von einem Teil der Pflanzen die Raupen sechs Stunden vor dem Ernten des Pflanzenmaterials entfernt. Sechs Stunden nach Verwundung ist die *AtGLS* nicht mehr induziert, nur wenn Raupen qualitativ zur Verletzung unterschiedliche Signale auslösen, sollte *AtGLS* unter den Bedingungen noch induzierbar sein. Dieses Experiment wurde in Wildtyppflanzen sowie *jin*- und *jar*-Mutanten durchgeführt.

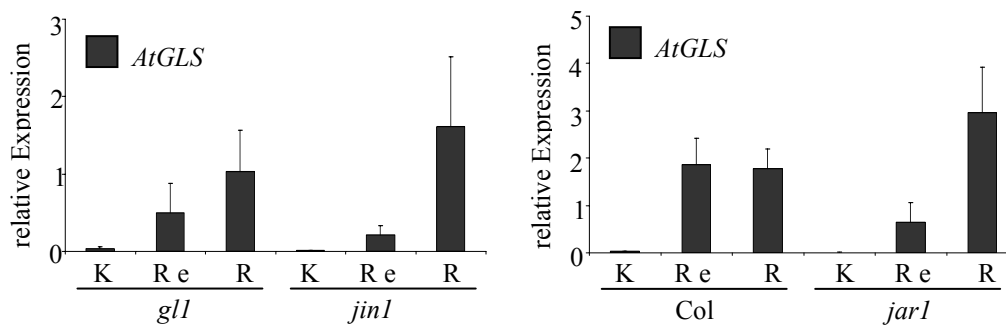


Abbildung 6.1-17: Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-Gens nach Fraß durch *Plutella xylostella* Larven in Col-0 Pflanzen sowie und *jin1*- und *jar1*-Mutanten durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sechs Wochen alte, auf Erde angezogene Col-0 Pflanzen, sowie *gll*- *jin1*- und *jar1*-Mutanten verwendet. *gll* ist die korrekte Kontrolle für die *jin1*-Mutanten, da die *jin1*-Mutation in diesem Hintergrund erstellt wurde. Eine Pflanze wurde mit jeweils fünf Larven von *Plutella xylostella* besetzt. 24 h nach dem Aufsetzen der Raupen wurden jeweils drei Blätter für eine Probe vereint. K: unbehandelte Kontrollen, R e: die Raupen wurden sechs Stunden vor dem Erntezeitpunkt entfernt, R: die Raupen haben bis zu dem Zeitpunkt der Ernte gefressen. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von vier biologischen Replikaten.

In Col-0 Pflanzen besteht kein Unterschied in der Expression der *AtGLS*, egal ob die Raupen sechs Stunden vor dem Ernten entfernt wurden oder nicht. Ein ähnliches Resultat ergab sich in den *gll*-Pflanzen, auch hier zeigt sich, dass Raupen ein anderes Signal auslösen, als eines was einer permanenten Verwundung entspricht, da Verwundung alleine zu diesem Zeitpunkt keine Induktion der *AtGLS* mehr auslösen würde. In *jin1*- und *jar1*-Mutanten ist die Induktion der *AtGLS* bei durchgängigem Fraß der Raupen der in Wildtyppflanzen identisch; das Ergebnis in der *jin1*-Mutante ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Raupen mehr induzieren können als eine permanente Verwundung. Es ist fraglich, warum die Proben, in denen die Raupen sechs Stunden vor dem Ernten entfernt wurden, von *gll*- *jin1*- und *jar1*-Mutanten eine schwächere *AtGLS*-Expression aufweisen als von Col-0. Vermutlich ist die Induktion durch die kürzere Fraßzeit schwächer, dies hat jedoch nichts mit dem fehlenden Verwundungsreiz zu tun, da das Ergebnis in der *jin1*-Mutante, die auf den Verwundungsstimulus bezüglich *AtGLS*-Expression nicht anspricht, identisch ist. Dass der Unterschied zwischen den Proben mit entfernten Raupen und denen mit Raupenfraß bis zur Ernte in den Col-0 Pflanzen nicht auftritt, könnte an der generellen Schwankung der *AtGLS*-Expression nach Raupenfraß liegen, eventuell würde eine höhere Anzahl von Replikaten auch hier zeigen, dass die Proben mit entfernten Raupen eine schwächere Induktion aufweisen.

6.1.13 Beteiligung der JAZ-Repressoren an der Regulation der *AtGLS*

Neuere Studien haben ergeben, dass die JAZ-Repressoren an der JA-Antwort der Pflanze beteiligt sind, indem sie den MYC2 inhibieren und erst nach einem JA-Stimulus über das COI1-Protein gebunden und durch das 26S-Proteasom abgebaut werden, wodurch der MYC2 als Aktivator wirken kann. Die *JAZ1Δ3A-GUS*-transgenen Pflanzen exprimieren einen JAZ-Faktor, der durch Deletion einer konservierten Domäne nicht mehr abgebaut werden kann. Damit zeigen die Pflanzen einen dominanten, JA-insensitiven Phänotyp, vermutlich, weil das Protein zwar an COI1 bindet, aber nicht mehr abgebaut wird und so auch die Bindung und den Abbau der endogenen JAZ-Repressoren verhindert (Thines et al., 2007). Eine alternative Erklärung wäre, dass der deletierte, nicht mehr abbaubare JAZ1 immer an MYC2 bindet und ihn daran hindert, aktivierend zu wirken, weshalb die Inaktivierung des MYC2 trotz Anwesenheit von JA erhalten bleibt. Verhält sich die *AtGLS* wie viele typische JA-induzierbare Gene, so sollte sie in den JAZ-Transgenen Pflanzen nur noch schwach induzierbar sein (Chung et al., 2008).

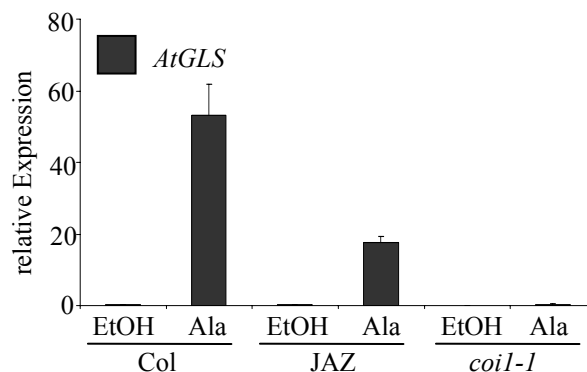


Abbildung 6.1-18: Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-Gens nach Alamethicininduktion in Col-0 Pflanzen sowie *JAZ1Δ3A-GUS*-Transgene und *coi-1*-Mutanten durch Real-time-RT-PCR

Es wurden abgeschnittene Blätter von fünf Wochen alten, auf Erde angezogenen Col-0 Pflanzen sowie *JAZ1Δ3A-GUS*-Transgenen (JAZ) und *coi-1*-Mutanten verwendet. Die *coi-1*-Mutanten wurden vorher auf 2MS-Platten mit 50 μ M Methyljasmonat, die *JAZ1Δ3A-GUS*-Transgene auf 2MS-Platten mit Kanamycin selektiert. Die Col-0 Pflanzen wurden ebenfalls für ca. 1 Woche auf 2MS-Platten angezogen und dann wie die Transgenen und Mutanten auf Erde überführt. Die Petiolen wurden für 24 h in Alamethicinlösung (5 μ g/ml) oder EtOH (0,1 %) als Lösungsmittelkontrolle gestellt. Es wurden jeweils vier Blätter für eine Probe vereint. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von zwei biologischen Replikaten.

In Abbildung 6.1-18 ist zu erkennen, dass die *JAZ1Δ3A-GUS*-Transgene zwar bezüglich des *AtGLS*-Gens mit Alamethicin noch induzierbar ist, jedoch nicht zu der vollen Stärke wie der Col-0 Wildtyp. Die *coi-1*-Mutante ist gar nicht mehr induzierbar, also ist sehr

wahrscheinlich, dass alle Signalwege, *AtGLS* durch Alamethicin zu induzieren über das COI1-Protein laufen, aber nur ein Teil davon über den JAZ-Repressor. Auch die Induktion mit Alamethicin deutet also darauf hin, dass der Promotor der *AtGLS* auf mindestens zwei verschiedenen Wegen aktiviert werden kann. Ein interessantes Experiment wäre Verwundung in der *JAZ1Δ3A-GUS*-Transgenen Pflanze, da der JAZ-Repressor vermutlich über den MYC2-TF wirkt. Somit wäre zu erwarten, dass in den *JAZ1Δ3A-GUS* - Transgenen keine Verwundungsinduktion der *AtGLS* mehr möglich ist.

6.2 Funktionelle Charakterisierung von TMTT in *Arabidopsis thaliana*

Die Bedeutung von TMTT in der Pflanzen-Insekten-Interaktion konnte in der Lima Bohne durch Versuche mit Spinnenmilben (*Tetranychus urticae*) und ihrem Fraßfeind *Phytoseiulus persimilis*, einer Raubmilbe, nachgewiesen werden. Befall mit *T. urticae* führt zu hohen Mengen an emittierten TMTT, die der Anlockung von *P. persimilis* dienen (De Boer et al., 2004). Weiterhin wurde belegt, dass exogen appliziertes TMTT Signalwirkung in Limabohnen besitzt, was eine Rolle für TMTT in der Pflanzen-Pflanzen-Interaktion aufzeigt (Arimura et al., 2000).

Um zu testen, ob TMTT in *Arabidopsis* eine Rolle in der Pflanzen-Pflanzen Kommunikation spielt, wurden *AtGLS*- Überexprimierer mit Col-0 Pflanzen gemeinsam in steriler Erde in einem Plastikgefäß angezogen. Als Kontrolle wurden Col-0 Pflanzen ohne Überexprimierer in den gleichen Gefäßen angezogen. Nach ca. 8 Wochen wurden die Pflanzen getrennt voneinander geerntet und die daraus gewonnene RNA mit Arizona *A. thaliana* Gesamtgenomarrays hybridisiert.

Dabei wurden die RNAs der Überexprimierer, der mit den Überexprimierern gewachsenen Col-0 Pflanzen und der nur mit Col-0 gewachsenen Col-0 untereinander verglichen.

6.2.1 Die Genexpression in 35S::AtGLS-Pflanzen ist fast identisch mit der Genexpression von Pflanzen, die in Gegenwart von 35S::AtGLS-Pflanzen gewachsen sind

Insgesamt sind in dem Vergleich Überexprimierer gegen Wildtyp 137 Gene stärker als 2^{3,5}-fach in den 35S::AtGLS-Pflanzen exprimiert. Eine ähnlich hohe Zahl (163 Gene) an stärker als im unbehandelten Wildtyp exprimierten Genen erhält man für Col-0 Pflanzen, die den Düften des Überexprimierers ausgesetzt waren.

Tabelle 1 Differenziell in den 35S::AtGLS-Pflanzen höher als in Wildtyppflanzen exprimierte Gene. Orange wurden die Gene hervorgehoben, welche ausschließlich in den 35S::AtGLS-Pflanzen induziert sind und nicht in den Pflanze, die gemeinsam mit 35S::AtGLS-Pflanzen inkubiert wurden.

Gen Name	Gen Beschreibung	WT- 35S::AtGLS	WT- Duft	AtGLS- Duft
At1g61120	AtGLS	-11,84	2,25	14,08
At2g21660	ATGRP7	-10,64	-10,73	-0,09
At5g24470	APRR5 (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5)	-9,51	-9,8	-0,29
At4g04330	T19B17_5	-9,07	-9,42	-0,36
At5g44420	PDF1.2	-7,83	1,26	9,09
At5g62360	Pectinesterase/ Pectinesterase Inhibitor	-7,29	-7,96	-0,67
At5g20630	GLP3 (GERMIN-LIKE PROTEIN 3)	-7,27	-7,04	0,23
At5g23240	heat shock protein binding / unfolded protein binding	-7,27	-7,32	-0,05
At2g26020	PDF1.2b	-7,17	1,18	8,35
At1g75830	LCR67/PDF1.1	-6,98	1,23	8,21
At1g20030	T20H2.19	-6,95	-6,55	0,39
At4g12480	PEARLI 1	-6,94	-6,93	0
At4g30650	F17I23.10	-6,84	-7,37	-0,53
At5g50450	MXI22.17	-6,81	-5,67	1,14
At5g44430	PDF1.2c	-6,8	1,47	8,27
At5g54960	PDC2 (PYRUVATE DECARBOXYLASE-2)	-6,69	-5,57	1,12
At1g11210	T28P6.13	-6,52	-7,4	-0,88
At4g16146	similar to negatively light-regulated protein, putative	-6,5	-6,48	0,02
At2g40610	ATEXPA8 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN A8)	-6,44	-4,97	1,47
At2g26010	PDF1.3	-6,36	1,53	7,89

Eine Liste der 20 am stärksten differentiell exprimierten Gene ist in Tabelle 1 dargestellt.

Vergleicht man die Ergebnisse der Arrays Col-0/35S::AtGLS und Col-0/Col-0 mit 35S::AtGLS zusammen gewachsen fällt auf, dass fast alle induzierten Gene in den beiden

Fällen identisch sind. Lediglich *AtGLS* selbst und einige *PDF*-Gene sind nur in den *35S::AtGLS*- Pflanzen induziert.

Das heißt, dass TMTT in der Lage ist, sowohl in der emittierenden Pflanze selbst als auch in Nachbarpflanzen Genexpression zu induzieren. Lässt man die differentiell exprimierte Gene zu funktionellen Kategorien zuordnen, fällt auf, dass die Verteilung über alle Klassen ebenfalls in beiden Arrays sehr ähnlich ist.

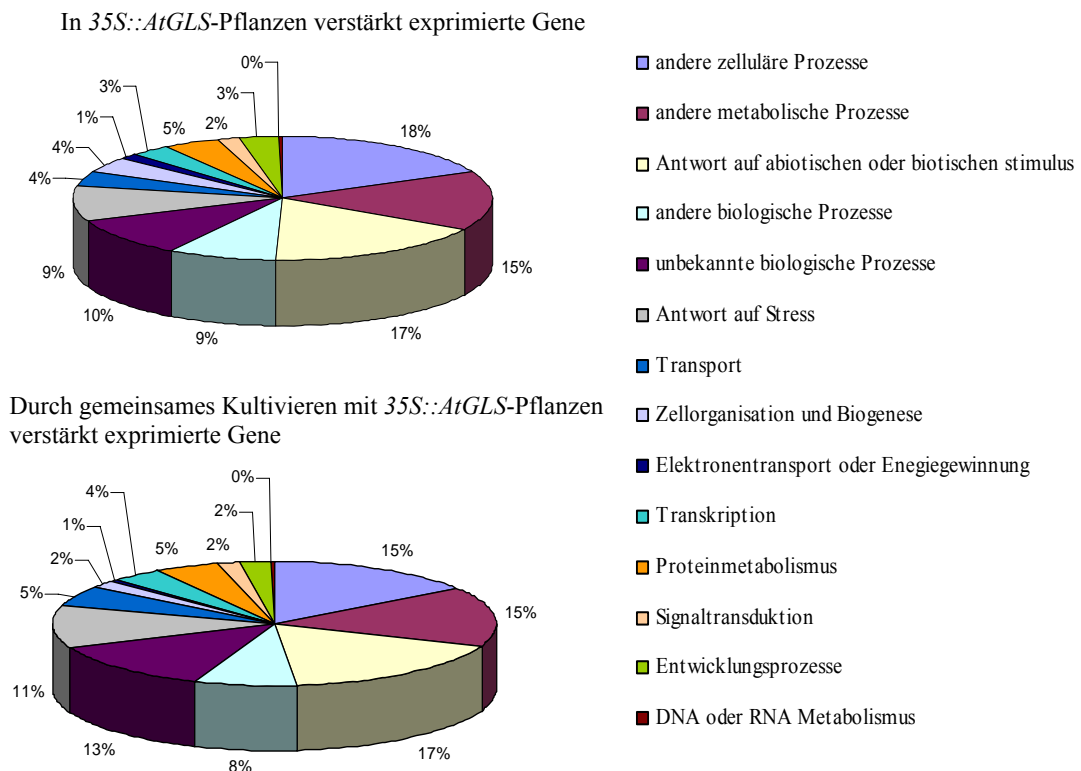


Abbildung 6.2-1 Zugehörigkeit der in den Arrays als differentiell stärker exprimierten Gene zu funktionellen Klassen

Die Zuordnung wurde von der TAIR-Seite www.arabidopsis.org übernommen.

Unter den ersten sechs Klassen mit den meisten differentiell exprimierten Genen befinden sich sowohl stressinduzierte Gene als auch Gene, die durch einen biotischen oder abiotischen Stimulus induziert werden.

Vergleicht man die Zuordnung der im Array als induziert gefundenen Gene zu funktionellen Klassen mit der Zuordnung aller in *A. thaliana* exprimierten Gene, so fällt auf, dass die stressinduzierten, durch einen abiotischen oder biotischen Stimulus induzierten sowie an anderen biologischen Prozessen beteiligten Klassen in diesem Experiment verglichen mit allen im Genom exprimierten Genen überrepräsentiert sind.

Dies zeigt die wahrscheinliche Beteiligung der *AtGLS* an der Stressantwort von *Arabidopsis thaliana*.

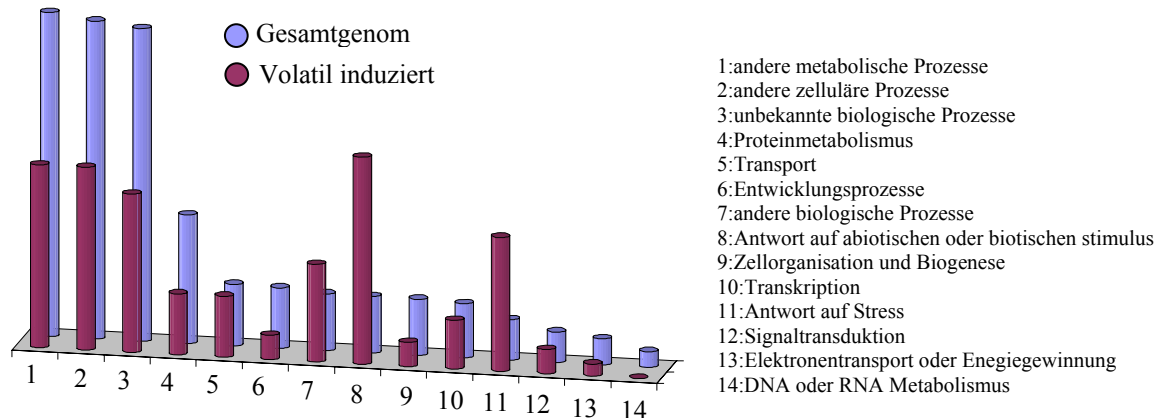


Abbildung 6.2-2: Vergleich der Zuordnung zu funktionellen Klassen für alle exprimierten Gene (Gesamtgenom) in *A. thaliana* und der durch gemeinsame Kultivierung mit *35S::AtGLS* Pflanzen mindestens 2^{3,5} fach induzierten Gene (Volatil induziert)

(Die funktionelle Zuordnung wurde mit Hilfe der Datenbank (www.arabidopsis.org) vorgenommen).

6.2.2 In einer Reproduktion des Experimentes lässt sich die Expression der induzierten Gene durch Real-time-RT-PCR nachweisen

Um die in dem Array differenziell exprimierten Gene experimentell zu bestätigen, wurde das gesamte Experiment noch einmal unter gleichen Bedingungen wiederholt und für eine Auswahl der Gene mit Hilfe von Real-time-RT-PCR die Expression analysiert

Tabelle 2 In dem Array als induziert gefundene Gene, die per Real-time-RT-PCR reproduziert wurden.

Farblich hervorgehoben sind jeweils die Gene, die nur in den *35S::AtGLS*-Pflanzen induziert wurden.

Gen Name	Gen Beschreibung	WT- <i>35S::AtGLS</i>	WT- Duft	AtGLS- Duft
At1g61120	AtGLS	-11,84	2,25	14,08
At2g21660	AtGRP7	-10,64	-10,73	-0,09
	APRR5 (PSEUDO-RESPONSE			
At5g24470	REGULATOR 5)	-9,51	-9,8	-0,29
At5g44420	PDF1.2	-7,83	1,26	9,09
At5g20630	GLP3 (GERMIN-LIKE PROTEIN 3	-7,27	-7,04	0,23
At1g20030	T20H2.19	-6,95	-6,55	0,39
At4g12480	PEARLI 1	-6,94	-6,93	0
At4g25100	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1)	-5,57	1,54	7,11
At3g04720	PR4 (PATHOGENESIS-RELATED 4)	-5,51	-4,67	0,83
At4g11650	AtOSM34	-3,55	-9,92	-6,38

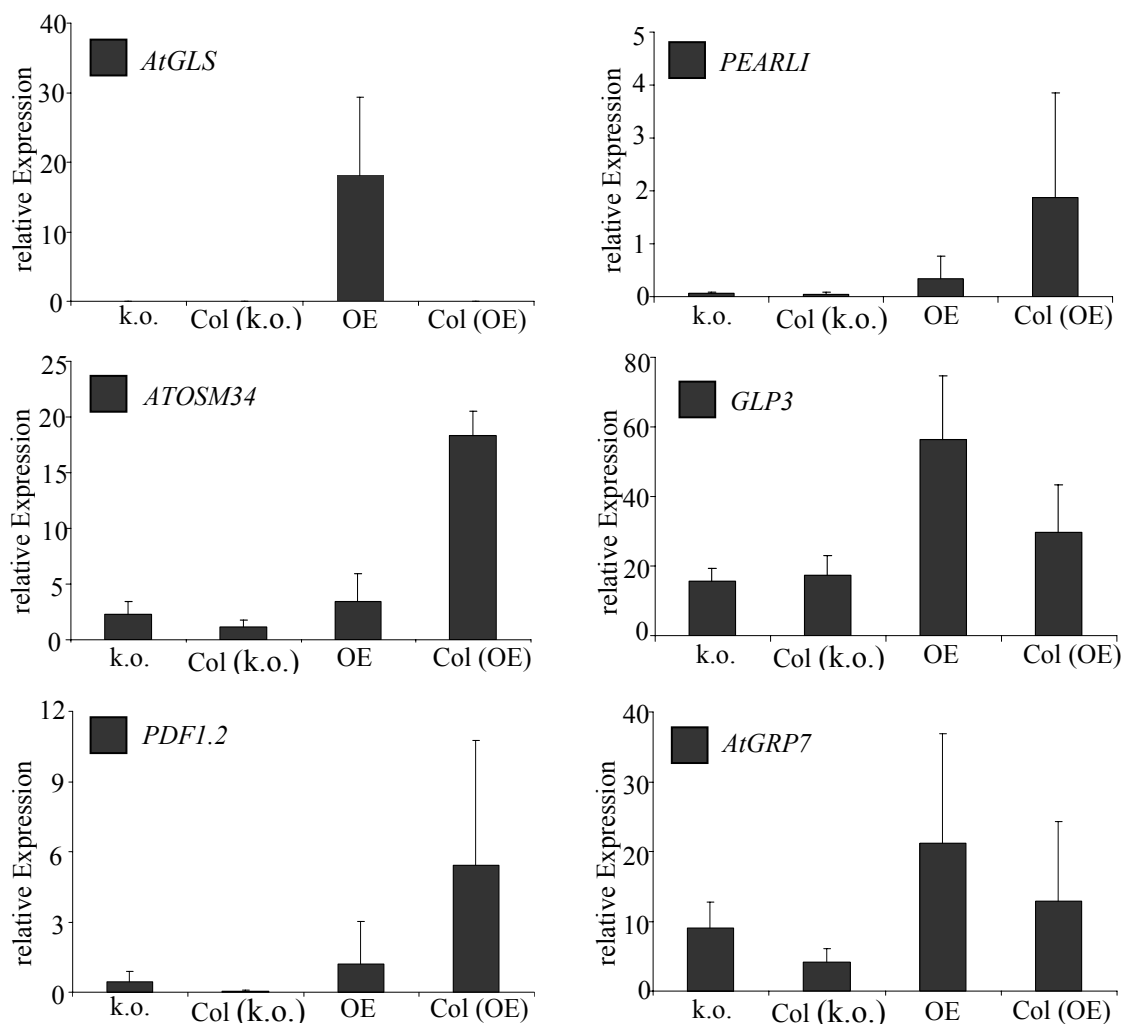


Abbildung 6.2-3: Analyse der Transkriptmengen potentiell durch TMTT induzierbarer Gene durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sieben Wochen alte, in geschlossenen Plastikgefäßen in steriler Erde gewachsene Pflanzen verwendet. Dabei wuchsen Col-0 (Col (k.o.)) Pflanzen in einem Gefäß zusammen mit *AtGLS* k.o. Pflanzen (k.o.), oder aber Col (Col (OE)) Pflanzen zusammen mit *35S::AtGLS*-Pflanzen (OE). Die gesamten Rosetten wurden aufgearbeitet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei biologischen Replikaten.

Für eine Auswahl an Genen ließen sich die Ergebnisse der Arrays gut reproduzieren. Eine Ausnahme bildet hier die Duftinduzierbarkeit von *PDF1.2*, welche in den Arrays nur in den Überexprimierern gefunden wurde. Für einige der Gene konnte auch die Überexpression in den *35S::AtGLS*-Pflanzen nicht reproduziert werden, dazu zählen zum Beispiel *APRR5* und *FSD1* sowie *T20H2.19* (Daten nicht gezeigt).

6.2.3 Auch in einem unsterilen System lassen sich die Ergebnisse per Real-time-RT-PCR reproduzieren

Der Vorteil der sterilen Anzucht von *Arabidopsis* liegt in einer kontrollierten Umgebung und somit einer möglichst gering schwankenden Grundexpression der Gene für den Array. In diesem Experiment sollten die Ergebnisse in einer physiologisch relevanteren Umgebung reproduziert werden. Dafür wurde der Versuch noch einmal wiederholt, wobei die Pflanzen diesmal gemeinsam in unsteriler Erde auf einem Tablett inkubiert wurden. Um die Volatile etwas zu akkumulieren, wurde eine Plastikhaube über die Tablett gestellt, die jedoch mit Löchern versehen war. Die Tablett mit den Überexprimierern von *AtGLS* und den *k.o.* wurden dabei in getrennten aber baugleichen Klimaschränken bei den gleichen Umweltbedingungen inkubiert.

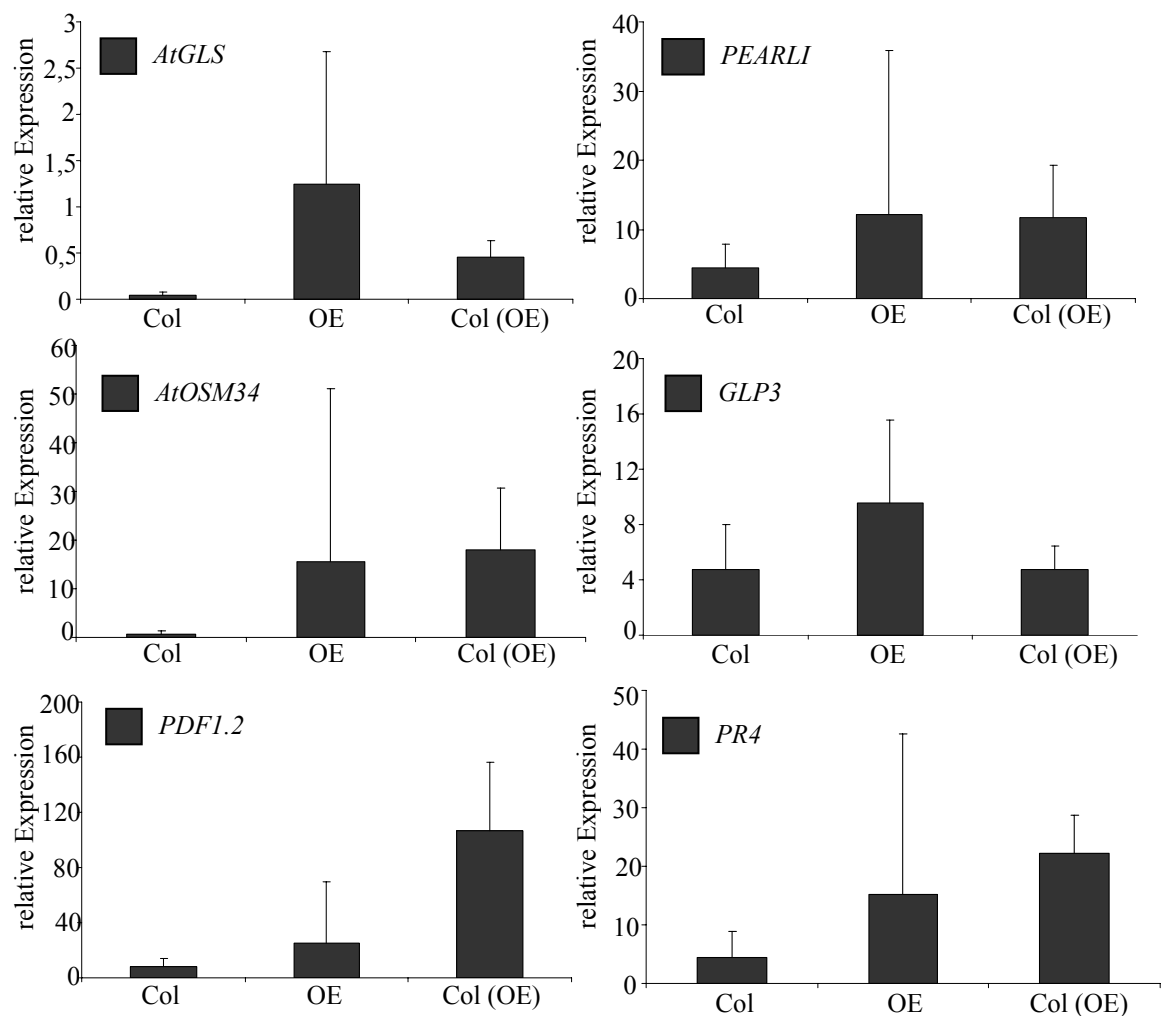


Abbildung 6.2-4: Analyse der Transkriptmengen potentiell durch TMTT induzierbarer Gene durch Real-time-RT-PCR

Es wurden unsteril auf Erde angezogene, sechs Wochen alte Pflanzen verwendet. Col-0 Pflanzen (Col) sind dabei entweder auf einem Tablett zusammen mit *AtGLS* *k.o.* Pflanzen gewachsen oder aber zusammen mit *35S::AtGLS* Pflanzen (OE), dann als Col (OE) bezeichnet. Die Tablett wurden dabei in getrennten Klimaschränken inkubiert. Es wurden die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von sechs biologischen Replikaten.

Es zeigt sich, dass auch in diesem System viele Ergebnisse des Arrays reproduziert werden konnten. Im Unterschied zu den Ergebnissen in den sterilen Erdkulturen zeigt sich hier jedoch, dass das gemeinsame Kultivieren mit Überexprimierern *AtGLS*-Expression in den Nachbarpflanzen auslöst. Eventuell ist dieser Unterschied auf die Sterilität zurückzuführen, da *AtGLS* unter diversen sterilen Anzuchsbedingungen auch nicht durch Alamethicin induzierbar ist (Daten nicht gezeigt).

Eine Erklärung dafür wäre, dass die Pflanzen unter den sterilen Bedingungen nur sehr wenig transpirieren und deshalb das Alamethicin nur sehr schlecht aufnehmen. Eine andere

Erklärung wäre jedoch, dass für die Induktion der *AtGLS* ein Reiz notwendig ist, der unter sterilen Bedingungen nicht generiert werden kann.

6.2.4 Exogenes TMTT wirkt induzierend auf die untersuchten Gene

In den bisherigen Ergebnissen wurde davon ausgegangen, dass es das von den *35S::AtGLS*-Pflanzen emittierte TMTT ist, welches in den Nachbarpflanzen zur Genexpression führt. Es wäre jedoch auch möglich, dass Geranylinalool, welches ebenfalls von den *AtGLS*-Überexprimierern emittiert wird, der Induktor ist, auch wenn das höhere Molekulargewicht zu einer geringeren Volatilität führt. Um zu untersuchen, welches der volatile Induktor für die Genexpression in Nachbarpflanzen von *AtGLS*-Überexprimierern ist, wurden Pflanzen in geschlossenen Gläsern mit TMTT über den Luftraum induziert und die Genexpression untersucht.

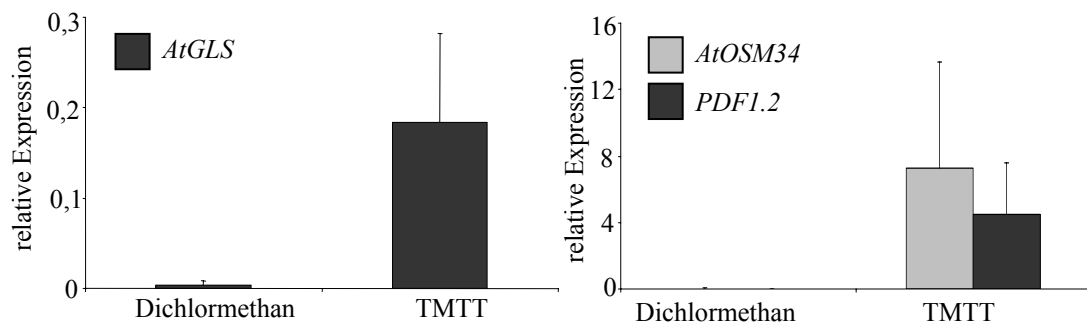


Abbildung 6.2-5: Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-, des *AtOSM34*- und des *PDF1.2*-Gens nach Induktion mit exogenem TMTT durch Real-time-RT-PCR

Es wurden auf Erde angezogene, sieben Wochen alte Col-0 Pflanzen verwendet. Die Töpfe wurden mit einem mit 10 µl TMTT (1 µg/µl) betroffenen Wattebausch für 24 h in geschlossenen Gläsern (ca. 0,5 l Volumen) inkubiert. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit 10 µl Dichlormethan (Lösungsmittelkontrolle) auf gleiche Weise behandelt. Es wurden jeweils die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten (Kontrollen) bzw. fünf biologischen Replikaten (TMTT).

Sowohl *AtOSM34* als auch *PDF1.2* werden durch Induktion mit TMTT in Col-0 Pflanzen induziert (Abbildung 6.2-5). Die absoluten Expressionsstärken sind relativ gering, jedoch ist der Unterschied zwischen Lösungsmittelkontrollen und mit TMTT behandelten Pflanzen deutlich zu erkennen.

6.2.5 Einfluss von *AtGLS* Überexpression auf *Botrytis cinerea* Infektion

Die Stärke der Expression der durch TMTT induzierten Gene ist in den hier gezeigten Experimenten relativ gering. Dies lässt vermuten, dass TMTT eher zu einem *priming* führt,

so dass die Nachbarpflanzen auf Pathogene oder Herbivorbefall schneller und effektiver reagieren können. Die Expression von *PDF1.2*, *PR4* und *OSM34* lässt vermuten, dass es sich hierbei eventuell um ein *priming* handelt, welches bei einem Befall durch Pilze zu einer erhöhten Resistenz in der Pflanze führt. Um zu untersuchen, ob *Botrytis cinerea* Infektion zur Induktion von *AtGLS* führt, wurden auf Erde angezogene Pflanzen infiziert und die Genexpression untersucht. Da sich *tga2,5,6*-Mutanten und *pad3*-Mutanten als besonders anfällig gegenüber *Botrytis cinerea* gezeigt haben (Zhou et al., 1999; Zhang et al., 2003), wurden sowohl Col-0 Pflanzen als auch *tga2,5,6*- und *pad3*-Mutante untersucht (Fode und Zander persönliche Kommunikation).

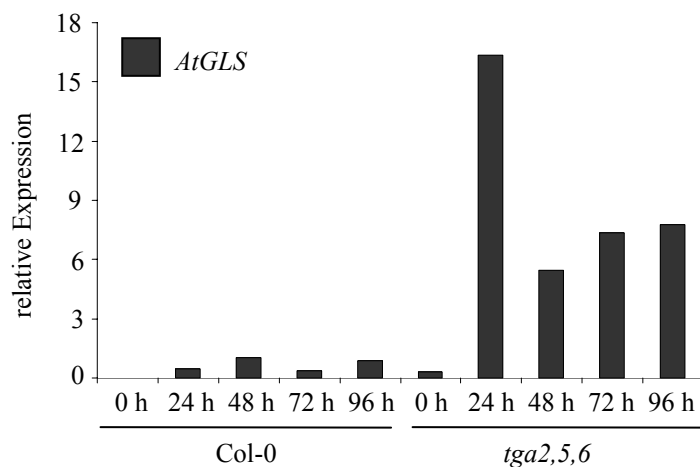


Abbildung 6.2-6: Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-Gens nach Infektion mit *Botrytis cinerea* durch Real-time-RT-PCR

Es wurden auf Erde angezogene, sechs Wochen alte Col-0 Pflanzen und *tga2,5,6*- Mutanten verwendet. Die Blätter der Pflanzen wurden jeweils mit 5 µl Sporensuspension (1×10^6 Sporen/ml) von *Botrytis cinerea* betropft und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es wurden jeweils die gesamten Rosetten aufgearbeitet.

In Wildtyppflanzen wird die *AtGLS* nur sehr schwach, wenn auch deutlich, durch *Botrytis cinerea* Infektion induziert (Abbildung 6.2-6). In den *tga2,5,6*-Mutanten dagegen ist die Induktion wesentlich stärker, was daran liegen kann, dass die Mutanten stärker als der Wildtyp von *B. cinerea* befallen werden. Dadurch sind größere Flächen der Blätter von dem Pilz befallen, weshalb auch die pilzinduzierte Genexpression stärker ausgeprägt sein kann als im Wildtyp. Eine andere mögliche Erklärung ist, dass einer der TGA-Faktoren oder alle drei einen inhibierenden Effekt auf *AtGLS*-Expression haben und deshalb die Induktion in der Mutante stärker ausfällt. Ein Befund, der die zweite Hypothese stützt, ist dass in der uninduzierten *tga-2,5,6*-Mutante die Mengen an *AtGLS*-Transkript höher sind als im uninduzierten Wildtyp. Da hier aber jeweils nur eine Probe analysiert wurde, müsste man eine größere Probenanzahl untersuchen, um den Effekt statistisch abzusichern.

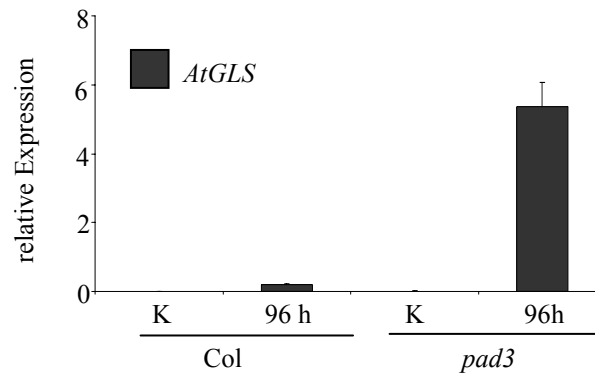


Abbildung 6.2-7 Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-Gens nach Infektion mit *Botrytis cinerea* durch Real-time-RT-PCR

Es wurden auf Erde angezogene, sechs Wochen alte Col *gll* Pflanzen und *pad3*-Mutanten verwendet. Die Blätter der Pflanzen wurden jeweils mit 5 μ l Sporensuspension (1×10^6 Sporen/ml) von *Botrytis cinerea* bepflanzt und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Es wurden jeweils die gesamten Rosetten aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung zweier technischer Replikate (PCR-Reaktion).

Auch die *pad3*-Mutante, die aufgrund des fehlenden Camalexins besonders stark von *B. cinerea* befallen wird (Mark Zander, persönliche Kommunikation), weist stärkere Expression der *AtGLS* auf als der Wildtyp, weshalb wahrscheinlich ist, dass die Stärke der Expression in Abbildung 6.2-6 in den *tga2,5,6*-Mutanten auch durch die Stärke des Befalls und nicht die Mutationen in den TGA-Faktoren verursacht wird.

Um zu untersuchen, ob TMTT einen Einfluss auf die Fitness der Pflanzen nach *Botrytis*-Befall hat, wurden Col-0 Pflanzen wiederum allein sowie gemeinsam mit *35S::AtGLS*-Pflanzen in sterilen Plastikgefäßen angezogen. Anschließend wurden die Pflanzen mit *Botrytis cinerea* infiziert und der Phänotyp der Pflanzen sowie die Genexpression untersucht.

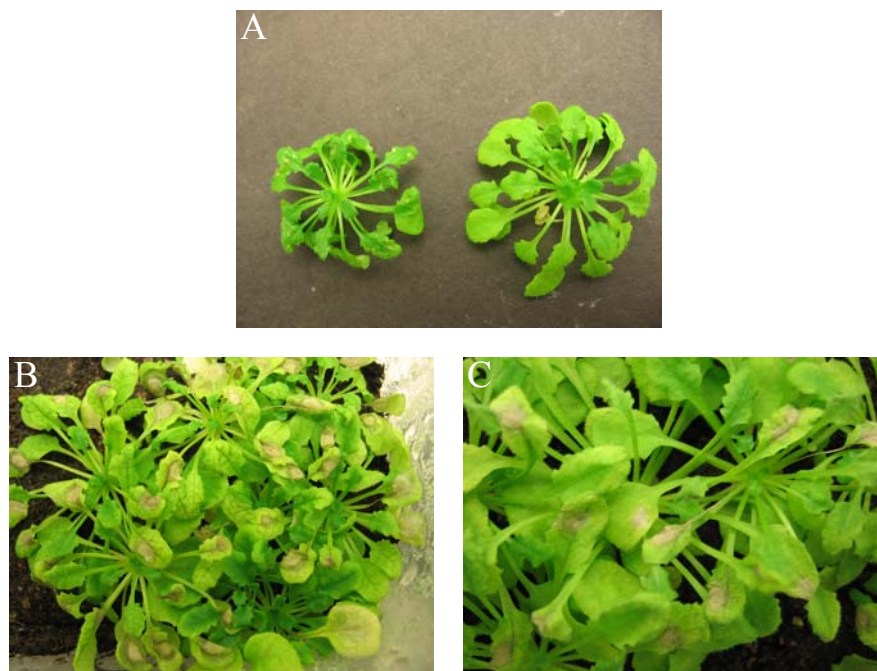


Abbildung 6.2-8 Phänotyp nach *Botrytis cinerea* Infektion

Es wurden sieben Wochen alte, in geschlossenen Plastikgefäßen in steriler Erde gewachsene Pflanzen verwendet. Dabei wuchsen Col-0 Pflanzen in einem Gefäß ohne, oder aber Col Pflanzen zusammen mit 35S::*AtGLS*-Pflanzen (OE). Auf einen Großteil der Blätter wurden jeweils 2 µl *Botrytis cinerea* Sporenlösung (1×10^6 Sporen/ml) getropft. Die Bilder wurden 48 h nach der Infektion aufgenommen.

A: Vergleich unbehandelte 35S::*AtGLS*-Pflanze (rechts) mit Col-0 (links), B: Infizierte Col-0 (48 hpi), mit 35S::*AtGLS*-Pflanzen kultiviert, C: Col-0 (48 hpi), ohne 35S::*AtGLS*-Pflanzen kultiviert

Alle infizierten Blätter zeigen 48 h nach dem Auftropfen der Sporen eine starke Reaktion auf den Pilz. Die Zellen, die in Kontakt mit der Sporenlösung gebracht wurden sowie einige mm von der Infektionsstelle entfernt, sind abgestorben. Bei den mit 35S::*AtGLS* Pflanzen kultivierten Col-0 zeigt sich nach 48 h eine starke systemische Reaktion auf den Pilz, die Blätter sind gelblich und die Blattadern treten grün hervor. Bei den nur mit Col-0 angewachsenen Pflanzen zeigt sich dieselbe Reaktion, jedoch tritt sie erst einige Stunden später auf, nach 48 h sind die meisten der systemischen Blätter noch normal grün.

Auch auf Ebene der Genexpression zeigt sich ein Unterschied zwischen den TMTT ausgesetzten infizierten Pflanzen und den infizierten Kontrollpflanzen. Erstere reagieren mit einer etwas stärkeren Expression von *PEARLI* und *PR4* auf die Induktion. Für andere TMTT induzierte Abwehrgene wie *PDF1.2* und *OSM34* zeigt sich kein Unterschied in der Expressionsstärke, eventuell muss das Experiment wiederholt werden, wobei auch frühere Zeitpunkte mit in die Untersuchung einbezogen werden sollten.

Die Mengen des exprimierten *Botrytis Aktin A* zeigen, dass die Infektion in allen Pflanzen in etwa gleich stark stattgefunden hat.

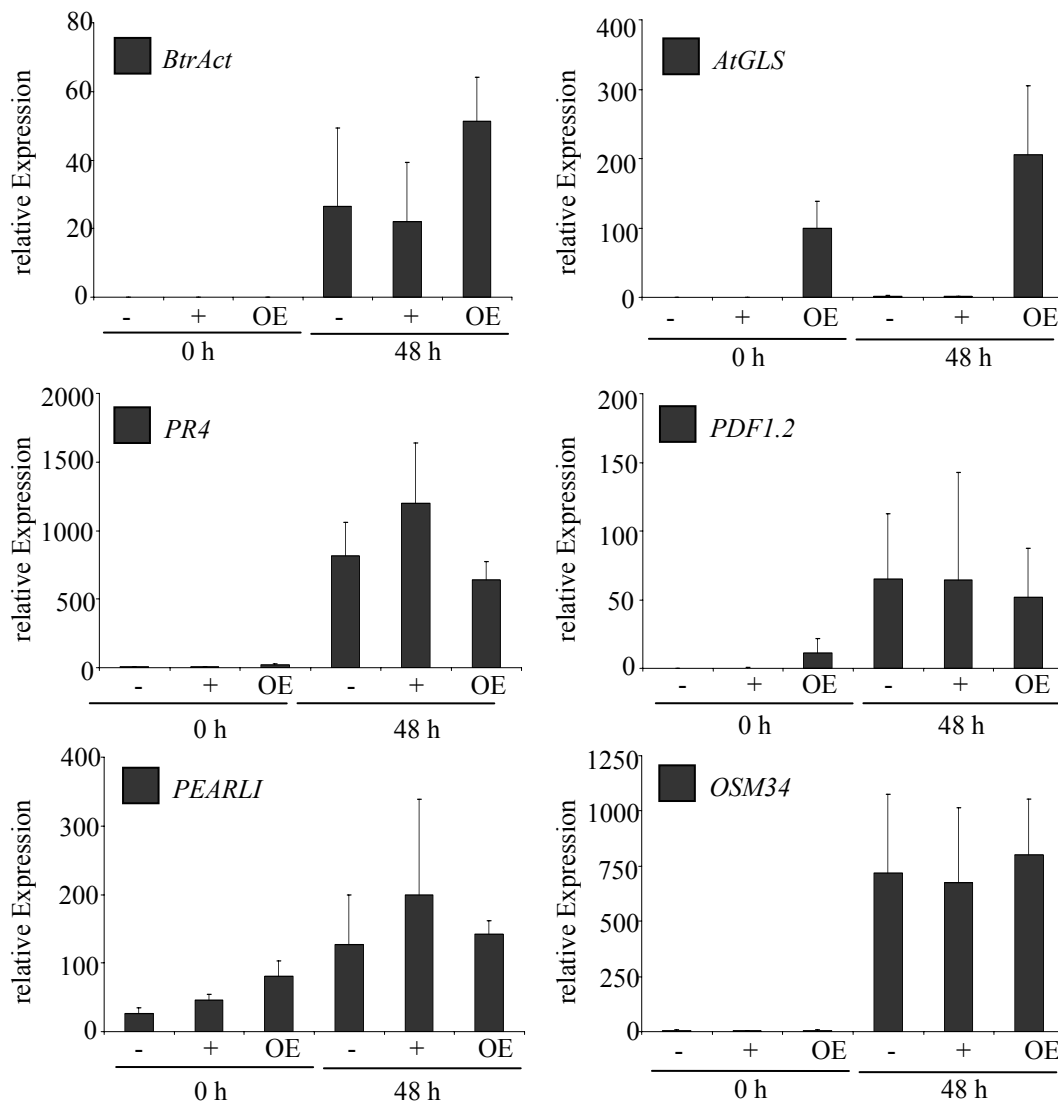


Abbildung 6.2-9: Analyse der Transkriptmengen potentiell durch TMTT induzierbarer Gene nach *B. cinerea* Infektion durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sieben Wochen alte, in geschlossenen Plastikgefäßen in steriler Erde gewachsene Pflanzen verwendet. Dabei wuchsen Col-0 Pflanzen in einem Gefäß ohne (-), oder aber Col Pflanzen zusammen mit (+) 35S::*AtGLS*-Pflanzen (OE).

Auf die Blätter wurden jeweils 2 µl *Botrytis cinerea* Sporenlösung (1×10^6 Sporen/ml) getropft und zu den angegebenen Zeitpunkten die gesamten Rosetten geerntet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von drei biologischen Replikaten.

6.2.6 Einfluss von *AtGLS*-Überexpression auf *Plutella xylostella* induzierte Abwehrgene

Da die *AtGLS*-Expression durch Fraß von *Plutella xylostella* Larven induziert wird und auch einige der durch TMTT induzierten Gene durch Raupenfraß induziert werden, ist möglich, dass TMTT in Nachbarpflanzen zu einer erhöhten Resistenz gegen Raupen führt. Um zu untersuchen ob dies zutrifft, wurden Col-0 Pflanzen allein sowie gemeinsam mit

35S::*AtGLS*-Pflanzen in sterilen Plastikgefäßen angezogen. Nach sieben Wochen wurden die Pflanzen mit Larven von *Plutella xylostella* besetzt.

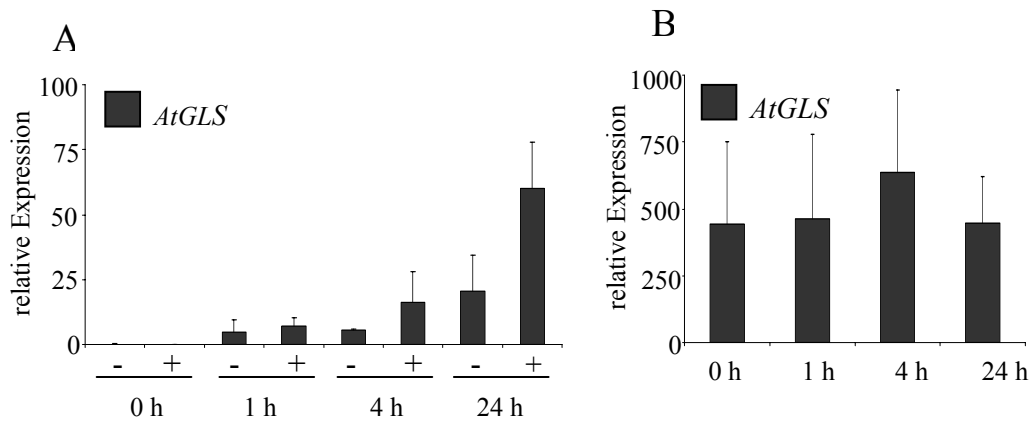


Abbildung 6.2-10: Analyse der Transkriptmengen des *AtGLS*-Gens nach Infektion mit *Plutella xylostella* durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sieben Wochen alte, in geschlossenen Plastikgefäßen in steriler Erde gewachsene Pflanzen verwendet. Dabei wuchsen Col-0 Pflanzen in einem Gefäß ohne (-), oder aber Col-0 Pflanzen zusammen (+) mit 35S::*AtGLS*-Pflanzen. Auf eine Rosette wurden 3-4 *Plutella*-Larven gesetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten die gesamten Rosetten geerntet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei biologischen Replikaten. A: Col-0 Pflanzen mit (+) und ohne (-) in einem Gefäß angezogen, B: 35S::*AtGLS*-Pflanzen

Bereits 4 h nach Befall durch *P. xylostella* Raupen zeigen sich erhöhte *AtGLS*-Transkriptmengen in Col-0 Pflanzen, die während ihrer Anzucht und während des Versuches den Volatilen der 35S::*AtGLS*-Pflanzen ausgesetzt waren. Auch nach 24 h sind die Transkriptmengen der *AtGLS* in den TMTT ausgesetzten Pflanzen ungefähr doppelt so hoch wie in den Col-0-Pflanzen, die nur unter anderen Col-0 Pflanzen angezogen wurden. Für das *AtGLS*-Gen konnte also zu den untersuchten Zeitpunkten ein deutliches *priming* nachgewiesen werden.

Auch für die durch TMTT induzierten Gene wurde untersucht, ob sie sich ähnlich wie die *AtGLS* verhalten. Bis jetzt konnte lediglich für das *GLP3*-Gen ein *priming*-Effekt nachgewiesen werden. Germin sind Pflanzenproteine, die in dem Darm von Herbivoren stabil bleiben und für die gezeigt werden konnte, dass sie an der aktiven Abwehr gegen Fraßfeinde beteiligt sind (Lou and Baldwin, 2006)

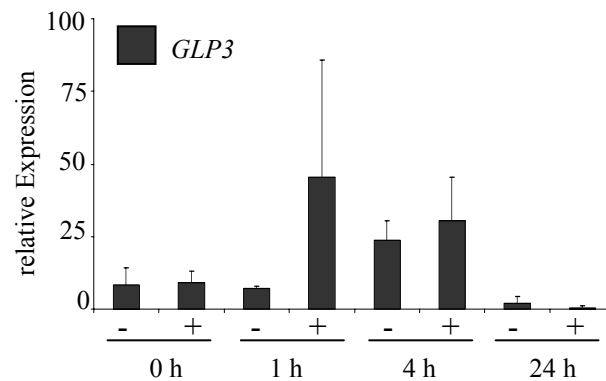


Abbildung 6.2-11: Analyse der Transkriptmengen des *GLP3*-Gens nach Infektion mit *Plutella xylostella* durch Real-time-RT-PCR

Es wurden sieben Wochen alte, in geschlossenen Plastikgefäßen in steriler Erde gewachsene Pflanzen verwendet. Dabei wuchsen Col-0 Pflanzen in einem Gefäß ohne (-), oder aber Col-0 Pflanzen zusammen (+) mit *35S::AtGLS*-Pflanzen. Auf eine Rosette wurden 3-4 *Plutella* Larven gesetzt und zu den angegebenen Zeitpunkten die gesamten Rosetten geerntet. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung von mindestens drei biologischen Replikaten.

Für die anderen durch TMTT induzierten Gene konnte bisher kein *priming* belegt werden, untersucht wurden *OSM34*, *PDF1.2*, *PR4* und *PEARLI*. Es ist möglich, dass hierfür andere, physiologischere Bedingungen (zum Beispiel unsterile Anzucht) oder auch andere Zeitpunkte geeigneter sind. Da die Pflanzen sieben Wochen lang den Volatilen der *AtGLS*-Überexprimierern ausgesetzt waren, ist möglich, dass die Pflanzen schon viele ihrer Ressourcen verbraucht haben und die Abwehr unterdrückt wird, um Ressourcen für Entwicklungsprozesse, wie zum Beispiel Blühen und Entwicklung der Samen, aufzusparen.

Möglicherweise ist es günstiger, die Pflanzen getrennt von den Überexprimierern anzuziehen und erst wenige Tage vor dem Besetzen mit den Raupen dem TMTT auszusetzen.

7 Diskussion

7.1 Differentielle Regulation zweier Terpensynthesen

Zielsetzung dieser Arbeit war unter anderem, in einer funktionellen Gruppe, den Terpensynthesen, die Modulation des JA-Signalweges zu demonstrieren und zu charakterisieren, wie es zu dieser Modulation kommt.

Dabei wurde zunächst untersucht, ob es eine differentielle Genexpression innerhalb der Terpensynthesen von *Arabidopsis thaliana* gibt, anschließend wurde in Experimenten mit Phytohormonbiosynthese- und Signalkaskademutanten untersucht, welchem Mechanismus diese Modulation unterliegt.

Terpensynthesen wurden als Beispiel für diese Analyse ausgewählt, weil es in der Lima-Bohne bereits Belege für differentielle Induktion von Mono- beziehungsweise Diterpensynthesen gibt (Engelberth et al., 2001). Des Weiteren ist in bisherigen Studien aufgefallen, dass das Duftprofil von *Arabidopsis thaliana* nach zwei verschiedenen Stressoren (Alamethicinbehandlung und *Plutella xylostella* Infektion) differiert. Alamethicinbehandlung von abgeschnittenen Blättern führt zur Emission von TMTT und alpha-Farnesen, während der Fraß durch *Plutella xylostella* nur zur Emission von TMTT führt (Herde, 2006).

In *Arabidopsis thaliana* gibt es 40 Terpensynthasegene, von denen acht als Pseudogene beschrieben sind (Aubourg et al., 2002). Von diesen 32 Terpensynthesen sind lediglich vier durch Alamethicin induzierbar: Die *AtGLS* (*At1g61120*), *At4g16730*, *At4g16740/TPS4* und *At2g24210* (Tholl, persönliche Kommunikation). Es stellt sich die Frage, ob diese wenigen induzierbaren Terpensynthesen einer unterschiedlichen Regulation unterliegen und somit von der Pflanze differentiel exprimiert werden können. Damit hätte die Pflanze die Möglichkeit, auf unterschiedliche biologische Reize mit der Emission von unterschiedlichen Terpenen zu reagieren. Diese Duftspektren könnten dann von Insekten oder Pflanzen wahrgenommen werden, die dann je nach Zusammensetzung unterschiedlich reagieren.

Für drei dieser Terpensynthesen wurde bereits eine Funktion gefunden: *AtGLS* ist verantwortlich für die Produktion von TMTT (Herde, 2006). *At2g24210* wurde als

Myrcen/Ocimen-Synthase charakterisiert (Bohlmann et al., 2000), At4g16740/TPS4 wurde als Ocimen-Synthase beschrieben (Faldt et al., 2003). At3g16730 hat im Col-0 Ökotyp ein Stoppcodon, was vermutlich dazu führt, dass das Enzym in diesem Ökotyp inaktiv ist (Petri, 2003).

Dies würde bedeuten, dass keines der durch Alamethicin induzierten Transkripte für eine Farnesen-Synthase kodiert. Ein Widerspruch ist jedoch, dass das Transkript von *TPS4* in Col-0 durch Alamethicin induzierbar ist, jedoch in diesem Ökotyp im Vergleich zu No-0 (Faldt et al., 2003) nie Emission von Ocimen nach Alamethicingabe gemessen wurde (Dorothea Tholl, persönliche Kommunikation). Deshalb ist möglich, dass *TPS4* in dem Col-0 Ökotyp eventuell durch unterschiedliche Lokalisation im Vergleich zum No-0 Zugang zu anderen Vorstufen besitzt und deshalb in diesen Pflanzen für die Emission von Farnesen nach Alamethicingabe verantwortlich ist (Dorothea Tholl, persönliche Kommunikation).

In dieser Arbeit hat sich stets eine Korrelation zwischen der Emission von alpha-Farnesen und *TPS4*-Transkript gezeigt, weshalb im folgenden davon ausgegangen wird, dass das Transkript für ein Enzym codiert, welches für Farnesenemission verantwortlich ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *TPS4* und *AtGLS* in der Tat eine differentielle Induzierbarkeit aufweisen. Analog zu den Beobachtungen im Duftspektrum zeigte sich, dass beide Terpensynthasen durch Alamethicin in abgeschnittenen Blättern induzierbar sind, aber nur die Transkripte der *AtGLS* durch Befall mit *Plutella xylostella* Raupen (Abbildung 6.1-1). Dennoch zeigte sich in weiteren Untersuchungen, dass ein Signalweg für die Induktionen der beiden Synthasen verantwortlich ist. Für *AtGLS* wurde bereits gezeigt, dass der Oktadekanoidweg von entscheidender Bedeutung ist, sowohl die Biosynthese von Jasmonsäure ist hier von Bedeutung als auch die Signalkaskade über das COI1-Protein (Herde, 2006). Für die *TPS4* wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Mutanten in der JA-Biosynthese mit Alamethicin nicht mehr induzierbar sind (Abbildung 6.1-2). Dies demonstriert also am Beispiel der Terpensynthasen, dass es innerhalb des JA-Weges zu einer Modulation der Antwort kommt.

7.2 Einfluss der unterschiedlichen Modulationsmechanismen auf die Expression der Terpensynthasen durch Alamethicin

Es sind in der Literatur bereits mehrere Mechanismen beschrieben, die es der Pflanze erlauben, auf einen bestimmten Stress mit der differentiellen Expression von Abwehrgenen zu reagieren. Eine Möglichkeit ist, dass die Signalwege nicht nur unabhängig voneinander Genexpression induzieren, sondern sich gegenseitig beeinflussen (siehe auch 3.4). Diese Beeinflussung ist bereits für viele Pflanzenhormone beschrieben worden. So konnte mit Hilfe eines genomweiten Ansatzes in diversen Mutanten gezeigt werden, dass es mehrere Gruppen von Genen gibt, die sich in der Beeinflussung durch die verschiedenen Phytohormone unterscheiden (Glazebrook et al., 2003). Ein anderer Mechanismus, innerhalb eines Signalweges zu Unterschieden in der Genexpression zu führen, liegt darin, dass frühe und späte Intermediate eines Pflanzenhormons unterschiedliche Signalwirkung besitzen können. Dies wurde innerhalb des Oktadekanoidweges als Oxilipin-Signatur beschrieben. Frühe Oxilipine, insbesondere OPDA, haben in *Arabidopsis* eine Aktivität in der Resistenz gegen Herbivore, nicht aber die Aktivität von JA in der Fertilität gezeigt (Stintzi et al., 2001). Diese Experimente wurden in der *opr3*- Mutante von *Arabidopsis* durchgeführt, die unterhalb von OPDA in der Jasmonsäurebiosynthese blockiert ist.

Die dritte Möglichkeit für eine Pflanze, nur eine gewisse Teilmenge an durch ein bestimmtes Phytohormon induzierbaren Genen zu exprimieren, liegt in der Menge des Phytohormones, welches für die Induktion der Gene benötigt wird. So könnte zum Beispiel die Menge eines Oxylipins über die Expression von Gengruppen bestimmen. Das einzige JA-Derivat, welches effektiv zum Abbau von Repressoren über COI1 führt, ist JA-ILE. Weder OPDA noch JA oder MeJA haben zur Interaktion des Repressors JAZ1 mit dem COI1-Protein geführt (Thines et al., 2007). Es ist möglich, dass andere JAZ-Faktoren eine geringere Affinität zu COI1 haben und deshalb mehr JA-ILE zum Abbau benötigen, so also die vorhandenen Mengen an JA-ILE und die unterschiedlichen Sensitivitäten der JA-induzierbaren Gene über das Induktionsmuster entscheiden.

Um zu testen, ob die differentielle Expression der Terpensynthasegene *TPS4* und *AtGLS* durch Interaktion der Phytohormone JA, SA, ET und ABA zustande kommt, wurden Biosynthese- und Signalwegmutanten dieser Hormone für Induktionen mit Alamethicin verwendet. Dabei zeigte sich, dass die Transkripte beider Terpensynthasen nach

Alamethicingabe durch SA nicht beeinflusst wurden. Dagegen zeigt *TPS4* im Gegensatz zu *AtGLS* (Herde, 2006) eine starke Abhängigkeit von Ethylen; die Terpensynthese ist in der *ein2*-Mutante ebenso wenig durch Alamethicin induzierbar wie in JA-Biosynthesemutanten (Abbildung 6.1-3). Dies passt sehr gut zu dem Befund, dass *TPS4* im Gegensatz zur *AtGLS* bei der Induktion durch Alamethicin auf einen Verletzungsreiz angewiesen ist. Da durch Verletzung Ethylen gebildet wird (Leon et al., 2001; Van Zhong and Burns, 2003), könnte die Anwesenheit von Ethylen ursächlich für den Unterschied in der *AtGLS* und *TPS4*-Expression sein.

Die Induktion der Terpensynthesen durch frühe Oktadekanoide kann praktisch ausgeschlossen werden. Versuche in der *acx*-Mutante haben für beide Terpensynthesen gezeigt, dass OPDA alleine nicht ausreicht, um eine der beiden *TPS* zu induzieren (Abbildung 6.1-2, Herde 2006). Hier gibt es also deutliche Unterschiede zu der Lima-Bohne. Die einzige Möglichkeit wäre, dass eine Kombination von OPDA und JA notwendig ist, um eine der beiden Synthesen zu induzieren. Da die *acx*-Mutanten noch in der Lage sind, geringe JA-Mengen zu synthetisieren, was sich zum Beispiel an ihrer partiellen Fertilität zeigt, ist dies sehr unwahrscheinlich. Außerdem haben Experimente mit gleichzeitiger Gabe von OPDA und JA diese Hypothese widerlegt (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Modulationsmöglichkeit liegt in den unterschiedlichen Mengen an JA-ILE, die für die Induktion der jeweiligen Gene benötigt werden. Titrationsexperimente mit JA-ILE und Coronatin haben jedoch gezeigt, dass es zwar deutliche Unterschiede in der Expression von *VSP2* und den Terpensynthesen bei Induktion mit geringen Konzentrationen von JA-ILE gibt, *VSP2* also deutlich sensitiver auf JA-ILE reagiert als die beiden Terpensynthesen. Die beiden Terpensynthesen zeigen jedoch eine sehr ähnliche Induzierbarkeit (Abbildung 6.1-9, Abbildung 6.1-10). Deshalb ist die unterschiedliche Sensitivität vermutlich kein Mechanismus der Pflanze, um die beiden Terpensynthesen differentiell zu induzieren.

7.3 *Plutella xylostella* induziert die Expression der Terpensynthesen im Gegensatz zu *Pseudomonas syringae* differentiell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Transkript von *TPS4* zwar genau wie Transkript von *AtGLS* durch den Befall mit *Pseudomonaden* induziert wird (Abbildung 6.1-8), jedoch nicht durch Befall mit dem Herbivoren *Plutella xylostella* (Abbildung

6.1-1). Dies kann daran liegen, dass Pseudomonaden Coronatin als ein wichtiges Signal produzieren, welches für die Expression beider Terpensynthesen ausreichend ist (Abbildung 6.1-9), während Raupen ein anderes Signal auslösen, was nur für *AtGLS*-Induktion hinreicht, nicht aber für *TPS4*, die noch auf ein anderes Signal angewiesen ist. Für diese Hypothese würde sprechen, dass *TPS4* ein Gen ist, welches im Gegensatz zur *AtGLS* auf die Ethylensignalkaskade angewiesen ist (Abbildung 6.1-3). Andererseits verletzen Raupen die Pflanzen während des Fressens sogar kontinuierlich, was zumindest lokal zu einer Akkumulation von Ethylen führen sollte; diese lokale Verletzung würde für eine Alamethicininduktion der *TPS4* ausreichen (Abbildung 6.1-6). Eine weitere Möglichkeit, warum der Verletzungsreiz durch das Fressen nicht ausreicht, könnte in der späten Kinetik der *TPS4*-Transkription liegen (Abbildung 6.1-14). Eventuell fressen die Raupen die induzierten Zellen auf, bevor der Reiz zur Induktion des *TPS4*-Gens führen kann.

Die zweite Hypothese wäre, dass Raupen ein bestimmtes Signal auslösen, welches beide Synthesen induziert, in den mit Raupen behandelten Pflanzen nur ausreichende Menge für *AtGLS*-Expression produziert werden, diese Mengen aber nicht für *TPS4* ausreichen. Dann müsste das von Raupen ausgelöste Signal jedoch qualitativ anders sein als Coronatin, da das *TPS4*-Transkript gleich sensitiv auf Coronatin reagiert wie das *AtGLS*-Transkript (Abbildung 6.1-10).

Eine andere Hypothese wäre, dass Raupen zwar alle Signale in ausreichender Quantität für *TPS4*-Expression generieren, aber zusätzlich ein weiteres, welches die *TPS4*-Expression aktiv drückt. Da Raupen auch in SA-defizienten Mutanten keine Genexpression von *TPS4* auslösen, und Alamethicin zu hohen Mengen an SA führt und trotzdem *TPS4* induziert, ist dieses drückende Signal nicht SA. Auch Ethylen und ABA haben keinen drückenden Einfluss auf *TPS4*-Expression, was Mutantenexperimente mit *Plutella xylostella* Infektion gezeigt haben (Abbildung 6.1-4). Dadurch wäre eine Kombination aus der ersten und der dritten Hypothese wahrscheinlich: Wenn Raupen eventuell trotz ihrer Verwundung der Blätter die Induktion der Ethylenkaskade aktiv drücken würden oder durch die Art der Verwundung Ethylenproduktion nicht auslösen, würde dies den Unterschied zwischen *AtGLS* und *TPS4* in *Plutella xylostella* behandelten Proben erklären. Dazu gibt es Hinweise, die zeigen konnten, dass nach *Pseudomonaden*-Infektion die Ethylenmengen der Pflanze wesentlich stärker ansteigen als nach Befall mit dem Herbivoren *Pieris rapae* (De

Vos et al., 2005). Pseudomonaden führten zu einer deutlichen Induktion der auf JA und Ethylen basierenden Abwehrgene *PDF1.2* und *PR4*, *Pieris rapae*-Befall dagegen erhöht die Transkriptmengen der beiden Gene nicht. Damit ist *TPS4* im Gegensatz zu *AtGLS* teilweise co-reguliert mit *PDF1.2* und *PR4*, jedoch zeigt sich ein Unterschied in der SA-abhängigen Repression von *PDF1.2*.

7.4 Welche Reize sind für die Induktion der Terpensynthasen ausreichend?

Um einen Hinweis zu bekommen, ob die beschriebenen Signalwege nicht nur notwendig, sondern auch hinreichend sind, wurde getestet, ob exogenes JA und Ethylen in der Lage sind, die Expression von *AtGLS* und *TPS4* zu induzieren. Dabei zeigte sich, dass MeJA nur in Kombination mit Ethylen die *TPS4* induzieren kann (Abbildung 6.1-5). Dieses Ergebnis unterstreicht, dass die Anwesenheit von Ethylen zwischen der Expression von *AtGLS* und *TPS4* diskriminiert.

Interessanterweise können sowohl Coronatin als auch Coronalon im Gegensatz zu MeJA die Anwesenheit von Ethylen ersetzen (Abbildung 6.1-9). Da die *PDF1.2*- und *PR4*-Expression nach Gabe von Coronatin jedoch nicht höher als in der Kontrolle ist (Abbildung 6.1-11), ist wahrscheinlicher, dass Coronatin einen anderen Mechanismus als MeJA und Alamethicin aktiviert, der auch unabhängig von Ethylen zur Induktion des *TPS4*-Gens führt. Weitere Evidenz für diese Hypothese könnte eine Behandlung der *ein2*-Mutante mit Coronatin liefern. Eine Induktion des *TPS4*-Transkriptes unter diesen Bedingungen würde die hier vorgestellte Hypothese unterstützen.

Für die Expression der *AtGLS* sind weder Ethylen noch Methyljasmonat alleine oder in Kombination ausreichend, um zur Genexpression zu führen. So stellt sich die Frage, ob es ein weiteres benötigtes Signal gibt oder ob hier die unterschiedlichen Sensitivitäten eine Rolle spielen. Lokal ist Verwundung zumindest transient ein ausreichendes Signal für *AtGLS*-Induktion (Abbildung 6.1-13). Eventuell würde eine kontinuierliche Verwundung ausreichen, um *AtGLS* auch dauerhaft zu induzieren. Es konnte gezeigt werden, dass kontinuierliche Verwundung allein ausreicht, um eine Genexpression zu erreichen, die der nach Herbivorenbefall stark ähnelt (Mithofer et al., 2005). Sollte dies der Fall sein, ist es unwahrscheinlich, dass hohe JA-ILE Gehalte allein für Induktion der *AtGLS* ausreichen, da sowohl JA als auch JA-ILE sehr früh nach Verletzung steigen und noch 8 h nach

Verletzung auf einem hohen Niveau bleiben (Suza et al., 2008), zu den Zeitpunkten, wenn *AtGLS*-Transkript schon wieder auf uninduzierte Mengen abgesunken ist.

7.5 Modell zu der Induktion der *AtGLS*

Für die Expression der *AtGLS* werden ein funktioneller Oktadekanoidweg sowie ein funktionelles COI1-Protein benötigt (Herde, 2007). Kein anderes Phytohormon hat einen Einfluss auf die Induktion dieser Terpensynthese gezeigt. JA und JA-ILE sind keine starken Induktoren der *AtGLS*-Transkription (Abbildung 6.1-10), obwohl die Induzierbarkeit durch Cycloheximid in Abhängigkeit des COI1-Proteins vermuten lässt, dass die *AtGLS* einer ähnlichen Regulation unterliegt wie die *JAZ*-Repressoren. Verletzung wirkt nur in Anwesenheit des MYC2-Faktors induzierend (Abbildung 6.1-16), andere Reize wie Alamethicin, CHX und *Plutella*-Fraß dagegen wirken auch in Abwesenheit von MYC2. Der MYC2 Transkriptionsfaktor ist in der Lage, diverse JA-abhängige Antworten in der Pflanze zu modulieren. So zeigte sich, dass er ein negativer Regulator der JA-abhängigen Indol-Glucosinolat-Synthese ist, sich gleichzeitig aber positiv auf die ebenfalls durch JA induzierte Abwehr gegen Insekten wie *Helicoverpa armigera* und die Expression von Abwehrgenen wie *VSP1* und *VSP2* auswirkt. Insgesamt gibt es Hinweise darauf, dass MYC2 die Antwort auf JA moduliert, indem er unterschiedliche Gruppen von Transkriptionsfaktoren entweder aktivierend oder reprimierend im JA-Signalweg differentiell reguliert (Dombrecht et al., 2007).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich folgern, dass der Promotor des *AtGLS*-Gens mindestens zwei verschiedene Bereiche besitzt, die für die Aktivierung wichtig sind. Einer davon wird durch den MYC2 oder einen von MYC2 positiv regulierten Transkriptionsfaktor aktiviert. Die Schnelligkeit der Wundinduktion lässt vermuten, dass der MYC2 selbst beteiligt ist und kein anderer Faktor gebildet werden muss. Ein anderer Bereich des Promotors wird durch einen MYC2-unabhängigen Faktor aktiviert, der nur durch Reize wie Alamethicin und *P. xylostella* an den Promotor binden kann, aber nicht durch Verletzung. Ein möglicher Mechanismus für die Aktivierung des *AtGLS*-Promotors ist in den folgenden Abbildungen dargestellt.

Vermutlich werden beide Aktivatoren im uninduzierten Zustand der Pflanze durch Repressoren gebunden, die beide COI1-abhängig abgebaut werden können.

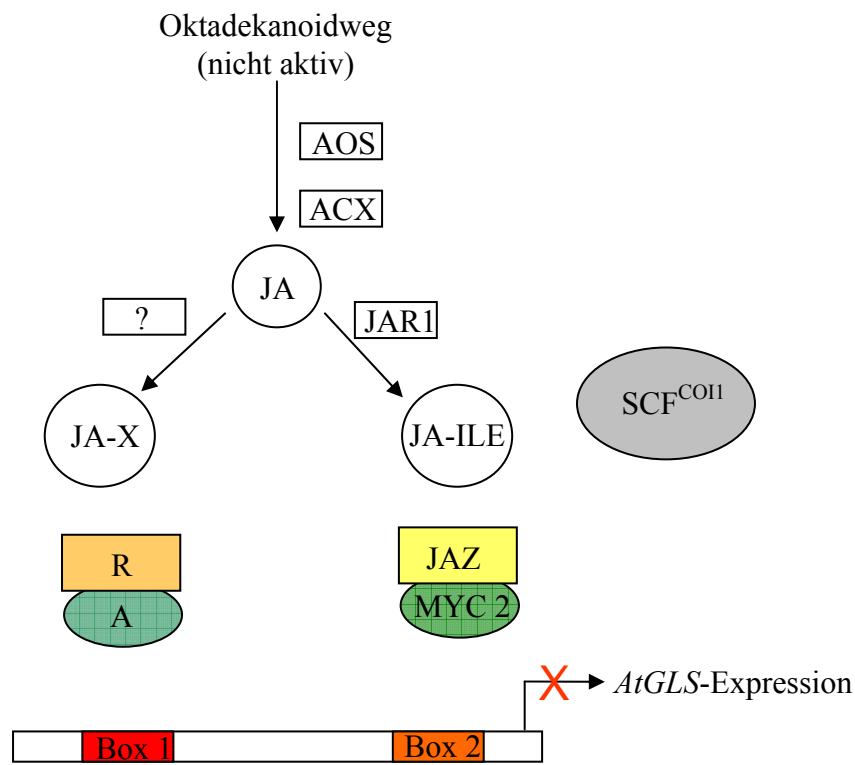


Abbildung 7.5-1: Modell zur Induktion der *AtGLS*, uninduzierter Zustand des Promotors

In der ungestressten Pflanzenzelle ist der Oktadekanoidweg nicht aktiv und die Mengen an Jasmonaten in der Zelle sind dementsprechend gering. Der Promotor der *AtGLS* besitzt zwei Elemente, an die Aktivatorn binden können, beide sind jedoch nicht besetzt. An die Box 1 kann ein postulierter Aktivator A binden, an die Box 2 der MYC2-Transkriptionsfaktor. Der MYC2-Faktor wird durch den JAZ-Repressor gebunden, der den Aktivator A durch einen unbekanntem Repressor R, der vermutlich auch zu der JAZ-Faktorfamilie gehört, reprimiert. Durch das Fehlen von Jasmonaten in der Zelle kann keiner der Repressoren an das COI1-Protein binden und abgebaut werden.

Durch einen Verletzungsreiz wird der Oktadekanoidweg induziert und JA akkumuliert in der Zelle. Entweder durch die Akkumulation von JA oder aber auch durch den Verletzungsreiz wird das JAR1-Protein aktiv und JA zu dem JA-Derivat JA-ILE konjugiert. Ob JAR1 dafür erst aktiviert werden muss oder ob die Regulation einfach auf dem zur Verfügungstellen von Edukten beruht, ist nicht zu beantworten. Eventuell sind hier außer JAR1 auch noch andere Enzyme beteiligt, die JA an Aminosäuren konjugieren können. JA-ILE kann den Abbau des JAZ-Repressors fördern, der den MYC2-Faktor reprimiert, ist jedoch nicht aktiv, um auch den zweiten Repressor (R) abzubauen, der den postulierten Aktivator (A) reprimiert. Deshalb steht nur der MYC2-TF zur Verfügung, um den *AtGLS*-Promotor zu aktivieren. Da sowohl die Induktion mit JA-ILE als auch mit

Verletzung nicht besonders stark im Vergleich zur Induktion mit Alamethicin ist, ist anzunehmen, dass der MYC2-TF den Promotor nur relativ schwach aktivieren kann.

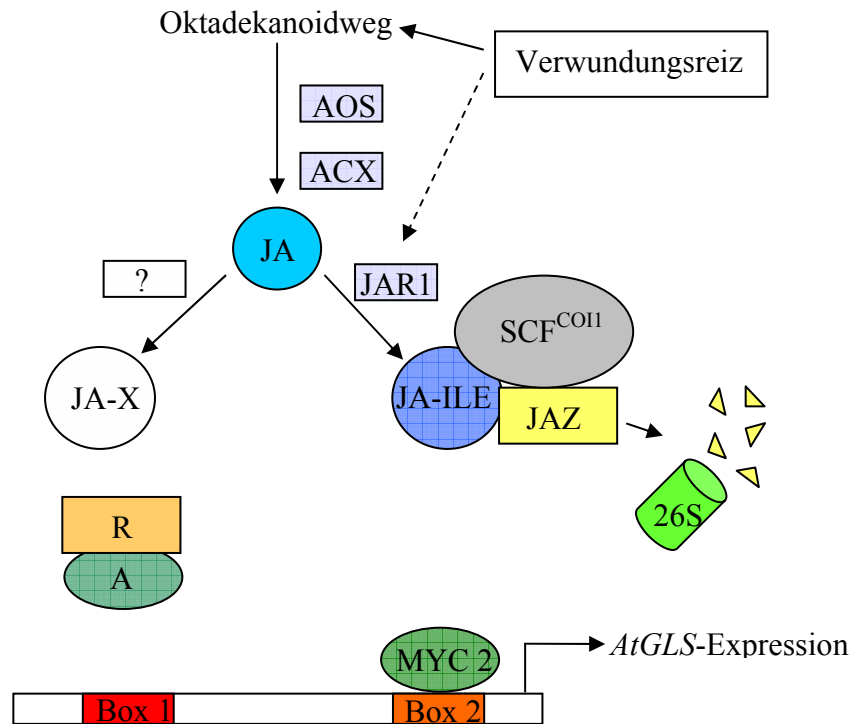


Abbildung 7.5-2: Modell zur Induktion der *AtGLS*, Induktion durch Verwundung

In einer durch Verwundung induzierten Pflanzenzelle wird der Oktadekanoidweg aktiviert und Jasmonsäure synthetisiert. Entweder durch die Verwundung oder aber allein durch das Vorhandensein der Jasmonsäure wird auch das JAR1-Protein aktiv und es akkumuliert JA-ILE in der Zelle. Durch die Anwesenheit von JA-ILE wird die Bindung des JAZ-Repressors an das COI1-Protein ermöglicht und JAZ über das 26S-Proteasom abgebaut, was den MYC2-Faktor freisetzt. Dieser bindet nun an die Box 2 des *AtGLS*-Promotors und induziert dadurch die Expression der *AtGLS*. Da der zweite Aktivator A immer noch von dem Repressor R gebunden wird, erreicht der Promotor durch Verwundung nicht seine volle Aktivierbarkeit.

Wird eine Pflanze mit Alamethicin oder *Plutella*-Fraß induziert, so werden mehrere JA-Derivate gebildet, vermutlich weil ein anderes, unbekanntes Enzym (?), das in der Lage ist, ein weiteres Derivat zu synthetisieren, aktiviert wird. Da zusätzlich auch JA-ILE gebildet wird, werden beide Aktivatoren freigesetzt und können an beide Boxen des *AtGLS*-Promotors binden, was zu einer starken Expression von *AtGLS*-Transkript führt.

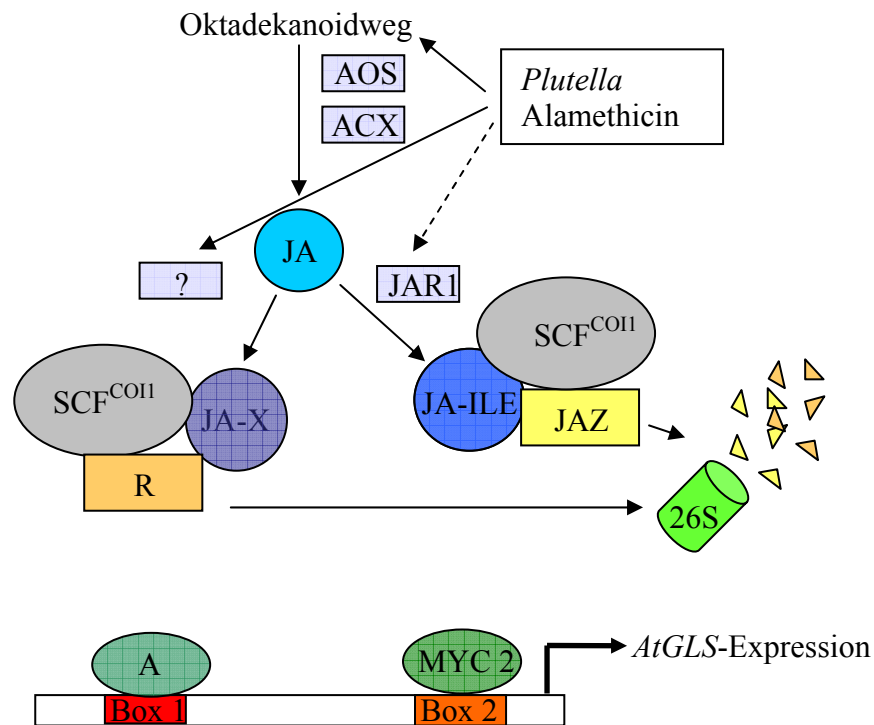


Abbildung 7.5-3 Modell zur Induktion der *AtGLS*, Induktion durch Alamethicin oder *Plutella*-Fraß

In einer durch Alamethicin/*Plutella* induzierten Pflanzenzelle wird der Oktadekanoidweg aktiviert und Jasmonsäure synthetisiert. Entweder kann das JAR1-Protein unter diesen Bedingungen nicht nur JA-ILE, sondern auch ein anderes, unbekanntes Derivat JA-X bilden, oder aber ein anderes Enzym ? wird aktiviert und produziert ein zusätzliches JA-Derivat. Dieses zweite Derivat kann die Bindung des Repressors R an das COI1-Protein vermitteln, wodurch dieser Repressor ebenfalls abgebaut wird. Dadurch liegen beide Aktivatoren frei vor, binden an die Boxen des *AtGLS*-Promotors und führen so zu einer starken Expression der *AtGLS*.

In der *JAZ1Δ3A-GUS*-transgenen Pflanze kann der JAZ1-Faktor nicht mehr abgebaut werden. Deshalb führt Alamethicin nur noch zur Freisetzung des Aktivators (A), weshalb die Induktion immer noch stark ist, aber ein wenig schwächer, als in Col-0 Pflanzen, in denen beide Aktivatoren binden können (Abbildung 6.1-18).

Coronatin ist vermutlich beiden JA-Derivaten strukturell ähnlich, sowohl JA-ILE als auch JA-X. Deshalb führt Coronatin in Col-0 Pflanzen zu einer starken Induktion des *AtGLS*-Transkriptes (Abbildung 6.1-9), da beide Repressoren in der Gegenwart von Coronatin abgebaut werden können. In der *jin*-Mutante fehlt der MYC2-TF, deshalb kann nur der Aktivator (A) binden und die Induktion mit Coronatin ist ein wenig geringer als im Col-0 Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Ein ähnlicher Effekt wäre auch für die

Alamethicininduktion in der *jin*-Mutante zu erwarten, da auch dann nur der Aktivator A an den Promotor binden kann. Hier konnte gezeigt werden, dass die Induktion des *AtGLS*-Transkripts jedoch in Col-0 Pflanzen und *jin*-Mutanten durch Alamethicin gleich stark ist (Abbildung 6.1-16). Vermutlich ist die Induktion durch den zweiten Faktor so gering, dass dieser Effekt durch die natürlichen Schwankungen, denen die Alamethicininduktion unterliegt, nicht mehr zu erkennen ist. Dasselbe gilt für die Induktion mit *Plutella*-Larven; der Unterschied in der Induktionsstärke durch unterschiedlich guten Fraß ist stärker, als der Effekt durch den Wegfall des MYC2-Faktors (Abbildung 6.1-17).

7.6 *TPS4*-Expression im Vergleich zur *AtGLS*-Expression

Die Ergebnisse dieser Arbeit führen zu der Annahme, dass der *TPS4*-Promotor im Gegensatz zum *AtGLS*-Promotor eine komplexere Regulation aufweist, die aber unterschiedlich zur *PDF1.2*-Regulation ist. Da die Integration vieler verschiedener Signale möglicherweise zur Modulation der JA-Antwort beiträgt, ist die *TPS4* ein gutes Modell, an deren Beispiel Prinzipien zur Modulation aufgezeigt werden können.

Zusätzlich zu den bereits genannten Prinzipien zeigte sich in dieser Arbeit, dass sich *AtGLS* und *TPS4* noch in anderen Spezifikationen unterscheiden. So ist *AtGLS* ein primäres, früh induzierbares Gen, während *TPS4* ein sekundäres Gen ist, was sich auch in seiner späteren Induzierbarkeit widerspiegelt (Abbildung 6.1-15). Es ist wahrscheinlich, dass die *TPS4* durch einen ähnlichen Mechanismus induziert wird wie die *AtGLS*, also ebenfalls der Abbau eines Repressors oder mehrerer Repressoren über das COI1-Protein beteiligt ist. Da auch für die *TPS4* JA-ILE nur ein schwacher Induktor ist (Abbildung 6.1-10), ist gut möglich, dass auch hier dasselbe unbekanntes Derivat JA-X eine wichtige Rolle spielt. Zusätzlich ist für die Induktion der *TPS4* jedoch noch die Biosynthese eines Transkriptionsfaktors nötig, da nach CHX-Gabe keine Induktion durch Coronalon oder Alamethicin mehr möglich ist. Da *TPS4*-Transkription noch auf die Ethylensignalkaskade über das EIN2-Protein angewiesen ist (Abbildung 6.1-3), ist möglich, dass die Biosynthese dieses Transkriptionsfaktors durch einen Ethylenreiz induziert wird.

7.7 TMTT spielt eine Rolle in Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation

TMTT ist ein in vielen Pflanzen vorkommendes Terpen, welches häufig nach einem Befall mit einem Herbivoren emittiert wird, so zum Beispiel in der Lima-Bohne, in Tomate und in *Arabidopsis thaliana* (Hopke et al., 1994; Van Poecke et al., 2001; Ament et al., 2004). In der Lima-Bohne konnte bisher eine Rolle für TMTT in der Pflanzen-Insekten Kommunikation nachgewiesen werden. Eine Raubmilbe (*Phytoseiulus persimilis*) wird dabei eindeutig stärker von Pflanzen angezogen, die mit ihrer Beute (*Tetranychus urticae*) infiziert waren, als von durch andere Herbivoren geschädigte Pflanzen. Der Unterschied im Duftprofil im Luftraum über den Pflanzen bildet dabei die unterschiedlichen Mengen an TMTT. Exogene Gabe von TMTT wiederum führte dazu, dass auch nicht von *T. urticae* befallene Pflanzen die Raubmilbenart anlockten (De Boer et al., 2004). Dies zeigt, dass TMTT eine bedeutende Rolle in der Herbivoren-Abwehr durch tritrophe Interaktion spielt. In *A. thaliana* konnte in Kooperation mit R. Mumm (Universität Wageningen, Niederlande) in vorläufigen Studien gezeigt werden, dass die T-DNA-Insertionslinien von *AtGLS* verglichen mit dem Wildtyp eine geringere Attraktion auf den Parasitoid *Cotesia rubecula* ausüben (Mumm, unveröffentlicht).

In der Lima-Bohne wurde eine Rolle für TMTT in der Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation nachgewiesen. Inkubiert man Blätter der Lima-Bohne mit TMTT, so lässt sich die Expression von Resistenzgenen wie *PR2* und *PR3* (Arimura et al., 2000) nachweisen.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass von *35S::AtGLS*-Pflanzen emittierte Düfte ausreichen, um in Nachbarpflanzen Gen-Expression auszulösen. Dafür reichte ein Versuchsansatz, der den in der Natur vorkommenden Bedingungen in vielen Aspekten ähnelt, aus, bei dem Überexprimierer neben Wildtyppflanzen auf einem Tablett gemeinsam angezogen wurden (Abbildung 6.2-4). Die emittierten Duftmengen der Wildtyppflanzen entsprechen dabei in etwa den Mengen, die auch nach Befall mit dem Herbivoren *Plutella xylostella* emittiert werden (Herde, 2006).

Vergleicht man, welche Arten von Gengruppen gemessen an ihrem Vorkommen in dem Genom von *Arabidopsis thaliana* überrepräsentiert sind, so fällt auf, dass dazu stressinduzierbare, auf biotischen oder abiotischen Stimulus responsive und an anderen biologischen Prozessen beteiligte Gene gehören (Abbildung 6.2-2).

Lässt man sich die überrepräsentierten Gengruppen weiter nach ihrer Funktion aufschlüsseln, so erhält man vor allem *cluster* bei Kältestress, osmotischem Stress und Abwehr der Pflanze, vor allem gegen Pilze (Ruepp et al., 2004; Zimmermann et al., 2004). Die reproduziert induzierten Gene sind unter anderem *PDF1.2*, *OSM34*, *GLP3* und *PEARLI*, aber auch die Expression von *AtGLS* selbst.

Um zu untersuchen, ob das von *AtGLS* produzierte Geranylinalool oder das Abbauprodukt TMTT für die Genexpression in Nachbarpflanzen verantwortlich ist, wurde exogenes TMTT mit Wildtyppflanzen in geschlossenen Gläsern inkubiert. Dabei zeigte sich, dass die exogene Gabe von TMTT ausreicht, um in Nachbarpflanzen zur Genexpression zu führen (Abbildung 6.2-5). Damit ist bewiesen, dass das leichtere und damit volatilere TMTT in *Arabidopsis* ein Signal ist, das von Nachbarpflanzen wahrgenommen werden kann.

Die geringen Induktionsraten der potentiellen Zielgene lässt vermuten, dass TMTT ein *priming* induzieren könnte, welches die Pflanzen dazu befähigt, schneller auf einen Pathogen oder Herbivorbefall zu reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass Volatile aus von Käfern befallenen Lima-Bohnen zu einer erhöhten Fitness in Nachbarpflanzen geführt haben. Diese haben in Feldversuchen einen schnelleren Wuchs sowie einen geringeren Schaden durch Herbivore gezeigt als Pflanzen, die den befallenen Pflanzen nicht ausgesetzt waren (Heil and Silva Bueno, 2007). Dieses Experiment zeigt, dass Volatile unter natürlichen Bedingungen ausreichen, funktionelles *priming* in Nachbarpflanzen auszulösen. Weiterhin wurde bei Heil gezeigt, dass Volatile auch in derselben Pflanze ein *priming* für Abwehrreaktionen auslösen können.

7.8 Durch TMTT induzierte Gene sind an der Abwehr gegen Pilze beteiligt

Für mehrere der TMTT-induzierten Gene ist bekannt, dass sie eine Rolle in der Pflanzenabwehr gegen Pilze spielen.

Osmotine sind basische PR5-Analoga, die zu der Familie der Thaumatine gehören. Kartoffeln, die ein Osmotin aus Tabak oder Kartoffel überexprimieren, zeigen spätere Krankheitssymptome nach Pilzinfektion als Wildtyp-Kartoffeln (Liu et al., 1994; Zhu et al., 1996). *OSM34* ist ein dazu homologes Protein aus *Arabidopsis thaliana* (Capelli (Capelli et al., 1997), weshalb es gut möglich ist, dass auch dieses Protein eine erhöhte

Resistenz gegen Pilze vermittelt, zumal es stark durch *Botrytis cinerea* induziert wird (Zimmermann et al., 2004).

Auch andere durch TMTT induzierte Gene weisen darauf hin, dass TMTT Resistenz gegen Pilze vermittelt. Eines der induzierten Gene ist *PDF1.2*, welches sowohl von Jasmonsäure-Signalwegen als auch von Ethylen abhängig ist (Penninckx et al., 1998). *A. thaliana* *PDF1.2* ist ein Pflanzen-Defensin, dessen Expression mit der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene korreliert. Das Protein wurde bereits aufgereinigt und es konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* fungizide Eigenschaften besitzt (Verburg and Huynh, 1991).

Des Weiteren wurde *PEARLI* als induziert durch TMTT gefunden. *PEARLI* ist ein Lipid-Bindeprotein, welches nach Überexpression in *Arabidopsis thaliana* in 50 % der Primärtransformanten zu einer vollständigen Resistenz gegen *Botrytis cinerea* führt (Chassot et al., 2007).

Ein weiteres durch TMTT induziertes Gen ist *PR4*. *Arabidopsis* PR-4 weist eine starke Homologie zu CBP-20, einem Tabak PR-Protein auf, welches belegte Aktivität gegen Pilze besitzt (Ponstein et al., 1994).

Insgesamt geben die durch TMTT induzierten Gene den Eindruck, dass sie in Nachbarpflanzen und eventuell auch in systemischen Blättern der TMTT emittierenden Pflanze für eine erhöhte Resistenz gegen Pilze verantwortlich sind und eventuell dazu führen können, dass die durch TMTT induzierten Pflanzen schneller und besser auf eine Pilzinfektion reagieren können.

Um zu testen, ob TMTT in Nachbarpflanzen zu einer erhöhten Resistenz gegen Pilze führt, wurden *35S::AtGLS*- und Wildtyppflanzen mit *Botrytis cinerea* infiziert.

Phänotypisch konnte man eine sehr schnelle, systemische Reaktion auf den Pilz erkennen, die bei den TMTT ausgesetzten Pflanzen schneller einsetzte als in den Kontrollpflanzen, die nur mit anderen Col-0 zusammen gewachsen sind. Nach 48 h hatten viele systemische Blätter der TMTT ausgesetzten Pflanzen eine gelbliche Färbung mit dunkel abgesetzten Blattadern, in den Kontrollpflanzen zeigten erst einige Blätter diese Reaktion (Abbildung 6.2-8).

Auf Genexpressionsebene ließ sich erkennen, dass viele der durch TMTT induzierten Gene auch durch Befall mit *Botrytis cinerea* induziert wurden, so z.B. *PDF1.2*, *PR4*, *OSM34* und *PEARLI*. *PEARLI* und *PR4* sind dabei in den TMTT ausgesetzten Col-0 Pflanzen stärker induziert als in den Col-0, die nur mit anderen Col-0 Pflanzen gewachsen sind, was

ein deutlicher Hinweis ist, dass TMTT in Nachbarpflanzen ein *priming* auslöst. Die Expression des *Aktin*-Gens von *Botrytis cinerea* zeigt, dass es keine großen Unterschiede im Befall der Pflanzen durch *B. cinerea* gibt (Abbildung 6.2-9). Eventuell ist die Infektion in einer sterilen Umgebung mit hoher Luftfeuchte so stark, dass die natürlichen Abwehrmechanismen der Pflanze nicht mehr wirken können. Deshalb sollte das Experiment noch einmal mit unsteril angewachsenen Pflanzen wiederholt werden, dann wird sich eventuell auch ein Fitnessgewinn durch das *priming* zeigen lassen.

7.9 Durch TMTT induzierte Gene sind an der Abwehr gegen Raupen beteiligt

Eines der Gene, dessen Expression durch gemeinsames Kultivieren von *35S::AtGLS*-Pflanzen in Nachbarpflanzen exprimiert wird, ist *GLP3*. Germin sind Proteine, welche im Raupendarm stabil bleiben und belegte Funktion in der direkten Abwehr gegen Fraßfeinde besitzen (Lou and Baldwin, 2006). Da *AtGLS*-Expression durch *P. xylostella* Fraß induziert wird, ist anzunehmen, dass die Emission von TMTT in Nachbarpflanzen auch zu einer erhöhten Fitness gegen Raupenfraß führt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl die *AtGLS* selbst als auch das an der Abwehr gegen Raupen beteiligte Gen *GLP3* durch Raupenfraß in TMTT ausgesetzten Pflanzen deutlich früher, aber auch insgesamt stärker induziert werden als in den Kontrollpflanzen (Abbildung 6.2-10, Abbildung 6.2-11). Dieses Ergebnis macht es sehr wahrscheinlich, dass TMTT ein Signal in der Pflanzen-Pflanzen-Kommunikation ist, welches zu einer erhöhten Abwehr gegen Raupenfraß führt. Sollte TMTT auch an der Pflanzen-Insekten Kommunikation in der tritrophen Interaktion beteiligt sein, würde sich dieses *priming* sowohl auf die direkte wie auch auf die indirekte Abwehr auswirken. Weitere Versuche könnten z.B. die Gewichtszunahme von Raupen auf TMTT ausgesetzten und Kontrollpflanzen vergleichen.

8 Zusammenfassung

Pflanzen emittieren flüchtige Substanzen, die von anderen Pflanzen, Insekten oder Pilzen wahrgenommen werden. Je nach Art des Stresses können Duftbouquets gebildet werden, wobei besonders die Zusammensetzung der Terpene variieren kann. Die Regulation der Synthese erfolgt vielfach auf der Ebene der Transkription der Terpensynthasegene. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* die Expression verschiedener Terpensynthasegene (*TPS4* und *AtGLS*) differenziell regulieren kann. Jasmonsäure ist essentiell, aber nicht hinreichend für die Induktion beider Gene. Bei Verwundung, einem Signal, bei dem das Jasmonsäure-Konjugat JA-Ile entsteht, werden beide Gene nur schwach induziert, was auf die in der Arbeit nachgewiesene geringe Sensitivität gegenüber JA-Ile zurückzuführen sein könnte. Befall mit *Pseudomonas syringae* induziert die beiden Terpensynthasegene wesentlich stärker, was mit einer guten Induzierbarkeit durch das Phytotoxin Coronatin, das von *Pseudomonas syringae* gebildet wird, korreliert. Der Befall mit dem Herbivoren *Plutella xylostella* und die Behandlung von nicht verwundeten Pflanzen mit dem Elicitor Alamethicin induziert nur die Expression des *AtGLS*-Gens, aber nicht die des *TPS4*-Gens. Wir postulieren, dass neben der Jasmonsäure weitere Signale entstehen, die die Transkription der *AtGLS* induzieren. Alternativ dazu könnte durch Alamethicin-Behandlung ein JA-Derivat entstehen, das selektiv *AtGLS* induziert. Alamethicin-behandelte verwundete Pflanzen exprimieren *AtGLS* und *TPS4*, wobei unter diesen Bedingungen eine Mutation in der Ethylensignalkaskade die Expression von *TPS4* unterbindet. In Verbindung mit pharmakologischen Daten kann postuliert werden, dass die Expression von *TPS4* durch eine Kombination von JA, Ethylen und einem weiteren Signal ausgelöst wird. Weiterhin wurde gezeigt, dass zwei unterschiedliche JA-abhängige Signalwege das *AtGLS*-Gen aktivieren. Die Signaltransduktion nach Verwundung benötigt den Transkriptionsfaktor MYC2, während die Induktion durch Alamethicin unabhängig von MYC2 ist. Um eine mögliche Funktion von TMTT, dem Endprodukt der *AtGLS*-abhängigen Terpensynthese, in *Arabidopsis thaliana* aufzuzeigen, wurden Transkriptprofile von Pflanzen gemessen, die in der Nachbarschaft von Pflanzen gewachsen waren, die konstitutiv TMTT synthetisierten. Die induzierten Gene waren zu großen Teilen den funktionellen Kategorien abiotischer und

biotischer Stress zuzuordnen. Aufgrund der relativ schwachen Induktion kann davon ausgegangen werden, dass TMTT in den Nachbarpflanzen zu einer Vorinduktion von Genen führt, die nach akutem Befall mit anderen biotischen Stressoren sehr effizient induziert werden und damit die Resistenz gegen Pilzinfektionen erhöhen.

9 Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* **284**, 2148-2152.
- Ament, K., Kant, M.R., Sabelis, M.W., Haring, M.A., and Schuurink, R.C.** (2004). Jasmonic acid is a key regulator of spider mite-induced volatile terpenoid and methyl salicylate emission in tomato. *Plant Physiology* **135**, 2025-2037.
- Anderson, J.P., Badruzaufari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 3460-3479.
- Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., and Takabayashi, J.** (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature* **406**, 512-515.
- Arimura, G., Ozawa, R., Nishioka, T., Boland, W., Koch, T., Kuhnemann, F., and Takabayashi, J.** (2002). Herbivore-induced volatiles induce the emission of ethylene in neighboring lima bean plants. *Plant Journal* **29**, 87-98.
- Aubourg, S., Lecharny, A., and Bohlmann, J.** (2002). Genomic analysis of the terpenoid synthase (AtTPS) gene family of Arabidopsis thaliana. *Molecular Genetics and Genomics* **267**, 730-745.
- Baldwin, I.T., Zhang, Z.P., Diab, N., Ohnmeiss, T.E., McCloud, E.S., Lynds, G.Y., and Schmelz, E.A.** (1997). Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana glauca*. *Planta* **201**, 397-404.
- Beckers, G.J.M., and Spoel, S.H.** (2006). Fine-tuning plant defence signalling: Salicylate versus jasmonate. *Plant Biology* **8**, 1-10.
- Berger, S., Bell, E., and Mullet, J.E.** (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of AtVsp in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **111**, 525-531.
- Bodenhausen, N., and Reymond, P.** (2007). Signaling pathways controlling induced resistance to insect herbivores in Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 1406-1420.

- Bohlmann, J., Martin, D., Oldham, N.J., and Gershenzon, J.** (2000). Terpenoid secondary metabolism in *Arabidopsis thaliana*: cDNA cloning, characterization, and functional expression of a myrcene/(E)-beta-ocimene synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **375**, 261-269.
- Bolter, C.J., Dicke, M., vanLoon, J.J.A., Visser, J.H., and Posthumus, M.A.** (1997). Attraction of Colorado potato beetle to herbivore-damaged plants during herbivory and after its termination. *Journal of Chemical Ecology* **23**, 1003-1023.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A., and Prat, S.** (2004). Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes & Development* **18**, 1577-1591.
- Brewer, D., Mason, F.G., and Taylor, A.** (1987). The Production of Alamethicins by *Trichoderma* Spp. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 619-625.
- Brooks, D.M., Bender, C.L., and Kunkel, B.N.** (2005). The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**, 629-639.
- Brooks, D.M., Hernandez-Guzman, G., Kloek, A.P., Alarcon-Chaidez, F., Sreedharan, A., Rangaswamy, V., Penaloza-Vazquez, A., Bender, C.L., and Kunkel, B.N.** (2004). Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**, 162-174.
- Cafiso, D.S.** (1994). Alamethicin - a Peptide Model for Voltage Gating and Protein Membrane Interactions. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **23**, 141-165.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.N.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired-Resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Capelli, N., Diogon, T., Greppin, H., and Simon, P.** (1997). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **191**, 51-56.
- Chang, C., Kwok, S.F., Blecker, A.B., and Meyerowitz, E.M.** (1993). *Arabidopsis* Ethylene-Response Gene *Etr1* - Similarity of Product to 2-Component Regulators. *Science* **262**, 539-544.
- Chao, Q.M., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker, J.R.** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133-1144.

- Chassot, C., Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal* **49**, 972-980.
- Chen, H., Gonzales-Vigil, E., Wilkerson, C.G., and Howe, G.A.** (2007). Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology* **143**, 1954-1967.
- Chen, H., Wilkerson, C.G., Kuchar, J.A., Phinney, B.S., and Howe, G.A.** (2005). Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 19237-19242.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., Micol, J.L., and Solano, R.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448**, 666-U664.
- Chomczynski, P.** (1993). A Reagent for the Single-Step Simultaneous Isolation of Rna, DNA and Proteins from Cell and Tissue Samples. *Biotechniques* **15**, 532-&.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of Rna Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate Phenol Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Chung, H.S., Koo, A.J.K., Gao, X., Jayanty, S., Thines, B., A. Daniel Jones, and Howe, a.G.A.** (2008). Regulation and Function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-Domain Genes in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology*.
- Church, G.M., and Gilbert, W.** (1984). Genomic Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **81**, 1991-1995.
- Clough, S., Bent, A.** (2000). Vapor-Phase Sterilization of Arabidopsis Seed.
- Cooper, W.R., and Goggin, F.L.** (2005). Effects of jasmonate-induced defenses in tomato on the potato aphid, *Macrosiphum euphorbiae*. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **115**, 107-115.
- De Boer, J.G., Posthumus, M.A., and Dicke, M.** (2004). Identification of volatiles that are used in discrimination between plants infested with prey or nonprey herbivores by a predatory mite. *Journal of Chemical Ecology* **30**, 2215-2230.
- De Moraes, C.M., Lewis, W.J., Pare, P.W., Alborn, H.T., and Tumlinson, J.H.** (1998). Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. *Nature* **393**, 570-573.

- De Vos, M., Van Oosten, V.R., Van Poecke, R.M.P., Van Pelt, J.A., Pozo, M.J., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Van Loon, L.C., Dicke, M., and Pieterse, C.M.J.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**, 923-937.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**, 497-513.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D.X., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **32**, 457-466.
- Dicke, M., Gols, R., Ludeking, D., and Posthumus, M.A.** (1999). Jasmonic acid and herbivory differentially induce carnivore-attracting plant volatiles in lima bean plants. *Journal of Chemical Ecology* **25**, 1907-1922.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., and Kazan, K.** (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 2225-2245.
- Dong, X.N.** (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 547-552.
- Dudareva, N., and Pichersky, E.** (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology* **122**, 627-633.
- Ecker, J.R., and Davis, R.W.** (1987). Plant Defense Genes Are Regulated by Ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5202-5206.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2002). A conditionally fertile *coil* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215**, 549-556.
- Ellis, C., Karafyllidis, L., and Turner, J.G.** (2002). Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1025-1030.
- Engelberth, J., Koch, T., Schuler, G., Bachmann, N., Rechtenbach, J., and Boland, W.** (2001). Ion channel-forming alamethicin is a potent elicitor of volatile biosynthesis and tendril coiling. Cross talk between jasmonate and salicylate signaling in lima bean. *Plant Physiology* **125**, 369-377.

- Enyedi, A.J., Yalpani, N., Silverman, P., and Raskin, I.** (1992). Signal Molecules in Systemic Plant-Resistance to Pathogens and Pests. *Cell* **70**, 879-886.
- Faldt, J., Arimura, G., Gershenzon, J., Takabayashi, J., and Bohlmann, J.** (2003). Functional identification of AtTPS03 as (E)-beta-ocimene synthase: a monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **216**, 745-751.
- Farmer, E.E., Almeras, E., and Krishnamurthy, V.** (2003). Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 372-378.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B.** (1983). A Technique for Radiolabeling DNA Restriction Endonuclease Fragments to High Specific Activity. *Analytical Biochemistry* **132**, 6-13.
- Feng, S.H., Ma, L.G., Wang, X.P., Xie, D.X., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., and Deng, X.W.** (2003). The COP9 signalosome interacts physically with SCFCO11 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* **15**, 1083-1094
- Feys, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male-Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**, 751-759.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1993). Requirement of Salicylic-Acid for the Induction of Systemic Acquired-Resistance. *Science* **261**, 754-756.
- Gao, L.L., Anderson, J.P., Klingler, J.P., Nair, R.M., Edwards, O.R., and Singh, K.B.** (2007). Involvement of the octadecanoid pathway in bluegreen aphid resistance in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**, 82-93.
- Gao, Z.Y., Chen, Y.F., Randlett, M.D., Zhao, X.C., Findell, J.L., Kieber, J.J., and Schaller, G.E.** (2003). Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 34725-34732.
- Gershenzon, J.** (1994). Metabolic Costs of Terpenoid Accumulation in Higher-Plants. *Journal of Chemical Ecology* **20**, 1281-1328.
- Gibeaut, D.M., Hulett, J., Cramer, G.R., and Seemann, J.R.** (1997). Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiology* **115**, 317-319.

- Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis - 2001 status. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 301-308.
- Glazebrook, J., Chen, W.J., Estes, B., Chang, H.S., Nawrath, C., Metraux, J.P., Zhu, T., and Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant Journal* **34**, 217-228.
- Guo, H.W., and Ecker, J.R.** (2003). Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**, 667-677.
- Guzman, P., and Ecker, J.R.** (1990). Exploiting the Triple Response of Arabidopsis to Identify Ethylene-Related Mutants. *Plant Cell* **2**, 513-523.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nurnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., and Schmelzer, E.** (1995). Oligopeptide Elicitor-Mediated Defense Gene Activation in Cultured Parsley Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 4150-4157.
- Han, W.W., Li, Z.S., Zheng, Q.C., and Sun, C.C.** (2006). Homology modeling and molecular dynamics studies on the tomato methyl jasmonate esterase. *Polymer* **47**, 1436-1442.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on Transformation of Escherichia-Coli with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**, 557-580.
- Heil, M., and Silva Bueno, J.C.** (2007). Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 5467-5472.
- Herde, M.** (2006). Identifikation und Regulation einer durch Insektenfraß induzierbaren Geranylinalool-Synthase in Arabidopsis thaliana (Goettingen: Georg-August-Universität).
- Hopke, J., Donath, J., Blechert, S., and Boland, W.** (1994). Herbivore-Induced Volatiles - the Emission of Acyclic Homoterpenes from Leaves of Phaseolus-Lunatus and Zea-Mays Can Be Triggered by a Beta-Glucosidase and Jasmonic Acid. *Febs Letters* **352**, 146-150.
- Horiuchi, J., Arimura, G., Ozawa, R., Shimoda, T., Takabayashi, J., and Nishioka, T.** (2001). Exogenous ACC enhances volatiles production mediated by jasmonic acid in lima bean leaves. *Febs Letters* **509**, 332-336.
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., and Ryan, C.A.** (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**, 2067-2077.

- Hua, J., and Meyerowitz, E.M.** (1998). Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261-271.
- Hua, J., Sakai, H., Nourizadeh, S., Chen, Q.H.G., Bleecker, A.B., Ecker, J.R., and Meyerowitz, E.M.** (1998). EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1321-1332.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High-Efficiency Transformation of *Escherichia-Coli* with Plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Jabs, T., Tschope, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O²(-) from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 4800-4805.
- Karban, R., Baldwin, I.T., Baxter, K.J., Laue, G., and Felton, G.W.** (2000). Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **125**, 66-71.
- Karban, R., and Baldwin, I.T.** (1997). *Induced responses to herbivory*. University of Chicago Press
- Katagiri, F.** (2004). A global view of defense gene expression regulation - a highly interconnected signaling network. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 506-511.
- Kessler, A., and Baldwin, I.T.** (2001). Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature. *Science* **291**, 2141-2144.
- Kessler, A., Halitschke, R., and Baldwin, I.T.** (2004). Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations. *Science* **305**, 665-668.
- Kliebenstein, D.J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen, D., Gershenzon, J., and Mitchell-Olds, T.** (2001). Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiology* **126**, 811-825.
- Kloek, A.P., Verbsky, M.L., Sharma, S.B., Schoelz, J.E., Vogel, J., Klessig, D.F., and Kunkel, B.N.** (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant Journal* **26**, 509-522.
- Knudsen, J.T., Tollsten, L., and Bergstrom, L.G.** (1993). Floral Scents - a Checklist of Volatile Compounds Isolated by Headspace Techniques. *Phytochemistry* **33**, 253-280.
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., and Boland, W.** (1999). Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signaling pathway. *Plant Physiology* **121**, 153-162.

- Kunkel, B.N., and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 325-331.
- Lawton, K., Weymann, K., Friedrich, L., Vernooij, B., Uknes, S., and Ryals, J.** (1995). Systemic acquired resistance in Arabidopsis requires salicylic acid but not ethylene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**, 863-870.
- Legouill, C., Parent, J.L., Rolapleszczynski, M., and Stankova, J.** (1994). Analysis of Recombinant Plasmids by a Modified Alkaline Lysis Method. *Analytical Biochemistry* **219**, 164-164.
- Leon, J., Rojo, E., and Sanchez-Serrano, J.J.** (2001). Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* **52**, 1-9.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T.** (2004a). The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**, 319-331.
- Li, L., Zhao, Y.F., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J.H., Whalon, M.E., Pichersky, E., and Howe, G.A.** (2004b). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development (vol 16, pg 126, 2004). *Plant Cell* **16**, 783-783.
- Liu, D., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A.** (1994). Osmotin Overexpression in Potato Delays Development of Disease Symptoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 1888-1892.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lorenzo, O., and Solano, R.** (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 532-540.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165-178.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J., and Solano, R.** (2004). Jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1938-1950.
- Lou, Y.G., and Baldwin, I.T.** (2006). Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. *Plant Physiology* **140**, 1126-1136.

- Loughrin, J.H., Manukian, A., Heath, R.R., Turlings, T.C.J., and Tumlinson, J.H.** (1994). Diurnal Cycle of Emission of Induced Volatile Terpenoids Herbivore-Injured Cotton Plants. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **91**, 11836-11840.
- Maleck, K., and Dietrich, R.A.** (1999). Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? Trends in Plant Science **4**, 215-219.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G., and Browse, J.** (2006). Transcriptional regulators of stamen development in Arabidopsis identified by transcriptional profiling. Plant Journal **46**, 984-1008.
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., and Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**, 5473-5477.
- Mead, D.A., Pey, N.K., Herrnstadt, C., Marcil, R.A., and Smith, L.M.** (1991). A Universal Method for the Direct Cloning of Pcr Amplified Nucleic-Acid. Bio-Technology **9**, 657-663.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. Cell **126**, 969-980.
- Mithofer, A., Wanner, G., and Boland, W.** (2005). Effects of feeding Spodoptera littoralis on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission. Plant Physiology **137**, 1160-1168.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H.** (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA Invitro - the Polymerase Chain-Reaction. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology **51**, 263-273.
- Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. Plant Cell **11**, 1393-1404.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., and Marks, M.D.** (1991). A Myb Gene Required for Leaf Trichome Differentiation in Arabidopsis Is Expressed in Stipules. Cell **67**, 483-493.
- Pare, P.W., and Tumlinson, J.H.** (1997). Induced synthesis of plant volatiles. Nature **385**, 30-31.
- Pare, P.W., and Tumlinson, J.H.** (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. Plant Physiology **121**, 325-331.

- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant Journal* **31**, 1-12.
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Mettraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Petri, J.** (2003). Spatial and temporal regulation of b-glucuronidase expression directed by 5'-flanking regions of one deoxy-xylulose phosphate synthase and three monoterpene synthase genes in Arabidopsis thaliana (Jena: Friedrich-Schiller-Universität).
- Peumans, W.J., and Vandamme, E.J.M.** (1995). The Role of Lectins in Plant Defense. *Histochemical Journal* **27**, 253-271.
- Pichersky, E., and Gershenzon, J.** (2002). The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 237-243.
- Pieterse, C.M.J., and van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* **4**, 52-58.
- Ponstein, A.S., Bresvloemans, A.A., Selabuurlage, M.B., Cornelissen, B.J.C., and Melchers, L.S.** (1994). The Missing Class-I Pr-4 Protein from Tobacco Exhibits Antifungal Activity. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90-90.
- Potter, D.A., and Kimmerer, T.W.** (1988). Do Holly Leaf Spines Really Deter Herbivory. *Oecologia* **75**, 216-221.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., and Genschik, P.** (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**, 679-689.
- Reymond, P., and Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 404-411.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., and Farmer, E.E.** (2000). Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 707-719.
- Reymond, P., Bodenhausen, N., Van Poecke, R.M.P., Krishnamurthy, V., Dicke, M., and Farmer, E.E.** (2004). A conserved transcript pattern in response to a specialist and a generalist herbivore. *Plant Cell* **16**, 3132-3147.

- Rojo, E., Solano, R., and Sanchez-Serrano, J.J.** (2003). Interactions between signaling compounds involved in plant defense. *Journal of Plant Growth Regulation* **22**, 82-98.
- Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G., and Sanchez-Serrano, J.J.** (1998). Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **13**, 153-165.
- Rose, U.S.R., Manukian, A., Heath, R.R., and Tumlinson, J.H.** (1996). Volatile semiochemicals released from undamaged cotton leaves - A systemic response of living plants to caterpillar damage. *Plant Physiology* **111**, 487-495.
- Ruepp, A., Zollner, A., Maier, D., Albermann, K., Hani, J., Mokrejs, M., Tetko, I., Guldener, U., Mannhaupt, G., Munsterkotter, M., and Mewes, H.W.** (2004). The FunCat, a functional annotation scheme for systematic classification of proteins from whole genomes. *Nucleic Acids Research* **32**, 5539-5545.
- Ryan, C.A.** (1990). Protease Inhibitors in Plants - Genes for Improving Defenses against Insects and Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **28**, 425-449.
- Sakai, H., Hua, J., Chen, Q.H.G., Chang, C.R., Medrano, L.J., Blecker, A.B., and Meyerowitz, E.M.** (1998). ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5812-5817.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sansom, M.S.P.** (1993). Alamethicin and Related Peptaibols - Model Ion Channels. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* **22**, 105-124.
- Schillmiller, A.L., Koo, A.J.K., and Howe, G.A.** (2007). Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Physiology* **143**, 812-824.
- Schoonhoven, L.M.** (2005). Insect-plant relationships: the whole is more than the sum of its parts. *Entomologia Experimentalis Et Applicata* **115**, 5-6.
- Schuler, G., Mithofer, A., Baldwin, I.T., Berger, S., Ebel, J., Santos, J.G., Herrmann, G., Holscher, D., Kramell, R., Kutchan, T.M., Maucher, H., Schneider, B., Stenzel, I., Wasternack, C., and Boland, W.** (2004). Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *Febs Letters* **563**, 17-22.
- Schulze-Lefert, P., and Robatzek, S.** (2006). Plant pathogens trick guard cells into opening the gates. *Cell* **126**, 831-834.

- Schulze, B.** (2005). Oxylipins and their involvement in plant response to biotic and abiotic stress (Jena, Deutschland: Friedrich-Schiller-Universität).
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 4788-4793.
- Seo, M., Aoki, H., Kamiya, Y., Koshiba, T., and Nambara, E.** (2003). Abscisic aldehyde oxidase involved in ABA biosynthesis in Arabidopsis seed. *Plant and Cell Physiology* **44**, S151-S151.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q.M., and Ecker, J.R.** (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* **12**, 3703-3714.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M.C., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X.N., and Pieterse, C.M.J.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.
- Staswick, P.E., and Tiriyaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2117-2127.
- Staswick, P.E., Su, W.P., and Howell, S.H.** (1992). Methyl Jasmonate Inhibition of Root-Growth and Induction of a Leaf Protein Are Decreased in an Arabidopsis-Thaliana Mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6837-6840.
- Stintzi, A., and Browse, J.** (2000). The Arabidopsis male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 12837-12842.
- Stotz, H.U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W., and Mitchell-Olds, T.** (2002). Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* **214**, 648-652.

- Stotz, H.U., Pittendrigh, B.R., Kroymann, J., Weniger, K., Fritsche, J., Bauke, A., and Mitchell-Olds, T.** (2000). Induced plant defense responses against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against Egyptian cotton worm but not diamondback moth. *Plant Physiology* **124**, 1007-1017.
- Stuhlfelder, C., Mueller, M.J., and Warzecha, H.** (2004). Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *European Journal of Biochemistry* **271**, 2976-2983.
- Suza, W.P., and Staswick, P.E.** (2008). The role of JAR1 in Jasmonoyl-l -isoleucine production during *Arabidopsis* wound response. *PLANTA*.
- Takabayashi, J., and Dicke, M.** (1996). Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants. *Trends in Plant Science* **1**, 109-113.
- Takabayashi, J., Dicke, M., and Posthumus, M.A.** (1994). Volatile Herbivore-Induced Terpenoids in Plant Mite Interactions - Variation Caused by Biotic and Abiotic Factors. *Journal of Chemical Ecology* **20**, 1329-1354.
- Thaler, J.S., Farag, M.A., Pare, P.W., and Dicke, M.** (2002). Jasmonate-deficient plants have reduced direct and indirect defences against herbivores. *Ecology Letters* **5**, 764-774.
- Thilmony, R., Underwood, W., and He, S.Y.** (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157 : H7. *Plant Journal* **46**, 34-53.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G.H., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-U662.
- Thomma, B.P.H.J., Tadesse, Y.S.H., Jacobs, M., and Broekaert, W.F.** (1999). Disturbed correlation between fungal biomass and beta-glucuronidase activity in infections of *Arabidopsis thaliana* with transgenic *Alternaria brassicicola*. *Plant Science* **148**, 31-36.
- Trapp, S.C., and Croteau, R.B.** (2001). Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. *Genetics* **158**, 811-832.
- Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., and Lewis, W.J.** (1990). Exploitation of Herbivore-Induced Plant Odors by Host-Seeking Parasitic Wasps. *Science* **250**, 1251-1253.
- Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W., and Bender, C.L.** (2005). The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant Journal* **42**, 201-217.

- van Hulten, M., Pelsler, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J., and Ton, J.** (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**, 5602-5607.
- van Loon, J.J.A., de Boer, J.G., and Dicke, M.** (2000). Parasitoid-plant mutualism: parasitoid attack of herbivore increases plant reproduction. Entomologia Experimentalis Et Applicata **97**, 219-227.
- van Poecke, R.M.P., and Dicke, M.** (2002). Induced parasitoid attraction by Arabidopsis thaliana: involvement of the octadecanoid and the salicylic acid pathway. Journal of Experimental Botany **53**, 1793-1799.
- Van Poecke, R.M.P., Posthumus, M.A., and Dicke, M.** (2001). Herbivore-induced volatile production by Arabidopsis thaliana leads to attraction of the parasitoid Cotesia rubecula: Chemical, behavioral, and gene-expression analysis. Journal of Chemical Ecology **27**, 1911-1928.
- Van Zhong, G., and Burns, J.K.** (2003). Profiling ethylene-regulated gene expression in Arabidopsis thaliana by microarray analysis. Plant Molecular Biology **53**, 117-131.
- Verburg, J.G., and Huynh, Q.K.** (1991). Purification and Characterization of an Antifungal Chitinase from Arabidopsis-Thaliana. Plant Physiology **95**, 450-455.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., and Keller, B.** (2002). The Arabidopsis male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. Planta **216**, 187-192.
- Walling, L.L.** (2000). The myriad plant responses to herbivores. Journal of Plant Growth Regulation **19**, 195-216.
- Walter, A., Mazars, C., Maitrejean, M., Hopke, J., Ranjeva, R., Boland, W., and Mithofer, A.** (2007). Structural requirements of jasmonates and synthetic analogues as inducers of Ca²⁺ signals in the nucleus and the cytosol of plant cells. Angewandte Chemie-International Edition **46**, 4783-4785.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**, 562-565.
- Williams, L., Rodriguez-Saona, C., Pare, P.W., and Crafts-Brandner, S.J.** (2005). The piercing-sucking herbivores Lygus hesperus and Nezara viridula induce volatile emissions in plants. Archives of Insect Biochemistry and Physiology **58**, 84-96.
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G.** (1998). COI1: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. Science **280**, 1091-1094.

- Xu, L.H., Liu, F.Q., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D.F., and Xie, D.X.** (2002). The SCFCO11 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1919-1935.
- Yan, Y.X., Stolz, S., Chetelat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., and Farmer, E.E.** (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19**, 2470-2483.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., Tena, G., Xiong, Y., and Sheen, J.** (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**, 789-U781.
- Zarate, S.I., Kempema, L.A., and Walling, L.L.** (2007). Silverleaf whitefly induces salicylic acid Defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* **143**, 866-875.
- Zarei, A.** (2007). Functional analysis of jasmonate-responsive transcription factors in Arabidopsis thaliana (Leiden: Universität Leiden).
- Zhang, Y.L., Tessaro, M.J., Lassner, M., and 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., and Glazebrook, J.** (1999). Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**, 2419-2428.
- Zhu, B.L., Chen, T.H.H., and Li, P.H.** (1996). Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* **198**, 70-77.
- Zhu, J.K.** (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., and Somerville, S.** (2004). Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *Plant Journal* **40**, 633-646.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* **136**, 2621-2632.

Danksagung:

Als erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Christiane Gatz für die Betreuung dieser Doktorarbeit danken. Sie hat mir geholfen, dieses komplexe Thema weiterzuentwickeln und immer Zeit gehabt, aus den manchmal verwirrenden Daten stimmige Theorien zu entwickeln. Im Laufe meiner Arbeit habe ich an vielen spannenden Konferenzen teilnehmen können, auch vielen Dank dafür.

PD Dr. Wolfgang Dröge-Laser danke ich für die Übernahme des Korreferats und so manche gut gelaunten, aufmunternde Worte.

Prof. Dr. Wilhelm Boland danke ich für die Bereitstellung von Coronalon, das wir in nicht unerheblichen Mengen für Induktionen genutzt haben.

Stefan Bartram danke ich dafür, dass er uns TMTT zugesandt hat.

Prof. Dr. Ian Baldwin danke ich für eine spannende Diskussion mit vielen Ideen sowie das nette Angebot, uns JA-ILE sowie JA-LEU zuzusenden.

Prof. Dr. Barbara Kunkel danke ich dafür, dass sie uns die Coronatin-defizienten Pseudomonadenstämme zugesandt hat.

Vielen Dank an Prof. Dr. Petr Karlovsky und Dr. Christoph Brandfaß, sie haben mir sehr dabei geholfen, die real-time-PCR zu etablieren.

Dorothea Mennerich danke ich für die vielen kleinen Plutella-Larven, die ich mir immer bei ihr abholen durfte.

Danke an euch, meine lieben Kollegen, vor allem denen, die weit mehr Freunde als Kollegen sind und deshalb das Arbeiten so angenehm gemacht haben! Ben, ich glaube, kein anderer Mensch hätte so viel Katrin in allen Lebenslagen aushalten können. Wir haben tatsächlich beide schreibend in einem kleinen Raum überlebt und du bist mir nur noch mehr ans Herz gewachsen. Ohne deine Hilfe in den letzten Tagen hätte ich diese Arbeit nicht geschafft, schön dass es dich gibt! Hella, dein wirbelwindiges, gut gelauntes Temperament hat mich aus so mancher Krise herausgeholt. Dazu hast du auch noch geradezu vor nützlichen Tipps, das Schreiben zu überstehen, übergesprudelt. Danke für deine Hilfe! Danke auch dir, Katja. Mit niemandem kann man so herrlich tratschen und all die großen und kleinen Probleme ausdiskutieren, die das Leben einem so bietet. Aber auch euch anderen, die ich nicht namentlich erwähnt habe, es war schön, mit euch zusammen zu arbeiten!

Mein Marco. Es ist ein großes Privileg, einen guten Freund, liebevollen Partner und intelligenten Kollegen in einer Person zu haben! Du hast mir sehr geholfen und immer Mut gemacht, wenn ich nicht mehr weiter wusste. Danke, dass du auch dann an meiner Seite bist, wenn du nicht bei mir sein kannst!

Niklas, mein Lieblingsdiplomand! Danke dafür, dass du mein AP2-Projekt in deine fähigen Hände übernommen hast, da war es gut aufgehoben. Dir und Simon verdanke ich die Flut an neuen Real-time-Daten, die zum Ende meiner Arbeit noch zu mir gespült wurde.

Dann danke ich unseren TAs, ich bin überzeugt, wir haben die besten, die es gibt. Bei euch allen war meine RNA immer gut aufgehoben. Annette, dir danke ich für das feinste Mörsern der Welt, egal, was an Pflanzenmaterial bei dir abgeliefert wurde, aus deinen Händen war es immer die beste Ausbeute und Qualität, die man sich wünschen konnte. Auch herzlichen Dank dir, Anna. Ich bin immer wieder erstaunt, wie schnell du Arbeiten für mich in deinen Tagesplan einschieben konntest. Und auch ein ganz herzliches Danke an dich, Ronny. Deine Sondenfragmente sind die besten und mit dir zu induzieren hat immer viel Spaß gemacht!

Dir, Guido, danke ich für Hilfe bei Computer- und Cycloproblemen, nachdem man dir bescheid gegeben hat, war alles in besten Händen!

Danke auch an Corinna und Heike!

Den Gärtnern Feli und Herrn Wedemeyer danke ich für viele Tablett mit gestopften Töpfen und die Pflege von Thripskulturen.

Meinen Eltern danke ich für die viele Unterstützung und das Verständnis, das sie mir entgegengebracht haben. Ihr habt mich so oft unterstützt, bessere Eltern kann man sich gar nicht wünschen. Danke, dass ich euch habe!

Lebenslauf:

Persönliche Angaben	Katrin Gärtner Geboren am 07.03.1979 in Clausthal-Zellerfeld
1985 - 1991	Grundschule/Orientierungsstufe
1991 - 1998	Robert-Koch-Schule, Clausthal-Zellerfeld
1998	Abitur
1998 - 2003	Studiengang Lehramt für das Gymnasium, Fächerkombination Biologie/Chemie an der Georg-August Universität in Göttingen
2003	1. Staatsexamen
2004 - 2008	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für „Allgemeine und Entwicklungsphysiologie der Pflanze“ des Albrecht-von-Haller-Instituts für Pflanzen- Wissenschaften der Georg-August-Universität Göttingen bei Prof. Dr. C. Gatz