

**Analyse der Jasmonoyl-Isoleucin-unabhängigen Funktion
des Jasmonat-Rezeptors CORONATINE INSENSITIVE1 in
Wurzeln von *Arabidopsis thaliana***

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

“Doctor rerum naturalium”

der Georg-August-Universität Göttingen

Im Promotionsprogramm

“Microbiology and Biochemistry”

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Johanna Schmitz

aus Mönchengladbach-Rheydt

Göttingen, 2015

Betreuungsausschuss

Prof. Dr. Christiane Gatz

(Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

Prof. Dr. Volker Lipka

(Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

Prof. Dr. Ivo Feussner

(Abteilung Biochemie der Pflanze)

Mitglieder der Prüfungskommission

Referentin: **Prof. Dr. Christiane Gatz**

(Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze)

Koreferent: **Prof. Dr. Volker Lipka**

(Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Ivo Feussner (Abteilung Biochemie der Pflanze)

Prof. Dr. Andrea Polle (Abteilung Forstbotanik und Baumphysiologie)

PD Dr. Thomas Teichmann (Abteilung Zellbiologie der Pflanze)

Jun. Prof. Dr. Cynthia Gleason (JP Molekulare Pflanzenwissenschaften)

Tag der mündlichen Prüfung: 28.5.2014

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich diese Dissertationsarbeit mit dem Titel „Analyse der Jasmonoyl-Isoleucin-unabhängigen Funktion des Jasmonat-Rezeptors CORONATINE INSENSITIVE1 in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Ich erkläre hiermit auch, dass ich mich an keiner anderen Universität um einen Doktorgrad beworben habe.

Johanna Schmitz

Göttingen, den 2.04.2015

Zusammenfassung

Verticillium longisporum ist ein bodenbürtiges vaskuläres Pflanzenpathogen, das im europäischen Raum eine ernsthafte Bedrohung des agronomisch wichtigen Raps, einer Quelle für Biokraftstoff und Speiseöl, darstellt. Infektionsanalysen mit *V. longisporum* zeigten in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* eine neue Funktion des Jasmonoyl-Isoleucin- (JA-Ile) Rezeptors COI1, die unabhängig von JA-Ile oder pilzlichen Analoga dieses Pflanzenhormons Suszeptibilität gegenüber dem Pathogen vermittelt. Pfropfungsexperimente führten zu der Erkenntnis, dass COI1 in Wurzeln für die Ausprägung von Krankheitssymptomen im Spross benötigt wird (Ralhan et al., 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welche Gene unter der Kontrolle der JA-Ile-unabhängigen COI1-Funktion stehen und inwieweit sich die Signaltransduktionskette von der bekannten, durch COI1 aktivierten, Signaltransduktion unterscheidet. RNA-Sequenz-Analysen von infizierten und nicht-infizierten Wurzeln des Wildtyps, der *coi1*-Mutante und der JA-Biosynthesemutante *aos* ergaben zunächst, dass unter den gewählten Infektionsbedingungen nur wenige Gene durch den Pilz beeinflusst werden. Beim Vergleich der Transkriptomdaten von *coi1*- und *aos*-Wurzeln fiel jedoch auf, dass eine Gruppe von 113 Genen in der *coi1*-Mutante konstitutiv stärker exprimiert wurde als in der JA-Biosynthesemutante. Im Gegensatz dazu gab es nur wenige Gene, die in der *coi1*-Mutante geringer exprimiert waren als in *aos* und deren Expressionsmuster sich in unabhängigen Proben als nicht reproduzierbar erwies.

Als Markergene für die Gruppe von Genen, bei der COI1 unabhängig von JA-Ile, d.h. auch in der *aos*-Mutante, als negativer Regulator der Genexpression wirkt, wurden aufgrund robuster Effekte der hochregulierten Transkriptmenge in der *coi1*-Mutante die Gene *Phosphoglyceratmutase*, *Gemin 2* und *Cysteine-rich Receptor-like Kinase 15 (CRK15)* gewählt. Durch Mutationen der Ligandenbindestelle von COI1 für JA-Ile wurde gezeigt, dass ein mutiertes COI1-Protein, das in der Pflanze JA-Ile-abhängige Funktionen wie Fertilität, JA-sensitives Wurzelwachstum und JA-induzierbare *JAZ10*-Expression nicht mehr ausführen konnte, ähnlich wie das WT-COI1 die Expression der Markergene weiterhin reprimieren konnte. Die Suszeptibilität-vermittelnde JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 gegenüber *V. longisporum* konnte mit diesen Konstrukten jedoch nicht eindeutig gezeigt werden, da die entsprechenden Leervektorkontrollen unerwarteterweise stark ausgeprägte Krankheitssymptome nach Infektion mit *V. longisporum* aufwiesen.

Weitere bekannte Signalkomponenten der JA-Signaltransduktion wurden bezüglich ihrer Rolle in der JA-Ile-unabhängigen Funktion des COI1-Proteins analysiert. Dabei konnte über die Beteiligung der JAZ-Proteine keine Aussage getroffen werden, da eine beschriebene dominant-negative Wirkung des

JAZ1Δ3-Proteins in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Dahingegen konnte gezeigt werden, dass Komponenten wie NINJA und MYC2,3,4 keinen Einfluss auf die reprimierende Funktion von COI1 bezüglich der *Phosphoglyceratmutase* haben.

Demnach konnte in dieser Arbeit durch Expressionsanalysen der *Phosphoglyceratmutase*, einem Schlüsselenzym der Glykolyse, demonstriert werden, dass sich die neue Funktion von COI1 stark von der klassischen und bekannten Funktion als JA-Ile-Rezeptor und Aktivator *downstream* agierender Prozesse der JA-Signaltransduktion unterscheidet. Es wird postuliert, dass es sich dabei um eine ancestrale Funktion des Proteins handelt, die mit der Entwicklung der JA-Synthese in Pflanzen aufgrund hoher Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden in den Hintergrund gestellt wurde.

Summary

Verticillium longisporum is a soil-borne vascular plant pathogen and a serious threat to the agronomically important oilseed rape, the source for biofuel and nutritional oil in Europe. In the interaction of the model plant *Arabidopsis thaliana* with *V. longisporum* a novel function of the jasmonoyl-isoleucine- (JA-Ile) receptor COI1 was found. This novel function of COI1 mediates susceptibility to this pathogen independent of the presence of JA-Ile or fungal analogues. Grafting experiments revealed that COI1 is required in root tissue for the expression of disease symptoms in the shoot (Ralhan et al., 2012).

In this study, RNA sequencing of infected and uninfected roots of wild-type plants, the *coi1*-mutant and the JA-biosynthesis mutant *aos* was used to identify genes that are under the control of the JA-Ile independent COI1-function. The question to which extent the signal transduction chain of the novel COI1-function differs from the known COI1-dependent signal transduction pathway was also addressed.

Under the conditions chosen for infection, transcription of only few genes was affected by the fungus. Conspicuously a group of 113 genes was constitutively higher expressed in the *coi1*-mutant compared to the JA-biosynthesis mutant, irrespective of the infection. In contrast, transcription of only few genes was lower in the *coi1*-mutant than in the *aos*-background. However, this expression pattern could not be reproduced in independent samples.

Based on reproducible and robust expression data, the genes *Phosphoglycerate mutase*, *Germin 2* and *Cysteine-rich Receptor-like Kinase 15 (CRK15)* were chosen as marker genes for the gene set regulated by the JA-Ile-independent COI1-function. In order to approach the question whether the integrity of the ligand binding pocket of COI1 is important for the novel COI1-function, site specific mutations were introduced and the mutated proteins were expressed in the *coi1*-background. As expected JA-dependent functions such as fertility, JA-sensitive root growth and JA-inducible *JAZ10* expression were not restored, but the function of the COI1-proteins to repress the expression of marker genes were maintained. However, the JA-Ile-independent function of COI1 in mediating susceptibility against *V. longisporum* could not clearly be demonstrated, since the corresponding empty vector controls exhibited strongly pronounced symptoms after infection with *V. longisporum*.

Well known signal components of the JA-signal transduction chain were analyzed for their role in the JA-Ile-independent function of COI1. No conclusion could be drawn concerning the involvement of JAZ-proteins, as a described dominant-negative effect of the JAZ1Δ3-protein did not even interfere

with all JA-dependent processes. Interestingly, JA-signalling components such as NINJA and MYC2,3,4 did not influence the repressive function of COI1 on the expression of the *Phosphoglycerate mutase*.

Taken together, the results of expression analysis of the *Phosphoglycerat mutase*, a key enzyme of glycolysis, suggest that the novel function of COI1 differs strongly from its classical and well known role as a JA-Ile-receptor and activator of downstream processes of JA-signaling. It is postulated that this recently discovered COI1-function is evolutionary ancient. Conceivably, the development of JA-synthesis in plants led to a displacement of this ancestral COI1-function due to the high affinity of the protein to its ligand JA-Ile.

Inhalt

Zusammenfassung	I
Summary	III
Inhalt	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1	Einleitung1
1.1	Das pflanzliche Immunsystem..... 1
1.2	Phytohormone als Teil der Immunabwehr..... 3
1.3	Das vaskuläre Pathogen <i>Verticillium</i> 13
1.3.1	Kontrolle von <i>Verticillium</i> -bedingten Krankheiten und Resistenzmechanismen von Pflanzen gegenüber diesem Pilz..... 16
1.4	Ziel der Arbeit..... 19
2	Material und Methoden21
2.1	Material 21
2.1.1	Oligonukleotide 21
2.1.2	Plasmide 23
2.1.3	Organismen 25
2.1.4	Puffer und Lösungen 27
2.1.5	Nährmedien..... 27
2.1.6	Zusätze 28
2.1.7	Kits..... 28
2.1.8	Enzyme 29
2.1.9	Größenstandards..... 29
2.1.10	Antikörper 29
2.1.11	Hersteller von Chemikalien und Reagenzien..... 30
2.1.12	Hersteller von Verbrauchsmaterialien 30
2.1.13	Laborzubehör 31
2.1.14	Software 31
2.2	Methoden..... 32
2.2.1	Molekularbiologische Methoden 32
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA von <i>A. thaliana</i> zur Genotypisierung 32
2.2.1.2	Isolierung genomischer DNA von <i>A. thaliana</i> zur Quantifizierung pilzlicher DNA 32
2.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion 32
2.2.1.4	Fusions-PCR 33
2.2.1.5	Agarose-Gelelektrophorese 34
2.2.1.6	Photometrie 34
2.2.1.7	Ligation..... 34

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.8	Gateway Klonierung.....	35
2.2.1.9	Transformation von <i>E. coli</i>	35
2.2.1.10	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
2.2.1.11	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	36
2.2.1.12	Plasmidpräparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.2.1.13	Fragmentierung von DNA.....	37
2.2.1.14	Sequenzierung.....	37
2.2.1.15	Transformation von <i>A. thaliana</i>	37
2.2.2	Pflanzenanzuchtsbedingungen und Kultivierung	38
2.2.2.1	Oberflächensterilisation von <i>A. thaliana</i> -Samen	38
2.2.2.2	Pflanzenanzucht auf Erde.....	38
2.2.2.3	Sterile Pflanzenanzucht auf MS-Platten	38
2.2.2.4	Sterile Anzuchtbedingungen in einer hydroponischen Kultur	39
2.2.3	Behandlung von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Chemikalien.....	40
2.2.3.1	Methyljasmonat	40
2.2.4	Anzuchtbedingungen und Kultivierung von <i>V. longisporum</i>	40
2.2.4.1	Anzucht von <i>V. longisporum</i> in PDB-Medium	40
2.2.4.2	Ernte frischer <i>V. longisporum</i> Sporen	40
2.2.4.3	Anzucht von <i>V. longisporum</i> auf SXM-Platten	41
2.2.4.4	Herstellung der Stammkulturen von <i>V. longisporum</i>	41
2.2.5	Infektion mit <i>V. longisporum</i>	41
2.2.5.1	Sand-Erde Infektionssystem mit <i>V. longisporum</i>	41
2.2.5.2	Platten-Infektionssystem mit <i>V. longisporum</i>	41
2.2.5.3	Infektionskanalsystem.....	42
2.2.5.4	Konfokalmikroskopische Analysen	42
2.2.5.5	Blattflächenvermessung	43
2.2.5.6	Probenentnahme infizierter Pflanzen	43
2.2.6	Transkriptionsanalysen	43
2.2.6.1	RNA-Extraktion	43
2.2.6.2	cDNA-Synthese	44
2.2.6.3	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)	44
2.2.6.4	RNA-Sequenzanalyse.....	45
2.2.6.5	Quantifizierung der DNA von <i>V. longisporum</i>	46
2.2.7	Biochemische Standardmethoden	47
2.2.7.1	Proteinextraktion aus <i>A. thaliana</i>	47
2.2.7.2	Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i>	47
2.2.7.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	47
2.2.7.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
2.2.7.5	Protein Immunoblot.....	48
2.2.8	Analyse von Reportergermlinien	49
2.2.8.1	Histochemische Analysen der Expression des GUS-Reportergens.....	49

Inhaltsverzeichnis

2.2.8.2	Quantitative Analysen der GUS-Reportengenaktivität mittels des MUG-Assays.....	49
2.2.9	Hefe-2-Hybrid-System (Y2H)	50
2.2.9.1	Hefetransformation.....	50
2.2.9.2	oNPG-Test	51
3	Ergebnisse	53
3.1	Genexpressionsanalyse in Wurzeln von <i>V. longisporum</i> -infizierten WT, <i>aos</i> und <i>coi1-t</i> <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	53
3.1.1	Vergleich zweier Infektionssysteme von <i>A. thaliana</i> mit <i>V. longisporum</i>	53
3.1.2	Transkriptionelle Analysen im Platten-Infektionssystem	55
3.1.3	Präparation und Charakterisierung der pflanzlichen RNA für die Durchführung der Transkriptomanalysen	57
3.1.4	Präparation und Charakterisierung der pilzlichen RNA für die Durchführung der Transkriptomanalysen	58
3.1.5	<i>V. longisporum</i> zeigt starke transkriptionelle Veränderungen nach Infektion von Pflanzenwurzeln	60
3.1.6	Die Infektion von <i>V. longisporum</i> führt in <i>A. thaliana</i> -Wurzeln zu geringen Änderungen im Transkriptom	61
3.1.7	Unabhängig davon, ob <i>V. longisporum</i> in das Xylem einwandert oder nicht, beeinflusst der Pilz das pflanzliche Transkriptom in sterilen Platten-Infektionssystemen kaum.....	64
3.2	Analyse unterschiedlicher Genexpression in <i>coi1-t</i> im Vergleich zu beiden Wildtypen und der <i>aos</i> -Mutante	66
3.2.1	Zwölf Gene sind in <i>coi1-t</i> weniger stark exprimiert als in den Genotypen WT _{<i>aos</i>} , <i>aos</i> und WT _{<i>coi1-t</i>}	66
3.2.2	113 Gene sind in <i>coi1-t</i> stärker exprimiert als in den Genotypen WT _{<i>aos</i>} , <i>aos</i> und WT _{<i>coi1-t</i>}	70
3.3	Analyse der Beteiligung von JA-Ile und bekannten Komponenten des JA-Signalweges an der Regulation von Genen, die in der <i>coi1-</i> nicht aber in der <i>aos</i> -Mutante erhöht exprimiert sind	77
3.3.1	Die erhöhte Expression der <i>Phosphoglyceratmutase</i> und <i>CRK15</i> in <i>coi1</i> sind unabhängig von Salicylsäure	78
3.3.2	Jasmonsäure hat in sterilen Wurzeln keinen Einfluss auf die Expression der Markergene <i>Phosphoglyceratmutase</i> , <i>Germin 2</i> und <i>CRK15</i>	79
3.3.3	Die Expression der Markergene wird unabhängig von MYC2,3,4 reguliert	82
3.3.4	Die Expression der <i>Phosphoglyceratmutase</i> wird unabhängig von NINJA reguliert	83
3.3.5	Der Einfluss von JAZ-Proteinen auf die Expression der Markergene bleibt weiterhin unbeantwortet	85
3.4	Expressionsanalysen der drei Markergene in Abhängigkeit von stabilisierten JAZ-Repressorproteinen unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors	88
3.4.1	Charakterisierung der transgenen Linien, die JAZ1Δ3 wurzelspezifisch exprimieren	89
3.4.2	Steht JAZ1Δ3 unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors, bleibt die dominant-negative Wirkung aus	90
3.4.3	Genexpressionsanalysen von Markergenen in JAZ1Δ3-Mutanten in Abhängigkeit von Jasmonsäure.....	91

Inhaltsverzeichnis

3.5	Analyse der Bedeutung der COI1-Ligandenbindestelle für die JA-unabhängige Funktion des Proteins.....	94
3.5.1	Mutierte COI1-Proteine interagieren weiterhin mit ASK2	95
3.5.2	Mutierte COI1-Proteine können JA-Ile nicht mehr binden	97
3.5.3	Mutierte COI1-Proteine können die JA-abhängige COI1-Funktion nicht ausführen	99
3.5.4	Mutierte COI1-Proteine können die in <i>coi1-16</i> erhöhte Expression von JA-Ile unabhängigen Markergenen unterdrücken	101
3.6	Analyse der Krankheitsphänotypen verschiedener Mutanten nach Infektion mit <i>V. longisporum</i>	104
3.6.1	<i>35S:HA-COI1-85, -382, -441</i> und <i>-466</i> zeigen wie der WT Suszeptibilität gegenüber <i>V. longisporum</i>	106
3.6.2	JAZ1Δ3-Linien zeigen wie der WT Suszeptibilität gegenüber <i>V. longisporum</i>	109
3.6.3	Salicylsäure ist nicht in die Suszeptibilität-vermittelnde JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 involviert	111
4	Diskussion	113
4.1	<i>V. longisporum</i> zeigt schwachen Einfluss auf das pflanzliche Transkriptom im sterilen Plattensystem.....	114
4.2	Basal wird die <i>Phosphoglyceratmutase</i> durch eine anzestrale, JA-Ile-unabhängige COI1-Funktion reguliert.....	118
4.3	Es wird postuliert, dass die anzestrale Funktion von COI1 abhängig von JAZ ist	120
4.4	Die anzestrale Funktion von COI1 zeigt Unabhängigkeit von weiteren Komponenten der JA-Signalkaskade	124
5	Literaturverzeichnis	129
6	Anhang	145
	Danksagung	192
	Lebenslauf	194

Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
°C	Celsius
A	Ampere
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ACC	S-adenosyl-L-methionine methylthioadenosine
ANAC019	NAC-Transkriptionsfaktor
ANAC055	NAC-Transkriptionsfaktor
ANAC072	NAC-Transkriptionsfaktor
AOC	ALLENE OXIDE CYCLASE
AOS	ALLENE OXIDE SYNTHASE
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
ASK2	Skp1-like
AUX/IAA	Auxin
bHLH	basic helix-loop-helix
Bibdo	Birnboim und Doly
bp	Basenpaar
BSMT1	<i>BENZOIC ACID/SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1</i>
BTH	Benzothiadiazole S-methyl ester
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
COI1	CORONATINIE INSENSITIVE 1
COR	Coronatin
CT	Schwellenwert
CUL1	cullin-1
ddH2O	doppelt destiliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dpi	<i>day(s) post infection</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAR	<i>Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression</i>
EDTA	Ethylendiamidtetraessigsäure
ERF1	ETHYLENE RESPONSE FACTOR
ET	Ethylen
et al.	Et alii; and others
ETI	Effektor-triggered immunity
EtOH	Ethanol

Abkürzungsverzeichnis

ETS	Effector-triggered susceptibility
F	Farad
fwd	forward
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
Glu	Glutaminsäure
GUS	β -Glucuronidase
HALT	Histidin-Adenin-Leucin-Threonin
HCl	Salzsäure
HDA6	Histondeacteylase 6
HR	hypersensitive Antwort
ICS	Isochorismate Synthase
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin
JAZ	Jasmonate ZIM-domain
jin	JASMONATE INSENSITIVE
JMT	Jasmonsäure-Carboxylmethyltransferase
JoS	Johanna Schmitz
kDa	Kilo-Dalton
L	Liter
LB	Left border primer
Leu	Leucin
LOX2	LIPOXYGENASE ISOZYME
LP	linker primer
LRR	leucine-rich repeat
m	Meter
M	Molar
MeJA	Methyljasmonat
Met	Methionin
Min.	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
MS	Murashige & Skoog medium
MU	4-Methylumbelliferon
MUG	Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
MYB	MYB DOMAIN PROTEIN
NAC	(NAM/ATAF1, 2/CUC2)-Trankriptionsfaktor
NINJA	NOVEL INTERACTOR OF JAZ
nm	Nanometer
NPR1	NON EXPRESSOR OF PR GENES 1
OD	Optische Dichte
oNPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
OPDA	12-Oxophytodiesäure
ORA59	OCTADE CANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59

Abkürzungsverzeichnis

PAL	Phenylalanine ammonia lyase
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PCI	Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDB	Potato dextrose broth
PDF1.2	Plant defensin 1.2
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PR	PATHOGENESIS RELATED
PRR	pathogen recognition receptor
PTI	PAMP-triggered immunity
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
R	Resistenz
rev	revers
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
Rnase	Ribonuclease
RP	rechter Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SA	Salicylsäure
SAR	<i>Systemic acquired resistance</i>
SCF ^{COI1}	Skp1-Cul1-F-box
SD	Hefe-Minimalmedium
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SID2	SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT 2
SKP1	s-phase-kinase-associated protein 1
ss-HSP	Einzelstrang- Heringssperma
Std.	Stunde
SXM	simuliertes Xylem Medium
TAE	tris-acetate-EDTA
TAP	Tandem affinity Purification
taq	Thermus aquaticus
T-DNA	Transfer DNA
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine
TF	Transkriptionsfaktor
TIFY-Motiv	TIF[F/Y]XG-Motiv
TIR1	TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
TPL	TOPLESS
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethane
Trp	Tryptophan

Abkürzungsverzeichnis

Tyr	Tyrosin
U	Unit
UBQ5	Ubiquitin 5
ÜN	über Nacht
UV	Ultra Violet
V	Volt
V.	<i>Verticillium</i>
<i>V. albo-atrum</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>
<i>V. dahliae</i>	<i>Verticillium dahliae</i>
<i>V. l. 43</i>	<i>Verticillium longisporum</i> isolate 43
<i>V. longisporum</i>	<i>Verticillium longisporum</i>
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
WT	Wildtyp
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure
Y2H	Hefe-2-Hybrid-System
ZIM	Zinc-finger protein expressed in inflorescence Meristem
Ω	Ohm

1 Einleitung

Lebende Organismen sind einer Vielzahl ständig variierender Umweltfaktoren ausgesetzt und passen Wachstum und Differenzierung in einem kontinuierlichen Prozess an. Neben der Adaption an abiotische Bedingungen wie bestehende Klima- oder Bodenverhältnisse, sind Pflanzen ebenfalls in der Lage schädliche Einflüsse von biotischen Faktoren zu überdauern. Da Pflanzen aufgrund ihres Protein- und Kohlenhydratgehalts als geeignete Nährstoffressource Angriffsfläche für viele Pathogene und Schädlinge inklusive Viren, Bakterien, Pilzen, Oomyceten oder Nematoden bieten (Dangl und Jones, 2001), haben sie über die Jahre viele Verteidigungsstrategien entwickelt.

1.1 Das pflanzliche Immunsystem

Die Unterscheidung zwischen *eigen* und *fremd* ist die Grundvoraussetzung eines Organismus, Angriffe der verschiedenen Pathogene zu überleben und stellt die Basis zur Aktivierung der Immunantwort dar. Pflanzen verfügen dabei nicht über ein spezielles Immunsystem wie das der Wirbeltiere, die sich über adaptive Immunität und ein zirkulierendes Blutsystem zur Wehr setzen können. Bei dem pflanzlichen Immunsystem erfolgt die Aktivierung der Immunantwort aufgrund der sogenannten angeborenen Immunität (*innate immunity*), wobei jede Pflanzenzelle mit eigenen Abwehrmechanismen ausgestattet ist und individuell auf Fremdeinfluss reagiert (Nürnberger et al., 2004).

Trotz der großen Anzahl verschiedener Spezies der Pflanzenpathogene ist eine kompatible Pflanzen-Pathogen-Interaktion, in deren Verlauf sich das Pathogen vermehrt und die Pflanze Krankheitssymptome ausbildet, die große Ausnahme. Der größte Teil des Pflanzenbestandes zeigt Resistenz gegenüber allen genetischen Varianten eines nicht angepassten Pathogens. Diese Interaktionen von Pflanzen und Pathogenen bezeichnet man als Nicht-Wirts-Resistenz und beschreibt die verbreitetste und robusteste Form des pflanzlichen Resistenzmechanismus (Nürnberger und Lipka, 2005; Lipka et al., 2008; Heath, 2000).

Die pflanzliche Abwehr setzt sich aus konstitutiven Barrieren und induzierten Abwehrmechanismen zusammen. Einen ersten passiven Verteidigungsmechanismus, der das Eindringen des Pathogens in einer frühen Phase verhindert, bilden die physikalischen und konstitutiv vorhandenen Barrieren einer Pflanze, wie bspw. die Kutikula und Zellwand. In unterirdischen Pflanzenteilen übernimmt die Exo- und Endodermis eine Schutzfunktion vor Wurzelpathogenen. Durch eingelagertes Suberin dient der Casparische Streifen als Grenzbarriere zum pflanzlichen Apoplasten und verhindert das Eindringen von Pathogenen (Franke und Schreiber, 2007). Im Unterschied zu konstitutiven Barrieren werden die

induzierten Abwehrmechanismen erst nach der Erkennung des mikrobiellen Pflanzenschädling an der Plasmamembran aktiviert (Nürnberg und Lipka, 2005). Die Wahrnehmung von Pathogenen in Pflanzen erfolgt über PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*), spezifische Elicitoren von Mikroorganismen wie bspw. Flagellin (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez und Boller, 2002). PAMPs werden über membranlokalisierte PRRs (*pathogen recognition receptor*) erkannt, bei denen es sich entweder um RLKs (*receptor-like kinases*) oder RLPs (*receptor-like proteins*) handelt. Dies führt zur Aktivierung der PTI (*PAMP-triggered immunity*), ein Prozess, der mit dem Anschalten komplexer Signalkaskaden verbunden ist (Jones und Dangl, 2006; Senthil-Kumar und Mysore, 2013). Diese erste Stufe der induzierten Abwehr von Pflanzen erfolgt schnell und ist effektiv, kann jedoch von angepassten Pathogenen überwunden werden. Durch die Entwicklung von Effektorproteinen ist es Pathogenen möglich, Schritte des basalen Resistenzmechanismus zu blockieren. Das Typ III Sekretionssystem biotropher Bakterien ist eine effektive Maschinerie, die über eine Nadel-ähnliche Struktur Effektoren in eukaryotische Zellen überträgt und die ETS (*effector-triggered susceptibility*) von Pflanzen hervorruft (Chatterjee et al., 2013). Die Effektortranslokation von Pilzen und Oomyceten erfolgt dagegen meist über Haustorien, die den Wirt penetrieren, und Einstülpungen hervorrufen, die jedoch keine Verletzungen der Plasmamembran veranlassen (Petre und Kamoun, 2014). Die genaue Effektorabgabe dabei ist weitestgehend ungeklärt, jedoch konnte das RXLR-Motiv in den übertragenen Proteinen der Oomyceten identifiziert werden. Dieses Motiv ist entscheidend für die Translokation der Effektorproteine (Whisson et al., 2007). Weitere Sequenzen, die Translokation bei Pflanzen-Pathogen-Interaktionen bewirken, wurden in Wirt-spezifischen Toxinen von nekrotrophen Pilzen identifiziert. Diese veranlassen den Zelltod des Wirtes und sorgen für den Zugriff auf weitere Nährstoffe für Wachstum und Differenzierung des Pathogens (Petre und Kamoun, 2014; Vleeshouwers und Oliver, 2014).

Effektorproteine wiederum werden entweder direkt oder indirekt von pflanzlichen Resistenz-Genen (R) erkannt, wonach es zu einer starken Resistenzreaktion kommt (*effector-triggered immunity* (ETI)). Die ETI erfolgt schneller und intensiver als die PTI und führt meist zu einer hypersensitiven Antwort (HR), einhergehend mit lokaler Zelltodreaktion (Greenberg und Yao, 2004).

Die hypersensitive Antwort entzieht dem Pathogen Substrat und grenzt seine initiale Infektion ein. Hier wird allerdings zwischen verschiedenen Lebensweisen der Krankheitserreger unterschieden. Je nach Art der Pathogene erfolgt die Pathogen-Pflanzen-Interaktion aufgrund von nekrotrophen und biotrophen Wechselwirkungen. Nekrotrophe Organismen töten befallenes Gewebe einer Wirtspflanze und ernähren sich saprophytisch von der verbleibenden organischen Substanz. *Botrytis cinerea* ist ein Beispiel für einen nekrotrophes Pathogen. Für diesen Pilz wurde festgestellt, dass in *Arabidopsis thaliana* der Grad der Pathogenizität mit der Superoxid-Akkumulation einhergeht, dem

Produkt der durch den Pilz ausgelösten HR (Govrin und Levine, 2000; Glazebrook, 2005). Die hypersensitive Antwort schützt die Pflanze nicht vor nekrotrophen Pathogenen, ist aber effektiv gegenüber Pathogenen mit biotropher Lebensweise. Biotrophe Pflanzenpathogene benötigen Substrat lebender Pflanzen um ihr Überleben zu sichern und ihren Lebenszyklus zu komplementieren (Koeck et al., 2011). Zu den biotrophen Pathogenen gehört beispielsweise der Pilz *Cladosporium fulvum* (Joosten und de Wit, 1999).

Während sich einige Pathogene eindeutig den biotrophen oder nekrotrophen Organismen zuordnen lassen, weisen viele Pathogene beide Lebensweisen auf. Eine initiale biotrophe Phase, in der das Immunsystem des Wirtes unterdrückt ist, ermöglicht es dem Pathogen, sich in der infizierten Pflanze auszubreiten. In der anschließenden nekrotrophen Phase werden Toxine, lytische Enzyme und andere Moleküle vom Pathogen sekretiert die zum Zelltod des Wirts führen. Diese Pathogene werden als hemibiotroph bezeichnet. Auch das vaskuläre Pathogen *V. longisporum* wird als hemibiotroph eingestuft, da es im ersten Teil seines Lebenszyklus im Xylem überdauert und erst zum späteren Zeitpunkt ernsthafte Gewebeschäden der Pflanze hervorruft (Klosterman et al., 2011).

1.2 Phytohormone als Teil der Immunabwehr

Pflanzen können zwischen biotrophen und nekrotrophen Pathogenen unterscheiden und passen ihre Verteidigung durch das Anschalten verschiedener Signalkaskaden an. Phytohormone, kleine Moleküle, die in geringen Konzentrationen Wirkung zeigen, sind unter anderem an der Modulierung dieser Abwehrmechanismen beteiligt. Bei den bestanalyisierten Phytohormonen, die eine klassische Rolle in Abwehrreaktionen gegen die verschiedensten Pathogene spielen, handelt es sich um Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen. So ist das Phytohormon Salicylsäure in PTI und ETI involviert, die mit der hypersensitiven Antwort und dem *oxidative burst* einhergehen. Da die HR zum lokalen Zelltod der Pflanze führt, und damit das Substrat für biotrophe Pathogene entzogen wird, spielt Salicylsäure (SA) eine Rolle in Abwehrreaktionen bei biotrophen Interaktionen. Die Phytohormone Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) übernehmen bei der Interaktion mit nekrotrophen Pathogenen eine zentrale Signalfunktion (Glazebrook, 2005).

Das pflanzenspezifische Oxylin **Jasmonsäure** (JA) und seine Metabolite, genannt Jasmonate, sind Lipid-abgeleitete Moleküle, die verschiedene Prozesse wie Fertilität (McConn und Browse, 1996), Wurzelwachstum (Staswick et al., 1992) sowie Abwehr von Herbivoren und nekrotrophen Pathogenen regulieren (Browse, 2005; Wasternack, 2007).

Die Biosynthese von Jasmonsäure erfolgt über den Oktadekanoid-Weg und startet im Chloroplasten, wenn α -Linolensäure aus der Membran durch Phospholipasen freigesetzt wird (Abbildung 1.1) (Ellinger et al., 2010; Wasternack, 2007). Durch weitere enzymatische Schritte, die die Enzyme 13-Lipoxygenase (Chauvin et al., 2013), Allenoxidsynthase (AOS) (Park et al., 2002; von Malek et al., 2002) und Allenoxidcyclase (AOC) (Stenzel et al., 2003) einschließen, entsteht OPDA (12-oxo-Phytodien-säure). In den Peroxisomen wird OPDA dann durch eine Serie von enzymatischen Reaktionen, inklusive der OPDA-Reduktion und drei Runden der β -Oxidation, in Jasmonsäure umgewandelt (Breit-haupt et al., 2009; Kienow et al., 2008; Kombrink, 2012).

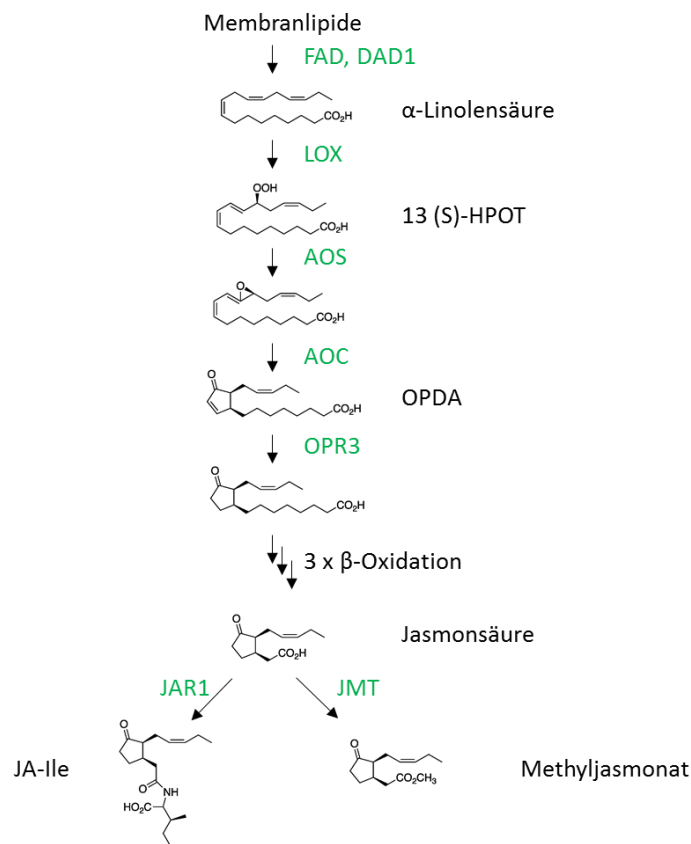


Abbildung 1.1 Vereinfachte Darstellung des Biosynthesewegs der Jasmonsäure durch den Oktadekanoid-Weg (verändert nach Howe, 2001)

In der Jasmonsäuresynthese involvierte Enzyme sind in grün dargestellt: Fettsäure-Desaturase 3, 7 & 8 (FAD), Phospholipase A1 (DAD1), Lipoxygenase (LOX); Allenoxidsynthase (AOS), Allenoxidcyclase (AOC), OPDA-Reduktase (OPR3), Jasmonsäure-Carboxylmethyltransferase (JMT), Jasmonoyl-Isoleucin-Synthetase (JAR1)

Anschließend wird JA im Cytosol durch die Jasmonsäure-Carboxylmethyltransferase (JMT) zu seinem flüchtigen Derivat, Methyljasmonat (MeJA), umgewandelt (Seo et al., 2001). JA und MeJA sind Signalmoleküle, die das Pflanzenwachstum und die Genexpression beeinflussen. In Arabidopsis inhi-

bieren sie zudem das Wurzelwachstum des Wildtypen (Staswick et al., 1992). Die exogene Applikation von MeJA rettet beispielsweise den JA-verantwortlichen Phänotypen der JA-Biosynthesemutante *aos* und inhibiert das Wurzelwachstum im gleichen Ausmaß wie im WT (von Malek et al., 2002). Die *jar1*-Mutante (*jasmonate resistant 1*) zeigt hingegen Resistenz gegenüber der Wurzelinhibierung nach MeJA-Behandlung. Das JA-Aminosäure-Konjugat JA-Ile allein, nicht aber JA oder MeJA, komplementieren die JA-insensitive Mutante und inhibiert das Wurzelwachstum. Dieses Resultat gibt Aufschluss darüber, dass es sich bei dem aktiven Hormon um JA-Ile, nicht aber um JA, MeJA oder andere JA-Aminosäure-Konjugate handelt (Staswick und Tiryaki, 2004).

Resistenz gegenüber Coronatin-, dem molekularen Analogon von Ja-Ile (Weiler et al., 1994) bzw. MeJA-vermittelnder Wurzelinhibierung zeigte hingegen die *coi1*-Mutante (Feys et al., 1994). Bei **CORONATINE INSENSITIVE1 (COI1)** handelt es sich um ein F-Box-Protein, das eine 34 %ige Sequenzhomologie zu einem weiteren F-Box-Protein, dem Auxin-Rezeptor TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1) aufweist (Xie et al., 1998; Dharmasiri et al., 2005). COI1 ist Teil eines funktionalen E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes, SCF^{COI1} (Skp1-Cul1-F-Box) und kontrolliert als Rezeptor durch selektiv gebundene Substrate die gezielte Ubiquitinierung und Degradierung dieser (Devoto et al., 2002; Xu et al., 2002; Takahashi et al., 2004). SCF-Komplexe sind aus den vier Untereinheiten SKP1 (*s-phase-kinase-associated protein-1*), CUL1 (*cullin-1*), einem kleinen RING-Fingerprotein, und einem F-Box-Protein zusammengesetzt. ASK2, ein SKP1-ähnliches Protein, fungiert dabei als Adaptor zwischen dem F-Box-Protein COI1 und der Cullin-RING-Ligase, welches das Ubiquitin-übertragende Enzym (E2) rekrutiert (Petroski und Deshaies, 2005) (Abbildung 3.27 (A)).

Es konnte gezeigt werden, dass COI1 als direkter Rezeptor für JA-Ile fungiert, ähnlich wie TIR1 für AUX/IAA (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010; Dharmasiri et al., 2005). COI1 kodiert für ein 67 kDa großes Protein und besteht aus zwei Domänen: eine kleine, N-terminale F-Box-Domäne sowie eine große LRR-Domäne (leucine-rich repeats), bestehend aus 18 LRRs mit versetzt angeordneten α -Helices und β -Faltblattstrukturen (Yan et al., 2009; Adams und Turner, 2010) (Abbildung 1.2 (A)). Während die F-Box-Domäne für die Protein-Protein-Interaktion mit ASK2 verantwortlich ist, sind die LRRs an der Interaktion mit JA-Ile beteiligt (Sheard et al., 2010). Die Struktur von COI1 weist eine Vertiefung des Proteins auf, die zusammen mit den verlängerten Schleifen des LRR-2, -12 und -14 die Bindetasche für JA-Ile formt (Abbildung 1.2 (A) & (B)). Die Bindetasche kann in vier kleinere Taschen (P1, P2, P3 und P4) unterteilt werden, die verschiedene Aminosäuren mit spezifischen Eigenschaften aufweisen (Abbildung 1.2 (B) und (C)). P1 beinhaltet Arg-496 und Tyr-444, die über Wasserstoffbrücken mit der Ketogruppe des Cyclopentanonrings von JA-Ile interagieren. Gegenüber liegend befindet sich P2, hydrophob aufgrund von Ala-86, Phe-89 und Leu-91 sowie Leu-469 und Trp-519. In diesem Teil der Bindetasche lagert sich die Pentenylseitenkette des Liganden an. P3 besteht hauptsächlich aus

hydrophilen Resten (Glu-355 und Arg-446), wohingegen P4 Reste aufweist (Val-411, Ala-384 und Arg-409), die die Seitenkette von JA-Ile binden. Tiefer liegend in der Bindetasche sorgen Aminosäuren wie Arg-85, Arg-348 und Arg-409 über Salz- und Wasserstoffbrücken für die Bindung der Amidgruppe des Liganden. Tyr-386 verstärkt die Bindung durch ausgebildete Wasserstoffbrücken zur Amingruppe des Liganden. P3 und P4 bilden zusammen mit JA-Ile eine neue Oberfläche die zur Bindung von JAZ-Proteinen führt. (Yan et al., 2009). Das F-Box-Protein COI1 vermittelt nämlich als Teil des SCF^{COI1}-Komplex JA-Signalwirkung durch Hormon-abhängige Ubiquitinierung und Degradierung der transkriptionalen JAZ-Repressor-Protein-Familie.

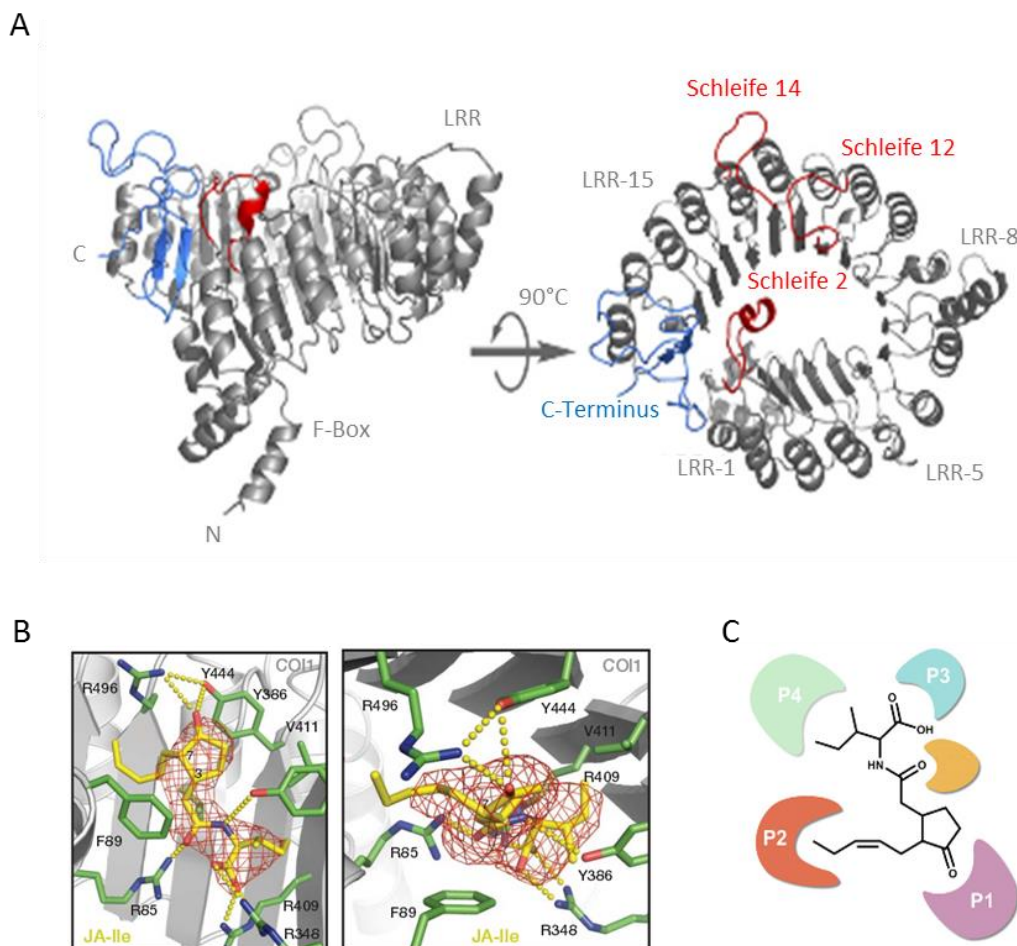


Abbildung 1.2 Strukturelles Modell von COI1 und Darstellung der Bindetasche des Proteins für JA-Ile (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010)

(A) Zwei Darstellungen des strukturellen COI1-Proteins, dargestellt als *ribbon model*. Die F-Box- und LRR-Domänen sind in grau dargestellt, das C-terminale Ende in blau. Die LRR-Motive sind durchnummeriert. Die drei oberhalb liegenden Schleifen von LRR-2, -12 und -14 sind in rot dargestellt. **(B)** Seitenansicht bzw. der Blick von oben auf JA-Ile, gebunden in der Bindetasche von COI1. Das Hormon ist als *stick model* dargestellt. Wasserstoff- und Salzbrückenbindungen sind in gestrichelten Linien (gelb) dargestellt. **(C)** Modell der Bindung von JA-Ile an COI1.

JAZ-Proteine (*jasmonate ZIM-domain*) fungieren in Abwesenheit des Hormons JA-Ile als Repressoren und inhibieren durch Bindung an Transkriptionsfaktoren deren Aktivität, was eine reprimierte JA-vermittelte Antwort zur Folge hat (Abbildung 1.3 (A)) (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007). In Anwesenheit von JA-Ile werden JAZ-Proteine zum SCF^{COI1}-Komplex rekrutiert, ubiquitiniert und durch das 26S-Proteasom degradiert (Abbildung 1.3 (B)). Die Degradierung der Repressoren führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die die JA-vermittelte Antwort aktivieren (Abbildung 1.3 (B)).

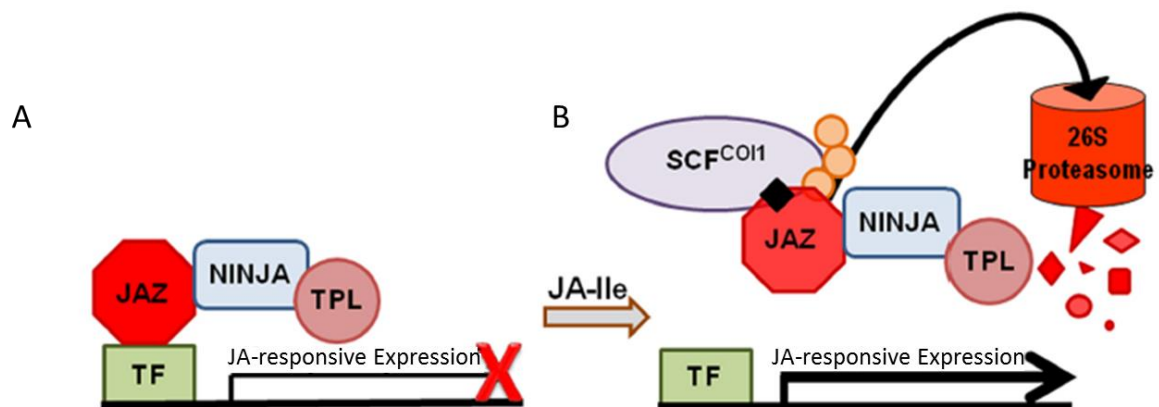


Abbildung 1.3 Modell der JA-Signalwirkung. (Wager und Browse, 2012)

(A) In Abwesenheit von JA-Ile binden JAZ-Proteine Transkriptionsfaktoren und rekrutieren Co-Repressoren wie NINJA und TOPLESS (TPL). Die Transkription von Genen wird reprimiert. **(B)** In Anwesenheit von JA-Ile (schwarze Raute), ermöglicht das Hormon die Interaktion von JAZ und dem F-Box Protein COI1, der Erkennungskomponente des SCF^{COI1}-Komplexes. Die Interaktion resultiert in der Ubiquitinierung (orange Kreise) und anschließender Degradierung des JAZ-Proteins durch das 26S-Proteasom. Transkriptionsfaktoren werden nicht mehr länger reprimiert und aktivieren die JA-vermittelnde transkriptionelle Antwort.

Arabidopsis thaliana weist 13 JAZ-Proteine auf, wovon 12 zur pflanzenspezifischen TIFY-Familie gezählt werden, benannt aufgrund des Kernmotiv TIF[F/Y]XG der ZIM-Domäne (Zinc-finger protein expressed in inflorescence Meristem) (Vanholme et al., 2007). Mitglieder der JAZ-Familie weisen neben hoher Sequenzvariabilität drei konservierte Domänen auf. N-Terminal findet man eine nicht näher charakterisierte, schwach konservierte Domäne (Hou et al., 2010) (Abbildung 1.4). Die zentral gelegene ZIM-Domäne besteht aus 30 Aminosäuren inklusive dem hoch konservierten TIF[F/Y]XG-Motiv. Das TIFY-Motiv wird sowohl für die Repressor-Aktivität als auch für die Bildung von Homo- und Heterodimeren benötigt (Vanholme et al., 2007). Die hoch konservierte, C-terminale Jas-Domäne (Chini

et al., 2007; Thines et al., 2007) ist in vielen Protein-Protein-Interaktionen involviert. Unter anderem vermittelt sie die Interaktion des JAZ-Proteins mit COI1 (Chini et al., 2007). JAZ-Proteine mit komplett oder nur teilweise deletierter Jas-Domäne weisen reduzierte Bindung mit COI1 auf (Chini et al., 2007; Thines et al., 2007; Yan et al., 2007).

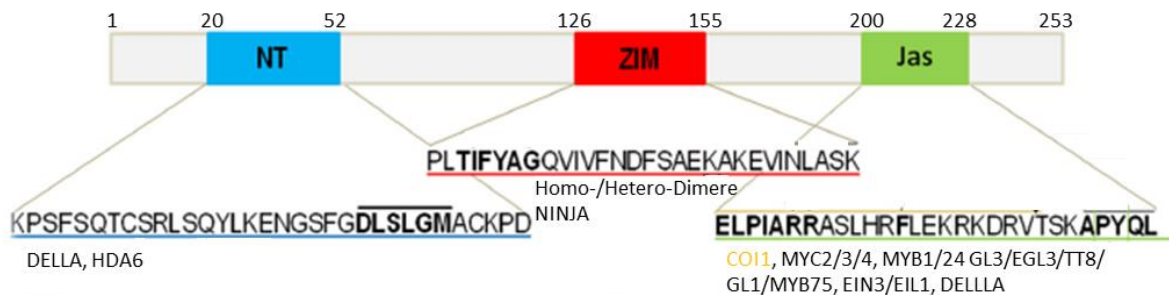


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der konservierten Domänen im JAZ-Protein (verändert nach Wager und Browse, 2012)

Die kolorierten Boxen zeigen die konservierten Domänen der JAZ-Familie (blau: N-terminale Domäne mit EAR-ähnlichem Motiv (fettgedruckte Aminosäuren), rot: zentrale ZIM-Domäne mit dem hoch konservierten TIF[F/Y]XG-Motiv (fettgedruckte Aminosäuren), grün: C-terminale Jas-Domäne) mit der darunter dargestellten Sequenz von JAZ1. Interagierende Proteine der jeweiligen Domäne sind unter der Sequenz aufgeführt.

Mittels *Tandem Affinity Purification* (TAP) konnte einer der beteiligten Mechanismen der reprimierenden Funktion von JAZ-Proteinen aufgeklärt werden. Das **NINJA**- (*NOVEL INTERACTOR OF JAZ*) Adaptorprotein und der Co-Repressor **TOPLESS** (TPL) wurden durch massenspektrometrische Analyse des aufgereinigten Komplexes identifiziert (Pauwels et al., 2010; Pauwels und Goossens, 2011). Es wird postuliert, dass die Transkription von JA-responsiven Genen von TOPLESS durch Histondeacetylierung reguliert wird. Histondeacetylierung führt zum „geschlossenen“ Zustand des Chromatins, welches daher nicht von Transkriptionsfaktoren gebunden werden kann und die Genexpression nicht aktiviert werden kann (Long et al., 2006). Im Auxin-Signalweg wirkt TPL als Repressor, indem AUX/IAA-Proteine TPL durch Interaktion mit einem DNA-bindenden Faktor zu Auxin-responsiven Promotoren rekrutieren (Szemenyei et al., 2008). Für den JA-Signalweg war deshalb ersichtlich, dass JAZ-Proteine die Co-Repressoren NINJA und TPL durch die Interaktion mit MYC-Transkriptionsfaktoren zu JA-responsiven Promotoren rekrutieren. Die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wird reprimiert. Dies unterstützend, zeigten *ninja*-RNA-Interferenz-Linien (RNAi) als auch *tpl1-1*-Mutanten Hypersensitivität gegenüber JA bezogen auf das Wurzelwachstum (Pauwels et al., 2010).

Aufgrund konstitutiver Aktivierung eines JA-responsiven Reporters *JAZ10:GUSPlus* im Hintergrund der *ninja*-Mutante konnte gezeigt werden, dass das NINJA-Protein in Wurzeln unentbehrlich für die Repression der JA-Signalkaskade und die Aufrechterhaltung des normalen Wurzelwachstums ist (Acosta et al., 2013).

Mögliche NINJA-unabhängige Mechanismen der JAZ-Repression werden postuliert wie bspw. die direkte Rekrutierung von TOPLESS durch JAZ5, JAZ6 bzw. JAZ8 über ein konserviertes EAR- (*ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression*) ähnliches Motiv, wie es für Auxin beschrieben wurde (Szemenyei et al., 2008; Causier et al., 2012; Shyu et al., 2012; Arabidopsis Interactome Mapping Consortium, 2011). Ein weiterer NINJA-unabhängiger Mechanismus erfolgt über die Interaktion der NT oder ZIM-Domäne des JAZ-Proteins mit HDA6, einer Histondeacetylase, die in die transkriptionelle Regulierung von JA-responsiven Genen, speziell als Co-Repressor in der Regulation der *ERF1*-Expression, involviert ist (Zhou et al., 2005).

Ein direkter Interaktionspartner für JAZ-Proteine wurde in den **MYC-Transkriptionsfaktoren** gefunden (Chini et al., 2007; Fernández-Calvo et al., 2011). Bei MYC2, MYC3 und MYC4 handelt es sich um Mitglieder der bHLH (*basic helix-loop-helix*) Familie, charakterisiert durch ihre bHLH-Domäne, die für die DNA-Bindung und Bildung von Homo- und Heterodimeren verantwortlich ist (Fernández-Calvo et al., 2011). Mitglieder der MYC-Transkriptionsfaktoren wirken redundant, denn Phänotypen der Einzelmutanten *myc2*, *myc3* und *myc4* lassen sich kaum vom Wildtypen unterscheiden. (Lorenzo et al., 2004; Cheng et al., 2011; Niu et al., 2011). Erst die Trippelmutante *myc2 myc3 myc4* weist einen JA-insensitiven Phänotyp auf, der dem *coi1*-Phänotypen sehr ähnlich ist. Jedoch ist die Trippelmutante weiterhin fertil und zeigt keine vollständige Resistenz gegenüber JA-vermittelter Inhibierung des Wurzelwachstums (Fernández-Calvo et al., 2011). Weitere Transkriptionsfaktoren wie bspw. MYB21 und MYB24 sind ebenfalls direkte Targets der JAZ-Proteine. Analysen der Doppelmutante *myb21 myb24* haben gezeigt, dass sie in die Regulation der Fertilität involviert sind und somit neben MYC-Transkriptionsfaktoren Teil der JA-Signaltransduktion sind (Song et al., 2011).

Mittels *Microarray*-Analysen wurde die *feedback* Regulierung der JAZ-Proteinexpression durch den MYC2-Transkriptionsfaktor erkannt. Somit ist *JAZ10* bspw. ein Gen, dessen Expression unter positiver Kontrolle von MYC2 steht (Chini et al., 2007). *VSP2* und *LOX2* sind andere Beispiele, deren Expression als Antwort auf Herbivorie und Verwundung durch MYC2 induziert wird (Reymond et al., 2000; Lorenzo et al., 2004; Acosta et al., 2013).

Wie eingangs erwähnt reguliert JA zusammen mit dem gasförmigen **Ethylen** (ET) Abwehrantworten gegenüber nekrotrophen Pathogenen (Dong, 1998). Die Interaktion zwischen JA und ET ist primär von synergetischer Natur. Ein klassisches Beispiel ist die durch den Transkriptionsfaktor ORA59

(*OCTADE CANOID-RESPONSIVE ARABIDOPSIS AP2/ERF59*) regulierte Expression des Abwehrgens *PDF1.2*, welches die gleichzeitige Aktivierung des JA- und ET-Signalweges fordert (Penninckx et al., 1998; Zander et al., 2010). Die Expression des Transkriptionsfaktors ERF1 (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR1*) ist ein weiteres Beispiel für die synergetische Wirkung beider Hormone (Pre et al., 2008; Lorenzo et al., 2003). Es ergeben sich damit zwei Wege der JA-vermittelnden Genexpression. Während MYC2 als positiver Regulator für die Expression von *VSP2* und *LOX2* fungiert, wirkt er als negativer Regulator für JA/ET-responsive Gene wie *PDF1.2*, deren Expression durch ORA59 aktiviert wird (Lorenzo et al., 2004). Infolgedessen lässt sich erkennen, dass bei kombinierter Aktivierung der JA- und ET-Signalkaskade die ORA59-vermittelte Genexpression der JA-Antwort aktiv ist, während in Abwesenheit von ET die MYC2-vermittelte Genexpression der JA-Antwort aktiv ist. Die Wechselwirkung zwischen ORA59 und MYC2 und damit zwischen JA und ET erlauben der Pflanze, die Expression von Genen für optimale Abwehrreaktionen gegenüber den jeweiligen Pathogenen abzustimmen. JA-Signalmutanten zeigen generell erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*. Die *jin1/myc2*-Mutante hingegen zeigt erhöhte Resistenz gegen das Pathogen. Da der inhibierende Effekt von MYC2 auf ORA59 in der *jin1/myc2*-Mutante nicht vorhanden ist, scheint die erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea* auf potenzierte Expression von ORA59-abhängigen Abwehrgenen zu beruhen (Lorenzo et al., 2004; Berrocal-Lobo et al., 2002).

Zusätzlich zu JA und ET ist **Salicylsäure** in die Organisation der komplexen Abwehrantwort einer Pflanze involviert. Das phenolische Signalmolekül Salicylsäure wirkt antagonistisch zur JA-vermittelnden Signalkaskade und spielt eine wichtige Rolle in der Pflanzenabwehr gegenüber biotrophen Pathogenen (Pieterse et al., 2009; Vlot et al., 2009). Neben lokalen Abwehrmechanismen, ausgelöst durch PTI (*PAMP-triggered immunity*) und ETI (*effector-triggered immunity*) ist SA für die Etablierung der langfristigen Immunität in Form der systemisch erworbenen Resistenz (*Systemic Acquired Resistance*, SAR) erforderlich (Tsuda et al., 2009; An und Mou, 2011; Durrant und Dong, 2004).

Salicylsäure wird in Pflanzen über zwei Synthesewege hergestellt, über den PAL- (*phenylalanine ammonia lyase*) Syntheseweg oder den ICS- (*isochorismate synthase*) Syntheseweg (Abbildung 1.5 (A)) (Chen et al., 2009; Wildermuth et al., 2001). Es konnte gezeigt werden, dass während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion der Hauptanteil an induzierbarer Salicylsäure durch den ICS-Syntheseweg produziert wird (Garcion et al., 2008).

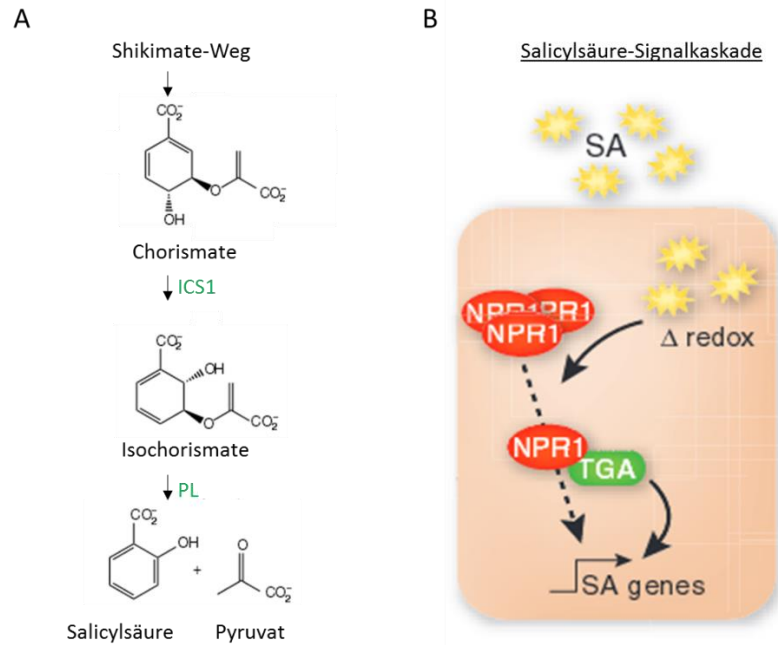


Abbildung 1.5 Biosyntheseweg (verändert nach Wildermuth et al., 2001) und Signalkaskade (Pieterse et al., 2009) der Salicylsäure

(A) Nach Infektion mit Pathogenen wird SA primär über den Isochorismat-Syntheseweg produziert. In der Salicylsäuresynthese involvierte Enzyme sind in grün dargestellt: Isochorismatsynthase (ICS1), Pyruvatlyase (PL, in Bakterien identifiziert). (B) Vereinfachte Darstellung der SA-Signalkaskade suggeriert, dass ein verändertes Redoxpotential in der Zelle NPR1-Oligomere in aktive Monomere umformt. NPR1 agiert im Zellkern als transkriptioneller Co-Aktivator mit TGA-Transkriptionsfaktoren und induziert die Expression von SA-abhängigen Genen.

In Chloroplasten katalysiert die Isochorismatsynthase die Umwandlung von Chorismat in Isochorismat, welches in einem zweiten Schritt in Salicylsäure umgesetzt wird (Wildermuth et al., 2001; Dempsey et al., 2011). Die SA-Biosynthese-Mutante *sid2* weist eine Mutation der *ICS1* auf und zeigt nach Infektion mit Pathogenen reduzierte SA-Akkumulation und erhöhte Suszeptibilität. Die durch Pathogen induzierte Genexpression ist ebenfalls reduziert, wie bspw. die Expression des SA-responsiven Gens *PR-1* (*PATHOGENESIS RELATED-1*) (Wildermuth et al., 2001). Durch Zugabe von exogenem SA oder SA-Analogen wie BTH (*benzothiadiazole S-methylester*) kann der Phänotyp der *sid2* komplementiert werden (Durrant und Dong, 2004; Nawrath und Metraux, 1999).

Die SA-Signalkaskade wird durch einen NPR1- (*NON EXPRESSOR OF PR GENES1*) abhängigen sowie NPR1-unabhängigen Mechanismus vermittelt. NPR1 spielt eine essentielle Rolle in der Etablierung der SAR und bei der Expression von *PR*-Genen (Cao et al., 1994). In Abwesenheit von SA bildet NPR1 im Cytoplasma Oligomere über Disulfidbrücken. Durch erhöhte SA-Mengen nach Infektion mit Pathogenen kommt es zur Veränderung der Redox-Homöostase: NPR1-Oligomere werden zu aktiven

Monomeren reduziert und in den Zellkern transportiert. Im Zellkern fungiert NPR1 als transkriptioneller Co-Aktivator für Transkriptionsfaktoren wie TGAs zur Regulierung von SA-responsiven Genen wie bspw. *PR-1* (Bowling et al., 1997; Mou et al., 2003; Tada et al., 2008).

NPR1 aktiviert nicht nur die lokale Immunantwort, sondern ist auch verantwortlich für transkriptionelle Änderungen in systemischen Geweben, ein Phänomen, dass als systemisch erworbene Resistenz (*Systemic Acquired Resistance, SAR*) bekannt ist. SAR führt über mehrere Wochen bis Monate zum Schutz der restlichen Pflanze vor sekundären Infektionen (Durrant und Dong, 2004).

Nach Infektion werden Signale wie Methylsalicylsäure (MeSA), Azelainsäure (Aza), Glycerin-3-Phosphat (G3P) und Dehydroabietinal (DA) gebildet, die die systemische Expression von *PR-1* in nicht befallenen, distalen Geweben der Pflanze positiv beeinflussen (Park et al., 2007; Jung et al., 2009; Chanda et al., 2011; Chaturvedi et al., 2012; Malamy et al., 1990). So zeigen bspw. Mutationen der G3P-Synthasen *GLY1* (G3P-Dehydrogenase) und *GLI1* (Glycerolkinase) kompromittierte SAR. Der Phänotyp kann durch exogene Zugabe von G3P in *gly1* und *gli1* wieder hergestellt werden (Chanda et al., 2011).

Salicylsäure aktiviert im Allgemeinen effektive Abwehrmechanismen gegenüber biotrophen Pathogenen, während die Abwehr gegenüber nekrotrophen Pathogenen mit Jasmonsäure-vermittelnden Verteidigungsmechanismen assoziiert ist (Glazebrook, 2005). Es handelt sich bei SA und JA um Phytohormone, die eine Hauptrolle in der Abwehr von Pathogenen übernehmen. Ihre überwiegend **antagonistische** Funktion moduliert die Immunabwehr und zeigt, dass die Komplexität des pflanzlichen Immunsystems nicht nur durch viele Phytohormone bedingt ist, sondern auch durch den *crossstalk* dieser untereinander (Kunkel und Brooks, 2002).

Ein erhöhter SA-Gehalt in Pflanzen ist mit reduzierter JA-Antwort verbunden und *vice versa* (Petersen et al., 2000; Spoel et al., 2003). Die Repression von JA-induzierter Expression durch SA erfolgt durch NPR1. Es wird vermutet, dass NPR1 die SA-vermittelte Suppression der JA-Signalweitergabe durch eine cytosolische Funktion ausführt (Spoel et al., 2003).

Auch auf der Ebene der regulierten Genexpression von NACs konnte der Antagonismus von SA und JA gezeigt werden. Mitglieder der NAC- (*NAM/ATAF1, 2/CUC2*) Transkriptionsfaktor-Familie wie ANAC019, ANAC055 und ANAC072 agieren *downstream* von MYC2 und wurden als positive Regulatoren von JA-induzierter *LOX2*- und *VSP1*-Expression identifiziert. Es handelt sich bei den NAC-Transkriptionsfaktoren um JA-induzierte Gene in Abhängigkeit von COI1 und MYC2 (Bu et al., 2008; Zheng et al., 2012). Ebenso induziert Coronatin die Expression der drei homologen NAC-Transkriptionsfaktoren durch direkte Aktivität von MYC2. Die damit einhergehende bakterielle Verbreitung in lokalem und systemischem Gewebe ist durch Coronatin-inhibierende Akkumulation von SA zu erklären. Die NAC-Transkriptionsfaktoren inhibieren die Expression des SA-Biosynthesegens *ICS1* und aktivieren

die Expression von *BSMT1* (*BENZOIC ACID/SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE1*), ein Gen, das für die SA-Methyltransferase kodiert, die SA in das inaktive und flüchtige MeSA umwandelt (Zheng et al., 2012).

Die Expression eines anderen NAC-Transkriptionsfaktors, *ATAF2*, wird durch das vaskuläre Pathogen *Verticillium longisporum* und durch *Fusarium oxysporum* induziert (Iven et al., 2012; Delessert et al., 2005). Die Überexpression des Transkriptionsfaktors *ATAF2* führt zur erhöhten Suszeptibilität gegenüber *F. oxysporum*. Aufgründessen wird postuliert, dass er als negativer Regulator der Pflanzenabwehr fungiert und pathogenbezogene Proteine in *Arabidopsis* reprimiert (Delessert et al., 2005).

1.3 Das vaskuläre Pathogen *Verticillium*

Verticillium gehört dem Phylum der *Ascomycota* (Schlauchpilze) an und wird der Untergruppe der filamentösen *Ascomyceten* zugeordnet (Hibbett et al., 2007). Die Gattung wird der Klasse der *Deuteromyceten* (Fungi imperfecti) zugeordnet, da sie keine Ascosporen ausbilden und sich somit nicht sexuell vermehren können. Die Fortpflanzung geschieht rein vegetativ (asexuell, amorph). Der Gattungsname *Verticillium* ist von der morphologischen Struktur der verzweigten Konidiophoren abgeleitet. Konidiosporen werden auf Phialiden gebildet, die sich seitlich vom Konidiophor abzweigen und wirtelig (*verticillate*) angeordnet sind (Inderbitzin et al., 2011).

Es handelt sich bei der Gattung *Verticillium* um eine weit verbreitete Gruppe von bodenbürtigen, hemibiotrophen Pflanzenpathogenen, die in kalten bis subtropischen Klimazonen vertreten sind. Die Gattung *Verticillium* verursacht vaskuläre Krankheiten in einem breiten Spektrum an Wirtspflanzen wie bspw. der Baumwolle, Kartoffel, Zuckerrübe, Tomate, Olive oder dem Raps (Pegg und Brady, 2002). Typische Krankheitssymptome nach Infektion mit *Verticillium* schließen Chlorose, Nekrose, Unterentwicklung, Welke (spezifisch für *V. dahliae*) und Ausbleichen der Blattnervatur ein. Sechs pflanzenpathogene Spezies beinhaltet die Gattung *Verticillium* (Barbara und Clewes, 2003). Bei *V. dahliae* und *V. albo-atrum* handelt es sich um die aggressivsten und bestuntersuchten Arten. Aus der interspezifischen Hybridisierung dieser beiden Arten ist vermutlich die von Karapapa und Kollegen (1997) erstmalig beschriebene Art *Verticillium longisporum* entstanden. Eine annähernde Verdopplung des Genoms (amphihaploid) lässt darauf schließen.

Verticillium longisporum unterscheidet sich in mehreren Punkten von *V. dahliae* bzw. *V. albo-atrum*. Der ersichtliche und namensgebende Unterschied von *V. longisporum* ist die längliche Form ihrer Konidien, die mit 7-9 µm etwa die zweifache Länge verglichen mit *V. dahliae* und *V. albo-atrum* auf-

weisen (Karapapa et al., 1997). Weiterhin grenzt sich *V. longisporum* durch sein Wirtsspektrum deutlich ab und ist vorwiegend pathogen für *Brassicaceae* (Kreuzblütlergewächse) (Zeise und Tiedemann, 2002). Die Spezialisierung von *V. longisporum* führt im europäischen Raum seit der letzten Dekade zu ernsthafter Bedrohung des Rapsanbaus und geht mit erheblichen Ernteaufschlägen einher (Zhou et al., 2006).

Untersuchungen der Interaktion von *V. longisporum* und *Brassica napus* haben gezeigt, dass Ernteaufschläge nicht durch die Welke der Pflanze erfolgen. Es gab keine Hinweise auf eine eingeschränkte Wasser- oder Nährstoffversorgung (Floerl et al., 2008). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass *V. longisporum de novo* Formation von funktionalem Xylem sowohl in *Brassica napus* als auch in *Arabidopsis thaliana* veranlasst. Infizierte und nicht gewässerte *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen geringere Symptome bezüglich des Trockenstresses als nicht infizierte Wildtypen (Reusche et al., 2012).

Unter Laborbedingungen kann auch die zur Familie der *Brassicaceae* gehörende Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* vom Wurzelpathogen *V. longisporum* infiziert werden (Steventon et al., 2001; Veronese et al., 2003). Als hemibiotrophes Pathogen überdauert der Pilz im ersten Teil seines Lebenszyklus im Xylem und ruft erst zum späteren Zeitpunkt ernsthafte Gewebeschäden der Pflanze hervor (Klosterman et al., 2011).

Ein Charakteristikum von *V. longisporum* und anderen *Verticillium*-Spezies ist der Wandel des Lebensstils während des **Infektionszyklus** einer Pflanze. Abhängig von den vorherrschenden Bedingungen, weist *V. longisporum* eine biotrophe oder nekrotrophe Lebensweise auf und überdauert in dormanter Form als Mikrosklerotien bis zum nächsten Infektionszyklus. Der Infektionszyklus lässt sich somit in eine parasitische, saprophytische und eine ruhende Entwicklungsphase einteilen (Fradin und Thomma, 2006). Erhalten Mikrosklerotien Zugang zu Kohlenstoff und Stickstoff von Wurzelexudaten, die in die Rhizosphäre abgegeben werden, sind die melanisierten und dickwandigen Überdauerungsstrukturen zur Keimung fähig (Abbildung 1.6). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass Monoterpene ebenfalls die Keimung und Kolonisierung von *Arabidopsis*-Wurzeln durch den Pilz stimulieren. Eine Überexpression der Monoterpensynthase TPS23/27 führt zur erhöhten Kolonisierung der Pflanzen durch *V. longisporum* (Roos et al., 2015). Aus Mikrosklerotien herauswachsende Hyphen folgen über kurze Distanzen dem Nährstoffgradienten zur potentiellen Wirtspflanze (Olsson, 1985; Fradin und Thomma, 2006). *Verticillium* tritt in die parasitische Phase seines Lebens ein, indem er die Pflanze an der Wurzelspitze oder an der Stelle lateraler Wurzelformation infiziert, Stellen an denen die Endodermis noch nicht vollständig ausgebildet ist (Bishop und Cooper, 1983; Pegg und Brady, 2002). Im Gegensatz zu anderen pathogenen Pilzen bildet *V. longisporum* keine Appressorien, sondern lediglich Hyphopodien (geringe Anschwellung der Hyphenspitze) (Eynck, 2007). Die Pilzhyphen wachsen inter- und intrazellulär durch den Wurzelkortex zum Zentralzylinder. Die Kolonisierung des Xylems

durch *V. longisporum* ist im Gegensatz zu *V. dahliae* nur auf einzelne Leitgefäße des Xylems beschränkt. Diese eingegrenzte Kolonisierung kann erklären, warum *V. longisporum* keine Welke in *Brassica napus* hervorruft (Eynck, 2007). Im vaskulären Gewebe werden Konidien gebildet, die mit dem vaskulären Strom aufwärts transportiert werden. Erreicht der Pilz sogenannte *trapping sites*, keimen die neu gebildeten Konidien und penetrieren angrenzende Zellen zur Fortführung der systemischen Kolonisierung (Beckman, 1987; Eynck, 2007). Im weiteren Verlauf der Infektion kommt es zur Ausbildung von Krankheitssymptomen wie stagnierendem Pflanzenwachstum oder auch Chlorosen und Nekrosen. Der Pilz wechselt in die nekrotrophe Phase seines Lebens und ernährt sich saprophytisch von abgestorbenen Pflanzenresten. Mikrosklerotien werden vom Pilz gebildet und gelangen mit dem abgestorbenen Pflanzenmaterial zurück in den Boden. Mehr als eine Dekade ist es dem Pilz möglich als Überdauerungsstruktur zu überleben, bis es erneut zur Keimung durch Wurzelexudate kommt (Pegg und Brady, 2002).

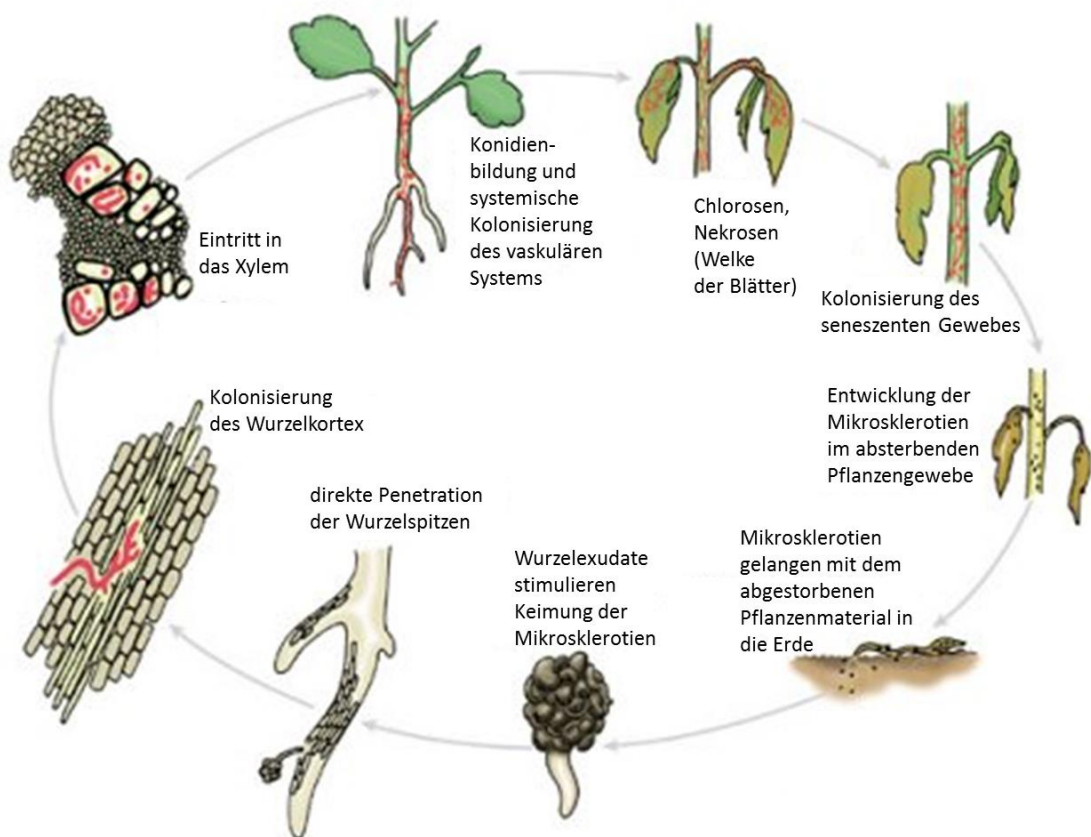


Abbildung 1.6 Lebenszyklus von *Verticillium*-Arten (verändert nach Berlangier und Powelson, 2000)

1.3.1 Kontrolle von *Verticillium*-bedingten Krankheiten und Resistenzmechanismen von Pflanzen gegenüber diesem Pilz

Der Lebenszyklus von *Verticillium* weist einige Besonderheiten auf, die die Kontrolle *Verticillium*-ausgelöster Krankheiten erschweren. In einem frühen Stadium der Infektion wächst der Pilz innerhalb des vaskulären Gewebes einer Pflanze, was die Bekämpfung des Pilzes mit Fungiziden unmöglich macht, ohne die Pflanze in ihrem Wachstum zu beeinflussen oder gar zu töten. Die Langlebigkeit der Überdauerungsformen stellt ebenfalls ein großes Problem dar, um *Verticillium*-vermittelte Krankheiten zu kontrollieren. Zur Eindämmung der Krankheiten wurde ein Focus auf Versuche gelegt, die Menge des Inokulums im Boden von Anbaugeländen zu verringern. So wurde lange Zeit Bromethan als Schädlingsbekämpfer eingesetzt. Aufgrund der damit einhergehenden Nebenwirkungen auf die Umwelt wurde die Anwendung wieder begrenzt (Martin, 2003). Eine wechselnde Fruchtfolge auf den Anbaugeländen zeigt allein für *V. longisporum* aufgrund seines eingeschränkten Wirtsspektrums Effizienz. So kann eine mehrjährige Unterbrechung in der Raps-Fruchtfolge das Inokulum im Boden effektiv verringern (Pegg und Brady, 2002).

Wegen der bisher wenig effizienten Maßnahmen die Krankheit, ausgelöst durch *Verticillium*, zu kontrollieren, sind neue Strategien zur Limitierung der *Verticillium*-Verbreitung notwendig. Die favorisierte Methode ist dabei die Züchtung genetisch resistenter Pflanzen, in Europa speziell von *Brassica napus* aufgrund der wachsenden Nachfrage als Quelle für Biokraftstoff und Speiseöl.

Im Focus der bisher genetisch basierten **Resistenzmechanismen** einer Pflanze gegenüber *Verticillium* liegt der in Tomatenpflanzen identifizierte polygene Resistenz-Locus *Ve1*, der Resistenz gegenüber *V. dahliae* und *V. albo-atrum* vermittelt (Kawchuk et al., 2001). *Ve1* kodiert für einen putativen, Plasmamembran-lokalisierten, *leucine-rich repeat*-Rezeptor der Klasse der RLPs (*receptor-like protein*) (Kawchuk et al., 2001). Als Ligandensensor erkennt *Ve1* den sezernierenden Effektor *Ave1* von *Verticillium* (Zhang et al., 2014). Aufgrund der Bindung von *Ve1* mit *SOBIR1* (*SUPPRESSOR OF BIR1*), einer Rezeptor-ähnlichen Kinase, erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung und die damit einhergehende *Ve1*-vermittelnde Immunität (Fradin et al., 2014; Liebrand et al., 2013). Funktionale Komplementationsanalysen wurden mit suszeptiblen Kartoffelsorten durchgeführt. *Ve1* vermittelt auch in anderen *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) Resistenz gegenüber *V. albo-atrum* (Kawchuk et al., 2001).

Neben den RLPs unterscheidet man ebenfalls die Klasse der RLKs (*receptor-like kinases*). Beide Klassen der R-Proteine weisen extrazelluläre LRR-Regionen sowie eine einzelne Transmembrandomäne auf. RLKs besitzen zusätzlich eine cytoplasmatische Serin/Threonin-Kinase-Domäne und sind somit nicht auf die Interaktion mit externen Kinasen zur Signalweitergabe angewiesen (Joosten und de Wit, 1999; Kruijt et al., 2005). Die Präsenz vieler RLPs und RLKs in diversen Pflanzenspezies suggeriert,

dass diese Gene eine wichtige Rolle in der Wahrnehmung und Weiterleitung von Pflanzenpathogenen spielen (Kruijt et al., 2005).

Ein Beispiel für eine solche RLK in *Arabidopsis thaliana* ist die Zellwand-assoziierte Rezeptor-ähnliche Kinase RFO3 (*RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM*). Sie vermittelt Resistenz gegenüber einem weiteren bodenbürtigen, vaskulären Pflanzenpathogen, *Fusarium oxysporum f.sp. matthioli* (FOM). Nach Infektion von *Arabidopsis* mit dem Wurzelpathogen *F. oxysporum* kommt es zur erhöhten Expression von RFO3 im vaskulären Gewebe. Pfropfungsexperimente zeigen, dass die Expression von RFO3 in Wurzeln die Infektion des vaskulären Gewebes durch das Pathogen verhindert und somit maßgeblich an der Resistenz-vermittelnden Funktion beteiligt ist (Cole und Diener, 2013).

Resistenz-vermittelnde Prozesse können neben der prävaskulären Phase auch erst später, in der vaskulären Phase, anlaufen (Talboys, 1972). Wenn der Pilz die prävaskuläre Abwehr überwunden hat, kann die Deposition von Suberin in vaskulären Zellen eine Barriere gegen die Penetration vom Pilz formen und verhindert somit die horizontale Ausbreitung des Pathogens über Xylemgefäße (Robb et al., 1989). In dieser Phase der Infektion unterstützt die Akkumulation verschiedener antimikrobieller Substanzen die Abwehr der Pflanze. Dazu zählen bspw. PR- (*pathogenesis-related*) Proteine wie Glucanasen und Chitinasen, phenolische Komponenten und Phytoalexine wie bspw. elementarer Schwefel (Daayf et al., 1997; Fradin und Thomma, 2006). Generell werden diese Substanzen in resistenten als auch in suszeptiblen Pflanzen gebildet. Resistente Pflanzen weisen jedoch erhöhte Mengen der Substanzen auf.

Durch die Analyse apoplastischer Waschflüssigkeiten *Verticillium*-infizierter *Brassicca napus var. napus*-Blätter wurden weitere Proteine gefunden, deren Expression nach Infektion signifikant induziert wurden. Unter anderem wurde ein Germin-ähnliches Protein (GLP3) gefunden (Floerl et al., 2008). Durch Infektionen einer T-DNA-Insertionslinie des GLP3 wurde im Vergleich zum WT eine größere infektionsbedingte Reduktion der Blattfläche und Biomasse gezeigt. GLP3 ist somit in Resistenz-vermittelnde Reaktionen gegen *Verticillium* involviert (Drübert, 2011).

Ein weiteres Protein **COI1**, der Rezeptor für JA-Ile, ist in Suszeptibilität-vermittelnde Prozesse gegenüber *V. longisporum* und auch *Fusarium oxysporum* involviert (Ralhan et al., 2012; Thatcher et al., 2009). Nach Infektion mit *V. longisporum* zeigt die JA-Hormonrezeptormutante *coi1-t* weniger ausgeprägte Krankheitssymptome als seine entsprechende Hormon-Biosynthesemutante *aos*. Diese Ergebnisse waren ungewöhnlich, da beide Mutanten, sowohl *coi1-t* als auch *aos* eine Mutation im Jasmonsäureweg aufweisen und daher keine JA-vermittelnde Genexpression, die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen vermittelt, aktivieren können. Während für die Interaktion mit *Fusarium* noch über Oxylipine, abgeleitet vom Pilz, diskutiert wird, konnte für die *V. longisporum*-Pflanzen-Interaktion die Synthese von JA-Ile des Pilzes wiederlegt werden (Thatcher et al., 2009; Ralhan

et al., 2012). Da von *V. longisporum* keine JA-Ile ähnliche Substanz gebildet wird, die COI1 aktiviert, wird im Gegensatz zur klassischen Funktion von COI1 als Rezeptor für JA-Ile, eine JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* vermittelt. Durch Pfropfungsexperimente von chimären Pflanzen wurde gezeigt, dass diese neue Funktion von COI1 in der Wurzel aktiv ist und im oberen Pflanzenteil dem Pilz ermöglicht, Krankheitssymptome in *Arabidopsis thaliana* hervorzurufen (Ralhan et al., 2012).

1.4 Ziel der Arbeit

Aufgrund vorheriger Infektionsanalysen von *Arabidopsis thaliana* mit *Verticillium longisporum* wird eine JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die Suszeptibilität gegenüber dem Pathogen vermittelt (Ralhan et al., 2012).

1. Aufgrund von RNA-Seq-Analysen von infizierten Col-0, *aos* und *coi1-t* Wurzeln möchten wir die Frage klären, ob wir Gene identifizieren können, die unabhängig von JA-Ile durch COI1 reguliert werden und in Suszeptibilitätsmechanismen gegenüber *V. longisporum* involviert sind.
2. Mit Hilfe von Mutanten bzw. transgenen Pflanzen, die in der JA-Ile abhängigen Signaltransduktion gestört sind (*JAZ1Δ3*, *ninja* und *myc2,3,4*) soll in Erfahrung gebracht werden, ob die neue Funktion von COI1 dem klassischen JA-Weg folgt oder weitere Unabhängigkeit von diesem Signalweg zeigt. Dies soll durch Expressionsanalysen der unter 1. ermittelten Gene erfolgen.
3. Es soll die Bedeutung der Ligandenbindestelle von COI1 für die neue Funktion dieses Proteins analysiert werden. Dazu soll die *coi1*-Mutante mit verschiedenen, mutierten *COI1*-Proteinen komplementiert werden, in denen spezifische, den Liganden kontaktierende Aminosäuren verändert wurden und die unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor exprimiert werden. Der Erfolg der Komplementation wird durch die Expressionsanalyse der unter 1. identifizierten Gene überprüft.
4. Es sollen Gene von *V. longisporum* identifiziert werden, deren Expression durch Infektion von *A. thaliana* beeinflusst werden. Interessant ist hierbei ob der pflanzliche Genotyp dafür eine Rolle spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Oligonukleotide

Tabelle 2.1 Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

Die Oligobukleotide wurden von den Firmen Microsynth (Lindau, Deutschland) und Lifetechnologie (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert. qRT-PCR Oligonukleotide wurden bei Qiagen als QuantiTec-Primer-assays™ bestellt. Grossbuchstaben geben die Gatewaysequenz an, in rot markierte Basen entsprechen der TIR1 Sequenz (AT3G62980)

Bezeichnung	Gen	Sequenz
Oligonukleotide für qRT-PCR		
AT3G30750	<i>CYP71A12</i>	QuantiTec
AT2G38870	<i>Protease inhibitor</i>	QuantiTec
AT1G02930	<i>GST1</i>	QuantiTec
AT5G37970	<i>SAM-Methyltransferase</i>	QuantiTec
AT4G21490	<i>NDB3</i>	QuantiTec
AT1G74710	<i>ICS1</i>	QuantiTec
AT5G39190	<i>GLP2A</i>	QuantiTec
AT2G14080	<i>Disease resistance protein</i>	QuantiTec
AT2G29220	<i>LERCK 31</i>	QuantiTec
AT3G60420	<i>Phosphoglycerate mutase</i>	QuantiTec
AT4G23230	<i>CRK15</i>	QuantiTec
AT5G13220	<i>JAZ10</i>	QuantiTec
AT1G26390_5	<i>FAD-binding Berberine family protein</i>	aaagctaagagtgatcctgaga
AT1G26390_3	<i>FAD-binding Berberine family protein</i>	gtaaaatttagagcatacaatcc
PLA2A_5	AT2G26560	aagaaaagaagatccgagac
PLA2A_3	AT2G26560	attcaaactgatacaagtgacc
Egfp Qtect-R	GFP	gaactccagcaggaccatgtg
Egfp Qtect-F	GFP	accactaccagcagaacaccc
Act8fwd	<i>Actin 8</i>	ggttttccccagtgtgttg
act8rev	<i>Actin 8</i>	ctcatgtcatcccagttgc
Olg70		cagcgaacgcgatatgtag

Material

Olg71		ggcttgtagggggttaga
UBQ5fwd	<i>Ubiquitin</i>	gacgcttcatctcgcc
UBQ5rev	<i>Ubiquitin</i>	gtaaacgtaggtgagtcca
Oligonukleotide zur Klonierung		
coi185fw		ctcacttgctgactttaatctgatccctgagaactgg
coi185rev		gatcagattaaagtcaagaaagtaggcttgcccttaagcttgac
coi198Dfw		ccctgagaactggggagattatgttactccttggg
coi198Drev		cccaaggagtaacataatctccccagttctcaggg
coi1382fw		agctagaaatcggttcttacttctgctcagatataactaacgaatctcttgaag
coi382rev		ctgagcagaagtagagaaccgattctagctcctggcagccctgag
coi441fw neu!		cgatctctctctatctggccttaaccgacttgggcttaagctac
coi441rev neu!		gttaaaggccagatagagagagatcgctctgagtttcttgcaccaatc
coi466fw neu!		cgtgagaatgctctcagtggcatttgcaggatcagatgaaggttaatg
coi466rev neu!		tgcaaatgccactgagagcatctcacgtttgactgtactgtccgatgtag
GBTterm-primer		atcataatcatagaaattcgcccg
pBD2modi (fw)		catcatcatcggaagagagtagtaac
JAZ1d3-GUS + attB for		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCatgtcgagttctatggaatggt- ctgagtt
JAZ1d3-GUS + attB rev		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTcattgtttgcc-tcctgctgcg
attB1 + GUS for		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCatggtccgtc-ctgtagaaacc
attB2 + GUS rev		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCattgtttgcc-tccctgctgcg
ASK2-attb for		GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCatgtcgacggtgagaaaaatca
AKS2-attb rev		GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCattcaaacgc-ccactgat
Oligonukleotide zur Genotypisierung		
ecoi-LP		tggaccatataaattcatgcagtc
ecoi-RP		ctgcagtgtgtaacgatgctc
LBb1.3		atthtggcatttcggaac
LBb1		gcgtggaccgcttgctgcaact

Material

Oligonukleotide Zur Sequenzierung	
pGBK7coi1fw1311	agggtgaaattgagctgcgctc
pGBKcoi1rev1819	agccacttaccatccttttcac
Seq-L1	tcgcgtaaacgctagcatggatctc
Seq-L2	gtaacatcagagattttgagacac
pB2GW7-fwd	cacaatcccactatccttcgca
pB2GW7-rev	catgagcgaaaccctataagaacc
35S term_pB2GW7HA-rev	gaaccctaattcccttat
Coiseqs1	ttagccgtcgattcccgaacttg
Coiseqs2	gaaaccatagctagaaattgccg
PYK raus for	cttcgatatgtaaagaaccatcctaaac
PYK Mitte for	ccaactgttgaccacatagctgataac

2.1.2 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz
pDONR201	gateway™ Entry-Vektor zur Klonierung von PCR-Fragmenten, <i>KmR</i>	Invitrogen
pDONR201 + COI1	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA von COI1 (AT2G39940)	diese Arbeit
pDONR201 + COI1-85	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-85	diese Arbeit
pDONR201 + COI1-98	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-98	diese Arbeit
pDONR201 + COI1-382	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-382	diese Arbeit
pDONR201 + COI1-441	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-441	diese Arbeit
pDONR201 + COI1-466	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-466	diese Arbeit
pB2GW7-HA	Gateway™ Expressionsvektor für Pflanzentransformation, beinhaltet den CaMV 35S-Promotor, ein 3× HA-tag (N-terminal), und ein BASTA-Resistenzgen als Selektionsmarker, <i>SpR</i>	Corinna Thurow
pB2GW7-HA + COI1	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA von COI1 (AT2G39940)	diese Arbeit
pB2GW7-HA + COI1-85	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-85	diese Arbeit

Material

pB2GW7-HA + COI1-98	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-98	diese Arbeit
pB2GW7-HA + COI1-382	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-382	diese Arbeit
pB2GW7-HA + COI1-441	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-441	diese Arbeit
pB2GW7-HA + COI1-466	pB2GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-466	diese Arbeit
pDEST-GAD	Gateway™ Expressionsvektor für Hefetransformation, beinhaltet den ADH-Promotor ein Leucinsynthesegen als Selektionsmarker, <i>AmpR</i> . Der Vektor ist designed um Fusionsproteine inklusive N-terminaler Gal4-Aktivierungsdomäne und HA tag zu erstellen.	Invitrogen
pDEST-GAD + JAZ9	pDEST-GAD Derivat, beinhaltet die cDNA von JAZ9 (AT1G70700)	
pDEST-GAD + ASK2	pDEST-GAD Derivat, beinhaltet die cDNA von ASK2 (AT5G08590)	diese Arbeit
pDEST-GBKT7	Gateway™ Expressionsvektor für Hefetransformation, beinhaltet den ADH-Promotor ein Tryptophansynthesegen als Selektionsmarker, <i>KanR</i> . Der Vektor ist designed um Fusionsproteine inklusive N-terminaler Gal4- Bindedomäne und <i>myc</i> tag zu erstellen.	Invitrogen
pDEST-GBKT7 + COI1	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA von COI1 (AT2G39940)	diese Arbeit
pDEST-GBKT7 + COI1-85	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-85	diese Arbeit
pDEST-GBKT7 + COI1-98	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-98	diese Arbeit
pDEST-GBKT7 + COI1-382	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-382	diese Arbeit
pDEST-GBKT7 + COI1-441	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-441	diese Arbeit
pDEST-GBKT7 + COI1-466	pDEST-GBKT7 Derivat, beinhaltet die cDNA des mutierten COI1-466	diese Arbeit
pE-HA	Gateway™ Expressionsvektor, beinhaltet den 35S-Promotor, ein 3× HA-tag (N-terminal), <i>AmpR</i>	Iven, 2009
PYK-TOPO	Promotor von PYK10 wurde in pCR2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert <i>KanR</i> , <i>AmpR</i>	Thomas Schmülling

Material

PYK10GW7-HA	Erstellter Gateway™ Expressionsvektor für Pflanzen-transformation in Anlehnung an pB2GW7-HA, beinhaltet den PYK10 Promotor, ein 3× HA-tag (N-terminal), und ein BASTA-Resistenzgen als Selektionsmarker, <i>SpR</i>	Jennifer Huhn, BSc-Arbeit
pDONR201 + GUS	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA von GUS	Jennifer Huhn, BSc-Arbeit
pDONR201 + JAZ1Δ3	Entry-Vektor Derivat, beinhaltet die cDNA von JAZ1Δ3	Sandra Balnojan, BSc-Arbeit
PYK10GW7-HA + GUS	PYK10GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA von GUS	Sandra Balnojan, BSc-Arbeit
PYK10GW7-HA + JAZ1Δ3	PYK10GW7-HA Derivat, beinhaltet die cDNA von JAZ1Δ3	Sandra Balnojan, BSc-Arbeit

2.1.3 Organismen

Bakterien	Eigenschaft	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	PMP90RK <i>rifr</i> , <i>gmr</i>	Koncz und Schell, 1986
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F-, <i>gyrA</i> 96 (Nalr), <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (rk-mk+), <i>glnV44</i> , <i>deoR</i> , D (<i>lacZYA-argF</i>) U169 [p80dD(<i>lacZ</i>)M15]	Hanahan, 1983
Pilze	Eigenschaft	Referenz
eGFP- <i>Verticillium longisporum</i> 43	eGFP-Reporterstamm von <i>V.l.</i> 43	Eynck, 2007
<i>Verticillium longisporum</i> 43	isoliert in Mecklenburg / Deutschland	Zeise und Tiedemann, 2002
Hefe	Eigenschaft	Referenz
PJ69-4A	MATα, <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>GAL2-ADE2</i> , <i>LYS2 ::GAL1-HIS3</i> , <i>met2::GAL7-lacZ</i>	James et al., 1996
Pflanzen	Eigenschaft	Referenz
Columbia, Col-0	Wildtyp	NASC stock Nr. N1902
Columbia, Col- <i>gl1</i>	Wildtyp, mit Defekt in der Trichomentwicklung	Oppenheimer et al., 1991
WT _{<i>aos</i>}	<i>aos</i> x Col-0, aus heterozygoter <i>aos</i> Mutante herausgekreuzter Wildtyp	AG Gatz

Material

WT _{coi1-t}	aus heterozygoter <i>coi1-t</i> Mutante herausgekreuzter Wildtyp	Mosblech et al., 2011
<i>aos</i>	JA-Biosynthesemutante	SALK 017756, Alonso et al., 2003
<i>coi1-t</i>	T-DNA Insertionslinie innerhalb COI1 (AT2G39940)	Mosblech et al., 2011
<i>coi1-16</i>	JA-insensitiv, singel Nukleotid- austausch (L245F)	Ellis und Turner, 2002
<i>coi1-1</i>	<i>Knock-out</i> -Linie, durch singel Nukleotidaustausch kommt es zum STOP-Codon (W467STOP)	Feys et al., 1994, Xie et al., 1998
<i>coi1-5</i>	singel Nukleotidaustausch (D98G)	Yan et al., 2009
<i>sid2-2</i>	SA Biosynthesemutante, Col- <i>gl1</i> Hintergrund	Ralhan, 2013
<i>sid2-2 x coi1-1</i>	SA-Biosynthesemutante, JA-Biosynthesemutante, Col- <i>gl1</i> Hintergrund	Ralhan, 2013
<i>myc2,3,4</i>	<i>Knock-out</i> -Linie der Transkriptions- faktoren MYC2,3,4	Fernández-Calvo et al., 2011
<i>ninja</i>	<i>Knock-out</i> -Linie, durch singel Nukleotidaustausch kommt es zum STOP-Codon (P224STOP)	Ted Farmer
<i>coi1-1 x ninja</i>	<i>Knock-out</i> -Linien beider Proteine	Ted Farmer
<i>PYK10:GUS</i>	Leervektorkontrolle, Col-0 Hintergrund	Jennifer Huhn, BSc-Arbeit
<i>PYK10:JAZ1Δ3-GUS</i>	exprimiert <i>JAZ1Δ3-GUS</i> unter dem wurzelspezifischen Promotor PYK10, N-terminal 3x HA-tag	Sandra Balnojan, BSc-Arbeit
<i>35S:JAZ1Δ3-GUS</i>	Überexpressionslinie, exprimiert <i>JAZ1Δ3-GUS</i> unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor	Thines et al., 2007
<i>35S:HA</i>	Leervektorkontrolle, Col- <i>gl1</i> Hintergrund	diese Arbeit
<i>35S:HA-COI1</i>	Überexpressionslinie, exprimiert <i>COI1</i> unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag	diese Arbeit
<i>35S:HA-COI1-85</i>	Überexpressionslinie, exprimiert <i>COI1-85</i> unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag	diese Arbeit
<i>35S:HA-COI1-98</i>	Überexpressionslinie, exprimiert <i>COI1-98</i> unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag	diese Arbeit

Material

<i>35S:HA-COI1-382</i>	Überexpressionslinie, exprimiert diese Arbeit COI1-382 unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag
<i>35S:HA-COI1-441</i>	Überexpressionslinie, exprimiert diese Arbeit COI1-441 unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag
<i>35S:HA-COI1-466</i>	Überexpressionslinie, exprimiert diese Arbeit COI1-466 unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotor, N-terminal 3x HA-tag

2.1.4 Puffer und Lösungen

TAE-Puffer (20X): 0,8 M Tris, 2,3 % (v / v) Essigsäure, 20 mM EDTA

Bibdo I : 25 mM Tris pH 8, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose 0,5 % RNaseA (10 mg/mL)

Bibdo II: 0,2 N NaOH, 1 % SDS

Bibdo III: 3 M Kaliumacetat, 11,5 % Essigsäure, pH 5,2

AspA (50X): 3,5 M Natriumnitrat, 350 mM Kaliumchlorid, 550 mM KH₂PO₄, pH 5,5

2.1.5 Nährmedien

dYT: 20 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl

Hydroponisches Medium: 72 µM Fe-EDTA, 50 µM KCl, 50 µM H₃BO₃, 10 µM MnSO₄, 2 µM ZnSO₄, 1,5 µM CuSO₄, 0,1 mM NaSiO₃, 0,5 mM KH₂PO₄, 0,075 nM Na₂MoO₄; 1,25 mM KNO₃, 0,75 mM MgSO₄, 1,5 mM Ca(NO₃)₃, die Lösung wurde aus 1000-fach konzentrierten Stammlösungen angesetzt, es wurde Leitungswasser verwendet, auf Autoklavieren wurde verzichtet

MS-Medium: 4,4 g/L MS-Medium, 20 g/L Saccharose, pH 5,7 mit KOH, 6,8 g/L Agar

½ MS-Medium: 2,2 g/L MS-Medium, 0,5 g/L MES, 10 g/L Saccharose, pH 5,7 mit KOH, 15 g/L Agar

¼ MS-Medium: 1,5 g/L MS-Medium, 0,5 g/L MES, 10 g/L Saccharose, pH 5,8 mit KOH, 4,8 g/L Agar

MSS-Medium: 4,4 g/L MS-Medium, 0,5 g/L MES, 5 g/L Saccharose, pH 5,7 mit KOH

SXM-Medium: 4 g/L Casein, 2 g/L Pektin (Citrus), 2 mL/L 1 M Magnesiumsulfat, 1 mL/L 1000x Spurenelementlösung, 20 mL/L AspA (50x), 2 % Agar

SD-Medium: 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base, 20 g/L Glucose, 0,62 g/L SD-Leu, -Trp, -Ura + 20 mg/L Uracil, pH 5,6 mit NaOH, 12 g/L Agar

Material

SD-HALT: 6,7 g/L Yeast Nitrogen Base, 20 g/L Glucose, 0,61 g/L SD-Leu, -Ade, -His, -Trp pH 5,6 mit NaOH, 12 g/L Agar

YPAD: 10 g/L Hefeextrakt, 20 g/L Pepton, 20 g/L Glucose, 100 mg/L Adeninhemisulfat, pH 6 mit HCl, 14 g/L Agar

YEB: 10 g/L Fleischextrakt, 2 g/L Hefeextrakt, 5 g/L Pepton, 5 g/L Saccharose, pH 7,0 mit NaOH, nach dem Autoklavieren auf 2 mM MgSO₄ einstellen

2.1.6 Zusätze

Zusatz	Konzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/L	AGS
Cefotaxim	500 mg/L	Duchefa
Coronatin	30 µM	Sigma-Aldrich
Gentamycin	25 mg/L	Duchefa
Kanamycin	50 mg/L	Sigma-Aldrich
MeJA	50 µM bzw 10 µM	Sigma-Aldrich
Spectinomycin	100 mg/L	Duchefa
Rifampicin	50 mg/L	Duchefa

2.1.7 Kits

Kit	Hersteller
Advantage® 2 Polymerase Mix	Clontech
BioTaq DNA Polymerase Kit	Bioline
DNeasy Plant Mini Kit (20)	Qiagen
Ionic Detergent Compatibility Reagent	ThermoScientific
iProof High-Fidelity PCR Kit	BioRad
LuminataForte Western HRP Substrate	Merck Millipore
NucleoBond PC500	Macherey-Nagel
NucloSpin Gel und PCR Clean-up	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
Pierce 660 nm Proein Assay Kit	ThermoScientific
RNeasy Plant Mini Kit (50)	Qiagen
SuperSignal West Femto	ThermoScientific

2.1.8 Enzyme

Enzym	Hersteller
Advantage DNA Polymerase	Clontech
Clonase Mix (BP,LR)	Invitrogen
DNaseI	ThermoScientific
iProof high fidelity DNA polymerase	BioRad
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, New England Biolabs
Reverse Transkriptase H-	MBI Fermentas
RNase A	Qiagen
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas

2.1.9 Größenstandards

Größenstandard	Hersteller
GeneRuler DNA Ladder Mix	MBI Fermentas
Prestained Protein Ladder Plus	MBI Fermentas

2.1.10 Antikörper

Antikörper	Eigenschaft	Hersteller
α HA-Tag	Polyklonal aus Kaninchen	abcam
α MYC-Tag	aus Maus	Cell Signaling Technology
α Kaninchen	aus Esel	GE Healthcare
α Maus	aus Schaf	GE Healthcare

2.1.11 Hersteller von Chemikalien und Reagenzien

AppliChem, Darmstadt, Deutschland: Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), oNPG (o-Nitrophenyl- β -Dgalactopyranosid)

BioRad, München, Deutschland: Fluorescein,

Biometra, Göttingen, Deutschland: Ammoniumpersulfat (APS)

Biosynth, Itasca, USA: X-Gluc ((5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure)

Cambrex, Rockland, USA: SYBR Green I

Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland: Agarose, β -Mercaptoethanol, 30 % Acrylamid:N,N'-Methylenbisacrylamid (37,5:1), Bakterienagar, Bradford-Reagenz, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Harnstoff, NaCl, Natriumhypochloridlösung, Polyethylenglykol, Saccharose, β -Mercaptoethanol, Tetramethylethyldiamin (TEMED), Tris, Tween20

Duchefa, Haarlem, Niederlande: Murashige und Skoog Medium

Life Technologies, Darmstadt, Deutschland: SD-Medium, Select Hefeextrakt, Select Agar

Thermo Scientific, Waltham, USA: Trypton, Casein

Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Deutschland: MES

Sigma-Aldrich, Stenheim, Deutschland: Orange G, Phenol, PDB-Medium

2.1.12 Hersteller von Verbrauchsmaterialien

Blotpapier (Whatman®), Deckgläser und Objektträger (Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland), Einweg Plastikmaterial (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland; Carl-Roth, Karlsruhe, Deutschland; Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), Mikrotiterplatten (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland), Parafilm (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), PVDF-Membran (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland), Nucleo Bond Filter (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), Glasperlen (425-600 μ M; Sigma-Aldrich, Stenheim, Deutschland), Aqua-Deco Bodengrund (Vitakraft, Nr.12262), Ton-Granulat (Seramis)

2.1.13 Laborzubehör

3D Schüttler: Vibrax VXR basic, Magnetrührer: RH basic 2 (IKA), Agarose Gelsystem, PA-Gelsystem, Western-Blot Halbtrockenkammer (Universität Göttingen), Analysewaage: Extend, Wasserentsalzer: Arium pro ID (Sartorius), Autoklav: VX-95 bzw. VX-150 (Systec), CCD Kamera: ChemoCam, Geldokumentationssystem: Gel Imager (PA-Gele) (Intas), Eismaschine (Ziegra), Elektroporator: Gene Pulser® II, Elektroporationsküvetten, PCR-Gerät: MyCycler, qRT-PCR-Gerät: iCyclert (BioRad), Elektrophoresestromgeber: EV243 bzw. EV231 (Consort), Feinwaage: 572 (Kern), Geldokumentationssystem (Agarosegele): Transilluminator (Biostep), Heizblock: MHR 11 bzw. TH 26 (HLC Biotech), Inkubator (Memmert), konfokales Lasermikroskop: SP5-DM6000, Fluoreszenz-Stereomikroskop: Leica M165 FC (Leica), Kühlzentrifuge: Heraeus Fresco 17, Mikrozentrifuge: Pico17, RNA-/DNA-Messgerät: NanoDrop2000, Sterilbank: Heraguard bzw. SAFE 2020, Tischzentrifuge: Heraeus Pico 117 (ThermoScientific), Kühlzentrifuge: Rotina 38R (Hettich), Kühlzentrifuge: RC6+ (Sorvall), Mikrotiterplattenleser: SynergyHT (BioTek), Pflanzenanzuchtskammer (JohnssonControls), Pflanzenanzuchtsschrank: AR-66L/3 (CLF Plant Climatics), pH-Meter: pH211 (Hanna Instruments), Photometer: Libera S11 (Biochrom), Vakuumpumpe: MD 1C (Vacuubrand), Vortexer: Vortex Genie 2 (Scientific Industries), Wasserbad: 1092 (GFL), Thoma-Zählkammer

2.1.14 Software

Software	Hersteller
BioRad iQ5	BioRad, München, Deutschland
BlattFlaeche	Datinf GmbH, Tübingen, Deutschland
GraphPad Prism 5.00	http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/
ImageJ	Schneider et al., 2012
LAS AF (v.2.6.7266.0)	Leica Application Suite (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland)
LAS V3.6	Leica Application Suite (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland)
MEGA 4	Tamura et al., 2007
Serial Cloner 2.6.1	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA von *A. thaliana* zur Genotypisierung

Genomische DNA wurde isoliert um PCR basierte Genotypisierungen (Edwards et al., 1991) von heterozygoten Linien oder gekreuzten Pflanzen durchzuführen. Standardmäßig wurde ein tiefgefrorenes Blatt mittels eines kleinen Pistills in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß pulverisiert. 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) wurden hinzugegeben, durch vortexen gemischt und anschließend für 5 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. 300 µl des Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 2-Propanol zur Fällung der DNA versetzt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 Min., 13.000 rpm, 4°C) wurde das Pellet zweimal mit 200 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 100 µl Milli-Q Wasser resuspendiert.

Für eine schnellere Methode wurden FTA® *classic cards* von Whatman® verwendet. Kleine Blattstücke wurden mit Hilfe von Parafilm auf FTA-Karten gepresst und dann bei RT für mindestens eine Stunde getrocknet. Ein ausgestanztes Blattstück der FTA-Karte wurde zunächst für 5 Min. in 50 µl FTA Puffer (10 mM Tris-HCl pH7,5; 2 mM EDTA, 0,1 % Tween 20) in einem PCR-Reaktionsgefäß oder einer 96er-Mikrotiterplatte bei RT inkubiert. Ein weiterer Inkubationsschritt folgte in 280 µl TE-1 Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) für weitere 5 Min. bei RT. Der Puffer wurde durch den PCR-Mix ersetzt und das PCR-Programm wurde gestartet (Ndunguru et al., 2005).

2.2.1.2 Isolierung genomischer DNA von *A. thaliana* zur Quantifizierung pilzlicher DNA

DNA-Extraktion von infizierten Petiolen wurde unter Zuhilfenahme des DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Deutschland, Hilden) durchgeführt. Dabei wurde den Anweisungen des Herstellers gefolgt, samt optionaler Schritte. Die DNA wurde am Ende zweimal in 30 µl Elutionspuffer eluiert.

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (englisch: *polymerase chain reaction*, PCR) (Saiki et al., 1985) ermöglichte die Amplifizierung von DNA-Sequenzen *in vitro* und erfolgte in einem MyCycler™ Bio-Rad Thermostyzykler (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden zwei verschiedene Polymerasen verwendet. Für Klonierungszwecke wurde die iProof™ High Fidelity DNA-Polymerase (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) verwendet, mit Denaturierungs- und Elongationsschritten bei 98 °C bzw. 72 °C. Die Hybridisierungstemperatur war abhängig von den genutzten Oligonukleotiden.

Eine zweite genutzte Polymerase war die Advantage *Taq* DNA-Polymerase (TaKaRa, Clontech, Japan), für analytische Ansätze, sprich zur Genotypisierung. Mit genomischer DNA als Matrize wurde das WT-Allel mittels des LP- und RP-Oligonukleotid amplifiziert, während das Allel mit T-DNA Insertion ein Produkt durch die Oligonukleotide RP und LB erzeugte. Während homozygote Mutanten sowie WT Linien daher nur ein PCR-Produkt erzeugten, ließen sich heterozygote Pflanzen durch zwei PCR-Produkte mit beiden Oligonukleotidkombinationen identifizieren.

2.2.1.4 Fusions-PCR

Mutierte COI1-Proteine wurden durch zielgerichtete Mutagenese mittels der *Fusions-PCR* erstellt. Komplementäre Oligonukleotide und PCRs wurden genutzt um zwei DNA-Fragmente mit überlappenden Enden zu generieren. Diese Fragmente wurden anschließend in einer weiteren PCR fusioniert, wobei 3'-Überhänge eines jeden Stranges als Oligonukleotid für die 3'-Verlängerung des komplementären Stranges fungierten. Um spezifische Veränderungen in die Nukleotidsequenz einzuführen, wurden diese überlappenden Sequenzen modifiziert (Ho et al., 1989). Die PCR wurde mit folgenden Bestandteilen in einem 20 µl Volumen ausgeführt: 1 µl DNA als Matrize, 100 µM jeder Oligonukleotide, 0,2 mM dNTPs, 4 µl des 5 x iProof HF-Puffer und 0,4 U iProof DNA-Polymerase, aufgefüllt mit ddH₂O. Die Amplifizierung wurde mit Hilfe eines PCR Thermocyclers durchgeführt.

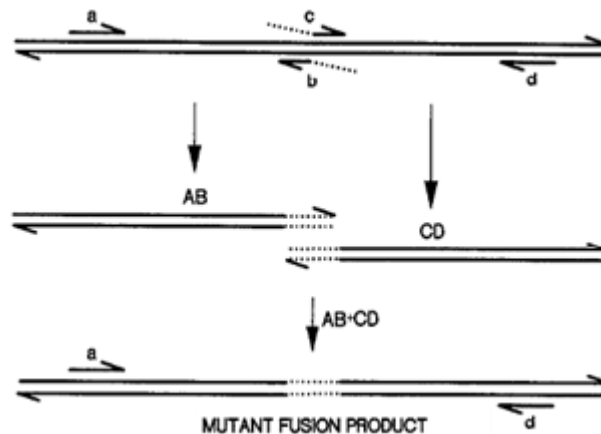


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der zielgerichteten Mutagenese *via* Fusions-PCR (Ho et al., 1989)

Beide Fragmente des Gens (AB und CD) werden in unabhängigen PCRs amplifiziert. Während dieser PCRs entstehen auf Grund der Oligonukleotide b und c komplementäre Überhänge, hier dargestellt durch gepunktete Linien. In einer zweiten PCR werden beide Produkte fusioniert. Hier kommt es zur komplementären Anlagerung der homologen Bereiche an den überlappenden Enden und mit Hilfe der Oligos a und d zur Amplifikation eines rekombinanten Produkts.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, die der horizontalen Auftrennung und Identifizierung von Nukleinsäuren nach Größe (Molekulargewicht) dient.

Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 2 %ige Gele (< 0,1-2 kb) oder 1 %ige Gele (> 0,5-7 bp) in 1 x TAE-Laufpuffer verwendet (Mülhardt, 2009). DNA-Proben wurden zur Dichteerhöhung mit 10 x DNA-Ladepuffer versetzt und aufs Gel aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung bei 120 V für etwa 45 Min. wanderten die negativ geladenen Fragmente umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts in Richtung Anode. Im Anschluss wurde das Gel für 15 Min. in einer 0,1 %igen (w/v) Ethidiumbromidlösung gefärbt. Ethidiumbromid ist ein zwischen den aromatischen Ringsystemen der Basen interkalierender Farbstoff (Sharp et al., 1973). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 260 nm. Die Größen wurden anhand eines parallel aufgetragenen Markers mit Nukleinsäurefragmenten definierter Größe bestimmt (DNA ladder mix, MBI Fermentas, Deutschland).

Für präparative Gele wurde die DNA bei größeren Wellenlängen (320 nm) untersucht, ausgeschnitten und mittels des NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Deutschland, Düren) eluiert.

2.2.1.6 Photometrie

Unter Zuhilfenahme eines Photometers ist es möglich, sowohl Trübungsmessungen als auch Konzentrationsbestimmungen durchzuführen.

Der NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Deutschland) bietet die Möglichkeit mit je nur 1 µl Probenvolumen die Konzentration von DNA und RNA photometrisch zu bestimmen. Gemessen wurde hier bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Basen innerhalb der Nukleinsäuren. Die Extinktion bei 280 nm wurde ebenfalls bei der photometrischen Bestimmung gemessen, um Auskunft über die Verunreinigung mit Proteinen zu geben. Die Probe gilt als nahezu proteinfrei, wenn das Extinktionsverhältnis von OD_{260}/OD_{280} bei 1,8 für DNA liegt und bei 2,0 für RNA.

Um das Wachstum eines Organismus zu beobachten, wurde die optische Dichte mit Hilfe eines Photometers bestimmt. Hierbei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt.

2.2.1.7 Ligation

Die Ligation ist eine konventionelle Methode zur Klonierung und wurde zur Insertion eines DNA-Fragmentes in einen Vektor mittels der T4-DNA Ligase genutzt. Doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle wurden durch die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke zwischen einer 3'-Hydroxylgruppe und einer 5'-Phosphatgruppe miteinander verknüpft. Voraussetzung dafür waren jeweils glatte Enden oder

komplementäre Einzelstrangüberhänge von Vektor und zu inserierendem PCR-Produkt. 50 ng Vektor-DNA wurde mit 6-fach höher Konzentration des Donor DNA-Fragments in 2 µl Ligationspuffer und 1 µl T4-DNA Ligase für zwei Stunden bei RT inkubiert. Die Ligase wurde anschließend bei 65 °C für 10 Minuten inaktiviert und der Ansatz wurde für eine Transformation genutzt.

2.2.1.8 Gateway Klonierung

Die *Gateway*[®] Technologie, die zur Einführung von Genen in Plasmide dient, basiert auf dem spezifischen Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda. Hier wird vollständig auf Restriktionsenzymen und Ligasen verzichtet die sonst bei der klassischen Klonierung zum Einsatz kommen. Unter Beibehaltung der Orientierung ist eine direkte Klonierung von Genen aus einem Eingangsvektor (*entry vector*) in verschiedene Expressionsvektoren (*destination vector*) über spezifische Rekombinationsstellen höchst effizient möglich (Hartley et al., 2000). Für alle Klonierungsschritte mit Hilfe des *Gateway*[®] System wurden die Anweisungen (Stand: November 7, 2010) von Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA) befolgt.

2.2.1.9 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation von Bakterien wurde der chemisch kompetente *E. coli* Stamm DH5α verwendet. Dieser entwickelte Stamm (Hanahan, 1983) zeichnet sich durch eine hohe Transformationseffizienz aus. 200 µl der Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 50 ng Plasmid versetzt. Der Ansatz inkubierte für 10 Min. auf Eis bevor der Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sek. erfolgte. Danach inkubierten die Zellen für 3 Min. auf Eis und wurden mit 800 µl dYT-Medium versetzt. Während einer Stunde Inkubation bei 37 °C und 850 rpm bildeten die Zellen ihre Antibiotikaresistenzen aus. Zur Selektion positiver Transformanden wurden die DH5α-Zellen auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Die Klone wuchsen über Nacht bei 37 °C.

2.2.1.10 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von Agrobakterien erfolgte durch die Elektroporation von GV3101::pMP90 (Koncz und Schell, 1986). 30 µl der kompetenten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 0,5 µl Plasmid-DNA versetzt. Die Suspension wurde im GenePulser II einem elektrischen Impuls ausgesetzt (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω). Anschließend wurden die Zellen in 1 mL YEB-Medium aufgenommen und für 2 Std. bei 29 °C inkubiert. Die Zellen wurden auf selektiven LB-Platten ausgestrichen und wuchsen für 2-3 Tage bei 29 °C.

2.2.1.11 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Rekombinante Plasmide wurden aus transformierten *E. coli*s via alkalische Lyse oder mit der Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits isoliert.

Um eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA für eine Sequenzierung, Klonierung oder Transformation zu erzielen, erfolgte die Isolierung unter Zuhilfenahme des Mini-, Midi- und Maxi-Kits nach Anweisung des Herstellers (Macherey-Nagel, Deutschland, Düren).

Die Isolierung der Plasmid-DNA für analytische Zwecke erfolgte nach dem Protokoll von Birnboim und Doly (1979) und basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart des Detergenz SDS. Im alkalischen Milieu kommt es zur Auflösung der Wasserstoff-Brücken zwischen den komplementären DNA-Strängen. Durch eine schnelle Neutralisation ist jedoch nur Plasmid-DNA in der Lage zu re-naturieren, während chromosomale DNA ausfällt. Das Detergenz SDS sorgt für die Denaturierung der Proteine. Für die Isolierung der Plasmid-DNA wurden 5 mL Übernachtskultur bei 5000 rpm für 5 Min. abzentrifugiert. Nach Abgießen des Überstands wurden die Zellpellets in 200 µl Bibdo I durch Vortexen aufgenommen. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 400 µl Bibdo II. Die Zellen lysierten während eines fünf minütigen Inkubationsschritt auf Eis. Die Zugabe von 300 µl Bibdo III führte zur Neutralisation des Ansatzes. Nach weiteren 10 Min. auf Eis wurde zwecks Entfernung der ausfallenden Bestandteile das Gemisch für 15 Min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Fällung der DNA mit 600 µl gekühltem 2-Propanol versetzt und für mindestens 30 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurde die ausgefallene DNA bei 4 °C und 13.000 rpm für 20 Min. pelletiert. Das Pellet wurde 2x mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und schließlich in 100 µl ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.12 Plasmidpräparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Bevor ein Agrobakterium-vermittelter Gentransfer in *A. thaliana* erfolgte, wurde zunächst eine Plasmidisolierung aus einer 5 mL Vorkultur der transformierten Agrobakterien durchgeführt. Mit Hilfe einer Kontrollfragmentierung konnte analysiert werden, ob es sich um das richtige Plasmid handelte, welches in die Pflanze transformiert werden sollte. Die pelletierte Vorkultur wurde in 300 µl P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/µl RNase A; Qiagen, Deutschland, Hilden) resuspendiert und zusätzlich für 5 Min. bei RT durch die Zugabe von 300 µl P2 (0,2 M NaOH, 1% SDS (w/v); Qiagen, Deutschland, Hilden) lysiert. Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 300 µl P3 (29,6 g Kaliumacetat, 5 mL Ameisensäure und ddH₂O bis 100 mL; Qiagen, Deutschland, Hilden). Nach einem Zentrifugationsschritt (5 Min., 13.000 rpm) wurden 700 µl Überstand mit 500 µl PCI-Mix (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol) versetzt, 1 Min. geschüttelt und anschließend 1 Min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. 500 µl der oberen, wässrigen Phase wurden

mit 350 µl 2-Propanol versetzt, gut gemischt und anschließend für 10 Min. bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Pellet mit 1 mL 70 % Ethanol für 5 Min. bei 13.000 rpm gewaschen. Das trockene Pellet wurde in 12 µl ddH₂O aufgenommen und für 10 Min. bei 65°C gelöst.

2.2.1.13 Fragmentierung von DNA

Restriktionsenzyme werden verwendet um Plasmide zu linearisieren, entweder zur Klonierung oder Analyse isolierter Plasmide. In der vorliegenden Dissertation wurden ausschließlich TypIII-Endonukleasen verwendet. Diese erkennen doppelsträngige DNA an spezifischen Stellen, meist palindromische Sequenzen, und schneiden innerhalb dieser. Diese Fragmentierung führt zur Ausbildung von 5'- bzw. 3'-Überhängen oder glatten Enden. Die Reaktionen laufen in optimierten Puffersystemen ab, nach Angaben des Herstellers. Die benötigte Menge an Enzym wurde folgendermaßen berechnet:

$$U = \frac{(\text{Lambda phage } (\lambda) \text{ DNA Länge in bp}) * (\text{Schnittstellen der Zielsequenz})}{(\text{Schnittstellen der } \lambda\text{-Sequenz}) * (\text{Größe der Zielsequenz in bp})}$$

2.2.1.14 Sequenzierung

Die Sequenzierung der untersuchten Genabschnitte erfolgte nach der Didesoxy- oder Kettenabbruch-Methode nach Sanger (1977) und wurde von einem externen Labor GATC (Deutschland, Konstanz) bzw. SeqLab Microsynth AG (Deutschland, Göttingen) durchgeführt. Die Sequenzanalyse erfolgte mit dem Programm MEGA 4 (Tamura et al., 2007). Als Vorlage wurden Sequenzen der ARAMEMNON Datenbank (Schwacke et al., 2003) sowie von Tair (Rhee et al., 2003) verwendet.

2.2.1.15 Transformation von *A. thaliana*

Um stabile Transformanten von *A. thaliana* herzustellen, wurde die *Floral dip*-Methode verwendet (Clough und Bent, 1998). Ein einzelner *A. tumefaciens* Klon wuchs in einer 20 mL Vorkultur YEB-Medium und entsprechende Antibiotika für zwei Tage bei 29°C und 220 rpm. 5 mL davon gingen in die Plasmidisolierung ein (2.2.1.12), mit dem Rest wurde eine 400 mL große Hauptkultur angeimpft. Die Kultur wuchs über Nacht bei 29 °C und 220 rpm heran. Anschließend wurden die Zellen bei 5000 rpm und 10 Min. pelletiert und in 5 %iger Saccharoselösung, versetzt mit 0,02 % Silwet-L77, resuspendiert. Pflanzen mit vielen unreifen Blütenknospen wurden anschließend in die *A. tumefaciens* Lösung

mit einer $OD_{600} = 0,8$ getaucht. Über Nacht wurden die frisch transformierten Pflanzen abgedeckt. Nach der Samenproduktion und Samenernte, sorgten Selektionsmarker auf der transgenen DNA zur Identifizierung von transformierten Nachkommen.

2.2.2 Pflanzenanzuchtsbedingungen und Kultivierung

2.2.2.1 Oberflächensterilisation von *A. thaliana*-Samen

Die Samensterilisation erfolgte in einem Exikator unter Chlorgas, welches durch das Mischen von 100 mL Natriumhypochlorit und 5 mL Salzsäure entstand. Die Sterilisationszeit im angelegten Vakuum betrug zwei Stunden für die Aussat auf Erde und vier Stunden für die Aussat auf sterilem Nährmedium bzw. sterilen hydroponischen Kulturen.

2.2.2.2 Pflanzenanzucht auf Erde

Oberflächensterilisierte Samen wurden auf autoklavierter Erde (Archut, Fruhstorfer Erde, T25, Str1 fein) ausgelegt, die mit Confidor (50 mg/L) und Düngemittel (0,5 mL/L Wuxal, Manna, Deutschland, Düsseldorf) versetzt wurde. Über Nacht wurden die Samen bei 4 °C stratifiziert. Im Anschluss wuchsen die Pflanzen unter Langtagbedingungen (22 °C / 20 °C oder 16 °C / 16 °C, 16 Std. Licht / 8 Std. Dunkelheit, 80-100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 60 % Luftfeuchtigkeit) oder Kurztagbedingungen (22 °C / 20 °C, 8 Std. Licht / 16 Std. Dunkelheit, 120-140 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, 60 % Luftfeuchtigkeit).

2.2.2.3 Sterile Pflanzenanzucht auf MS-Platten

Für die Anzucht von Pflanzen auf sterilem Medium werden oberflächensterilisierte Samen jedes Genotyps auf Murashige und Skoog (MS)-Medium (Duchefa, Niederlande) ausgelegt. Die Selektion homozygoter *coi1-t* Pflanzen aus dem heterozygoten Samenansatz erfolgt auf MS-Medium ergänzt mit 50 μM MeJA. Nach zweitägiger Stratifizierung im Dunkeln bei 4 °C wuchsen die Samen für zwei Wochen unter Kurztagbedingungen im Anzuchtsschrank. Die Keimlinge wurden pikiert und wuchsen auf einem Sand-Erde-Gemisch (Vitakraft, Nr. 12262, Deutschland, Bremen) mit einer Schicht Seramis (Masterfoods GmbH, Deutschland, Verden/Aller) für weitere zwei Wochen unter Kurztagbedingungen. Um eine genügend hohe Luftfeuchtigkeit zu gewähren, wuchsen die Keimlinge in der ersten Woche unter transparenten Hauben. Das primäre Gießen erfolgte mit 0,1 % Wuxal.

Für die RNA-Sequenzanalyse und Mikroskopie der pilzlichen Penetration von *A. thaliana*-Wurzeln, wurden Pflanzen ebenfalls auf MS-Platten angezogen. Hier wurde $\frac{1}{2}$ MS-Medium in 10*10 cm Petrischalen gegossen (auf einem Deckel liegend), so dass eine Schräglage entstand. Zehn oberflächensterilisierte Samen wurden ausgelegt und die Platten wurden mit Parafilm verschlossen. Nach zweitägiger Stratifizierung in Dunkelheit bei 4 °C wuchsen die Pflanzen für drei Wochen unter Kurztagbedingungen in vertikaler Position.

2.2.2.4 Sterile Anzuchtbedingungen in einer hydroponischen Kultur

Hydroponische Kulturen stellen aufgrund der exakt definierten Zusammenstellung des Mediums im Gegensatz zur Anzucht auf Erde eine besser kontrollierte Anzucht von Pflanzen dar. Ein weiterer Vorteil ist die Anreicherung von verfügbarem Wurzelmaterial und deren einfachere Behandlung mit unterschiedlichen Chemikalien. Zur Pflanzenanzucht wurden oberflächensterilisierte Samen auf einem Metallsieb ausgelegt, welches die Oberfläche des MSS-Mediums (4,4 g/L MS-Medium, 0,5 g/L MES, 5 g/L Saccharose, pH 5,7) berührt. Die Kulturgläser wurden mit Parafilm M® verschlossen und für 20 Tage unter Kurztagbedingungen kultiviert. Am Tag 20 wurden die Pflanzen mit 10 µM MeJA für zwei Stunden behandelt (Meier, 2015).

Zur Analyse von heterozygoten Linien in hydroponischen Kulturen wurde eine weitere Art dieser Kulturen verwendet, die es zuließen, Einzelpflanzen zu charakterisieren. In den großen Hydroponiken wuchsen Pflanzen auf eine Grösse heran, dass RNA von Einzelpflanzen präpariert werden konnte. Diese hydroponischen Kulturen wurden in Anlehnung an das von Gibeaut et al. (1997) beschriebene Protokoll angelegt. In den Deckel eines Plastikcontainers mit 12 L Fassungsvermögen wurden Löcher geschnitten, in die der untere Teil eines Bechers aus Plastik eingesetzt werden konnte. In diesem Becher 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. Die Steinwolle wurde mit Medium befeuchtet, der obere Teil mit 5 Samen bestückt und mit kleinen durchsichtigen Plastikbechern als Hauben abgedeckt. Nach ca. zwei Wochen wurden alle bis auf einen Keimling entfernt. Diese wurden insgesamt acht Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert. Ein Blatt wurde in diesem Zeitraum zur Genotypisierung mittels GUS-Färbung (2.2.8.1) verwendet, bevor es zur Behandlung der Wurzeln mit und ohne 10 µM MeJA für zwei Stunden kam. Wurzeln und der oberirdische Teil wurden im Anschluss von Einzelpflanzen geerntet und bei -80 °C tief gefroren.

2.2.3 Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit Chemikalien

2.2.3.1 Methyljasmonat

Zur Durchführung des Wurzelinhibierungs-Versuches (Thines et al., 2007), wurden MS-Platten mit und ohne 50 μM MeJA versetzt. Je zehn oberflächensterilisierte Samen des zu analysierenden Genotyps wurden fünfmal neben zehn oberflächensterilisierten Samen des Kontrollgenotyps (*Col-g/1* oder *coi1-16*) in eckigen Petrischalen ausgelegt. Die Keimlinge wuchsen für 14 Tage in vertikaler Position unter Kurztagbedingungen. Mit Hilfe einer Digitalkamera wurden Fotos aufgenommen und die Wurzellänge wird mittels des Programms ImageJ (Schneider et al., 2012) quantifiziert.

2.2.4 Anzuchtbedingungen und Kultivierung von *V. longisporum*

2.2.4.1 Anzucht von *V. longisporum* in PDB-Medium

Zur Produktion von frischen *V. longisporum* Sporen wurden 100 mL Potato dextrose broth (PDB, Sigma, Deutschland, Steinheim), 0,5 mg/L Cefotaxim und 500 μL einer Glycerin-Stammkultur ($\sim 10^8$ Sporen/mL) in einen Vierschikane-Kolben gegeben. Der Pilz inkubierte für 10-14 Tage in Dunkelheit bei 23 °C und 90 rpm.

2.2.4.2 Ernte frischer *V. longisporum* Sporen

Durch das Filtern (Nucleo Bond Folded filters, Macherey-Nagel, Deutschland, Düren) der Sporensuspension (2.2.4.1) wurden frische Sporen von *V. longisporum* geerntet. Der Durchfluss wurde für 10 Min. bei 4000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Die Falcon-Röhrchen wurden zum Waschen der Sporen mit autoklaviertem Leitungswasser auf 50 mL aufgefüllt, indem das Präzipitat resuspendiert wurde. Anschließend wurde erneut für 10 Min. bei 4000 rpm und RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 5-10 mL autoklaviertem Leitungswasser resuspendiert und unter Zuhilfenahme einer Zählkammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm² Fläche, ThomaZählkammer) zur Bestimmung der Sporenkonzentration genutzt. Eine Konzentration von 1×10^6 Sporen/mL fand Verwendung in der Sand-Erde-Infektion (2.2.5.1) während 1×10^5 Sporen/mL für Platteninfektionen (2.2.5.2) ausreichend waren.

2.2.4.3 Anzucht von *V. longisporum* auf SXM-Platten

Als Referenz für entdeckte Pilzgene während RNA-Sequenzanalysen wurden 1×10^5 Sporen/mL des Pilzes nach dem Rezept von Neumann und Dobinson (2003) auf *Simulated Xylem Medium* (SXM) gesprüht. *V. longisporum* wuchs für zwei Tage in Dunkelheit bei 23 °C bis zur Entwicklung eines verzweigten Mycel und einigen nicht gekeimten Sporen, die übrig blieben. Der Pilz wurde mit Hilfe einer Skalpellklinge von der Mediumoberfläche gekratzt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

2.2.4.4 Herstellung der Stammkulturen von *V. longisporum*

Für die Herstellung pilzlicher Stammkulturen werden die Sporen wie in Abschnitt (2.2.4.1) unter sterilen Bedingungen geerntet. 800 µL der Sporensuspension mit einer Konzentration von mindestens 1×10^8 Sporen/mL wurden dann mit 200 µL 86 %igen Glycerin versetzt. Die 1 mL Aliquots wurden 5 Tage bei -20 °C und für Langzeitlagerung bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.5 Infektion mit *V. longisporum*

2.2.5.1 Sand-Erde Infektionssystem mit *V. longisporum*

In diesem Infektionssystem wurden *Arabidopsis*-Pflanzen durch das Eintauchen der Wurzeln in die Sporenlösung infiziert. Pflanzen, die zwei Wochen auf MS-Medium und zwei Wochen auf Sand-Erde-Gemisch wuchsen (2.2.2.3) wurden aus dem Gemisch herausgelöst. Dabei und auch bei dem folgenden Abspülen der restlichen Erde in Leitungswasser, kam es zur mechanischen Schädigung der Wurzeln. Diese wurden dann für 45 Min. in der Sporenlösung (10^6 Sporen/mL) bzw. in autoklaviertem Leitungswasser als Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen in einzelne Töpfe gepflanzt und für 15 bzw. 19 Tage unter Kurztagbedingungen kultiviert. Dabei wuchsen die Pflanzen für die ersten zwei Tage unter einer transparenten Haube, um eine hohe Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten (Ralhan et al., 2012).

2.2.5.2 Platten-Infektionssystem mit *V. longisporum*

Die Infektion im Plattensystem erfolgte auf nährstofffreiem Medium, um den Pilz zu eigenem Überleben durch Wurzelpenetration zu zwingen. Hierfür wuchsen *Arabidopsis*-Pflanzen für drei Wochen auf ½ MS-Medium (2.2.2.3) und wurden dann auf 1 %ige Wasser-Agarose Schrägplatten transferiert. Nach 24 Stunden wurden die Wurzeln mit der Sporenlösung (10^5 Sporen/mL) besprüht, die Petrischalen mit Parafilm verschlossen und zu ¾ mit Alufolie eingepackt. Die entstandene Dunkelheit sollte

das „Dämmerlicht“ für den Wurzelraum und den Pilz erzeugen. In den nächsten vier Tagen wurden die Pflanzen für Mikroskopie- und Genexpressions-Analysen verwendet (Reusche, 2011).

2.2.5.3 Infektionskanalsystem

Ein weiteres steriles Platteninfektionssystem wurde von Tim Iven (2012) etabliert. Runde Petrischalen wurden hier mit $\frac{1}{4}$ MS-Medium (4,8 g/L Agar) gefüllt. Mittels eines Skalpell wurde das obere Drittel Medium, sowie ein etwa 0,5 cm breiter Infektionskanal auf der Hälfte des in der Platte verbleibenden Agars herausgeschnitten. 30-40 oberflächensterilisierte Samen, gelöst in 2 % *low-melting* Agarose, wurden gleichmässig an die Grenze zwischen Medium und Petrischalenboden ausgelegt. Nach dreitägiger Stratifizierung der Samen bei 4 °C wuchsen die Keimlinge für zwei Wochen unter Langtagbedingungen in vertikaler Position. Um die Wurzeln vor UV-Strahlung zu schützen, wurde nach einer Woche der Wurzelbereich mit schwarzen Tonpapierhüllen verdeckt. Zur Infektion wurden 500 μ l Sporensuspension der Glycerinkultur ($4 \cdot 10^5$ Sporen/mL) steril in den Infektionskanal pipetiert. Kontrollpflanzen wurden mit 500 μ l ddH₂O, versetzt mit Glycerin, behandelt. Die erneut geschlossenen Petrischalen wurden zurück in die Langtagkammer gestellt.

2.2.5.4 Konfokalmikroskopische Analysen

Konfokalmikroskopische Analysen wurden mit Hilfe des Leica SP5-DM6000 (Leica GmbH, Deutschland, Wetzlar), ausgestattet mit einem Argon-Ionen-Laser als Anregungsquelle und der Leica Software LAS AF (v.2.6.7266.0) ausgeführt.

Für die Präparatherstellung zur Analyse der Wurzelpenetration von *V. longisporum* wurden infizierte Wurzeln aus dem Platteninfektionssystem (2.2.5.2) auf einen Objektträger gelegt, in Wasser eingebettet und mit einem Deckglas versehen. Die Analyse erfolgte 24 Std., 48 Std., 72 Std. und 96 Std. nach Infektion.

Das konfokale Lasermikroskop wurde ebenfalls für Promotorstudien des pilzlichen Gens *TDF12.2* (VDAG03755), das durch Pflanzen induziert wurde, genutzt. Das Gen wurde durch ein *mCherry*-Konstrukt ausgetauscht und für Expressionsanalysen genutzt. Dafür wuchsen *Arabidopsis*-Pflanzen für drei Wochen unter Kurztagbedingungen direkt auf Objektträgern, deren Oberfläche mit SXM-Medium bedeckt war. Der transgene Pilzstamm wurde direkt auf den Objektträger gesprüht und 48 Stunden später unter dem konfokalen Lasermikroskop analysiert.

Für die konfokalmikroskopischen Untersuchungen der unterschiedlichen Fluoreszenzproteine wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Parameter verwendet.

Tabelle 2.2 Parameter zur Detektion der unterschiedlichen Fluorophore

Fluorophor	Anregungswellenlänge	Emissionsfilter
GFP	488 nm	500 – 540 nm
mCherry	561 nm	596 – 620 nm

2.2.5.5 Blattflächenvermessung

Um die Entwicklung des Krankheitsphänotyps basierend auf der Größe der Blattfläche der Pflanzen nach Infektion mit *V. longisporum* zu bestimmen, wurden mittels einer Digitalkamera Fotos von einzelnen Pflanzen aufgenommen. Die Blattfläche der kompletten Rosette wurde mit dem Bildanalyseprogramm BlattFlaeche (Datinf GmbH, Deutschland, Tübingen) quantifiziert. Der Durchmesser der Kulturtöpfe wurde als interner Standard für die Normalisierung der Blattfläche verwendet.

2.2.5.6 Probenentnahme infizierter Pflanzen

Pflanzen aus dem Sand-Erde-Infektionssystem wurden nach 15 bzw. 19 Tagen aus der Erde genommen. Ihre Wurzeln wurden in Leitungswasser von Erde gesäubert. Anschließend wurden die Wurzeln, Petiolen und Blätter bzw. der gesamte oberirdische Teil von 16 mock behandelten bzw. mit Pilz infizierten Pflanzen geerntet. Um genügend Material für nachfolgende Analysen zu erhalten, wurde das Material von jeweils vier Pflanzen zusammengefasst und bei -80 °C gelagert.

Für RNA-Sequenzierungsanalysen und anderen Genexpressionsanalysen heterozygoter Pflanzenlinien, die auf sterilem MS-Medium angezogen wurden (2.2.2.3), wurden einzelne Wurzeln in 2 mL Reaktionsgefäßen geerntet und bei -80 °C gelagert. Ihre Pflanzensprosse wurden zur DNA-Präparation und anschließender Genotypisierung verwendet (2.2.1.1).

Von homozygoten Pflanzenlinien, die auf sterilem ½ MS-Medium angezogen wurden (2.2.2.3), wurden 40 Wurzeln vereint und bei -80 °C weggefroren.

2.2.6 Transkriptionsanalysen

2.2.6.1 RNA-Extraktion

Zur Isolierung von pflanzlicher RNA wurde die TRIZOL-Extraktionsmethode verwendet (Chomczynski, 1993). Tief gefrorenes und fein gemörstertes Pflanzenmaterial (~ 200 mg) wurde in 1,3 mL Trizolpuffer (380 mL/L Phenol gesättigt mit 0,1 M Citratpuffer pH 4,3; 0,8 M Guanidinthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 33,4 mL/L 3 M Na-Acetatlösung pH 5,2; 5 % Glycerin) gelöst und für 10 Min. bei

RT geschüttelt. Nach Zugabe von 260 µl Chloroform wurden die 2 mL Reaktionsgefäße erneut 10 Min. bei RT geschüttelt. Nach 45 Min. Zentrifugation bei 13.000 rpm und 4 °C erfolgte die Trennung der wässrigen Phase mit den Nukleinsäuren und der unteren organischen Phase mit Proteinen und Zelltrümmern. 800 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und mit 300 µl 2-Propanol und 300 µl Hochsalzpuffer (1,2 M Natriumchlorid, 0,8 M tri-Na-Citrat) versetzt. Die Reaktionsgefäße wurden invertiert. Während des nächsten Zentrifugationsschritts (20-60 Min. bei 13.000 rpm und 4 °C) kam es zur Fällung der RNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zwei Mal mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen (10 min, 13.000 rpm, RT). Nach dem Trocknen des Pellets für 10 Min. bei RT wurde es in 15-40 µl autoklaviertem ddH₂O aufgenommen und für 10 Min. bei 65 °C gelöst. Die Konzentration wurde mit Hilfe des Nano Drop 2000c bestimmt (2.2.1.6).

2.2.6.2 cDNA-Synthese

Für die Synthese von cDNA wurde 1 µg RNA eingesetzt. Diese wurde zunächst mit 1 µl DNase I (Fermentas, Deutschland, St. Leon-Roth) und 1 µl 10x DNase I Puffer für 30 Min. bei 37 °C inkubiert, um Kontaminationen der cDNA mit genomischer DNA zu verhindern. Zur Inaktivierung der DNase I wurde 1 µl 25 mM EDTA hinzugegeben und für 10 Min. bei 65 °C inkubiert. Als Startoligonukleotide für die Synthese der cDNA wurden Zufallsnonamere und oligo-dT Oligonukleotide verwendet. Die Anlagerung an die RNA erfolgte bei 70 °C für 10 Min. Schließlich wurden 20 nmol dNTPs, 4 µl RT 5x-Reaktionspuffer und 60 U Reverse Transcriptase H- (Fermentas, Deutschland, St. Leon-Roth) hinzugeben. Das Volumen wurde mit ddH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Elongation fand für 70 Min. bei 42 °C statt, gefolgt von der Inaktivierung der Reversen Transkriptase für 10 Min. bei 70 °C. Die präparierte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.6.3 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR). Dabei war die Fluoreszenz des Farbstoffs SyberGreen ein Maß der zunehmenden Menge an DNA, da dieser Farbstoff nur in DNA-gebundener Form fluoresziert. Die Amplifizierung und Quantifizierung erfolgte im iCycler (BioRad, Hercules, CA, USA) mit *Ubiquitin5* als Referenzgen. Der Reaktionsmix bestand aus 1 µl der 1:10 verdünnten cDNA als Matrize sowie 1 µl NH₄-Reaktionspuffer, 0,25 U BIOTaq DNA-Polymerase (Bioline, Deutschland, Luckenwalde), 2 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs, 0,4 µM der Oligonukleotide, 10 nM Fluorescein (BioRad, Hercules, CA, USA) und 100.000 fach verdünnter SYBR Green I Lösung (Cambrex, Rockland, ME, USA). Der Reaktionsmix wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt.

Das verwendete PCR-Programm wird in Tabelle 2.3 aufgeführt. Anschließend wurden die relativen Genexpression mit der $2^{-[CT(\text{Zielgen})-CT(\text{Referenzgen})]}$ -Methode nach Schmittgen und Livak berechnet (2008).

Tabelle 2.3 Ablauf einer qRT-PCR-Reaktion

	Dauer	Temperatur	Wiederholung
primäre Denaturierung	2 Min.	95 °C	1x
Denaturierung	20 Sek.	95 °C	40x
Anlagerungsphase	20 Sek.	55 °C	
Elongation	40 Sek.	72 °C	
finale Elongation	4 Min.	72 °C	1x
	1 Min.	95 °C	
	1 Min.	55 °C	
Schmelzkurve	10 Sek.	55 °C – 95 °C	81x

2.2.6.4 RNA-Sequenzanalyse

Heterozygote, segregierende Linien der *coi1-t*- und *aos*- Mutante wurden angezogen und infiziert wie in 2.2.2.3 und 2.2.5.2 beschrieben. Nachdem jede individuell geerntete Pflanze genotypisiert war, konnten 33 Wurzeln für *coi1-t* und WT_{coi1-t} und 36 Wurzeln für *aos* und WT_{aos} , mock und infiziert, kombiniert werden und zur RNA-Synthese eingesetzt werden. Da das Experiment für jeden Genotyp noch zweimal wiederholt wurde, erhielt man 3 Replikate für jeden Genotyp, mock und infiziert, was insgesamt zu 24 zu analysierenden Proben führte. Um analysieren zu können, welche pilzlichen Transkripte in Gegenwart von Pflanzenwurzeln höher exprimiert werden als bei rein saprophytischem Pilzwachstum wurden ebenfalls drei unabhängige Replikate der pilzlichen RNA hergestellt (2.2.4.3). RNA von allen 27 Proben wurde mit der TRIZOL-Extraktionsmethode präpariert (2.2.6.1). RNA von *V. longisporum* wurde anschließend mit dem RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen, Valencia, CA, USA) anhand der Anweisungen des Herstellers aufgereinigt. RNA-Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des Illumina HiSeq 2000 Instrument im Transkriptom-Labor an der Universität Göttingen ausgeführt.

Die mit dem Gerät detektierten Fluoreszenzsignale wurden mit dem Illumina-Programm BaseCaller in bcl-Dateien transformiert und mit dem Programm CASAVA (v1.8.2) in fastq-Dateien demultiplext. Die Sequenzalignments mit den Referenzgenomen von *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) und *Verticillium dahliae* VdLs.17 (Broad Institute) erfolgten mit dem Programm Bowtie2 (v2.1.0). Die reads pro Gen wurden mit Hilfe von HTSeq Python Skripten und den entsprechenden gtf-Genannotations-Dateien (*Arabidopsis*, TAIR10; *Verticillium*, Broad Institut) ermittelt.

Für die Analyse der differentiellen Genexpression wurde die grafische Benutzeroberfläche der RobinNA Software (Version 1.2.4; Lohse et al., 2012) verwendet. Die Normalisierung und statistische Evaluation der Werte erfolgte mit DESeq (Anders und Huber, 2010).

2.2.6.5 Quantifizierung der DNA von *V. longisporum*

Pilzliche Biomasse wurde durch die Bestimmung der pilzlichen DNA in infizierten Pflanzen mit qRT-PCR-Analysen quantifiziert. Dafür wurde DNA aus Petiolen oder der ganzen Rosette von infizierten Pflanzen isoliert (2.2.1.2). Die Amplifizierung und Quantifizierung von *V. longisporum*-DNA erfolgte im iCycler System (BioRad, Hercules, CA, USA). Hierzu wurden die Oligonukleotide OLG70 (5'-CAGCGAAACGCGATATGTAG-3') und OLG71 (5'-GGCTTG TAGGGGGTTAGA-3') verwendet, die spezifische Sequenzen der ribosomalen RNA binden (Eynck, 2007). Der Reaktionsmix bestand aus 1x Advantage Puffer (TaKaRa, Clontech, Japan), 200 µM jedes dNTPs, 0,3 µM der Oligonukleotide OLG70 und OLG71, 0,25 U Advantage Polymerase (TaKaRa, Clontech, Japan), 10 nM Fluorescein (BioRad, Hercules, CA, USA), 100.000x verdünnte SYBR Green I Lösung (Cambrex Bio Science Rockland Inc., Maine, USA) und 25 ng der zu analysierenden DNA. Der Reaktionsmix wurde mit ddH₂O auf ein Volumen von 25 µl aufgefüllt. Für die Normalisierung verschiedener DNA Präparationen dient *Actin8* (AT1G49240) als Referenzgen und wird mit den Oligonukleotiden *act8fow* (5'-GGTTTTCCCCAGTGTTGTTG-3') und *act8rev* (5'-CTCCATGTCATCCCAGTTGC-3') amplifiziert. Das verwendete PCR-Programm wird in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.4 Ablauf der qRT-PCR zur Bestimmung pilzlicher DNA

	Dauer	Temperatur	Wiederholung
primäre Denaturierung	1 Min.	95 °C	1x
Denaturierung	20 Sek.	95 °C	40x
Anlagerungsphase	20 Sek.	60 °C	
Elongation	40 Sek.	68 °C	
finale Elongation	4 Min.	68 °C	1x
	1 Min.	95 °C	
	1 Min.	60 °C	
Schmelzkurve	10 Sek.	60 °C – 95 °C	71x

2.2.7 Biochemische Standardmethoden

2.2.7.1 Proteinextraktion aus *A. thaliana*

Proteine wurden aus tief gefrorenem Pflanzenmaterial unter denaturierten Konditionen extrahiert. Gemörsertes Material, Wurzel- oder Blattproben, wurden in 3-facher Menge an Extraktionspuffer (4 M Harnstoff, 16,6 % Glycerin, 5 % SDS, 0,5 % β -Mercaptoethanol) aufgetaut, während die Proben 10 Min. bei 65 °C geschüttelt wurden. Nach der Zentrifugation (20 Min. bei 13.000 rpm) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.7.2 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Zur Proteinextraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*, wurde 1,5 mL einer Übernachtskultur pelletiert (1 Min., 13.000 rpm) und in flüssigem Stickstoff tief gefroren. Das Pellet wurde dann in 40 μ l Extraktionspuffer (8 M Harnstoff, 5 % SDS, 40 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 mM EDTA, 0,4 mg/ml Bromphenolblau, 0,01 % β -Mercaptoethanol) resuspendiert und aufgetaut. Glasperlen (Durchmesser 425-600 μ m) wurden hinzugegeben und der Mix wurde 10 Min. bei 70 °C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für eine Minute und RT bei hoher Geschwindigkeit geschüttelt. Nach einminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und RT, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.7.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Konzentrationsbestimmung des totalen Proteingehalts erfolgte mit dem *Pierce 660 nm Protein assay*[®] der Firma ThermoScientific anhand der Anweisungen des Herstellers. Zur Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Referenzreihe mit 1 μ g, 3 μ g, 6 μ g und 9 μ g BSA (Rinderserumalbumin) gemessen.

2.2.7.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinenalyse erfolgte mittels *Sodium Dodecyl Sulfate*-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE). Die Eigenladung von Proteinen wird durch SDS so effektiv überdeckt, dass die Auftrennung allein aufgrund des Molekulargewichts erfolgte. Durch die negative Ladung des SDS wanderten die SDS-Proteinkomplexe im elektrischen Feld zur Anode. Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurden denaturierte Proteine auf das Sammelgel geladen. Hier kam es zunächst zur Aufkonzentrierung der Proteine in dem aus Polyacrylamid bestehenden Sammelgel (5 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid (37,5:1), 125 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS). Dieses war dem Trenngel oben aufgesetzt (10-12 % (w/v) Acrylamid / Bisacrylamid

(37,5:1), 400 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) TEMED, 0,1 % (w/v) APS) in der die eigentliche Trennung der Proteine erfolgte. Die Elektrophorese lief für zwei bis drei Stunden in 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 2 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) bei 160 V. Die Größenbestimmung erfolgte anhand eines parallel aufgetragenen Protein-Markers (Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific, Deutschland).

2.2.7.5 Protein Immunoblot

Als Western-Blot bezeichnet man den Transfer von zuvor durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteinen aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran im elektrischen Feld (Kyhse-Anderesen, 1984). Die durch SDS negativ geladenen Proteine wanderten durch Anlegen einer Spannung Richtung Anode und wurden dabei von der Membran aufgehalten. Aufgrund von hydrophoben Wechselwirkungen waren sie in der Lage an der Oberfläche der Membran zu binden. Dort konnten die immobilisierten Proteine anschließend immunologisch untersucht werden. Für die Durchführung wurde das Trenngel zunächst in 1x Transferpuffer (25 mM Tris, 2 M Glycin, 20 % (v/v) Methanol, 0,1 % SDS) äquilibriert und die Membran in Methanol aktiviert. Anschließend wurde das Gel auf der Membran zwischen drei Lagen in Transferpuffer getränktem Whatman®-Papier übereinandergeschichtet und in der Blottingapparatur zwischen zwei Graphitplatten positioniert. Der Proteintransfer erfolgte für zwei Stunden bei RT und einer Stromstärke von 1 mA pro cm² Membran. Für die anschließende Immunodetektion wurden zunächst unspezifische Bindestellen durch die Inkubation der Membran in TBST (20 mM Tris, 130 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Tween 20) mit 5 % (w/v) Milchpulver für zwei Stunden bei RT unter konstantem Schwenken geblockt. Die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper erfolgte in TBST mit 5 % (w/v) Milchpulver über Nacht bei 4 °C unter konstantem Schwenken. Am nächsten Tag wurde die Membran drei Mal für 10 Minuten mit TBST gewaschen. Dieser Schritt fand, wie alle Weiteren, unter ständigem Schütteln statt. Die Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper erfolgte ebenfalls in TBST mit 5 % (w/v) Milchpulver für zwei Stunden bei RT. Nach dem Waschen der Membran in TBST für 5x 10 Minuten erfolgte ihre Inkubation mit einer Substratlösung (Luminata™ Forte Western HRP Substrate) für 5 Min. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase sorgte für die Umsetzung des Substrates. Die Detektion der Peroxidaseaktivität fand mit einer CCD-Kamera (Intas, Deutschland, Göttingen) statt.

2.2.8 Analyse von Reporterlinien

Reporterlinien wurden für Analysen der intrazellulären Lokalisation und gewebespezifischen Genexpression verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde mit der β -Glucuronidase (GUS) gearbeitet, die an das 3'-Ende des zu untersuchenden Gens fusioniert wurde. Dieses Enzym ist in der Lage ein farbloses Substrat, X-Gluc, in einen blauen Farbstoff umzuwandeln, welcher mit Hilfe histochemischer Methoden detektierbar ist (Jefferson et al., 1987).

2.2.8.1 Histochemische Analysen der Expression des GUS-Reportergens

X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure) ist ein farbloses Substrat, welches durch die β -Glucuronidase in einen blauen Farbstoff umgewandelt werden kann. Aufgrund dessen ist es ein weit verbreitetes Substrat, das häufig in histochemischen Analysen zur Untersuchung des Genexpressionsortes eingesetzt wird. Das zu analysierende Pflanzenmaterial wurde zunächst für 30 Min. bei RT fixiert (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 0,3 % Formaldehyd, 0,3 M Mannitol). Zwei 20-minütige Waschschrte in 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7 (28,85 mL 0,5 M Na_2HPO_4 , 21,15 mL 0,5 M NaH_2PO_4 in 500 mL H_2O) folgten. Das Pflanzenmaterial wurde dann in die Färbelösung transferiert (2 mM X-Gluc in DMF, 0,5 M $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,5 M $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7), drei Mal für fünf Minuten Vakuumfiltriert und für zwei Stunden bis ÜN bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung gegen 100 % Ethanol getauscht, was zur Entfärbung des oberirdischen Pflanzenteils ÜN bei 37 °C führt.

2.2.8.2 Quantitative Analysen der GUS-Reportergenaktivität mittels des MUG-Assays

Zur Proteinextraktion wurden 300 μl GUS-Extraktionspuffer (50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7, 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100, 0,1 % Sarcosyl, 0,005 % β -Mercaptoethanol) zu ca. 100 mg Pflanzenmaterial hinzugegeben. Dieses wurde mit einem kleinen Pistill zerrieben. Die Lösung wurde anschließend für fünf Minuten bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß transferiert. Zur Konzentrationsbestimmung des totalen Proteingehalts wurde der Proteinextrakt mit 1x Bradford-Reagenz (Roth, Deutschland, Karlsruhe) gemischt und die OD_{595} bestimmt. Die Proteinaktivität wurde anschließend unter Zuhilfenahme von Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG) bestimmt, welches zu 4-Methylumbelliferon (MU) hydrolysiert. Das Produkt war durch seine Fluoreszenz nachweisbar. Über die Intensität dieser Fluoreszenz konnte auf die Umsatzrate der β -Glucuronidase geschlossen werden. Eine definierte Proteinmenge wurde mit GUS-Extraktionspuffer in einer 96er Mikrotiterplatte auf 100 μl aufgefüllt und mit 100 μl 4-MUG Lösung (GUS-Extraktionspuffer + 4 mM MUG) versetzt. Die Lösung wurde für 10 Min. in Dunkelheit bei 37 °C

inkubiert. 100 µl wurden dann in 100 µl GUS-Stoppuffer (0,2 M Na₂CO₃) übertragen. Diese Werte wurden bei der späteren Berechnung als F_t = 0 verwendet. Die verbleibenden 100 µl inkubierten für weitere 60 Min. bei 37 °C und im Dunkeln. Diese Reaktion wurde ebenfalls mit 100 µl GUS-Stoppuffer abgestoppt. Die Fluoreszenz wurde dann bei 360 nm (Anregung) und 440 nm (Emission) gemessen. Die spezifische Enzymaktivität wies die Menge an umgesetzten Substrat pro Zeiteinheit und Menge des eingesetzten Proteins auf und wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{spezifische GUS-Aktivität} = \frac{\text{umgesetztes MUG (pmol)}}{\text{Protein (mg)} * \text{Zeit (min)}}$$

2.2.9 Hefe-2-Hybrid-System (Y2H)

2.2.9.1 Hefetransformation

Die Hefetransformation erfolgte nach dem Protokoll von Gietz und Woods (2002). Zur Erzeugung von kompetenten Hefezellen des Stammes PJ69a wurden 10 mL YPAD-Medium inokuliert und ÜN bei 220 rpm und 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Kultur verwendet, um eine 50 mL Kultur mit einer OD₆₀₀ = 0,5 in YPAD-Medium anzusetzen. Diese wurde erneut bei 220 rpm und 30 °C inkubiert bis eine OD₆₀₀ = 1,8 erreicht wurde. Die Hefezellen wurden durch fünfminütige Zentrifugation bei 4000 rpm geerntet und in 25 mL sterilem ddH₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (4000 rpm, 5 Min) wurde das Zellpellet in 1 mL sterilem ddH₂O resuspendiert. Die Zellen wurden in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt und für 30 Sek. bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Hefezellen in einem Gesamtvolumen von 1 mL resuspendiert und in 10x 100 µL Aliquots aufgeteilt. Die Aliquots wurden erneut zentrifugiert (30 Sek. bei 13.000 rpm), der Überstand verworfen und die Zellen in 360 µL Transformations-Mix (240 µl 50 % (w/v) PEG 3500, 36 µl 1 M LiAc, 50 µl aufgekochtes Heringssperma (ss-HSP), 1 µg jedes Plasmids in 34 µl sterilem ddH₂O) aufgenommen. Nach 30 Min. bei 30 °C erfolgte der Hitzeschock bei 42 °C für 40 Min. Die Transformationsansätze wurden für 1 Min. bei 13.000 rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und die Pellets in 1 mL sterilem ddH₂O aufgenommen. Geeignete Aliquots der Zellen wurden auf Selektions- und Interaktionsplatten ausgestrichen und für 2-3 Tage bei 30 °C inkubiert.

2.2.9.2 oNPG-Test

Mit Hilfe des oNPG-Tests war es möglich Protein-Protein-Interaktionen in Hefezellen zu quantifizieren. Der verwendete Stamm PJ69-4A enthält das bakterielle *lacZ*-Gen welches für die β -Galactosidase kodiert. Dieses Enzym spaltet normalerweise das Disaccharid Laktose, nimmt aber auch o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (oNPG) als Substrat an. oNPG ist ein farbloser Stoff, bei dessen Spaltung das gelbe o-Nitrophenol freigesetzt wird, welches bei einer Wellenlänge von 420 nm photometrisch quantifiziert werden kann. Die Expression dieses Gens wird durch GAL4 kontrolliert, welches bei erfolgreicher Protein-Protein-Interaktion reassembliert (pDEST-HA-GAD, pDEST-GBKT7-Myc). Zur Durchführung des Tests wuchsen transformierte Hefezellen ÜN in 5 mL selektivem SD-Medium bei 30 °C und 220 rpm. Die Liganden induzierten Protein-Protein-Interaktionsstudien fanden in Anwesenheit von Coronatin statt. Hier wurden am nächsten Tag 3 mL Kulturen mit einer $OD_{600} = 0,5$ mit 30 μ M Coronatin versetzt und erneut für 4 Std. bei 30 °C und 220 rpm angezogen. Für beide Analysen, die Liganden induzierten- und klassischen Interaktionsstudien, ging es nun gleich weiter. Zwei Mal 1,5 mL Hefekultur wurden abzentrifugieren (1 Min., 13.000 rpm). Ein Pellet wurde für die Proteinextraktion aus Hefezellen (2.2.7.2) und anschließende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingefroren, das Andere wurde in 1 mL Z-Puffer (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1,0 mM $MgSO_4$, pH 7) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 1 Min. bei 13.000 rpm und RT wurden die Zellen letztendlich in 300 μ L Z-Puffer aufgenommen. Hiervon wurden 100 μ L in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, drei Mal in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Die beschädigten Hefezellen wurden in 700 μ L Z-Puffer mit 27 % (v/v) β -Mercaptoethanol versetzt und invertiert. Nach Zugabe von 160 μ L oNPG-Lösung (4 mg/ml o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid (oNPG) in Z-Puffer) folgte eine Inkubation für 30-60 Minuten bei 37 °C. Nach Eintreten einer Gelbfärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 400 μ L 1 M Na_2CO_3 gestoppt und der Reaktionsansatz für 10 Min. bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert. 200 μ L des Überstands wurden dann für die Messung in einem Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 420 nm eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz mit Z-Puffer statt Hefelösung. Zur Berechnung der enzymatischen Reaktion wurde die Zeit der Inkubation mit oNPG einbezogen und die OD_{600} der verbleibenden 200 μ L Hefesuspension bestimmt. Mittels folgender Formel konnte die Aktivität der β -Galactosidase berechnet werden:

$$\beta\text{-Galactosidaseaktivitat [u]} = \frac{100 * OD_{420}}{V * T * OD_{600} * F}$$

(V = Volumen der Hefekultur; T = Reaktionszeit, F = Verdunnungsfaktor)

3 Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalyse in Wurzeln von *V. longisporum*-infizierten WT, *aos* und *coi1-t Arabidopsis*-Pflanzen

Nach Infektion mit *V. longisporum* zeigt die JA-Hormonrezeptormutante *coi1* im Gegensatz zum Wildtyp und zur JA-Biosynthese Mutante *aos* weniger Krankheitssymptome. Da vom Pilz keine JA-Ile ähnliche Substanz gebildet wird, die COI1 aktiviert, wird eine JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* vermittelt. Pfropfungsexperimente haben gezeigt, dass die neue COI1-Funktion in Wurzeln aktiv ist und im oberen Pflanzenteil dem Pilz ermöglicht, Krankheitssymptome in *A. thaliana* hervorzurufen (Ralhan et al., 2012).

Zur Identifikation von Zielgenen der neuen JA-Ile unabhängigen COI1-Funktion, sollten zunächst Transkriptomanalysen von nicht infizierten und infizierten Wurzeln der Genotypen WT, *aos* und *coi1* durchgeführt werden. Diese Zielgene sollten anschließend verwendet werden, um die Beteiligung von JAZ, MYC2 und NINJA an dem neuen JA-Ile unabhängigen Signalweg zu untersuchen. Weiterhin sollte ihre Rolle bei Resistenz- bzw. Suszeptibilitätsmechanismen gegen *V. longisporum* untersucht werden.

3.1.1 Vergleich zweier Infektionssysteme von *A. thaliana* mit *V. longisporum*

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, welches biologische Material in der RNA-Präparation verwendet werden und in die Transkriptomanalysen eingehen sollte.

In vorherigen Versuchen wurde ein Infektionssystem verwendet, bei dem *Arabidopsis*-Pflanzen zunächst auf einem Sand-Erde-Gemisch angezogen werden. Die Pflanzen werden für die Infektion aus dem Substrat gezogen, um die Wurzeln mit dem Pilz durch 45-minütige Inkubation in einer Sporensuspension (10^6 Sporen / mL) in Kontakt zu bringen. In diesem „Sand-Erde-Infektionssystem“ bilden *Arabidopsis*-Pflanzen ein weit verzweigtes Wurzelwerk (Abbildung 3.1 (A)). Vorherige Analysen mit einem GFP-markierten *V. longisporum*-Stamm zeigten, dass der Pilz nur in wenigen Wurzeln dieses Materials detektiert werden kann. Da eine gezielte Ernte dieser Wurzeln mit Hilfe des *Laser-Scanning*-Mikroskops einerseits zu aufwändig wäre und andererseits die Pflanze gestresst hätte, wäre hier nur die Ernte des gesamten Wurzelwerks in Frage gekommen. Hierbei war zu befürchten, dass lokal induzierte Genexpression nicht mehr nachweisbar sein könnte.

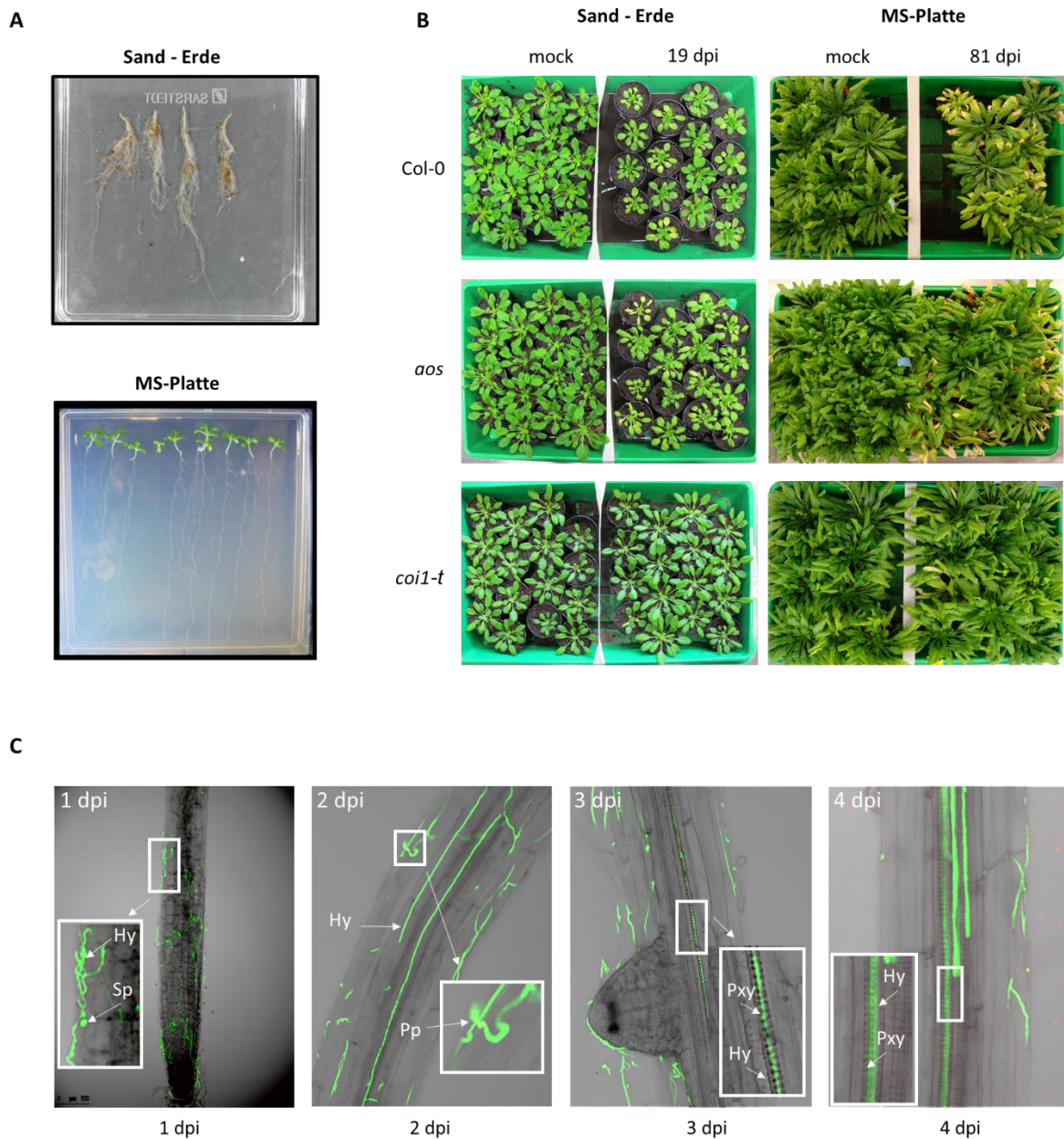


Abbildung 3.1 Vergleich des Wurzelwachstums und Pathophänotypen im Sand-Erde- und Platten-Infektionssystem bzw. Infektionsverlauf von *V. longisporum*-GFP in *A. thaliana* Col-0 Wurzeln im Platten-Infektionssystem

(A) Typisches Wurzelwachstum von *Arabidopsis*-WT-Pflanzen, 19 Tage nach Infektion im Sand-Erde-Infektionssystem bzw. 3 Wochen nach Kultivierung auf MS-Platten. **(B)** Gegenüberstellung der Entwicklung vom Pathophänotypen 19 Tage nach Infektion im Sand-Erde-System bzw. 81 Tage nach Infektion, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen. Es wurden Pflanzen der Genotypen Col-0, *aos* und *coi1-t* untersucht. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Einzelaufnahmen des Zeitverlaufs der Infektion nach 1, 2, 3 und 4 Tagen im Platten-Infektionssystem. (1 dpi) Gekeimte Sporen auf der Wurzeloberfläche 1 Tag nach Infektion. (2 dpi) Hyphenwachstum und Penetration 2 Tage nach Infektion. (3 dpi, 4 dpi) Fortgeschrittenes Hyphenwachstum und Wachstum im Leitgefäßsystem der Wurzel 3 und 4 Tage nach Infektion. Abkürzungen: Hy (Hyphe), Pp (Penetrationsstelle), Pxy (Protoxylem), Sp (Spore)

Daher wurde mit einem von der AG-Lipka entwickelten Infektionssystem gearbeitet (Reusche, 2011). Dieses Protokoll sieht vor, dass Pflanzen für drei Wochen auf MS-Medium angezogen werden. Unter diesen Bedingungen entwickeln Pflanzen eine einzelne Hauptwurzel (Abbildung 3.1 (A)). Anschließend werden die Pflanzen auf 1 %ige Wasser-Agarose-Platten umgelegt und die Wurzeln mit 10^5 Sporen / mL besprüht. Nach drei bis vier Tagen kann eine Besiedlung des Xylems beobachtet werden (Reusche, 2011). Der Transfer auf das nährstoffarme Wasser-Agarose-Medium war notwendig, um ein zu starkes saprophytisches Wachstum des Pilzes auf dem Substrat zu verhindern, da dadurch die Pflanze in anderer Weise beeinflusst werden könnten, als das biotrophe Wachstum an und innerhalb der Wurzel.

In dieser Arbeit konnte noch einmal der von M. Reusche beschriebene Infektionsverlauf bestätigt werden (Abbildung 3.1 (C), Reusche, 2011). Die Sporen von *V. longisporum* keimen innerhalb der ersten 24 Stunden und wachsen auf der Wurzeloberfläche. Zwei Tage nach Infektion wächst das Hyphennetzwerk weiterhin auf der Oberfläche und erste Hyphen beginnen die Epidermis zu penetrieren. Nach bereits drei Tagen erreicht der Pilz das Leitgewebe der Wurzel im Bereich des Protoxylems. Wachstum von *V. longisporum* im Leitgefäßsystem wird vier Tagen nach Infektion beobachtet. Die Infektionsrate lag bei 70 - 80 %.

Der Vergleich der Pathophänotypen infizierter Pflanzen beider Infektionssysteme zeigt, dass 19 Tage nach Infektion eindeutige Krankheitssymptome bei Pflanzen des Sand-Erde-Infektionssystems auftreten (Abbildung 3.1 (B)), während Pflanzen, die im sterilen Platten-System infiziert und nach 4 Tagen auf Erde umgesetzt werden, stark verzögerte Symptome aufweisen, die wenig ausgeprägt sind (Abbildung 3.1 (B)). Dieses Ergebnis deutet an, dass die Besiedlung des Xylems durch den Pilz unter den hier gewählten Bedingungen nur zu einer schwachen Induktion von Genen führen wird, die für Kolonisierung oder Symptomausprägung im Spross verantwortlich sind. Angesichts der experimentellen Nachteile des Sand-Erde-Infektionssystems wurde dennoch entschieden, das Transkriptom von mock- und *V. longisporum*-infizierten sterilen Wurzeln zu analysieren.

3.1.2 Transkriptionelle Analysen im Platten-Infektionssystem

Um auf transkriptioneller Ebene die Wirkung von *V. longisporum* auf *Arabidopsis*-Wurzeln zu analysieren, wurden die Wurzeln vom Spross mit Hilfe eines Skalpell abgetrennt und aufgearbeitet. Um einen geeigneten Zeitpunkt für geplante Transkriptomanalysen zu finden, wurde in einem *time-course*-Experiment die Expression früher Infektionsmarker nach zwei, vier und sechs Tagen *post* Infektion mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Dazu wurde RNA aus Wurzeln von Col-0, *aos* und *coi1-16*-Pflanzen verwendet.

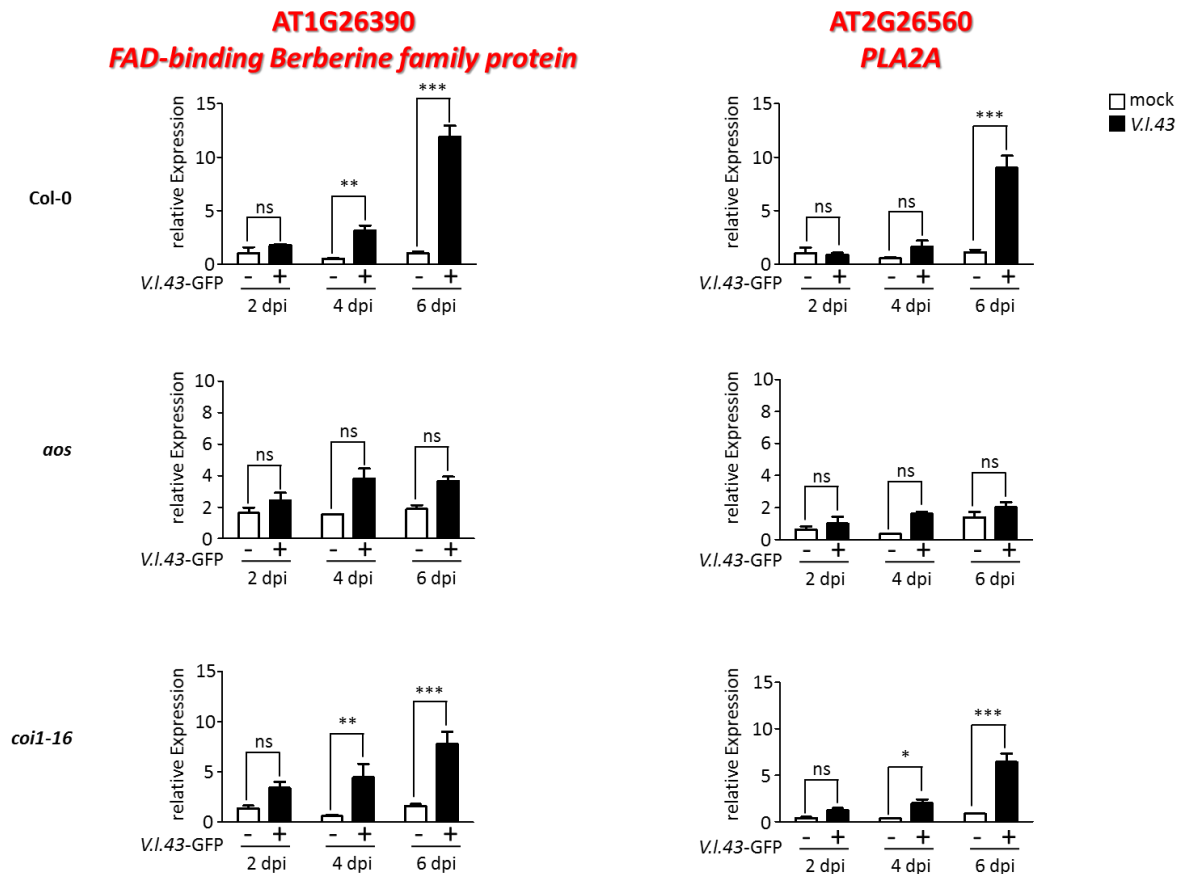


Abbildung 3.2 Quantitative RT-PCR von *V. longisporum*-induzierten Genen in Wurzeln von Col-0, *aos* und *coi1-16* im *time course* Experiment 2, 4 und 6 Tage nach Infektion (dpi)

Relative Transkriptmengen von AT1G26390 und AT2G26560 in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von Col-0, *aos* und *coi1-16* zwei, vier und sechs Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten (\pm SEM) mit fünf Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Relative Transkriptmengen von Col-0 / *aos* / *coi1-16* zwei Tage nach mock-Infektion wurden gleich 1 gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an.

Bei den hier analysierten Infektionsmarkern handelt es sich um AT1G26390, ein FAD-bindendes Protein der Berberin-Familie, und AT2G26560, eine Phospholipase. Diese Gene wurden im Datensatz eines zuvor durchgeführten Microarrays (Iven, 2009) gefunden. Für diesen Datensatz erfolgte die Infektion nach dem sogenannten „Infektionskanalsystem“. Das Infektionskanalsystem (Iven, 2009) unterscheidet sich vom hier verwendeten Platten-Infektionssystem in folgenden Aspekten: Während im Platten-Infektionssystem 3 Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene Pflanzen, von MS-Medium auf Wasser-Agarose umgelegt und durch Sprühen einer Sporensuspension (10^5 Sporen / mL) infiziert werden, wachsen Pflanzen im Infektionskanalsystem (Iven, 2009) 2 Wochen auf MS-Medium unter Langtagbedingungen und werden auf dem Medium durch Pipettieren

von 500 µl Sporensuspension ($4 \cdot 10^5$ Sporen/mL) in einen auf den Platten vorbereiteten Infektionskanal infiziert (vgl. Abbildung 3.8 (A)). In diesem System wird das saprophytische Wachstum des Pilzes in unmittelbarer Nähe der Wurzel auf einen kleinen Bereich eingeschränkt. Unter diesen Bedingungen dringt der Pilz zwar in die Wurzel ein, kann aber nicht das Xylem besiedeln. Die Gene AT1G26390 und AT2G26560 waren im Infektionskanalsystem nach drei Tagen um den Faktor 8 in Col-0 erhöht (Iven, 2009).

Beide Gene werden ebenfalls induziert, wenn Pflanzen auf Agarose mit *V. longisporum* infiziert werden (Abbildung 3.2). In WT und *coi1*-Pflanzen beginnt die Induktion nach vier Tagen und wird zum Zeitpunkt 6 dpi stärker. Aus unbekanntem Gründen reagieren die Wurzeln der *aos*-Pflanzen deutlich schwächer auf den Pilz.

Um primäre Zielgene der neuen COI1-Funktion zu identifizieren und um eventuelle Wachstumsvorteile der Pflanzen auf nährstoffarmem Medium (Wasser-Agarose) zu minimieren, wurde auch aufgrund oben genannten Genexpressionsanalysen der Zeitpunkt vier Tage nach der Infektion für Transkriptomanalysen der drei Genotypen Col-0, *aos* und *coi1* gewählt.

3.1.3 Präparation und Charakterisierung der pflanzlichen RNA für die Durchführung der Transkriptomanalysen

Nach den ersten Versuchen im Platten-Infektionssystem wurden Proben zur transkriptomweiten RNA-Sequenzanalyse (RNA-Seq) vorbereitet. Aufgrund der Sterilität von homozygoten *coi1-t*- und *aos*-Pflanzen, wurde für beide Genotypen eine heterozygote Samenpopulation verwendet und aus diesen die homozygoten Wildtypen und *coi1*- bzw. *aos*-Pflanzen über Genotypisierung identifiziert. Somit konnte für beide Mutanten der segregierende WT von einer Samenpopulation derselben Mutterpflanzen identifiziert werden. Zur Präparation eines Replikates für RNA-Seq-Analysen wurden 500 Samen einer heterozygoten Samenpopulation auf MS-Platten ausgelegt. Nach 3 Wochen Wachstum, dem Umlegen auf 1 %ige Wasser-Agarose-Platten und Infektion mit *V. longisporum*, wurde am vierten Tag nach Infektion zunächst an exemplarisch ausgewählten Wurzeln überprüft, ob der Pilz in das Xylem eingedrungen war (vgl. Abbildung 3.1 (C)). Weitere Pflanzen wurden zur Analyse des Pathophänotypen auf Erde transferiert (vgl. Abbildung 3.1 (B)). Von 160 mock und 160 infizierten Pflanzen wurde jede Wurzel und jeder Spross individuell geerntet. Der Spross wurde zur Genotypisierung verwendet. Es konnten jeweils 36 Wurzeln für die *aos*-Mutante und seinen entsprechenden WT bzw. 33 Wurzeln für WT_{*coi1-t*} und *coi1-t* vereint und zur Extraktion von RNA verwendet werden. Durch Wiederholungen des Ansatzes wurden unabhängige Replikate erhalten, in denen die Genexpression der zuvor beschriebenen Infektionsmarker (Iven, 2009) getestet wurde (Abbildung 3.3).

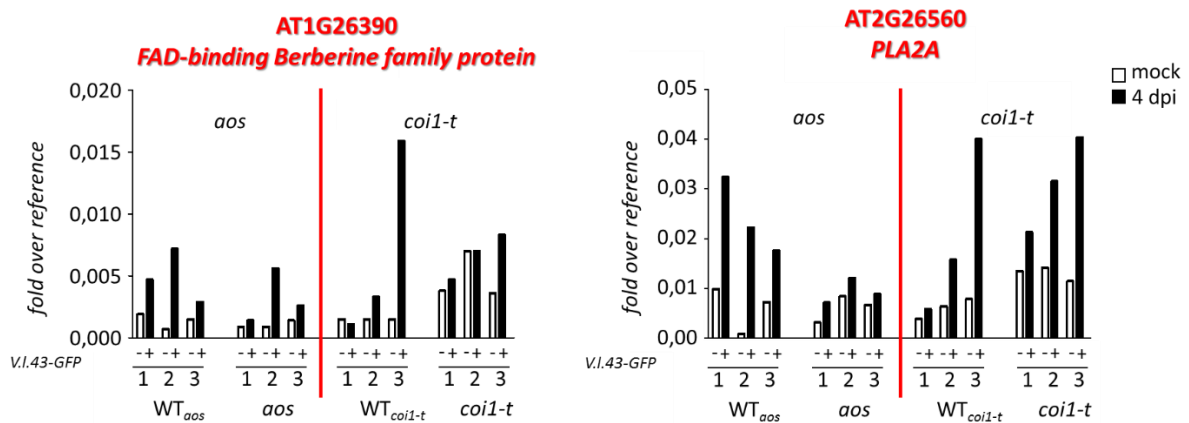


Abbildung 3.3 Quantitative RT-PCR von *V. longisporum*-induzierten Genen in Wurzeln von *WT_{aos}*, *aos*, *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* 4 Tage nach Infektion (dpi)

$\Delta\Delta$ CT-Werte von *AT1G26390* und *AT2G26560* in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von *WT_{aos}*, *aos*, *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion von je 3 unabhängigen Replikaten. Die Replikate von *WT_{aos}* und *aos* bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* aus 33 Wurzeln. *Fold over reference* Werte der einzelnen Replikate wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert.

Diese drei Replikate zeigen eine durchgehend heterogene Induktion beider Gene in allen vier Genotypen. So unterscheiden sich bspw. die Replikate 1 und 3 der *WT_{coi1-t}*-Wurzeln. Beide Gene sind in Replikat 1 nach Infektion mit *V. longisporum* nicht induziert wohl aber in Replikat 3. Diese Genexpressionsanalysen (Abbildung 3.3) sind zum Teil widersprüchlich zu den zuvor gezeigten (Abbildung 3.2), bspw. zeigt *PLA2A* hier nun eine bessere Induktion in *coi1-t* als *AT1G26390*. Diese Variabilität der Genexpression war bei weiteren Replikaten sogar noch höher (Anhang Abbildung 6.1), so dass mit den hier analysierten Replikaten weiter gearbeitet wurde.

3.1.4 Präparation und Charakterisierung der pilzlichen RNA für die Durchführung der Transkriptomanalysen

Zur Analyse der Transkriptome konnte zwischen Microarray-RNA-Analysen und RNA-Seq-Analysen entschieden werden. Die RNA-Seq-Analyse bot den Vorteil, dass das Expressionsprofil nicht nur auf Gene von *A. thaliana* beschränkt wird, sondern auch Transkripte von *V. longisporum* detektiert werden können. Dazu musste zunächst geklärt werden, ob die hohe Anzahl an Pflanzentranskripten nicht die pilzlichen Transkripte in dem Maße verdünnen würden, dass eine Detektion dieser nicht mehr möglich wäre.

Um dies zu testen, wurde die Genexpression von GFP, dem Markergen des Stammes *V. longisporum*-GFP, in unterschiedlichem Material analysiert: Wurzel-RNA von Col-0 4 Tage nach mock und

V. longisporum-GFP Infektion, RNA vom Pilz allein sowie gemischter RNA von Col-0 und *V. longisporum*-GFP im Verhältnis 9:1. Während in reiner Pilz-RNA die GFP-Expression schon nach 20 Zyklen detektierbar ist, überschreitet die GFP-Transkriptmenge in cDNA von infizierten Col-0 Wurzeln 4 Zyklen später den Schwellenwert (Abbildung 3.4 (A)). Ähnlich wie in infizierten Wurzeln, konnte ein Schwellenwert von 24 in 9:1 gemischter cDNA von Col-0 und *V. longisporum*-GFP identifiziert werden. Ausgehend von diesen Ergebnissen war zu erwarten, dass 10 % der durch RNA-Seq-Analysen detektierten Transkripte pilzlicher Herkunft sein würden. Diese Häufigkeit sollte es erlauben, dass Transkripte von zumindest hoch exprimierten pilzlichen Genen in genügender Menge vorhanden sein sollten, dass deren relative Quantifizierung unter verschiedenen Bedingungen möglich ist.

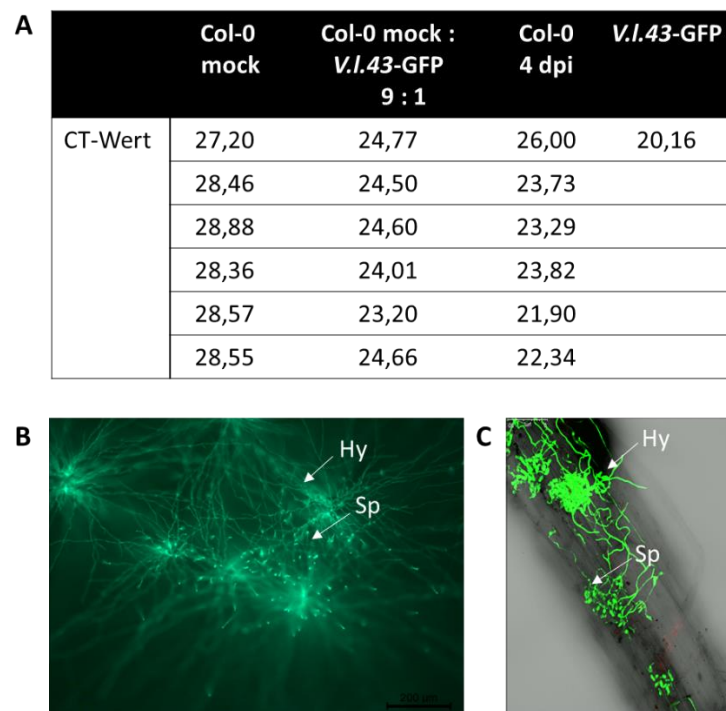


Abbildung 3.4 Quantitativer RT-PCR-Test und Analyse des Wachstumsverhaltens von *V. longisporum* zur Detektion pilzlicher Genexpression während der RNA-Seq-Analyse

(A) Dargestellt sind CT-Werte der GFP-Detektion in 3 Wochen alten Wurzeln von Col-0 nach mock- und *V. longisporum*-Infektion, sowie von 2 Tage auf SXM gewachsenem *V. longisporum*-GFP und gemischter cDNA von Col-0 mock und *V. longisporum*-GFP im Verhältnis 9:1 von je 6 verschiedenen bzw. einem einzelnen Replikat. **(B)** Wachstum von *V. longisporum*-GFP nach zwei Tagen auf SXM. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des Wachstums von *V. longisporum*-GFP nach vier Tagen auf 1%iger Wasser-Agarose liegender Col-0 Wurzel. Abkürzungen: Hy (Hyphe), Sp (Spore)

Um analysieren zu können, welche pilzlichen Transkripte in Gegenwart von Pflanzenwurzeln höher exprimiert werden als bei rein saprophytischem Pilzwachstum, wurde ebenfalls RNA von *V. longisporum* präpariert, der zwei Tage auf SXM-Medium ohne pflanzliche Wurzeln gewachsen war. Innerhalb dieser Wachstumszeit bildet *V. longisporum*-GFP ein verzweigtes Hyphennetzwerk aus (Abbildung 3.4 (B)). Zudem sind nach zwei Tagen noch ungekeimte Sporen vorhanden. Dieses Entwicklungsstadium ist mit *V. longisporum*-GFP, der vier Tage in Kontakt mit Wurzeln wächst, vergleichbar (Abbildung 3.4 (C)). Drei unabhängige Replikate von RNA-Präparationen des Stammes *V. longisporum*-GFP wurden hergestellt.

Letzendlich gingen 27 Proben in die RNA-Seq-Analysen ein, je drei Replikate von WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t, mock und *V. longisporum*-GFP-infiziert sowie drei Replikate der *V. longisporum*-GFP-RNA, gewachsen auf SXM-Medium. Mit Hilfe des *Illumina HiSeq 2000* Instruments wurde die RNA-Sequenzanalyse im Transkriptomlabor der Universität Göttingen durchgeführt.

3.1.5 *V. longisporum* zeigt starke transkriptionelle Veränderungen nach Infektion von Pflanzenwurzeln

In RNA-Seq-Analysen detektierte Sequenzen von *V. longisporum*-Genen wurden mit dem publizierten Genom von *Verticillium dahliae* verglichen (<https://www.broadinstitute.org/>). Die Auswertung der Genexpressionsanalyse zeigt, dass massive Veränderungen im *V. longisporum*-Transkriptom nach der Infektion von Pflanzenwurzeln erfolgen. Mehr als 600 Gene von *V. longisporum* sind nach dem Kontakt mit Pflanzen induziert (Anhang Tabelle 6.1). Dahingegen werden 127 Gene durch den Kontakt zur Pflanze im Pilz reprimiert (Anhang Tabelle 6.2). All diese Gene weisen eine mindestens 4-fache Veränderung mit einem *padj.* < 0,05 auf. Eins dieser induzierten Gene ist *TDF12.2*. Dieses Gen wurde bereits zuvor in cDNA-AFLP-Analysen (*amplified fragment length polymorphism*) von *V. longisporum*, gewachsen in Xylemsaft von mock und infizierten *Brassica napus* Pflanzen, identifiziert (Weiberg, 2008). Die Expression dieses Gens ist im Vergleich zu dem Pilz, der auf SXM-Medium wächst, mehr als 800-fach induziert, wenn *V. longisporum* in Gegenwart von Pflanzen auf 1 %iger Wasser-Agarose wächst (Abbildung 3.5 (A)). Die Induktion von *TDF12.2* ist unabhängig von den verschiedenen Pflanzengenotypen.

Die pflanzeninduzierte Expression von *TDF12.2* wurde mit Hilfe eines *TDF12.2*_{Pro}:*mCherry*-Reporter-genkonstrukts unter dem *Laser-Scanning*-Mikroskop im Platten-Infektionssystem bestätigt. Der GFP-markierte *V. longisporum*-Stamm wurde mit dem Fusionskonstrukt aus dem *TDF12.2*-Promotor und *mCherry*, einem rot fluoreszierenden Protein, transformiert (A. Ralhan; Abbildung 3.5 (B)). Nach der Infektion drei Wochen alter, auf SXM-Medium liegender Pflanzen mit dem stabil transformierten *V. longisporum*-Stamm, kann nach zwei Tagen beobachtet werden, dass *mCherry* und somit *TDF12.2*

nur exprimiert wird, wenn mindestens eine Hyphe von *V. longisporum* in direktem Kontakt zur Wurzel steht (Abbildung 3.5 (C)). Wächst der Pilz auf SXM ohne Kontakt zur Wurzel, wird *mCherry* nicht exprimiert.

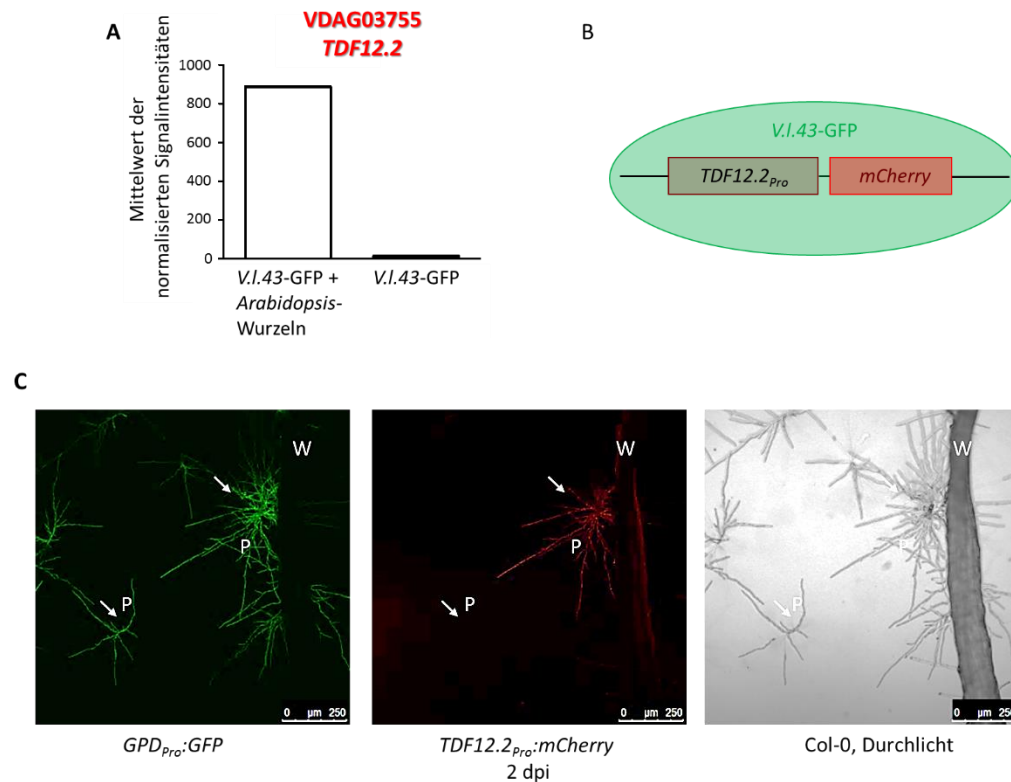


Abbildung 3.5 Analyse der Genexpression von *TDF12.2*

(A) Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken von drei unabhängigen Replikaten von infizierten WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t Wurzeln und auf SXM gewachsenem *V. longisporum*. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken von *TDF12.2* keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.) **(B)** Darstellung des transformierten Konstrukts *TDF12.2_{Pro}:mCherry* in *V. longisporum*-GFP. **(C)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zur Genexpressionsanalyse von *TDF12.2*. Die Aufnahmen wurden 48 Std. nach Infektion der Col-0 Wurzeln auf SXM-Medium aufgenommen. Die Pfeile zeigen auf *V. longisporum*, der in Kontakt mit der Wurzel bzw. ohne hergestellten Kontakt mit der Wurzel auf SXM-Medium wächst. Abkürzungen: P (Pilz), W (Wurzel)

3.1.6 Die Infektion von *V. longisporum* führt in *A. thaliana*-Wurzeln zu geringen Änderungen im Transkriptom

Sequenzen pflanzlicher Gene wurden anhand des Referenzgenoms von *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) annotiert. Das Ziel dieser Analyse war es, Gene zu finden, die abhängig von der Infektion in der coi1-t-Mutante im Vergleich zu WT_{aos}, aos und WT_{coi1-t} unterschiedlich exprimiert werden. Die Aus-

wertung der Genexpressionsanalyse zeigt, dass die Infektion der Wurzeln mit *V. longisporum* nur geringe Veränderungen im Transkriptom aller vier Genotypen, WT_{aos} , *aos*, WT_{coi1-t} und *coi1-t*, hervorruft (Abbildung 3.6). Die dargestellten Gene weisen alle eine mindestens 2-fache Veränderung mit einem p-Wert < 0,01 nach Infektion auf. Durch die Infektion werden mehr Gene induziert (Abbildung 3.6 (A)) als reprimiert (Abbildung 3.6 (B)). Durch *V. longisporum* induzierte Genexpression findet man in allen vier untersuchten Genotypen (Abbildung 3.6 (A)). Allerdings ist die Überlappung der Gene in beiden Wildtypen gering. Während im WT_{coi1-t} noch 77 Gene induziert werden, findet man im WT_{aos} nur 19 induzierte Gene. Beide untersuchten Wildtypen zeigen eine Überlappung von nur 10 Genen. Die Gruppe von Genen, die für die Untersuchung der Suszeptibilität vermittelnden JA-Ile unabhängigen Funktion von COI1 interessant wäre, enthält nur vier Gene: AT1G29090, AT4G28140, AT1G08080 und AT2G28210 (Abbildung 3.6 (A)). Es handelt sich hierbei um Gene, die nach Infektion im WT_{aos} , *aos* und WT_{coi1-t} signifikant induziert werden, nicht aber in der *coi1-t*-Mutante.

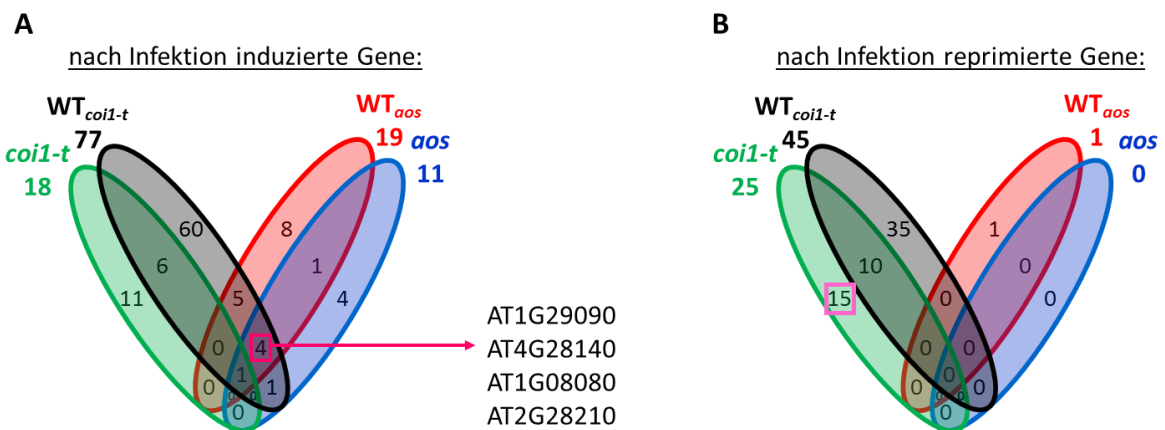


Abbildung 3.6 Venn-Diagramme der Gene, die nach Infektion mit *V. longisporum* im WT_{aos} , *aos*, WT_{coi1-t} und *coi1-t* induziert bzw. reprimiert werden

Dargestellt sind alle Gene, die in allen vier Genotypen, WT_{aos} (rot), *aos* (blau), WT_{coi1-t} (schwarz) und *coi1-t* (grün) nach Infektion mit *V. longisporum*-GFP am Tag vier mindestens zweifach induziert (A) bzw. reprimiert (B) sind und einen p-Wert < 0,01 aufweisen. Mit Kästchen markierte Gengruppen sind Gene, die im Gegensatz zum WT_{aos} , *aos* und WT_{coi1-t} in der *coi1-t*-Mutante unterschiedlich exprimiert werden und potentiell in Suszeptibilität vermittelnde Mechanismen involviert sind. Die Genlisten sind im Anhang Tabelle 6.3 (nach Infektion induziert) und Tabelle 6.4 (nach Infektion reprimiert) dargestellt.

Elektronisch erstellte Expressionsstärken der vier Gene zeigen die mindestens 2-fache Induktion der Expression nach Infektion im WT_{aos} , *aos* und WT_{coi1-t} mit einem p-Wert < 0,01 (Abbildung 3.7). Die Expression dieser vier Gene ist in der *coi1-t*-Mutante nach Infektion ebenfalls tendenziell induziert,

jedoch zeigen sie aufgrund ihrer erhöhten Hintergrundexpression in mock infizierten Wurzeln eine weniger als 2-fache Induktion und einen p-Wert > 0,01.

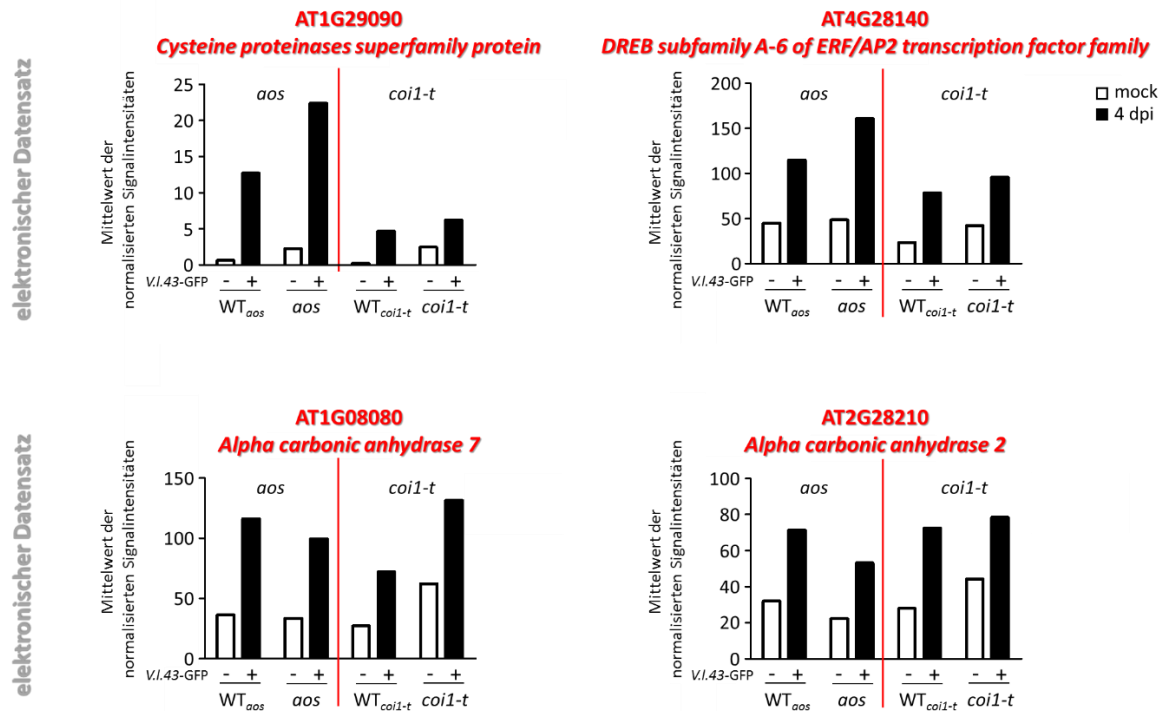


Abbildung 3.7 Elektronisch erstellte Expressionstärken von vier Genen, die nach Infektion im WT_{aos}, aos und WT_{coi1-t} induziert werden

Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Bei den dargestellten Genen handelt es sich um AT1G29090, AT4G28140, AT1G08080 und AT2G28210. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.)

AT1G29090 zeigt im Gegensatz zu den anderen drei Genen (AT4G28140, AT1G08080, AT2G28210) nach Infektion deutlich geringere Expression in der coi1-t-Mutante im Vergleich zu WT_{aos} und der aos-Mutante (Abbildung 3.7). Da die Expression jedoch auch in WT_{coi1-t} deutlich geringer ist gegenüber WT_{aos} und somit ähnlich zu coi1-t, wird dieses Gen als nicht interessant gewertet. Dieses Ergebnis zeigt, wie wichtig die Analyse von zwei Wurzeln aus zwei Typen von Wildtyppflanzen mit unterschiedlicher Historie war.

Die coi1-t-Mutante zeigt nach Infektion eine reduzierte Expression von 25 Genen (Abbildung 3.6 (B)). Während im WT_{coi1-t} noch 45 Gene reprimiert werden, findet man im WT_{aos} nur ein reprimiertes Gen.

Beide untersuchten Wildtypen zeigen somit keine Überlappungen reprimierter Genexpressionen nach Infektion mit *V. longisporum* (Abbildung 3.6 (B)).

Eine weitere Gengruppe, die für die Untersuchung der Suszeptibilität vermittelnden JA-Ile unabhängigen Funktion von COI1 interessant wäre, sind die 15 Gene, die allein in der *coi1-t*-Mutante, nicht aber in WT_{aos} , *aos* und WT_{coi1-t} durch *V. longisporum* reprimiert werden (Abbildung 3.6 (B)). Elektronisch erstellter Diagramme dieser Gene lassen ebenfalls keinen geeigneten Kandidaten für die Suszeptibilität-vermittelnde neue JA-Ile unabhängige COI1-Funktion erkennen (vgl. Anhang Tabelle 6.3 (nach Infektion induziert) und Tabelle 6.4 (nach Infektion reprimiert)).

3.1.7 Unabhängig davon, ob *V. longisporum* in das Xylem einwandert oder nicht, beeinflusst der Pilz das pflanzliche Transkriptom in sterilen Platten-Infektionssystemen kaum

Die Infektion mit *V. longisporum* führt in *A. thaliana* Wurzeln zu geringen Änderungen im Transkriptom, wenn die Pflanzen wie oben beschrieben zunächst auf MS-Medium gewachsen sind und anschließend zur Infektion auf 1 %ige Wasser-Agarose umgelegt wurden (Abbildung 3.8 (A)). In einem anderen Infektionssystem, dem Infektionskanalsystem (Iven, 2009), in dem Pflanzen auf MS-Medium sowohl wachsen als auch infiziert werden (Abbildung 3.8 (B)), schien der Pilz zunächst eine deutlichere Antwort im Pflanzentranskriptom auszulösen. Microarray-Analysen von Pflanzen des Infektionskanalsystems zeigten, dass mehr als 300 Gene durch *V. longisporum* drei Tage nach Infektion in Col-0 induziert werden. In diesen Analysen wurde jedoch mit weniger stringenten Kriterien gearbeitet. Die 300 Gene weisen eine mindestens 2-fache Induktion und einem p-Wert $\leq 0,1$ auf (Iven, 2009), im Gegensatz zu der hier gewählten Stringenz mit einer mindestens 2-fachen Induktion und einem p-Wert $< 0,01$.

Werden beide Infektionssysteme in einem Experiment mit einer Sporenlösung aus einer gemeinsamen Glycerinkultur verglichen (Abbildung 3.8), wird anhand konfokalmikroskopischer Analysen bestätigt, dass der Pilz im Platten-Infektionssystem (JoS) nach vier Tagen in das Leitgewebe der Wurzel eingedrungen ist (Abbildung 3.8 (A)), während es ihm im Infektionskanalsystem (Tim Iven) nicht gelingt, ins Xylem einzuwandern (Abbildung 3.8 (B)).

Transkriptanalysen fünf exemplarisch ausgewählter Gene, unter anderem beide zuvor gezeigten Infektionsmarker (Abbildung 3.2) zeigen tendenziell eine schwache Antwort der Pflanze auf den Pilz, unabhängig vom gewählten Infektionssystem (Abbildung 3.8 (C)). Zuvor gezeigte induzierte Expression der Gene durch *V. longisporum* um einen Faktor von mindestens 8 im Infektionskanalsystem konnte in dieser Arbeit im gleichen System für kein Gen bestätigt werden (Iven, 2009). Der schwache Einfluss des Pilzes auf die Genexpression ist demnach unabhängig davon, ob der Pilz ins Xylem eindringen kann (Abbildung 3.8 (A)) oder nicht (Abbildung 3.8 (B)).

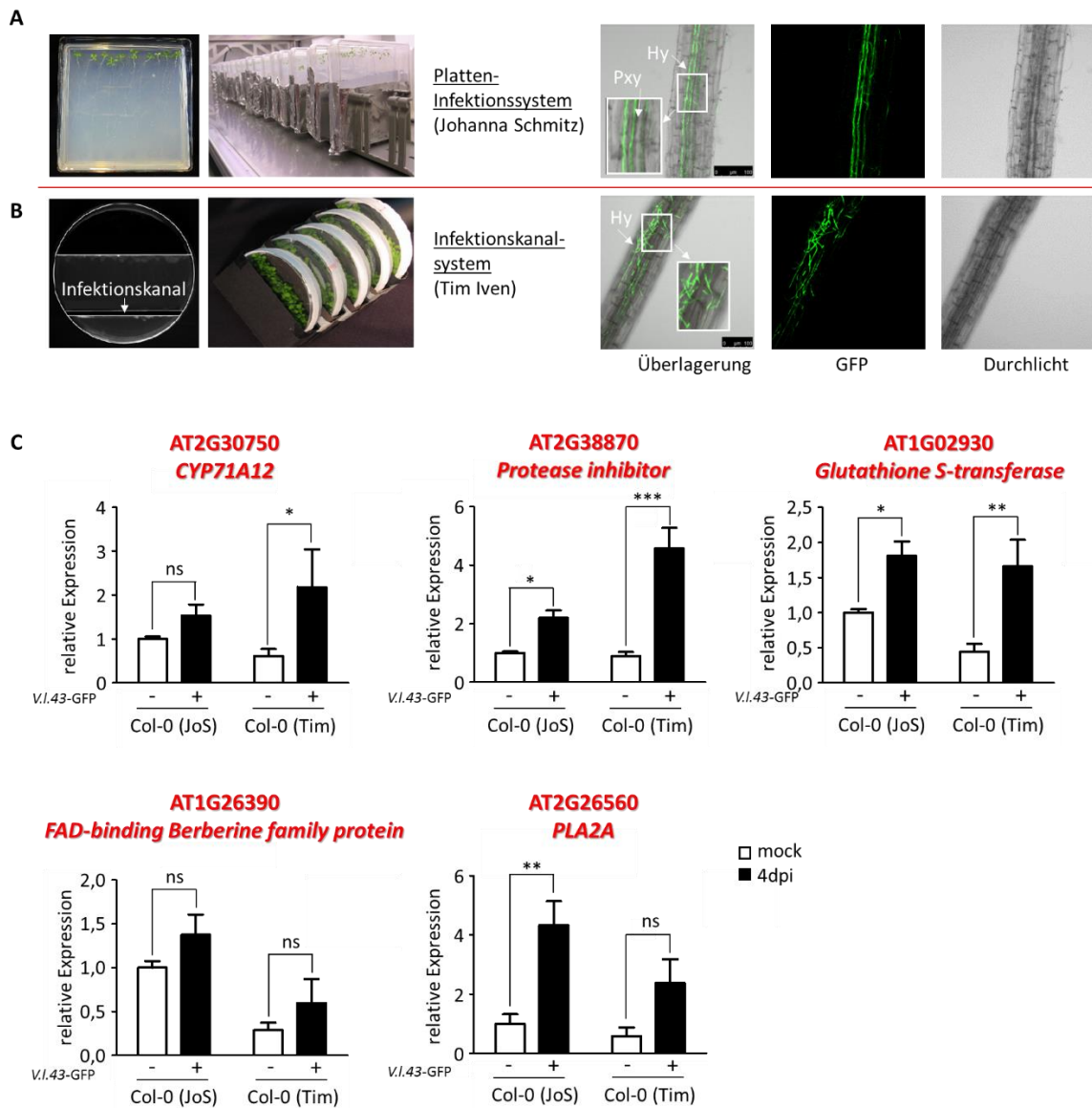


Abbildung 3.8 Vergleich des Platten-Infektionssystem (JoS) mit dem Infektionskanalsystem (Tim Iven)

Aufbau des Infektionssystem sowie fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Wachstumsverhaltens von *V. longisporum*-GFP vier Tage nach Infektion **(A)** im Platten-Infektionssystem (JoS) und **(B)** im Infektionskanalsystem (Tim Iven). **(C)** Vergleich der relativen Transkriptmengen von AT2G30750, AT2G38870, AT1G02930, AT1G26390 und AT2G26560 in Col-0-Wurzeln von Pflanzen 4 Tage nach Infektion mit *V. longisporum* aus beiden Infektionssystemen mittels quantitativer RT-PCR. Gezeigt sind Mittelwerte von 5 Replikaten (JoS) bzw. 4 Replikaten (Tim) (\pm SEM) mit ca. 40 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock infizierten Col-0 (JoS) wurde gleich 1 gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (two way ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben.

3.2 Analyse unterschiedlicher Genexpression in *coi1-t* im Vergleich zu beiden Wildtypen und der *aos*-Mutante

Um der Frage nachzugehen, ob Gene, unabhängig davon, ob deren Expression unter den hier gewählten Bedingungen vom Pilz beeinflusst werden oder nicht, unter der Kontrolle der neuen JA-Ile unabhängigen COI1-Funktion stehen, wurden relative Transkriptmengen in den vier Genotypen verglichen.

3.2.1 Zwölf Gene sind in *coi1-t* weniger stark exprimiert als in den Genotypen WT_{*aos*}, *aos* und WT_{*coi1-t*}

Im Vergleich der Transkriptomdaten WT_{*aos*}, *aos*, WT_{*coi1-t*} und *coi1-t* weisen 12 Gene in mock bzw. infiziertem Wurzelmaterial eine 4-fach reduzierte Expression in *coi1-t* auf (p-Wert < 0,01) (Anhang Tabelle 6.5). Diese könnten theoretisch an Prozessen beteiligt sein, die Suszeptibilität vermitteln.

Die Transkriptomdaten wurden in unabhängigen Experimenten für eine Auswahl der 12 Gene validiert (Abbildung 3.9).

Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 3.9:

(A) Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{*aos*}, *aos*, WT_{*coi1-t*} und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.) **(B)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{*aos*}, *aos*, WT_{*coi1-t*} und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten für WT_{*aos*} und *aos* bzw. von 6 Replikaten (\pm SEM) für WT_{*coi1-t*} und *coi1-t*, unabhängigen Materials, das nicht für die RNA-Seq-Analysen eingesetzt wurde. Die Replikate von WT_{*aos*} und *aos* bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von WT_{*coi1-t*} und *coi1-t* aus 33 Wurzeln. **(C)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tagen nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. **(D)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von Col-0-, *aos*- und *coi1-16*-Wurzeln 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat.

Die relativen Transkriptmengen wurden jeweils gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten WT_{*aos*} bzw. Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur für **(B)** und **(C)** bzw. *unpaired two-tailed Student t-test* für **(D)**).

Ergebnisse

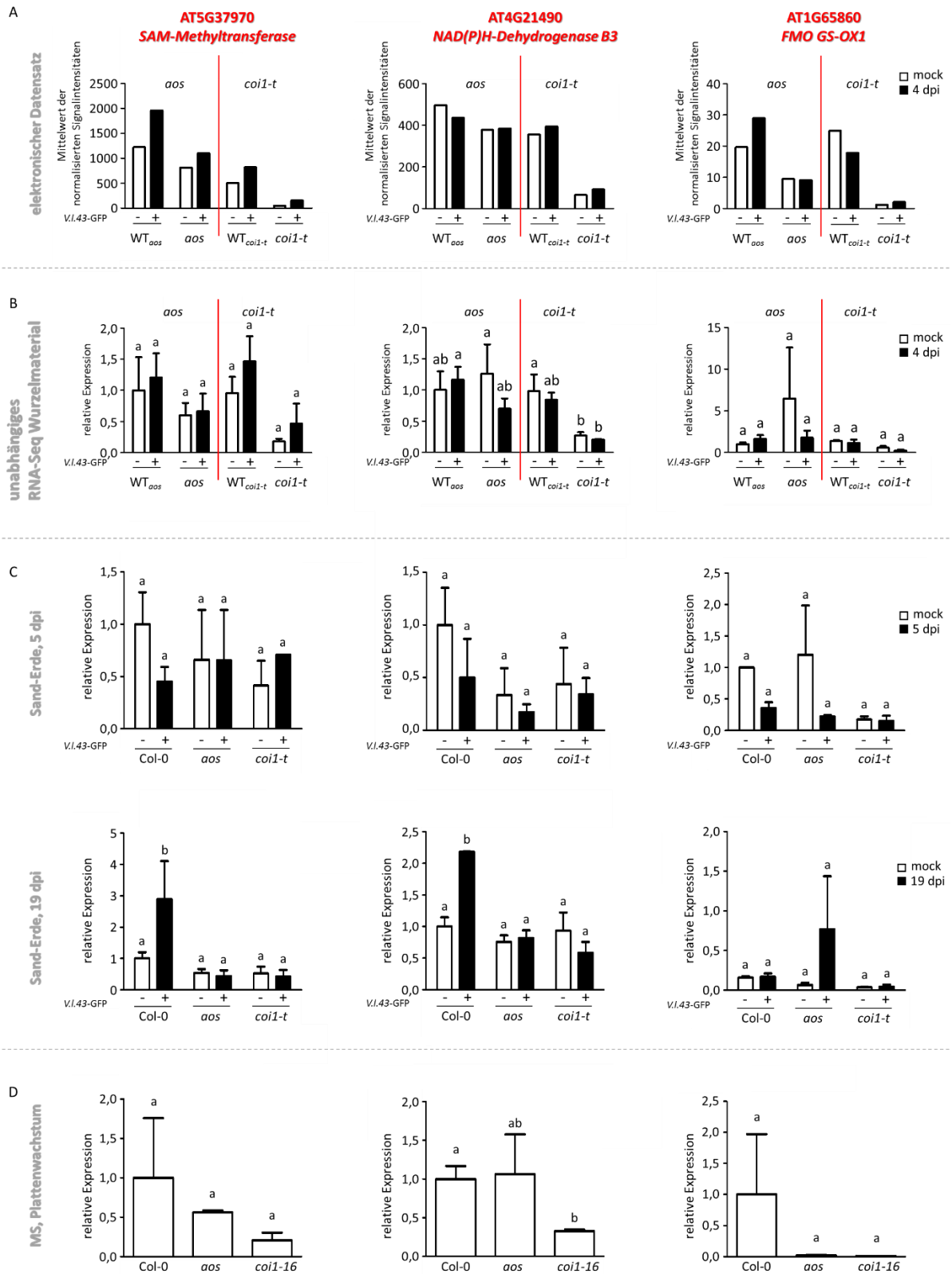


Abbildung 3.9 Quantitative RT-PCR in unterschiedlich gewachsenem und behandeltem Wurzelmaterial von Col-0, *aos* und *coi1*

Die Beschreibung setzt sich auf der vorherigen Seite fort.

Expressionsprofile der RNA-Seq-Analysen von den drei Genen AT5G37970, AT4G21490 und AT1G65860 (Abbildung 3.9 (A)) wurden mit den verschiedenen Transkriptmengen in unterschiedlich angezogenen und behandelten Col-0-, *aos*- und *coi1*-Wurzeln verglichen. 6 Unabhängige Replikate, für WT_{*coi1-t*} und *coi1-t*, des Wurzelmaterials, das in die RNA-Seq-Analyse einging, und 3 Replikate von WT_{*aos*} und *aos*, bestätigt die geringere Expression in der *coi1-t*-Mutante tendenziell für AT5G37970, eine SAM-Methyltransferase und AT4G21490, eine NAD(P)H-Dehydrogenase (Abbildung 3.9 (B)). Dagegen zeigten Expressionsanalysen in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock und *V. longisporum* Infektion ähnliche Transkriptmengen in allen drei Genotypen (Abbildung 3.9 (C)).

Für weitere Genexpressionsanalysen wuchs der Wildtyp zusammen mit homozygoten Linien der *aos*- und *coi1-16*-Mutante für 3 Wochen auf MS-Medium. Auch hier wurden die Pflanzen auf 1 %ige Wasser-Agarose umgelegt, wie es für das Material der RNA-Seq-Analyse erfolgte. Da die reduzierte Expression von AT5G37970, AT4G21490 und AT1G65860 in *coi1-t* jedoch unabhängig von der Infektion war, wurde auf die Behandlung mit dem Pilz verzichtet und nur mock-infizierte Wurzeln für Transkriptionsanalysen verwendet (Abbildung 3.9 (D)). In diesem unabhängigen Wurzelmaterial zeigt die SAM-Methyltransferase und NAD(P)H-Dehydrogenase tendenziell eine geringere Transkriptmenge in der *coi1-16*-Mutante im Gegensatz zur Genexpression in Col-0 und der *aos*-Mutante (Abbildung 3.9 (D)). Allerdings sind die Daten durch hohe Fehlerbalken in Col-0 bzw. der *aos*-Mutante nur teilweise als signifikant einzustufen. AT1G65860, eine Flavin-Monooxygenase ist tendenziell in der *aos*- und *coi1-16*-Mutante sehr schwach exprimiert. In Übereinstimmung mit publizierten Transkriptomdaten (Genevestigator, Hruz et al., 2008) scheint es sich hier um ein JA-Ile-abhängiges Gen zu handeln (Abbildung 3.10). Auch weitere Gene werden in diesem veröffentlichten Datensatz als JA-abhängig beschrieben (Abbildung 3.10, in grau beschriftete Gene). Da wir die neue COI1-Funktion untersuchen wollen, die JA-Ile-unabhängig agiert, sind diese Gene von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Ergebnisse

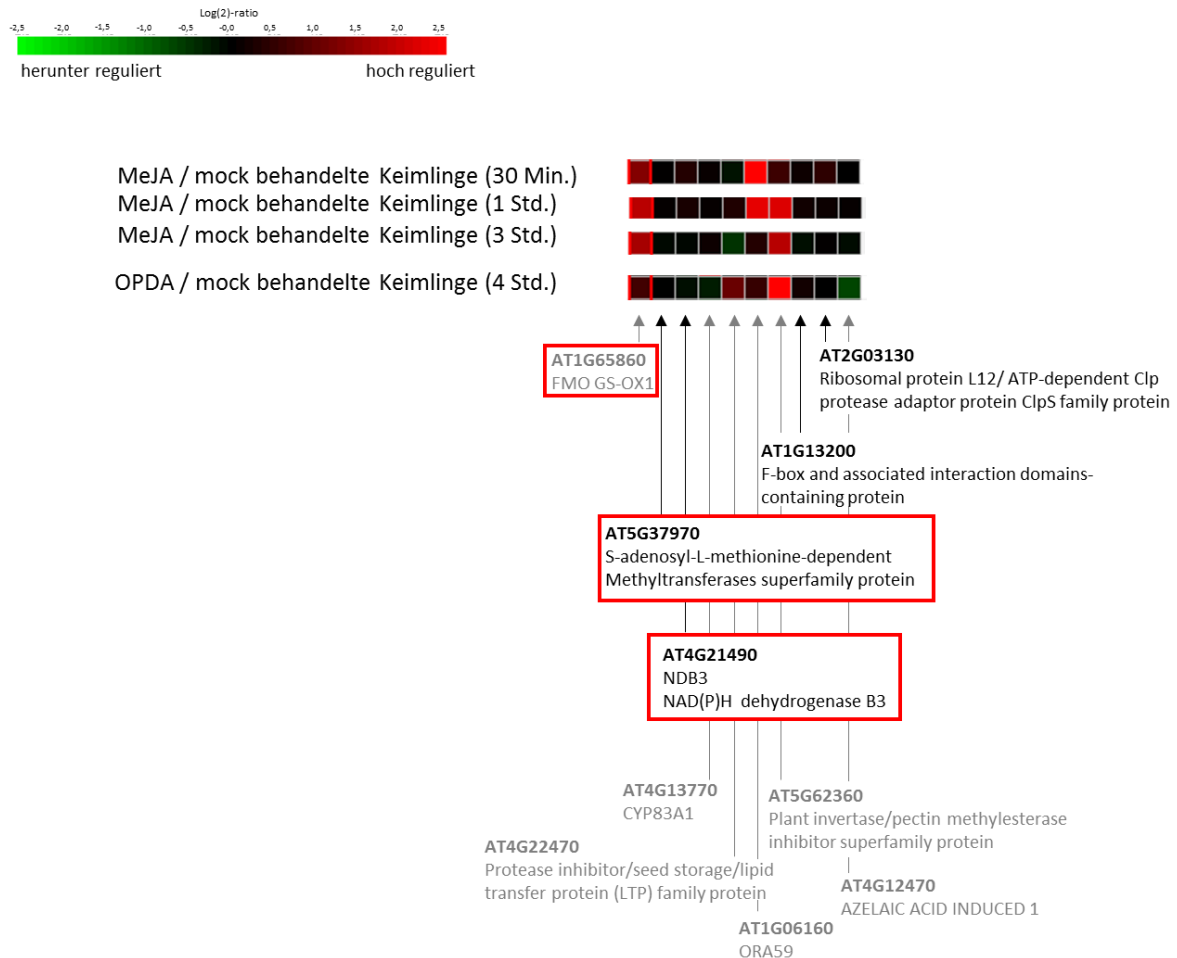


Abbildung 3.10 Einfluss von Jasmonsäure auf die Expression der in der *coi1-t*-Mutante reduzierten Gene

Mit Hilfe des Genevestigator (Hruz et al., 2008) wird der Einfluss von Jasmonsäure auf die Genexpression der in der *coi1-t* Mutante reprimierten Gene analysiert. Die Induktion bzw. Repression der Gene durch Behandlung mit Jasmonsäure oder OPDA ist nach der Induktions- bzw. Repressionsstärke entsprechend der oben dargestellten Farbskala in eine sogenannte *Heatmap* eingeteilt. Rot zeigt die Induktion, grün die Repression der entsprechenden Transkriptmenge unter den verschiedenen Bedingungen. Markierungen zeigen Gene, die näher analysiert wurden. Grau dargestellte Gene zeigen laut Genevestigator Einfluss von Jasmonsäure. (2 der 12 Transkripte waren im Genevestigator-Datensatz nicht enthalten)

Aber auch aufgrund der geringen Expressionsunterschiede in den drei Genotypen der unabhängigen Experimente (Abbildung 3.9), und keiner robusten reduzierten Expression von AT5G37970, AT4G21490 und AT1G65860 in der *coi1*-Mutante im Gegensatz zu der Transkriptmenge in Col-0 und *aos*, wurde auf die weitere Analyse dieser Gene ebenfalls verzichtet.

3.2.2 113 Gene sind in *coi1-t* stärker exprimiert als in den Genotypen WT_{aos}, *aos* und WT_{coi1-t}

Gene, die im Vergleich zu WT_{aos}, *aos* und WT_{coi1-t} in der *coi1-t*-Mutante eine erhöhte Expression aufweisen, sind theoretisch in Resistenz-vermittelnde Mechanismen gegenüber *V. longisporum* involviert. 113 Gene zeigen eine mindestens 4-fach erhöhte Genexpression in der *coi1-t*-Mutante im Vergleich zu den anderen drei Genotypen (p-Wert < 0,01) (Anhang Tabelle 6.6).

Da beschrieben ist, dass die JA-induzierte Expression von drei NAC-Transkriptionsfaktoren, ANAC019, ANAC055 und ANAC072, die SA-Biosynthese durch direkte Interaktion mit dem Promotor der *ICS1* unterdrücken (Zheng et al., 2012), könnte zumindest ein Teil der in *coi1-t* vermehrten Transkriptmengen der Gene auf den Ausfall dieser bekannten JA-aktivierten COI1-Funktion zurückzuführen sein. Daher wurde die Expression des SA-Biosynthesegens *ICS1* (*isochorismate synthase*, AT1G74710) in unabhängigen Wurzelmaterial von Col-0, *aos* und *coi1* untersucht (Abbildung 3.11). Die Genexpression zeigt in Übereinstimmung mit den RNA-Seq-Daten (Abbildung 3.11 (A) und (B)), dass die *ICS1*-Expression in der JA-defizienten *aos*-Mutante auch in unabhängigen Replikate des Wurzelmaterials, das in die RNA-Seq-Analyse einging nicht erhöht ist (Abbildung 3.11 (C)). In Wurzelmaterial aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock-Infektion (Abbildung 3.11 (D)) sowie in mock-infiziertem Wurzelmaterial aus dem Platten-Infektionssystem (Abbildung 3.11 (E)) ist ebenfalls eine erhöhte Genexpression der *ICS1* nur in der *coi1*-Mutante, nicht aber in der *aos*-Mutante zu beobachten. Eine tendenzielle erhöhte Expression in der *aos*-Mutante wie in der *coi1*-Mutante konnte erst 19 Tage nach *V. longisporum*-Infektion gesehen werden (Abbildung 3.11 (D)). Aufgrund reduzierter Expression in der *aos*-Mutante gegenüber der *coi1*-Mutante, kommt die *ICS1* als Kandidatengen für die neue COI1-Funktion in Frage. Da ihre Expression in Blättern jedoch durch den klassischen JA-Weg beeinflusst ist, ist zu vermuten, dass ihre erhöhte Expression in *coi1*-Wurzeln auf eine basale bekannte COI1-Aktivität zurückzuführen sein könnte, die auch in Abwesenheit von JA-Ile (z.B. in der *aos*-Mutante) abläuft. Da dieser Weg als weniger neuartig eingestuft wird, wurden zunächst alle Gene, die als Konsequenz der erhöhten *ICS1*-Expression in *coi1* erhöht exprimiert werden, von weiteren Analysen ausgeschlossen. Da auch Toleranz gegen *V. longisporum* unabhängig von Salicylsäure ist (Abbildung 3.37), können die *ICS1*- und SA-induzierbaren Gene nicht für diesen Pathophänotypen verantwortlich sein.

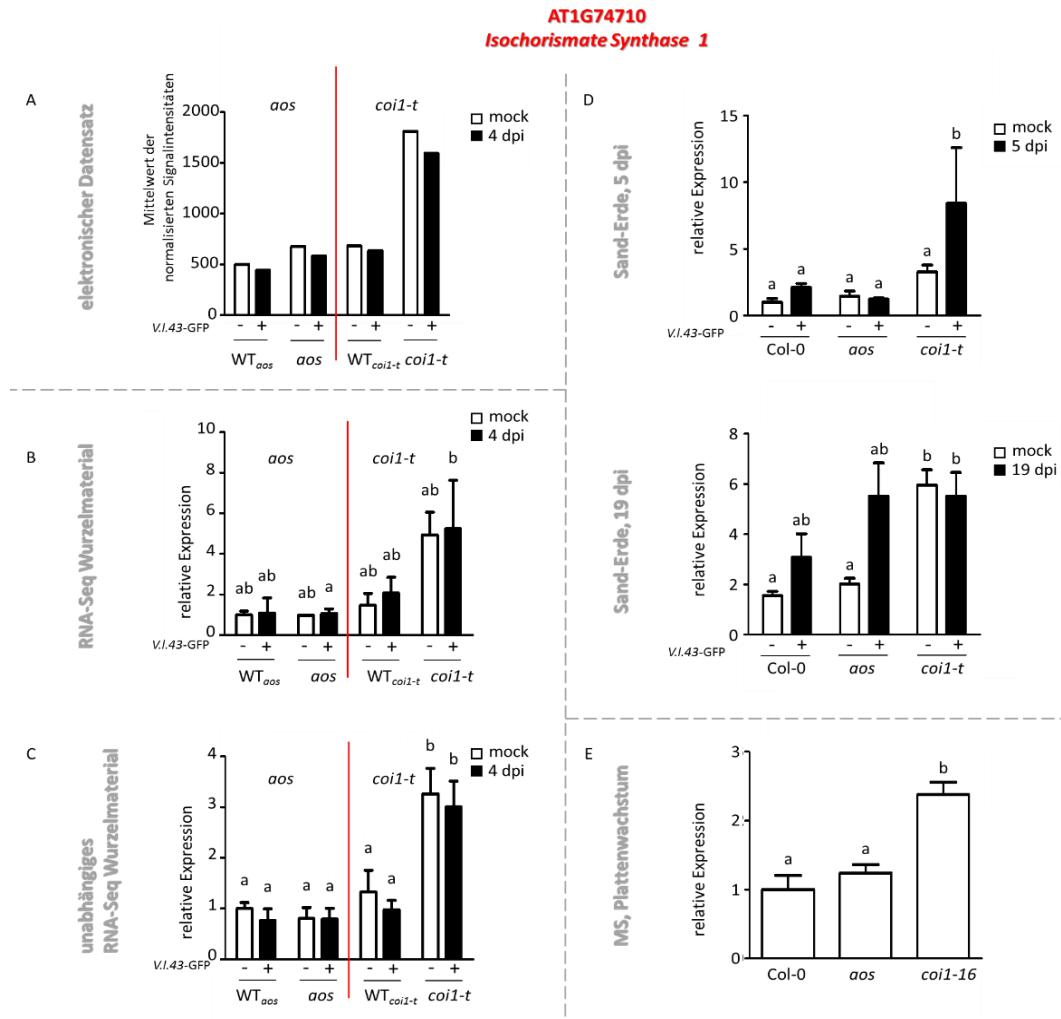


Abbildung 3.11 Quantitative RT-PCR von *ICS1* in unterschiedlich gewachsenem und behandeltem Wurzelmaterial von Col-0, *aos* und *coi1*

(A) Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, *aos*, WT_{coi1-t} und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.) **(B)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, *aos*, WT_{coi1-t} und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion, Material, das in der RNA-Seq-Analyse eingesetzt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten (\pm SEM). Die Replikate von WT_{aos} und *aos* bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von WT_{coi1-t} und *coi1-t* aus 33 Wurzeln. **(C)** Genexpressionsanalysen in unabhängigen Replikaten des Materials, das in der RNA-Seq-Analyse eingesetzt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 (WT_{aos} / *aos*) bzw. 6 (WT_{coi1-t} / *coi1-t*) Replikaten (\pm SEM) vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Die Replikate von WT_{aos} und *aos* bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von WT_{coi1-t} und *coi1-t* aus 33 Wurzeln. **(D)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. **(E)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von Col-0-, *aos*- und *coi1-16*-Wurzeln 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat.

Die relativen Transkriptmengen wurden jeweils gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten WT_{aos} bzw. Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur für **(B)**, **(C)** und **(D)** bzw. *unpaired two-tailed Student t-test* für **(E)**).

Daher wurde zunächst überprüft, ob diese 113 Gene in Datenbanken als SA-induziert beschrieben sind (Abbildung 3.12). In der Tat sind 65 von 84 analysierten Genen SA-induzierbar. (29 der 113 Transkripte waren im Genevestigator-Datensatz nicht enthalten.)

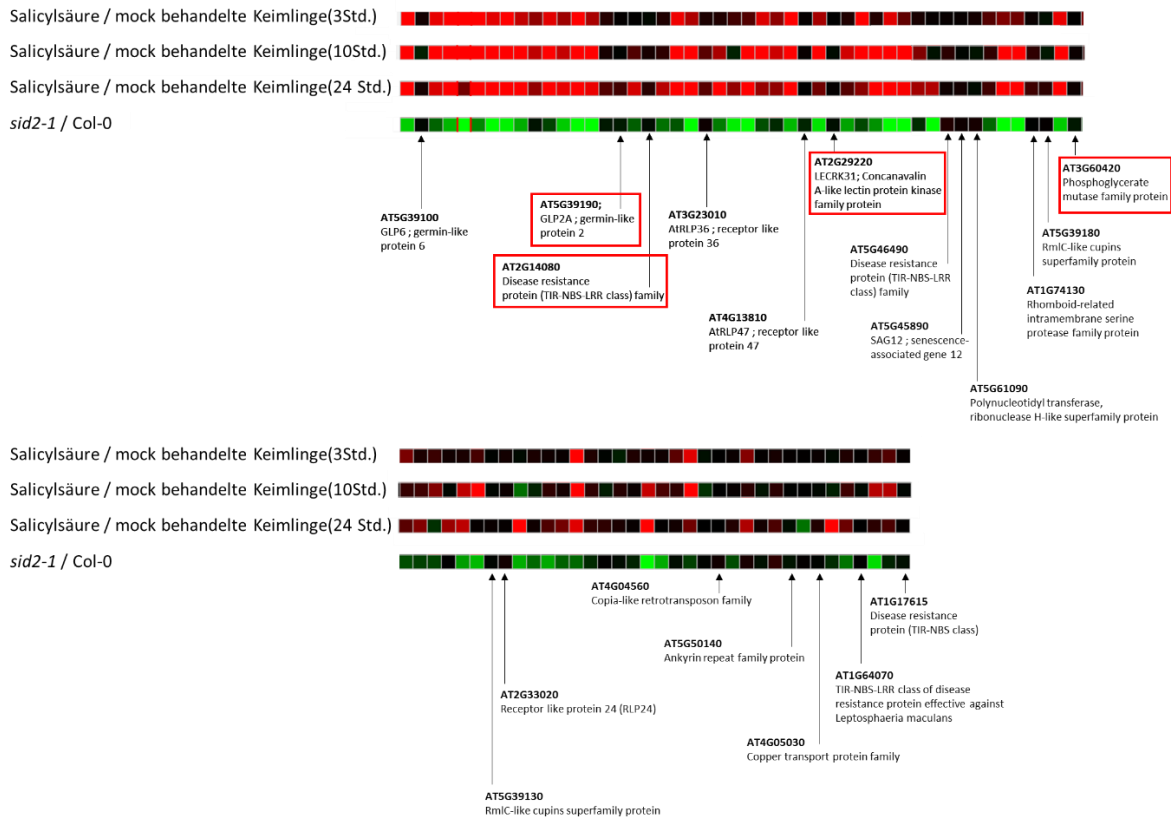


Abbildung 3.12 Einfluss von Salicylsäure auf die Genexpression der in der *coi1-t*-Mutante induzierten Gene

Mit Hilfe des Genevestigator (Hruz et al., 2008) wird der Einfluss von Salicylsäure auf die Genexpression der in der *coi1-t*-Mutante induzierten Gene analysiert. Die Induktion bzw. Repression der Gene durch Behandlung mit Salicylsäure oder in der SA-Biosynthese-Mutante *sid2-2* ist nach der Induktions- bzw. Repressionsstärke entsprechend der oben dargestellten Farbskala in eine sogenannte *Heatmap* eingeteilt. Rot zeigt die Induktion, grün die Repression der entsprechenden Transkriptmenge unter den verschiedenen Bedingungen. Markierungen zeigen Gene, die im weiteren Verlauf näher analysiert werden. (29 der 113 Transkripte waren im Genevestigator-Datensatz nicht enthalten)

Für eine Auswahl der 113 *coi1*-induzierten Gene (vgl. Abbildung 3.12, mit Kästchen markierte Gene), sowie ein weiteres (*CRK15*, *AT4G23230*), das im Genevestigator Datensatz nicht enthalten war, wurde die Transkriptmenge in unabhängigem Wurzelmaterial getestet.

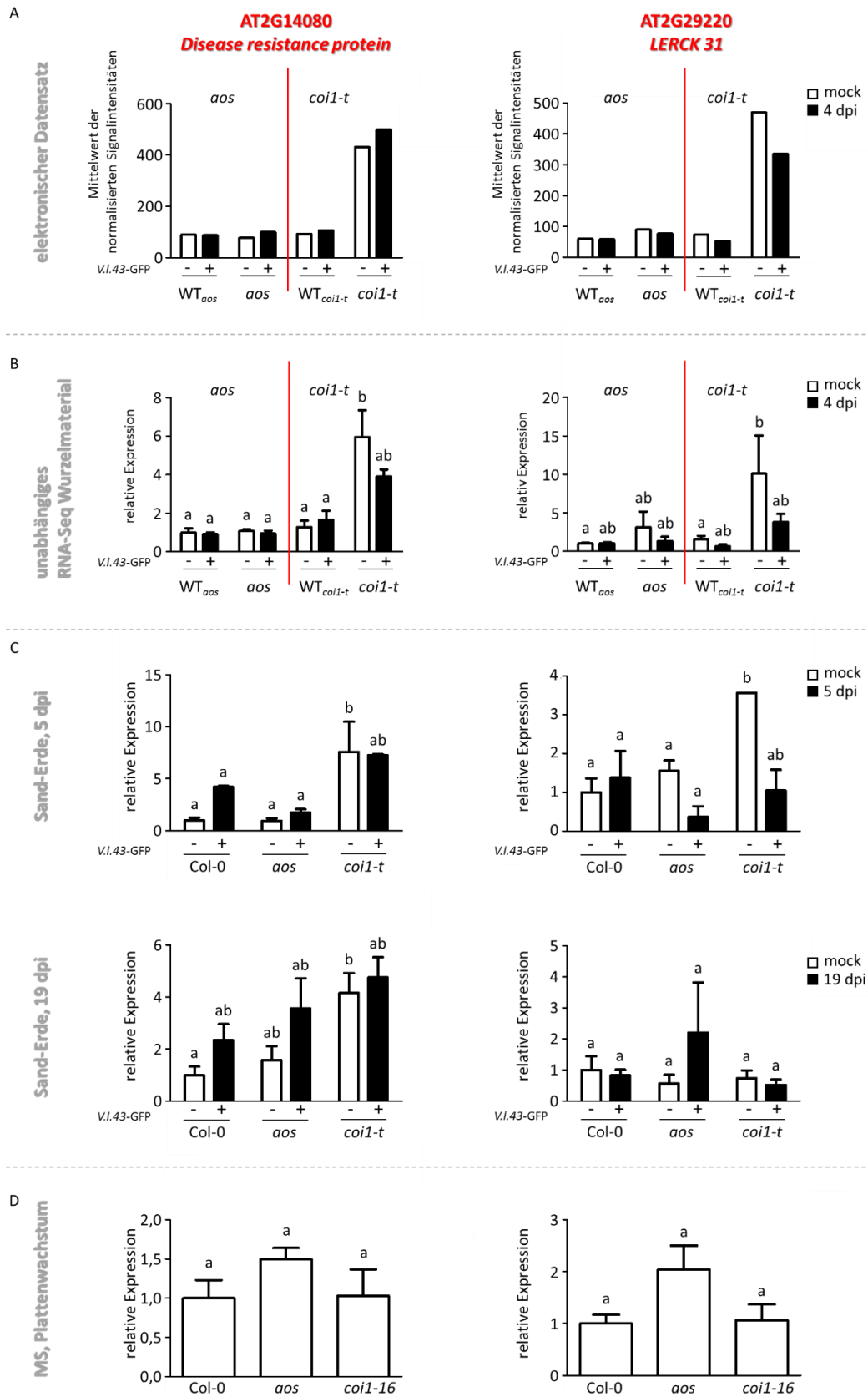


Abbildung 3.13 Quantitative RT-PCR in unterschiedlich gewachsenem und behandeltem Wurzelmaterial von Col-0, *aos* und *coi1*

Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 3.13:

(A) Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von *WT_{aos}*, *aos*, *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.) **(B)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von *WT_{aos}*, *aos*, *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten für *WT_{aos}* und *aos* bzw. von 6 Replikaten (\pm SEM) für *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* unabhängigen Materials, das nicht für die RNA-Seq-Analyse eingesetzt wurde. Die Replikate von *WT_{aos}* und *aos* bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von *WT_{coi1-t}* und *coi1-t* aus 33 Wurzeln. **(C)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. **(D)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von Col-0-, *aos*- und *coi1-16*-Wurzeln 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat.

Die relativen Transkriptmengen wurden jeweils gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten *WT_{aos}* bzw. Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur für **(B)** und **(C)** bzw. *unpaired two-tailed Student t-test* für **(D)**).

Mit AT2G14080 wurde in den Daten der RNA-Seq ein Gen gefunden, dessen erhöhte Expression in der *coi1-t*-Mutante in unterschiedlich behandelten Wurzelmaterial von Col-0, der *aos*- und *coi1*-Mutante bestätigt werden konnte (Abbildung 3.13, linke Spalte). Sowohl in unabhängigen Replikaten des Wurzelmaterials, das in die RNA-Seq-Analyse einging (Abbildung 3.13 (B)) als auch in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion (Abbildung 3.13 (C)), konnte tendenziell eine JA-Ile-unabhängige Aktivierung der Genexpression durch COI1 beobachtet werden. Die Genexpression für AT2G29220 verhielt sich ähnlich, jedoch war der Effekt der erhöhten Genexpression in Wurzelmaterial der *coi1-t*-Mutante aus dem Sand-Erde-Infektionssystem (Abbildung 3.13 (C)) nicht so eindeutig wie für AT2G14080. Wächst der Wildtyp zusammen mit homozygoten Linien der *aos*- und *coi1-16*-Mutante für 3 Wochen auf MS-Medium, ist nach der mock-Infektion der Effekt nicht mehr vorhanden. Die temperatursensitive *coi1-16*-Mutante scheint aufgrund einer einzelnen Punktmutation noch Restaktivität des Proteins aufzuweisen, so dass die Repression der Genexpression bestehen bleibt.

Der Effekt der erhöhten Genexpression beider Gene in der *coi1-t*-Mutante konnte in vielen verschiedenen Experimenten bestätigt werden, jedoch scheinen die geringen Unterschiede nicht robust genug zu sein, um auch in der *coi1-16*-Mutante beständig zu sein.

Bei weiteren drei Genen, die im Gegensatz zum Wildtyp und der *aos*-Mutante erhöhte Transkriptmengen in der Rezeptormutante aufweisen, handelt es sich um AT3G60420, eine *Phosphoglyceratmutase*, AT3G39190, das *Germin 2* und AT4G23230, dem *CRK15* (Abbildung 3.14).

Ergebnisse

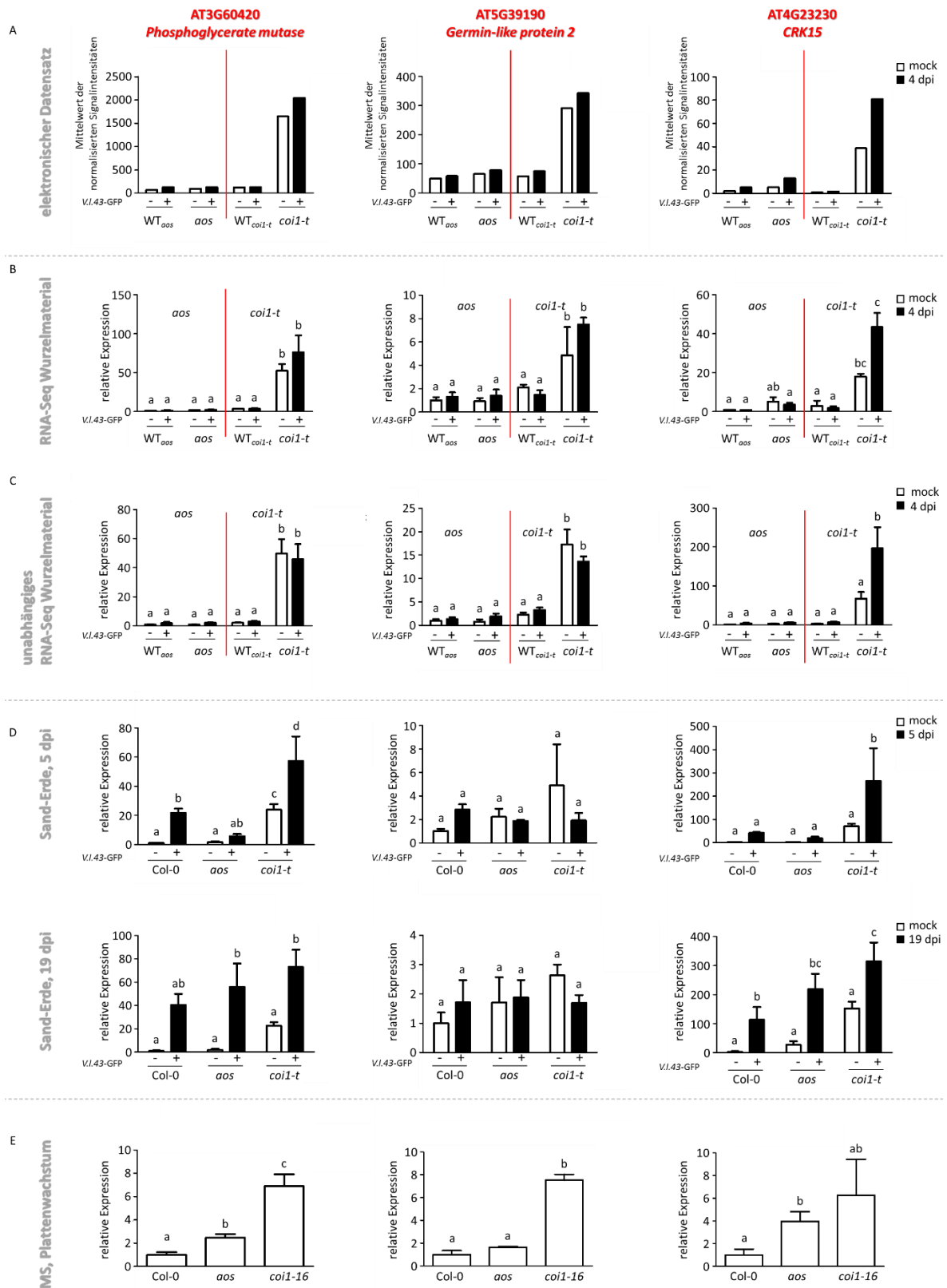


Abbildung 3.14 Quantitative RT-PCR in unterschiedlich gewachsenem und behandeltem Wurzelmaterial von Col-0, *aos* und *coi1*

Die Beschreibung setzt sich auf der nächsten Seite fort.

Fortsetzung der Beschreibung von Abbildung 3.14:

(A) Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.) **(B)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion, Material, das in der RNA-Seq-Analyse eingesetzt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten (\pm SEM). Die Replikate von WT_{aos} und aos bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von WT_{coi1-t} und coi1-t aus 33 Wurzeln. **(C)** Genexpressionsanalysen in unabhängige Replikate des Materials, das in der RNA-Seq-Analyse eingesetzt wurde. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 (WT_{aos} / aos) bzw. 6 (WT_{coi1-t} / coi1-t) Replikaten (\pm SEM) vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Die Replikate von WT_{aos} und aos bestehen aus 36 vereinten Wurzeln, die Replikate von WT_{coi1-t} und coi1-t aus 33 Wurzeln. **(D)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln aus dem Sand-Erde-Infektionssystem 5 und 19 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. **(E)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von Col-0-, aos- und coi1-16-Wurzeln 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat.

Die relativen Transkriptmengen wurden jeweils gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten WT_{aos} bzw. Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur für **(B)**, **(C)** und **(D)** bzw. *unpaired two-tailed Student t-test* für **(E)**).

Die *Phosphoglyceratmutase* zeigt durchgehend erhöhte Expression in der coi1-Mutante, unabhängig davon, ob das Pflanzenmaterial auf Erde oder MS-Medium gewachsen ist (Abbildung 3.14, linke Spalte). In der coi1-16-Mutante ist ebenfalls die erhöhte Expression gegenüber dem WT und der aos-Mutante zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass es sich bei der *Phosphoglyceratmutase* um eine robustere Regulation handelt, die noch in der temperatursensitiven Mutante zu tragen kommt. In Transkriptomanalysen des Wurzelmaterials vom Sand-Erde-System sieht man 19 Tage nach Infektion, dass *V. longisporum* einen induzierenden Einfluss auf die Expression der *Phosphoglyceratmutase* hat (Abbildung 3.14 (D)). Auch *CRK15* zeigt diesen Einfluss des Pilzes (Abbildung 3.14, rechte Spalte). Dieses Gen verhält sich auch in weiteren Analysen ähnlich wie die *Phosphoglyceratmutase*. Auch für das *Germin 2* erkennt man, dass das COI1-Protein einen negativen Einfluss auf die Expression des Genes besitzt. Nicht ganz so konsequent wie die beiden anderen Gene verläuft die Expression im Sand-Erde-Infektionssystem. Hier ist die Genexpression in allen Genotypen, unabhängig von der Infektion gleich.

Transkriptanalysen von mock- und *V. longisporum*-infizierten Wurzeln der aos- und coi1-t-Mutante sowie den entsprechend segregierenden Wildtypen haben gezeigt, dass es keine robusten Gene gibt, die in der coi1-t-Mutante geringer exprimiert sind und damit als Aktivatoren der Suszeptibilität-vermittelnden JA-Ile unabhängigen COI1-Funktion agieren.

Mit AT2G14080 (Abbildung 3.13), der *Phosphoglyceratmutase*, dem *Germin 2* und mit *CRK15* (Abbildung 3.14) wurden Gene gefunden, die in der *coi1-t*-Mutante im Gegensatz zum WT und der *aos*-Mutante erhöhte Expression zeigen. Die neue COI1-Funktion reprimiert damit die Expression der drei Gene.

Für folgende Analysen wurden drei Markergene, die *Phosphoglyceratmutase*, das *Germin 2* und *CRK15* näher betrachtet.

3.3 Analyse der Beteiligung von JA-Ile und bekannten Komponenten des JA-Signalweges an der Regulation von Genen, die in der *coi1*- nicht aber in der *aos*-Mutante erhöht exprimiert sind



Abbildung 3.15 Darstellung des klassischen JA-Signalweges im Blatt.

Durch Transkriptomanalysen konnten drei Gene gefunden werden (*Phosphoglyceratmutase*, *Germin 2*, *CRK15*) die im Gegensatz zum WT und der *aos*-Mutante erhöhte Expression in der *coi1*-Mutante, unabhängig von *V. longisporum*, zeigen. Im Folgenden werden diese Gene als Markergene der neuen COI1-Funktion betrachtet und getestet, inwiefern *downstream* von COI1 agierende Prozesse für die neue COI1-Funktion relevant sind.

Im klassischen JA-Signalweg, besitzt die JA-Ile-induzierbare Funktion von COI1 eine negative Wirkung auf die SA-Biosynthese (Zheng et al., 2012; Abbildung 3.15). Im Prinzip verläuft die Kaskade über den JA-induzierbaren Abbau der JAZ-Proteine, die gemeinsam mit Topless und meist NINJA als Repressoren des JA-Signalweges fungieren (Chini et al., 2007). Der Abbau veranlasst MYC2 die Transkription der drei NAC-Faktoren ANAC019, ANAC055 und ANAC072 zu induzieren (Zheng et al., 2012). Diese können direkt am Promotor der ICS1 binden und dort die Genexpression als Antwort auf JA unterdrücken. Hypothetisch ist bei diesem Schema die Beteiligung von NINJA an dieser Regulation.

3.3.1 Die erhöhte Expression der *Phosphoglyceratmutase* und *CRK15* in *coi1* sind unabhängig von Salicylsäure

Da bekannt ist, dass beim Wegfall der klassischen COI1-Funktion der SA-Signaltransduktionsweg hyperstimuliert ist, wurde im Folgenden die Expression der drei Gene *Phosphoglyceratmutase*, *Germin 2* und *CRK15*, in Abhängigkeit von Salicylsäure analysiert. Dafür wuchsen Col-*gl1*, *aos*, *coi1-16*, *sid2-2* und die bezüglich des *coi1-1*-Allels heterozygote Linie *coi1-1 x sid2-2* für 3 Wochen auf MS-Medium, wurden auf 1 %ige Wasser-Agarose umgelegt und mock-infiziert. Vier Tage nach Infektion wurden je 5 Replikate mit 20 Wurzeln / Replikat aller homozygoten Linien zur RNA-Präparation verwendet. Für die *aos*-Mutante konnte nur ein Replikat präpariert werden. Von der heterozygoten *coi1-1 x sid2-2*-Mutante wurde der Spross zur Genotypisierung verwendet. Anschließend wurden je 20 Wurzeln der homozygoten *coi1-1 x sid2-2** bzw. *sid2-2** vereint und RNA extrahiert.

Der Vergleich der Expressionsstärke von *coi1-1 x sid2-2* gegenüber *sid2-2* zeigt, dass die erhöhte Expression der *Phosphoglyceratmutase* und der *CRK15* in *coi1* auch in Abwesenheit von SA zu beobachten ist, d.h. nicht auf eine Hyperstimulation des SA-Weges zurückzuführen ist. Anders verhält es sich für das *Germin2*. Für dieses Gen ist nur noch ein schwacher Einfluss des *coi1-1*-Allels im *sid2-2*-Hintergrund zu beobachten. Die analysierten Expression in den Kontrollproben Col-*gl1*, *aos* und *coi1-16* belegt, dass auch in diesem Experiment die JA-Ile-unabhängige COI1-Funktion detektierbar ist.

Aufgrund der Expressionsanalysen des SA-Biosynthese Gens *ICS1* wird gezeigt, dass es sich bei *sid2-2*, *coi1-1 x sid2-2** und *sid2-2** tatsächlich um SA-defiziente Mutanten handelt (Abbildung 3.16). Im Gegensatz zur zuvor beobachteten Induktion von *ICS1* in der *coi1-t*-Mutante (Abbildung 3.11), ist hier keine signifikante Steigerung der Genexpression vom Wildtypen zur *coi1-16* erkennbar. Da es sich bei der *coi1-16*-Mutante um eine temperatursensitive Mutante mit einer einzelnen Punktmutation handelt, ist hier eventuell noch Restaktivität des Proteins vorhanden, so dass die Repression auf den SA-Weg bestehen bleibt.

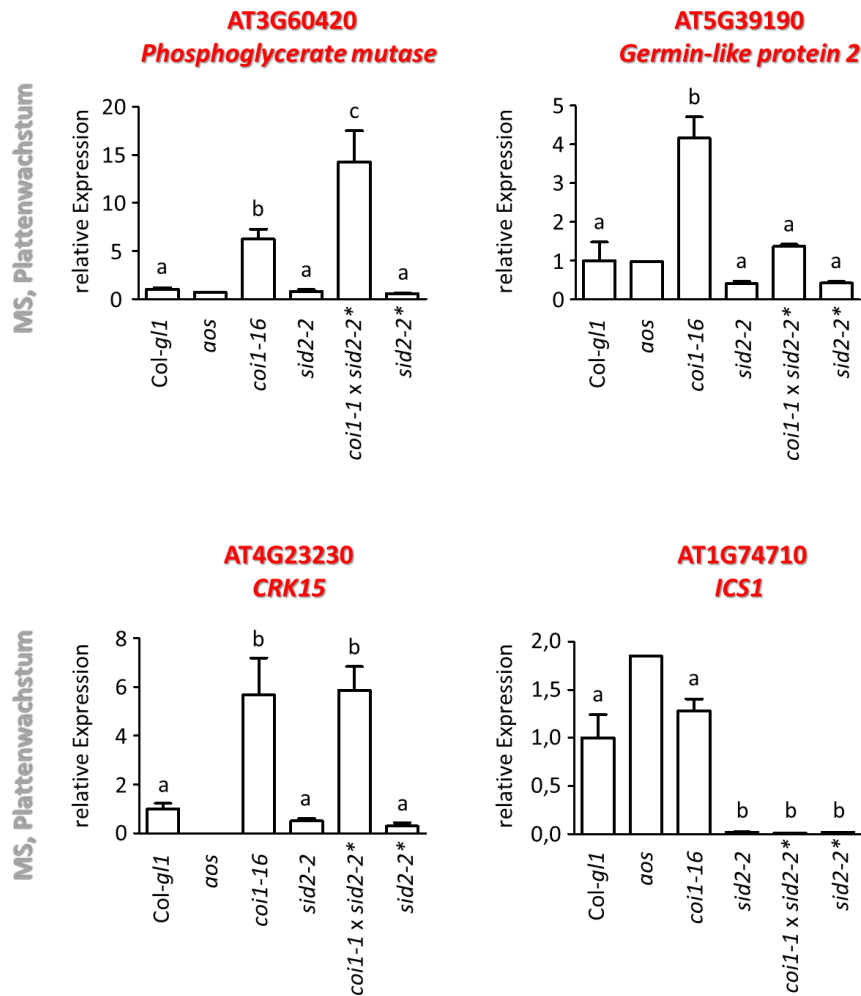


Abbildung 3.16 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von Col-g/1, aos und coi1-16, sid2-2, coi1-1 x sid2-2* und sid2-2*

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 5 (Col-g/1, coi1-16, sid2-2) bzw. 3 (coi1-1 x sid2-2*, sid2-2*) bzw. 1 (aos) Replikate (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikate. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Relative Transkriptmengen von Col-g/1 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (one way ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test). * markiert die beiden Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind.

3.3.2 Jasmonsäure hat in sterilen Wurzeln keinen Einfluss auf die Expression der Markergene Phosphoglyceratmutase, Germin 2 und CRK15

Der Einfluss von JA-Ile auf die COI1-abhängige Regulation der drei Markergene wurde durch Genexpressionsanalysen in MeJA-behandelten Wurzeln von Col-0 in unabhängigen Experimenten und unter verschiedenen Anzuchtbedingungen analysiert.

Zunächst wurde die Genexpression in Pflanzen analysiert, die für drei Wochen unter Kurztagbedingungen auf MS-Medium wuchsen und anschließend für zwei Stunden mock- und mit 50 μ M MeJA

behandelt wurden. Als Positivkontrolle für die Wirkung von JA in diesem Experiment, wurde die Expression von *JAZ10*, einem bekannten JA-responsiven Gen getestet. Unter diesen Bedingungen zeigt *JAZ10* eine dreifach induzierte Genexpression (Abbildung 3.17 (A)). Da in hydroponischen Kulturen, wenn Einzelpflanzen für 8 Wochen unter Kurztagbedingungen in großen hydroponischen Kulturen (Abbildung 3.17 (B)) oder viele Pflanzen einer homozygoten Linie für 20 Tage in kleinen hydroponischen Kulturen wachsen (Abbildung 3.17 (C)) und anschließend für zwei Stunden mock- und mit 10 μ M MeJA behandelt werden, die Expression von *JAZ10* um mehr als 200-fach bzw. 80-fach nach Hormonbehandlung induziert ist, wurde die Induktion auf MS-Medium als schwach eingestuft. Unter Bedingungen, die eine schwache Induktion von *JAZ10* bewirken, wurde in Wurzeln von Col-0 kein signifikanter Einfluss von MeJA auf die Genexpression der *Phosphoglyceratmutase*, des *Germin 2* und *CRK15* beobachtet (Abbildung 3.17 (A)). Ein erhöhter Einfluss von MeJA auf die *JAZ10* Expression geht mit zunehmender Repression der drei Markergene einher (Abbildung 3.17 (B) und (C)). In großen hydroponischen Kulturen, zeigen die drei Gene eine zwei- bis dreifache Reduktion der Expression nach Hormonbehandlung (Abbildung 3.17(B)). Im Gegensatz zur 200-fachen Induktion der *JAZ10*-Expression unter diesen Bedingungen handelt es sich jedoch eher um einen geringen Einfluss von JA auf die Transkriptmenge der *Phosphoglyceratmutase*, des *Germin 2* und *CRK15*. Ungewöhnlich war die beobachtete Induktion der *Phosphoglyceratmutase*-Expression in einem der unabhängigen Experimente, durchgeführt in kleinen hydroponischen Kulturen (Abbildung 3.17 (C)).

Zusammenfassend würde man den Einfluss von JA auf die Expression der *Phosphoglyceratmutase*, dem *Germin 2* und *CRK15* als gering einstufen. Erst wenn JA unter gewählten Bedingungen einen hohen Einfluss auf die Genexpression JA-responsiver Gene zeigt, ist es schwach in die Regulation der drei Markergene involviert.

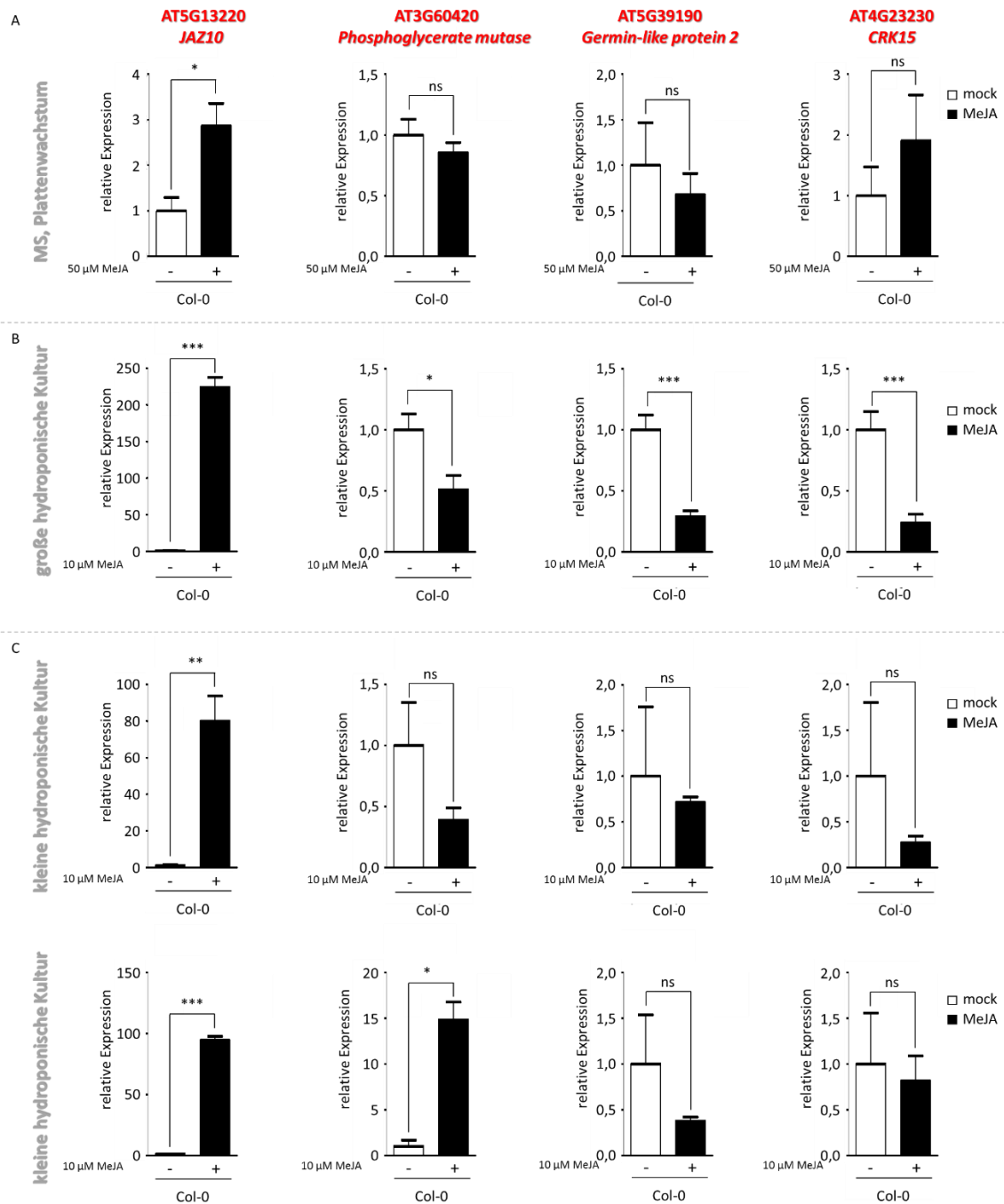


Abbildung 3.17 Quantitative RT-PCR in Wurzeln von Col-0 nach mock- und MeJA-Behandlung

(A) Genexpressionsanalysen in Col-0-Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen und zweistündiger mock- und 50 μ M MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat. **(B)** Genexpressionsanalyse in Col-0-Wurzeln von 8 Wochen alten, in großen hydroponischen Kulturen angezogener Pflanzen und zweistündiger mock- und 10 μ M MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 1 Wurzel / Replikat. **(C)** Genexpressionsanalysen in Col-0-Wurzeln von 20 Tage alten, in kleinen hydroponischen Kulturen angezogener Pflanzen und zweistündiger mock- und 10 μ M MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Replikaten (\pm SEM).

Die relativen Transkriptmengen wurden jeweils gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-behandelten Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. * zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 (*unpaired two-tailed Student t-test*) zwischen mock- und MeJA-behandelten Proben an.

3.3.3 Die Expression der Markergene wird unabhängig von MYC2,3,4 reguliert

Im klassischen, beschriebenen Signalweg von JA agiert COI1 als Rezeptor für JA-Ile (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010) und veranlasst die Degradierung der *downstream* agierenden JAZ-Repressor-Proteine (Chini et al., 2007), was zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie MYC2, MYC3 und MYC4 führt (Fernández-Calvo et al., 2011).

Im Folgenden wurde getestet, ob die reprimierende Funktion des COI1-Proteins auf die drei Markergene die bekannten Komponenten der JA-Signaltransduktion benötigt. Da COI1 und MYC2, MYC3 und MYC4 Aktivatoren des JA-Weges sind, haben sie in vielen Funktionen den gleichen Phänotypen: so sind JA-abhängige Gene in *coi1*- und der *myc2,3,4*-Mutante weniger stark exprimiert (Fernández-Calvo et al., 2011). Sollte diese Verknüpfung ebenfalls für die Regulation der drei Markergene, der *Phosphoglyceratmutase*, dem *Germin 2* und *CRK15* bestehen, so wäre eine erhöhte Expression dieser in der *myc2,3,4* zu erwarten.

Von drei Wochen alten Pflanzen der Genotypen Col-0, *aos*, *coi1-16* und *myc2,3,4* wurden nach mock-Behandlung auf 1 %iger Wasser-Agarose für 5 bzw. 4 Replikate bei *myc2,3,4* jeweils 30 Wurzeln geerntet, vereint und zur RNA-Extraktion verwendet. Mit quantitativer RT-PCR wurde zunächst die Expression der drei Markergene getestet (Abbildung 3.18). Für die *Phosphoglyceratmutase* sowie das *Germin 2* ist eine signifikante Induktion im Wurzelmaterial der *coi1-16*-Mutante, verglichen mit Col-0, *aos* und *myc2,3,4* erkennbar. *CRK15* zeigt dahingehend nur tendenziell eine erhöhte Expression in der *coi1-16*-Mutante. Die Genexpression der *Phosphoglyceratmutase*, dem *CRK15* und *Germin 2* in Wurzelmaterial der *myc2,3,4*-Mutante unterscheidet sich nicht von der Expression in Col-0 und der *aos*-Mutante.

Die Genexpression von *JAZ10* zeigt eine signifikant erhöhte Expression im Wildtypen gegenüber der Transkriptmenge in der *aos*-, *coi1-16*- und *myc2,3,4*-Mutante. Hier scheinen basale JA-Mengen durch eine basale Aktivierung des JA-Weges für Transkriptionsaktivierung in Wurzeln zu sorgen.

Im Vergleich zum WT konnte im Gegensatz zu vorher (Abbildung 3.11) keine erhöhte Expression von *ICS1* in der *coi1-16*-Mutante festgestellt werden. Des Weiteren konnte keine signifikant erhöhte Genexpression von *ICS1* in der *myc2,3,4*-Mutante gegenüber Col-0 und *aos* beobachtet werden.

Transkriptanalysen in der *myc2,3,4*-Mutante zeigen, dass die Expression der drei Markergene, der *Phosphoglyceratmutase*, dem *Germin 2* und *CRK15* in Wurzeln unabhängig von MYC2,3,4 über COI1 reguliert wird.

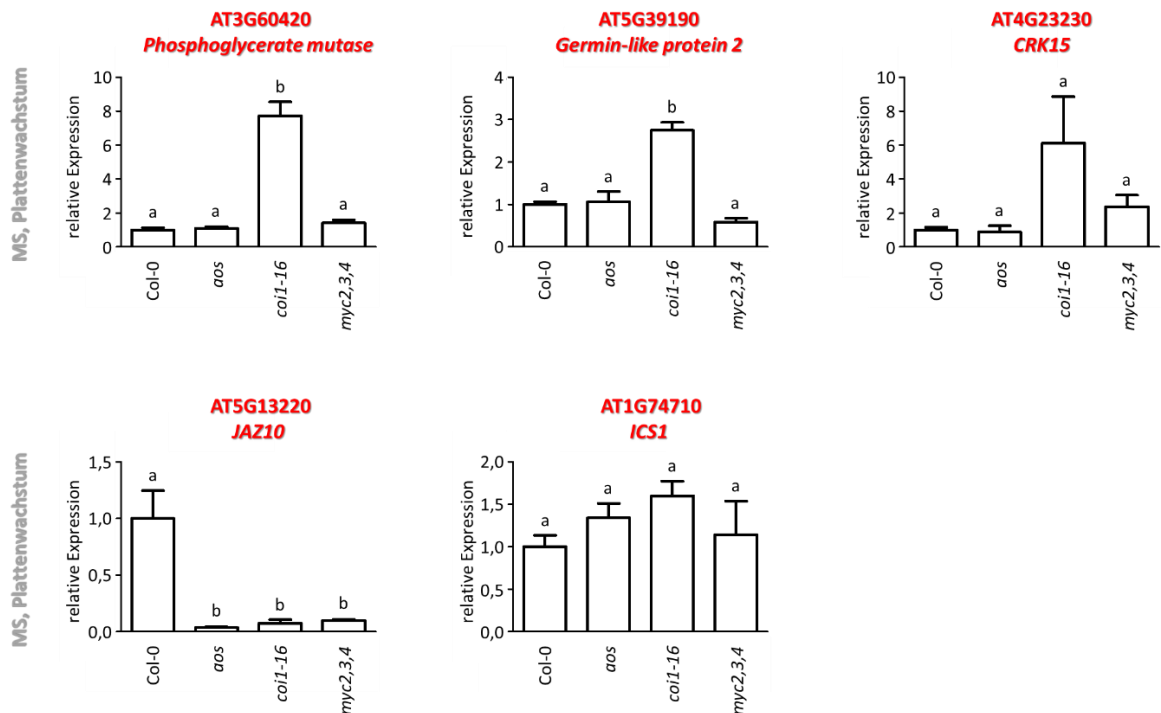


Abbildung 3.18 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von Col-0, *aos*, *coi1-16* und *myc2,3,4*

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 5 (Col-0, *aos*, *coi1-16*) bzw. 4 (*myc2,3,4*) Replikaten (\pm SEM) mit 30 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von UBQ5 normalisiert. Die relative Transkriptmenge von Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test).

3.3.4 Die Expression der *Phosphoglyceratmutase* wird unabhängig von NINJA reguliert

Eine weitere Rolle im JA-Signalweg, *downstream* von COI1, spielen *NOVEL INTERACTOR OF JAZ-* (NINJA) Proteine, die zusammen mit JAZ-Proteinen und TOPLESS Teile des Repressorkomplexes sind und den JA-Signalweg negativ regulieren. Für die *ninja*-Mutante wurde in Wurzeln beobachtet, dass der JA-Weg konstitutiv aktiviert ist (Acosta et al., 2013). Sollte sich diese konstitutive Aktivierung des JA-Wegs auf die neue COI1-Funktion auswirken, so sollte die Expression der drei Markergene in der *ninja*-Mutante reduziert sein. Um diesen Effekt besser auflösen zu können, wurde neben der *ninja*-Mutante auch die *coi1-1 x ninja*-Doppelmutante eingesetzt.

Zur Genexpressionsanalyse der Markergene in Abhängigkeit von NINJA wurde mit zwei heterozygoten Linien gearbeitet, der *coi1-1* und *coi1-1 x ninja*. Diese wuchsen ebenfalls für drei Wochen auf MS-Medium und wurden auf Wasser-Agarose mock infiziert. Sprossmaterial wurde zur Genotypisierung verwendet und die Wurzeln der segregierenden homozygoten Linien Col-*g1*** und *coi1-1*** bzw. *ninja** und *coi1-1 x ninja** vereint und zur RNA-Extraktion verwendet.

Wie schon zuvor, konnten die erhöhten Transkriptmengen der drei Markergene in der *coi1*-Mutante gezeigt werden (Abbildung 3.19). Die Menge der *Phosphoglyceratmutase* wird durch das *ninja*-Allel nur wenig reduziert, während das *Germin 2* und *CRK15* deutlich geringere Expression in der *coi1-1 x ninja*-Mutante aufweisen.

Diese Daten zeigen, dass zumindest die Regulation der *Phosphoglyceratmutase* durch die JA-Ile unabhängige COI1-Funktion nicht durch NINJA beeinflusst wird, während das NINJA-Protein partiell an der erhöhten Expression des *Germin 2* und *CRK15* in der *coi1*-Mutante beteiligt zu sein scheint.

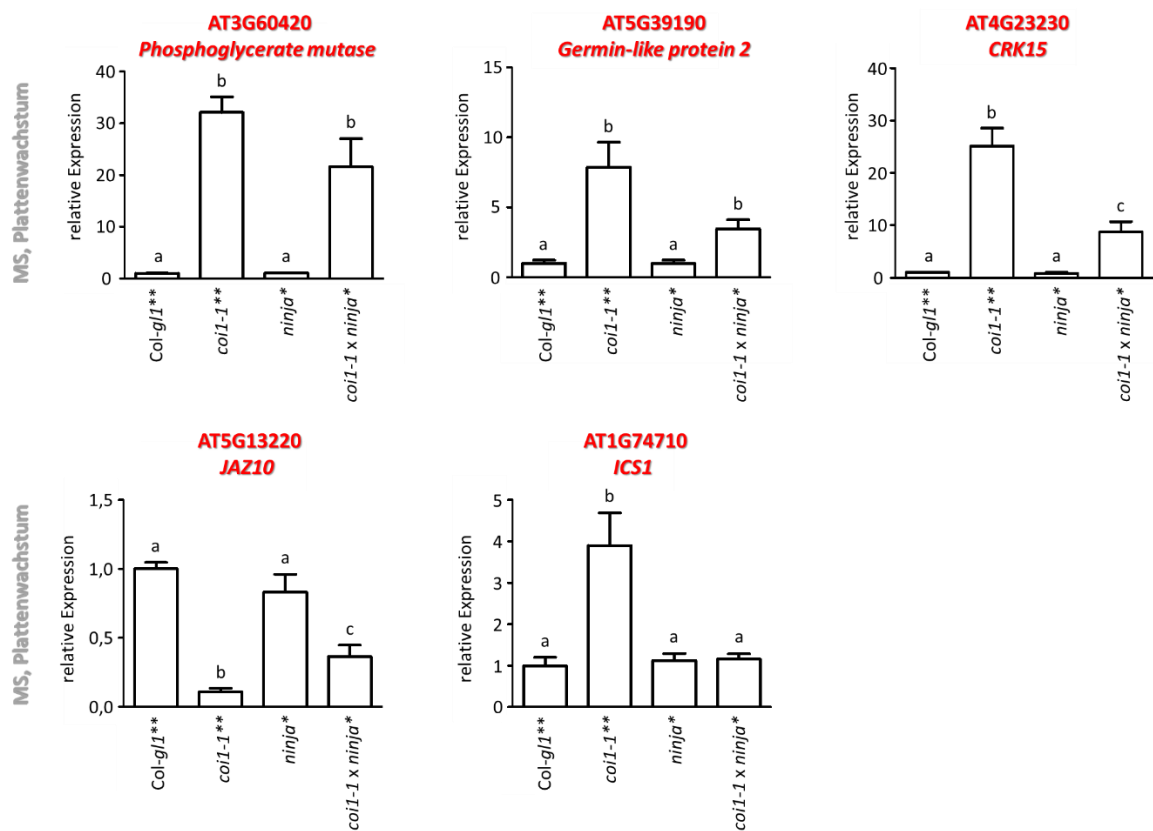


Abbildung 3.19 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von *Col-g/1*, *coi1-1*, *ninja* und *coi1-1 x ninja*.

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 Replikaten (\pm SEM). Die Replikate von *Col-g/1*, *coi1-1* und *coi1-1 x ninja* bestehen aus 23 vereinten Wurzeln, die Replikate von *ninja* aus 32 Wurzeln. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von *Col-g/1* wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*unpaired two-tailed Student t-test*). ** als auch * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzentypen hervorgegangen sind.

JAZ10 zeigt im WT gegenüber *coi1-1* erhöhte Expression (Abbildung 3.19). Ähnliche Genexpression wie der WT zeigt die *ninja*-Mutante. Dies lässt darauf schließen, dass NINJA unter unseren Bedingungen in Anwesenheit von COI1 keinen Einfluss auf die Genexpression von *JAZ10* nimmt und widerspricht damit veröffentlichten Ergebnissen (Acosta et al., 2013), die beschreiben, dass die *ninja*-Mutante gegenüber dem WT etwa 25-fach erhöhte *JAZ10*-Expression in Wurzeln aufweist. Die *JAZ10*-Expression ist im Vergleich zu *ninja* in der Doppelmutante *coi1-1 x ninja* partiell reduziert, im Vergleich zur *coi1-1*-Mutante jedoch erhöht. Dies bedeutet, dass NINJA in Abwesenheit von COI1 einen Einfluss hat zur Repression von *JAZ10* beizutragen.

Die hier untersuchte *coi1-1* Mutante, in der ein einzelner Basenaustausch zum Proteinabbruch führt, zeigt im Gegensatz zur zuvor analysierten *coi1-16*-Mutante signifikant erhöhte *ICS1*-Expression. Diese erhöhte Expression kann durch die Mutation in NINJA reduziert werden, allerdings ist die Expression im WT nicht unterdrückt. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die erhöhte Expression von *ICS1* in *coi1-1* auf die Repression von negativen Regulatoren durch NINJA zurückzuführen ist. Dies weist auf einen klaren Unterschied in der Regulation der *Phosphoglyceratmutase* gegenüber *ICS1* hin.

3.3.5 Der Einfluss von JAZ-Proteinen auf die Expression der Markergene bleibt weiterhin unbeantwortet

Bisherige Versuche haben gezeigt, dass die neue COI1-Funktion unabhängig von JA-Ile, MYC2,3,4 und zumindest bezüglich der *Phosphoglyceratmutase* unabhängig von NINJA agiert. Proteine, die im klassischen JA-Signalweg ebenfalls *downstream* von COI1 agieren, sind JAZ-Repressor-Proteine. Im Genom von *A. thaliana* sind 13 Mitglieder der JAZ-Familie kodiert (Dr. Gregg Howe, persönliche Kommunikation). Der *knock-out* von einzelnen Mitgliedern der Familie führt nur zu einer leichten Hypersensitivität der JA-Antwort (Thines et al., 2007). Die reprimierende Funktion von JAZ-Repressoren im Rahmen der JA-Signaltransduktion wurde durch die ektopische Expression eines mutierten JAZ1-Proteins mit einer deletierten JAS-Domäne gezeigt (*JAZ1Δ3*). Diese dominante Mutation stabilisiert das Protein und inhibiert die JA-Antwort. Pflanzen, die *JAZ1Δ3-GUS* unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus exprimieren, zeigen keine JA-angefasste Inhibierung des Wurzelwachstums und sind steril (Thines et al., 2007). Eine Vermehrung der Linien kann nur durch Bestäubung mit WT-Pollen erfolgen. Anschließend erfolgt die Analyse der Nachkommen in der F2-Generation entweder ohne Genotypisierung (75 % der Nachkommen tragen das dominant-negative Transgen), oder nach dem Nachweis der GUS-Expression in individuellen Nachkommen.

Um zu testen, ob die JAZ-Proteine Einfluss auf die neue COI1-Funktion nehmen, wurde die Genexpression der drei Markergene in der dominant-negativen *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie analysiert. Aufgrund

der stabilisierten Repressorproteine in dieser Mutante, erwartet man einen *coi1*-ähnlichen Phänotyp und somit eine erhöhte Expression der drei Markergene.

Auch in dieser transgenen Linie erfolgten die Transkriptomanalysen zunächst in Wurzelmaterial von steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen nach MeJA-Induktion. Doch erneut zeigte *JAZ10* nach Hormonbehandlung keine gute Induktion im Wildtypen (Abbildung 3.20). Der segregierende Wildtyp (Col-0*) der heterozygoten *35S:JAZ1Δ3*-Linie zeigt die gleiche Transkriptmenge nach MeJA, wie der unbehandelte Kontroll-WT. Man erkennt, dass die *JAZ10*-Expression COI1-abhängig ist, allerdings nicht durch *JAZ1Δ3* beeinflusst wird.

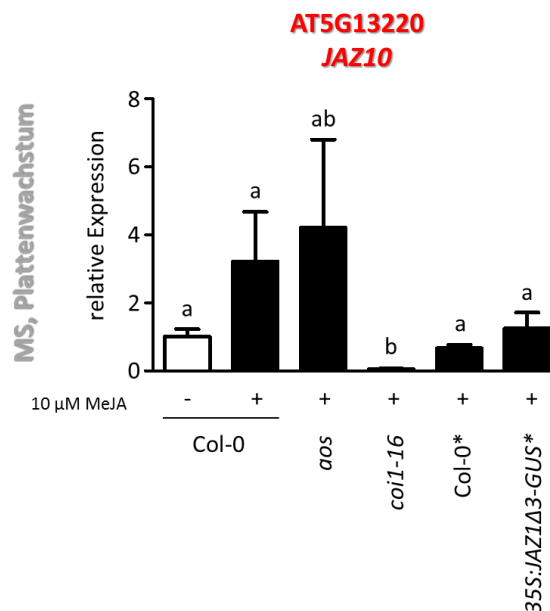


Abbildung 3.20 Quantitative RT-PCR-Analysen in Wurzeln von Col-0, *aos*, *coi1-16* sowie *35S:JAZ1Δ3* und dem segregierenden WT nach MeJA-Behandlung

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen und zweistündiger mock- und 10 μM MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (± SEM) mit 20 Wurzeln bzw. 40 Wurzeln (*35S:JAZ1Δ3-GUS*) / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock behandelten Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*unpaired two-tailed Student t-test*). * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind.

Aufgrund der schwachen Wirkung von MeJA auf die Expression von *JAZ10* in sterilen Wurzeln, wurde im Folgenden ein System verwendet, in der die MeJA-Induktion erfolgreich verläuft und das erlaubt, Einzelpflanzen der heterozygoten Linie zu untersuchen. Hydroponische Kulturen, mit einem Fassungsvermögen von 12 L Medium, ermöglichen es, Einzelpflanzen zur Charakterisierung sowie mit

ausreichender Biomasse zur RNA-Präparation heranwachsen zu lassen (Abbildung 3.21 (A)). In diesem System wuchsen die Pflanzen acht Wochen unter Kurztagbedingungen. Ein Blatt wurde in diesem Zeitraum zur Genotypisierung mittels GUS-Färbung verwendet, bevor es zur Behandlung der Wurzeln mit und ohne 10 μM MeJA für zwei Stunden kam. Wurzel-RNA der Einzelpflanzen wurde für Gen- und GUS-Expressionsanalysen verwendet.

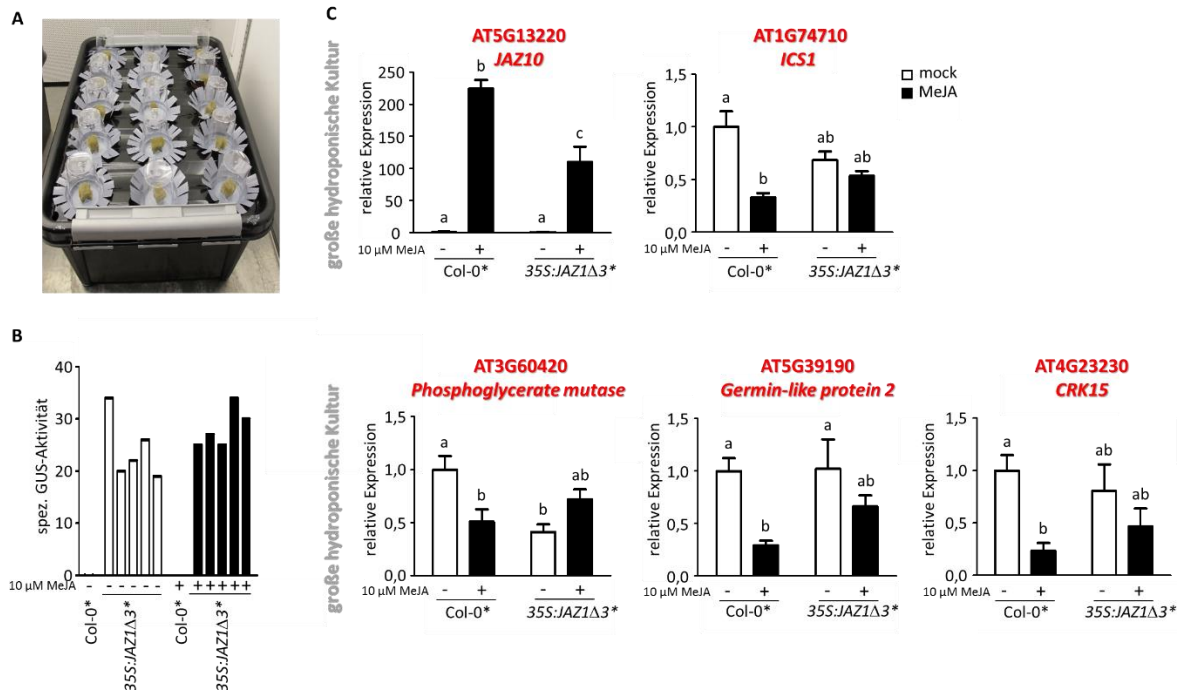


Abbildung 3.21 Quantitative RT-PCR-Analysen in Wurzeln von *Col-0** und *35S:JAZ1Δ3-GUS**, gewachsen in hydroponischen Kulturen nach mock- und MeJA-Behandlung

(A) Aufbau einer großen hydroponischen Kultur. (B) *MUG*-Assay in Wurzeln von 8 Wochen alten, in großen hydroponischen Kulturen angezogener Pflanzen von *Col-0** und *35S:JAZ1Δ3-GUS**-Mutanten und zweistündiger mock- und 10 μM MeJA-Behandlung. (C) Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 8 Wochen alten, in großen hydroponischen Kulturen angezogener Pflanzen von *Col-0** und *35S:JAZ1Δ3-GUS**-Mutanten und zweistündiger mock- und 10 μM MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 5 (*35S:JAZ1Δ3-GUS**) bzw. 12 (*Col-0**) Replikaten (\pm SEM) mit 1 Wurzel / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Relative Transkriptmenge des mock behandelten *Col-0** wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p -Wert $< 0,05$ (*one way* ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test). * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind. (Teile der Abbildung sind bereits in Abbildung 3.17 gezeigt worden.)

Analysen der GUS-Aktivität verschiedener Einzelpflanzen zeigen kaum Schwankungen innerhalb der Linie und werden nicht durch MeJA beeinflusst (Abbildung 3.21 (B)).

Unter den hier verwendeten Bedingungen zeigt *JAZ10* die zuvor gezeigte 200-fache Induktion der Expression nach MeJA-Behandlung in Wurzeln von *Col-0* (Abbildung 3.21; vgl. Abbildung 3.17).

MeJA-induzierte Expression von *JAZ10* kann allerdings ebenfalls in transgenen *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linien beobachtet werden, und wird nur in geringem Maße durch *JAZ1Δ3-GUS* gestört. Offensichtlich reicht der dominant-negative Effekt des *JAZ1Δ3-GUS*-Proteins nicht aus, um genügend JAZ-Proteine zu stabilisieren, die mit der Induktion von *JAZ10* interferieren könnten, obwohl das Wurzelwachstum deutlich weniger durch JA gehemmt werden kann (Abbildung 3.23).

Die Expression der *Phosphoglyceratmutase*, des *Germin 2* und der *CRK15* wird nach MeJA-Behandlung um den Faktor 2 - 3 in Wurzeln des Col-0 reprimiert. Auch die Expression von *ICS1* folgt diesem Muster. Im Gegensatz zur 200-fachen Induktion von *JAZ10* ist der reprimierende Einfluss von MeJA als schwach einzustufen. Die Expression dieser Gene ist in der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie tendentiell ebenfalls reduziert, d.h. stabilisierte JAZ-Proteine reprimieren das Gen in geringem Maße. Dieser Effekt ist konträr zu der Wirkung von *coi1*, in der ebenfalls stabilisierte JAZ-Proteine vorliegen sollten, so dass JA keine Wirkung mehr haben kann. Nach Behandlung mit MeJA erfolgt keine signifikant veränderte Genexpression. Es scheint, als ob die stabilisierten JAZ-Proteine den leicht reprimierenden Effekt von JA auf die Markergene verhindern würden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Expression der drei Markergene in der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Pflanze nicht erhöht ist, was bedeuten würde, dass die erhöhte Expression in der *coi1*-Pflanze nicht darauf zurückzuführen ist, dass JAZ-Proteine akkumulieren. Allerdings kann die Unabhängigkeit der neuen COI1-Funktion von JAZ-Proteinen aufgrund der ebenfalls schwachen Wirkung des *JAZ1Δ3-GUS*-Konstrukts auf die *JAZ10*-Expression nicht geklärt werden.

3.4 Expressionsanalysen der drei Markergene in Abhängigkeit von stabilisierten JAZ-Repressorproteinen unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors

Mit der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Mutante konnte gezeigt werden, dass sich das Wurzelwachstum nach Behandlung mit MeJA beeinflussen lässt (Thines et al., 2007), nicht aber die Expression von *JAZ10* (Abbildung 3.21 (C)). Die Deletion der Jas-Domäne im JAZ1-Protein führt anscheinend nicht zur Stabilisierung aller JAZ-Proteine, die an der Expression MeJA-induzierten Expression von *JAZ10* in Wurzeln beteiligt sind. Trotz der fehlenden Hyperinduktion der drei Markergene, der *Phosphoglyceratmutase*, dem *Germin 2* und *CRK15* kann nicht entschieden werden, ob die neue COI1-Funktion unabhängig von JAZ ist, da es sich bei *35S:JAZ1Δ3-GUS* um keine absolut dominant-negative Mutante handelt.

Da durch Propfungsexperimente gezeigt werden konnte, dass die neue Funktion von COI1 in der Wurzel aktiv ist (Ralhan et al., 2012), sollte analysiert werden, ob eine wurzelspezifische Expression

des JAZ1Δ3-Konstrukts einen dominant-negativen Wurzelphänotyp hervorbringt, und somit die Rolle der JAZ-Proteine in der neuen COI1-Funktion beantwortet werden kann.

3.4.1 Charakterisierung der transgenen Linien, die JAZ1Δ3 wurzelspezifisch exprimieren

In Anlehnung an die beschriebene dominant-negative *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie, in der das Konstrukt unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus exprimiert wird (Thines et al., 2007), wurde in dieser Arbeit *JAZ1Δ3-GUS* aus der Überexpressionslinie amplifiziert und unter die Kontrolle des wurzelspezifischen PYK10-Promotors gebracht (Nitz et al., 2001). Durch Transformation des Konstrukts in Col-0 entstanden stabil transformierte Linien, die in der dritten Generation homozygot vorlagen.

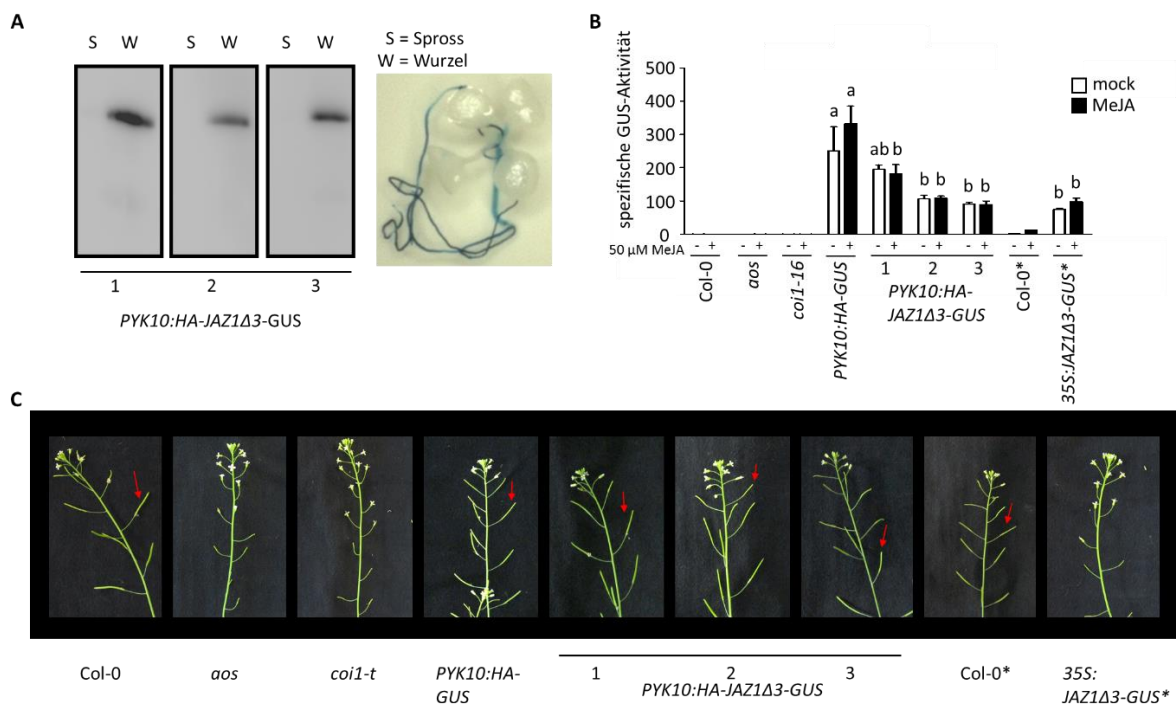


Abbildung 3.22 Charakterisierung hergestellter JAZ1Δ3-Mutanten unter der Kontrolle des wurzelspezifischen Promotors PYK10 im Vergleich zu *35S:JAZ1Δ3-GUS*

(A) Western-Blot-Analysen dreier unabhängiger *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS* Linien, sowie ein GUS-gefärbter Keimling zur Visualisierung der Wurzelpezifität des PYK10-Promotors. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper. **(B)** *MUG*-Assay von JAZ1Δ3-Mutanten und ihren Kontrollen in Wurzeln von 14 Tage alten, auf MS-Medium +/- 50 μM MeJA angezogener Pflanzen. Gezeigt sind Mittelwerte von einem Replikat (Col-0, *aos*, *coi1-16* und Col-0*) bzw. 3 Replikaten für die anderen Genotypen (± SEM). Die Replikate von Col-0* und *35S:JAZ1Δ3-GUS** bestehen aus 39 vereinten Wurzeln, alle weiteren Replikate bestehen aus 20 vereinten Wurzeln. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way* ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test). **(C)** Wachstumsanalysen der verschiedenen Linien und Ihrer Kontrollen zum Test der Fertilität unter Langtagbedingungen. (Rote Pfeile markieren reife Schoten.) * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind.

Western-Blot-Analysen zeigen, dass der PYK10-Promotor tatsächlich nur in Wurzeln exprimiert. Keine Expression konnte im Spross von drei unabhängigen transgenen Linien detektiert werden (Abbildung 3.22 (A)). Dieses Ergebnis wurde durch die GUS-Färbung eines *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Keimlings bestätigt. Die quantitative Bestimmung der GUS-Reportergenaktivität wurde mittels eines *MUG-Assays* durchgeführt (Abbildung 3.22 (B)). Drei Replikate mit je 20 (*PYK10:HA-GUS* und 3 x *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*) bzw. 39 vereinten Wurzeln von *35S:JAZ1Δ3-GUS* zeigten, dass die Expression nicht durch MeJA beeinflusst wird. Die Expressionshöhe in Wurzeln der *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Linien ist vergleichbar mit der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie. Die Wildtypen, *aos*- und *coi1-16*-Mutanten zeigten wie erwartet keine GUS-Aktivität und dienten als Negativkontrollen des Versuches. Der Leervektor (*PYK10:HA-GUS*) diente als Positivkontrolle. Wie erwartet, beeinflusst die wurzelspezifische Expression von *JAZ1Δ3-GUS* die Fertilität nicht, während die ektopische Expression von *JAZ1Δ3-GUS* unter der Kontrolle des 35S-Promotors zu männlich sterilen Blüten führt (Abbildung 3.22 (C); rote Pfeile markieren Schoten mit reifen Samen).

3.4.2 Steht JAZ1Δ3 unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors, bleibt die dominant-negative Wirkung aus

Es wurde gezeigt, dass die Expression von *JAZ1Δ3-GUS* unter der Kontrolle des 35S-Promotors die negative Wirkung von JA auf das Wurzelwachstum verhindert (Thines et al., 2007). Wachsen die Pflanzen für 14 Tage auf MS-Platten +/- 50 μM MeJA, konnte in dieser Arbeit für die *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie bestätigt werden, dass das Wurzelwachstum weniger stark durch JA beeinträchtigt wird, als das des WT. Allerdings fällt die JA-Insensitivität nicht so stark aus, wie in der *coi1-t*-Mutante (Abbildung 3.23). Die Reduktion der Wurzellänge der *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Linien entspricht der des Wildtypen, der *aos*-Mutante, der Leervektorkontrolle (*PYK10:HA-GUS*) und auch von Col-0*. Somit konnte für *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS* keine signifikante Resistenz gegenüber der MeJA-induzierten Wurzelwachstumshemmung verzeichnet werden, obwohl die Menge an *JAZ1Δ3-GUS* ähnlich unter beiden Promotoren war (vgl. Abbildung 3.22 (B)). Mikroskopische Untersuchungen zeigten zusätzlich keine differenzierte Lokalisation der Expression von *JAZ1Δ3-GUS* im Wurzelmaterial unter beiden Promotoren (Anhang Abbildung 6.2).

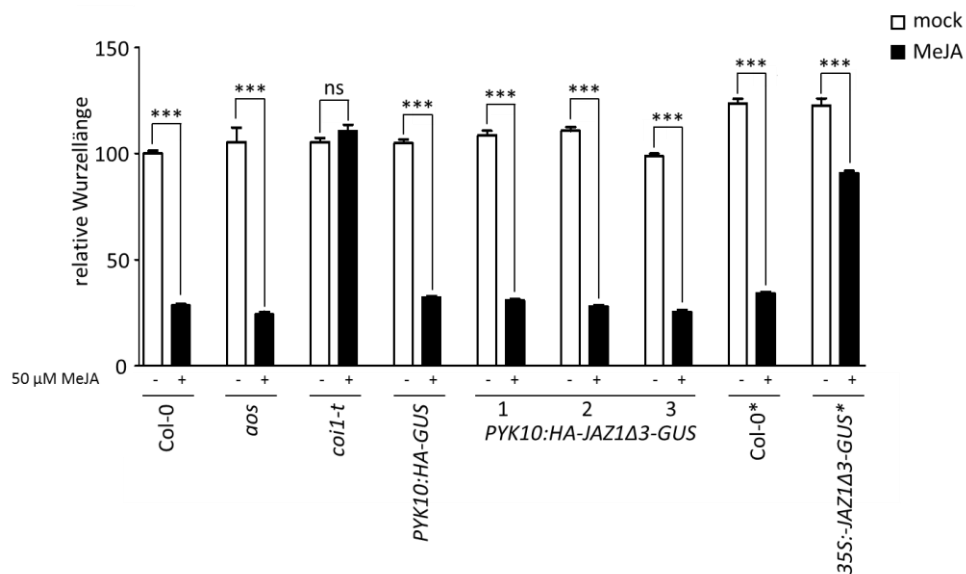


Abbildung 3.23 Wurzelwachstumstest der JAZ1Δ3-Mutanten auf MS-Medium +/- 50 μM MeJA

Wurzelwachstumstest der JAZ1Δ3-Mutanten und ihren Kontrollen von 14 Tage alten, auf MS-Medium +/- 50 μM MeJA angezogener Pflanzen. Gezeigt sind Mittelwerte von ca. 30 analysierten Wurzeln (\pm SEM). Die relative Wurzellänge von Col-0, gewachsen auf MS-Medium ohne MeJA wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und MeJA-behandelten Proben an. * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind.

3.4.3 Genexpressionsanalysen von Markergenen in JAZ1Δ3-Mutanten in Abhängigkeit von Jasmonsäure

Um zu testen ob die *PYK10:HA-JAZ1Δ3*-Mutanten andere typische JA-insensitive Phänotypen aufweisen, wurden Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von MeJA durchgeführt.

Da es sich bei den *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Mutanten um homozygote Linien handelt und eine Genotypisierung der Einzelpflanzen nicht nötig war, erfolgte die Induktion dieser Mutanten mit MeJA in kleinen hydroponischen Kulturen. Diese Systeme sind im Gegensatz zu den großen hydroponischen Kulturen aufgrund kürzerer Wachstumszeit der Pflanzen weniger zeitintensiv. In den kleinen hydroponischen Kulturen werden keine Einzelpflanzen angezogen, sondern viele Samen auf einem Sieb ausgelegt, für 20 Tage unter Kurztagbedingungen angezogen und für zwei Stunden mit 10 μM MeJA induziert.

Die Expression von *JAZ10* ist im Wildtyp nach MeJA 80-fach induziert (Abbildung 3.24, vgl. Abbildung 3.17) und zeigt wie erwartet Abhängigkeit von COI1. Auch in zwei unabhängigen Transformanten der *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Linien wird *JAZ10* genau wie in der Leervektorkontrolle (*PYK10:HA-GUS*) sig-

nifikant induziert. Die Expression von JAZ1Δ3-GUS unter der Kontrolle des wurzelspezifischen Promotors PYK10 hat genau wie *35S:JAZ1Δ3-GUS* (vgl. Abbildung 3.21) keinen Einfluss auf die Induktion von *JAZ10* nach MeJA-Behandlung. Dieses Ergebnis stellt das Konzept der universell dominant-negativen Wirkung eines stabilen JAZ-Repressors in Frage. Sollte eine Wirkung auf die Expression der *Phosphoglyceratmutase* und der beiden anderen Markergene ausfallen, so kann keine Schlussfolgerung zur Bedeutung der JAZ-Proteine gezogen werden. Da aber vorab nicht ausgeschlossen werden konnte, dass bezogen auf diese drei Gene der gleiche Phänotyp auftritt wie in der *coi1*-Mutante, wurden die Analysen mit diesen transgenen Pflanzen fortgesetzt.

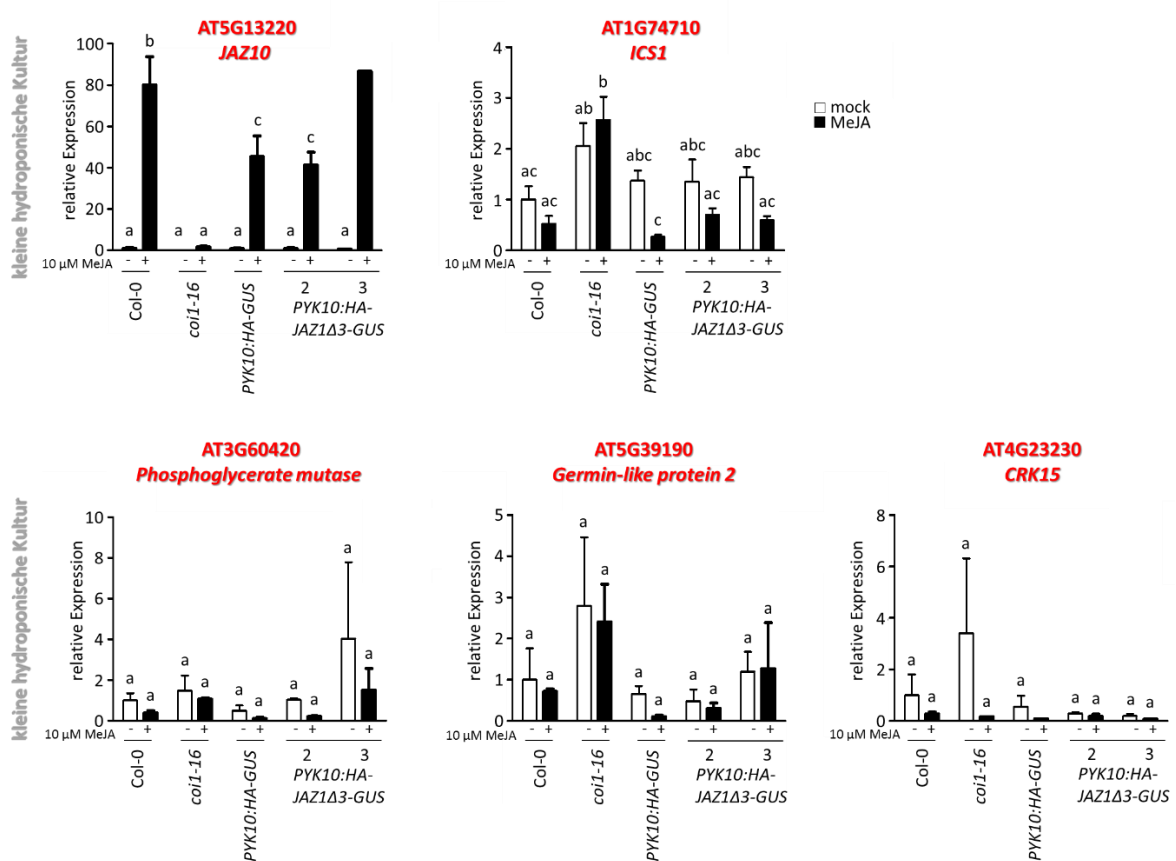


Abbildung 3.24 Quantitative RT-PCR-Analysen in Wurzeln von *PYK10:JAZ1Δ3-GUS*, gewachsen in hydroponischen Kulturen nach mock- und MeJA-Behandlung

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 20 Tage alten, in kleinen hydroponischen Kulturen angezogenen Pflanzen und zweistündiger mock- und 10 μM MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Replikaten (± SEM). Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-behandelten Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test). (Teile der Abbildung sind bereits in Abbildung 3.17 gezeigt worden.)

Bei der Analyse der Markergene für die JA-Ile unabhängige Expression zeigte sich, dass die Schwankungen bei einzelnen Proben sehr hoch waren und vor allem die Expression in *coi1-16* nicht erhöht war (Abbildung 3.24). Somit scheinen die Gene in diesem System nicht durch die JA-unabhängige COI1-Funktion reprimiert zu sein.

Die negative Wirkung von JA auf die Expression der *ICS1* lässt sich nachweisen und ist abhängig von COI1 (Abbildung 3.24). In der *coi1-16* ist erhöhte Expression zu beobachten. Dahingegen zeigt JAZ1Δ3-GUS keinen Einfluss auf die reprimierende Wirkung.

Aufgrund des ungewöhnlichen Expressionsmuster für die JA-Ile unabhängige Expression der *Phosphoglyceratmutase* und den anderen beiden Markergenen, wurde der Einfluss des *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Konstrukts auf diese Gene in Wurzelmaterial von Pflanzen analysiert, die auf MS-Medium wuchsen und mock-infiziert wurden. Da in diesem System die JA-Induktion schwach ist (vgl. Abbildung 3.20), wurde auf diese Behandlung verzichtet.

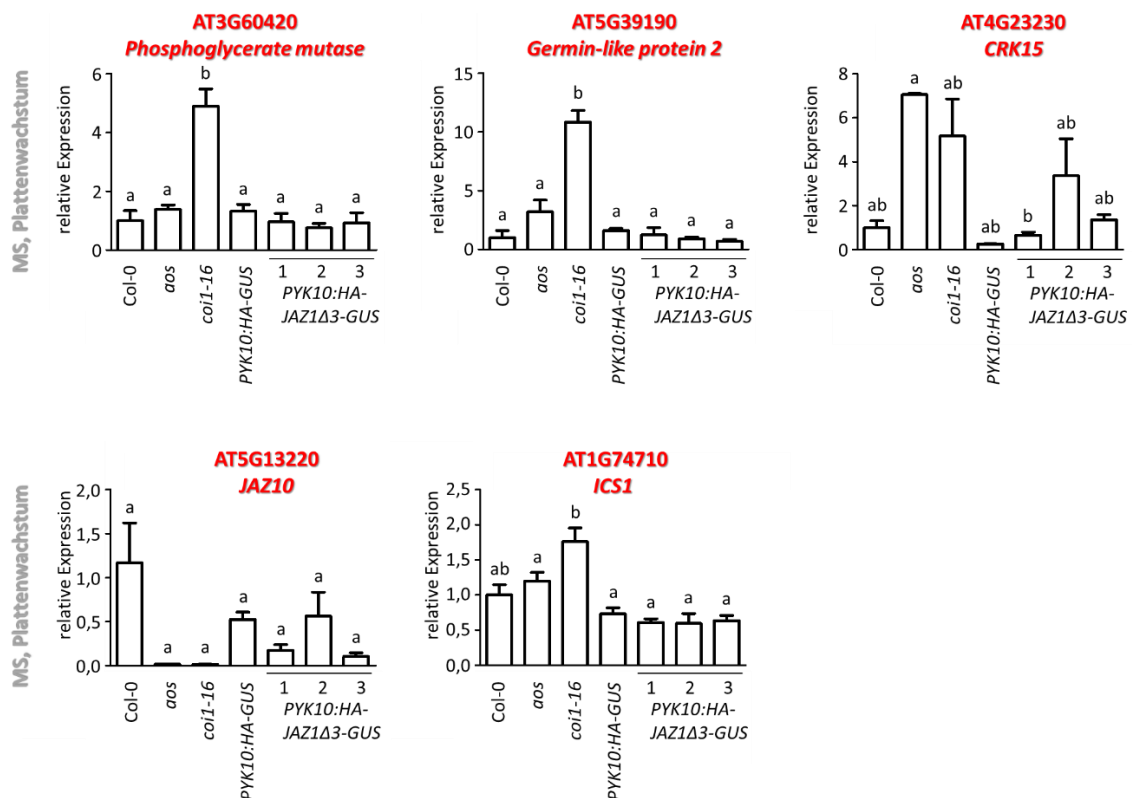


Abbildung 3.25 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von *PYK10:JAZ1Δ3-GUS*

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test).

Die reprimierte Expression der *Phosphoglyceratmutase*, des *Germin 2* und *CRK15* durch COI1 konnte erneut beobachtet werden. Die Expression zeigt dahingegen keinen Einfluss durch JAZ1Δ3-GUS. Die Expression der Markergene ist gegenüber der *coi1*-Mutante in drei unabhängigen *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Linien wie im WT und der Leervektorkontrolle (*PYK10:HA-GUS*) reprimiert.

Wie schon vorher beobachtet (Abbildung 3.18), ist die basale *JAZ10*-Transkription in der *coi1*- und *aos*-Mutante stark verringert, d.h. basale Degradierung von JAZ-Proteinen durch JA-Ile aktiviertes COI1 scheint für die Expression sehr wichtig zu sein. Sobald dieser Abbau der Proteine nicht mehr stattfindet, scheinen JAZ-Proteine die *JAZ10*-Expression zu hemmen. Vergleicht man die *PYK10:HA-GUS*-Linie mit den *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Pflanzen, so scheint der Effekt des dominant-negativen Konstrukts eher schwach zu sein (Abbildung 3.25). Die *ICS1* ist in der *coi1-16*-Mutante erneut nur tendenziell erhöht gegenüber dem Wildtyp und verhält sich in allen anderen analysierten Genotypen gleich.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass das JAZ1Δ3-GUS-Protein keinen Einfluss auf die JA-Ile-unabhängige, COI1-abhängige regulierte Expression der Markergene hat. Da es auf der anderen Seite auch nicht alle Funktionen des JA-abhängigen COI1-Proteins, die mit JAZ-Proteinen verknüpften sind inhibiert, kann mit diesem Konstrukt keine Aussage über die Beteiligung von JAZ-Proteinen an der hier untersuchten JA-Ile-unabhängigen Funktion von COI1 getroffen werden.

3.5 Analyse der Bedeutung der COI1-Ligandenbindestelle für die JA-unabhängige Funktion des Proteins

Bisher konnte für die Expression der *Phosphoglyceratmutase* gezeigt werden, dass COI1 auch in Abwesenheit von den bekannten Signaltransduktionskomponenten des JA-Wegs wie NINJA und MYC2,3,4 als Repressor wirken kann. Im Folgenden soll die Rolle der Ligandenbindestelle von COI1 analysiert werden. Im bisher beschriebenen Signalweg von Jasmonsäure, übernimmt COI1 die Funktion als Rezeptor für JA-Ile (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010) und reguliert *downstream* agierende Prozesse der JA-Antwort. Würde eine veränderte Bindestelle des COI1-Proteins keinen Einfluss auf die neue Funktion nehmen, so sollte ein JA-Ile unabhängig agierendes COI1-Protein ähnlich wie das wildtypische die Expression der Markergene reprimieren.

3.5.1 Mutierte COI1-Proteine interagieren weiterhin mit ASK2

Um die Rolle der Ligandenbindestelle von COI1 zu klären, wurden Pflanzen hergestellt, die ein COI1-Protein besitzen, das nicht mehr in der Lage ist, JA-Ile zu binden. Zur Herstellung der mutierten COI1-Proteine wurde die Paralogie von COI1 zu TIR1, dem Rezeptor für Auxin, verwendet (Dharmasiri et al., 2005). Mit zielgerichteter Mutagenese und anschließender Fusions-PCR wurden fünf COI1-Konstrukte erstellt. Bei vier der fünf Konstrukte wurde jeweils eine spezifische Kontaktstelle des TIR1 für Auxin in die entsprechende Stelle des COI1-Proteins eingeführt (Abbildung 3.26). Das COI1-98 Konstrukt wurde in Anlehnung an die *coi1-5*-Mutante erstellt, die als Mutante mit stabilem Protein, das nicht mehr in der Lage ist JA-Ile zu binden, beschrieben wurde (Yan et al., 2009). Diese Mutante weist einen einzelnen Nukleotidaustausch auf, der zum Austausch von Glycin in Aspartat an Stelle 98 im COI1-Protein führt.

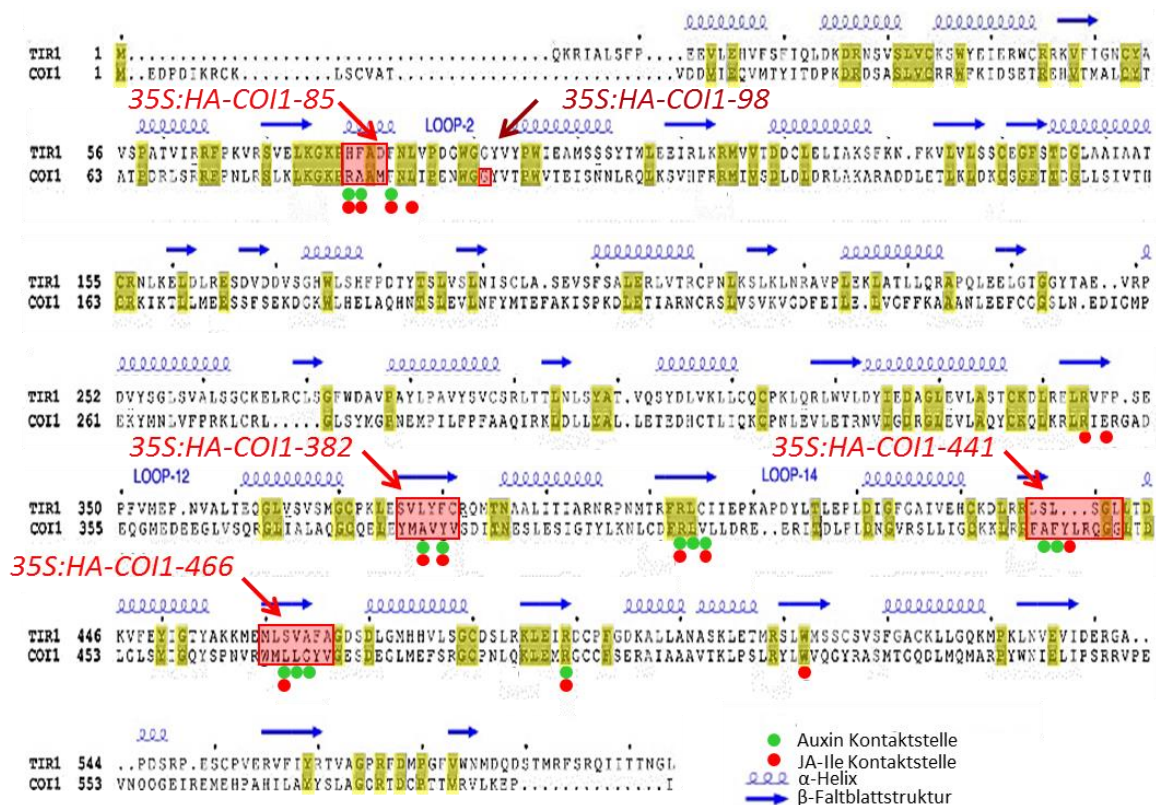


Abbildung 3.26 Alignment der COI1- und TIR1-Proteinsequenz aus *A. thaliana*

Dargestellt ist das Sequenzalignment der Paralogie TIR1 und COI1 aus *A. thaliana* mit annotierten Strukturelementen (α-Helices und β-Faltblattstrukturen) und Bindestellen für Auxin (grüne Punkte) bzw. JA-Ile (rote Punkte). Konservierte Aminosäuren sind gelb markiert. Rot markiert sind die ausgetauschten Regionen zur Herstellung von COI1-85, COI1-98, COI1-382, COI1-441 und COI1-466. Die Abbildung wurde modifiziert nach Tan et al. (2007).

Um zu testen, ob eingefügte Mutationen im COI1-Protein die Struktur und damit die Funktionalität der Proteine beeinflussen, wurde getestet, ob die mutierten COI1-Proteine noch in der Lage sind, die beschriebene Interaktion von COI1 und ASK2 (*Skp1-like protein*) (Devoto et al., 2002; Takahashi et al., 2004; Xu et al., 2002) einzugehen (Abbildung 3.27 (A)). Für den Nachweis wurde das Hefe-2-Hybrid-System verwendet. Zur Durchführung dieser Interaktionsstudien wurde der Hefestamm PJ69a mit Fusionsproteinen aus der GAL4 DNA-Bindedomäne und COI1 bzw. COI1-85, COI1-98, COI1-382, COI1-441 und COI1-466 und weiterhin mit dem Fusionsprotein aus der GAL4-Aktivierungsdomäne und ASK2 transformiert. Die Stärke der Interaktion wurde zunächst in einem oNPG-Test gemessen und die Expression der verschiedenen mutierten COI1-Proteine mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3.27 (B)).

COI1, COI1-85, COI1-98, COI1-382 und COI1-441 zeigen signifikant erhöhte β -Galactosidase-Aktivität gegenüber den getesteten Negativkontrollen (pDESTGBKT7 ohne ASK2) im oNPG-Test (Abbildung 3.27 (B)). Sie sind demnach fähig, mit ASK2 zu interagieren. COI1-466 zeigt im oNPG-Test keine Interaktion mit ASK2. In Western-Blot-Analysen fällt auf, dass die Proteine in Anwesenheit von ASK2 stärker exprimiert werden. Die zusätzlich durchgeführten Wachstumstests der transformierten Hefen auf Interaktionsmedium (SD-HALT) zeigen ebenfalls, dass die mutierten COI1-Proteine mit ASK2 interagieren. Auch Hefen mit COI1-466 und ASK2 zeigen Wachstum. Im Vergleich zu der Positivkontrolle ist das Wachstum der Hefen deutlich reduziert und konnte erst nach 4 Tagen bei 28°C und einer Woche bei RT festgestellt werden. Dies gilt ebenfalls für das Wachstum der Hefe, die mit ASK2 und dem wildtypischen COI1 transformiert wurde, dem Protein, für das die Interaktion bereits gezeigt wurde (Devoto et al., 2002; Takahashi et al., 2004; Xu et al., 2002). Da es sich bei dem Wachstumstest um den sensitiveren Test handelt, wurde die Interaktion aller fünf mutierten COI1-Konstrukte mit ASK2 in Hefen gezeigt.

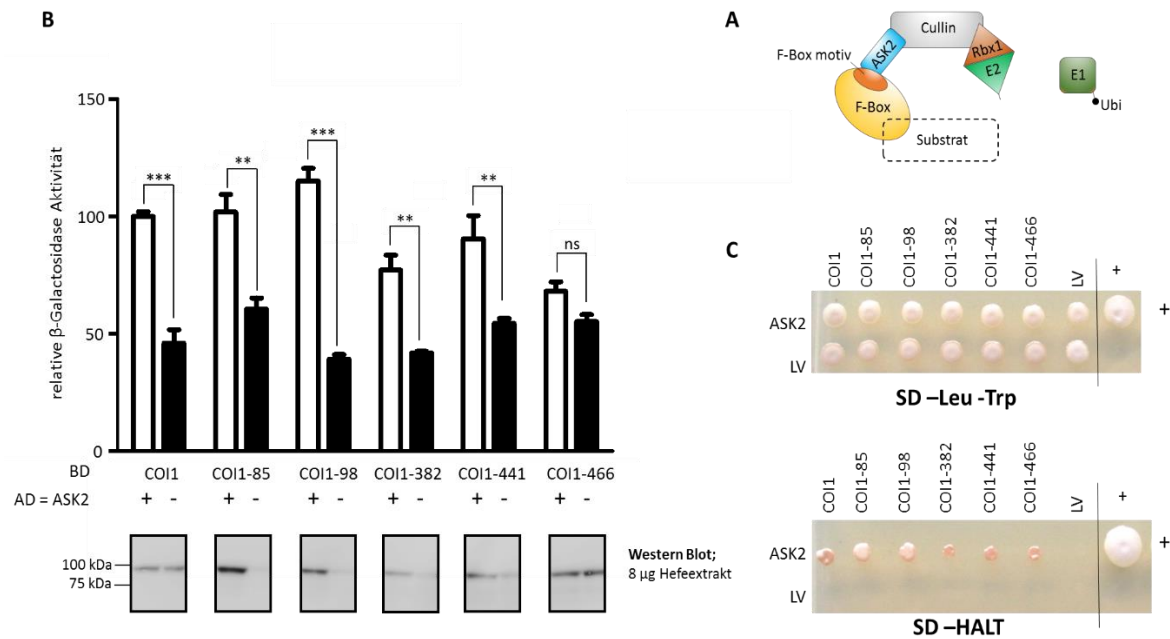


Abbildung 3.27 oNPG-Test und Hefewachstum auf SD-Platten zur Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktion von COI1-Mutanten und ASK2 im Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Transformation der Hefe erfolgte mit COI1, COI1-85, -98, -382, -441 und -466 im Plasmid pDESTGAD sowie ASK2 im Plasmid pDESTGBKT7 und entsprechende Leervektorkontrollen. **(A)** Schematisches Modell des SCF^{COI1} Komplex (verändert nach Yan et al., 2013). **(B)** Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Hefeklonen (\pm SEM) in An- und Abwesenheit von ASK2. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur). Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit einem gegen das *myc-tag* gerichteten Antikörper. **(C)** Wachstumstest der Protein-Protein-Interaktion auf SD-Medium und Interaktionsmedium (SD-HALT). Bei der Positivkontrolle handelt es sich um p53 (ein menschlicher Tumorsuppressor) und SV40 (das T-Antigen des Simian-Virus 40). Abkürzungen: BD (Bingedomäne), AD (Aktivierungsdomäne), H (Histidin), A (Adenin), L (Leucin), T (Tryptophan), LV (Leervektorkontrolle)

3.5.2 Mutierte COI1-Proteine können JA-Ile nicht mehr binden

Die Analyse der Bindungsfähigkeit von den mutierten COI1-Proteinen und JA-Ile fand mit einem indirekten Nachweis in einem Liganden-induzierten Hefe-Zwei-Hybrid-System statt. Da JA-Ile als Ligand die Bindung zwischen COI1 und JAZ-Proteinen bewirkt (Thines et al., 2007), wurde die Protein-Protein-Interaktion von mutierten COI1-Proteinen mit JAZ9 in Anwesenheit von Coronatin durchgeführt, dem molekularen Analogon von JA-Ile (Weiler et al., 1994). Auch hier wurde der Hefestamm PJ69a transformiert, erneut mit den Fusionsproteinen aus der GAL4 DNA-Bingedomäne und den verschiedenen COI1-Proteinen und weiterhin mit JAZ9, fusioniert mit der GAL4-Aktivierungsdomäne. ÜN-Kulturen der verschiedenen Hefetransformanden wuchsen für 4 Stunden in An- bzw. Abwesenheit von

30 μM Coronatin und wurden genutzt um die Stärke der Interaktion im oNPG-Test zu messen (Abbildung 3.28 (A)). Die Expression der verschiedenen mutierten COI1-Proteine wurde mittels Western-Blot-Analyse überprüft (Abbildung 3.28 (B)).

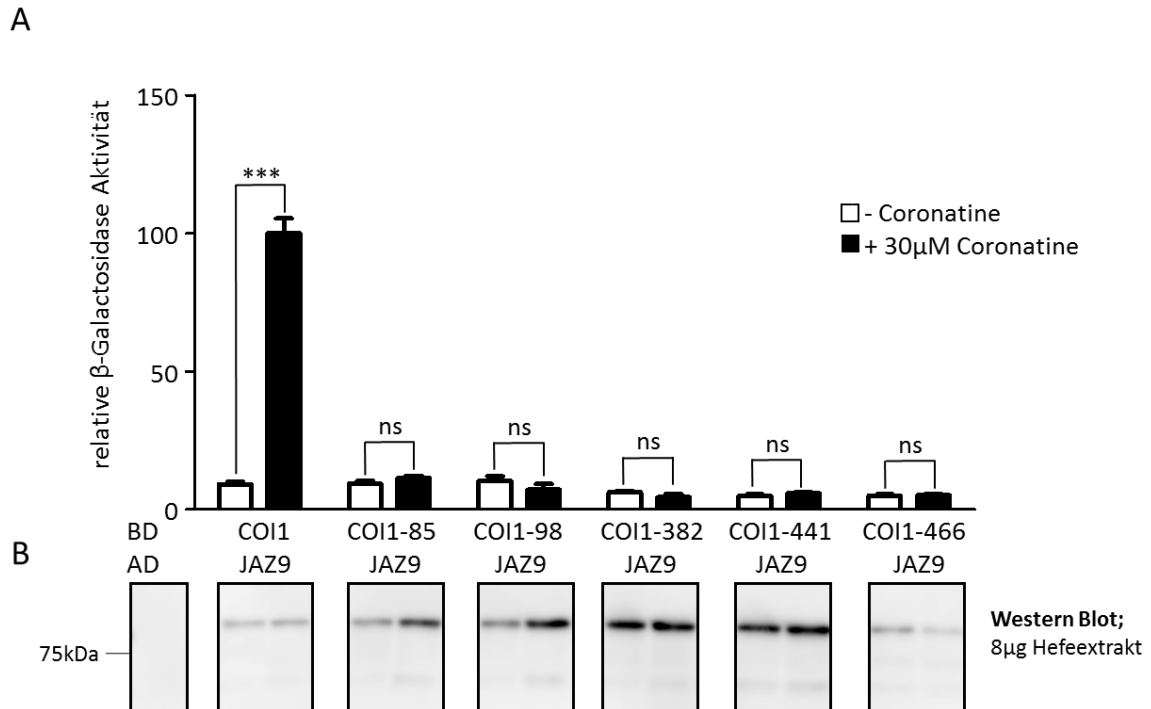


Abbildung 3.28 oNPG-Test zur Quantifizierung der Protein-Protein-Interaktion von COI1-Mutanten und JAZ9 im Liganden-induzierten Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Transformation der Hefe erfolgte mit COI1, COI1-85, -98, -382, -441 und -466 im Plasmid pDESTGAD sowie JAZ9 im Plasmid pDESTGBKT7. **(A)** Gezeigt sind die Mittelwerte aus vier unabhängigen Hefeklonen (\pm SEM), die in SD-Medium +/- 30 μM Coronatin gewachsen sind. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur). **(B)** Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit einem gegen das *myc-tag* gerichteten Antikörper. Abkürzungen: BD (Bindedomäne), AD (Aktivierungsdomäne)

Nur in Anwesenheit von Coronatin ist das wildtypische COI1-Protein in der Lage mit JAZ9 zu interagieren, erkennbar an der signifikanten Induktion der β -Galactosidase-Aktivität (Abbildung 3.28 (A)). Alle fünf mutierten COI1-Proteine zeigen keinen Unterschied der β -Galactosidase-Aktivität in An- bzw. Abwesenheit von Coronatin. Die Aktivität der β -Galactosidase unterscheidet sich hier nicht von der, die beim wildtypischen COI1 und JAZ9 in Abwesenheit von Coronatin gemessen wird. Die Mutationen in der Ligandenbindestelle des Rezeptorproteins führen dazu, dass COI1-Proteine nicht mehr Coronatin binden können, erkennbar an der fehlenden β -Galactosidase-Aktivität, die durch die Interaktion mit JAZ9 induziert wird.

3.5.3 Mutierte COI1-Proteine können die JA-abhängige COI1-Funktion nicht ausführen

Die in der Ligandenbindedomäne mutierten COI1-Proteine können noch mit ASK2 interagieren. Gezeigt wird dadurch, dass ihre Faltung aufgrund der eingefügten Mutationen nicht vollauf gestört ist. Wie erwartet, können sie in Hefe nicht mehr in Anwesenheit des Liganden Coronatin mit JAZ9 interagieren. Um die Frage zu beantworten, ob sie noch JA-unabhängige Funktionen, wie die Repression der *Phosphoglyceratmutase* durchführen können, wurden die Konstrukte stabil in die *coi1-16*-Mutante eingebracht. Diese weist einen einzelnen Aminosäureaustausch im Protein auf, der dazu führt, dass diese Mutante zwar bei 22°C Wachstumstemperatur nicht mehr fertil ist, bei 16°C jedoch noch in der Lage ist, Samen zu setzen (Ellis und Turner, 2002). Nachdem in stabil transformierten Linien die Expression von *35S:HA-COI1* (Komplementationslinie mit dem wildtypischen COI1), *35S:HA* (Leervektorkontrolle) und *35S:HA-COI1-85*, *35S:HA-COI1-98*, *35S:HA-COI1-382*, *35S:HA-COI1-441* sowie *35S:HA-COI1-466* bestätigt werden konnte, wurde zunächst die Fertilität bei 22°C getestet. *Col-g/1* und die Komplementationslinie mit dem wildtypischen COI1 (*35S:HA-COI1*) sind in der Lage, bei 22°C reife Samen zu bilden (Abbildung 3.29 (A), rote Pfeile markieren reife Schoten). Die verschiedenen mutierten COI1-Proteine können den Phänotyp der *coi1-16*-Mutante bei 22 °C nicht komplementieren und sind steril. Die mutierten COI1-Proteine zeigen somit auch *in planta* JA-Insensitivität.

Wachsen die Pflanzen auf MS-Platten +/- 50 µM MeJA, zeigt die *coi1-16*-Mutante im Gegensatz zu *Col-g/1* Insensitivität in Bezug auf MeJA inhibiertes Wurzelwachstum (Abbildung 3.29 (B)). Wie erwartet führt die Expression des WT-COI1-Proteins (*35S:HA-COI1*) zur Wiederherstellung der JA-Sensitivität des Wurzelwachstums. Unerwartet war, dass die Transformation der *coi1-16*-Mutante mit dem Leervektor einen Einfluss zeigt. In der transformierten *coi1-16*-Mutante ist ein schwacher Effekt von JA auf das Wurzelwachstum zu verzeichnen, so als ob durch die Transformation das COI1-16-Protein „aktiviert“ worden sei. Ähnlich wie die Leervektorkontrolle verhalten sich die COI1-Proteinmutanten -85, -98 und -466. Transformationen mit den Konstrukten *35S:HA-COI1-382* und *35S:HA-COI1-441* haben jedoch keinen Einfluss auf den *coi1-16*-Phänotypen und zeigen Resistenz gegenüber der MeJA-induzierten Wurzelwachstumshemmung. *35S:HA-COI1-382* weist zudem kürzere Wurzeln auf, unabhängig ob Pflanzen in An- oder Abwesenheit von MeJA wachsen. Western-Blot-Analysen zeigen, dass alle untersuchten Pflanzen das heterologe COI1-Protein exprimieren (Abbildung 3.29 (B)).

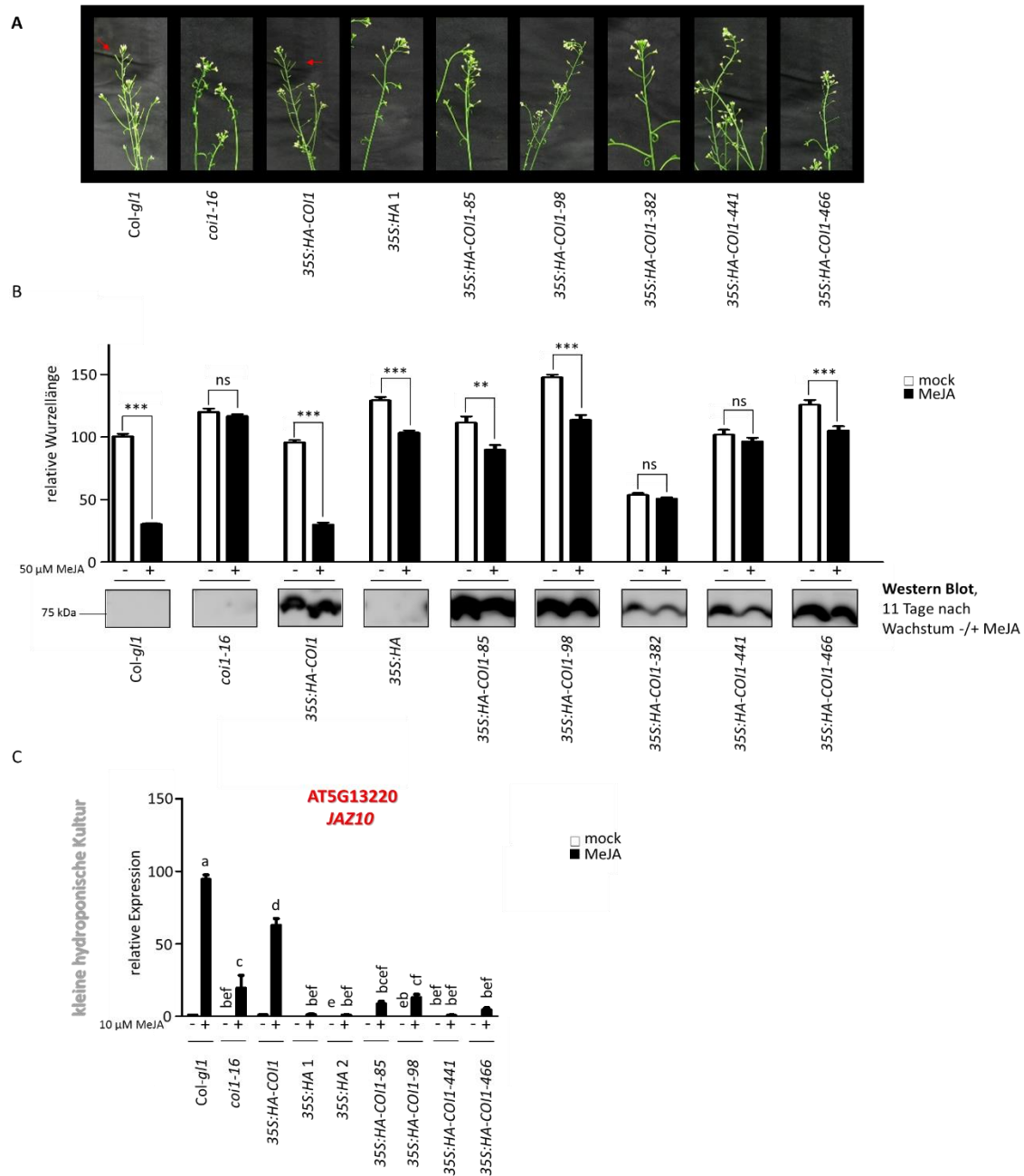


Abbildung 3.29 Charakterisierung der JA-Insensitivität von CO1-Mutanten *in planta*

(A) Wachstumsanalysen der verschiedenen Linien und Ihrer Kontrollen zum Test der Fertilität bei 22°C unter Langtagbedingungen. (Rote Pfeile markieren reife Schoten.) **(B)** Wurzelwachstumstest von CO1-Mutanten und ihren Kontrollen von 14 Tage alten, auf MS-Medium +/- 50 μ M MeJA angezogener Pflanzen. Gezeigt sind Mittelwerte von ca. 30 analysierten Wurzeln (\pm SEM). Die relative Wurzellänge von Col-g/1, gewachsen auf MS-Medium ohne MeJA wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und MeJA-behandelten Proben an. Der Nachweis der Proteinexpression erfolgte mit einem gegen das HA-tag gerichteten Antikörper. **(C)** Quantitative RT-PCRs in Wurzeln von 20 Tage alten, in kleinen hydroponischen Kulturen angezogener Pflanzen und zweistündiger mock- und 10 μ M MeJA-Behandlung. Gezeigt sind Mittelwerte von 3 unabhängigen Replikaten (\pm SEM). Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock behandelten Col-g/1 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test). Bei *35S:HA-CO1-85* handelt es sich um eine heterozygote Linie. (Teile der Abbildung sind bereits in Abbildung 3.17 gezeigt worden.)

Als nächstes wurde getestet, inwieweit die verschiedenen COI1-Proteine in der Lage sind, JA-induzierbare Genexpression zu vermitteln. Für diese Analysen wurden die in kleinen, sterilen hydroponischen Kulturen angewachsenen Linien 2 Std. mit 10 μ M MeJA behandelt. In Col-*g1* ist die Expression von *JAZ10* nach MeJA-Behandlung mehr als 90-fach induziert (Abbildung 3.29 (C); vgl. Abbildung 3.17). Eine ähnlich hohe Induktion von *JAZ10* ist ebenfalls in der WT-COI1-Komplementationslinie (*35S:HA-COI1*) sichtbar. Die *coi1-16*-Mutante zeigt untypischerweise ebenfalls JA-induzierbare Expression von *JAZ10*. Beide Leervektorkontrollen (*35S:HA* 1 und 2) zeigen keine signifikant erhöhte Genexpression von *JAZ10* nach MeJA-Behandlung. In allen Linien, die mutierte COI1-Proteine exprimieren, ist die Induktion von *JAZ10* deutlich geringer als im WT und den *35S:HA-COI1*-Pflanzen. Dies zeigt, dass die Mutationen, wie gewünscht, die Bindestelle für JA-Ile soweit schwächen, dass die Induktion von *JAZ10* deutlich geringer ausfällt.

3.5.4 Mutierte COI1-Proteine können die in *coi1-16* erhöhte Expression von JA-Ile unabhängigen Markergenen unterdrücken

Bisher konnte gezeigt werden, dass alle fünf mutierten COI1-Proteine, COI1-85, COI1-98, COI1-382, COI1-441 und COI1-466 in Hefe mit ASK2 interagieren, jedoch keinen JA-Ile induzierbaren Komplex mit JAZ9 bilden. Bezüglich der bekannten JA-abhängigen Prozesse (Fertilität, JA-Sensitivität des Wurzelwachstums, JA-Induktion der *JAZ10*-Expression), verhielten sich die mit den mutierten COI1-Konstrukten transformierten Pflanzen wie Leervektorkontrollen, d.h. sie komplementieren den *coi1-16*-Phänotyp nicht oder nur sehr schwach. Im Folgenden wurde getestet, ob die in *coi1-16* erhöhte Expression der für die JA-Ile-unabhängige Antwort typischer Markergene (*Phosphoglyceratmutase*, *Germin 2* und *CRK15*), durch die transgenen COI1-Derivate wieder unterdrückt werden können.

Dafür wuchsen die verschiedenen transgenen Linien für drei Wochen auf MS-Medium und wurden nach dem Transfer auf 1 %ige Wasser-Agarose mock-infiziert. Erhöhte mRNA-Mengen konnte tendenziell für alle drei Markergene in der *coi1-16*-Mutante gegenüber der entsprechenden WT-Pflanze in Wurzeln entdeckt werden, ein Effekt der sehr effizient durch das Wildtyp-COI1-Protein komplementiert werden kann (Abbildung 3.30). Unerwartet dagegen war, dass die mit dem Levektor transformierten *coi1-16*-Pflanzen sich nicht identisch zu den *coi1-16*-Pflanzen verhielten. In diesen Pflanzen ist die Expression der Markergene reduziert. Diese partielle Komplementation des *coi1-16*-Phänotyps durch das Transformationsereignis war bereits bei der Quantifizierung der JA-Sensitivität des Wurzelwachstums aufgefallen (Abbildung 3.29 (B)). Allerdings zeigt *35S:HA-COI1-98* eine hohe Expression der Markergene. Dieses Protein scheint die Restaktivität des temperatursensitiven COI1-Proteins zu unterdrücken. Im Gegensatz dazu können die Proteine COI1-382, COI1-441 und

COI1-466 die Expression der drei Markergene unter den Wert drücken, der in diesem Experiment in der *coi1-16* zu beobachten war und verhalten sich somit ähnlich wie das WT-COI1-Protein (Abbildung 3.30).

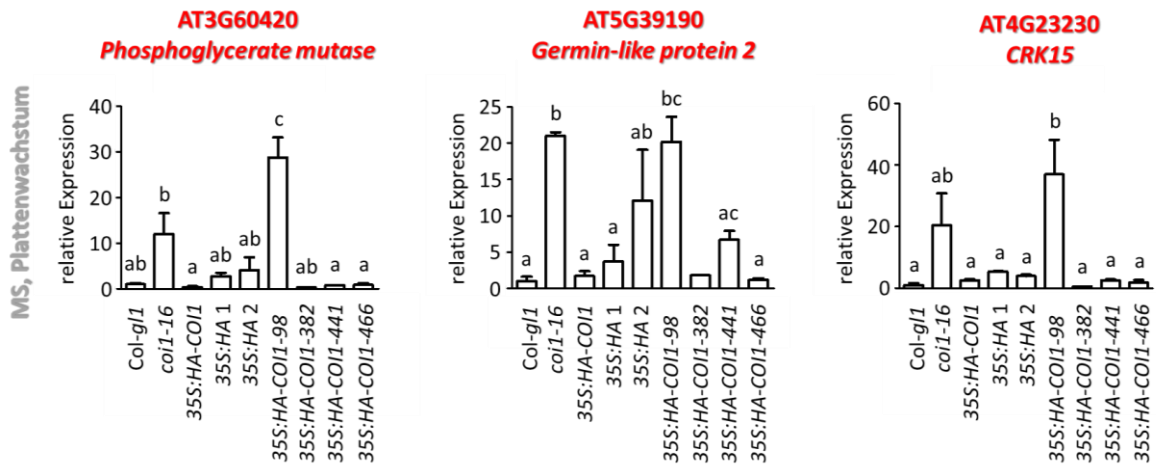


Abbildung 3.30 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von COI1-Mutanten

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von *Col-g/1* wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test).

Bei der Wiederholung des Experimentes, bei der die *35S:HA-COI1-85*-Linie ebenfalls einbezogen wurde, ist die gleiche Tendenz zu beobachten: das WT-COI1 und die Proteine COI1-85, COI1-382, COI1-441 und COI1-466 unterdrücken die *coi1-16* erhöhte Expression des *Phosphoglyceratmutase*-Gens, wobei mit Leervektoren transformierte Linien ebenfalls nicht so eine hohe Expression zeigen wie die *coi1-16*-Mutante (Abbildung 3.31). *CRK15* zeigt ähnliche Expression wie die *Phosphoglyceratmutase* in den untersuchten Genotypen, jedoch tendenziell erhöhte Transkriptmengen in den beiden Leervektorkontrollen, ähnlich wie in der *coi1-16*-Mutante. Das COI1-98-Protein ist in beiden Fällen nicht funktional. Bezüglich der Expression des *Germin 2* jedoch verhalten sich die Kontrollen wie erwartet und zeigen signifikant erhöhte Expression, genau wie in der *coi1-16*-Mutante (Abbildung 3.31). Hier können die Proteine COI1-441 und COI1-466 tendenziell und COI1-382 signifikant so gut wie das WT-COI1-Protein komplementieren, COI1-85 hingegen nicht.

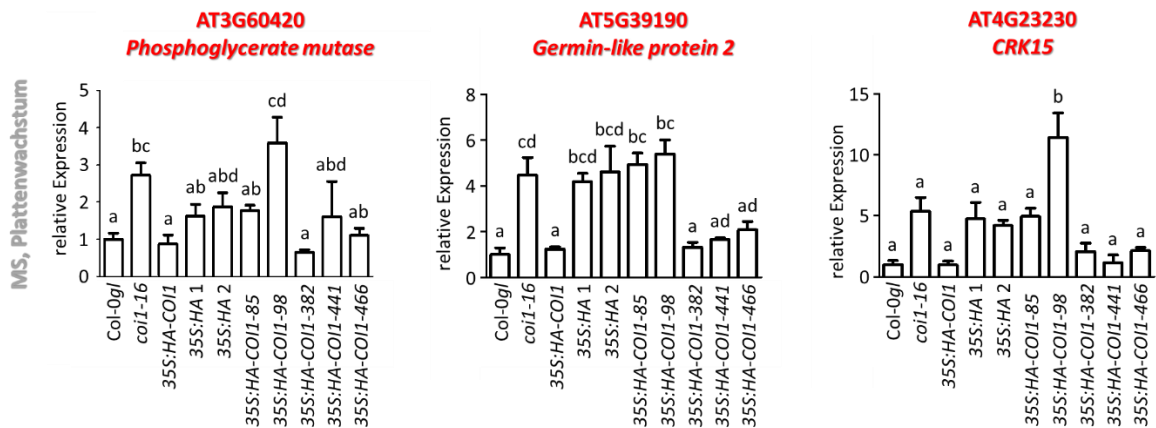


Abbildung 3.31 Quantitative RT-PCR-Analysen in mock-infizierten Wurzeln von COI1-Mutanten

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 unabhängigen Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von *Col-gli* wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*one way* ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test). Bei *35S:HA-COI1-85* handelt es sich um eine heterozygote Linie.

In einem weiteren Experiment wurde die Expression der *Phosphoglyceratmutase* noch einmal spezifisch in Pflanzen, die mit dem Leervektor transformiert worden waren, und Pflanzen, die verschiedene mutierte COI1-Konstrukte exprimieren, verglichen (Abbildung 3.32). In einem Versuch mit mehreren internen Kontrollen wuchsen jeweils 10 Pflanzen einer Referenzlinie (*35S:HA 1* und *2* bzw. *35S:HA-COI1-98*) mit 10 Pflanzen eines der COI1-Konstrukte (*35S:HA-COI1*, *35S:HA-COI1-85*, *35S:HA-COI1-382*, *35S:HA-COI1-441* sowie *35S:HA-COI1-466*) für drei Wochen auf MS. Die Pflanzen wurden auf 1 %ige Wasser-Agarose-Platten umgelegt und mock-infiziert. Im Anschluss wurden von je zwei Platten jeweils 10 Wurzeln vereint. Für jedes Konstrukt wurden sieben Replikate präpariert und analysiert. Die Proteine COI1-382, COI1-441 und COI1-466 werden als funktional bezüglich der Repression des *Phosphoglyceratmutase*-Gens in der *coi1-16*-Mutante eingeschätzt (Abbildung 3.32).

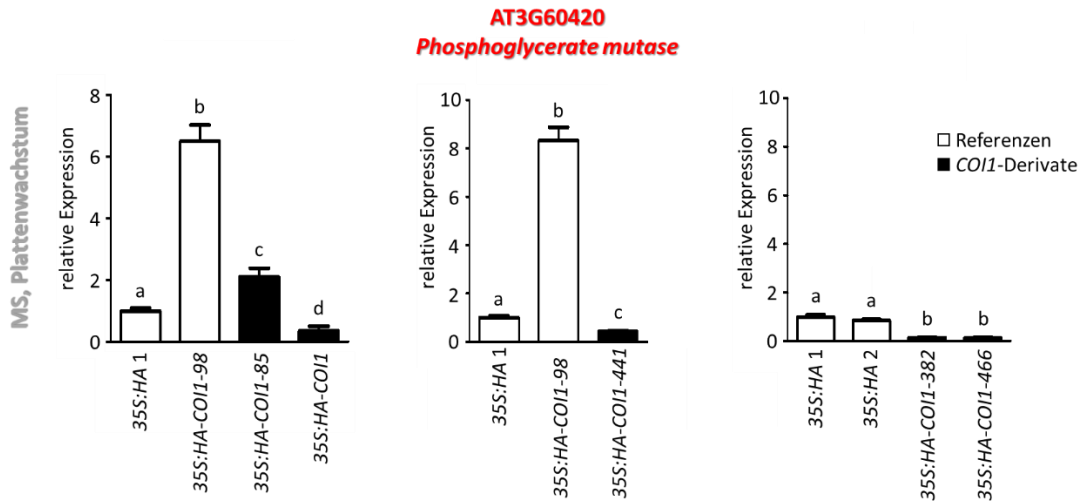


Abbildung 3.32 Quantitative RT-PCR der *Phosphoglyceratmutase* in mock-infizierten Wurzeln von *COI1*-Mutanten

Genexpressionsanalysen in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen 4 Tage nach mock-Infektion. Jeweils 10 Pflanzen einer Referenzlinie wuchsen mit 10 Pflanzen einer Linie der *COI1*-Derivate *side by side* auf einer Platte. Gezeigt sind Mittelwerte von 7 Replikaten (\pm SEM) mit 20 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge der Leervektorkontrolle (*35S:HA 1*) wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p -Wert $< 0,05$ an (*unpaired two-tailed Student t-test*). Bei *35S:HA-COI1-85* handelt es sich um eine heterozygote Linie.

Diese Analysen zeigen, dass ein *COI1*-Protein, das in der Pflanze JA-Ile-abhängige Funktionen wie Fertilität, JA-sensitives Wurzelwachstum und JA-induzierbare *JAZ10*-Expression nicht mehr ausführen kann, zur Repression von Genen beitragen kann, die in der *coi1*-Mutante erhöht exprimiert werden kann.

3.6 Analyse der Krankheitsphänotypen verschiedener Mutanten nach Infektion mit *V. longisporum*

Im bisher beschriebenen Jasmonsäure-aktivierten Signalweg, übernimmt *COI1* die Funktion als Rezeptor für JA-Ile (Yan et al., 2009; Sheard et al., 2010). Als F-Box-Protein ist *COI1* in Anwesenheit von JA-Ile in die Degradierung *downstream* agierender JAZ-Repressor-Proteine involviert (Chini et al., 2007) und aktiviert darüber nachgeschaltete Genexpressionskaskaden als Antwort auf JA. Das *COI1*-Protein zeigt demnach im klassischen Signalweg JA-Ile-Abhängigkeit.

Nach Infektion mit *V. longisporum* wurde eine neue JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 nachgewiesen. Die JA-Hormonrezeptormutante *coi1-t* zeigt im Gegensatz zum Wildtyp und zur JA-Biosynthese Mutante *aos* weniger Krankheitssymptome. Da vom Pilz keine JA-Ile ähnliche Substanz gebildet wird, die COI1 aktiviert, wird eine JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* vermittelt (Ralhan et al., 2012).

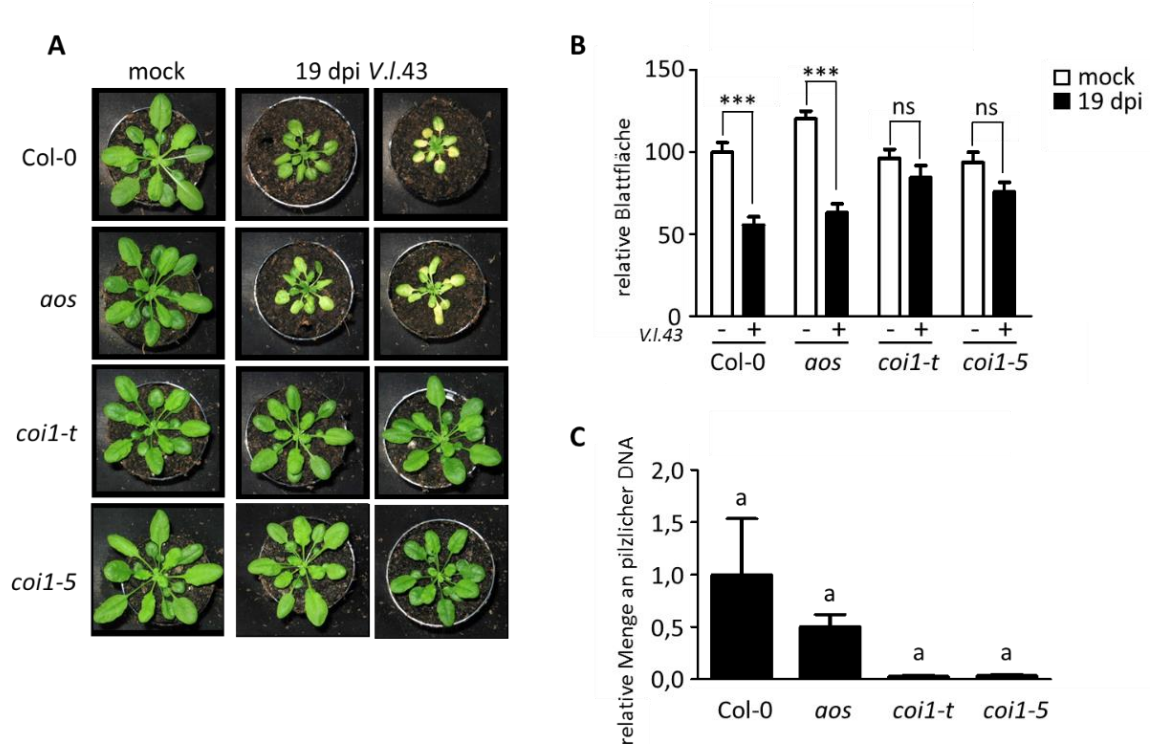


Abbildung 3.33 Entwicklung der Krankheitssymptome der *coi1-5*-Mutante nach Infektion mit *V. longisporum* im Sand-Erde-Infektionssystem

(A) Repräsentative Bilder von Col-0, *aos*, *coi1-t* und *coi1-5* 19 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. **(B)** Darstellung der gemessenen relativen Blattflächen von mock- und *V. longisporum*-infizierten Genotypen. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 3 unabhängigen Experimenten. Die relative Blattfläche des mock-infizierten Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an. **(C)** Quantifizierung der pilzlichen Biomasse mittels qRT-PCR. DNA wurde aus Petiolen der infizierten Genotypen 19 Tage nach Infektion extrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 3 unabhängigen Experimenten. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *Actin8* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von Col-0 wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert < 0,05 an (*one way* ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test).

In dieser Arbeit konnte diese Suszeptibilität-vermittelnde neue Funktion von COI1 mit der T-DNA-Insertionslinie *coi1-t* noch einmal reproduziert und mit einer weiteren COI1-Mutante, der *coi1-5*, bestätigt werden (Abbildung 3.33). Die *coi1-5*-Mutante beinhaltet einen Austausch von Glycin zu Asparat an Position 98, am Ende des zweiten *Loops*, einem wichtigen Teil der JA-Ile-Bindetasche und weist aufgrund seiner Sterilität und der Resistenz gegenüber JA-induzierter Wurzelwachstumshemmung den typischen JA-insensitiven Phänotypen auf (Yan et al., 2009).

Nach Infektion mit *V. longisporum* zeigt die *coi1-5*-Mutante, genau wie *coi1-t* Resistenz gegenüber dem Pathogen, während Col-0 und *aos* eine signifikante Reduktion der Blattfläche 19 Tage nach Infektion mit dem Pilz zeigen (Abbildung 3.33 (A) und (B)). Die Resistenz gegenüber *V. longisporum* beider Linien mit dem mutierten COI1-Protein, gehen tendenziell mit einer geringeren Menge an pilzlicher DNA in den Petiolen einher (Abbildung 3.33 (C)).

Mit den folgenden Linien: *35S:HA-COI1-85*, *35S:HA-COI1-98*, *35S:HA-COI1-382*, *35S:HA-COI1-441* und *35S:HA-COI1-466* wurden Pflanzen erstellt, die COI1-Proteine enthalten, die nicht in der Lage sind JA-Ile zu binden, aber dennoch die erhöhte Expression der Markergene für die JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 reprimieren zu können.

Durch Infektion der verschiedenen Linien mit *V. longisporum* kann nun der Einfluss dieser Proteine auf die Ausprägung der Krankheitssymptome nach Infektion mit dem Pilz getestet werden.

3.6.1 *35S:HA-COI1-85*, *-382*, *-441* und *-466* zeigen wie der WT Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum*

Die Infektion der verschiedenen transgenen Linien mit *V. longisporum* fand im Sand-Erde-Infektionssystem statt. Dafür keimten die Pflanzen zunächst auf MS-Platten aus, wurden dann nach zwei Wochen auf ein Sand-Erde-Gemisch verpflanzt und nach weiteren zwei Wochen durch 45-minütige Inkubation der Wurzeln in einer Sporensuspension von *V. longisporum* (10^6 Sporen / mL) infiziert. 15 Tage nach Infektion wurden die Krankheitssymptome der Pflanzen anhand der Blattfläche gemessen (Abbildung 3.34 (A) und (B)).

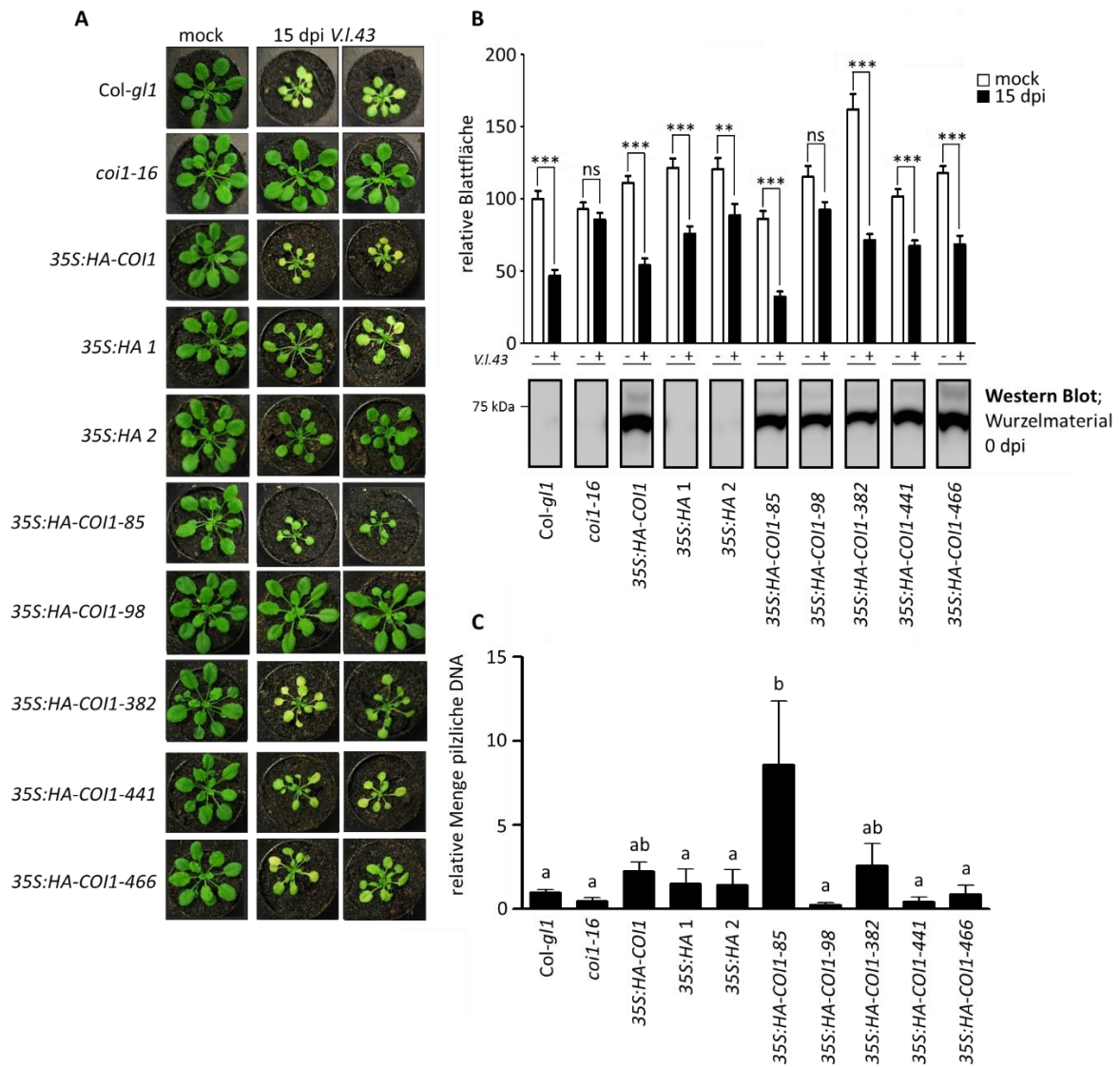


Abbildung 3.34 Entwicklung der Krankheitssymptome von COI1-Mutanten nach Infektion mit *V. longisporum* im Sand-Erde-Infektionssystem

(A) Repräsentative Bilder von *Col-g11*, *coi1-16*, *35S:HA-COI1*, *35S:HA 1 + 2* und *35S:HA-COI1-85, -98, -382, -441* sowie *-466* 15 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. **(B)** Darstellung der gemessenen relativen Blattflächen von mock- und *V. longisporum*-infizierten Genotypen. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 3 unabhängigen Experimenten. Die relative Blattfläche des mock-infizierten Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ (*two way ANOVA*, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an. **(C)** Quantifizierung der pilzlichen Biomasse mittels qRT-PCR. DNA wurde aus Petiolen der infizierten Genotypen 15 Tage nach Infektion extrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 3 unabhängigen Experimenten. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *Actin8* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von *Col-g11* wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*one way ANOVA*, gefolgt vom Tukey-Test). Bei *35S:HA-COI1-85* handelt es sich um eine heterozygote Linie.

Repräsentative Bilder der mock- und *V. longisporum*-infizierten Pflanzen (Abbildung 3.34 (A)) sowie die quantitative Auswertung (Abbildung 3.34 (B)) dreier unabhängiger Experimente zeigt, dass der WT im Gegensatz zur *coi1-16*-Mutante suszeptibel gegenüber dem Pilz ist. Die *coi1-16*-Mutante zeigt keine signifikante Reduktion der Blattfläche 15 Tage nach *V. longisporum*-Infektion. Auch die Komplementationslinie mit dem wildtypischen COI1-Konstrukt zeigt eine reduzierte Blattfläche ähnlich der des Wildtyps. Unerwarteterweise zeigen beide Leervektorkontrollen, *35S:HA* 1 und 2 im *coi1-16*-Hintergrund, ebenfalls stark ausgeprägte Krankheitssymptome nach Infektion mit dem Pilz, einhergehend mit reduzierter Blattfläche und früher Seneszenz. Hier setzt sich der Trend fort, der bereits für die leicht erhöhte Sensitivität des Wurzelwachstums (Abbildung 3.29) und für die weniger stark erhöhte Expression, der für die JA-unabhängige COI1-Funktion charakteristischen Markergene beobachtet wurde (Abbildung 3.30). Für *35S:HA-COI1-98* konnte Resistenz gegenüber *V. longisporum* beobachtet werden. Dieses Ergebnis bestätigt damit zuvor gezeigte Insensitivität gegenüber *V. longisporum* der *coi1-5*-Mutante, eine Linie mit derselben Mutation wie die *35S:HA-COI1-98* (Abbildung 3.33). Die Linien *35S:HA-COI1-85*, *35S:HA-COI1-382*, *35S:HA-COI1-441* sowie *35S:HA-COI1-466* weisen starken Einfluss des Pilzes auf die Blattflächengröße auf. Sie zeigen ähnlich starke Reduktion der Blattfläche wie *Col-g/1* und die Komplementationslinie (*35S:HA-COI1*), beides Linien, deren COI1-Protein JA-Ile binden kann. Western-Blot-Analysen zeigen, dass alle untersuchten Pflanzen das heterologe COI1-Protein gleichmäßig stark exprimieren (Abbildung 3.34 (B)).

Die Analyse der pilzlichen DNA in Petiolen zeigt erhöhte Mengen in der *35S:HA-COI1-85*, eine Linie, die Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* aufweist (Abbildung 3.34 (C)). In den restlichen analysierten Genotypen ist kein signifikanter Unterschied der pilzlichen DNA in Petiolen zu beobachten (Abbildung 3.34 (C)). Tendenziell ist zu erkennen, dass *V. longisporum* in *coi1-t* und der *35S:HA-COI1-98*-Linie weniger effizient proliferieren kann.

Expressionsanalysen der *Phosphoglyceratmutase* in Wurzelmaterial der mock- und *V. longisporum*-infizierten COI1-Derivate und ihren Kontrollen zeigen eindeutig erhöhte Expression nach Pilzinfektion (Abbildung 3.35). Die durch *V. longisporum* induzierte Expression des Markergens 15 Tage nach Behandlung mit dem Pilz im Sand-Erde-Infektionssystem, zeigt Abhängigkeit von COI1. Dagegen ist im Platten-Infektionssystem 4 Tage nach Infektion mit *V. longisporum* keine induzierte Expression der *Phosphoglyceratmutase* zu beobachten (Abbildung 3.14).

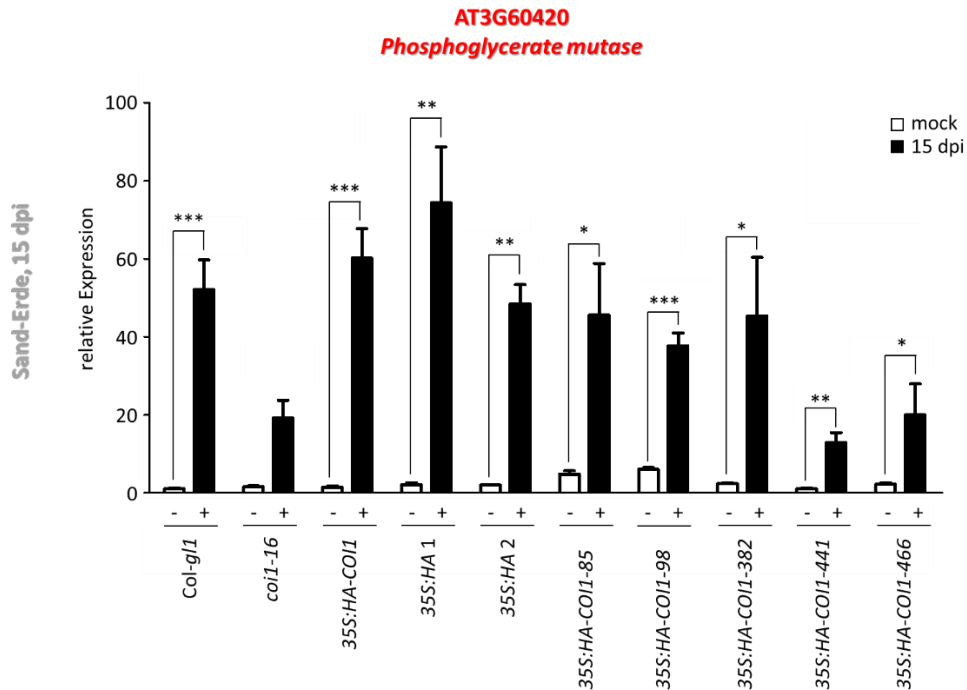


Abbildung 3.35 Quantitative RT-PCR der *Phosphoglyceratmutase* in Wurzeln von COI1-Mutanten nach mock- und *V. longisporum*-Infektion im Sand-Erde-Infektionssystem

Genexpressionsanalysen in Wurzeln 15 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion im Sand-Erde-Infektionssystem. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten *Col-gI1* wurde gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p -Wert $< 0,05$ (*unpaired two-tailed Student t-test*) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an. Für *coi1-16* konnte aufgrund fehlender Replikate kein Signifikanztest durchgeführt werden. Bei *35S:HA-COI1-85* handelt es sich um eine heterozygote Linie.

3.6.2 JAZ1Δ3-Linien zeigen wie der WT Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum*

Um zu testen ob die Suzeptibilität vermittelnde JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 gegenüber *V. longisporum* *downstream* Gene des JA-Signalweges einschließt, wurde die *35S:JAZ1Δ3-GUS* Linie infiziert und analysiert (Abbildung 3.36). Weiterhin wurden transgene Linien untersucht, die das Konstrukt unter dem wurzelspezifischen Promotor PYK10 regulieren.

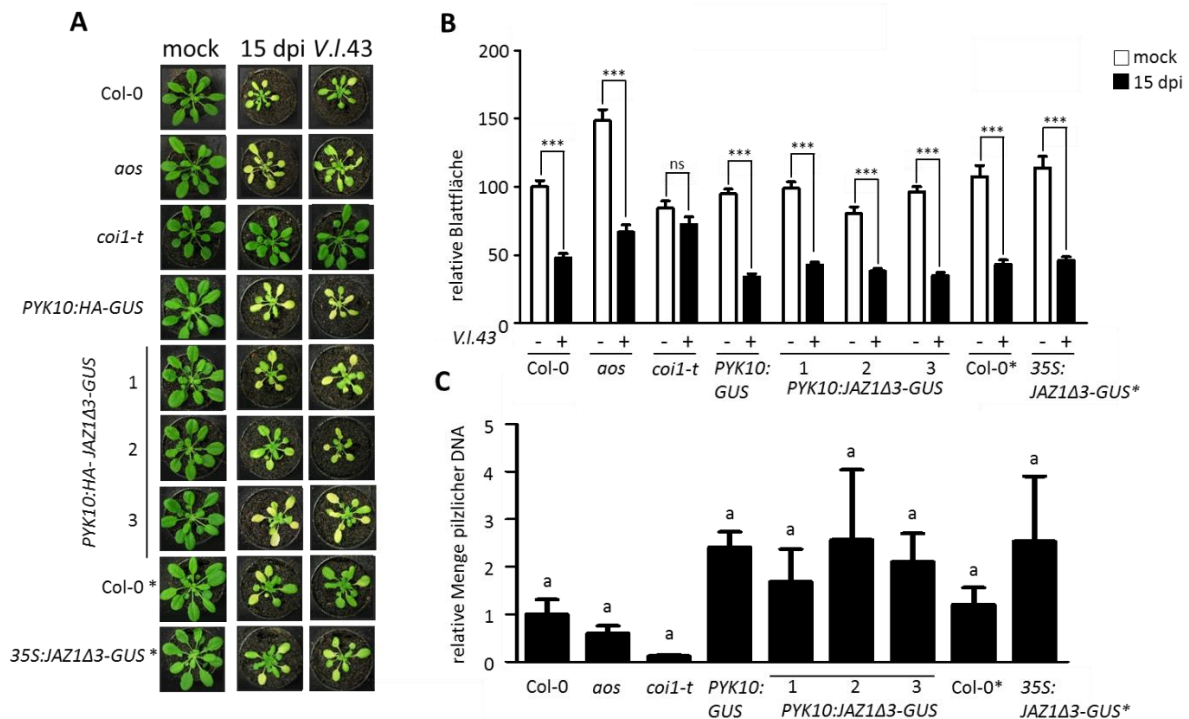


Abbildung 3.36 Entwicklung der Krankheitssymptome in JAZ1Δ3-Mutanten nach Infektion mit *V. longisporum* im Sand-Erde-Infektionssystem

(A) Repräsentative Bilder von Col-0, *aos*, *coi1-t* sowie *PYK10:HA-GUS* (Leervektorkontrolle), drei unabhängigen *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS* Linien und der Überexpressionslinie *35S:JAZ1Δ3-GUS** und dem entsprechend segregierendem WT Col-0* 15 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. (B) Darstellung der gemessenen relativen Blattflächen von mock- und *V. longisporum*-infizierten Genotypen. Gezeigt sind Mittelwerte von 8 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 2 unabhängigen Experimenten. Die relative Blattfläche des mock-infizierten Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an. (C) Quantifizierung der pilzlichen Biomasse mittels qRT-PCR. DNA wurde aus Petiolen der infizierten Genotypen 15 Tage nach Infektion extrahiert. Gezeigt sind Mittelwerte von 8 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 2 unabhängigen Experimenten. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *Actin8* normalisiert. Die relative Transkriptmenge von Col-0 wurden gleich 1 gesetzt. Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*one way* ANOVA, gefolgt vom Tukey-Test). * markieren jeweils beide Genotypen, die aus einer heterozygoten, segregierenden Pflanzenlinie hervorgegangen sind.

Repräsentative Bilder von den drei unabhängigen *PYK10:HA-JAZ1Δ3-GUS*-Linien und der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie (Abbildung 3.36 (A)) zeigen nach Infektion reduzierte Blattfläche und verfrühte Seneszenz. Die quantitative Auswertung der Blattfläche bestätigt den negativen Einfluss des Pilzes auf die Pflanzen (Abbildung 3.36 (B)). Unabhängig von der Wahl des Promotors, PYK10, ein wurzel-spezifischer oder 35S, kommt es trotz ektopischer Expression von stabilisiertem JAZ1 zu signifikanter

Reduktion der Blattfläche 15 Tage nach Infektion mit *V. longisporum*. Diese Mutanten zeigen ähnliche Blattflächenreduktionen wie der analysierte WT (Col-0 bzw Col-0*), die *aos*-Mutante und die Leervektorkontrolle (*PYK10:HA-GUS*).

Die *coi1-t*-Mutante zeigt im Gegensatz zur *aos*-Mutante erneut Toleranz gegenüber dem Pilz und somit, dass das COI1-Protein in die JA-Ile-unabhängige, vermittelnde Suszeptibilität involviert ist. Über eine JAZ-unabhängige, Suszeptibilität-vermittelnde COI1-Funktion kann aufgrund der nur partiellen negativen Dominanz der *35S:JAZ1Δ3-GUS*-Linie keine Aussage getroffen werden (vgl. Kapitel 3.3.5 und 3.4.3).

Die Analyse der pilzlichen DNA in Petiolen in unterschiedlichen Genotypen zeigt keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.36 (C)). Tendenziell ist zu erkennen, dass *V. longisporum* in *coi1-t* weniger effizient proliferieren kann.

3.6.3 Salicylsäure ist nicht in die Suszeptibilität-vermittelnde JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 involviert

Da Jasmonsäure und Salicylsäure in Bezug auf die Pflanzenabwehrantwort antagonistisch wirkende Phytohormone sind (Pieterse et al., 2009), wurde getestet, ob die erhöhte Expression des SA-Biosynthesegens *ICS1* in der *coi1-t*-Mutante am Abwehrprozess gegen *V. longisporum* beteiligt ist. Dazu wurde die SA-Biosynthese-Mutante *sid2-2* und die Doppelmutante *coi1-1 x sid2-2* im Vergleich zu *Col-gl1*, *aos* und *coi1-1* im Sand-Erde-Infektionssystem analysiert. Während der Wildtyp und die *aos*-Mutante erneut typische Krankheitssymptome nach Infektion mit *V. longisporum* aufweisen, zeigt die *coi1-1*-Mutante Toleranz (Abbildung 3.37 (A) und (B)). Die Biosynthesemutante *sid2-2* zeigt im Hintergrund des Wildtyps, d.h. in Anwesenheit von COI1, Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum*. Ist das COI1 Protein zusätzlich zur Isochorismat-Synthase mutiert, wird die Toleranz gegenüber *V. longisporum* hergestellt. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass SA nicht in die Suszeptibilität-vermittelnde JA-Ile-unabhängige COI1-Funktion involviert ist.

Expressionsanalysen der *Phosphoglyceratmutase* in diesem untersuchten Wurzelmaterial zeigen erneut induzierte Transkriptmengen nach Infektion mit *V. longisporum* und SA-unabhängige, tendentiell jedoch JA-Ile- und COI1-abhängige Regulation des Gens nach Pilz-Behandlung (Abbildung 3.37 (C)). Wie schon im Plattensystem gezeigt werden konnte (Abbildung 3.16), ist die Expression der *Phosphoglyceratmutase* in der *sid2-2*-Mutante gegenüber der *coi1-1* und der Doppelmutante *coi1-1 x sid2-2* signifikant reduziert, hier sichtbar in mock induzierten Wurzeln. Dies bedeutet, auf basalem Level reprimiert die neue COI1-Funktion die Expression der *Phosphoglyceratmutase* unabhängig von SA und JA-Ile.

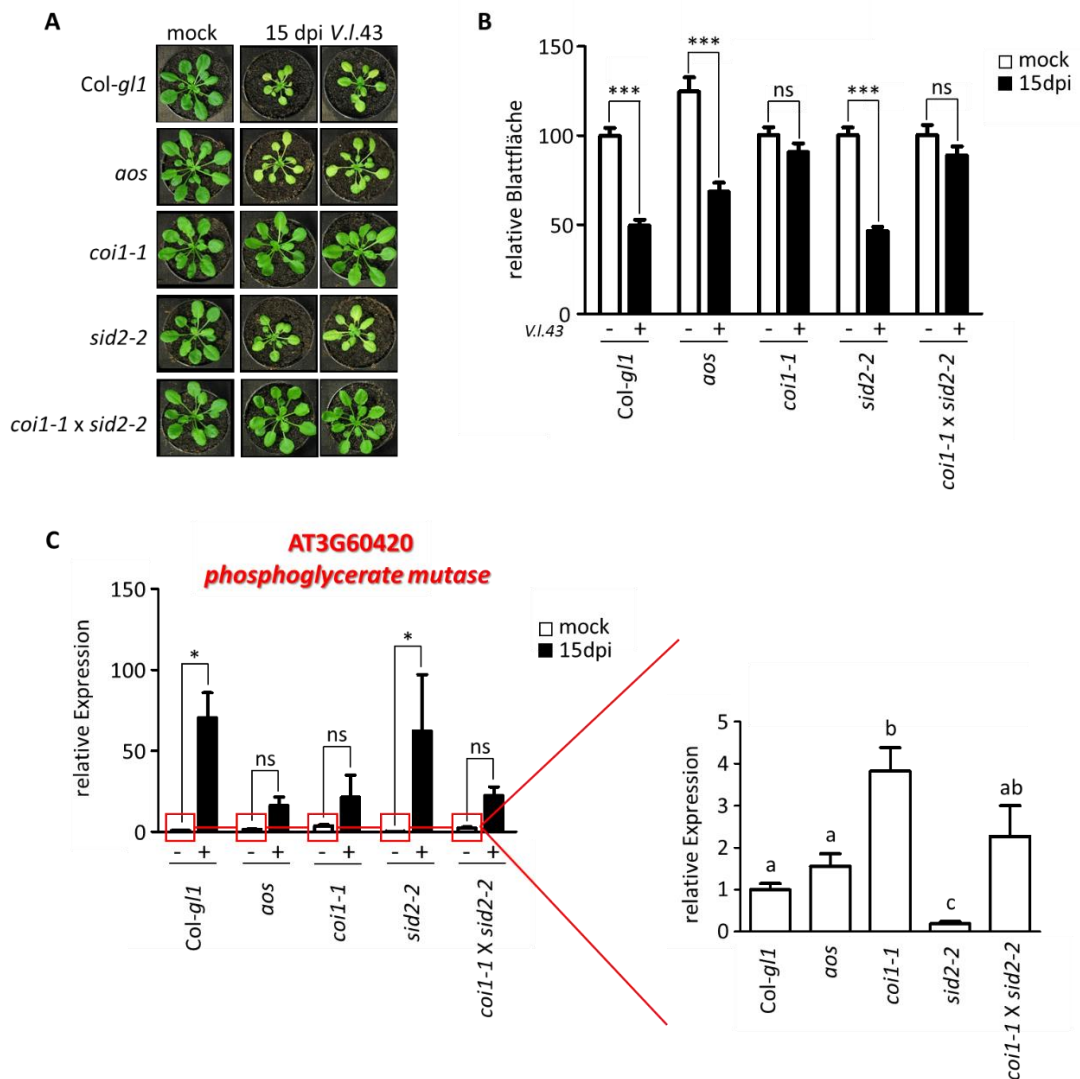


Abbildung 3.37 Entwicklung der Krankheitssymptome und Genexpressionsanalysen in Abhängigkeit von Salicylsäure nach Infektion mit *V. longisporum* im Sand-Erde-Infektionssystem

(A) Repräsentative Bilder von Col-*gl1*, *aos*, *coi1-1*, *sid2-2* und *coi1-1* x *sid2-2* 15 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion. **(B)** Darstellung der gemessenen relativen Blattflächen von mock- und *V. longisporum*-infizierten Genotypen. Gezeigt sind Mittelwerte von 12 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Pflanzen / Replikat von 3 unabhängigen Experimenten. Die relative Blattfläche des mock-infizierten Wildtyps wurde gleich 100 % gesetzt. Sterne zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur) zwischen mock- und *V. longisporum*-infizierten Proben an. **(C)** Genexpressionsanalysen in Wurzeln 15 Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion im Sand-Erde-Infektionssystem. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 Replikaten (\pm SEM) mit 4 Wurzeln / Replikat. Die relativen Transkriptmengen wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert. Die relative Transkriptmenge des mock-infizierten Col-*gl1* wurde gleich 1 gesetzt. * bzw. unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede mit einem p-Wert $< 0,05$ an (*two way* ANOVA, gefolgt von Bonferroni-Korrektur bzw. *unpaired two-tailed Student t-test*).

4 Diskussion

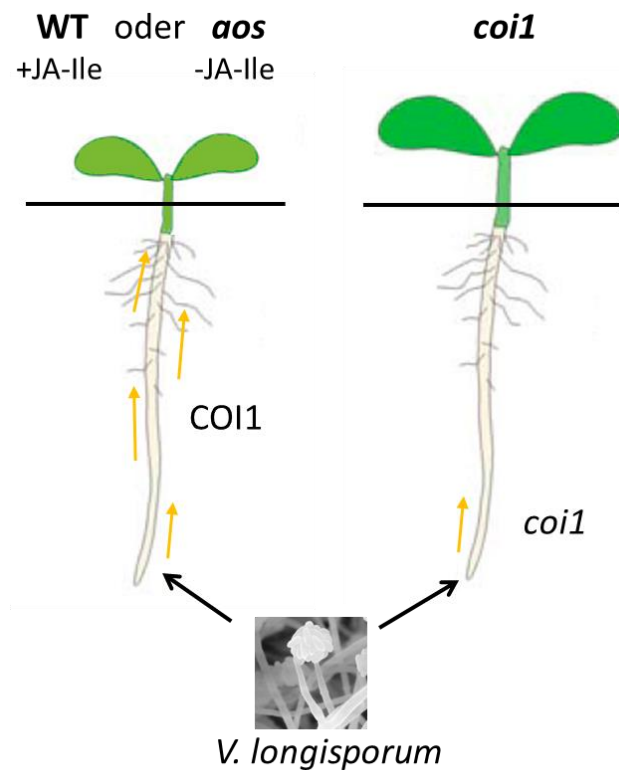


Abbildung 4.1 Modellvorstellung des JA-Ile unabhängigen, durch COI1 regulierten mobilen Signals

V. longisporum dringt in die Wurzel von Wirtspflanzen ein. Im Gegensatz zur *coi1*-Mutante kommt es im WT und der *aos*-Mutante zur Ausbildung des Pathophänotypen. Es wird ein mobiles Signal postuliert, aktiviert durch eine JA-Ile unabhängige COI1-Funktion, das in der Wurzel gebildet wird und im Spross die Entwicklung der Krankheitssymptome hervorruft.

Durch Pfropfungsexperimente von chimären Pflanzen wurde gezeigt, dass der Genotyp der Wurzel den Krankheitsphänotypen des Sprosses beeinflusst (Ralhan et al., 2012). Dies führt zur Hypothese eines mobilen Signals, das in der Wurzel gebildet wird und im Spross den Pathophänotypen hervorruft (Abbildung 4.1).

V. longisporum ist ein bodenbürtiges Pilzpathogen, das durch die Wurzel seiner Wirtspflanzen eindringt. Durch Hyphenwachstum und Konidientransport im Xylem erreicht der Pilz oberirdische Pflanzenteile und löst die Entwicklung pathophänotypischer Symptome aus (Berlanger und Powelson, 2000).

Nach der Infektion von WT, der JA-Hormonbiosynthesemutante *aos* und der JA-Hormonrezeptormutante *coi1-t* mit *V. longisporum*, weisen *aos*-Pflanzen wildtypische Symptome auf, während *coi1-t*-Pflanzen tolerant gegenüber dem Pilz sind. Diese Ergebnisse schienen ungewöhnlich, da beide Mutanten Defekte des Jasmonsäureweges aufweisen und somit denselben Phänotypen zeigen sollten. Da vom Pilz keine JA-Ile ähnliche Substanz gebildet wird, die COI1 aktiviert, wird eine neue, JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die im oberirdischen Pflanzenteil Suszeptibilität hervorruft.

4.1 *V. longisporum* zeigt schwachen Einfluss auf das pflanzliche Transkriptom im sterilen Plattensystem

Zur Identifizierung des JA-Ile unabhängigen, jedoch COI1-abhängigen mobilen Signals, sollten in der vorliegenden Arbeit Transkriptanalysen von Wurzelmaterial der Genotypen Col-0, *aos* und *coi1-t* nach Infektion mit *V. longisporum* durchgeführt werden.

Da einige Infektionssysteme von *A. thaliana* mit *V. longisporum* bekannt sind, wurde zunächst die Wahl des Systems getroffen.

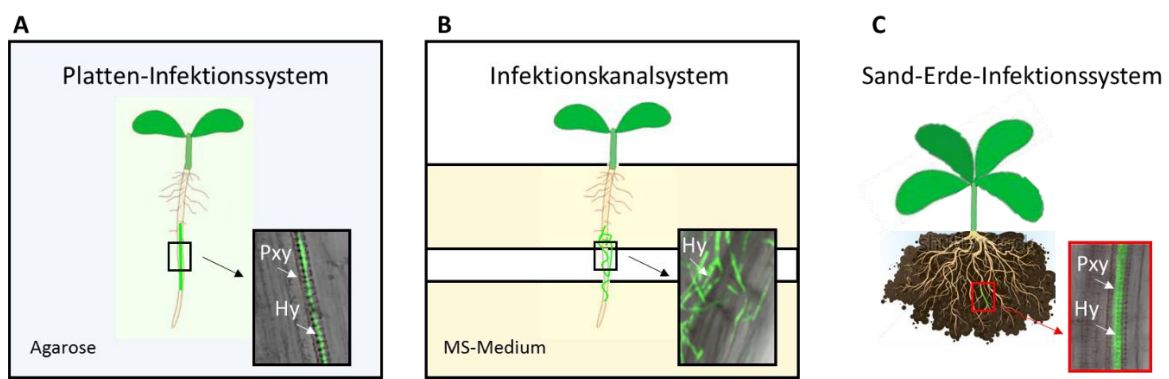


Abbildung 4.2 Schematische Darstellung dreier unterschiedlicher Infektionssysteme von *A. thaliana* mit *V. longisporum*

(A) Im Platten-System erfolgt die Infektion von *Arabidopsis*-Pflanzen auf Wasser-Agarose. Unter den zuvor herrschenden Wachstumsbedingungen entwickeln diese Pflanzen eine einzelne Hauptwurzel, in der 4 Tage nach Infektion mit *V. longisporum* eine Besiedlung des Xylems beobachtet werden kann. **(B)** Im Infektionskanalsystem erfolgt das Wachstum wie auch die Infektion der Pflanzen auf MS-Medium. Unter diesen Bedingungen dringt der Pilz zwar in die Wurzel ein, kann aber nicht das Xylem besiedeln. **(C)** Im Sand-Erde-Infektionssystem bilden die *Arabidopsis*-Pflanzen ein weit verzweigtes Wurzelwerk aus. Nur in wenigen Wurzeln dieses Materials kann *V. longisporum* im Xylem detektiert werden.

Im Sand-Erde-Infektionssystem (Abbildung 4.2 (C)) werden *Arabidopsis*-Pflanzen nach der Anzucht aus dem Substrat gezogen und mit einer Sporensuspension des Pilzes infiziert. In diesem System bilden *Arabidopsis*-Pflanzen ein weit verzweigtes Wurzelwerk (Abbildung 3.1 (A)), in dem nur wenige Wurzeln im Bereich des Xylems vom Pilz kolonisiert werden. Daher wurden zwei Infektionssysteme in Betracht gezogen, in denen die Pflanzen auf sterilem Medium angezogen werden und die Verzweigung der Wurzel unter diesen Bedingungen weniger stark ausgeprägt ist. Im sogenannten Infektionskanalsystem (Abbildung 4.2 (B)), in dem die Pflanzen auf MS-Medium wachsen, kann der Pilz zwar in die Wurzel eindringen, jedoch nicht das Xylem kolonisieren. Da vermutet wird, dass das systemische

Signal unter Umständen nur gebildet wird, wenn sich *V. longisporum* im Xylem befindet, fiel die Entscheidung für das von der AG-Lipka entwickelte sogenannte Platten-Infektionssystem (Abbildung 4.2 (A)). Ausschlaggebend für eine erfolgreiche Besiedlung des Xylems ist in diesem System, dass die Pflanzen für die Infektion auf nährstoffarmes Wasser-Agarose-Medium umgesetzt werden.

Transkriptanalysen dieses Materials wurden mit Hilfe der RNA-Seq-Methode durchgeführt, die im Gegensatz zu Microarray-Analysen den Vorteil bot, dass das Expressionsprofil nicht nur auf Gene von *A. thaliana* beschränkt wurde, sondern auch Transkripte von *V. longisporum* detektiert werden konnten.

Bei der Auswertung des erhaltenen Datensatzes fiel zunächst auf, dass zwei unterschiedliche Wildtypen aus zwei segregierenden Linien, der *aos* und *coi1-t*, starke Diskrepanzen in ihrem Expressionsprofil aufweisen. Während der WT aus der heterozygoten *aos*-Linie 107 Gene aufweist, die eine mindestens 2-fache Induktion mit einem p-Wert $\leq 0,1$ nach Infektion mit *V. longisporum* erkennen lassen, konnte für den zweiten WT_{*coi1-t*} eine induzierte Transkriptmenge für 256 Gene gefunden werden (Abbildung 4.3). Beide Wildtypen zeigen eine Überlappung für nur 34 Gene. Hier stellt sich die Frage, ob aufgrund der unterschiedlichen Historie beider Wildtypen epigenetische Mechanismen Einfluss zeigen und einen oder auch beide Wildtypen dazu veranlassen, auf der Ebene der Genexpression für einen Wildtyp untypische Reaktionen in Bezug auf *V. longisporum* zu zeigen.

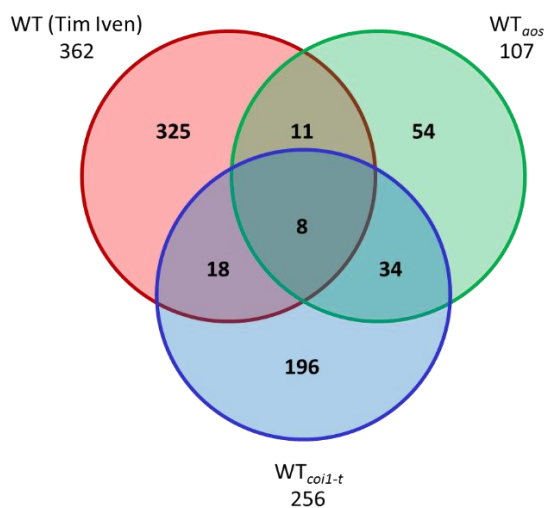


Abbildung 4.3 Venn-Diagramm der Gene, die nach Infektion mit *V. longisporum* in drei unterschiedlich analysierten Wildtypen induziert werden

Dargestellt sind alle Gene, die in Col-0 am Tag 3 (rot; Microarray-Analysen; Iven, 2009) bzw. im WT_{*aos*} (grün) und WT_{*coi1-t*} (blau) (RNA-Seq-Analysen) am Tag 4 nach Infektion mit *V. longisporum* mindestens zweifach induziert sind und einen p-Wert $\leq 0,1$ aufweisen

Da zuvor bereits Microarray-Analysen von Col-0, im Infektionskanalsystem (Abbildung 4.2 (B)) gewachsen und mit *V. longisporum* infiziert, durchgeführt wurden (Iven, 2009), wurde dieser Datensatz als Referenz verwendet und mit den unterschiedlich induzierten Transkripten der zwei hier verwendeten Wildtypen verglichen (Abbildung 4.3). Der Datensatz des durchgeführten Microarrays weist 362 Gene auf, die drei Tage nach Infektion mit *V. longisporum* in Col-0 induziert werden (mindestens 2-fache Induktion und einem p-Wert $\leq 0,1$; (Iven, 2009)). Vergleicht man die Transkriptome aller drei Wildtypen, ist deutlich erkennbar, dass beide Wildtypen, WT_{*aos*} und WT_{*coi1-t*},

auch zum WT aus früheren Analysen kaum Überlappungen zeigen. Nur 8 Gene zeigen eine gemeinsame Induktion in allen drei Wildtypen. Bei zwei dieser acht Gene handelt es sich tatsächlich um die vorab gewählten Infektionsmarker (Abbildung 3.3). Die ähnliche Induktion der Gene in Wildtypen aus beiden sterilen Systemen, dem Platten-Infektionssystem und Infektionskanalsystem, konnte in einem parallel durchgeführten Experiment beider Ansätze verifiziert werden (Abbildung 3.8).

Schlussfolgernd wird die Erkenntnis gewonnen, dass in sterilen Plattensystemen die Wirkung von *V. longisporum* auf eine veränderte Genexpression in Pflanzen sehr schwach ist. Schon die stark verzögerten und wenig ausgeprägten Krankheitssymptome der Pflanzen aus dem Platten-Infektionssystem (Abbildung 3.1 (B)) deuteten an, dass es unter den gewählten Bedingungen nur zu einer schwachen Induktion von Genen kommen würde, die für die Kolonisierung oder Symptomausprägung im Spross verantwortlich sind. Die Stringenzkriterien mussten stark herabgesetzt werden um überhaupt eine Veränderung in den Transkriptomen der unterschiedlichen Genotypen erkennen zu können. Dies führte jedoch zu vielen falsch positiven Genen.

Für die schlechte Auflösung der unterschiedlichen Genexpression nach Infektion mit *V. longisporum* wird weiterhin die gewählte Tiefe der RNA-Sequenzierung Einfluss gehabt haben. Die verwendeten 15-20 Millionen *reads* pro Probe hätten die schwach exprimierten Transkripte aufgrund der hohen Konzentration einer reduzierten Anzahl stark exprimierter Transkripte wahrscheinlich verdeckt. Desweiteren spielt die Länge der Transkripte in RNA-Seq-Analysen eine Rolle bei der Detektion. So kommt es, dass längere Transkripte gegenüber kürzeren bevorzugt detektiert werden (Tarazona et al., 2011). Eine tiefere Sequenzierungsebene wäre daher ebenfalls sinnvoll gewesen, da regulatorische Transkripte meist kurz sind. Beide Parameter wirken sich auf die Interpretation der biologischen Daten aus.

Schon der Vergleich zweier Datensätze unterschiedlich verwendeter Microarrays zeigte, dass die Methoden zur Transkriptomanalysen empfindlich sind und die Ergebnisse von vielen Faktoren beeinflusst werden (Hannah et al., 2005). So kann eine unterschiedliche statistische Datenanalyse von unabhängigen Replikaten bspw. schon zu unterschiedlichen Ergebnissen führen. Vermutlich würde sich der Datensatz eines Microarrays des in dieser Arbeit analysierten Materials deutlich von denen durch RNA-Seq-Analysen erhaltenen Ergebnissen unterscheiden. Ob durch neue Transkriptomdaten des gleichen Materials dennoch neue Erkenntnisse geliefert werden, ist fragwürdig. Vielmehr bietet sich dafür ein Wechsel des Infektionssystems und damit das Wurzelmaterial aus dem Sand-Erde-System an. Expressionsanalysen der *Phosphoglyceratmutase* in diesem Wurzelmaterial zeigen nämlich signifikante Induktion nach Infektion mit *V. longisporum* (Abbildung 3.14; Abbildung 3.35). Da dieses Gen in einem RNA-Seq-Datensatz gefunden wurde, der Unterschiede von WT und der *aos*-Mutante zur *coi1*-Mutante aufweist, jedoch Unabhängigkeit von der Infektion mit *V. longisporum* zeigt, war dieses

Ergebnis überraschend (Abbildung 3.12). Damit konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz einer geringen Besiedlung des Xylems im Sand-Erde-Infektionssystem das Signal systemisch induziert zu sein scheint und zu einer erhöhten Expression im gesamten Wurzelmaterial führt. Daher würde es sich anbieten, dieses Wurzelmaterial aus dem Sand-Erde-Infektionssystem für erneute Transkriptomanalysen einzusetzen, um das mobile Signal, das in der Wurzel gebildet wird und im Spross Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* vermittelt, zu identifizieren. Aufgrund der allgemein längeren Erfahrung im Umgang mit Microarray Datensätzen bezüglich systemischer Messabweichungen und ausgereiften Analysen, würde diese Art der Transkriptomanalyse bevorzugt verwendet werden.

Die schwache Reaktion von Pflanzen auf den Pilz im sterilen Infektionssystem führte dazu, dass keine verlässlichen Unterschiede im Verhalten der induzierten Genexpression zwischen den analysierten Mutanten *aos* und *coi1-t* detektiert werden konnten. Gene, die auf den ersten Blick interessant erschienen, da sie in *coi1* anders reguliert werden als im WT und der *aos*-Mutante (Abbildung 3.6) und potentiell in die Aktivierung des mobilen Signals, das im Spross Suszeptibilität vermittelt, involviert sind, haben sich nach Veranschaulichung der Expressionsprofile als keine guten Kandidatengene herausgestellt (Abbildung 3.7). Tatsächlich lieferten die Daten der RNA-Seq-Analyse nur verlässliche Daten für robuste Effekte. Diese wurden nur in den Transkriptomen der unterschiedlichen Genotypen unabhängig von der Infektion mit *V. longisporum* gefunden. 113 Gene zeigten im Vergleich zu WT_{*aos*}, *aos* und WT_{*coi1-t*} in der *coi1-t*-Mutante eine erhöhte Expression mit einer deutlich höheren Stringenz (mindestens 4-fach induzierte Genexpression mit einem p-Wert < 0,01; Abbildung 3.14).

Da beschrieben ist, dass die JA-induzierte Expression von drei NAC-Transkriptionsfaktoren, ANAC019, ANAC055 und ANAC072, die SA-Biosynthese durch direkte Interaktion mit dem Promotor der *ICS1* unterdrücken (Zheng et al., 2012), wurde zunächst mit veröffentlichten Transkriptomdaten überprüft, welche dieser 113 Gene nicht durch SA beeinflusst werden (Abbildung 3.12). Ihre induzierte Genexpression in der *coi1*-Mutante wird dann vermutlich nicht aufgrund der Hyperstimulierung des SA-Signalweges erfolgen, da in dieser Arbeit wie auch bereits zuvor schon Unabhängigkeit der Toleranz von Salicylsäure gegenüber *V. longisporum* gezeigt werden konnte (Ralhan et al., 2012; Abbildung 3.37). Daraus folgt, dass die als Konsequenz der erhöhten *ICS1*-Expression in *coi1* (Abbildung 3.11) erhöht exprimierten Gene nicht für diesen Pathophänotypen verantwortlich sein können. Diese SA-induzierten Gene, wobei es sich um 65 von 84 analysierten Transkripte handelt (29 der 113 Transkripte waren im Genevestigator-Datensatz nicht enthalten), wurden deshalb von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Für 19 der 113 erhöht exprimierten Gene in der *coi1-t*-Mutante konnte in veröffentlichten Transkriptomdaten kein Einfluss von SA auf ihre Genexpression vermerkt werden.

Auffällig ist jedoch, dass die Liste der 113 Gene, unabhängig davon, ob ihre Expression durch SA beeinflusst wird oder nicht, primär Gene beinhaltet, die in Abwehrmechanismen der Pflanze involviert sind. Es scheint, dass das COI1-Protein sowohl als Teil des klassischen JA-Weges, als auch unabhängig von JA-Ile Funktionen in der Verteidigung gegenüber äußeren Einflüssen übernimmt.

4.2 Basal wird die *Phosphoglyceratmutase* durch eine ancestrale, JA-Ile-unabhängige COI1-Funktion reguliert

Bei einem der 113 Gene, die im Gegensatz zum WT und der *aos*-Mutante erhöhte Expression in der *coi1-t*-Mutante zeigen, handelt es sich um die *Phosphoglyceratmutase* (Abbildung 3.14). Die erhöhte Expression der *Phosphoglyceratmutase* und der weiteren Gene wurde unabhängig von *V. longisporum* entdeckt. In den folgenden Analysen wurde die *Phosphoglyceratmutase* als Markergen der neuen COI1-Funktion gesehen, die unabhängig von JA-Ile die Expression der Gene reprimiert.

Die *Phosphoglyceratmutase* ist ein Gen, das als Enzym der Glykolyse die Umlagerung eines Phosphatrestes bewirkt. Dabei katalysiert es die Umwandlung von 3-Phosphoglycerat, einem Molekül, das eine wichtige Vorstufe zur Biosynthese der Aminosäuren L-Serin, L-Cystein und Glycin darstellt (Albers et al., 2003), zu 2-Phosphoglycerat. Die Lokalisation der *Phosphoglyceratmutase* ist bisher unbekannt, allerdings wird mit einer ~ 60 % igen Wahrscheinlichkeit eine cytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt (Briesemeister et al., 2010). Dies ist stimmig mit der im Cytoplasma ablaufenden Glykolyse.

Die in dieser Arbeit gezeigte Repression der *Phosphoglyceratmutase* durch COI1 erfolgt auch in der *aos*-Mutante und ist somit unabhängig von JA-Ile (Abbildung 3.14). Weiterhin kann die reprimierende Funktion nur sehr geringfügig durch JA-Ile verstärkt werden (Abbildung 3.17). Nach Infektion mit *V. longisporum* scheint es jedoch, dass sich die Funktion des COI1-Proteins umkehrt. Im Sand-Erde-Infektionssystem konnte nach Behandlung mit dem Pilz eine Induktion der Genexpression vernommen werden, die in der *aos*- und *coi1*-Mutante geringer ausfiel (Abbildung 3.34 und Abbildung 3.37). Hier scheint die Expression durch ein vom Pilz kommendes Signal und abhängig von JA-Ile und COI1 induziert zu werden (Abbildung 4.4). Es scheint, als ob die neue JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 durch das mögliche Signal vom Pilz überlagert wird, und die altbekannte Funktion als Aktivator übernimmt.

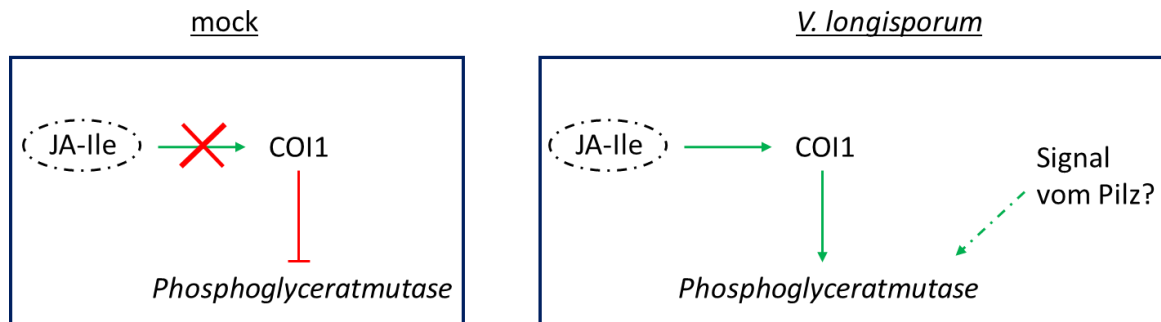
Phosphoglyceratmutase

Abbildung 4.4 Genregulation der *Phosphoglyceratmutase* in mock- und *V. longisporum*-infiziertem Wurzelmaterial

COI1 reprimiert unabhängig von JA-Ile (auch in der *aos*-Mutante) die Expression der *Phosphoglyceratmutase*, während nach Infektion mit *V. longisporum* die klassische Funktion von COI1 aktiv zu sein scheint. In Abhängigkeit von JA-Ile verstärkt COI1 die Pilz-induzierte Expression der *Phosphoglyceratmutase*. Ein potentielles Signal vom Pilz scheint in die induzierte Genexpression nach Infektion involviert zu sein.

Über die Signaltransduktionskette, die auch in der *coi1*- und *aos*-Mutante noch eine Induktion der *Phosphoglyceratmutase* im Sand-Erde-Infektionssystem erlaubt, kann noch keine Aussage getroffen werden. Lediglich der Salicylsäureweg kann ausgeschlossen werden, da in dieser Arbeit die Abhängigkeit der induzierten *Phosphoglyceratmutase*-Expression von diesem Hormon eindeutig wiederlegt werden konnte (Abbildung 3.37).

Primär wird für die Regulation der *Phosphoglyceratmutase* eine basale, JA-Ile unabhängige Funktion von COI1 postuliert, die möglicherweise in Abhängigkeit von JAZ agiert. Hinweise dazu liefern Studien in *Physcomitrella patens* und *Marchantia polymorpha*, die zeigen, dass Homologe des JA-Ile Rezeptors COI1 und JAZ im Genom präsent sind (Wang et al., 2015). Dies lässt darauf schließen, dass es sich bei dem COI1/JAZ-Komplex evolutionär um einen ancestralen Komplex handelt und eine Gemeinsamkeit zwischen der Aufteilung der Landpflanzen in Tracheophyten und Bryophyten darstellt. Auch wenn gezeigt werden konnte, dass exogenes MeJA in *P. patens* zu reduziertem Wachstum und Induktion von Abwehrgenen führt, ließen Analysen des Oxylingehalts in *P. patens* schlussfolgern, dass das Moos nicht in der Lage ist JA selber zu synthetisieren (Ponce De León, I. et al., 2012; Stumpe et al., 2010). Aufgrund der augenscheinlichen Diskrepanz zwischen der Fähigkeit auf MeJA zu reagieren und der Unfähigkeit das Molekül selber synthetisieren zu können wird postuliert, dass der ancestrale COI1/JAZ-Komplex eine breitere Ligandenspezifität aufweist und somit sowohl den endogenen, noch unbekanntem Liganden erkennt als auch exogen zugegebene JA.

Die in dieser Arbeit analysierte neue Funktion von COI1, die unabhängig von JA-Ile ist, scheint demnach eine ancestrale Funktion von COI1 zusammen mit JAZ zu sein, die mit der Entwicklung der JA-Synthese in Pflanzen aufgrund hoher Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden in den Hintergrund gestellt wurde.

4.3 Es wird postuliert, dass die ancestrale Funktion von COI1 abhängig von JAZ ist

Um die Rolle des Liganden weiterhin verifizieren zu können, wurden Linien mit Mutationen in der Bindetasche des Rezeptorproteins COI1 für JA-Ile untersucht. Tatsächlich konnte aber mit Strukturanalysen gezeigt werden, dass der wirkliche Rezeptor für JA-Ile nicht COI1 alleine, sondern ein Zusammenspiel von COI1 und dem JAZ-Protein ist (Sheard et al., 2010). Während JA-Ile durch das COI1-Protein mit hoher Spezifität erkannt und in einer Vertiefung im Bereich der LRR-Region gebunden wird, setzt das JAZ-Protein als eine Art Verschluss das Hormon in der Bindetasche fest.

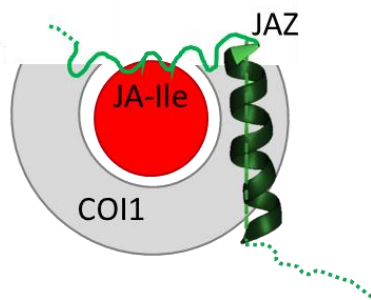


Abbildung 4.5 Schematische Darstellung des COI1/JA-Ile/JAZ-Komplex

Über eine α -Helix bindet JAZ an COI1. Eine Schleifenregion von JAZ bindet an COI1 und JA-Ile und fixiert damit das an COI1 gebundene Hormon.

Dabei binden JAZ-Proteine über eine konservierte α -Helix an das COI1-Protein, während sich eine Schleifenregion des JAZ-Proteins über JA-Ile, sitzend in der Bindetasche, legt und durch Bindungen mit COI1 und dem Hormon dieses darin einschließt (Abbildung 4.5). Es konnte gezeigt werden, dass Coronatin, das natürliche Analogon von JA-Ile aus *Pseudomonas syringae*, *in vitro* kaum Bindungen eingeht, wenn das COI1- oder ein JAZ-Protein alleine zur Verfügung steht (Sheard et al., 2010). Daraus lässt sich schließen, dass der COI1/JAZ-Komplex als Ko-Rezeptor die Bindung von JA-Ile vermittelt.

Als die verschiedenen *COI1*-Mutanten entworfen und hergestellt wurden, war die exakte Bindung des COI1/JA-Ile/JAZ-Komplexes noch nicht bekannt. In Anlehnung an die Auxin-Bindestellen des Paralogen TIR1 wurden Mutationen in das COI1-Protein eingefügt. Die Intention war dabei, das COI1-Protein so zu verändern, dass es nicht mehr in der Lage ist, JA-Ile zu binden, ohne die Konformation und somit seine Aktivität zu verlieren. Dafür wurde durch zielgerichtete Mutagenese bei vier der fünf mutierten COI1-Proteine jeweils eine spezifische Kontaktstelle des TIR1 für Auxin in die entsprechende Stelle des COI1-Proteins eingeführt (Abbildung 4.6).

Mit dem heutigen Wissen wird deutlich, dass die Ligandenbindestelle des COI1 für JA-Ile in allen Mutanten exakt getroffen wurde (Abbildung 4.6; blau bzw. rot markierte AS). Dadurch, dass nicht immer nur eine Aminosäure mutiert wurde, wird mit Hilfe der Strukturanalysen des COI1/JA-Ile/JAZ-Komplex offensichtlich (Sheard et al., 2010; Yan et al., 2009), dass durch jede Mutation ebenfalls eine Bindestelle zum JAZ-Degron getroffen wurde. Teilweise ist die Bindestelle des COI1-Proteins zu JA-Ile nicht von Bindestellen zum JAZ-Protein trennbar und hoch konserviert unter verschiedenen Landpflanzen (Abbildung 4.6; rot markierte AS).

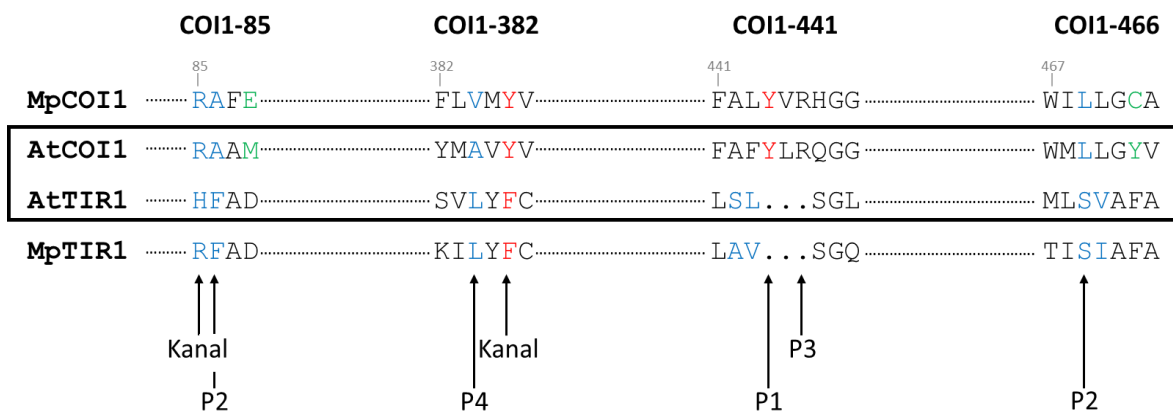


Abbildung 4.6 Alignment von COI1- und TIR1- Proteinsequenzbereichen aus *A. thaliana* und *M. polymorpha*

Dargestellt sind die in den *Arabidopsis*-COI1-Mutanten ausgetauschten Aminosäuren, aligniert mit den Sequenzen aus MpCOI1 und TIR1 aus *A. thaliana* und *M. polymorpha*. Rote Aminosäuren markieren Kontaktstellen gleichzeitig für JA-Ile und dem JAZ-Protein (COI1) bzw. Auxin und dem JAZ-Protein (TIR1). Grün dargestellte Aminosäuren bilden den Kontakt zum JAZ-Protein und blaue Aminosäuren sind an der Bindung von JA-Ile (COI1) bzw. Auxin (TIR1) beteiligt. Pfeile markieren die Aminosäuren, die als Teil der vier kleineren Taschen (P1-P4) der JA-Ile Bindetasche an der Bindung des Hormons beteiligt sind (vgl. Abbildung 1.2).

Nach bisherigem Kenntnisstand kann jedoch nicht entschieden werden, ob ein einzelner Aminosäureaustausch im COI1-Protein zum Verlust der Bindung von JAZ-Proteinen führt. Im COI1-Protein gibt es mehr als 20 Aminosäuren, die in die Interaktion mit der Schleifenregion von JAZ-Proteinen involviert sind (Anhang Abbildung 6.4). Es konnte gezeigt werden, dass ein einzelner Aminosäureaustausch in der α -Helix von JAZ1 ausreichend ist, die Bindung von JAZ und COI1 in Anwesenheit von Coronatin zu verhindern, während in der Schleifenregion mehrere Aminosäuren für die Interaktion beider Proteine notwendig sind (Sheard et al., 2010). Da durch die Mutationen in COI1-Proteinen nur Aminosäuren, die zur Schleifenregion des JAZ-Proteins Kontakt haben, ausgetauscht wurden, wird die Bindung zwischen mutierten COI1-Proteinen und JAZ vermutlich nicht vollständig zerstört wor-

den sein. Die völlige Unabhängigkeit der mutierten COI1-Proteine von JAZ-Proteinen ist daher unwahrscheinlich. Wahrscheinlich werden die Aminosäureaustausche höchstens zu einer geschwächten Bindefähigkeit der Repressoren geführt haben. Um dies verifizieren zu können, sollten jedoch zukünftig weitere COI1-Proteine mit Mutationen in den essentiellen Binderegionen zu JAZ-Proteinen hergestellt und analysiert werden.

Wie bereits erwähnt, wird für den ancestralen COI1/JAZ-Komplex eine breitere Ligandenspezifität postuliert. In einem Liganden induzierten Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte keine Interaktion von COI1 und JAZ beobachtet werden (Abbildung 3.28). Dies ist jedoch vermutlich auf das Fehlen von einem, an das mutierte COI1-Protein bindenden Liganden zurückzuführen. Vermutlich kann die Bindung von COI1 und JAZ in den transgenen Linien mit den mutierten COI1-Proteinen noch erfolgen, wenn ein anderer, bisher noch unbekannter Ligand involviert ist. Ein anderer Ligand müsste ähnliche Strukturelemente wie JA-Ile oder Coronatin aufweisen, um ebenfalls Platz in der Bindetasche von COI1 zu finden und Bindungen eingehen zu können. Es wird vermutet, dass möglicherweise Indol-Derivate als unbekannter Ligand in Frage kommen. Diese Vermutung basiert auf der Erkenntnis, dass COI1 und TIR1 aus einem gemeinsamen Vorläufer entstanden sind und noch eine 34 %ige Sequenzhomologie aufweisen (Xie et al., 1998). Da die Mutationen des COI1-Proteins ebenfalls in Richtung TIR erstellt wurden, sollte die Affinität von Indol-Derivaten zur Ligandenbindedomäne verstärkt worden sein. Indole entstehen beispielsweise aus Tryptophan, einer aromatischen Aminosäure, die aus dem Shikimatweg hervorgeht. Ob ein aus dem Shikimatweg abgeleiteter Metabolit tatsächlich als unbekannter Ligand in Frage kommt, soll zukünftig getestet werden. Wie zuvor beschrieben, zeigt die Regulation der *Phosphoglyceratmutase* auf basalem Level und damit im Platten-Infektionssystem nach mock-Behandlung stark reprimierte Expression durch die mögliche neue COI1/JAZ-Funktion (Abbildung 4.4). Würde man die Pflanzen in diesem System mit Glyphosat behandeln, kommt es aufgrund der chemischen Verbindung zur Blockade des Enzyms 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase (EPSPS). Dieses Enzym ist in die Synthese der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin über den Shikimatweg in Pflanzen involviert. Handelt es sich tatsächlich um einen Liganden aus diesem Syntheseweg, würde erwartet werden, dass dieser durch Glyphosat nicht mehr gebildet wird. Dies würde die reprimierte Expression der *Phosphoglyceratmutase* durch COI1/JAZ aufheben und ähnlich wie in der *coi1*-Mutante erhöhte Transkriptmengen zur Folge haben.

Ob nun die neue Funktion von COI1 tatsächlich wie vermutet JAZ-abhängig ist, bleibt also zu klären. Eine deutliche JA-Ile-Unabhängigkeit konnte mit den transgenen Linien jedoch eindeutig gezeigt werden.

Sowohl in Hefe (Abbildung 3.28) als auch *in planta* (Abbildung 3.29) wird ersichtlich, dass die mutierten COI1-Proteine nicht in der Lage sind, JA-Ile bzw. JAZ zu binden. Bezüglich der bekannten JA-abhängigen Prozesse (Fertilität, JA-Sensitivität des Wurzelwachstums, JA-Induktion der *JAZ10*-Expression), konnten mutierte *COI1*-Konstrukte den *coi1-16*-Phänotyp nicht komplementieren. Einige dieser von JA-Ile unabhängig agierenden COI1-Proteine sind in der Lage, ähnlich wie das Wildtypische, die Expression der *Phosphoglyceratmutase* zu reprimieren (Abbildung 3.32). Die Erwartung, dass wenn eine veränderte Bindestelle des COI1-Proteins keinen Einfluss auf die neue Funktion nehmen sollte, und damit ein JA-Ile unabhängig agierendes COI1-Protein ähnlich wie das wildtypische die Expression der *Phosphoglyceratmutase* reprimieren würde, wurde damit erfüllt. Mit diesen Analysen konnten die Untersuchungen der *aos*-Mutante bestätigt werden, da sowohl das COI1-Protein, das JA-Ile bindet, als auch solche, die das Hormon nicht mehr binden, die Expression der *Phosphoglyceratmutase* reprimieren. Mögliche Restmengen von JA-Ile in der *aos*-Mutante führen demnach nicht zur Ausprägung des Phänotyps.

Die Linie *35S:HA-COI1-382* zeigte in allen Analysen, dass das Protein bezüglich der JA-Ile-unabhängigen Funktionen (Fertilität, JA-Sensitivität des Wurzelwachstums und JA-Induktion der *JAZ10*-Expression; Abbildung 3.29 bzw. Repression der *Phosphoglyceratmutase*-Expression; Abbildung 3.32) funktional ist. Diese Mutante weist einen Austausch der Aminosäuren 382 – 387 auf. Hier wird ein in Angiospermen stark konserviertes Alanin gegen Leucin ausgetauscht. Ala384 formt zusammen mit Arg409 und Val441 die Bindung der Isoleucine-Seitenkette von JA-Ile. Ein Austausch dieser Position wird die Bindetasche vermutlich so stark verkleinert haben, dass JA-Ile nicht mehr binden kann. Das COI1-Protein aus dem Lebermoos *Marchantia*, das kein JA-Ile produziert und für das daher ein anderer Ligand postuliert wird, hat an dieser Stelle ein Valin (vgl. Abbildung 4.6). Weiterhin ist es möglich, dass der Austausch des Tyrosins an Stelle 386, das zusammen mit einem weiteren an der Bindung des Sauerstoffatoms der Amidgruppe von JA-Ile beteiligt ist (Yan et al., 2009), gegen ein Phenylalanin Auswirkungen auf die Bindefähigkeit hat. In jedem Fall muss an dieser Stelle eine aromatische Aminosäure vorliegen, denn OsCOI2, ein orthologes COI-Protein aus Reis (Lee et al., 2013), das nicht in der Lage ist, die *A. thaliana*-Mutante *coi1-1* zu komplementieren, besitzt an dieser Stelle ein Histidin. Ein mutiertes OsCOI2-Protein, in dem das Histidin gegen Tyrosin getauscht wurde (Lee et al., 2013), kann dagegen die *A. thaliana coi1*-Mutante bezüglich Fertilität und Wurzelwachstumshemmung durch MeJA komplementieren. Das scheinbar funktionslose OsCOI2-Protein ist jedoch Kandidat für die Vermittlung von JA-Ile unabhängige COI1-Funktionen.

Eine Suszeptibilität-vermittelnde JA-Ile-unabhängige Funktion von COI1 konnte aufgrund der immer wiederkehrenden Probleme mit den Leervektorkontrollen mit diesen Mutanten leider noch nicht be-

obachtet werden (Abbildung 3.34). Die RNA-Seq-Daten zweier segregierender Wildtypen haben gezeigt, dass eine unterschiedliche Historie Einfluss auf die Genexpression hat (Abbildung 3.6). Daher wurden Leervektorkontrollen angefertigt, um den Effekt der *Agrobakterien*-vermittelten Transformation zu berücksichtigen. In der Literatur ist bisher wenig über den Einfluss des Transformationsereignisses bekannt, daher ist der beobachtete Effekt der Leervektorkontrollen in dieser Arbeit, wie bspw. das MeJA-inhibierende Wurzelwachstum (Abbildung 3.29 (B)) oder auch die Symptomentwicklung nach *V. longisporum*-Infektion (Abbildung 3.34), nicht klar. Womöglich spielt es eine Rolle, dass Mutationen des JA-Signalweges analysiert werden, der in der Entwicklung und in das Wachstum von Pflanzen involviert ist. Hier scheinen epigenetische Ereignisse kritischere Auswirkungen zu haben, als in anderen Signalwegen. In Zukunft sollen Kreuzungen der mutierten *COI1*-Linien mit der *coi1-t*-Mutante hergestellt werden. Vielleicht kann das „Gedächtnis“ an die *Agrobakterium*-vermittelte Transformation durch die Kreuzung minimiert werden, so dass der bspw. erwartete tolerante Phänotyp der Leervektorkontrollen sich Generationen später wieder einstellen lässt.

4.4 Die ancestrale Funktion von COI1 zeigt Unabhängigkeit von weiteren Komponenten der JA-Signalkaskade

Anhand von Expressionsanalysen der *Phosphoglyceratmutase*, als Markergen der neuen JA-Ile unabhängigen *COI1*-Funktion, sollte die Frage beantwortet werden, wie ähnlich die neue Funktion von *COI1* der klassischen ist. Dazu erfolgten Genexpressionsanalysen in Linien mit Mutationen in *downstream* von *COI1* agierenden Proteinen. Neben der *Phosphoglyceratmutase* wurde ebenfalls die Expression der *ICS1* analysiert. Für das SA-Biosynthesegen ist in Blättern bereits bekannt, dass die klassische JA-Ile-induzierbare Funktion von *COI1* die Expression negativ beeinflusst (Zheng et al., 2012; Abbildung 4.7). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die *ICS1* und *Phosphoglyceratmutase* trotz gleichem Expressionsmuster in den RNA-Seq-Daten, und zwar erhöhte Expression in der *coi1*-Mutante gegenüber dem WT und der *aos*-Mutante, weiter *downstream* in Wurzeln unterschiedliche Regulationen der Expression aufweisen. Die Regulation der *ICS1* ist im Gegensatz zu der von der *Phosphoglyceratmutase* eindeutig abhängig vom NINJA-Protein (Abbildung 3.19).

Downstream von *COI1* agieren JAZ-Proteine in Abwesenheit von JA-Ile als Repressoren der JA-vermittelten Antwort. Die Abhängigkeit der neuen JA-Ile unabhängigen Funktion des *COI1*-Proteins von den JAZ-Proteinen wurde mit Hilfe der transgenen **35S:JAZ1Δ3-GUS**-Linie analysiert. Und obwohl das JAZ1Δ3-GUS-Konstrukt in der Lage ist, genügend JAZ-Proteine hinsichtlich der Resistenz

gegenüber MeJA-Wurzelwachstumsinhibierung (Abbildung 3.23) und reprimierter Fertilität (Abbildung 3.22 (A)) zu stabilisieren, wird anhand der Genexpression von *JAZ10* ersichtlich, dass *JAZ1Δ3-GUS* die induzierte Genexpression nach MeJA-Behandlung im WT nur in geringem Maße stört (Abbildung 3.21). Dies widerspricht der zuvor beschriebenen nur schwachen Induktion JA-responsiver Gene wie bspw. *VSP1* durch das Konstrukt (Thines et al., 2007). Der dominant-negative Effekt scheint nicht ausreichend zu sein, um genügend JAZ-Proteine zu stabilisieren, die zu einer Unterdrückung der basalen *JAZ10*-Promotoraktivität führen. Aufgrund dessen kann die Rolle von JAZ-Proteinen in der neuen JA-Ile-unabhängigen Funktion von COI1 hier nicht aufgeklärt werden. Auch mit Mutanten, die das deletierte JAZ unter der Kontrolle eines wurzelspezifischen Promotors tragen, und damit an dem Ort exprimieren, an dem das mobile Signal gebildet wird, konnte aufgrund des fehlenden Nachweises für die Funktionalität des Konstrukts (Abbildung 3.23) ihre Rolle nicht geklärt werden. Um eine fundierte Aussage treffen zu können, müssten Mutanten analysiert werden, die eine Mutation in mehr als nur einem JAZ-Protein der 13 Mitglieder aufweisen.

Doch aufgrund der vorher geführten Diskussion scheinen JAZ-Proteine wahrscheinlich an der neuen Funktion von COI1 beteiligt zu sein. Es könnte sogar gemutmaßt werden, dass die Proteine eine bisher nicht erkannte aktivierende Funktion besitzen (vgl. Abbildung 4.7). Die bekannte reprimierende Funktion von JAZ-Proteinen erfolgt nur, wenn zusätzliche Proteine rekrutiert werden wie TOPLESS, das entweder über EAR-Domänen direkt an JAZ bindet oder über das Adaptorprotein NINJA rekrutiert wird. Die Interaktion mit NINJA findet über TIFY-Domänen statt. Tatsächlich konnte erst kürzlich das 13. Mitglied der JAZ-Familie gefunden werden, welches anstelle der TIFY-Domäne ein NAFY-Motiv aufweist (Dr. Gregg Howe, persönliche Kommunikation). Ob die Aminosäureaustausche dazu führen, dass kein NINJA mehr gebunden werden kann, ist bisher nicht bekannt. Jedoch könnte die Rekrutierung reprimierender Kofaktoren ebenfalls erst im Laufe der Evolution entstanden sein, so dass die aktivierende Funktion von JAZ-Proteinen ebenfalls ancestrally zu erklären wäre. Zusammen mit einem Transkriptionsfaktor könnten dann stabilisierte JAZ-Proteine die Expression der *Phosphoglyceratmutase* direkt aktivieren. Da womöglich das ancestrale COI1-Protein schon die Funktion als Teil eines funktionalen E3-Ubiquitin-Ligasekomplexes übernimmt, basierend auf der Beobachtung der starken Interaktion von MpCOI und ASK2 (Dr. Joachim Uhrig, persönliche Kommunikation), würden die Aktivoren abgebaut werden und zur beobachteten, reduzierten Expression der *Phosphoglyceratmutase* führen.

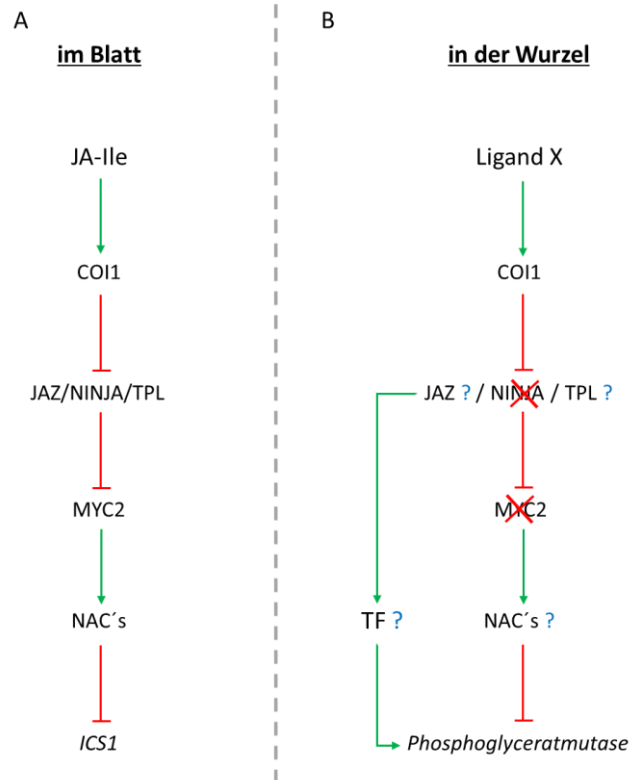


Abbildung 4.7 Signaltransduktion der *ICS1* und *Phosphoglyceratmutase* in unterschiedlichen Geweben

(A) Dargestellt ist die bekannte Signaltransduktion der *ICS1* in Blättern. **(B)** Darstellung der Signaltransduktion der *Phosphoglyceratmutase* in Wurzeln. Im Gegensatz zum klassischen Weg der JA-Signaltransduktion verläuft diese unabhängig von NINJA und MYC. Stabilisierte JAZ-Proteine könnten in die positive Regulierung der *Phosphoglyceratmutase* involviert sein.

JAZ-Proteine erhalten ihre vollständige reprimierende Funktion durch die Rekrutierung des Co-Repressors TOPLESS (TPL), der meist über das Adaptorprotein *NOVEL INTERACTOR OF JAZ* (**NINJA**) gebunden wird. Während die Expression der *ICS1* eindeutig durch die Mutation im NINJA-Allel beeinflusst wird, unterscheidet sich die erhöhte Expression der *Phosphoglyceratmutase* in der *coi1-1*-Mutante nicht von der Transkriptmenge in der Doppelmutante *coi1-1 x ninja* (Abbildung 3.19). Dies weist auf einen klaren Unterschied in der Regulation der *Phosphoglyceratmutase* gegenüber *ICS1* hin (Abbildung 4.7 (B)). Da es Proteine der JAZ-Familie gibt, die Topless direkt rekrutieren und das Adaptorprotein NINJA nicht benötigen, kann durch die Unabhängigkeit von NINJA, der neuen JA-Ile unabhängigen Funktion von COI1, nicht auf die Unabhängigkeit der JAZ-Proteine geschlossen werden.

In Anwesenheit von JA-Ile kommt es zum Abbau der JAZ-Repressor-Proteine über das 26S-Proteasom und zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Ein direkter Interaktionspartner für JAZ-Proteine wurde in den **MYC-Transkriptionsfaktoren** gefunden (Chini et al., 2007; Fernández-Calvo et al., 2011). Die Expression der *Phosphoglyceratmutase* unterscheidet sich in der *myc2,3,4*

nicht von der Expression in Col-0 und der *aos*-Mutante, ist jedoch signifikant in der *coi1-16*-Mutante erhöht (Abbildung 3.18). Als Aktivatoren des JA-Weges, genau wie COI1, wäre bei einer MYC-abhängigen Regulierung der Genexpression der gleiche Phänotyp bei *coi1* und *myc2,3,4* erwartet worden. Es konnte demnach gezeigt werden, dass die Genexpression der *Phosphoglyceratmutase* nicht nur unabhängig von JA-Ile und NINJA ist, sondern ebenfalls unabhängig von MYC2,3,4 über COI1 reguliert wird. Eine Aussage über die unterschiedliche Regulierung der *ICS1*- und *Phosphoglyceratmutase*-Expression bezüglich MYC2,3,4, kann aufgrund geringer Effekte für die *ICS1* schwer getroffen werden (Abbildung 3.18).

Weiter downstream in der für Blätter bekannten JA-Signalkaskade veranlasst MYC2 die Transkription von **NAC-Faktoren**, die die SA-Biosynthese durch direkte Interaktion mit dem Promotor der *ICS1* unterdrücken (Zheng et al., 2012). Die schwache Auflösung der RNA-Seq-Analyse lieferte keine NAC-ähnlichen Transkriptionsfaktoren, die möglicherweise an der Regulation der Genexpression beteiligt sein könnten. Transkriptionsfaktoren, die entweder eine erhöhte oder reduzierte Expression in der *coi1-t*-Mutante zeigen und damit potentiell die Aufgabe von MYC's und NAC's übernehmen können, konnten in den Daten der RNA-Seq nicht gefunden werden.

Letztendlich konnte für die *Phosphoglyceratmutase* eine neuartige Regulation der Genexpression durch COI1, vermutlich zusammen mit JAZ gezeigt werden, die unabhängig von anderen bekannten Komponenten, wie NINJA und MYC2,3,4, des klassischen JA-Signalweges ist (Abbildung 4.7 (B)).

5 Literaturverzeichnis

- Acosta, I.F., Gasperini, D., Chételat, A., Stolz, S., Santuari, L., and Farmer, E.E.** (2013). Role of NINJA in root jasmonate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (38): 15473–15478.
- Adams, E., and Turner, J.** (2010). COI1, a jasmonate receptor, is involved in ethylene-induced inhibition of Arabidopsis root growth in the light. *Journal of experimental botany* **61** (15): 4373–4386.
- Albers, E., Laize, V., Blomberg, A., Hohmann, S., and Gustafsson, L.** (2003). Ser3p (Yer081wp) and Ser33p (Yil074cp) are phosphoglycerate dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278** (12): 10264–10272.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C., and Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301** (5633): 653–657.
- An, C., and Mou, Z.** (2011). Salicylic acid and its function in plant immunity. *Journal of integrative plant biology* **53** (6): 412–428.
- Anders, S., and Huber, W.** (2010). Differential expression analysis for sequence count data. *Genome biology* **11** (10): R106.
- Arabidopsis Interactome Mapping Consortium** (2011). Evidence for network evolution in an *Arabidopsis* interactome map. *Science* **333** (6042): 601–607.
- Barbara, D.J., and Clewes, E.** (2003). Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? *Molecular plant pathology* **4** (4): 297–305.
- Beckman, C.H.** (1987). *The nature of wilt diseases of plants* (St. Paul, Minn.: APS Press).
- Berlanger, I., and Powelson, M.L.** (2000). *Verticillium wilt*. PHI.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., and Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29** (1): 23–32.
- Birnboim, H.C., and Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* **7** (6): 1513–1523.
- Bishop, C.D., and Cooper, R.M.** (1983). An ultrastructural study of root invasion in three vascular wilt diseases. *Physiological Plant Pathology* **22** (1): 15–IN13.

- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., and Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9** (9): 1573–1584.
- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Schaller, F., Stintzi, A., Schaller, A., Huber, R., Macheroux, P., and Clausen, T.** (2009). Structural basis of substrate specificity of plant 12-oxophytodienoate reductases. *Journal of molecular biology* **392** (5): 1266–1277.
- Briesemeister, S., Rahnenführer, J., and Kohlbacher, O.** (2010). YLoc-an interpretable web server for predicting subcellular localization. *Nucleic acids research* **38** (Web Server issue): W497-502.
- Browse, J.** (2005). Jasmonate: An Oxylinin Signal with Many Roles in Plants. In *Plant Hormones* (Elsevier), pp. 431–456.
- Bu, Q., Jiang, H., Li, C.-B., Zhai, Q., Zhang, J., Wu, X., Sun, J., Xie, Q., and Li, C.** (2008). Role of the *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factors ANAC019 and ANAC055 in regulating jasmonic acid-signaled defense responses. *Cell research* **18** (7): 756–767.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **6** (11): 1583–1592.
- Causier, B., Ashworth, M., Guo, W., and Davies, B.** (2012). The TOPLESS interactome: a framework for gene repression in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **158** (1): 423–438.
- Chanda, B., Xia, Y., Mandal, M.K., Yu, K., Sekine, K.-T., Gao, Q.-m., Selote, D., Hu, Y., Stromberg, A., Navarre, D., Kachroo, A., and Kachroo, P.** (2011). Glycerol-3-phosphate is a critical mobile inducer of systemic immunity in plants. *Nature genetics* **43** (5): 421–427.
- Chatterjee, S., Chaudhury, S., McShan, A.C., Kaur, K., and De Guzman, Roberto N** (2013). Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. *Biochemistry* **52** (15): 2508–2517.
- Chaturvedi, R., Venables, B., Petros, R.A., Nalam, V., Li, M., Wang, X., Takemoto, L.J., and Shah, J.** (2012). An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *The Plant journal for cell and molecular biology* **71** (1): 161–172.
- Chauvin, A., Caldelari, D., Wolfender, J.-L., and Farmer, E.E.** (2013). Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *The New phytologist* **197** (2): 566–575.
- Chen, Z., Zheng, Z., Huang, J., Lai, Z., and Fan, B.** (2009). Biosynthesis of salicylic acid in plants. *Plant Signal Behav* **4** (6): 493–496.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., and Xie, D.** (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Molecular plant* **4** (2): 279–288.

- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-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** (7154): 666–671.
- Chomczynski, P.** (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15** (3): 532-4, 536-7.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal for cell and molecular biology* **16** (6): 735–743.
- Cole, S.J., and Diener, A.C.** (2013). Diversity in receptor-like kinase genes is a major determinant of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthioli*. *The New phytologist* **200** (1): 172–184.
- Daayf, F., Nicole, M., Boher, B., Pando, A., and Geiger, J.P.** (1997). Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* **103** (2): 125–136.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411** (6839): 826–833.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W., Van Der Straeten, Dominique, Manners, J., Dennis, E.S., and Dolferus, R.** (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*. *Plant J* **43** (5): 745–757.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., and Klessig, D.F.** (2011). Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **9**: e0156.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *The Plant journal for cell and molecular biology* **32** (4): 457–466.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435** (7041): 441–445.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1** (4): 316–323.
- Drübert, C.** (2011). Funktionelle Charakterisierung von apoplastischen Proteinen in *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Verticillium longisporum* (Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen).
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual review of phytopathology* **42**: 185–209.

- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research* **19** (6): 1349.
- Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I.I., Bals, T., Juenger, M., Pollmann, S., Berger, S., Schuenemann, D., and Mueller, M.J.** (2010). DONGLE and DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis: redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant physiology* **153** (1): 114–127.
- Ellis, C., and Turner, J.G.** (2002). A conditionally fertile *coi1* allele indicates cross-talk between plant hormone signalling pathways in *Arabidopsis thaliana* seeds and young seedlings. *Planta* **215** (4): 549–556.
- Eynck, C.** (2007). Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18** (3): 265–276.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J.-M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., Eeckhout, D., Schweizer, F., Godoy, M., Franco-Zorrilla, J.M., Pauwels, L., Witters, E., Puga, M.I., Paz-Ares, J., Goossens, A., Reymond, P., Jaeger, G. de, and Solano, R.** (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant cell* **23** (2): 701–715.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *The Plant cell* **6** (5): 751–759.
- Floerl, S., Druebert, C., Majcherczyk, A., Karlovsky, P., Kues, U., and Polle, A.** (2008). Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biol* **8**: 129.
- Fradin, E.F., and Thomma, B.** (2006). Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol* **7** (2): 71–86.
- Fradin, E.F., Zhang, Z., Rovenich, H., Song, Y., Liebrand, Thomas W H, Masini, L., van den Berg, Grady C M, Joosten, Matthieu H A J, and Thomma, Bart P H J** (2014). Functional analysis of the tomato immune receptor Ve1 through domain swaps with its non-functional homolog Ve2. *PLoS One* **9** (2): e88208.
- Franke, R., and Schreiber, L.** (2007). Suberin - a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current opinion in plant biology* **10** (3): 252–259.

- Garcion, C., Lohmann, A., Lamodièrre, E., Catinot, J., Buchala, A., Doermann, P., and Métraux, J.-P.** (2008). Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of *Arabidopsis*. *Plant physiology* **147** (3): 1279–1287.
- 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** (2): 317–319.
- Gietz, R.D., and Woods** (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in enzymology* **350**: 87–96.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual review of phytopathology* **43**: 205–227.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7** (6): 251–256.
- Govrin, E.M., and Levine, A.** (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current biology CB* **10** (13): 751–757.
- Greenberg, J.T., and Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6** (3): 201–211.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* **166** (4): 557–580.
- Hannah, M.A., Heyer, A.G., and Hinch, D.K.** (2005). A global survey of gene regulation during cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS genetics* **1** (2): e26.
- Hartley, J.L., Temple, G.F., and Brasch, M.A.** (2000). DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome research* **10** (11): 1788–1795.
- Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current opinion in plant biology* **3** (4): 315–319.
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lucking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, R., Aime, M.C., Aptroot, A., Bauer, R., Begerow, D., Benny, G.L., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Dai, Y.-C., Gams, W., Geiser, D.M., Griffith, G.W., Gueidan, C., Hawksworth, D.L., Hestmark, G., Hosaka, K., Humber, R.A., Hyde, K.D., Ironside, J.E., Koljalg, U., Kurtzman, C.P., Larsson, K.-H., Lichtwardt, R., Longcore, J., Miadlikowska, J., Miller, A., Moncalvo, J.-M., Mozley-Standridge, S., Oberwinkler, F., Parmasto, E., Reeb, V., Rogers, J.D., Roux, C., Ryvarden, L., Sampaio, J.P., Schussler, A., Sugiyama, J., Thorn, R.G., Tibell, L., Untereiner, W.A., Walker, C., Wang, Z., Weir,**

- A., Weiss, M., White, M.M., Winka, K., Yao, Y.-J., and Zhang, N.** (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol Res* **111** (Pt 5): 509–547.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., and Pease, L.R.** (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77** (1): 51–59.
- Hou, X., Lee, Li Yen Candy, Xia, K., Yan, Y., and Yu, H.** (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Developmental cell* **19** (6): 884–894.
- Howe, G.A.** (2001). Cyclopentenone signals for plant defense: remodeling the jasmonic acid response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (22): 12317–12319.
- Hruz, T., Laule, O., Szabo, G., Wessendorp, F., Bleuler, S., Oertle, L., Widmayer, P., Gruissem, W., and Zimmermann, P.** (2008). Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in bioinformatics* **2008**: 420747.
- Inderbitzin, P., Bostock, R.M., Davis, R.M., Usami, T., Platt, H.W., and Subbarao, K.V.** (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS one* **6** (12): e28341.
- Iven, T.** (2009). *Transkriptomanalyse der Arabidopsis-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort* (Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek).
- Iven, T., König, S., Singh, S., Braus-Stromeier, S.A., Bischoff, M., Tietze, L.F., Braus, G.H., Lipka, V., Feussner, I., and Dröge-Laser, W.** (2012). Transcriptional activation and production of tryptophan-derived secondary metabolites in arabidopsis roots contributes to the defense against the fungal vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Molecular plant* **5** (6): 1389–1402.
- James, P., Halladay, J., and Craig, E.A.** (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144** (4): 1425–1436.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* **6** (13): 3901–3907.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444** (7117): 323–329.
- Joosten, M., and de Wit, P.** (1999). THE TOMATO-CLADOSPORIUM FULVUM INTERACTION: A Versatile Experimental System to Study Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Phytopathol* **37**: 335–367.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., and Greenberg, J.T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* **324** (5923): 89–91.
- Karapapa, V.K., Bainbridge, B.W., and Heale, J.B.** (1997). Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* **101** (11): 1281–1294.

- Kawchuk, L.M., Hachey, J., Lynch, D.R., Kulcsar, F., van Rooijen, G., Waterer, D.R., Robertson, A., Kokko, E., Byers, R., Howard, R.J., Fischer, R., and Pruffer, D.** (2001). Tomato Ve disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (11): 6511–6515.
- Kienow, L., Schneider, K., Bartsch, M., Stuible, H.-P., Weng, H., Miersch, O., Wasternack, C., and Kombrink, E.** (2008). Jasmonates meet fatty acids: functional analysis of a new acyl-coenzyme A synthetase family from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* **59** (2): 403–419.
- Klosterman, S.J., Subbarao, K.V., Kang, S., Veronese, P., Gold, S.E., Thomma, Bart P H J, Chen, Z., Henrissat, B., Lee, Y.-H., Park, J., Garcia-Pedrajas, M.D., Barbara, D.J., Anchieta, A., Jonge, R. de, Santhanam, P., Maruthachalam, K., Atallah, Z., Amyotte, S.G., Paz, Z., Inderbitzin, P., Hayes, R.J., Heiman, D.I., Young, S., Zeng, Q., Engels, R., Galagan, J., Cuomo, C.A., Dobinson, K.F., and Ma, L.-J.** (2011). Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS pathogens* **7** (7): e1002137.
- Koeck, M., Hardham, A.R., and Dodds, P.N.** (2011). The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection. *Cellular microbiology* **13** (12): 1849–1857.
- Kombrink, E.** (2012). Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths. *Planta* **236** (5): 1351–1366.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular genetics and genomics MGG* **204** (1986): 383–396.
- Kruijt, M., DE Kock, Maarten J D, and de Wit, Pierre J G M** (2005). Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular plant pathology* **6** (1): 85–97.
- Kunkel, B.N., and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5** (4): 325–331.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *Journal of biochemical and biophysical methods* **10** (3-4): 203–209.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (5259): 680–685.
- Lee, H.Y., Seo, J.-S., Cho, J.H., Jung, H., Kim, J.-K., Lee, J.S., Rhee, S., and Do Choi, Y.** (2013). *Oryza sativa* COI homologues restore jasmonate signal transduction in *Arabidopsis coi1-1* mutants. *PLoS One* **8** (1): e52802.
- Liebrand, T., van den Berg, Grady C M, Zhang, Z., Smit, P., Cordewener, Jan H G, America, Antoine H P, Sklenar, J., Jones, Alexandra M E, Tameling, Wladimir I L, Robatzek, S., Thomma, Bart P H J, and Joosten, Matthieu H A J** (2013). Receptor-like kinase SOBIR1/EVR interacts with receptor-

- like proteins in plant immunity against fungal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** (24): 10010–10015.
- Lipka, U., Fuchs, R., and Lipka, V.** (2008). Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Current opinion in plant biology* **11** (4): 404–411.
- Lohse, M., Bolger, A.M., Nagel, A., Fernie, A.R., Lunn, J.E., Stitt, M., and Usadel, B.** (2012). RobiNA: a user-friendly, integrated software solution for RNA-Seq-based transcriptomics. *Nucleic acids research* **40** (Web Server issue): W622-7.
- Long, J.A., Ohno, C., Smith, Z.R., and Meyerowitz, E.M.** (2006). TOPLESS regulates apical embryonic fate in Arabidopsis. *Science* **312** (5779): 1520–1523.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-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. *The Plant cell* **16** (7): 1938–1950.
- 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** (1): 165–178.
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., and Raskin, I.** (1990). Salicylic Acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* **250** (4983): 1002–1004.
- Martin, F.N.** (2003). Development of alternative strategies for management of soilborne pathogens currently controlled with methyl bromide. *Annu Rev Phytopathol* **41**: 325–350.
- McConn, M., and Browse, J.** (1996). The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an Arabidopsis Mutant. *The Plant cell* **8** (3): 403–416.
- Meier, A.** (2015). Transkriptionelle Regulation des pflanzlichen Detoxifikationsprogramms durch das GRAS-Protein SCL14 (Göttingen; Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek)
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I., and Heilmann, I.** (2011). Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal for cell and molecular biology* **65** (6): 949–957.
- Mou, Z., Fan, W., and Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113** (7): 935–944.
- Mülhardt, C.** (2009). *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics* (Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag).
- 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** (8): 1393–1404.

- Ndunguru, J., Taylor, N.J., Yadav, J., Aly, H., Legg, J.P., Aveling, T., Thompson, G., and Fauquet, C.M.** (2005). Application of FTA technology for sampling, recovery and molecular characterization of viral pathogens and virus-derived transgenes from plant tissues. *Virology journal* **2**: 45.
- Neumann, M.J., and Dobinson, K.F.** (2003). Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal genetics and biology FG & B* **38** (1): 54–62.
- Nitz, I., Berkefeld, H., Puzio, P.S., and Grundler, F.M.** (2001). *Pyk10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **161** (2): 337–346.
- Niu, Y., Figueroa, P., and Browse, J.** (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* **62** (6): 2143–2154.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological reviews* **198**: 249–266.
- Nürnberg, T., and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular plant pathology* **6** (3): 335–345.
- Olsson, S.** (1985). Microsclerotial germination of *Verticillium dahliae* as affected by rape rhizosphere. *FEMS Microbiology Letters* **31** (5): 293–299.
- 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** (3): 483–493.
- Park, J.-H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* **31** (1): 1–12.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F.** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318** (5847): 113–116.
- Pauwels, L., Barbero, G.F., Geerinck, J., Tilleman, S., Grunewald, W., Perez, A.C., Chico, J.M., Bossche, R.V., Sewell, J., Gil, E., Garcia-Casado, G., Witters, E., Inze, D., Long, J.A., Jaeger, G. de Solano, R., and Goossens, A.** (2010). NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* **464** (7289): 788–791.
- Pauwels, L., and Goossens, A.** (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *Plant Cell* **23** (9): 3089–3100.
- Pegg, G.F., and Brady, B.L.** (2002). *Verticillium wilts* (Wallingford, Oxon, UK, New York: CABI Pub.).

- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., 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** (12): 2103–2113.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103** (7): 1111–1120.
- Petre, B., and Kamoun, S.** (2014). How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells? *PLoS biology* **12** (2): e1001801.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J.** (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6** (1): 9–20.
- Pieterse, C., Leon-Reyes, A., Van der Ent, Sjoerd, and Van Wees, Saskia C M** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature chemical biology* **5** (5): 308–316.
- Ponce De León, I., Schmelz, E.A., Gaggero, C., Castro, A., Álvarez, A., and Montesano, M.** (2012). *Physcomitrella patens* activates reinforcement of the cell wall, programmed cell death and accumulation of evolutionary conserved defence signals, such as salicylic acid and 12-oxo-phytodienoic acid, but not jasmonic acid, upon *Botrytis cinerea* infection. *Molecular plant pathology* **13** (8): 960–974.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., Vos, M. de, Pieterse, Corne M J, and Memelink, J.** (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147** (3): 1347–1357.
- Ralhan, A.** (2013). The role of defense signaling pathways in the interaction of *Arabidopsis thaliana* and *Verticillium longisporum* (Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen).
- Ralhan, A., Schöttle, S., Thurow, C., Iven, T., Feussner, I., Polle, A., and Gatz, C.** (2012). The vascular pathogen *Verticillium longisporum* requires a jasmonic acid-independent COI1 function in roots to elicit disease symptoms in *Arabidopsis* shoots. *Plant physiology* **159** (3): 1192–1203.
- Reusche, M.** (2011). Analyse der *Verticillium longisporum* induzierten Seneszenz und Transdifferenzierung in *Arabidopsis thaliana* (Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek Göttingen).
- Reusche, M., Thole, K., Janz, D., Truskina, J., Rindfleisch, S., Drübert, C., Polle, A., Lipka, V., and Teichmann, T.** (2012). *Verticillium* infection triggers VASCULAR-RELATED NAC DOMAIN7-dependent de novo xylem formation and enhances drought tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24** (9): 3823–3837.

- 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** (5): 707–720.
- Rhee, S.Y., Beavis, W., Berardini, T.Z., Chen, G., Dixon, D., Doyle, A., Garcia-Hernandez, M., Huala, E., Lander, G., Montoya, M., Miller, N., Mueller, L.A., Mundodi, S., Reiser, L., Tacklind, J., Weems, D.C., Wu, Y., Xu, I., Yoo, D., Yoon, J., and Zhang, P.** (2003). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic acids research* **31** (1): 224–228.
- Robb, J., Powell, D.A., and Street, P. F. S.** (1989). Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in Verticillium wilt of tomato. *Can. J. Bot.* **67** (2): 600–607.
- Roos, J., Bejai, S., Mozūraitis, R., and Dixelius, C.** (2015). Susceptibility to Verticillium longisporum is linked to monoterpene production by TPS23/27 in Arabidopsis. *The Plant journal for cell and molecular biology* **81** (4): 572–585.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230** (4732): 1350–1354.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74** (12): 5463–5467.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J.** (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols* **3** (6): 1101–1108.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods* **9** (7): 671–675.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, Eric, Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W.B., Flügge, U.-I., and Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins. *Plant physiology* **131** (1): 16–26.
- Senthil-Kumar, M., and Mysore, K.S.** (2013). Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. *Annual review of phytopathology* **51**: 407–427.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.J., Lee, Y.H., Lee, Y.W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D.** (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (8): 4788–4793.
- Sharp, P.A., Sugden, B., and Sambrook, J.** (1973). Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* **12** (16): 3055–3063.

- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A., and Zheng, N.** (2010). Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature* **468** (7322): 400–405.
- Shyu, C., Figueroa, P., Depew, C.L., Cooke, T.F., Sheard, L.B., Moreno, J.E., Katsir, L., Zheng, N., Browse, J., and Howe, G.A.** (2012). JAZ8 lacks a canonical degron and has an EAR motif that mediates transcriptional repression of jasmonate responses in Arabidopsis. *The Plant cell* **24** (2): 536–550.
- Song, S., Qi, T., Huang, H., Ren, Q., Wu, D., Chang, C., Peng, W., Liu, Y., Peng, J., and Xie, D.** (2011). The Jasmonate-ZIM domain proteins interact with the R2R3-MYB transcription factors MYB21 and MYB24 to affect Jasmonate-regulated stamen development in Arabidopsis. *The Plant cell* **23** (3): 1000–1013.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, Susanne M C, Korzelius, J.P., Van Pelt, Johan A, Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L C, Dong, X., and Pieterse, Corne M J** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15** (3): 760–770.
- Staswick, P.E., Su, W., and Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** (15): 6837–6840.
- Staswick, P.E., and Tiryaki, I.** (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16** (8): 2117–2127.
- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I., and Wasternack, C.** (2003). Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of Arabidopsis thaliana. *Plant molecular biology* **51** (6): 895–911.
- Steventon, L.A., Okori, P., and Dixelius, C.** (2001). An Investigation of the Susceptibility of Arabidopsis thaliana to Isolates of Two Species of Verticillium. *Journal of phytopathology* **149** (7-8): 395–401.
- Stumpe, M., Göbel, C., Faltin, B., Beike, A.K., Hause, B., Himmelsbach, K., Bode, J., Kramell, R., Wasternack, C., Frank, W., Reski, R., and Feussner, I.** (2010). The moss Physcomitrella patens contains cyclopentenones but no jasmonates: mutations in allene oxide cyclase lead to reduced fertility and altered sporophyte morphology. *The New phytologist* **188** (3): 740–749.
- Szemenyei, H., Hannon, M., and Long, J.A.** (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science* **319** (5868): 1384–1386.

- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., and Dong, X.** (2008). Plant immunity requires conformational changes corrected of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321** (5891): 952–956.
- Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., and Matsui, M.** (2004). Expression and interaction analysis of Arabidopsis Skp1-related genes. *Plant & cell physiology* **45** (1): 83–91.
- Talboys, P.W.** (1972). Resistance to Vascular Wilt Fungi. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **181** (1064): 319–332.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S.** (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular biology and evolution* **24** (8): 1596–1599.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, Luz Irina A, Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C.V., Estelle, M., and Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446** (7136): 640–645.
- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., and Conesa, A.** (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome research* **21** (12): 2213–2223.
- Thatcher, L.F., Manners, J.M., and Kazan, K.** (2009). *Fusarium oxysporum* hijacks COI1-mediated jasmonate signaling to promote disease development in Arabidopsis. *The Plant journal for cell and molecular biology* **58** (6): 927–939.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448** (7154): 661–665.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., and Katagiri, F.** (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS genetics* **5** (12): e1000772.
- Vanholme, B., Grunewald, W., Bateman, A., Kohchi, T., and Gheysen, G.** (2007). The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci* **12** (6): 239–244.
- Veronese, P., Narasimhan, M.L., Stevenson, R.A., Zhu, J.-K., Weller, S.C., Subbarao, K.V., and Bressan, R.A.** (2003). Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **35** (5): 574–587.
- Vleeshouwers, V., and Oliver, R.P.** (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *MPMI* **27** (3): 196–206.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology* **47**: 177–206.

- 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** (1): 187–192.
- Wager, A., and Browse, J.** (2012). Social Network: JAZ Protein Interactions Expand Our Knowledge of Jasmonate Signaling. *Frontiers in plant science* **3**: 41.
- Wang, C., Liu, Y., Li, S.-S., and Han, G.-Z.** (2015). Insights into the origin and evolution of the plant hormone signaling machinery. *Plant physiology* **167** (3): 872–886.
- Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot* **100** (4): 681–697.
- Weiberg, A.** (2008). Identification of genes induced in the vascular pathogen *Verticillium longisporum* by xylem sap metabolites of *Brassica napus* using an improved genome-wide quantitative cDNA-AFLP (Göttingen: Niedersächsische Staats- und Universitätsbibliothek).
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., and Bublitz, F.** (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS letters* **345** (1): 9–13.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L., and Birch, Paul R J** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* **450** (7166): 115–118.
- 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** (6863): 562–565.
- 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 (New York, N.Y.)* **280** (5366): 1091–1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W.L., Ma, H., Peng, W., Huang, D., and Xie, D.** (2002). The SCF(COI1) ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *The Plant cell* **14** (8): 1919–1935.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., and Xie, D.** (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant cell* **21** (8): 2220–2236.
- Yan, Y., Eli Borrego, and Michael V. Kolomiets** (2013). *Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses* (INTECH Open Access Publisher).

- Yan, Y., 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** (8): 2470–2483.
- Zander, M., La Camera, S., Lamotte, O., Métraux, J.-P., and Gatz, C.** (2010). Arabidopsis thaliana class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *The Plant journal for cell and molecular biology* **61** (2): 200–210.
- Zeise, K., and Tiedemann, A. von** (2002). Host Specialization among Vegetative Compatibility Groups of *Verticillium dahliae* in Relation to *Verticillium longisporum*. *Journal of phytopathology* **150** (3): 112–119.
- Zhang, Z., Song, Y., Liu, C.-M., and Thomma, Bart P H J** (2014). Mutational analysis of the Ve1 immune receptor that mediates *Verticillium* resistance in tomato. *PLoS One* **9** (6): e99511.
- Zheng, X.-Y., Spivey, N.W., Zeng, W., Liu, P.-P., Fu, Z.Q., Klessig, D.F., He, S.Y., and Dong, X.** (2012). Coronatine promotes *Pseudomonas syringae* virulence in plants by activating a signaling cascade that inhibits salicylic acid accumulation. *Cell host & microbe* **11** (6): 587–596.
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., and Wu, K.** (2005). HISTONE DEACETYLASE19 is involved in jasmonic acid and ethylene signaling of pathogen response in Arabidopsis. *Plant Cell* **17** (4): 1196–1204.
- Zhou, L., Hu, Q., Johansson, A., and Dixelius, C.** (2006). *Verticillium longisporum* and *V. dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. *Plant Pathology* **55** (1): 137–144.

6 Anhang

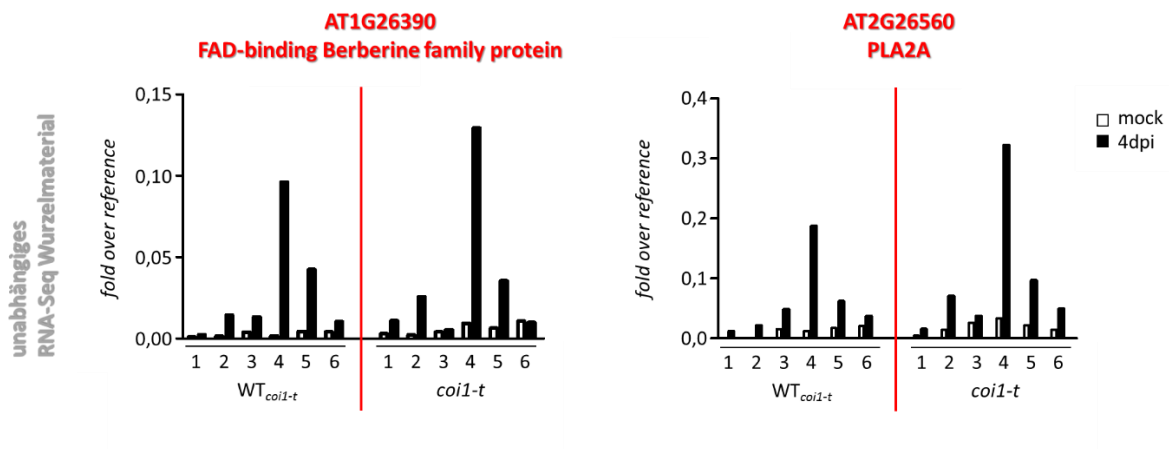


Abbildung 6.1 Quantitative RT-PCR von *V. longisporum*-induzierten Genen in Wurzeln weiterer Replikate von WT_{coi1-t} und *coi1-t* 4 Tage nach Infektion (dpi)

$\Delta\Delta$ CT-Werte von AT1G26390 und AT2G26560 in Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen von WT_{coi1-t} und *coi1-t* vier Tage nach mock- und *V. longisporum*-Infektion von je 6 unabhängigen Replikaten. Die Replikate von WT_{coi1-t} und *coi1-t* bestehen aus 33 Wurzeln. *Fold over reference* Werte der einzelnen Replikate wurden gegen die Expression von *UBQ5* normalisiert.

Tabelle 6.1 609 Gene die in infizierten Pflanzen (WT_{aos}, *aos*, WT_{coi1-t} und *coi1-t*) gegenüber *V.I.43-GFP* mindestens 4-fach induziert sind und einen FDR < 0,05 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	<i>V.I.43-GFP</i> vs. WT _{aos} inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. <i>aos</i> inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. WT _{coi1-t} inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. <i>coi1-t</i> inf		AGI-Code	Genname	<i>V.I.43-GFP</i> vs. WT _{aos} inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. <i>aos</i> inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. WT _{coi1-t} inf		<i>V.I.43-GFP</i> vs. <i>coi1-t</i> inf	
		log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.			log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.
VDAG08159	hypothetical protein	3,15	5E-03	3,01	3E-02	2,94	4E-02	2,52	5E-02	VDAG08958	chaperone protein hchA	2,14	6E-03	2,09	2E-04	2,71	1E-06	2,43	2E-06
VDAG02065	TRI14 protein	5,71	1E-04	5,63	5E-04	4,55	4E-02	3,83	4E-02	VDAG04670	hypothetical protein	2,95	7E-05	2,74	9E-04	3,24	4E-06	3,33	2E-06
VDAG01516	hypothetical protein	3,37	1E-02	3,78	1E-02	3,06	3E-02	2,98	4E-02	VDAG04759	allantoate permease	2,72	1E-03	3,04	9E-06	2,88	2E-05	3,04	2E-06
VDAG01891	hypothetical protein	3,08	1E-03	3,02	2E-02	2,54	2E-02	2,38	4E-02	VDAG07223	quinone oxidoreductase	5,54	3E-10	5,33	3E-06	5,41	4E-07	5,47	1E-06
VDAG02908	secretory phospholipase A2	7,51	7E-03	7,73	2E-02	6,85	4E-02	6,27	4E-02	VDAG07622	fasciclin domain family	5,13	2E-08	5,15	7E-08	4,61	6E-05	4,83	1E-06
VDAG07273	leucyl aminopeptidase	4,97	2E-04	4,97	3E-03	4,39	7E-03	3,71	4E-02	VDAG09492	2-oxoglutarate-dependent ethylene/succinate-forming enzyme	3,91	1E-08	3,94	6E-06	3,18	6E-05	3,70	1E-06
VDAG02938	hypothetical protein	2,39	3E-02	2,50	4E-02	2,47	1E-02	2,32	4E-02	VDAG08672	hypothetical protein	3,89	4E-05	3,68	2E-04	4,14	3E-05	4,22	1E-06
VDAG05224	hypothetical protein	7,60	3E-03	7,30	3E-02	6,44	2E-02	6,17	4E-02	VDAG07583	phosphate-repressible phosphate permease	2,73	5E-09	2,74	9E-09	2,25	7E-06	2,47	1E-06
VDAG08320	hypothetical protein	2,66	3E-02	3,07	7E-03	2,64	5E-02	2,44	3E-02	VDAG03329	hypothetical protein	2,80	9E-03	3,26	2E-04	3,49	7E-06	3,49	1E-06
VDAG03253	hypothetical protein	6,30	3E-05	5,46	3E-03	4,99	1E-02	4,07	3E-02	VDAG09108	U-box domain containing protein	3,02	1E-09	3,00	1E-07	2,73	6E-06	2,68	1E-06

VDAG10393	taurine catabolism di- oxygenase TauD	3,94	2E-03	3,71	2E-02	2,68	5E-02	2,99	3E-02	VDAG05641	hypothetical protein	5,01	9E-10	5,33	2E-10	4,93	2E-07	4,70	9E-07
VDAG03343	hypothetical protein	4,02	1E-02	3,61	3E-03	3,59	1E-02	3,50	3E-02	VDAG06447	vacuolar membrane zinc transporter	2,51	2E-06	2,43	9E-06	2,77	2E-08	2,65	9E-07
VDAG05094	FAD binding domain-con- taining protein	4,99	4E-06	4,82	1E-04	4,48	3E-03	3,74	3E-02	VDAG03252	glycine-rich RNA- binding protein	2,81	1E-08	2,74	3E-08	2,52	1E-06	2,37	8E-07
VDAG00932	hypothetical protein	5,38	2E-02	5,31	3E-02	5,29	3E-02	5,27	3E-02	VDAG05959	hypothetical protein	2,35	6E-03	2,41	3E-04	3,08	5E-07	2,90	8E-07
VDAG03943	cyclopentanone 1,2- monooxygenase	7,23	8E-03	6,99	7E-03	5,68	4E-02	5,96	3E-02	VDAG08619	hypothetical protein	2,72	8E-06	2,60	5E-07	2,64	8E-07	2,64	7E-07
VDAG03472	hypothetical protein	7,53	1E-02	6,72	5E-02	7,58	8E-03	6,68	3E-02	VDAG09295	hypothetical protein	11,23	2E-08	11,35	1E-06	10,87	6E-07	10,65	7E-07
VDAG07969	secreted glucosidase	6,82	2E-02	6,62	1E-02	7,00	3E-02	6,50	2E-02	VDAG05074	hypothetical protein	2,09	5E-03	2,32	6E-05	2,80	1E-07	2,58	7E-07
VDAG07494	secreted protein	5,92	2E-04	5,67	2E-02	6,09	2E-03	5,10	2E-02	VDAG01180	ankyrin repeat protein	5,81	9E-05	5,05	2E-03	6,22	4E-05	6,07	7E-07
VDAG03942	beta-lactamase family protein	6,57	5E-03	6,34	6E-03	5,06	4E-02	5,33	2E-02	VDAG08050	kelch repeat protein	4,88	3E-08	4,41	3E-06	4,67	1E-05	4,51	6E-07
VDAG07562	hypothetical protein	2,29	2E-02	2,21	9E-03	2,25	9E-03	2,01	2E-02	VDAG09533	hypothetical protein	4,58	1E-03	4,73	1E-04	5,48	4E-07	5,19	6E-07
VDAG04811	hypothetical protein	3,43	4E-04	3,24	7E-03	3,45	5E-03	2,91	2E-02	VDAG07327	aldehyde dehydrogenase	5,06	1E-03	4,90	5E-05	5,69	2E-07	5,12	6E-07
VDAG08714	hypothetical protein	4,29	5E-03	5,01	9E-03	4,56	3E-02	4,69	2E-02	VDAG02565	RNA binding protein	2,31	5E-04	2,60	3E-06	2,28	7E-05	2,66	6E-07
VDAG01937	hypothetical protein	3,90	5E-04	4,01	2E-03	3,61	4E-02	3,76	2E-02	VDAG00639	phospholipase D active site- containing protein	3,46	6E-08	3,71	2E-07	2,99	2E-05	3,67	6E-07
VDAG01759	hypothetical protein	2,53	5E-04	2,39	3E-04	2,24	3E-03	2,13	2E-02	VDAG10194	sodium/nucleo- side cotransporter	2,06	1E-05	2,19	9E-06	2,23	3E-07	2,26	6E-07

VDAG08096	interferon-induced GTP-binding protein Mx1	3,09	4E-02	3,31	2E-02	3,59	1E-02	3,66	2E-02	VDAG04959	peroxisomal hydratase-dehydrogenase-epimerase	3,54	5E-04	3,42	6E-04	4,17	7E-07	4,06	6E-07
VDAG01743	hypothetical protein	4,25	2E-03	4,60	8E-03	4,12	1E-02	3,68	1E-02	VDAG07176	alkaline proteinase	3,52	4E-07	3,65	3E-06	3,99	8E-08	3,62	5E-07
VDAG10213	sulfite reductase flavoprotein α -component	2,72	3E-04	2,66	3E-03	2,87	6E-04	2,23	1E-02	VDAG08786	hypothetical protein	2,27	2E-03	2,35	1E-05	2,63	4E-07	2,61	4E-07
VDAG09626	subtilisin Carlsberg	5,52	1E-04	5,55	1E-04	4,30	2E-02	4,81	1E-02	VDAG07360	glycoside hydrolase	2,56	1E-06	2,50	1E-06	2,58	3E-07	2,56	4E-07
VDAG05967	alkaline proteinase	2,31	3E-02	2,14	1E-02	2,22	2E-02	2,22	1E-02	VDAG09577	hypothetical protein	2,87	1E-07	2,89	2E-06	2,97	8E-07	3,01	4E-07
VDAG08141	choline dehydrogenase	4,46	5E-03	4,30	1E-02	3,40	4E-02	3,63	1E-02	VDAG04555	hypothetical protein	4,28	3E-08	3,85	5E-07	4,15	5E-07	3,82	3E-07
VDAG02084	hypothetical protein	6,14	2E-04	5,44	2E-03	5,27	8E-03	4,28	1E-02	VDAG02843	fibronectin	3,32	2E-05	3,13	5E-05	3,79	3E-07	3,51	3E-07
VDAG09368	hypothetical protein	2,66	3E-03	2,99	2E-03	2,77	1E-02	2,19	1E-02	VDAG01771	low affinity copper transporter	2,46	1E-07	2,53	1E-06	2,31	7E-06	2,42	3E-07
VDAG03800	phosphate-repressible phosphate permease	3,78	5E-03	3,68	1E-02	3,45	1E-02	3,30	1E-02	VDAG03470	phthalate transporter	2,77	2E-04	2,65	8E-06	2,96	6E-08	2,82	3E-07
VDAG09541	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450	5,70	3E-03	5,45	2E-03	5,05	3E-02	5,08	1E-02	VDAG05586	hypothetical protein	3,08	5E-07	2,95	8E-08	2,94	5E-08	2,82	2E-07
VDAG05528	hypothetical protein	4,33	7E-03	3,55	4E-02	4,48	4E-02	3,77	1E-02	VDAG01069	CHIP6 protein	2,64	2E-05	2,56	3E-06	2,83	7E-07	2,67	2E-07
VDAG05709	oryzin	6,14	3E-04	5,90	2E-02	6,01	7E-03	5,45	1E-02	VDAG08145	C2H2 type zinc finger domain-containing protein	3,85	3E-06	4,12	6E-08	4,40	6E-08	3,69	2E-07
VDAG02105	hypothetical protein	8,17	1E-03	7,97	2E-03	8,08	1E-02	7,46	1E-02	VDAG00832	inner membrane transport protein yfaV	5,03	9E-07	4,91	5E-06	4,54	3E-06	4,86	2E-07

VDAG04484	beta-hexosaminidase beta chain	3,87	3E-02	3,83	6E-03	4,03	5E-03	3,89	1E-02	VDAG03201	hypothetical protein	3,05	1E-06	2,91	4E-08	2,95	2E-06	2,76	2E-07
VDAG06251	hypothetical protein	2,84	5E-02	2,48	5E-02	2,98	3E-02	2,78	9E-03	VDAG03200	hypothetical protein	3,29	1E-05	3,17	2E-07	3,29	1E-06	3,04	2E-07
VDAG02163	hypothetical protein	6,24	1E-03	6,21	7E-03	5,71	2E-02	5,48	9E-03	VDAG00995	hypothetical protein	3,11	6E-05	3,37	7E-07	3,50	3E-07	3,40	2E-07
VDAG00500	carboxypeptidase S1	4,45	1E-02	4,20	4E-02	4,98	4E-03	4,41	9E-03	VDAG09034	GPI ethanolamine phosphate transferase	2,59	7E-05	2,38	2E-06	2,82	9E-09	2,56	1E-07
VDAG08476	cytochrome P450 61	2,41	3E-03	2,35	3E-02	2,38	7E-03	2,32	9E-03	VDAG09532	serine 3-dehydrogenase	4,22	3E-04	4,57	2E-05	5,06	1E-07	4,87	1E-07
VDAG03941	regulatory protein alcR	2,34	2E-02	2,49	1E-02	2,90	5E-03	2,51	9E-03	VDAG00635	glucose N-acetyltransferase	2,90	2E-07	2,91	9E-07	2,63	8E-06	2,94	1E-07
VDAG03978	hypothetical protein	2,64	1E-04	2,54	6E-03	2,07	1E-02	2,29	8E-03	VDAG04326	hypothetical protein	2,80	9E-05	2,70	2E-06	3,01	5E-07	2,92	1E-07
VDAG02223	hypothetical protein	4,77	3E-04	4,63	3E-04	4,23	2E-02	4,08	8E-03	VDAG00284	ZZ type zinc finger domain-containing protein	2,57	5E-08	2,68	5E-08	2,22	2E-06	2,45	1E-07
VDAG05984	allantoate permease	3,31	5E-02	3,19	2E-03	3,19	5E-03	2,81	8E-03	VDAG09561	hypothetical protein	2,87	1E-06	2,89	2E-07	2,81	1E-07	2,90	1E-07
VDAG01062	thermostable beta-glucosidase B	3,12	2E-04	2,83	9E-03	2,70	7E-03	2,74	8E-03	VDAG01122	hypothetical protein	4,93	7E-06	4,98	3E-07	5,14	7E-07	4,95	1E-07
VDAG02089	quininate permease	3,32	2E-03	3,05	2E-02	3,75	6E-03	3,37	8E-03	VDAG01738	hypothetical protein	5,69	2E-11	5,33	1E-08	4,72	5E-05	4,99	1E-07
VDAG07850	hypothetical protein	3,86	5E-03	3,86	9E-04	3,71	1E-02	3,57	7E-03	VDAG00933	hypothetical protein	2,30	2E-03	2,38	2E-06	2,60	5E-08	2,55	1E-07
VDAG08075	hypothetical protein	4,05	4E-02	3,97	4E-02	4,75	3E-02	4,95	7E-03	VDAG03845	hypothetical protein	7,38	1E-09	7,35	9E-10	7,30	3E-09	6,59	1E-07
VDAG02901	Bys1 family protein	3,31	2E-02	3,77	1E-02	3,62	1E-02	3,74	7E-03	VDAG03538	integral membrane protein	4,88	1E-05	4,75	1E-07	5,51	1E-09	4,70	1E-07
VDAG10365	hypothetical protein	2,06	5E-03	2,29	3E-03	2,35	3E-03	2,04	7E-03	VDAG02080	LDB19 protein	2,48	5E-06	2,72	2E-07	2,67	2E-07	2,89	1E-07

VDAG02623	hypothetical protein	4,70	7E-03	4,86	2E-03	4,27	2E-02	4,21	7E-03	VDAG07359	hypothetical protein	4,81	3E-09	4,42	5E-07	4,49	6E-08	4,27	9E-08
VDAG01868	high-affinity methionine permease	2,56	3E-03	2,71	1E-02	2,21	2E-02	2,17	7E-03	VDAG09258	CreD	3,85	4E-08	3,83	2E-09	3,40	4E-07	3,66	9E-08
VDAG06374	peroxisomal copper amine oxidase	4,57	1E-04	4,51	3E-03	3,93	2E-02	4,41	6E-03	VDAG06211	hypothetical protein	4,75	3E-06	4,06	8E-05	4,74	3E-07	4,49	9E-08
VDAG02047	hypothetical protein	2,35	1E-02	2,10	2E-02	2,15	4E-03	2,27	6E-03	VDAG09376	hypothetical protein	4,63	1E-08	4,31	3E-07	3,93	7E-06	4,49	9E-08
VDAG07333	hypothetical protein	2,48	2E-03	2,53	1E-02	2,38	2E-02	2,34	6E-03	VDAG05011	hypothetical protein	6,66	2E-12	5,70	2E-06	6,93	3E-11	6,25	8E-08
VDAG08142	hypothetical protein	4,51	1E-02	4,78	2E-03	4,10	1E-02	4,25	6E-03	VDAG00499	endothiapepsin	12,05	3E-10	11,38	4E-08	10,82	5E-08	10,65	7E-08
VDAG00726	hypothetical protein	3,62	9E-04	3,57	2E-03	3,61	1E-03	3,02	6E-03	VDAG05884	glutamine synthetase	4,22	4E-06	4,29	3E-06	4,41	7E-08	4,44	6E-08
VDAG03528	glucoamylase	3,66	2E-02	3,95	2E-02	3,70	2E-02	4,26	6E-03	VDAG09750	beta-glucosidase	3,12	2E-07	3,21	1E-07	2,94	7E-08	2,92	6E-08
VDAG03117	cutinase	3,46	3E-05	2,49	6E-03	2,96	6E-04	2,27	6E-03	VDAG04547	hypothetical protein	3,63	3E-03	3,52	1E-04	3,90	7E-06	4,09	6E-08
VDAG06129	hypothetical protein	2,52	2E-03	2,53	3E-03	2,53	6E-03	2,32	5E-03	VDAG06151	high affinity copper transporter	6,41	1E-06	6,40	3E-07	6,75	6E-07	6,65	5E-08
VDAG07415	integral membrane protein	3,28	7E-05	3,27	1E-03	3,21	2E-03	2,64	4E-03	VDAG02220	hypothetical protein	5,36	3E-09	5,30	6E-06	5,08	1E-06	5,47	4E-08
VDAG02463	hypothetical protein	4,01	6E-04	3,94	7E-03	3,60	3E-03	3,61	4E-03	VDAG05915	hypothetical protein	3,18	1E-05	3,42	5E-09	3,17	3E-07	3,21	4E-08
VDAG01692	endoglucanase	3,42	8E-04	3,15	4E-02	3,88	9E-03	3,60	4E-03	VDAG06812	cytochrome b-245 heavychain subunit beta	3,27	3E-06	3,36	4E-07	3,56	6E-09	3,33	4E-08
VDAG03594	hypothetical protein	2,88	2E-03	2,95	2E-04	2,94	2E-03	2,71	4E-03	VDAG03760	alpha-glucosides permease MPH2/3	3,75	3E-08	3,79	3E-06	4,28	6E-10	3,87	4E-08

VDAG08286	alpha-glucosides permease MPH2/3	2,91	3E-03	2,74	1E-02	2,56	6E-03	2,76	4E-03	VDAG09288	arabinogalactan endo-1,4-beta- galactosidase	3,14	3E-07	3,19	3E-06	3,39	5E-07	3,29	3E-08
VDAG01755	hypothetical protein	4,10	7E-04	3,95	9E-03	3,27	9E-03	3,37	4E-03	VDAG02099	integral mem- brane protein	3,23	1E-05	3,14	3E-07	3,29	1E-08	3,15	3E-08
VDAG09191	hypothetical protein	2,39	2E-03	2,54	1E-02	2,97	2E-03	2,61	4E-03	VDAG03708	arabinan endo- 1,5-alpha- L-arabinosidase A	4,74	1E-13	4,88	4E-11	4,17	8E-08	4,18	3E-08
VDAG03559	hypothetical protein	3,42	2E-02	3,47	3E-03	3,48	1E-02	3,40	4E-03	VDAG07228	hypothetical protein	3,59	6E-07	3,63	2E-07	3,77	3E-07	3,63	3E-08
VDAG06144	hypothetical protein	3,36	1E-02	3,29	2E-03	3,48	7E-03	3,22	4E-03	VDAG03550	dimethylaniline monooxygenase	4,65	7E-09	4,44	7E-08	3,78	5E-06	4,06	3E-08
VDAG08683	GTP-binding protein EsdC	3,42	2E-02	3,46	4E-02	4,08	3E-03	3,89	4E-03	VDAG00757	hypothetical protein	6,27	1E-13	6,23	2E-10	5,59	1E-08	5,51	2E-08
VDAG07537	hypothetical protein	2,38	8E-04	2,52	7E-03	2,09	2E-02	2,47	3E-03	VDAG04667	hypothetical protein	4,02	2E-05	4,26	2E-07	4,62	7E-09	4,27	2E-08
VDAG03388	repressible alka- line phosphatase	3,51	1E-02	3,57	1E-02	3,54	5E-03	3,52	3E-03	VDAG01653	SWIRM domain- containing protein	3,01	4E-07	2,98	1E-07	3,03	3E-08	3,06	2E-08
VDAG00029	hypothetical protein	2,49	5E-05	2,64	1E-03	2,37	5E-03	2,10	3E-03	VDAG05354	metalloproteinase	4,15	3E-11	4,41	1E-07	4,24	6E-07	4,50	2E-08
VDAG06371	hypothetical protein	2,29	6E-03	2,35	2E-03	2,49	3E-03	2,25	3E-03	VDAG09736	calpain clp-1	6,63	3E-09	6,51	3E-07	6,71	7E-09	6,47	2E-08
VDAG01744	hypothetical protein	5,15	1E-05	5,04	4E-04	3,98	8E-03	4,12	3E-03	VDAG00473	hypothetical protein	7,19	1E-07	7,29	4E-08	6,59	9E-07	7,01	2E-08
VDAG08206	hypothetical protein	3,55	2E-02	3,49	2E-03	3,48	1E-02	3,31	3E-03	VDAG01529	MFS transporter	3,22	7E-08	3,30	2E-07	3,15	2E-08	3,22	2E-08
VDAG08906	hypothetical protein	2,04	2E-02	2,03	5E-02	2,79	8E-04	2,32	3E-03	VDAG03539	FAD binding domain-contain- ing protein	3,17	1E-05	3,42	9E-08	3,65	7E-09	3,51	2E-08
VDAG03966	hypothetical protein	2,94	1E-02	3,38	3E-04	2,54	1E-02	2,68	3E-03	VDAG05066	hypothetical protein	2,56	2E-06	2,70	6E-06	2,67	2E-06	2,98	1E-08
VDAG06994	alpha-glucosides permease MPH2/3	3,46	1E-02	3,48	3E-02	4,00	4E-03	4,11	3E-03	VDAG01997	hypothetical protein	3,29	2E-05	3,34	3E-08	3,46	1E-09	3,35	1E-08

VDAG02653	hypothetical protein	3,30	5E-04	3,35	6E-03	2,76	1E-02	3,06	3E-03	VDAG03617	riboflavin biosynthesis protein	5,79	1E-12	5,72	4E-09	5,51	2E-08	5,07	1E-08
VDAG07594	sugar transporter	2,74	5E-04	2,13	1E-02	2,56	5E-03	2,70	3E-03	VDAG10463	RibD C-terminal domain-containing protein	4,60	2E-10	4,33	1E-07	4,82	3E-09	4,50	1E-08
VDAG09641	hypothetical protein	3,10	1E-05	2,99	1E-04	2,61	2E-03	2,41	3E-03	VDAG04546	low-affinity methionine permease	2,43	9E-06	2,78	1E-07	2,52	7E-07	2,85	1E-08
VDAG00464	hypothetical protein	2,54	1E-03	2,36	1E-03	2,43	5E-04	2,08	3E-03	VDAG05798	hypothetical protein	6,84	7E-10	6,03	9E-06	7,34	8E-10	6,87	9E-09
VDAG06993	necrosis- and ethylene-inducing protein	2,94	8E-03	3,42	3E-02	3,86	2E-03	3,56	3E-03	VDAG07946	rhamnogalacturonan acetyltransferase	4,76	2E-04	4,58	4E-05	5,30	7E-08	5,30	8E-09
VDAG03483	exoglucanase	3,14	1E-04	3,32	2E-04	3,46	2E-03	2,88	2E-03	VDAG03242	hypothetical protein	2,49	8E-06	2,57	2E-07	2,95	4E-11	2,62	7E-09
VDAG03349	hypothetical protein	3,15	4E-03	3,31	3E-04	3,05	3E-03	3,22	2E-03	VDAG05720	DNA ligase	3,43	8E-11	3,53	2E-09	3,06	9E-07	3,24	7E-09
VDAG03385	endo-1,4-beta-xylanase	3,48	3E-03	3,44	4E-02	3,98	2E-03	4,11	2E-03	VDAG03137	hypothetical protein	5,58	7E-08	5,41	2E-09	5,49	2E-08	5,30	6E-09
VDAG09257	hypothetical protein	2,79	2E-02	2,40	3E-03	2,74	1E-03	2,47	2E-03	VDAG00260	mannan endo-1,6-alpha-mannosidase DCW1	2,99	1E-08	2,98	5E-09	3,00	6E-09	2,81	6E-09
VDAG05569	hypothetical protein	4,14	2E-02	3,89	1E-02	4,60	1E-03	4,01	2E-03	VDAG07120	integral membrane protein	5,62	1E-08	5,63	5E-10	5,54	2E-08	5,53	6E-09
VDAG03188	hypothetical protein	5,81	6E-04	4,22	3E-02	5,48	3E-04	4,88	2E-03	VDAG06955	hypothetical protein	3,12	4E-07	3,25	1E-07	3,19	3E-08	3,30	5E-09
VDAG10268	pectinesterase	2,51	4E-02	2,64	1E-02	2,67	1E-02	3,03	2E-03	VDAG02958	guanylate kinase	9,43	1E-08	8,91	2E-08	8,91	1E-07	8,95	5E-09
VDAG01048	hypothetical protein	3,08	5E-04	3,67	8E-04	3,07	5E-03	3,01	2E-03	VDAG06019	hypothetical protein	8,04	1E-14	7,91	3E-11	6,93	1E-08	6,86	4E-09
VDAG02232	integral membrane protein	6,93	2E-04	6,75	1E-03	6,09	3E-03	6,34	2E-03	VDAG06327	hypothetical protein	3,03	2E-06	3,24	5E-09	3,13	1E-08	3,21	4E-09

VDAG09088	MFS transporter	4,35	3E-04	3,29	1E-02	3,96	2E-03	3,73	2E-03	VDAG03905	serin endopeptidase	2,70	6E-05	3,09	3E-05	3,14	1E-06	3,89	4E-09
VDAG01869	taurine catabolism dioxygenase TauD	3,98	1E-04	3,58	1E-02	3,68	5E-03	3,51	2E-03	VDAG01181	isoflavone reductase family protein	6,33	6E-11	6,80	3E-08	6,52	4E-08	6,65	4E-09
VDAG03371	carboxylic acid transport protein	3,23	8E-03	3,36	2E-02	3,68	2E-03	3,62	2E-03	VDAG01737	hypothetical protein	4,35	1E-09	4,37	1E-07	4,12	2E-06	4,27	3E-09
VDAG05393	ankyrin repeat domain-containing protein	4,48	1E-04	4,26	1E-03	4,05	5E-04	3,80	2E-03	VDAG05021	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase	3,14	1E-06	2,88	9E-06	3,65	2E-10	3,26	3E-09
VDAG08042	siderophore iron transporter 1	3,09	9E-05	3,03	2E-05	2,55	2E-03	2,74	2E-03	VDAG07336	L-amino-acid oxidase	4,70	8E-13	4,56	2E-09	4,07	1E-07	4,12	3E-09
VDAG03158	endoglucanase	2,94	1E-06	2,86	2E-04	2,36	6E-03	2,52	2E-03	VDAG08125	hypothetical protein	5,34	3E-08	5,54	6E-09	5,30	4E-08	5,37	3E-09
VDAG02280	hypothetical protein	5,70	5E-05	4,79	8E-03	5,49	5E-04	4,90	2E-03	VDAG08099	NADPH-dependent methylglyoxal reductase GRE2	7,59	9E-10	7,40	1E-10	7,60	9E-10	7,08	2E-09
VDAG07605	hypothetical protein	7,05	3E-02	6,47	2E-02	6,78	2E-02	7,37	2E-03	VDAG07589	yneE	2,90	8E-08	2,93	4E-08	2,92	6E-10	3,05	2E-09
VDAG05716	hypothetical protein	2,65	2E-04	2,78	7E-04	2,20	2E-02	2,62	2E-03	VDAG06228	integral membrane protein	3,15	3E-06	3,33	6E-07	3,79	4E-10	3,58	2E-09
VDAG10533	hypothetical protein	2,69	8E-03	2,39	5E-04	2,36	2E-03	2,55	2E-03	VDAG04407	hypothetical protein	5,52	3E-09	5,78	1E-09	5,62	5E-08	5,82	2E-09
VDAG09878	hypothetical protein	2,94	2E-02	3,01	9E-03	3,58	9E-04	3,13	1E-03	VDAG03423	hypothetical protein	3,81	2E-10	3,79	7E-10	3,72	1E-07	3,76	1E-09
VDAG03202	hypothetical protein	2,45	4E-03	2,33	3E-03	2,60	2E-03	2,40	1E-03	VDAG03664	FAD binding domain-containing protein	8,73	4E-12	8,35	9E-09	8,56	3E-10	8,08	1E-09
VDAG00752	exoglucanase	5,06	1E-03	5,92	1E-03	6,33	2E-04	5,61	1E-03	VDAG09107	hypothetical protein	7,19	1E-10	7,01	1E-10	7,16	1E-09	6,75	1E-09
VDAG02275	hypothetical protein	2,28	1E-03	2,29	6E-03	2,19	6E-03	2,29	1E-03	VDAG07887	benzoate 4-monooxygenase	3,38	2E-11	3,72	1E-11	3,01	9E-07	3,41	7E-10

VDAG01558	hypothetical protein	3,13	2E-02	3,45	1E-02	3,78	1E-03	3,87	1E-03	VDAG03390	4-coumarate-CoA ligase	5,82	9E-09	5,24	5E-07	5,77	3E-08	5,54	4E-10
VDAG08018	hypothetical protein	3,46	3E-05	3,84	4E-04	3,24	8E-03	3,52	1E-03	VDAG07045	hypothetical protein	5,13	2E-06	5,02	6E-08	5,50	5E-10	5,14	4E-10
VDAG05051	sarcosine oxidase	3,53	5E-05	3,45	9E-04	3,59	3E-03	3,61	1E-03	VDAG07139	hypothetical protein	3,48	1E-09	3,33	2E-09	3,53	9E-09	3,39	3E-10
VDAG00060	hypothetical protein	2,56	8E-04	2,36	2E-02	2,50	5E-03	2,41	1E-03	VDAG07776	hypothetical protein	4,36	2E-13	4,22	1E-12	4,01	1E-09	3,71	3E-10
VDAG03059	hypothetical protein	3,75	3E-02	4,18	2E-02	4,75	1E-03	4,82	1E-03	VDAG05268	hypothetical protein	7,03	2E-08	7,24	5E-08	7,84	8E-11	7,43	3E-10
VDAG01993	hypothetical protein	5,26	9E-05	4,77	1E-03	4,08	5E-03	4,77	1E-03	VDAG01693	hypothetical protein	4,98	2E-07	5,32	6E-12	5,17	1E-10	5,14	3E-10
VDAG07777	hypothetical protein	3,34	4E-03	3,57	2E-03	3,78	2E-04	3,37	1E-03	VDAG09616	hypothetical protein	3,11	9E-07	3,21	2E-09	3,32	3E-08	3,34	3E-10
VDAG09775	hypothetical protein	6,70	2E-05	6,27	7E-04	5,36	2E-03	5,86	1E-03	VDAG08941	potassium transporter 1	3,65	1E-05	3,82	1E-06	4,38	1E-10	4,13	3E-10
VDAG04611	G-protein coupled receptor	3,94	2E-02	3,52	4E-02	4,47	2E-03	4,39	1E-03	VDAG05707	LDB19 protein	3,54	4E-13	3,64	6E-12	3,12	1E-09	3,25	3E-10
VDAG08198	hypothetical protein	3,20	2E-02	3,45	2E-03	4,26	6E-05	3,24	1E-03	VDAG01460	VIB-1 protein	3,12	5E-07	3,14	7E-09	3,14	1E-07	3,27	3E-10
VDAG02154	RTA1 protein	4,88	3E-02	4,95	5E-03	5,13	7E-03	5,04	1E-03	VDAG04356	replication initiator 1	3,82	3E-06	3,86	3E-09	3,97	3E-10	4,08	2E-10
VDAG05374	MFS hexose transporter	10,08	2E-05	10,17	2E-04	8,95	4E-04	8,21	1E-03	VDAG09581	opaque-specific ABC transporter CDR3	11,62	4E-14	11,48	1E-14	10,00	3E-09	10,38	2E-10
VDAG03843	hypothetical protein	2,03	2E-03	2,21	1E-03	2,30	4E-04	2,18	1E-03	VDAG09578	iron transporter SMF3	3,59	4E-10	3,50	3E-11	3,66	2E-11	3,36	2E-10
VDAG02660	ferric reductase	3,42	2E-02	3,41	7E-03	3,74	4E-04	3,49	1E-03	VDAG06283	pantothenate transporter liz1	6,92	1E-10	6,61	8E-10	7,08	1E-09	6,78	1E-10
VDAG09764	hypothetical protein	2,50	7E-04	2,41	6E-05	2,26	8E-04	2,19	1E-03	VDAG04029	hypothetical protein	3,70	2E-12	3,40	2E-09	3,49	5E-11	3,35	1E-10
VDAG04491	hypothetical protein	2,54	1E-02	2,83	6E-05	2,35	7E-04	2,57	9E-04	VDAG09297	O-acetylhomoserine (thiol)-lyase	10,86	6E-12	10,78	4E-10	10,49	9E-11	10,21	1E-10

VDAG01968	salicylate 1-monooxygenase	3,06	4E-04	3,19	1E-03	2,54	4E-03	3,28	9E-04	VDAG09919	iron transport multicopper oxidase FET3	7,75	3E-11	7,63	1E-11	7,70	1E-10	7,35	1E-10
VDAG10457	hypothetical protein	2,24	5E-04	2,26	1E-03	2,34	4E-04	2,30	9E-04	VDAG09411	amidohydrolase family protein	6,55	3E-13	6,64	5E-14	6,33	6E-11	6,11	1E-10
VDAG07928	lovastatin nonaketide synthase	4,10	3E-04	3,99	7E-04	4,17	2E-04	4,14	8E-04	VDAG07237	hydroxyacid oxidase	5,51	1E-14	5,71	1E-11	4,94	4E-08	5,44	1E-10
VDAG08728	hypothetical protein	2,28	3E-04	2,39	2E-05	2,28	5E-04	2,10	8E-04	VDAG07215	taurine catabolism dioxygenase TauD	4,01	3E-11	3,80	4E-10	3,56	2E-10	3,71	1E-10
VDAG09275	hypothetical protein	5,16	2E-05	4,98	2E-03	4,26	5E-03	4,96	8E-04	VDAG07249	amino acid transporter	4,46	1E-08	4,42	9E-09	4,50	2E-11	4,44	1E-10
VDAG00169	hypothetical protein	3,09	8E-03	2,98	3E-03	3,19	3E-03	3,27	8E-04	VDAG00675	hypothetical protein	3,60	2E-06	3,48	6E-07	4,34	8E-11	4,03	1E-10
VDAG02161	keratin-associated protein 5-4	5,09	4E-07	4,65	5E-04	4,51	5E-04	4,22	8E-04	VDAG10029	pps1 dual specificity phosphatase	3,41	5E-08	3,59	1E-09	3,74	1E-10	3,60	1E-10
VDAG03403	cation diffusion facilitator 1	3,16	3E-04	2,71	9E-04	2,85	2E-04	2,43	8E-04	VDAG10402	isoamyl alcohol oxidase	3,63	5E-10	3,55	5E-11	3,93	2E-12	3,54	7E-11
VDAG04625	hypothetical protein	3,37	7E-04	2,67	1E-02	2,87	8E-04	2,82	7E-04	VDAG00987	TOS1 protein	3,49	4E-12	3,62	8E-13	3,53	2E-12	3,42	7E-11
VDAG00600	acetyl esterase	3,69	7E-06	3,47	2E-04	3,16	2E-03	3,04	7E-04	VDAG03844	hypothetical protein	3,32	4E-08	3,18	2E-09	3,35	9E-12	3,24	6E-11
VDAG08135	hypothetical protein	2,14	2E-02	2,54	6E-03	2,26	1E-02	2,63	7E-04	VDAG03833	hypothetical protein	6,52	2E-11	6,84	4E-10	6,14	8E-08	6,68	6E-11
VDAG00167	hypothetical protein	2,38	1E-02	2,19	2E-02	3,07	2E-04	2,72	7E-04	VDAG09292	multidrug resistance-associated protein	5,98	1E-10	5,78	1E-07	6,11	4E-10	6,05	6E-11
VDAG03913	hypothetical protein	2,73	3E-02	3,13	5E-03	3,16	6E-04	3,39	7E-04	VDAG02895	phenylacetone monooxygenase	4,45	9E-12	4,64	1E-11	4,54	1E-11	4,38	6E-11
VDAG05849	vacuolar ATP synthase subunit c	2,55	1E-04	2,45	8E-04	2,17	4E-03	2,21	7E-04	VDAG05115	zinc carboxypeptidase A	9,72	3E-11	9,66	4E-10	10,01	2E-11	9,57	6E-11

VDAG02239	high-affinity methionine permease	2,80	6E-03	2,61	2E-02	2,66	3E-03	3,08	7E-04	VDAG01212	glucose N-acetyltransferase	6,15	2E-10	5,99	2E-11	6,18	1E-11	5,97	5E-11
VDAG07852	hypothetical protein	2,32	8E-04	2,35	9E-04	2,28	1E-03	2,28	7E-04	VDAG05799	pectinesterase	8,70	9E-13	8,20	5E-10	8,95	2E-12	8,47	4E-11
VDAG04797	hypothetical protein	3,83	4E-03	3,45	9E-03	4,36	5E-04	4,20	7E-04	VDAG01109	hypothetical protein	6,08	5E-11	6,24	2E-11	5,72	1E-08	6,23	4E-11
VDAG05848	candidapepsin-3	3,18	4E-02	3,21	6E-03	3,74	2E-03	3,42	6E-04	VDAG07786	dibenzothiophene desulfurization enzyme A	6,84	2E-14	6,66	2E-11	6,65	1E-12	6,10	4E-11
VDAG05580	beta-glucosidase	3,09	5E-05	2,66	3E-03	2,86	3E-04	2,76	6E-04	VDAG07606	sulfate permease	6,61	1E-16	6,41	1E-13	4,89	2E-07	5,70	3E-11
VDAG09253	sulfate transporter 4.1	5,31	3E-05	4,19	1E-02	5,19	4E-05	4,80	6E-04	VDAG06588	hypothetical protein	3,71	9E-11	3,82	2E-12	3,84	3E-13	3,74	2E-11
VDAG09793	lactate 2-monooxygenase	6,46	3E-02	8,05	2E-03	7,41	5E-03	8,07	6E-04	VDAG04701	necrosis- and ethylene-inducing protein and ethylene inducing peptide	6,67	1E-07	6,43	3E-06	7,68	1E-10	7,82	1E-11
VDAG00177	hypothetical protein	2,71	8E-04	2,56	2E-03	2,69	6E-04	2,48	6E-04	VDAG00749	hypothetical protein	6,16	1E-09	5,98	2E-11	6,03	2E-11	5,75	1E-11
VDAG06252	exoglucanase-6A	3,44	1E-04	3,45	8E-04	3,54	7E-05	3,16	6E-04	VDAG08046	vacuolar calcium ion transporter	4,14	6E-10	4,10	1E-11	3,96	1E-09	4,02	1E-11
VDAG08840	hypothetical protein	3,50	4E-05	3,13	5E-03	3,17	2E-03	3,23	6E-04	VDAG06037	GPR1/FUN34/yaa H family protein	2,71	5E-09	2,66	8E-08	2,94	2E-10	2,95	1E-11
VDAG09536	pectate lyase	7,32	1E-04	7,31	9E-04	8,21	6E-05	7,31	6E-04	VDAG08514	hypothetical protein	3,97	2E-07	4,06	1E-08	4,34	1E-11	4,37	8E-12
VDAG09530	hypothetical protein	3,53	3E-02	3,44	5E-02	4,32	1E-03	4,49	6E-04	VDAG03496	integral membrane protein	8,30	8E-09	8,14	3E-10	8,68	3E-11	8,57	7E-12
VDAG03780	clock-controlled-9 protein	2,59	3E-03	2,64	1E-02	2,96	6E-03	3,09	6E-04	VDAG04148	hypothetical protein	7,17	7E-15	7,33	1E-14	6,60	5E-10	7,02	6E-12
VDAG04031	hypothetical protein	4,39	1E-03	4,82	1E-02	5,40	4E-04	5,15	5E-04	VDAG05722	hypothetical protein	8,90	2E-14	8,94	3E-14	8,39	4E-11	8,59	5E-12

VDAG07088	hypothetical protein	2,72	4E-02	2,79	5E-04	3,01	5E-04	3,00	5E-04	VDAG08644	C2H2 type zinc finger domain-containing protein	3,80	2E-13	3,77	5E-12	3,59	2E-11	3,55	5E-12
VDAG07222	metal dependent amidohydrolase	3,22	5E-06	3,26	6E-05	2,59	1E-03	2,61	5E-04	VDAG03392	hypothetical protein	7,30	1E-14	7,28	1E-11	7,13	4E-12	6,98	4E-12
VDAG03891	acetamidase	2,50	1E-02	2,71	3E-03	2,85	3E-03	2,92	5E-04	VDAG05823	hypothetical protein	6,73	1E-18	6,67	7E-16	5,94	5E-11	5,81	3E-12
VDAG02312	GlIT	3,81	8E-04	3,36	2E-03	3,52	5E-03	3,53	5E-04	VDAG05060	multidrug resistance protein	4,43	2E-16	4,31	9E-16	3,86	4E-11	3,99	3E-12
VDAG06586	hypothetical protein	3,51	1E-02	3,19	5E-03	3,57	2E-03	3,45	5E-04	VDAG06133	amine oxidase	7,54	2E-13	7,65	2E-13	7,25	7E-11	7,44	3E-12
VDAG07126	spt3	3,07	4E-02	3,07	3E-03	3,16	1E-03	3,11	4E-04	VDAG06204	ligninase H8	12,58	9E-11	12,60	8E-12	12,82	1E-11	12,80	3E-12
VDAG07769	phytanoyl-CoA dioxygenase family protein	4,43	2E-05	4,14	1E-04	4,64	6E-06	4,29	4E-04	VDAG05410	lipase	3,16	6E-06	3,61	2E-07	4,19	6E-12	4,23	3E-12
VDAG06509	hypothetical protein	2,05	6E-04	2,11	2E-04	2,01	4E-04	2,04	4E-04	VDAG04337	hypothetical protein	4,67	3E-15	4,71	2E-11	4,65	4E-11	4,61	2E-12
VDAG01171	hypothetical protein	2,47	1E-03	2,50	2E-03	2,65	2E-03	2,63	4E-04	VDAG05745	serine/threonine-protein kinase unc-51	3,73	1E-11	3,78	2E-12	3,86	3E-13	3,72	2E-12
VDAG05561	hypothetical protein	3,88	2E-03	4,17	9E-04	3,76	4E-04	3,81	4E-04	VDAG08101	aldehyde dehydrogenase	4,01	6E-12	3,86	6E-13	3,98	4E-13	3,78	2E-12
VDAG08282	lactonohydrolase	4,09	2E-05	3,92	9E-04	3,20	2E-03	3,60	4E-04	VDAG05125	oligopeptide transporter 1	10,96	4E-12	10,92	2E-11	11,36	4E-13	10,89	2E-12
VDAG07406	endoglucanase-1	3,26	2E-04	3,47	5E-03	3,51	4E-04	3,68	3E-04	VDAG05721	hypothetical protein	9,85	5E-16	9,95	4E-16	9,10	3E-11	9,16	2E-12
VDAG09286	Cel74a	6,76	3E-06	6,41	9E-04	7,03	1E-04	6,58	3E-04	VDAG01687	rhamnogalacturonan acetylsterase	6,84	1E-14	7,02	2E-11	6,76	1E-11	6,86	2E-12
VDAG06213	hypothetical protein	2,21	2E-03	2,07	2E-04	2,27	1E-04	2,13	3E-04	VDAG09294	ferric reductase transmembrane component 5	9,62	1E-14	9,62	3E-12	9,32	9E-13	8,99	2E-12

VDAG08195	hypothetical protein	4,56	1E-05	4,56	1E-04	4,36	7E-04	4,21	3E-04	VDAG05340	pisatin demethylase	4,07	2E-11	4,43	3E-10	4,39	2E-10	4,40	2E-12
VDAG09562	hypothetical protein	2,30	1E-02	2,15	5E-03	2,84	5E-04	2,67	3E-04	VDAG05988	FMP42 protein	4,76	2E-14	4,58	5E-13	4,61	2E-12	4,50	1E-12
VDAG09324	carotenoid cleavage dioxygenase	4,05	4E-07	3,87	1E-05	3,61	5E-04	3,45	3E-04	VDAG05983	hypothetical protein	9,34	8E-12	9,53	4E-13	9,66	2E-12	9,47	1E-12
VDAG03449	hypothetical protein	2,19	3E-03	2,12	6E-04	2,27	1E-04	2,12	3E-04	VDAG04306	hypothetical protein	3,41	1E-10	3,58	2E-10	3,52	1E-12	3,67	1E-12
VDAG04340	hypothetical protein	2,65	9E-03	2,80	5E-03	2,94	3E-04	2,96	3E-04	VDAG09380	hypothetical protein	8,79	3E-11	8,09	1E-09	8,94	2E-14	8,48	1E-12
VDAG06278	siderophore iron transporter mirB	3,38	4E-06	3,29	4E-07	3,05	1E-04	2,64	3E-04	VDAG10467	dicarboxylic amino acid permease	4,41	2E-10	4,46	3E-10	4,60	1E-12	4,53	1E-12
VDAG04666	hypothetical protein	2,57	2E-02	2,27	1E-02	2,44	2E-03	2,87	3E-04	VDAG09790	hypothetical protein	3,46	3E-07	3,60	1E-10	3,61	7E-11	3,77	9E-13
VDAG07253	hypothetical protein	2,46	2E-02	2,37	4E-02	3,17	1E-03	2,93	3E-04	VDAG00794	hypothetical protein	7,36	5E-13	7,21	4E-11	7,18	1E-11	7,39	8E-13
VDAG06237	hypothetical protein	6,20	3E-06	5,48	4E-03	5,90	2E-04	5,67	2E-04	VDAG10515	hypothetical protein	12,31	4E-13	12,01	3E-13	12,30	1E-12	11,89	7E-13
VDAG09058	hypothetical protein	3,52	2E-02	3,89	7E-03	4,33	2E-04	4,35	2E-04	VDAG01514	hypothetical protein	5,21	7E-09	5,46	5E-10	5,98	6E-14	5,72	6E-13
VDAG02828	YkgB	3,90	8E-08	3,78	2E-05	2,95	6E-04	3,27	2E-04	VDAG07727	polysaccharide deacetylase family protein	5,76	4E-15	5,81	4E-11	5,18	1E-09	5,76	4E-13
VDAG04228	hypothetical protein	6,92	1E-02	6,49	3E-03	7,29	2E-03	7,17	2E-04	VDAG09918	plasma membrane iron permease	9,23	1E-13	9,07	3E-14	9,29	2E-13	8,80	3E-13
VDAG06013	hypothetical protein	2,05	6E-03	2,21	4E-04	2,20	2E-03	2,30	2E-04	VDAG07332	hypothetical protein	4,15	5E-11	4,10	1E-12	4,15	5E-12	4,17	2E-13
VDAG00257	hypothetical protein	4,00	1E-06	3,87	1E-04	3,53	1E-03	3,56	2E-04	VDAG03418	extracellular elastolytic metalloproteinase	9,48	1E-16	9,27	1E-14	9,50	1E-15	8,86	1E-13

VDAG09111	hypothetical protein	2,37	5E-03	2,40	1E-03	2,26	9E-04	2,57	2E-04	VDAG09063	rhamnogalacturo-nase B	7,17	1E-13	7,12	3E-11	7,57	1E-14	7,29	8E-14
VDAG10458	sugar transporter STL1	2,59	1E-04	2,35	8E-04	2,30	1E-03	2,59	1E-04	VDAG09614	candidapepsin-2	4,73	3E-10	5,14	3E-12	4,98	3E-10	5,29	7E-14
VDAG05111	hypothetical protein	2,36	1E-05	2,48	4E-06	2,15	1E-04	2,31	1E-04	VDAG04369	hypothetical protein	4,90	1E-12	5,08	4E-13	4,79	4E-11	5,23	5E-14
VDAG09686	hypothetical protein	2,84	5E-03	2,85	3E-03	2,73	9E-04	2,84	1E-04	VDAG03537	allantoate permease	4,23	1E-11	4,29	2E-15	4,26	1E-15	4,00	5E-14
VDAG02751	hypothetical protein	3,75	1E-02	4,27	4E-04	4,57	2E-04	4,14	1E-04	VDAG02965	amidohydrolase family protein	3,98	4E-15	4,00	1E-15	3,85	9E-13	3,83	2E-14
VDAG09742	hypothetical protein	2,73	1E-06	2,75	8E-06	2,52	2E-04	2,45	1E-04	VDAG08012	hypothetical protein	3,94	7E-15	3,96	5E-15	3,75	2E-12	3,86	9E-15
VDAG07322	hypothetical protein	7,67	2E-02	8,14	1E-02	10,70	1E-04	10,38	1E-04	VDAG05448	metalloprotease	6,29	1E-13	6,51	6E-13	6,30	1E-13	6,46	8E-15
VDAG00083	hypothetical protein	2,43	1E-05	2,52	6E-06	2,25	8E-04	2,07	1E-04	VDAG06010	NRS/ER protein	6,84	3E-16	6,80	2E-16	6,75	2E-14	6,59	5E-15
VDAG00833	thiol-specific monooxygenase	3,92	1E-04	3,86	9E-04	3,66	2E-04	3,76	1E-04	VDAG00751	metalloprotease	10,80	3E-18	10,51	3E-15	10,37	2E-15	10,07	4E-15
VDAG04459	hypothetical protein	4,03	1E-03	4,10	1E-03	4,32	7E-05	4,19	1E-04	VDAG06936	hypothetical protein	6,21	5E-11	6,08	4E-11	6,60	4E-16	6,34	2E-15
VDAG08213	hypothetical protein	3,51	3E-03	3,90	3E-03	4,13	6E-04	4,08	1E-04	VDAG07326	hypothetical protein	6,03	5E-08	6,08	4E-10	7,08	8E-17	6,73	1E-15
VDAG02827	hypothetical protein	3,72	6E-08	3,57	2E-05	3,20	9E-05	3,28	1E-04	VDAG08097	polygalacturonase	4,65	1E-13	4,61	2E-12	4,92	2E-16	4,78	9E-16
VDAG06861	hypothetical protein	2,65	8E-04	2,82	6E-04	2,71	2E-04	2,79	1E-04	VDAG06023	isotrichodermin C-15 hydroxylase	5,97	2E-12	5,81	3E-12	5,81	6E-14	5,90	6E-16
VDAG03536	yetA	3,66	1E-02	2,98	4E-03	3,90	3E-04	3,80	1E-04	VDAG06992	ferric reductase transmembrane component 4	8,24	2E-14	7,97	9E-12	8,75	5E-16	8,52	4E-16
VDAG10454	BAR domain-containing protein	2,54	2E-05	2,53	2E-06	2,34	1E-04	2,21	1E-04	VDAG01264	mono	3,23	3E-07	3,40	4E-10	3,87	3E-14	4,14	4E-16
VDAG10372	hypothetical protein	2,78	1E-03	2,77	2E-04	2,86	2E-04	2,84	1E-04	VDAG03387	hypothetical protein	5,85	6E-14	5,76	9E-15	5,81	1E-13	5,70	2E-16

VDAG08480	N-terminal amidase	2,35	2E-02	2,30	3E-03	2,79	5E-05	2,74	1E-04	VDAG02045	high affinity copper transporter	3,87	1E-10	3,75	2E-13	4,27	7E-17	3,91	1E-16
VDAG07712	hypothetical protein	3,82	4E-04	3,80	7E-05	3,99	2E-04	3,88	9E-05	VDAG07634	diatom spindle kinesin 1	4,04	7E-14	4,33	3E-15	3,98	2E-10	4,40	9E-17
VDAG07645	hypothetical protein	5,54	5E-06	5,42	1E-04	5,26	1E-03	4,97	8E-05	VDAG05017	hypothetical protein	4,11	6E-13	4,22	9E-14	4,54	5E-16	4,42	6E-17
VDAG00496	hypothetical protein	2,96	1E-05	2,93	1E-07	2,80	6E-06	2,33	8E-05	VDAG03534	hypothetical protein	9,76	2E-16	9,63	1E-16	9,87	1E-16	9,59	5E-17
VDAG10293	hypothetical protein	3,96	1E-04	3,02	9E-03	3,76	1E-03	3,51	8E-05	VDAG05471	hypothetical protein	4,79	1E-15	4,48	2E-13	4,70	4E-16	4,68	3E-17
VDAG01173	cytochrome P450	2,67	8E-05	2,91	2E-06	2,77	2E-05	2,68	7E-05	VDAG02162	oviduct-specific glycoprotein	7,06	1E-16	7,05	4E-15	7,15	1E-16	6,98	3E-17
VDAG06979	hypothetical protein	3,93	5E-06	3,86	3E-04	3,81	3E-05	3,76	7E-05	VDAG01193	high-affinity nicotinic acid transporter	7,75	8E-17	7,76	7E-15	7,43	4E-15	7,77	3E-17
VDAG02450	hydroxyquinol 1,2-dioxygenase	3,20	6E-07	2,77	2E-05	2,89	7E-05	2,45	6E-05	VDAG09795	hypothetical protein	4,95	5E-19	4,87	7E-18	4,66	4E-16	4,70	2E-17
VDAG07294	hypothetical protein	4,00	1E-06	4,21	9E-06	3,97	6E-06	3,63	6E-05	VDAG05050	choline monooxygenase	12,18	1E-21	12,22	2E-19	11,97	7E-18	11,90	8E-18
VDAG06948	beta-lactamase family protein	2,90	7E-03	2,85	2E-03	3,36	6E-05	3,25	6E-05	VDAG04019	secretory phospholipase A2	8,23	2E-18	8,20	1E-16	7,61	3E-15	8,26	5E-18
VDAG04342	mixed-linked glucanase	3,07	9E-05	2,89	3E-04	2,99	3E-04	2,89	6E-05	VDAG00783	hypothetical protein	9,57	1E-13	9,35	2E-14	10,49	6E-20	9,94	4E-18
VDAG02693	ser/Thr protein phosphatase family	2,23	1E-04	2,17	4E-05	2,21	2E-05	2,20	6E-05	VDAG06354	zinc transporter SLC39A9	4,73	8E-22	4,60	2E-19	4,54	5E-19	4,32	4E-18
VDAG01902	hypothetical protein	3,10	8E-06	3,02	4E-04	2,50	2E-03	3,07	5E-05	VDAG07127	AAA ATPase central domain-containing protein	4,50	6E-19	4,53	3E-20	4,03	1E-12	4,18	4E-18
VDAG09802	transferase family protein	9,70	2E-07	9,58	7E-06	8,56	2E-05	8,26	5E-05	VDAG00785	DJ-1/Pfpl family protein	4,87	2E-18	5,17	1E-17	4,20	1E-10	5,32	1E-18
VDAG07951	hypothetical protein	4,34	1E-02	4,41	7E-05	4,69	7E-05	4,51	5E-05	VDAG03657	hypothetical protein	5,36	2E-15	5,35	5E-15	5,75	9E-20	5,60	7E-19

VDAG09230	hypothetical protein	7,81	2E-04	7,75	5E-05	8,26	5E-05	7,86	4E-05	VDAG04826	peroxidase/catalase	8,44	3E-18	8,66	6E-16	8,47	8E-17	8,92	5E-19
VDAG09969	retrograde regulation protein	3,03	3E-06	3,02	2E-06	3,08	3E-06	2,73	4E-05	VDAG02046	ferric reductase transmembrane component 5	4,10	1E-14	4,02	2E-15	4,34	2E-19	4,22	2E-19
VDAG03736	hypothetical protein	2,73	3E-05	2,82	4E-04	2,46	3E-04	2,90	4E-05	VDAG07191	high-affinity nicotinic acid transporter	4,74	5E-13	5,06	2E-13	5,23	1E-16	5,53	2E-19
VDAG00797	cytochrome P450	2,95	2E-06	3,04	8E-07	2,83	2E-05	2,74	3E-05	VDAG09534	aflatoxin biosynthesis polyketide synthase	11,23	2E-15	11,54	6E-17	12,44	3E-20	12,14	6E-20
VDAG03707	alpha-N-arabinofuranosidase	6,15	6E-06	6,36	7E-06	6,32	5E-05	6,20	3E-05	VDAG09506	5'/3'-nucleotidase SurE family protein	5,73	3E-23	5,60	1E-19	5,53	1E-20	5,34	6E-20
VDAG09260	hypothetical protein	2,58	6E-04	2,59	1E-04	2,59	7E-04	2,64	3E-05	VDAG03135	PRO41 protein	4,29	1E-12	4,44	8E-16	4,59	3E-19	4,54	5E-20
VDAG07312	stress responsive A/B barrel domain-containing protein	8,37	3E-05	8,09	6E-05	8,82	3E-07	7,89	3E-05	VDAG10527	lectin-B	14,98	4E-22	15,03	3E-22	14,47	4E-19	14,71	2E-20
VDAG07148	hypothetical protein	2,60	4E-06	2,56	4E-06	2,58	6E-06	2,36	3E-05	VDAG09293	high affinity copper transporter	11,06	1E-21	10,82	2E-18	11,06	2E-21	10,70	1E-20
VDAG03583	hypothetical protein	3,81	1E-04	4,09	4E-04	3,83	1E-04	4,25	3E-05	VDAG03174	hypothetical protein	4,66	1E-15	4,55	5E-17	4,99	1E-20	4,88	3E-21
VDAG01698	FAD/FMN-containing dehydrogenase	4,01	4E-04	4,39	1E-03	4,86	4E-05	4,86	3E-05	VDAG09691	hypothetical protein	5,65	5E-26	5,56	3E-23	5,44	1E-21	5,27	3E-21
VDAG04343	hypothetical protein	2,61	7E-05	2,61	1E-04	2,81	5E-05	2,83	3E-05	VDAG06039	hypothetical protein	5,00	1E-23	4,92	2E-22	4,59	4E-17	4,72	3E-21
VDAG08598	hypothetical protein	2,26	6E-04	2,19	1E-05	2,31	6E-06	2,06	3E-05	VDAG06212	alpha/beta hydrolase	4,79	5E-26	4,80	1E-21	4,65	4E-17	4,60	2E-21
VDAG07119	rhamnogalacturonate lyase	6,74	9E-05	6,48	5E-05	6,92	4E-05	6,57	3E-05	VDAG08753	hypothetical protein	4,39	2E-14	4,38	3E-16	4,82	5E-22	4,73	1E-21

VDAG05191	hypothetical protein	3,23	1E-02	4,28	2E-04	4,28	7E-04	4,44	3E-05	VDAG01718	hypothetical protein	4,95	2E-13	5,02	3E-16	4,88	1E-16	5,31	1E-21
VDAG05441	hypothetical protein	3,32	8E-07	3,32	1E-05	3,18	1E-04	3,14	2E-05	VDAG03361	hypothetical protein	4,66	4E-19	4,41	3E-17	5,04	2E-22	4,77	1E-21
VDAG04994	cytochrome P450 1A2	5,01	6E-03	5,48	2E-03	6,25	2E-05	6,06	2E-05	VDAG09269	NAD(P) transhydrogenase	6,18	2E-19	6,05	5E-19	6,02	9E-21	6,08	7E-22
VDAG01348	hypothetical protein	2,32	8E-03	2,72	3E-03	2,67	5E-04	3,06	2E-05	VDAG03160	ammonium transporter MEP1	5,58	1E-16	5,69	6E-18	5,85	1E-20	5,92	2E-22
VDAG04827	acetylsterase	5,43	4E-07	5,36	4E-05	4,78	9E-05	5,26	2E-05	VDAG06521	hypothetical protein	5,37	1E-19	5,47	2E-18	5,42	2E-18	5,72	1E-22
VDAG05585	hypothetical protein	3,67	2E-04	3,23	1E-04	3,23	2E-03	3,52	2E-05	VDAG04429	hypothetical protein	5,25	3E-32	5,07	7E-24	4,73	5E-20	4,80	5E-23
VDAG02279	hypothetical protein	5,92	9E-06	5,79	1E-04	5,40	7E-05	5,68	2E-05	VDAG01750	cysteine proteinase	5,41	4E-32	5,50	1E-26	5,01	2E-21	5,09	2E-23
VDAG01556	neutral ceramidase	4,86	1E-04	4,88	1E-03	5,70	2E-05	5,47	2E-05	VDAG03652	hypothetical protein	4,89	1E-21	4,80	3E-19	5,21	5E-25	4,88	9E-24
VDAG04513	hexose transporter protein	3,41	4E-06	3,42	5E-04	3,71	1E-05	3,63	2E-05	VDAG02207	uracil permease	4,85	5E-20	5,14	1E-22	4,97	1E-22	4,96	6E-24
VDAG00208	hypothetical protein	2,17	2E-05	2,03	4E-04	2,23	3E-05	2,07	2E-05	VDAG02906	hypothetical protein	5,73	9E-27	5,87	1E-25	5,78	7E-25	5,80	4E-24
VDAG02909	hypothetical protein	7,19	8E-07	7,16	3E-04	6,72	1E-03	7,38	2E-05	VDAG02591	hypothetical protein	4,85	3E-19	4,88	1E-21	4,94	4E-20	4,94	4E-24
VDAG08417	hypothetical protein	2,67	4E-04	2,60	2E-05	2,57	4E-05	2,58	2E-05	VDAG00516	hypothetical protein	5,23	2E-23	5,19	1E-24	5,22	4E-24	5,12	4E-25
VDAG09366	polygalacturonase	2,14	3E-04	2,04	1E-05	2,26	6E-06	2,08	2E-05	VDAG03325	cupin domain-containing protein	4,72	1E-19	4,70	2E-21	5,00	6E-23	4,83	3E-25
VDAG07316	homogentisate 1,2-dioxygenase	5,45	2E-04	5,53	6E-04	5,50	8E-05	5,70	1E-05	VDAG09526	FAD binding domain-containing protein	12,03	7E-21	12,39	2E-22	13,25	2E-26	13,01	5E-26
VDAG02222	siderophore iron transporter mirA	3,65	2E-09	3,77	2E-08	3,26	7E-05	3,11	1E-05	VDAG03714	sugar transporter	8,73	5E-17	8,79	1E-21	9,32	2E-27	8,99	4E-26
VDAG00522	hypothetical protein	3,88	5E-04	3,78	1E-03	4,11	6E-05	4,32	1E-05	VDAG10460	amino-acid permease inda1	7,69	1E-23	7,87	4E-23	8,00	2E-26	7,93	3E-26

VDAG05397	hypothetical protein	3,58	3E-05	3,66	5E-06	3,61	2E-05	3,42	1E-05	VDAG09529	hypothetical protein	9,87	4E-21	10,31	4E-23	10,74	1E-26	10,58	1E-26
VDAG07325	hypothetical protein	4,24	2E-02	3,92	4E-03	4,86	4E-05	4,84	1E-05	VDAG09381	hypothetical protein	8,01	3E-24	7,90	8E-24	7,99	2E-25	7,96	7E-27
VDAG00915	hypothetical protein	5,28	3E-11	5,32	8E-10	4,46	1E-04	4,37	1E-05	VDAG07231	hypothetical protein	6,19	2E-16	6,21	4E-19	6,68	4E-24	6,75	5E-27
VDAG06250	hypothetical protein	3,39	9E-03	3,47	7E-04	3,73	2E-05	3,66	1E-05	VDAG09527	hydrolase	10,84	3E-22	11,18	8E-24	11,78	1E-27	11,58	2E-27
VDAG09373	alpha-galactosidase	4,75	1E-08	4,25	4E-07	4,22	5E-06	3,97	1E-05	VDAG02590	hypothetical protein	6,56	6E-28	6,42	7E-28	6,57	3E-26	6,27	2E-27
VDAG02900	integral membrane protein	3,52	1E-04	3,71	1E-05	3,19	2E-04	3,43	1E-05	VDAG03713	hypothetical protein	9,06	1E-21	9,19	4E-25	9,61	4E-27	9,47	2E-27
VDAG06172	hypothetical protein	3,02	7E-05	3,25	2E-05	3,45	5E-05	3,23	1E-05	VDAG10464	hypothetical protein	10,49	9E-28	10,60	6E-26	10,50	2E-27	10,46	9E-28
VDAG01895	hypothetical protein	2,55	2E-03	2,52	2E-04	2,75	1E-05	2,77	1E-05	VDAG01905	hypothetical protein	5,25	1E-29	5,40	5E-29	4,98	4E-25	5,22	7E-28
VDAG06043	PNG1 protein	2,31	5E-05	2,36	5E-06	2,39	5E-06	2,34	1E-05	VDAG09574	hypothetical protein	8,42	4E-34	8,37	2E-32	8,03	4E-27	7,91	2E-28
VDAG07680	hypothetical protein	11,26	3E-05	11,01	2E-05	11,64	1E-05	11,29	1E-05	VDAG09804	alpha/beta hydrolase fold-3 domain-containing protein	6,94	3E-32	7,01	4E-28	6,86	2E-28	6,66	2E-28
VDAG03755	hypothetical protein; TDF12.2	5,29	4E-04	5,52	3E-03	6,23	5E-05	6,55	1E-05	VDAG09805	siderophore iron transporter mirB	9,98	2E-30	9,91	2E-26	9,93	2E-28	9,73	1E-28
VDAG05078	hypothetical protein	3,23	2E-08	3,22	6E-08	2,91	3E-06	2,77	1E-05	VDAG09615	hypothetical protein	6,12	9E-19	5,98	8E-18	6,96	1E-28	6,88	4E-31
VDAG04175	SAM and PH domain-containing protein	4,27	1E-03	4,38	4E-04	4,42	5E-05	4,61	9E-06	VDAG02631	hypothetical protein	7,12	2E-25	7,04	5E-28	7,31	1E-29	7,23	9E-32
VDAG01784	HhH-GPD family base excision DNA repair protein	3,14	7E-03	2,87	4E-04	3,64	2E-06	3,21	8E-06	VDAG09528	hypothetical protein	10,75	1E-25	11,07	1E-27	11,59	1E-31	11,43	8E-32

VDAG06298	cAMP-independent regulatory protein pac2	2,46	2E-05	2,41	2E-06	2,43	9E-06	2,26	8E-06	VDAG05961	hypothetical protein	7,60	1E-25	7,44	2E-25	8,31	8E-34	7,91	3E-32
VDAG07290	carboxypeptidase B	6,19	1E-06	6,23	3E-05	6,69	5E-07	5,98	8E-06	VDAG09669	6-phosphoglucanolactonase	6,14	7E-36	6,37	2E-30	5,97	1E-27	6,13	2E-32
VDAG04796	K ⁺ /H ⁺ antiporter 1	2,39	7E-06	2,47	1E-05	2,32	3E-05	2,49	8E-06	VDAG04336	alpha-N-arabinofuranosidase	9,43	3E-32	9,50	5E-32	9,47	6E-30	9,37	2E-32
VDAG07367	serin endopeptidase	2,59	1E-05	2,73	1E-05	2,45	4E-05	2,58	8E-06	VDAG00053	FAD binding domain-containing protein	5,86	2E-39	5,85	2E-33	5,66	2E-31	5,71	7E-33
VDAG04446	YoaJ	3,64	1E-07	3,80	8E-06	3,86	2E-07	3,61	7E-06	VDAG07588	ferric reductase transmembrane component 3	11,16	7E-23	10,89	1E-24	11,79	3E-33	11,51	5E-33
VDAG06280	hypothetical protein	5,81	6E-06	6,17	2E-05	6,02	4E-06	5,62	7E-06	VDAG09382	glucose oxidase	7,25	2E-35	7,32	7E-32	7,16	2E-32	7,13	3E-33
VDAG02566	AdhA	2,90	7E-06	3,03	2E-05	2,87	3E-05	2,95	7E-06	VDAG01904	hypothetical protein	6,20	6E-27	6,16	2E-29	6,45	5E-31	6,24	2E-33
VDAG05053	sarcosine dehydrogenase	5,84	1E-08	5,72	9E-07	5,17	3E-04	5,64	7E-06	VDAG00057	zinc-regulated transporter 1	5,97	2E-42	6,04	3E-38	5,80	4E-34	5,84	4E-36
VDAG03453	NAD-dependent deacetylase sirtuin-7	3,63	3E-05	3,86	6E-05	4,09	4E-05	3,98	6E-06	VDAG03653	hypothetical protein	5,76	7E-38	5,73	5E-32	5,95	2E-37	5,81	2E-36
VDAG09774	hypothetical protein	4,44	1E-06	4,20	2E-05	4,78	3E-07	4,21	6E-06	VDAG00307	hypothetical protein	7,49	6E-38	7,68	3E-38	7,43	8E-34	7,46	1E-36
VDAG09850	sulfatase domain-containing protein	3,38	1E-05	3,43	5E-07	3,35	9E-06	3,30	6E-06	VDAG01036	hypothetical protein	7,34	4E-40	7,29	3E-35	7,37	9E-33	7,32	4E-37
VDAG02256	hypothetical protein	6,44	1E-05	6,29	2E-06	6,50	8E-06	6,24	6E-06	VDAG07413	hypothetical protein	5,72	3E-32	5,69	2E-33	5,62	1E-32	5,69	1E-37
VDAG00549	sorbitol dehydrogenase	3,04	2E-05	3,12	3E-06	3,04	1E-05	2,83	5E-06	VDAG00784	para-nitrobenzyl esterase	9,59	1E-38	9,77	1E-37	9,50	2E-37	9,42	7E-38
VDAG03223	serine/threonine-protein kinase RIM15	2,21	3E-03	2,05	1E-04	2,23	1E-05	2,15	5E-06	VDAG02181	cytochrome P450 monooxygenase	7,01	3E-43	7,20	4E-43	7,11	3E-41	6,80	3E-39

VDAG09583	alcohol oxidase	6,65	2E-08	7,21	1E-10	6,23	1E-06	6,28	5E-06	VDAG00291	hypothetical protein	6,38	9E-39	6,35	7E-40	6,34	4E-37	6,17	1E-39
VDAG01760	hypothetical protein	2,28	8E-04	2,33	1E-05	2,42	2E-05	2,42	5E-06	VDAG07881	pectinesterase	10,33	5E-44	10,24	8E-42	10,49	1E-41	10,09	2E-40
VDAG06373	choline transport protein	2,87	1E-06	2,90	3E-06	2,64	7E-06	2,71	5E-06	VDAG03938	cytochrome P450 52E2	6,52	3E-40	6,40	1E-39	6,66	5E-44	6,25	5E-41
VDAG04957	3-ketoacyl-CoA thiolase	3,90	1E-03	3,38	7E-04	3,94	1E-05	3,83	4E-06	VDAG03495	FAD binding domain-containing protein	11,04	1E-40	11,07	1E-41	11,08	5E-41	11,09	1E-41
VDAG09985	hypothetical protein	3,27	4E-05	3,63	7E-05	3,44	5E-05	3,56	4E-06	VDAG03533	hypothetical protein	7,23	1E-51	6,86	7E-40	6,88	1E-40	6,62	6E-42
VDAG10208	amino-acid permease inda1	2,09	4E-04	2,07	6E-05	2,03	5E-06	2,10	4E-06	VDAG08124	sugar transporter family protein	6,09	5E-36	6,19	4E-40	6,37	4E-42	6,22	3E-42
VDAG07264	hypothetical protein	4,12	1E-07	4,10	1E-04	4,36	2E-05	4,05	4E-06	VDAG05101	hypothetical protein	7,75	2E-30	7,66	4E-32	8,43	2E-43	8,15	1E-42
VDAG05052	hypothetical protein	2,42	9E-04	2,52	2E-04	3,14	4E-07	2,86	4E-06	VDAG02068	zinc/iron transporter protein	6,27	2E-47	6,17	4E-39	6,19	5E-41	6,17	2E-43
VDAG07646	acetamidase	4,50	3E-09	4,64	4E-08	4,39	2E-07	4,05	4E-06	VDAG07133	hypothetical protein	9,65	3E-40	9,58	1E-39	9,65	4E-37	9,67	7E-44
VDAG10006	para-nitrobenzyl esterase	2,86	1E-02	2,96	1E-04	3,06	2E-04	3,26	4E-06	VDAG05090	hypothetical protein	7,98	3E-49	7,71	4E-41	7,79	5E-41	7,70	1E-44
VDAG07424	oxidoreductase	3,69	4E-11	3,88	8E-12	2,90	2E-06	2,84	4E-06	VDAG02269	pantothenate transporter liz1	6,79	7E-37	6,92	1E-40	6,81	5E-42	6,86	1E-44
VDAG04341	hypothetical protein	4,06	1E-03	3,91	1E-03	4,71	1E-05	4,74	3E-06	VDAG07282	hypothetical protein	7,85	2E-52	7,86	1E-45	7,57	6E-38	7,61	2E-45
VDAG05852	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	5,97	2E-06	5,82	3E-07	5,92	1E-06	5,59	3E-06	VDAG01172	hypothetical protein	9,46	2E-42	9,73	5E-44	9,52	1E-44	9,69	1E-47
VDAG05141	high-affinity potassium transport protein	3,90	2E-02	3,85	7E-05	4,42	1E-06	4,15	3E-06	VDAG02221	ATP-dependent permease MDL1	8,48	2E-65	8,39	7E-57	8,04	4E-50	7,79	3E-48
VDAG03702	hypothetical protein	3,06	3E-06	3,13	4E-05	3,39	4E-07	3,20	3E-06	VDAG09794	hypothetical protein	7,19	2E-49	7,10	2E-49	7,08	6E-46	7,04	1E-48
VDAG06721	homogentisate 1,2-dioxygenase	2,37	1E-05	2,43	2E-05	2,34	1E-06	2,39	3E-06	VDAG04335	hypothetical protein	10,47	2E-54	10,54	8E-52	10,30	4E-46	10,29	1E-49

VDAG02621	hypothetical protein	5,86	5E-08	5,70	2E-06	4,40	2E-04	4,92	3E-06	VDAG09386	CipC protein	7,92	3E-57	7,75	2E-50	7,84	6E-50	7,57	5E-50
VDAG04960	salicylate hydroxylase	3,69	9E-04	3,05	4E-03	3,97	7E-06	3,75	3E-06	VDAG07265	hypothetical protein	9,98	1E-52	9,78	2E-52	9,95	1E-52	9,65	5E-52
VDAG05456	pisatin demethylase	3,14	3E-04	3,20	2E-04	3,42	6E-06	3,41	3E-06	VDAG05068	ankyrin repeat and SAM domain-containing protein	6,99	3E-54	7,13	3E-47	6,83	3E-45	7,18	3E-53
VDAG00514	ATP-binding cassette transporter abc1	2,52	2E-05	2,56	9E-07	2,48	1E-06	2,47	3E-06	VDAG07266	choline dehydrogenase	7,34	6E-59	7,33	4E-56	7,15	3E-51	7,11	1E-54
VDAG03712	alpha-L-rhamnosidase	4,06	3E-03	4,02	1E-04	4,40	3E-06	4,14	3E-06	VDAG03314	hypothetical protein	7,46	3E-59	7,36	8E-52	7,69	6E-58	7,51	1E-56
VDAG01165	NADP-dependent mannitol dehydrogenase	3,92	7E-04	4,53	5E-06	4,15	3E-05	4,58	3E-06	VDAG05652	hypothetical protein	8,10	7E-69	8,09	3E-63	7,87	1E-57	7,64	8E-57
VDAG04905	ankyrin repeat protein	4,58	8E-04	3,70	3E-03	4,98	2E-05	5,10	3E-06	VDAG07230	superoxide dismutase	7,54	2E-66	7,49	1E-60	7,34	1E-59	7,38	3E-62
VDAG05526	short-chain dehydrogenase/reductase SDR	2,94	2E-06	2,80	3E-07	2,92	8E-07	2,73	2E-06	VDAG07412	Endonuclease /exonuclease /phosphatase family protein	9,51	7E-47	9,52	2E-44	10,16	2E-56	10,27	2E-62
VDAG00453	hypothetical protein	2,83	2E-07	2,89	1E-06	2,32	2E-05	2,70	2E-06	VDAG10367	hypothetical protein	8,10	1E-79	8,12	9E-72	7,79	7E-63	7,67	1E-64
VDAG03267	hypothetical protein	3,55	1E-09	3,47	2E-06	2,99	1E-05	3,23	2E-06	VDAG07300	ATP-binding cassette sub-family A member 9	7,39	1E-57	7,39	6E-60	7,72	2E-66	7,62	1E-68
VDAG07166	carnitine O-palmitoyltransferase I	3,75	1E-07	3,73	1E-05	3,68	1E-06	3,54	2E-06	VDAG03386	hypothetical protein	9,57	1E-72	9,78	2E-73	9,18	3E-64	9,60	6E-73
VDAG03640	Phosphoglycerate mutase family protein	2,79	8E-05	2,34	2E-04	2,58	4E-05	2,53	2E-06	VDAG07229	hypothetical protein	9,05	2E-79	8,81	1E-69	8,94	1E-70	8,66	5E-73
VDAG00950	choline-sulfatase	3,73	2E-06	3,61	3E-06	3,49	6E-07	3,40	2E-06	VDAG09801	siderophore iron transporter mirB	9,11	4E-71	9,18	3E-70	9,22	7E-74	9,19	3E-78

VDAG03339	hypothetical protein	5,72	4E-06	5,75	1E-05	6,02	8E-07	5,66	2E-06	VDAG08100	serin endopeptidase	13,22	2E-85	13,15	4E-85	13,10	1E-81	12,76	6E-80
VDAG06705	hypothetical protein	2,27	7E-05	2,41	1E-04	2,46	3E-06	2,57	2E-06	VDAG02067	hypothetical protein	9,00	2E-92	8,83	6E-80	8,75	2E-83	8,63	1E-82
VDAG03771	hypothetical protein	2,57	4E-06	2,60	7E-06	2,42	3E-06	2,59	2E-06	VDAG08741	endochitinase	9,03	5E-98	8,96	6E-91	9,12	2E-97	8,90	4E-96
VDAG05853	solute carrier family 35 member E3	6,16	6E-06	6,16	4E-07	6,27	1E-06	5,99	2E-06	VDAG07185	glucan 1,3-beta-glucosidase	12,31	5E-130	12,24	1E-124	12,38	2E-124	11,94	6E-122
VDAG05001	phosphoadenosine phosphosulfate reductase	2,40	5E-05	2,11	1E-04	2,34	1E-06	2,26	2E-06	VDAG04551	antigen 1	10,79	4E-133	10,85	6E-125	10,69	3E-126	10,80	2E-127
VDAG09283	ferric reductase transmembrane component 6	2,57	2E-05	2,44	1E-05	2,58	8E-06	2,48	2E-06	VDAG05411	cobW domain-containing protein	13,29	2E-160	13,26	3E-152	13,50	1E-162	13,49	3E-166
VDAG05140	fungal specific transcription factor domain-containing protein	2,62	8E-07	2,67	1E-06	2,45	3E-05	2,67	2E-06										

Tabelle 6.2 127 Gene die in infizierten Pflanzen (WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t) gegenüber V.I.43-GFP mindestens 4-fach reprimiert sind und einen FDR < 0,05 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	V.I.43-GFP vs. WT _{aos} inf		V.I.43-GFP vs. aos inf		V.I.43-GFP vs. WT _{coi1-t} inf		V.I.43-GFP vs. coi1-t inf		AGI-Code	Genname	V.I.43-GFP vs. WT _{aos} inf		V.I.43-GFP vs. aos inf		V.I.43-GFP vs. WT _{coi1-t} inf		V.I.43-GFP vs. coi1-t inf	
		log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.			log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.	log2 FC	padj.
VDAG05386	amino acid transporter	-5,21	8E-34	-5,68	4E-38	-4,16	2E-28	-5,33	6E-38	VDAG05792	peroxisomal catalase	-2,97	2E-05	-2,89	1E-06	-2,69	5E-06	-2,99	8E-07
VDAG02630	superoxide dismutase	-3,81	1E-20	-3,98	2E-29	-4,10	2E-32	-4,25	4E-35	VDAG09522	aquaporin-9	-5,00	7E-08	-4,34	6E-06	-4,69	8E-07	-4,63	8E-07
VDAG06698	hypothetical protein	-4,45	5E-25	-4,36	1E-27	-3,11	7E-16	-4,20	7E-26	VDAG00608	mitochondrial carnitine carrier	-2,17	9E-05	-2,43	7E-07	-2,35	8E-07	-2,36	9E-07
VDAG10513	sulfite oxidase	-3,77	1E-22	-3,65	3E-25	-3,70	2E-25	-3,77	2E-25	VDAG01137	STI35 protein	-2,73	1E-07	-2,78	5E-08	-2,30	6E-06	-2,49	1E-06
VDAG00299	hypothetical protein	-5,10	1E-19	-5,01	4E-21	-4,39	3E-17	-5,24	3E-22	VDAG07616	hypothetical protein	-2,92	2E-04	-2,87	5E-05	-2,52	5E-05	-3,32	1E-06
VDAG04730	hypothetical protein	-4,22	6E-18	-3,91	5E-20	-4,08	2E-21	-3,97	5E-22	VDAG08368	trimethyllysine dioxygenase	-2,32	4E-06	-2,54	2E-08	-2,02	1E-05	-2,07	1E-06
VDAG07100	hypothetical protein	-4,87	2E-18	-4,32	2E-17	-4,15	2E-16	-4,65	5E-22	VDAG04011	methylglutaconyl-CoA hydratase	-3,34	5E-05	-3,00	8E-06	-3,35	1E-06	-3,13	2E-06
VDAG01845	branched-chain-aa amino-transferase	-3,70	3E-20	-3,17	1E-19	-3,50	9E-24	-3,31	1E-20	VDAG02244	hypothetical protein	-2,04	4E-03	-2,82	1E-05	-2,52	3E-05	-3,00	3E-06
VDAG02199	proline oxidase	-3,68	2E-14	-3,79	2E-20	-4,17	9E-24	-3,71	3E-20	VDAG04057	hypothetical protein	-3,59	1E-05	-3,88	1E-09	-2,94	4E-05	-3,18	3E-06
VDAG07211	pyrimidine precursor biosynthesis enzyme THI11	-3,49	4E-17	-3,73	2E-21	-3,19	1E-16	-3,59	9E-20	VDAG01666	hypothetical protein	-3,23	2E-09	-3,03	1E-09	-2,89	1E-08	-2,44	3E-06
VDAG02125	hypothetical protein	-3,83	2E-09	-3,88	4E-15	-3,53	1E-12	-4,74	1E-19	VDAG01337	aromatic amino acid aminotransferase	-2,85	2E-03	-2,97	2E-05	-2,99	2E-05	-3,19	3E-06

VDAG10220	hemoglobin	-6,13	7E-17	-5,82	2E-18	-5,85	1E-18	-5,69	3E-19	VDAG04361	dihydrolipoamide transacylase	-3,86	9E-05	-3,47	6E-05	-3,79	7E-06	-3,87	3E-06
VDAG04771	hypothetical protein	-5,68	1E-10	-5,76	3E-14	-5,48	2E-13	-7,23	1E-18	VDAG04384	hypothetical protein	-2,02	1E-04	-2,03	3E-06	-2,09	2E-06	-2,06	4E-06
VDAG07414	homogentisate 1,2-dioxygenase	-3,03	2E-13	-3,11	4E-16	-3,25	9E-17	-3,38	3E-18	VDAG02470	pregnancy-associated glycoprotein	-2,64	5E-03	-3,05	1E-06	-2,85	5E-05	-3,10	4E-06
VDAG00847	ATP synthase protein	-2,39	1E-08	-2,25	1E-12	-2,61	2E-16	-2,65	2E-17	VDAG00006	HMF1 protein	-3,14	5E-05	-2,81	8E-05	-2,91	2E-05	-3,19	5E-06
VDAG05827	hypothetical protein	-2,76	6E-09	-2,82	5E-11	-2,89	9E-13	-3,54	4E-16	VDAG02769	2-methylcitrate synthase	-3,19	8E-05	-3,08	6E-06	-3,09	7E-06	-3,10	5E-06
VDAG00910	cytochrome c	-2,90	2E-13	-3,00	2E-19	-2,93	1E-17	-2,82	5E-16	VDAG02453	hypothetical protein	-2,03	1E-04	-2,32	4E-06	-2,25	1E-05	-2,23	6E-06
VDAG10081	L-galactonate dehydratase	-2,91	2E-16	-2,73	2E-17	-2,59	2E-14	-2,65	2E-15	VDAG08070	hypothetical protein	-2,12	3E-04	-2,39	8E-08	-2,16	2E-05	-2,23	6E-06
VDAG09715	hypothetical protein	-3,71	2E-10	-3,92	7E-15	-3,63	1E-12	-3,92	4E-15	VDAG08580	hypothetical protein	-3,21	1E-03	-3,24	5E-05	-3,00	2E-04	-3,65	8E-06
VDAG08496	dihydrodipicolinate synthase	-3,10	1E-13	-2,70	2E-14	-3,03	5E-16	-2,81	4E-15	VDAG09832	flavoprotein oxygenase	-2,30	4E-05	-2,36	2E-05	-2,68	2E-07	-2,36	1E-05
VDAG03116	cytochrome c peroxidase	-2,86	3E-12	-2,78	3E-17	-3,06	3E-19	-2,75	5E-15	VDAG08517	3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase	-2,57	2E-04	-2,67	8E-06	-2,63	1E-05	-2,63	1E-05
VDAG02057	fumaryl-acetoacetase	-3,07	6E-12	-2,92	9E-14	-2,98	1E-14	-3,00	1E-14	VDAG07657	hypothetical protein	-2,62	4E-03	-2,85	2E-04	-2,33	1E-03	-3,52	1E-05
VDAG02775	Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit α	-3,03	2E-11	-2,94	2E-13	-3,16	4E-15	-3,01	5E-14	VDAG04046	hypothetical protein	-3,73	8E-04	-3,59	2E-05	-3,21	3E-04	-3,76	2E-05
VDAG03922	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	-3,95	3E-08	-4,01	2E-11	-4,19	2E-12	-4,52	6E-14	VDAG01703	NADP-dependent L-serine/L-allo-threonine dehydrogenase ydfG	-2,25	9E-04	-2,34	5E-05	-2,08	4E-04	-2,39	2E-05
VDAG05315	hypothetical protein	-4,58	9E-11	-4,64	3E-14	-4,47	2E-13	-4,31	1E-13	VDAG07310	glutaminase	-3,12	2E-05	-3,28	1E-07	-2,53	7E-05	-2,61	2E-05
VDAG01575	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit beta	-3,39	4E-08	-3,59	4E-11	-3,39	1E-10	-3,91	3E-13	VDAG09737	riboflavin transporter MCH5	-3,04	1E-04	-2,80	2E-04	-2,15	3E-03	-3,15	3E-05

VDAG01194	polyamine transporter 2	-4,91	1E-08	-5,98	7E-11	-5,36	3E-10	-6,31	1E-12	VDAG02228	dihydrodipicolinate synthase	-2,49	4E-04	-2,89	1E-05	-2,55	9E-05	-2,70	5E-05
VDAG01614	electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase	-2,56	3E-09	-2,83	3E-13	-2,64	5E-11	-2,82	1E-12	VDAG07042	polyamine transporter 1	-3,29	6E-04	-3,76	1E-06	-3,76	4E-06	-3,24	7E-05
VDAG08579	hypothetical protein	-4,14	1E-07	-3,14	2E-06	-4,10	4E-09	-5,27	5E-12	VDAG06153	hypothetical protein	-3,56	3E-03	-3,71	2E-04	-3,67	3E-04	-4,02	8E-05
VDAG07630	phosphate-repressible phosphate permease	-3,18	3E-05	-3,38	6E-08	-3,85	4E-10	-4,30	2E-11	VDAG03622	Axe2	-2,32	4E-03	-2,65	4E-05	-2,19	1E-03	-2,47	1E-04
VDAG06094	mitochondrial hypoxia responsive domain-containing protein	-2,13	7E-07	-2,23	2E-09	-2,26	2E-10	-2,36	4E-11	VDAG09908	acyl-CoA dehydrogenase	-2,29	5E-03	-2,35	2E-04	-2,58	7E-05	-2,49	1E-04
VDAG03544	hypothetical protein	-3,12	5E-05	-3,17	1E-08	-3,11	8E-08	-3,73	5E-11	VDAG07839	hypothetical protein	-2,15	3E-03	-2,81	2E-03	-3,17	2E-04	-3,09	1E-04
VDAG04054	cytochrome b-c1 complex subunit 2	-2,03	7E-07	-2,08	3E-10	-2,11	3E-09	-2,15	1E-10	VDAG04222	pyridoxal reductase	-2,80	2E-02	-2,75	5E-03	-2,75	7E-03	-3,40	2E-04
VDAG08114	exostosin-2	-5,12	4E-08	-4,87	8E-08	-5,30	3E-08	-6,49	1E-10	VDAG01073	NAD(P)H-dependent D-xylose reductase	-2,09	2E-02	-2,12	2E-03	-2,11	3E-03	-2,44	2E-04
VDAG04438	succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	-2,55	1E-09	-2,44	4E-13	-2,51	7E-12	-2,27	2E-10	VDAG09022	acetyl-CoA acetyltransferase	-2,57	3E-03	-2,76	1E-04	-2,49	7E-04	-2,68	3E-04
VDAG04207	succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	-2,30	5E-08	-2,15	5E-11	-2,51	2E-13	-2,18	2E-10	VDAG07116	aromatic and neutral aliphatic amino acid permease	-2,64	1E-02	-3,17	6E-04	-3,08	5E-04	-3,32	3E-04
VDAG01121	hypothetical protein	-2,80	8E-07	-3,06	3E-11	-2,85	1E-09	-2,90	5E-10	VDAG04291	hypothetical protein	-3,23	3E-04	-2,62	6E-04	-2,54	2E-03	-2,75	3E-04

VDAG09349	hypothetical protein	-2,21	3E-06	-2,51	1E-09	-2,52	6E-09	-2,55	1E-09	VDAG00005	phenazine biosynthesis PhzC/PhzF protein	-2,32	2E-02	-2,59	1E-03	-2,84	4E-04	-3,04	4E-04
VDAG00347	electron transfer flavoprotein subunit beta	-2,04	2E-06	-2,12	2E-09	-2,09	8E-09	-2,18	2E-09	VDAG09881	hypothetical protein	-6,11	3E-03	-6,46	2E-04	-5,71	9E-04	-5,99	4E-04
VDAG01921	methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain	-3,42	1E-06	-3,05	2E-07	-3,15	1E-07	-3,47	2E-09	VDAG08495	D-galacturonic acid reductase	-2,67	8E-03	-2,77	9E-04	-2,99	6E-04	-2,91	5E-04
VDAG02728	hypothetical protein	-2,30	6E-06	-2,13	7E-06	-2,04	5E-06	-2,64	6E-09	VDAG03757	enoyl-CoA hydratase	-2,56	9E-03	-2,67	5E-04	-2,62	6E-04	-2,71	5E-04
VDAG07909	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase	-3,07	5E-06	-3,30	2E-08	-3,43	9E-10	-3,26	7E-09	VDAG02768	mitochondrial 2-methylisocitrate lyase	-3,12	2E-03	-2,74	8E-04	-3,03	3E-04	-2,86	5E-04
VDAG07892	hypothetical protein	-2,01	6E-05	-2,01	7E-08	-2,20	1E-09	-2,11	9E-09	VDAG09303	NADPH dehydrogenase	-4,19	5E-03	-3,73	4E-03	-3,35	1E-02	-4,37	7E-04
VDAG01989	hydroxymethylglutaryl-CoA lyase	-2,66	4E-06	-2,67	5E-08	-2,53	5E-08	-2,78	1E-08	VDAG05014	calcium-transporting ATPase	-2,22	1E-02	-2,35	3E-03	-2,37	1E-03	-2,55	9E-04
VDAG09950	isotrichodermin C-15 hydroxylase	-3,80	5E-06	-4,19	5E-09	-4,01	5E-08	-4,17	1E-08	VDAG07177	bifunctional P-450:NADPH-P450 reductase	-4,58	5E-03	-4,72	1E-03	-4,55	2E-03	-4,60	1E-03
VDAG10512	dihydrodipicolinate synthase	-2,53	2E-07	-2,66	1E-09	-2,29	5E-07	-2,55	1E-08	VDAG00774	mannitol-1-phosphate 5-dehydrogenase	-2,17	3E-02	-2,12	3E-03	-2,47	1E-03	-2,32	2E-03
VDAG09558	NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit	-2,15	2E-05	-2,31	4E-10	-2,24	3E-09	-2,23	1E-08	VDAG07577	hypothetical protein	-4,74	8E-03	-4,07	2E-02	-4,26	7E-03	-4,86	2E-03
VDAG00506	mitochondrial carrier protein LEU5	-2,78	3E-09	-2,50	3E-09	-2,70	2E-10	-2,30	2E-08	VDAG01781	polygalacturonase	-2,95	4E-02	-2,98	4E-03	-3,47	9E-04	-3,13	2E-03

VDAG08648	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kDa subunit	-2,20	1E-05	-2,04	5E-09	-2,23	1E-08	-2,05	4E-08	VDAG04793	alcohol dehydrogenase	-4,77	4E-02	-4,18	5E-02	-4,01	2E-02	-7,13	2E-03
VDAG02800	hypothetical protein	-2,89	2E-02	-3,67	5E-05	-3,40	5E-05	-5,45	4E-08	VDAG04753	structural toxin protein RtxA	-3,63	8E-03	-3,21	5E-03	-3,75	1E-03	-3,36	2E-03
VDAG02209	glyoxylate reductase	-2,05	2E-06	-2,06	3E-08	-2,07	6E-08	-2,02	4E-08	VDAG10189	hypothetical protein	-4,30	7E-05	-3,94	2E-04	-2,97	1E-03	-2,70	4E-03
VDAG09314	succinate dehydrogenase cytochrome b560 subunit	-2,15	1E-06	-2,09	3E-09	-2,39	3E-11	-2,00	4E-08	VDAG00421	glutathione S-transferase Gst3	-2,40	2E-02	-2,55	1E-03	-2,36	4E-03	-2,24	4E-03
VDAG00256	vitamin H transporter 1	-2,20	2E-06	-2,16	2E-08	-2,28	1E-08	-2,11	5E-08	VDAG00619	hypothetical protein	-2,55	9E-03	-2,48	5E-03	-2,66	1E-03	-2,20	4E-03
VDAG04729	acetylornithine amino-transferase	-4,23	4E-05	-4,55	3E-06	-4,10	6E-06	-5,06	6E-08	VDAG02866	hypothetical protein	-3,06	2E-02	-2,72	2E-02	-2,26	5E-02	-3,22	4E-03
VDAG07212	hypothetical protein	-2,41	1E-04	-3,00	3E-07	-2,87	2E-07	-2,82	1E-07	VDAG05136	hypothetical protein	-3,10	4E-02	-3,55	8E-03	-2,82	2E-02	-3,27	1E-02
VDAG05481	2-oxoisovalerate dehydrogenase subunit alpha	-3,50	4E-05	-3,66	3E-06	-3,44	2E-06	-4,11	1E-07	VDAG04010	hypothetical protein	-3,79	3E-04	-2,79	1E-03	-2,29	6E-03	-2,28	1E-02
VDAG09644	arginine permease	-4,04	6E-07	-3,88	3E-08	-4,37	6E-10	-3,75	2E-07	VDAG08136	hypothetical protein	-2,65	2E-02	-3,66	3E-02	-3,35	2E-02	-3,65	1E-02
VDAG04128	methyl-malonnate-semialdehyde dehydrogenase	-2,33	1E-04	-2,22	4E-06	-2,73	1E-08	-2,44	2E-07	VDAG05132	isoflavone reductase family protein	-2,45	2E-02	-3,94	5E-03	-2,80	3E-02	-2,95	1E-02
VDAG05480	ubiquinone/menaquinone biosynthesis methyltransferase ubiE	-2,63	2E-06	-2,15	6E-07	-2,44	2E-08	-2,18	2E-07	VDAG07072	hypothetical protein	-3,37	4E-02	-3,40	1E-02	-3,29	1E-02	-3,31	1E-02

VDAG07271	TTL domain-containing protein	-5,71	1E-04	-5,91	5E-06	-4,66	1E-04	-6,80	3E-07	VDAG08037	hypothetical protein	-2,83	5E-02	-2,56	2E-02	-2,94	1E-02	-2,72	1E-02
VDAG01922	isovaleryl-CoA dehydrogenase	-3,20	3E-04	-3,22	3E-06	-3,72	2E-07	-3,57	3E-07	VDAG02054	hypothetical protein	-2,57	5E-02	-2,66	1E-02	-2,81	9E-03	-2,47	2E-02
VDAG05736	mitochondrial import inner membrane translocase subunit tim-9	-2,11	1E-04	-2,05	5E-06	-2,25	4E-07	-2,20	4E-07	VDAG01926	hypothetical protein	-2,95	4E-02	-2,97	8E-03	-2,74	2E-02	-2,62	2E-02
VDAG09741	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	-2,85	4E-04	-3,18	1E-06	-3,00	9E-06	-3,31	5E-07	VDAG03198	hypothetical protein	-3,62	6E-03	-2,87	3E-03	-2,03	2E-02	-2,04	2E-02
VDAG02123	cellulose synthase catalytic subunit	-2,80	3E-03	-2,84	6E-04	-3,04	1E-04	-4,01	6E-07										

Tabelle 6.3 Gene, die nach Infektion mindestens 2-fach induziert sind und einen p-value < 0,01 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	WT _{coi1-t} mock		coi1-t mock		WT _{coi1-t} mock		WT _{coi1-t} inf		WT _{aos} mock		aos mock		WT _{aos} mock		WT _{aos} inf	
		vs. WT _{coi1-t} inf		vs. coi1-t inf		vs. coi1-t mock		vs. coi1-t inf		vs. WT _{aos} inf		vs. aos inf		vs. aos mock		vs. aos inf	
		log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value
60 Gene die im WT_{coi1-t} nicht aber in WT_{aos}, aos und coi1-t nach Infektion induziert sind																	
AT4G16860	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	1,62	2E-05	0,54	0,1232	2,76	0,0000	1,69	0,0000	-0,73	0,1124	0,20	0,4131	-0,75	0,0696	0,18	0,5293
AT4G16146	cAMP-regulated phosphoprotein 19-related protein	1,65	3E-05	1,08	0,0222	0,10	0,7834	-0,46	0,2088	0,22	0,6621	-0,09	0,9257	-0,31	0,6664	-0,62	0,3132
AT2G15890	MEE14; maternal effect embryo arrest	1,71	1E-04	1,18	0,0241	0,03	0,8998	-0,51	0,2233	0,15	0,6792	0,19	0,7748	-0,11	0,8543	-0,07	0,7856
AT4G24350	Phosphorylase superfamily protein	1,31	1E-04	0,56	0,2870	-1,67	0,0006	-2,42	0,0000	0,27	0,3569	0,11	0,9674	-1,53	0,0000	-1,69	0,0000
AT5G42900	COR27; cold regulated gene 27	1,44	2E-04	1,07	0,0183	0,10	0,7771	-0,26	0,5020	0,40	0,2557	0,02	0,9829	-0,27	0,4608	-0,65	0,0887
AT1G76650	CML38; calmodulin-like 38	1,27	2E-04	0,83	0,0295	0,17	0,5981	-0,27	0,4833	0,52	0,1042	0,51	0,2692	-0,45	0,2374	-0,45	0,1244
AT1G56300	Chaperone DnaJ-domain family protein	1,89	3E-04	1,46	0,0158	-0,28	0,6947	-0,72	0,1794	-0,07	0,9532	0,29	0,7674	-0,45	0,5005	-0,10	0,7805
AT1G52343	unknown protein	1,03	3E-04	0,65	0,0491	0,49	0,1164	0,11	0,7063	0,25	0,3985	0,47	0,1682	0,03	0,8032	0,25	0,4311
AT2G40340	Integrase-type DNA-binding family protein	1,07	3E-04	0,90	0,0052	0,16	0,6598	-0,01	0,9461	-0,11	0,6364	0,18	0,8511	-0,09	0,8002	0,21	0,6687
AT3G49130	SWAP/surp RNA-binding domain-containing protein	1,58	3E-04	0,78	0,1050	1,38	0,0036	0,58	0,1500	0,79	0,0437	0,29	0,9612	-0,21	0,5437	-0,71	0,0211
AT4G33980	unknown protein	1,49	4E-04	0,97	0,0470	0,45	0,3098	-0,07	0,8428	-0,23	0,5533	0,13	0,7985	-0,23	0,7855	0,14	0,9844
AT1G43765	other RNA	1,11	4E-04	0,26	0,5014	0,14	0,6989	-0,71	0,0217	0,01	0,9913	0,04	0,7850	-0,11	0,7665	-0,08	0,5613
AT2G39400	alpha/beta-Hydrolases family protein	1,26	4E-04	0,75	0,0820	1,12	0,0031	0,61	0,0980	0,71	0,0414	0,71	0,2444	-0,21	0,6645	-0,21	0,2566

AT1G77525	unknown protein	1,18	5E-04	-0,17	0,8131	-0,29	0,5497	-1,64	0,0000	0,23	0,4561	-0,06	0,6330	-0,32	0,3991	-0,61	0,0468
AT5G13080	WRKY75; WRKY DNA-binding protein 75	1,11	1E-03	0,42	0,2649	0,45	0,2024	-0,24	0,5165	0,37	0,2295	0,39	0,6669	-0,51	0,1409	-0,48	0,0415
AT4G37290	unknown protein	2,14	1E-03	0,65	0,3824	1,33	0,0542	-0,17	0,8597	0,89	0,1478	1,46	0,1402	-0,24	0,7113	0,34	0,8656
AT5G39110	GLP6; RmlC-like cupins family protein	1,37	2E-03	0,68	0,1829	3,05	0,0000	2,36	0,0000	0,38	0,3118	0,23	0,9559	0,52	0,3119	0,37	0,8861
AT2G30750	CYP71A12; cytochrome P450	1,22	2E-03	0,47	0,2616	1,25	0,0020	0,51	0,1377	0,76	0,0373	0,95	0,0937	-0,13	0,7539	0,07	0,6002
AT2G40080	unknown protein	1,75	2E-03	1,60	0,0146	-0,47	0,4694	-0,61	0,2561	-0,26	0,6978	0,38	0,5630	-0,44	0,4089	0,19	0,8540
AT5G24470	APRR5; pseudo-response regulator 5	1,42	2E-03	1,23	0,0207	-0,14	0,8176	-0,33	0,4546	-0,31	0,4698	0,26	0,5570	-0,37	0,4726	0,21	0,5606
AT1G62935	unknown protein	1,16	2E-03	0,12	0,7925	0,42	0,2958	-0,61	0,1114	0,69	0,1137	0,05	0,8573	0,45	0,1989	-0,18	0,9469
AT1G11530	ATCX51; C-terminal cysteine residue is changed to a serine 1	1,32	2E-03	0,37	0,4711	-0,19	0,6818	-1,14	0,0057	0,01	0,9733	0,17	0,7401	-0,20	0,7030	-0,05	0,9510
AT2G43550	ATTI6; Scorpion toxin-like knottin superfamily protein	1,30	2E-03	0,81	0,1003	-1,25	0,0119	-1,74	0,0001	0,31	0,4196	0,10	0,7815	-0,41	0,2869	-0,62	0,1405
AT3G15630	unknown protein	1,04	2E-03	0,35	0,4031	0,49	0,1754	-0,20	0,5130	0,48	0,1035	0,37	0,4657	0,11	0,8374	0,01	0,5806
AT2G26560	PLP2; phospholipase A 2A	1,73	2E-03	0,99	0,1169	1,34	0,0222	0,60	0,2291	1,03	0,0469	1,37	0,1026	-0,52	0,3300	-0,18	0,2732
AT2G15080	AtRLP19; receptor like protein 19	1,55	3E-03	-0,35	0,4621	1,97	0,0002	0,07	0,7913	-0,64	0,3089	0,09	0,9155	-0,16	0,9217	0,57	0,3352
AT1G57650	ATP binding	1,28	3E-03	0,85	0,0751	1,41	0,0016	0,98	0,0122	0,68	0,1126	0,54	0,2436	-0,11	0,9647	-0,25	0,6889
AT3G26200	CYP71B22; cytochrome P450	1,89	3E-03	1,21	0,1012	-0,27	0,7380	-0,95	0,1386	1,28	0,0318	1,22	0,1511	-1,27	0,0443	-1,34	0,0151
AT4G14270	CID2	1,10	4E-03	0,95	0,0286	0,06	0,8498	-0,08	0,8233	0,04	0,8321	0,06	0,9358	0,15	0,7109	0,17	0,9140
AT1G67980	CCOAMT; caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase	1,08	4E-03	1,02	0,0218	0,50	0,1904	0,45	0,2509	0,76	0,0335	0,85	0,1699	-0,80	0,0367	-0,70	0,0113
AT3G12910	NAC domain transcriptional regulator family protein	1,55	4E-03	0,44	0,4260	2,37	0,0000	1,26	0,0077	0,87	0,0800	1,39	0,1117	0,30	0,5090	0,83	0,5084
AT5G49525	unknown protein	1,08	4E-03	0,60	0,1523	-0,21	0,6586	-0,69	0,0779	0,23	0,5447	0,12	0,7571	-0,18	0,7215	-0,29	0,5416
AT1G57630	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein	1,05	4E-03	0,43	0,2606	1,81	0,0000	1,19	0,0002	0,62	0,0594	0,80	0,1881	0,06	0,8532	0,24	0,8587
AT1G33813	transposable element gene	2,18	4E-03	0,40	0,5894	2,21	0,0080	0,43	0,4971	0,53	0,5567	0,40	0,8148	0,82	0,3108	0,70	1,0000

AT5G57220	CYP81F2; cytochrome P450	1,27	5E-03	0,52	0,3066	1,18	0,0127	0,43	0,2905	0,79	0,0528	0,95	0,1813	-0,12	0,7763	0,05	0,4915
AT2G02120	PDF2.1; Scorpion toxin-like knot-tin superfamily protein	1,19	5E-03	1,06	0,0350	0,83	0,0589	0,70	0,0926	-0,04	0,9963	0,10	0,9048	0,62	0,1564	0,76	0,1950
AT1G21850	SKU5 similar 8	1,19	5E-03	0,78	0,0900	1,38	0,0022	0,96	0,0130	0,59	0,1370	-0,36	0,1239	1,11	0,0046	0,16	0,7844
AT1G11210	unknown protein	1,41	6E-03	1,49	0,0186	0,60	0,2542	0,69	0,2321	-0,37	0,5240	0,06	0,9772	0,29	0,6543	0,72	0,2644
AT2G38465	unknown protein	1,22	6E-03	0,27	0,5653	0,19	0,6934	-0,76	0,0993	-0,13	0,7684	0,33	0,4948	-0,16	0,8278	0,30	0,4565
AT1G11500	unknown protein	1,02	6E-03	0,29	0,6151	0,22	0,5935	-0,51	0,1327	0,43	0,2247	0,16	0,8546	0,34	0,3625	0,06	0,6675
AT2G15880	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	1,41	6E-03	0,77	0,1934	0,37	0,4899	-0,28	0,6009	-0,42	0,3607	0,32	0,3611	-0,51	0,3416	0,23	0,3968
AT3G55677	Plant self-incompatibility protein S1 family	4,14	6E-03	0,48	0,7775	3,74	0,0298	0,07	1,0000	0,61	0,6945	-0,30	1,0000	-0,19	1,0000	-1,10	0,7402
AT1G70220	RNA-processing, Lsm domain	1,31	7E-03	1,27	0,0314	-0,10	0,9907	-0,13	0,7957	-0,13	0,8474	-0,72	0,1430	-0,02	1,0000	-0,60	0,2335
AT1G26240	Proline-rich extensin-like family protein	3,02	7E-03	0,61	0,6138	1,85	0,0895	-0,56	0,6498	1,04	0,3064	1,66	0,2621	-0,25	0,7422	0,37	0,9221
AT1G68630	PLAC8 family protein	2,01	7E-03	1,53	0,0732	0,64	0,5038	0,15	0,8590	1,34	0,0683	0,38	0,8004	-0,69	0,5413	-1,65	0,0570
AT2G23270	unknown protein	1,65	7E-03	0,57	0,3834	0,87	0,1579	-0,20	0,8224	0,65	0,2400	0,77	0,5228	0,09	0,8483	0,21	0,8226
AT1G71030	MYB-like 2	1,21	7E-03	1,12	0,0580	0,30	0,5068	0,21	0,8175	0,35	0,4160	0,38	0,7163	0,21	0,5849	0,23	0,8955
AT2G03250	EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein	1,59	7E-03	0,28	0,6032	3,15	0,0000	1,84	0,0001	1,20	0,0657	0,49	0,6551	0,25	0,8342	-0,46	0,4293
AT2G17740	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	2,10	8E-03	0,08	0,9439	2,50	0,0016	0,48	0,4050	1,58	0,0271	0,31	1,0000	0,62	0,4931	-0,65	0,1742
AT1G21130	O-methyltransferase family protein	1,03	8E-03	0,55	0,2062	1,18	0,0039	0,70	0,0581	0,76	0,0333	0,74	0,2362	0,04	0,9399	0,02	0,4929
11 Gene die in der <i>coi1-t</i>, nicht aber in WT_{aos}, <i>aos</i> und WT_{coi1-t} nach Infektion induziert sind																	
AT4G14103	F-box/RNI-like superfamily protein	0,84	0,0019	1,25	0,0004	-0,85	0,0139	-0,44	0,0823	-0,11	0,6907	0,17	0,6110	-0,11	0,8313	0,17	0,5010
AT3G44860	FAMT; farnesoic acid carboxyl-O-methyltransferase	0,03	0,9586	3,88	0,0004	-8,37	0,0000	-4,53	0,0000	0,74	0,2377	1,70	0,0549	-7,34	0,0000	-6,38	0,0000
AT3G29320	Glycosyl transferase, family 35	1,00	0,0007	1,12	0,0015	-0,29	0,4287	-0,17	0,5305	-0,10	0,7082	0,25	0,3043	-0,24	0,5057	0,11	0,4768

AT5G46350	WRKY8; WRKY DNA-binding protein 8	0,96	0,0074	1,20	0,0051	0,07	0,8018	0,31	0,4048	0,59	0,0829	0,53	0,4395	-0,07	0,9701	-0,13	0,3863
AT5G37970	S-adenosyl-L-methionine-depend- ent methyltransferases protein	0,70	0,0812	1,69	0,0052	-3,41	0,0000	-2,43	0,0000	0,68	0,1836	0,43	0,3975	-0,58	0,2527	-0,83	0,1316
AT5G11320	Flavin-binding monooxygenase family protein	1,14	0,0187	1,61	0,0063	0,81	0,1411	1,28	0,0136	1,24	0,0141	1,30	0,0283	0,69	0,1965	0,74	0,2629
AT2G29310	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein	1,13	0,0158	1,65	0,0078	-1,12	0,0826	-0,60	0,2099	0,37	0,5282	0,32	0,7622	0,30	0,6102	0,24	0,8573
AT5G62360	Plant invertase/pectin methyles- terase inhibitor family protein	0,65	0,2252	2,61	0,0088	-2,73	0,0047	-0,77	0,1733	0,37	0,5409	-0,62	0,8387	0,36	0,7421	-0,63	0,6244
AT4G25000	ATAMY1; alpha-amylase-like	-0,38	0,4900	1,51	0,0091	-0,36	0,5474	1,53	0,0026	0,38	0,3386	-0,05	1,0000	0,24	0,7306	-0,20	0,5746
AT1G70800	Calcium-dependent lipid-binding family protein	0,91	0,0067	1,07	0,0092	-0,03	1,0000	0,13	0,7889	0,21	0,4334	0,04	0,9862	0,08	0,9618	-0,09	0,5056
AT4G18350	NCED2; nine-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 2	1,13	0,0447	1,88	0,0098	-0,19	0,8763	0,56	0,3978	0,40	0,4159	0,78	0,4513	0,09	0,9159	0,47	0,8747
6 Gene die im WT_{coi1-t} und in coi1-t, nicht aber in WT_{aos} und aos nach Infektion induziert sind																	
AT1G49720	ABF1; abscisic acid responsive el- ement-binding factor 1	2,09	0,0013	2,55	0,0017	-0,93	0,2476	-0,47	0,4319	-0,33	0,5902	0,16	0,7497	-0,38	0,6445	0,11	0,7123
AT1G06160	ORA59; octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59	1,74	0,0004	2,14	0,0043	-2,46	0,0008	-2,05	0,0001	-0,10	0,9898	-0,13	0,7740	-0,48	0,2753	-0,51	0,2038
AT4G30650	Low temperature and salt re- sponsive protein family	1,32	0,0001	1,08	0,0055	-0,80	0,0345	-1,04	0,0014	0,05	0,8986	0,09	0,7047	0,07	0,8321	0,11	0,6507
AT5G43440	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)- dependent oxygenase protein	1,43	0,0008	1,30	0,0071	0,19	0,6250	0,07	0,7931	0,24	0,5660	0,62	0,3666	-0,10	0,9250	0,28	0,7754
AT5G52330	TRAF-like superfamily protein	1,24	0,0032	1,35	0,0089	-0,13	0,8499	-0,03	0,8809	-0,29	0,4602	0,22	0,5300	-0,06	0,9930	0,45	0,1966
AT1G68050	flavin-binding, kelch repeat, f box 1	2,29	0,0006	2,09	0,0099	-0,19	0,8858	-0,39	0,5385	-0,40	0,5632	-0,10	0,9722	-0,22	0,7515	0,08	0,7875
8 Gene die im WT_{aos}, nicht aber in aos, WT_{coi1-t} und coi1-t nach Infektion induziert sind																	
AT1G02920	ATGSTF7; glutathione S-transferase 7	0,92	0,0013	0,40	0,2146	0,93	0,0021	0,40	0,1251	1,02	0,0004	0,96	0,0318	-0,17	0,7368	-0,23	0,1357

AT2G17040	anac036; NAC domain containing protein 36	0,32	0,4121	0,22	0,6720	3,11	0,0000	3,01	0,0000	1,53	0,0006	1,19	0,0408	0,36	0,4494	0,02	0,6439
AT1G73165	CLE1; CLAVATA3/ESR-RELATED 1	1,11	0,1885	0,38	0,7689	1,18	0,2061	0,45	0,6621	2,66	0,0032	0,90	0,6020	1,21	0,2204	-0,55	0,2966
AT3G11150	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase protein	-0,17	0,7271	-0,19	0,6850	-0,19	0,7301	-0,20	0,6113	1,11	0,0047	-0,23	0,9468	0,05	1,0000	-1,29	0,0067
AT2G30770	CYP71A13; cytochrome P450	0,45	0,4584	0,43	0,5438	0,72	0,2401	0,70	0,2189	1,57	0,0051	1,64	0,0834	-0,54	0,4192	-0,47	0,1023
AT1G56470	pseudogene, disease resistance protein	1,64	0,0433	-0,28	0,7728	1,10	0,2408	-0,81	0,2962	2,25	0,0064	0,38	0,7994	0,25	1,0000	-1,62	0,0516
AT1G02930	GSTF6; glutathione S-transferase 6	0,86	0,0665	0,42	0,4400	0,83	0,0912	0,40	0,3781	1,23	0,0067	1,16	0,1508	0,06	0,9010	-0,01	0,3447
AT3G13784	AtcwINV5; cell wall invertase 5	0,20	0,8302	-0,14	0,9546	-0,05	1,0000	-0,39	0,6625	1,86	0,0095	0,21	0,3628	1,39	0,0711	-0,26	0,9424
4 Gene die in <i>aos</i>, nicht aber in <i>WT_{aos}</i>, <i>WT_{coi1-t}</i> und <i>coi1-t</i> nach Infektion induziert sind																	
AT3G47750	ATP binding cassette subfamily A4	0,05	0,8899	-0,40	0,5543	-1,02	0,0301	-1,47	0,0010	0,72	0,1058	1,32	0,0026	-1,26	0,0164	-0,66	0,4177
AT1G66700	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases protein	0,62	0,0139	0,70	0,0191	0,97	0,0004	1,05	0,0001	0,89	0,0006	1,08	0,0031	0,00	0,8695	0,20	0,9514
AT2G20880	ERF053; Integrase-type DNA-binding superfamily protein	0,56	0,1174	0,84	0,0179	0,19	0,6710	0,47	0,1017	0,87	0,0101	1,01	0,0067	0,18	0,7970	0,32	0,5815
AT2G19190	FRK1; FLG22-induced receptor-like kinase 1	0,32	0,3009	0,64	0,0473	1,62	0,0000	1,94	0,0000	0,67	0,0430	1,01	0,0085	0,42	0,1437	0,75	0,0372
1 Gen das im <i>WT_{aos}</i> und in <i>aos</i>, nicht aber im <i>WT_{coi1-t}</i> und <i>coi1-t</i> nach Infektion induziert ist																	
AT3G09790	UBQ8; ubiquitin 8	0,53	0,4059	0,32	0,5708	0,29	0,6390	0,08	0,7482	1,77	0,0015	2,19	0,0030	-0,10	0,9932	0,31	1
5 Gene die im <i>WT_{coi1-t}</i> und <i>WT_{aos}</i>, nicht aber in <i>aos</i> und <i>coi1-t</i> nach Infektion induziert sind																	
AT2G29350	senescence-associated gene 13	1,54	0,0002	0,44	0,3309	2,41	0,0000	1,31	0,0006	1,17	0,0022	1,09	0,1511	0,36	0,3649	0,28	0,6175
AT5G36970	NHL25; NDR1/HIN1-like 25	1,40	0,0099	0,66	0,2901	0,45	0,4217	-0,29	0,6199	1,39	0,0064	1,62	0,0195	-0,78	0,1572	-0,56	0,1222
AT4G21380	ARK3; receptor kinase 3	1,32	0,0028	0,66	0,1832	1,48	0,0012	0,82	0,0439	1,11	0,0077	0,99	0,1261	-0,07	0,9260	-0,19	0,2967
AT1G33817	transposable element gene	2,00	0,0002	0,11	0,8943	1,53	0,0092	-0,36	0,4825	1,38	0,0082	1,03	0,2352	0,27	0,6778	-0,08	0,4463
AT5G40990	GLIP1; GDSL lipase 1	1,42	0,0010	1,04	0,0356	1,24	0,0060	0,86	0,0368	1,07	0,0096	1,25	0,0509	0,12	0,8287	0,29	0,8368

1 Gen das im WT _{coi1-t} und aos, nicht aber im WT _{aos} und coi1-t nach Infektion induziert ist																	
AT4G31970	CYP82C2; cytochrome P450	2,49	0,0056	0,64	0,5045	1,94	0,0327	0,09	0,8305	2,09	0,0132	3,22	0,0076	-1,62	0,0591	-0,49	0,1645
4 Gene die im WT _{coi1-t} , WT _{aos} und aos, nicht aber in coi1-t nach Infektion induziert sind																	
AT1G29090	Cysteine proteinases superfamily protein	4,40	0,0044	1,33	0,3175	3,47	0,0787	0,40	0,7876	4,32	0,0005	3,30	0,0045	1,84	0,3436	0,82	0,6097
AT4G28140	DREB subfamily A-6 of ERF/AP2 transcription factor family protein	1,74	0,0001	1,18	0,0245	0,84	0,0794	0,29	0,5644	1,35	0,0052	1,73	0,0002	0,10	0,9692	0,49	0,2959
AT1G08080	alpha carbonic anhydrase 7	1,41	0,0041	1,08	0,0625	1,20	0,0210	0,87	0,0769	1,67	0,0005	1,57	0,0100	-0,12	0,7489	-0,22	0,3079
AT2G28210	alpha carbonic anhydrase 2	1,37	0,0005	0,83	0,0616	0,66	0,1147	0,11	0,7029	1,16	0,0031	1,25	0,0036	-0,52	0,2329	-0,43	0,3010
1 Gen das im WT _{aos} , aos, WT _{coi1-t} und coi1-t nach Infektion induziert ist																	
AT5G34851	transposable element gene	1,96	0,0097	3,15	0,0008	-0,60	0,6910	0,59	0,3390	3,02	0,0002	3,19	0,0012	0,06	1	0,24	0,9031

Tabelle 6.4 Gene die nach Infektion mindestens 2-fach reprimiert sind und einen p-value < 0,01 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	WT _{coi1-t} mock vs. WT _{coi1-t} inf		coi1-t mock vs. coi1-t inf		WT _{coi1-t} mock vs. coi1-t mock		WT _{coi1-t} inf vs. coi1-t inf		WT _{aos} mock vs. WT _{aos} inf		aos mock vs. aos inf		WT _{aos} mock vs. aos mock		WT _{aos} inf vs. aos inf	
		log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value
35 Gene die im WT_{coi1-t} nicht aber in WT_{aos}, aos und coi1-t nach Infektion reprimiert sind																	
AT1G73220	organic cation/carnitine transporter1	-1,29	3E-08	-0,81	0,0018	0,56	0,0319	1,04	7E-06	-0,47	0,0413	-0,48	0,0516	0,61	0,0155	0,60	0,0194
AT4G02810	unknown protein	-1,25	2E-06	-0,34	0,2909	-0,51	0,0705	0,39	1E-01	0,18	0,5330	0,09	0,7521	0,01	0,8999	-0,08	0,8720
AT2G46420	unknown protein	-2,02	1E-05	-0,81	0,1090	-0,40	0,4037	0,81	7E-02	-0,17	0,7029	-0,53	0,1587	0,33	0,4573	-0,03	0,7448
AT3G63110	ATIPT3; isopentenyl-transferase 3	-1,71	1E-05	-0,77	0,1098	-0,35	0,3974	0,59	1E-01	-0,31	0,4585	-0,72	0,1584	0,19	0,8418	-0,23	0,6303
AT3G48740	Nodulin MtN3 family protein	-1,42	2E-05	-0,93	0,0043	1,61	0,0000	2,11	2E-10	-0,71	0,1216	-0,88	0,0458	1,04	0,0026	0,87	0,0266
AT5G64940	ATATH13; ABC2 homolog 13	-1,56	2E-05	-0,99	0,0114	-0,02	0,9531	0,55	1E-01	-0,22	0,5349	-0,31	0,3156	-0,02	0,9690	-0,11	0,6547
AT1G06040	B-box zinc finger family protein	-1,03	5E-05	-0,79	0,0039	0,08	0,7745	0,32	2E-01	-0,15	0,5165	-0,33	0,1760	0,15	0,6317	-0,02	0,7924
AT3G09600	Myb-like transcription factor	-1,57	9E-05	-1,05	0,0166	0,09	0,8489	0,61	1E-01	-0,30	0,4148	-0,57	0,1696	0,04	0,9342	-0,22	0,5944
AT1G13600	AtbZIP58; basic leucine-zipper 58	-1,10	3E-04	-0,89	0,0044	0,64	0,0488	0,85	7E-03	-0,13	0,6309	-0,23	0,2809	0,17	0,5440	0,08	0,9907
AT5G17300	Myb-like transcription factor	-1,61	4E-04	-1,21	0,0135	0,18	0,7492	0,58	2E-01	-0,49	0,2572	-0,62	0,2340	0,12	0,8644	-0,02	0,9705
AT1G07500	unknown protein	-1,21	5E-04	-0,88	0,0301	-0,26	0,4912	0,07	7E-01	-0,17	0,6492	-0,55	0,1023	0,17	0,7520	-0,20	0,3830
AT1G64500	Glutaredoxin family protein	-1,66	6E-04	-1,33	0,0164	-0,12	0,8076	0,21	6E-01	-0,60	0,2259	-0,29	0,4924	-0,20	0,6134	0,12	1,0000
AT3G24520	AT-HSFC1; heat shock transcription factor C1	-1,59	7E-04	-1,22	0,0118	-0,12	0,8294	0,25	7E-01	-0,27	0,4904	-0,62	0,3726	0,17	0,7277	-0,18	0,9671
AT2G37900	Major facilitator superfamily protein	-1,14	9E-04	-0,16	0,7692	-1,15	0,0025	-0,17	7E-01	0,15	0,5739	0,07	1,0000	-0,88	0,0069	-0,95	0,0026
AT5G24120	SIGE; sigma factor E	-1,21	1E-03	-0,78	0,0631	-0,13	0,7554	0,30	4E-01	-0,25	0,5182	-0,39	0,2577	0,03	0,9741	-0,11	0,5959
AT5G39660	CDF2; cycling DOF factor 2	-1,06	1E-03	-0,94	0,0066	0,29	0,4300	0,42	2E-01	-0,36	0,2443	-0,34	0,3484	-0,02	0,8486	0,00	0,9969

AT5G11260	Basic-leucine zipper (bZIP) transcription factor family protein	-1,05	1E-03	-0,81	0,0266	-0,04	0,9205	0,20	5E-01	-0,26	0,4223	-0,51	0,1146	0,09	0,8237	-0,16	0,5446
AT1G72490	unknown protein	-1,07	2E-03	-0,91	0,0138	-0,38	0,3036	-0,21	5E-01	-0,51	0,0933	-0,26	0,3478	-0,18	0,6781	0,07	0,8023
AT1G76620	unknown protein	-1,14	2E-03	-0,28	0,5628	-0,39	0,3267	0,46	2E-01	-0,11	0,6560	-0,08	0,6969	-0,44	0,3411	-0,41	1,0000
AT3G22840	ELIP1; Chlorophyll A-B binding family protein	-2,82	2E-03	-1,73	0,0669	-0,10	0,9469	0,99	3E-01	-0,59	0,5331	-1,28	0,1201	0,19	0,8989	-0,49	0,3886
AT3G62610	ATMYB11; myb domain protein 11	-1,51	3E-03	-0,16	0,8741	-0,39	0,4721	0,96	6E-02	-0,43	0,3901	-0,32	0,7465	-0,10	0,8262	0,01	0,9143
AT5G44110	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases protein	-1,73	3E-03	-1,61	0,0116	0,18	0,7814	0,30	6E-01	-0,57	0,3398	-1,26	0,0456	0,35	0,6075	-0,34	0,5165
AT3G15354	SPA3; SPA1-related 3	-1,26	3E-03	-1,13	0,0143	0,00	0,9912	0,13	8E-01	-0,48	0,2115	-0,47	0,3748	-0,28	0,5728	-0,28	0,7795
AT5G54470	B-box type zinc finger family protein	-1,34	3E-03	-0,92	0,0611	-0,29	0,5654	0,13	8E-01	-0,75	0,0718	-0,58	0,2540	-0,37	0,4293	-0,21	0,8501
AT3G56290	unknown protein	-1,98	4E-03	-1,61	0,0278	0,01	1,0000	0,37	6E-01	-0,41	0,5475	-0,65	0,2999	0,02	0,9601	-0,23	0,6142
AT2G47460	MYB12; myb domain protein 12	-1,73	5E-03	-1,32	0,0382	0,06	0,9084	0,47	5E-01	-0,71	0,2555	-1,06	0,1003	0,18	0,8661	-0,17	0,6813
AT1G09030	NF-YB4; nuclear factor Y, subunit B4	-1,62	5E-03	-1,01	0,0779	0,40	0,4608	1,01	1E-01	-0,47	0,4695	-0,68	0,5331	0,48	0,3325	0,27	0,3844
AT4G10310	HKT1; high-affinity K ⁺ transporter 1	-1,00	6E-03	-0,32	0,5563	-0,98	0,0193	-0,30	6E-01	-0,02	0,8800	0,21	0,5197	-0,56	0,1191	-0,33	0,5015
AT3G54500	unknown protein	-1,50	6E-03	-1,16	0,0576	0,26	0,6733	0,60	2E-01	-0,33	0,4619	-0,50	0,4348	-0,01	0,8843	-0,18	0,9963
AT1G61130	SCPL32; serine carboxypeptidase-like 32	-1,97	6E-03	-0,65	0,4732	-0,44	0,5849	0,87	3E-01	0,17	0,9356	-0,42	0,8617	0,78	0,3055	0,20	0,6758
AT5G10100	trehalose-6-phosphate phosphatase	-1,18	7E-03	-0,70	0,1458	-0,35	0,4738	0,14	8E-01	-0,05	0,7613	-0,36	0,4427	0,27	0,4444	-0,04	0,8414
AT1G23110	unknown protein	-1,17	7E-03	-0,27	0,6634	0,02	1,0000	0,93	3E-02	-0,33	0,4939	-0,37	0,2366	0,97	0,0317	0,93	0,1297
AT5G02270	ATNAP9; non-intrinsic ABC protein 9	-1,10	7E-03	-1,09	0,0178	0,08	0,8646	0,09	8E-01	-0,28	0,4122	-0,43	0,3975	0,05	0,8457	-0,09	0,9369
AT1G80340	GA4H; gibberellin 3-oxidase 2	-2,21	9E-03	-1,41	0,1343	-1,06	0,2713	-0,26	8E-01	-0,86	0,3128	-1,20	0,1961	0,14	0,9202	-0,19	0,8139
AT3G21890	B-box type zinc finger family protein	-1,26	1E-02	-1,36	0,0143	0,05	0,9174	-0,04	1E+00	-0,04	0,8312	-0,68	0,3079	0,51	0,3527	-0,14	0,9823

15 Gene die in <i>coi1-t</i> , nicht aber in WT_{aos} , <i>aos</i> und WT_{coi1-t} nach Infektion reprimiert sind																	
AT4G37160	sks15; SKU5 similar 15	-0,29	0,2473	-1,00	0,0004	0,13	0,6529	-0,58	0,0247	-0,30	0,2029	-0,38	0,2695	0,35	0,1398	0,27	0,1441
AT1G73120	unknown protein	-0,65	0,0580	-1,41	0,0012	-0,42	0,2907	-1,18	0,0046	-0,22	0,5067	-0,43	0,3461	0,16	0,7491	-0,05	0,9892
AT1G14280	PKS2; phytochrome kinase substrate 2	-0,42	0,1773	-1,31	0,0018	0,40	0,3410	-0,49	0,3068	-0,28	0,4775	-0,51	0,3554	0,31	0,4027	0,08	0,6224
AT2G05580	Glycine-rich protein family	-0,03	1,0000	-1,25	0,0037	0,87	0,0350	-0,36	0,3745	0,21	0,7265	0,05	0,6295	0,19	0,8212	0,04	0,7386
AT5G56080	ATNAS2; nicotian-amine synthase 2	-0,98	0,0011	-1,02	0,0037	0,37	0,3031	0,33	0,2145	-0,59	0,0624	-0,67	0,0803	0,38	0,3007	0,30	0,3144
AT4G31940	CYP82C4; cytochrome P450	-0,95	0,0203	-1,43	0,0043	-0,64	0,1746	-1,13	0,0196	-0,15	0,6760	-0,39	0,5816	0,30	0,6051	0,06	0,7393
AT1G19900	glyoxal oxidase-related protein	-0,30	0,3162	-1,05	0,0053	0,49	0,1874	-0,26	0,5432	-0,38	0,2339	-0,17	0,9902	0,36	0,3522	0,57	0,0460
AT3G02470	S-adenosylmethionine decarboxylase	-0,37	0,3535	-1,11	0,0055	0,59	0,1691	-0,14	0,5682	-0,19	0,6351	0,01	0,8820	-0,18	0,5960	0,02	0,9167
AT4G19690	IRT1; iron-regulated transporter 1	-0,62	0,0670	-1,15	0,0064	-0,58	0,1505	-1,11	0,0055	-0,10	0,7072	-0,23	0,8020	0,05	0,9808	-0,08	0,9154
AT4G34881	unknown protein	-0,52	0,1441	-1,03	0,0068	0,13	0,7760	-0,38	0,2368	0,06	0,8915	0,08	0,7728	-0,12	0,7237	-0,11	0,8607
AT3G19030	unknown protein	-0,76	0,0242	-1,07	0,0075	-0,19	0,6311	-0,51	0,2199	-0,19	0,4502	-0,37	0,4850	-0,16	0,8047	-0,34	0,7753
AT3G19320	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	-0,46	0,1559	-1,08	0,0078	0,38	0,3300	-0,25	0,6811	-0,37	0,3332	-0,61	0,4782	0,43	0,2448	0,20	0,2222
AT1G44830	Integrase-type DNA-binding protein	-0,46	0,1930	-1,21	0,0085	0,27	0,5680	-0,48	0,3542	-0,44	0,3402	-0,45	0,0499	0,10	0,8028	0,09	0,4955
AT4G22217	Arabidopsis defensin-like protein	0,01	0,8642	-1,13	0,0087	-0,87	0,0321	-2,01	0,0000	0,01	0,8994	-0,49	0,2229	-0,01	0,8759	-0,51	0,1385
AT2G42560	late embryogenesis abundant domain-containing protein	0,31	0,7799	-2,51	0,0087	3,25	0,0011	0,43	0,8589	1,94	0,2077	0,37	0,7481	0,19	1,0000	-1,39	0,6146
10 Gene die im WT_{coi1-t} , nicht aber in WT_{aos} , <i>aos</i> und <i>coi1-t</i> nach Infektion reprimiert sind																	
AT2G31380	STH; salt tolerance homologue	-1,45	3E-05	-1,27	0,0006	-0,28	0,4481	-0,11	0,7239	-0,21	0,5718	-0,71	0,0333	0,05	0,9813	-0,45	0,1099
AT5G37550	unknown protein	-1,17	5E-05	-1,06	0,0012	-0,16	0,5834	-0,06	0,9243	-0,22	0,4508	-0,30	0,2805	0,14	0,6913	0,07	0,9761
AT1G01060	LHY; Homeodomain-like super-family protein	-2,51	8E-06	-1,86	0,0015	0,19	0,7385	0,85	0,1169	-0,47	0,3386	-0,79	0,1701	0,09	0,9018	-0,23	0,7133
AT2G30520	Phototropic-responsive NPH3 family protein	-1,24	6E-04	-1,21	0,0023	0,20	0,6377	0,23	0,5180	-0,36	0,3499	-0,56	0,0899	0,16	0,7699	-0,04	0,6131

AT3G12320	unknown protein	-1,66	2E-04	-1,39	0,0028	0,18	0,7088	0,46	0,3268	-0,54	0,1777	-0,68	0,1420	-0,02	0,9487	-0,15	0,7880
AT1G26790	Dof-type zinc finger DNA-binding protein	-2,64	2E-04	-2,13	0,0039	-0,02	0,9705	0,49	0,5205	-1,06	0,1100	-1,23	0,1609	0,01	0,9785	-0,16	1,0000
AT5G23660	homolog of Medicago truncatula MTN3	-1,27	3E-04	-1,05	0,0045	0,33	0,4350	0,55	0,1696	-0,61	0,1098	-0,78	0,0240	0,45	0,2952	0,28	0,7874
AT2G46830	CCA1; circadian clock associated 1	-2,05	5E-05	-1,50	0,0058	0,05	0,9295	0,60	0,2142	-0,62	0,1767	-0,71	0,1884	-0,06	0,9105	-0,15	0,8706
AT3G54510	Early-responsive to dehydration stress protein	-1,15	7E-03	-1,33	0,0060	0,37	0,4636	0,19	0,6290	-0,56	0,1719	-0,91	0,1208	0,12	0,7889	-0,23	0,9924
AT2G31083	CLE5; CLAVATA3/ESR-RELATED 5	-2,05	4E-03	-1,88	0,0064	0,92	0,1436	1,09	0,1667	-0,77	0,3908	-1,20	0,0725	1,57	0,0085	1,14	0,1543
1 Gen, das im WT_{aos}, nicht aber in aos, WT_{coi1-t} und coi1-t nach Infektion reprimiert ist																	
AT3G27480	Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein	-0,43	0,1447	-0,39	0,2550	0,58	0,0931	0,62	0,0448	-1,00	0,0031	-0,48	0,3848	-0,12	0,6811	0,40	0,1387

Tabelle 6.5 12 Gene die im Gegensatz zum WT_{coi1-t}, WT_{aos} und der aos-Mutante in der coi1-t-Mutante mindestens 4-fach reprimiert sind und einen p-value < 0,01 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	aos mock vs. coi1-t mock		aos inf vs. coi1-t inf		WT _{coi1-t} mock vs. coi1-t mock		WT _{coi1-t} inf vs. coi1-t inf		WT _{aos} mock vs. coi1-t mock		WT _{aos} inf vs. coi1-t inf	
		log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value
AT1G65860	flavin-monooxygenase glucosinolate S-oxygenase 1	-2,94	0,0017	-2,15	0,0037	-4,34	2E-08	-3,12	8E-07	-4,00	5E-07	-3,82	5E-10
AT5G37970	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	-4,11	0,0000	-2,85	0,0000	-3,41	3E-07	-2,43	2E-06	-4,69	1E-11	-3,68	4E-11
AT4G21490	NAD(P)H dehydrogenase B3	-2,54	0,0011	-2,07	0,0013	-2,45	2E-03	-2,11	6E-04	-2,93	2E-04	-2,25	5E-04
AT4G13770	cytochrome P450, family 83, subfamily A, polypeptide 1	-2,05	0,0000	-1,17	0,0000	-3,46	3E-24	-2,54	3E-19	-3,32	1E-22	-2,82	4E-23
AT2G05420	TRAF-like family protein	-2,40	0,0000	-1,52	0,0002	-2,12	2E-05	-1,69	1E-05	-2,35	1E-06	-1,25	2E-03
AT4G22470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-2,64	0,0000	-2,39	0,0000	-2,22	1E-04	-1,72	9E-05	-2,69	9E-07	-1,95	1E-05
AT1G06160	octadecanoid-responsive Arabidopsis AP2/ERF 59	-3,67	0,0000	-1,39	0,0192	-2,46	8E-04	-2,05	6E-05	-4,15	9E-09	-1,90	2E-04
AT4G25930	Protein of unknown function (DUF295)	-2,46	0,0003	-1,81	0,0010	-2,14	2E-03	-1,61	2E-03	-2,42	3E-04	-1,75	1E-03
AT5G62360	Plant invertase/pectin methyltransferase inhibitor superfamily protein	-3,51	0,0003	-0,28	0,3727	-2,73	5E-03	-0,77	2E-01	-3,15	7E-04	-0,91	1E-01
AT1G13200	F-box and associated interaction domains-containing protein	-1,85	0,0006	-2,02	0,0000	-1,73	2E-03	-1,94	3E-05	-1,72	2E-03	-2,32	1E-06
AT2G03130	Ribosomal protein L12/ATP-dependent Clp protease adaptor protein ClpS family protein	-2,57	0,0004	-2,52	0,0003	-1,93	1E-02	-2,31	1E-04	-2,48	7E-04	-1,87	4E-03
AT4G12470	azelaic acid induced 1	-2,67	0,0000	-2,31	0,0000	-1,21	2E-02	-1,15	9E-03	-2,02	2E-04	-1,22	5E-03

Tabelle 6.6 113 Gene die im Gegensatz zum WT_{coi1-t}, WT_{aos} und der aos-Mutante in der coi1-t-Mutante mindestens 4-fach induziert sind und einen p-value < 0,01 aufweisen. (log2 FC (*false discovery*) bedeutet n-fache Induktion des ersten analysierten Zustands gegenüber des Zweiten (rot) bzw. n-fache Repression des ersten Zustands gegenüber des Zweiten (grün)).

AGI-Code	Genname	<i>aos</i> mock		<i>aos</i> inf		WT _{coi1-t} mock		WT _{coi1-t} inf		WT _{aos} mock		WT _{aos} inf	
		vs.		vs.		vs.		vs.		vs.		vs.	
		<i>coi1-t</i> mock		<i>coi1-t</i> inf		<i>coi1-t</i> mock		<i>coi1-t</i> inf		<i>coi1-t</i> mock		<i>coi1-t</i> inf	
		log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value	log2 FC	p-value
AT1G21250	cell wall-associated kinase	3,51	1E-31	3,62	1E-27	3,80	2E-37	3,76	4E-39	4,56	6E-48	4,70	2E-49
AT5G39100	germin-like protein 6	3,61	1E-30	3,37	5E-29	3,18	6E-28	2,51	1E-21	3,76	3E-35	4,10	3E-42
AT1G21270	wall-associated kinase 2	2,90	3E-22	3,34	3E-23	3,15	8E-27	3,05	2E-28	3,77	8E-35	3,83	2E-36
AT5G52720	Copper transport protein family	4,62	9E-46	4,05	2E-34	3,06	7E-26	2,42	8E-20	3,92	5E-38	3,63	4E-35
AT2G26400	acireductone dioxygenase 3	3,81	8E-30	4,34	5E-31	3,18	7E-24	3,24	3E-27	4,31	1E-38	4,51	1E-42
AT4G14365	XB3 ortholog 4	2,76	4E-24	2,21	2E-17	2,67	2E-23	2,44	2E-22	2,98	4E-28	2,64	6E-24
AT1G02450	NIM1-interacting 1	3,63	2E-20	3,73	2E-20	3,69	3E-23	2,95	7E-20	4,48	3E-28	4,61	7E-31
AT5G54710	Ankyrin repeat family protein	2,42	6E-17	2,15	2E-13	2,81	2E-22	2,63	4E-22	2,96	4E-24	2,49	1E-18
AT5G52760	Copper transport protein family	3,54	3E-30	3,25	2E-26	2,76	4E-22	2,44	1E-20	3,40	1E-30	3,19	3E-29
AT1G73805	Calmodulin binding protein-like	3,81	1E-26	3,41	2E-21	3,36	4E-22	3,09	4E-21	3,79	4E-27	3,58	9E-26
AT1G16260	Wall-associated kinase family protein	2,42	2E-15	2,35	4E-15	2,87	9E-22	2,81	7E-23	2,91	8E-22	3,24	6E-27
AT2G41090	Calcium-binding EF-hand family protein	2,54	4E-18	2,27	2E-12	2,78	3E-21	2,30	6E-17	2,99	8E-24	2,43	1E-16
AT5G26690	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	3,07	1E-17	3,10	1E-15	3,21	1E-19	3,08	6E-20	3,75	1E-24	3,46	7E-23
AT1G10340	Ankyrin repeat family protein	2,04	6E-14	2,02	7E-12	2,49	2E-19	2,32	1E-19	2,77	3E-23	2,58	7E-22
AT3G56400	WRKY DNA-binding protein 70	2,49	4E-20	2,34	1E-17	2,29	8E-19	2,12	2E-18	2,81	1E-26	2,80	9E-29
AT3G50480	homolog of RPW8 4	2,61	2E-14	2,83	3E-15	2,62	2E-15	2,23	3E-13	2,90	5E-18	2,98	4E-20
AT5G54720	Ankyrin repeat family protein	2,11	4E-09	2,00	1E-07	2,88	3E-15	2,46	5E-13	2,74	5E-14	2,69	2E-13
AT5G39190	germin-like protein 2	2,17	3E-13	2,13	5E-13	2,35	4E-15	2,21	1E-15	2,55	5E-17	2,56	4E-18
AT3G57460	catalytics; metal ion binding	4,97	4E-23	4,11	2E-18	3,02	1E-14	2,42	5E-12	3,57	1E-17	3,75	1E-18
AT2G14080	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	2,46	2E-15	2,33	5E-14	2,22	7E-14	2,23	3E-15	2,26	5E-14	2,51	1E-17
AT3G13100	multidrug resistance-associated protein 7	2,74	4E-16	2,47	2E-12	2,42	9E-14	2,21	6E-13	2,75	5E-17	2,59	1E-16
AT3G28510	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	3,91	3E-17	3,62	7E-14	3,14	2E-13	2,91	3E-13	4,47	1E-23	4,25	5E-24
AT1G01680	plant U-box 54	4,01	4E-14	4,05	2E-12	3,73	5E-13	3,25	1E-11	4,36	1E-16	4,14	5E-16
AT5G39160	RmlC-like cupins superfamily protein	2,36	1E-13	2,07	2E-12	2,19	2E-12	2,09	1E-13	2,79	4E-18	2,34	1E-14
AT2G18660	plant natriuretic peptide A	2,79	2E-07	2,84	9E-08	3,82	4E-12	3,56	1E-11	3,99	6E-13	4,02	2E-13

Anhang

AT3G23010	receptor like protein 36	4,27	3E-13	2,82	8E-09	3,53	5E-12	3,44	7E-12	3,60	2E-11	2,73	7E-08
AT4G13900	pseudogene, similar to NLOD, contains leucine rich-repeat domains	2,53	4E-11	2,30	1E-08	2,44	3E-11	3,26	2E-18	2,92	5E-14	3,02	6E-15
AT2G13810	AGD2-like defense response protein 1	2,79	8E-08	2,93	2E-07	3,24	1E-10	2,49	3E-08	3,56	4E-12	3,98	2E-15
AT3G45860	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 4	4,13	3E-08	4,43	3E-07	4,55	3E-10	4,39	3E-10	2,62	2E-05	3,91	1E-07
AT3G23120	receptor like protein 38	2,68	5E-07	2,36	2E-06	3,40	5E-10	3,49	3E-11	3,41	4E-10	3,31	5E-10
AT1G49750	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	2,21	2E-05	2,31	1E-05	3,22	2E-09	3,10	3E-09	2,58	1E-06	2,88	3E-08
AT5G24210	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	3,42	1E-07	3,79	8E-09	3,91	2E-09	3,94	5E-10	4,03	1E-09	3,94	1E-09
AT4G13810	receptor like protein 47	4,51	1E-10	2,67	1E-07	3,43	3E-09	3,63	4E-12	2,72	8E-07	3,32	3E-09
AT5G60900	receptor-like protein kinase 1	2,84	2E-08	2,42	1E-07	2,77	1E-08	2,75	3E-09	2,77	2E-08	2,69	1E-08
AT2G29220	Concanavalin A-like lectin protein kinase family protein	2,40	6E-07	2,13	4E-05	2,68	3E-08	2,68	2E-09	2,97	1E-09	2,53	3E-08
AT3G48650	pseudogene	2,87	6E-08	2,70	4E-07	2,71	4E-08	2,95	4E-10	3,16	6E-10	3,07	7E-10
AT1G72910	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain-containing protein	3,31	4E-06	3,20	1E-05	3,77	2E-07	3,10	5E-06	3,55	1E-06	2,66	1E-04
AT2G15042	Leucine-rich repeat (LRR) family protein	6,47	4E-09	4,58	2E-07	3,86	2E-07	3,78	5E-09	4,75	3E-08	4,83	5E-09
AT3G48640	unknown protein	2,36	5E-08	2,47	9E-08	2,10	2E-07	2,17	4E-08	2,78	2E-10	3,58	5E-14
AT2G32160	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	3,03	1E-07	3,55	6E-08	2,75	3E-07	3,31	6E-10	3,37	2E-09	3,78	3E-11
AT3G23110	receptor like protein 37	2,83	8E-08	2,05	2E-05	2,61	4E-07	2,77	2E-08	2,92	2E-08	2,54	4E-07
AT5G44570	unknown protein	2,53	2E-03	2,43	8E-04	4,51	2E-06	3,96	8E-06	2,67	1E-03	2,37	4E-03
AT1G17600	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	3,86	2E-09	3,06	9E-07	2,69	2E-06	2,05	8E-05	3,07	2E-07	2,73	1E-06
AT4G23230	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 15	2,88	3E-03	2,63	8E-04	5,41	2E-06	5,61	1E-07	4,30	4E-05	3,99	5E-05
AT5G13320	Auxin-responsive GH3 family protein	2,90	2E-07	3,08	9E-07	2,61	3E-06	2,55	1E-06	3,19	1E-08	3,16	5E-09
AT5G46490	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	3,05	2E-06	3,52	1E-05	2,79	5E-06	2,06	2E-04	2,65	1E-05	2,90	1E-05
AT5G45890	senescence-associated gene 12	3,32	3E-04	2,71	1E-03	4,11	8E-06	2,37	2E-03	3,79	5E-05	3,36	5E-04
AT5G61090	Polynucleotidyl transferase, ribonuclease H-like superfamily protein	2,42	4E-04	2,01	8E-04	3,08	1E-05	2,92	1E-05	2,08	2E-03	2,80	1E-04
AT2G21900	WRKY DNA-binding protein 59	3,42	3E-08	3,26	2E-06	2,60	1E-05	2,24	2E-05	3,87	2E-10	3,89	6E-11
AT2G02320	phloem protein 2-B7	2,71	2E-05	4,12	1E-06	2,68	2E-05	2,13	1E-04	3,64	3E-07	4,09	4E-08
AT4G38560	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARLI 4) family	2,37	1E-03	3,10	3E-04	3,09	2E-05	3,16	8E-06	4,10	5E-07	3,19	3E-05
AT5G24200	alpha/beta-Hydrolases super	4,77	1E-04	5,40	3E-04	5,29	3E-05	4,72	8E-05	5,48	2E-05	5,45	2E-05

Anhang

	family protein												
AT1G13470	Protein of unknown function (DUF1262)	4,04	9E-07	3,15	1E-03	2,92	3E-05	2,84	9E-05	4,31	3E-07	2,38	3E-03
AT5G55460	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	2,48	8E-05	2,12	2E-05	2,40	3E-05	2,47	7E-06	2,72	8E-06	2,61	8E-06
AT5G09876	unknown protein	2,69	4E-05	2,51	1E-03	2,39	6E-05	2,01	3E-04	2,39	9E-05	3,10	6E-06
AT3G47480	Calcium-binding EF-hand family protein	2,46	5E-05	2,27	1E-04	2,40	7E-05	2,56	1E-05	2,66	1E-05	2,33	9E-05
AT1G74140	Rhomboid-related intramembrane serine protease family protein	2,80	2E-05	2,81	1E-06	2,13	1E-04	3,02	2E-08	3,51	9E-08	4,50	6E-11
AT5G39120	RmlC-like cupins superfamily protein	2,67	3E-03	3,06	8E-04	3,49	2E-04	3,42	2E-04	3,07	7E-04	3,59	9E-05
AT5G39150	RmlC-like cupins superfamily protein	2,90	3E-03	3,31	1E-03	3,89	2E-04	3,65	2E-04	3,52	5E-04	4,07	7E-05
AT5G35525	PLAC8 family protein	2,60	1E-04	2,76	2E-04	2,42	3E-04	2,25	2E-04	2,72	6E-05	2,94	7E-06
AT1G24147	unknown protein	2,68	1E-03	3,65	4E-05	2,93	4E-04	3,36	2E-05	3,10	2E-04	3,94	1E-05
AT5G39180	RmlC-like cupins superfamily protein	3,52	3E-03	3,41	4E-03	4,04	6E-04	3,78	9E-04	3,97	7E-04	4,28	3E-04
AT1G30190	unknown protein	3,39	4E-04	3,36	5E-04	3,03	9E-04	3,67	6E-05	3,82	6E-05	3,57	2E-04
AT3G60420	Phosphoglycerate mutase family protein	4,08	4E-03	3,97	1E-02	3,73	8E-03	4,00	4E-03	4,53	2E-03	3,99	5E-03
AT1G56120	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	2,64	2E-20	2,33	7E-17	2,28	2E-17	1,95	2E-14	2,48	9E-20	2,52	1E-21
AT3G61198	other RNA	2,62	8E-14	1,84	2E-08	2,74	1E-15	1,96	1E-09	2,82	1E-15	1,98	1E-08
AT3G21080	ABC transporter-related	2,03	2E-09	1,27	8E-05	2,52	5E-14	1,84	4E-09	2,31	5E-12	2,37	3E-12
AT4G16860	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	2,94	8E-14	3,29	5E-15	2,76	2E-13	1,69	6E-08	2,19	2E-09	3,46	3E-19
AT4G11170	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	2,12	2E-12	1,71	2E-10	2,03	5E-13	1,57	3E-10	2,15	4E-14	2,34	2E-17
AT5G22530	unknown protein	2,60	2E-17	2,03	1E-11	2,00	1E-12	1,37	1E-07	2,09	4E-13	1,71	2E-10
AT2G17040	NAC domain containing protein 36	2,91	4E-09	1,95	1E-05	3,11	1E-10	3,01	1E-10	3,27	4E-11	1,97	2E-05
AT1G58602	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	2,87	9E-15	2,71	6E-12	2,11	3E-10	1,83	6E-09	2,65	2E-14	2,89	2E-17
AT5G39130	RmlC-like cupins superfamily protein	2,27	1E-11	2,04	6E-11	2,07	6E-10	1,91	5E-10	2,59	2E-14	2,57	4E-15
AT2G33020	receptor like protein 24	2,62	3E-12	2,49	1E-10	2,11	1E-09	1,99	5E-10	2,58	6E-13	2,90	6E-16
AT5G26170	WRKY DNA-binding protein 50	2,80	7E-12	2,21	7E-08	2,26	2E-09	1,96	2E-08	2,70	3E-12	2,43	3E-11
AT1G19250	flavin-dependent monooxygenase 1	2,91	4E-17	3,11	4E-16	2,00	2E-09	1,91	3E-10	2,87	3E-17	2,88	4E-19
AT1G05880	RING/U-box super family protein	3,20	3E-11	3,07	2E-09	2,72	2E-09	1,59	5E-05	3,94	4E-16	3,20	2E-12
AT1G21525	pseudogene of unknown	2,76	9E-13	2,22	7E-10	2,06	2E-08	1,72	1E-07	3,03	3E-15	2,97	4E-14

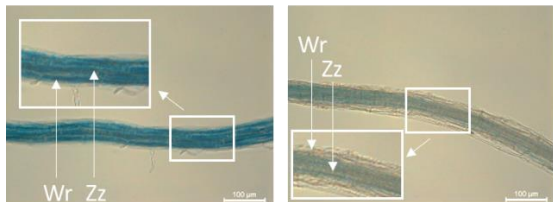
Anhang

	protein												
AT2G29350	senescence-associated gene 13	2,33	1E-07	1,68	1E-06	2,41	2E-08	1,31	6E-04	2,69	7E-10	1,96	3E-06
AT2G03250	EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein	2,98	5E-07	2,77	1E-06	3,15	3E-08	1,84	8E-05	3,23	5E-08	2,30	2E-05
AT1G72930	toll/interleukin-1 receptor-like	2,20	9E-08	1,86	3E-06	2,13	7E-08	1,67	9E-06	2,24	2E-08	1,90	1E-06
AT5G22520	unknown protein	2,35	2E-08	1,91	4E-07	2,04	2E-07	1,61	2E-05	2,10	2E-07	1,85	2E-06
AT1G21240	wall associated kinase 3	2,86	2E-08	2,57	1E-07	2,54	2E-07	1,75	5E-05	3,06	2E-09	2,79	6E-09
AT2G46440	cyclic nucleotide-gated channels	2,73	1E-05	1,63	1E-03	2,93	1E-06	3,41	3E-08	2,83	4E-06	3,02	1E-06
AT1G33840	Protein of unknown function (DUF567)	2,10	2E-04	2,39	1E-03	2,70	2E-06	1,35	5E-03	3,47	7E-08	2,47	2E-05
AT5G46950	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	2,15	2E-05	2,29	5E-06	2,26	5E-06	1,39	8E-04	3,64	2E-10	2,36	3E-06
AT1G29100	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein	3,24	5E-08	4,78	3E-10	2,39	1E-05	1,50	1E-03	3,82	4E-10	4,39	7E-12
AT3G28890	receptor like protein 43	2,67	1E-05	2,81	9E-06	2,38	2E-05	1,93	2E-04	2,54	1E-05	2,66	2E-05
AT4G17660	Protein kinase superfamily protein	2,08	2E-04	1,85	1E-04	2,16	3E-05	2,10	3E-05	2,35	1E-05	2,28	5E-06
AT3G50770	calmodulin-like 41	2,13	1E-05	1,93	4E-05	2,00	3E-05	2,04	1E-05	2,23	4E-06	1,90	6E-05
AT5G22380	NAC domain containing protein 90	2,65	9E-03	1,95	1E-02	4,73	5E-05	3,66	4E-04	2,86	5E-03	3,30	2E-03
AT1G58300	heme oxygenase 4	4,15	9E-09	3,32	2E-05	2,59	6E-05	1,61	5E-03	3,50	2E-07	4,30	1E-07
AT3G04210	Disease resistance protein (TIR-NBS class)	2,18	1E-03	1,52	4E-03	2,59	2E-04	2,38	4E-04	2,00	4E-03	1,41	5E-02
AT1G07690	unknown protein	5,30	1E-03	4,11	2E-02	5,58	3E-04	3,43	6E-03	5,16	7E-04	3,74	1E-02
AT4G04560	transposable element gene	3,38	4E-03	0,66	2E-01	4,11	3E-04	1,83	6E-02	3,71	9E-04	3,85	9E-03
AT5G24540	beta glucosidase 31	2,79	8E-05	1,79	8E-05	2,41	3E-04	2,18	1E-04	2,66	1E-04	3,09	3E-06
AT5G46960	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	3,97	1E-07	2,30	5E-04	2,52	3E-04	1,84	3E-03	4,40	2E-08	3,87	2E-07
AT5G52710	Copper transport protein family	4,32	6E-11	3,97	3E-08	2,11	5E-04	1,33	8E-03	3,77	1E-09	3,49	3E-09
AT2G42560	late embryogenesis abundant domain-containing protein / LEA domain-containing protein	4,31	2E-04	1,43	5E-01	3,25	1E-03	0,43	9E-01	4,49	9E-05	0,04	1E+00
AT1G58225	unknown protein	3,73	7E-03	2,38	4E-02	4,50	1E-03	4,27	2E-03	3,89	4E-03	2,76	4E-02
AT2G43920	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	2,85	1E-04	2,58	9E-05	2,22	3E-03	1,78	7E-03	2,45	1E-03	1,54	3E-02
AT2G44220	Protein of unknown Function (DUF239)	3,01	4E-04	0,90	4E-01	2,40	4E-03	2,00	9E-03	3,36	1E-04	1,69	4E-02
AT5G50140	Ankyrin repeat family protein	4,21	3E-04	3,37	1E-02	2,93	5E-03	1,93	3E-02	3,97	4E-04	3,88	5E-04
AT3G54070	Ankyrin repeat family protein	3,10	6E-03	2,78	2E-02	2,97	6E-03	3,18	2E-03	4,60	2E-04	3,25	3E-03

Anhang

AT4G05030	Copper transport protein family	2,74	1E-02	3,65	8E-03	2,90	7E-03	1,91	5E-02	3,15	5E-03	2,86	8E-03
AT1G26390	FAD-binding Berberine family protein	2,32	4E-03	1,27	3E-02	2,09	9E-03	0,60	3E-01	2,65	9E-04	1,56	4E-02
AT5G24220	Lipase class 3-related protein	3,15	9E-04	2,11	6E-02	2,30	9E-03	1,39	6E-02	3,65	9E-05	2,76	1E-03
AT2G04495	unknown protein	1,82	1E-04	2,10	2E-05	2,71	5E-09	2,09	4E-07	2,58	4E-08	2,55	1E-08
AT4G23320	cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 24	1,90	3E-02	2,45	2E-04	3,18	7E-04	2,00	2E-03	2,55	6E-03	2,92	2E-04
AT1G64070	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	1,79	2E-02	2,20	3E-03	2,09	4E-03	2,29	1E-03	2,18	4E-03	2,00	7E-03
AT3G25010	receptor like protein 41	2,32	5E-04	2,78	5E-05	1,82	5E-03	2,14	4E-04	2,85	2E-05	2,68	5E-05
AT4G11900	S-locus lectin protein kinase family protein	1,62	1E-01	3,86	8E-03	3,67	5E-03	3,24	4E-03	1,73	1E-01	3,34	6E-03
AT1G17615	Disease resistance protein (TIR-NBS class)	1,55	6E-02	2,31	7E-03	2,12	1E-02	2,65	6E-04	2,79	3E-03	4,07	7E-05

PYK10:JAZ1Δ3



35S:JAZ1Δ3

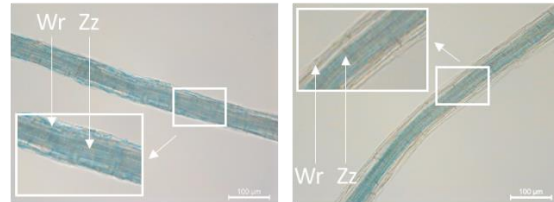


Abbildung 6.2 Stereomikroskopische Aufnahmen von GUS-gefärbten Wurzeln des JAZ1Δ3-Konstrukts, sowohl unter dem wurzelspezifischen PYK10- als auch unter dem 35S-Promotor
 GUS-gefärbte Wurzeln von 3 Wochen alten, steril auf MS-Medium angezogenen Pflanzen. Abkürzungen: Wr (Wurzelrinde), Zz (Zentralzylinder)

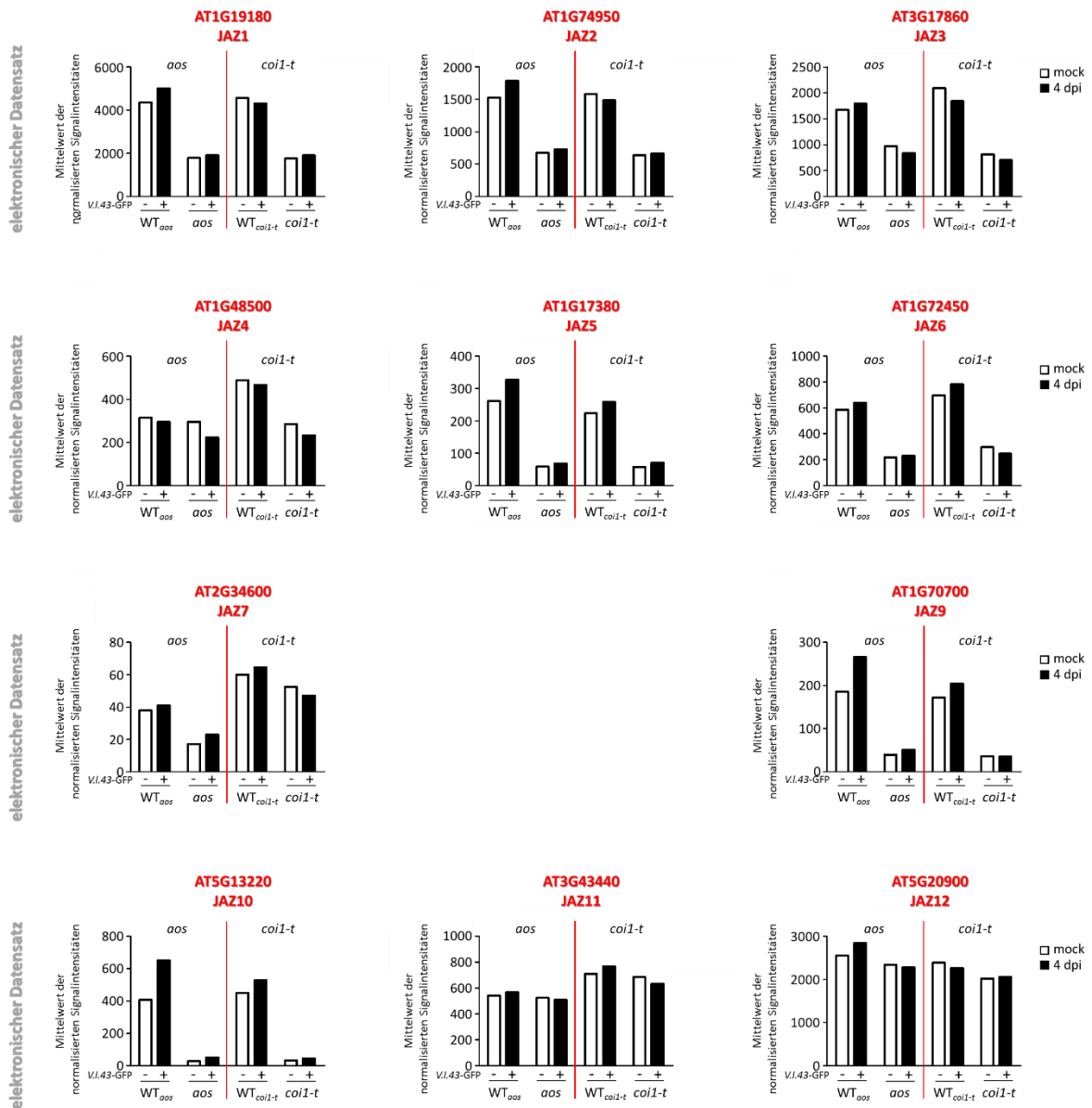
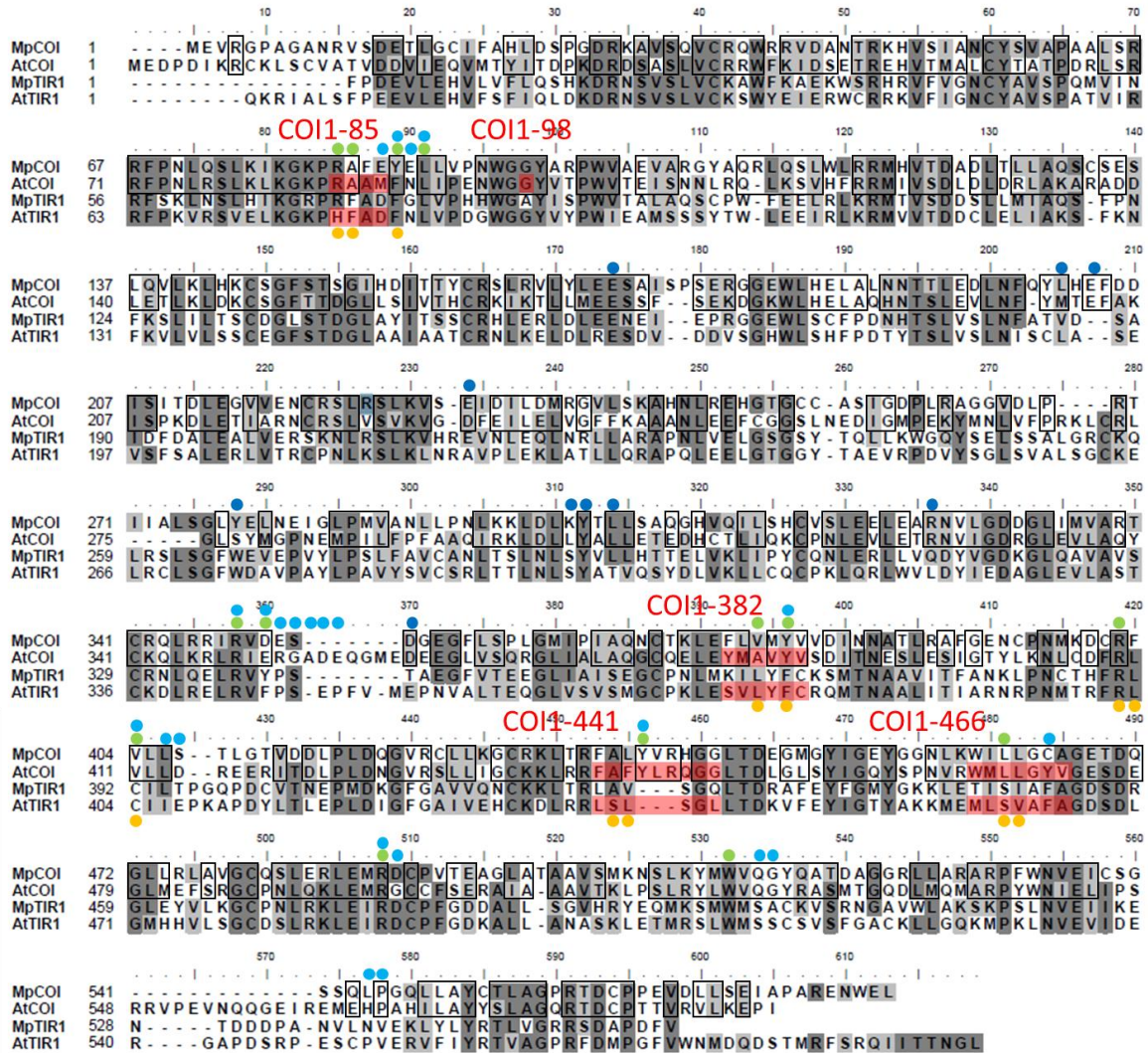


Abbildung 6.3 Elektronisch erstellte Expressionstärken von JAZ-Genen im WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t

Elektronisch erstellte Genexpression anhand der Mittelwerte der normalisierten Signalstärken in Wurzeln von drei unabhängigen Replikaten, steril auf MS-Medium angezogener Pflanzen von WT_{aos}, aos, WT_{coi1-t} und coi1-t vier Tage nach mock und *V. longisporum* Infektion. Bei den dargestellten Genen handelt es sich um Mitglieder der JAZ-Repressor-Familie (Aufgrund der fehlenden normalisierten Einzelwerte aller drei Replikate im Robin Programm, konnte für die elektronisch erstellten Signalstärken der vier Gene keine SEM berechnet werden. Nur der normalisierte Mittelwert stand zur Verfügung.)



- JA-Ile Kontaktstelle in AtCOI1
- Auxin Kontaktstelle in AtTIR1
- JAZ Kontaktstelle der Schleifenregion in AtCOI1
- JAZ Kontaktstelle der α -Helix in AtCOI1

Abbildung 6.4 Alignment der COI1- und TIR1-Proteinsequenzen aus *A. thaliana* und *M. polymorpha*

Ähnlichkeiten und identische Sequenzbereiche sind in grau-weiß gefärbt. Die schwarzen Umrandungen heben konservierte Aminosäuren zwischen AtCOI1 und MpCOI hervor. Farbliche Kreise markieren Aminosäuren von AtCOI1, die in die Bindung mit JA-Ile (grün) und dem JAZ-Protein (blau) involviert sind bzw. Aminosäuren von AtTIR1, die an der Bindung von Auxin (orange) beteiligt sind. Rote Boxen markieren ausgetauschte Aminosäuren des AtCOI1 gegen Aminosäuren des AtTIR1 in den fünf mutierten COI1-Proteinen.

Danksagung

Zum Schluss möchte ich hier die Gelegenheit ergreifen mich bei all denen zu bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben:

An erster Stelle gilt mein Dank Frau **Prof. Dr. Christiane Gatz** für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in Ihrer Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ihre ansteckende Begeisterung für das Thema sowie zahlreiche Ratschläge und Ideen waren stets motivierend und ermöglichten den erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Herrn **Prof. Dr. Volker Lipka** für die Übernahme des Koreferats. Ihm, sowie Herrn **Prof. Dr. Ivo Feussner** danke ich ebenfalls für die Teilnahme an meinem Prüfungskomitee. Anregende Diskussionen und aufschlussreiche Vorschläge waren stets wertvolle Ergebnisse dieser Treffen. Den zuvor genannten sowie Frau **Prof. Dr. Andrea Polle**, Herrn **PD Dr. Thomas Teichmann** und Frau **Jun. Prof. Cynthia Gleason** danke ich für die Bereitschaft meine Prüfungskommission zu bilden.

Bei der bioinformatischen Auswertung meiner RNA-Sequenzierung habe ich von dem Wissen von Frau **Dr. Corinna Thurow** profitiert. Ich danke Ihr weiterhin für zahlreiche Diskussionen und Hilfestellungen während meiner ganzen Doktorandenzeit. Herrn **PD Dr. Joachim Uhrig**, der im Laufe meiner Doktorandenzeit Mitglied der Arbeitsgruppe wurde, habe ich ebenfalls auf Grund vieler hilfreicher Gespräche und wertvoller Tipps sehr zu schätzen gelernt. Ihm danke ich ebenfalls für das mühsame Korrekturlesen der vorliegenden Arbeit.

Herrn **Dr. Guido Kriete** gilt mein besonderer Dank für die sofortige Hilfestellung bei jeglichen technischen Fragen und das unermüdliche Einrichten vom erneut abgestürzten Laptop.

Herrn **Dr. Hassan Ghareeb** danke ich für immer wieder geleistete Hilfestellung bei der Arbeit mit dem konfokalen Mikroskop.

Ohne unsere TAs wäre das Leben im Labor nicht halb so einfach gewesen. Vielen Dank **Anna Hermann, Larissa Kunz, Ronald Scholz** und **Katharina Dworak** für eure ständige Unterstützung, sowohl moralisch als auch praktisch bei so manchen größeren Experimenten, die ohne euch nicht so schnell bearbeitet gewesen wären.

Auch unseren Gärtnern **Felicitas Glasenapp, Uwe Wedemeyer** und **Susanne Mester** danke ich für das unermüdliche Stopfen von Töpfen, auch oft in letzter Sekunde, das stundenlange Samenernten und Pikieren vieler, vieler Pflanzen.

Für eine rundum nette Arbeitsatmosphäre haben nicht nur bereits genannte Mitglieder unserer Arbeitsgruppe gesorgt, sondern noch viele weitere: Ich danke **Dr. Anjali Ralhan** für die Einführung in den Umgang mit *Verticillium*. Gemeinsam mit Ihr, **Dr. Neena Ratnakaran** sowie Ronny wurde immer

für gute Stimmung in unserem Labor gesorgt. **Dr. Alexander Meier** danke ich für viele nette Gespräche und aufbauende Worte in so mancher Mittags- und Kaffeepause. **Dr. Armin Töller, Li-Jun Huang, Ning Li** und **Jan Oberdiek** danke ich ebenfalls für amüsante Gespräche „auf dem Flur“. Nicht zu vergessen sind **Dr. Martin Muthreich, Frederik Polzin** und **Nathannon Leelarasamee**. Auch ohne euch wäre meine Zeit im Labor nur halb so gut gewesen. **Charlotte Roth, Yvonne Ziegler** und **Karin Thole** danke ich ebenfalls für eine schöne Zeit, so manche lustige Tagung und aufbauende Worte, wann immer sie nötig waren.

Wissenschaft und Arbeit sind nur das halbe Leben, daher danke ich besonders **Julia Sprenger** und **Ruwan Perera** sowie zahlreichen anderen Freunden und Bekannten für Ihren nicht zu unterschätzenden Beitrag an der Fertigstellung dieser Arbeit. Eure häufigen Besuche waren immer mit viel Spaß und neuer Motivation für den Alltag verknüpft.

Nicht zuletzt gilt mein wahrscheinlich größtes Dankeschön **meiner Familie**. Ich danke meinen **Eltern** für Ihre unermüdliche Unterstützung, den Glauben an mich und dafür, dass ich weiß, dass Ihr immer für mich da seid. Trotz der Entfernung habt Ihr es immer wieder geschafft mich aufzubauen und zu ermutigen. Dieser Dank gebührt ebenfalls meinen Schwestern **Christine** und **Rike** sowie **Heike** und **KW Schmitz**. Ich danke euch von Herzen.

Mischi, Dir danke ich besonders für deine unendliche Geduld mit mir. Danke, dass Du einfach immer für mich da bist, mich in allen Lebenslagen aufmunterst und in allem was ich tue unterstützt. Danke für das Korrekturlesen und die vielen, vielen Kleinigkeiten die Du gerade in der letzten Zeit für mich übernommen hast. Danke, dass Du mit mir das Abenteuer Göttingen auf Dich genommen hast!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Johanna Schmitz
Geburtsdatum/ -ort: am 14.6.1984 in Mönchengladbach / Rheydt
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Studium

Seit September 2011 **Georg-August-Universität Göttingen,**
Promotionsstudium
Abteilung Molekularbiologie und Physiologie der Pflanze
(Prof Dr. Christiane Gatz)
Titel der Dissertation: Analyse der Jasmonoyl-Isoleucin-un-
abhängigen Funktion des Jasmonat-Rezeptors CORONATINE
INSENSITIVE1 in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*

Februar 2011-August 2011 **Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Abteilung**
Molekulare Evolution, Universität Bonn
Wissenschaftliche Hilfskraft

Juli 2008-Februar 2011 **Institut für Zelluläre und Molekulare Botanik, Abteilung**
Molekulare Evolution, Universität Bonn
Studentische Hilfskraft

Oktober 2007 - Februar 2011 **Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn**
Hauptstudium der Biologie (Diplom)
Abteilung Molekulare Evolution (Prof. Dr. Volker Knoop)
Titel der Diplomarbeit: Protein-Protein-Interaktionsstudien
der MRS2 Magnesiumtransporter-Familie aus *Arabidopsis*
thaliana mit Hilfe des mbSUS in *Saccharomyces cerevisiae*

Oktober 2005 - September 2007

Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Grundstudium der Biologie (Vordiplom)

September 2003-Juli 2005

Rheinische Akademie e.v. Köln

Ausbildung zur staatlich geprüften Biologisch-technischen Assistentin

Schulische Laufbahn

August 1994-Juli 2003

Silverberg-Gymnasium, Bedburg

Abschluss: Abitur

August 1990- Juli 1994

Wilhelm-Busch-Grundschule, Bedburg

Publikationsliste

Schmitz, J., Tierbach, A., Lenz H., Meschenmoser, K., und Knoop, V. (2013). Membrane protein interactions between different *Arabidopsis thaliana* MRS2-type magnesium transporters are highly permissive. *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (9): 2032-2040.

Reibe, S., Schmitz, J., und Madea, B. (2009). Molecular identification of forensically important blowfly species (Diptera: *Calliphoridae*) from Germany. *Parasitology Research* **106** (1): 257-261.