

**Charakterisierung der jasmonatinsensitiven  
*Arabidopsis thaliana* Mutanten *jin1* und *jin4***

**Dissertation**



zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anja Nickstadt

geb. am 12. Dezember 1974 in Wernigerode

Gutachter:

1. Prof. Dr. K. Humbeck

2. Prof. Dr. D. Scheel

Halle (Saale), 17.10.2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000009254**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000009254>]

"...und eines Tages war es soweit,  
daß wir alles wieder verloren,  
denn träumend stirbt eine alte Zeit,  
und aus Träumen werden neue geboren."

Arthur O'Shaugressy  
(1844-1881)

Teile der Arbeit wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Nickstadt, A., Thomma, B.P.H.J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., Zeier, J., Löffler, C., Scheel, D., Berger, S. (2004): The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology* 5 (5), 425-434

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Reaktionen der Pflanze auf Stress</b>	<b>1</b>
1.1.1 Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen	1
1.1.2 Konstitutive und induzierbare pflanzliche Abwehrmechanismen	3
1.1.3 Induzierte Resistenzen (IR)	6
1.1.4 Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr	6
1.1.5 <i>Pseudomonas syringae</i> als bakterielles Phytopathogen	8
1.1.6 Reaktion der Pflanzen auf Ozon	8
<b>1.2 Jasmonate als pflanzliche Signalstoffe und deren Biosynthese</b>	<b>11</b>
<b>1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i> Mutanten mit Veränderungen der JA-Biosynthese und JA-Signaltransduktion</b>	<b>12</b>
<b>1.4 Kartierung von Mutationen</b>	<b>17</b>
1.4.1 Molekulare Marker	17
1.4.2 Meiotische Rekombinationskartierung	18
<b>1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien</b>	<b>20</b>
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	20
2.1.2 Geräte	20
2.1.3 Software und Websites	21
2.1.3.1 Software	21
2.1.3.2 Websites	21
2.1.4 Antibiotika	21
2.1.5 Radiochemikalien	22
2.1.6 Molekularbiologische „Kit“ Systeme	22
2.1.7 Enzyme	22
2.1.8 Restriktionsenzyme	22
<b>2.2 Gängige Lösungen, Puffer und Medien</b>	<b>22</b>
2.2.1 Herstellung häufig verwendeter Medien	22

2.2.2	Herstellung häufig verwendeter Puffer und Lösungen	23
<b>2.3</b>	<b>Verwendete Organismen</b>	24
2.3.1	Pflanzen	24
2.3.2	Bakterien	24
<b>2.4</b>	<b>Pflanzenanzucht und Stressbehandlung</b>	24
2.4.1	Pflanzenanzucht	24
2.4.2	Sterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> Samen	25
2.4.3	Agrobakterien vermittelte Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
2.4.4	Ozon-Experimente	26
2.4.4.1	Ozon-Behandlung	26
2.4.4.2	Quantifizierung des Zelltodes nach Ozonbehandlungen	26
2.4.5	Pathogenbehandlungen	26
2.4.5.1	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i>	26
2.4.5.2	Infektion von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen mit <i>Pseudomonas syringae</i>	27
2.4.5.3	Bestimmung des <i>Pseudomonas</i> Wachstums in der Pflanze	27
2.4.6	Bestimmung des Chlorophyllgehalts in <i>Arabidopsis</i> Blättern	27
2.4.6.1	Aceton-Methode	27
2.4.6.2	Bestimmung mittels SPAD-Analyser	28
2.4.7	Flottieren von Pflanzen	28
<b>2.5</b>	<b>Molekularbiologische Techniken</b>	28
2.5.1	Verwendete Bakterienvektoren	28
2.5.2	Methoden zur Nukleinsäurechemie	29
2.5.2.1	Isolierung von Plasmid-DNA	29
2.5.2.2	Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe (Quick DNA MiniPrep)	29
2.5.2.3	DNeasy Plant Kit	30
2.5.2.4	DNA-Isolation aus Blättern	30
2.5.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe	30
2.5.2.6	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA	31
2.5.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	31
2.5.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	31
2.5.2.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.5.2.10	Restriktionsverdau	31
2.5.2.11	Ligation	32
2.5.3	Transfertechniken	32
2.5.3.1	Northern Blot	32

2.5.3.2	Southern Blot	32
2.5.4	Radioaktive Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten	33
2.5.4.1	DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Analysen)	33
2.5.4.2	RNA-Hybridisierungsexperimente (Northern-Analysen)	33
2.5.4.3	Visualisierung mittels Phosphorscreen	33
2.5.5	PCR	34
2.5.5.1	Standard-PCR	34
2.5.5.2	Semiquantitative RT-PCR	35
2.5.5.3	Inverse PCR	35
2.5.5.4	3'Race-PCR	35
2.5.5.5	Kolonie-PCR	36
2.5.6	Klonierung von PCR-Produkten	36
2.5.7	Sequenzierung	36
2.5.7.1	Automatisierte Sequenzierung	37
2.5.7.2	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung	37
<b>2.6</b>	<b>Mikrobiologische Methoden</b>	37
2.6.1	Herstellung von Glycerinkulturen	37
2.6.2	Herstellung kompetenter Zellen ( <i>Escherichia coli</i> )	37
2.6.3	Transformation von <i>Escherichia coli</i>	37
2.6.4	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
<b>2.7</b>	<b>Übersicht über die verwendeten Primer</b>	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	41
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der Mutanten <i>jin1</i> und <i>jin4</i></b>	41
3.1.1	Einfluss von Methyljasmonat und Coronalon auf das Wurzelwachstum	41
3.1.2	Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i>	43
3.1.2.1	Makroskopische Beobachtungen	43
3.1.2.3	Einfluss von <i>Pseudomonas syringae</i> -Infiltrationen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter	44
3.1.2.4	Vergleich der Bakterienausbreitung in Wildtyppflanzen und Mutanten	46
3.1.2.5	Genexpression nach Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i>	49
<b>3.2</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen zur Ozonempfindlichkeit der Mutanten <i>jin1</i> und <i>jin4</i></b>	56
3.2.1	Untersuchte Wildtypen, Mutanten und Doppelmutanten	56

3.2.2	Ozonbehandlungen	58
3.2.3	Expression ozonresponsiver Gene	63
<b>3.3</b>	<b>Kartierung des <i>jin1</i> Locus</b>	65
3.3.1	Vorarbeiten (Grobkartierung)	65
3.3.2	Feinkartierung von <i>jin1</i>	66
<b>3.4</b>	<b>Sequenzierung von <i>AtMyc2</i> in <i>jin</i></b>	68
<b>3.5</b>	<b>Komplementation des Mutantenphänotyps</b>	73
3.5.1	Komplementation unter Kontrolle des 35S-Promotors	73
3.5.2	Komplementation unter Kontrolle des endogenen Promotors	75
<b>3.6</b>	<b>Untersuchungen zur Expression von <i>AtMYC2</i></b>	77
3.6.1	In welchen Pflanzenteilen wird <i>AtMYC2</i> exprimiert?	77
3.6.2	Expression von <i>AtMYC2</i> nach Verwundung	78
3.6.3	Expression von <i>AtMYC2</i> nach Applikation von Abscisinsäure und Methyljasmonat	78
3.6.4	Expression von <i>AtMYC2</i> nach Infiltration von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	79
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	81
<b>4.1</b>	<b>Auswirkung der Jasmonatinsensitivität auf die Pathogenresistenz</b>	81
4.1.1	Welchen Einfluss hat das Phytotoxin Coronatin auf die Resistenz von <i>jin1</i> ?	82
4.1.2	Sind veränderte Salizylat- oder Jasmonat-Spiegel für die Resistenz von <i>jin1</i> verantwortlich?	83
4.1.3.	Führt die veränderte Expression von Abwehrgenen zur gesteigerten Resistenz von <i>jin1</i>	85
4.1.3.1	Expression jasmonatresponsiver Gene	85
4.1.3.2	Expression nicht jasmonatresponsiver Gene	86
<b>4.2</b>	<b>Auswirkung der Jasmonatinsensitivität auf die Ozonsensitivität</b>	89
<b>4.3</b>	<b><i>AtMYC2</i> - ein neues Element der Jasmonat-Signaltransduktion</b>	91
<b>4.4</b>	<b>Weiterführende Arbeiten</b>	95
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	97
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	99
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	114

**Abkürzungsverzeichnis**

ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
BAC	" <i>bacterial artificial chromosome</i> "
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	komplementäre DNA
cfu	koloniebildende Einheiten (" <i>colony forming units</i> ")
cm	Zentimeter
cM	ZentiMorgan
DNA	Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure
d.h.	das heißt
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
h	Stunden
HR	hypersensitive Reaktion (" <i>hypersensitive reaction</i> ")
ISR	induzierte systemische Resistenz
JA	Jasmonate
kb	Kilobase npaare
kD	Kilodalton
L	Liter
LAR	lokal erworbene Resistenz (" <i>local acquired resistance</i> ")
M	molar
MeJA	Methyljasmonat
min	Minuten
MIPS	Munich information center for protein sequences, GSF
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	millimolar
µM	mikromolar
mRNA	messenger RNA

nl	Nanoliter
OCD	oxidativer Zelltod (" <i>oxidative cell death</i> ")
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (" <i>open reading frame</i> ")
PCD	programmierter Zelltod (" <i>programmed cell death</i> ")
PCR	Polymerasekettenreaktion
<i>Psm</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
RNA	Internationale Bezeichnung für Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (" <i>reactive oxygen species</i> ")
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschließender Polymerasekettenreaktion
sec.	Sekunden
SA	Salizylsäure (Salicylic acid)
SAG	glucosidisch gebundene Salizylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz (" <i>systemic acquired resistance</i> ")
SD	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
rpm	runs per minute (Umdrehungen pro Minute)
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Ein- und Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren:

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# **1. Einleitung**

## **1.1 Reaktionen der Pflanze auf Stress**

Pflanzen besitzen in der Regel nicht die Fähigkeit der freien Ortsbewegung. Sie haben daher im Laufe der Evolution ein breites Spektrum an Methoden entwickelt, um auf Veränderungen der Umweltbedingungen wie Licht, Wasser, Nährstoffe, Schadstoffe, Berührung bzw. Verwundung oder Befall durch phytopathogene Organismen reagieren zu können. Pflanzen sind einer Vielzahl verschiedener Pathogene wie z.B. Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt, die in der Landwirtschaft nicht selten zu erheblichen Ertragseinbußen führen (Oerke *et al.*, 1994; Baker *et al.*, 1997). Gegenstand der modernen Phytopathologie ist es daher, die molekularen Grundlagen des Wechselspiels zwischen Pflanze und Mikroorganismus aufzuklären.

### **1.1.1 Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen**

Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und pathogenen Mikroorganismen können in kompatible (verträgliche) und inkompatible (unverträgliche) Interaktionen unterteilt werden (Prell, 1996). Bei einer kompatiblen Interaktion wird das Pathogen als virulent bezeichnet, da es die Wirtspflanze besiedeln und sich auf bzw. in ihr vermehren kann. Dadurch wird die Wirtspflanze geschädigt. Bei der Infektion mit avirulenten Phytopathogenen spricht man von einer inkompatiblen Interaktion, bei der durch Abwehrmechanismen eine weitere Vermehrung des Pathogens eingeschränkt bzw. verhindert wird.

Einen Sonderfall stellt die Toleranz dar. Hierbei zeigt die Pflanze trotz massiven Pathogenbefalls keine oder nur schwach ausgeprägte Krankheitssymptome (Agrios, 1997).

Im Regelfall sind Pflanzen gegenüber den meisten potentiell pathogenen Mikroorganismen resistent (Bell, 1981). Diese Art der Resistenz wird als Basis- oder Nicht-Wirts-Resistenz bezeichnet (Ebel & Scheel, 1992; Prell, 1996) und ist genetisch determiniert. Bei der Basisresistenz sind die meisten potentiell pathogenen Mikroorganismen nicht in der Lage, die konstitutiven Abwehrbarrieren der Pflanzen zu überwinden (Heath, 2000). Wird die Pflanze dennoch von einem Pathogen befallen, kann der betroffene Bereich durch die Aktivierung induzierbarer Abwehrmechanis-

men lokal abgegrenzt werden. Die Mechanismen der Nicht-Wirts-Resistenz werden auch unter dem Begriff der Basisinkompatibilität zusammengefasst. Die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen ist inkompatibel.

Gelingt es einem Pathogen, die Abwehrmechanismen der Pflanze zu überwinden, spricht man von Basiskompatibilität. Diese Interaktion ist kompatibel und die Pflanze erkrankt (Hammond-Kossack & Jones, 2000; Heath 2000). Durch die Entwicklung von Rassen-Sorten-spezifischen Mechanismen kann diese vonseiten der Pflanzen jedoch wieder in eine inkompatible Interaktion umgewandelt werden.

Die meisten pathogenen Mikroorganismen sind nur auf die Besiedelung eines engen Wirtspflanzenspektrums spezialisiert. Allerdings können auch bei diesen Wirtspflanzen Resistenzen ausgeprägt sein (Heath 2000, Rausher, 2001). Bei diesen Wirtsresistenzen wird zwischen horizontaler (genereller/quantitativer) und vertikaler (spezifischer/qualitativer) Resistenz unterschieden.

Bei der horizontalen Resistenz, häufig auch als Feldresistenz bezeichnet, ist ein Genotyp einer Pflanzenart gegenüber einigen bzw. allen Rassen eines Pathogens resistent. Diese Art der Resistenz, die unter komplexer genetischer Kontrolle steht, ist zwar dauerhaft und rassenunspezifisch, aber zumeist unvollständig.

Bei der vertikalen Resistenz sind Pflanzen nur gegenüber bestimmten Rassen eines Pathogens resistent (Prell, 1996). Diese Form der Wirtsresistenz ist monogenetisch determiniert und wird durch die "Gen-für-Gen-Hypothese" (Flor, 1971) beschrieben. Die "Gen-für-Gen-Hypothese" basiert auf dem "Schlüssel-Schloss-Prinzip", das heißt zu jedem resistenzvermittelnden Wirtsgen (Resistenzgen,  $R$ ) existiert aufseiten des Pathogens ein korrespondierendes Avirulenzgen ( $Avr$ ). Die meisten Resistenzgene der Pflanzen sind dominant. Hingegen sind beim Pathogen die Avirulenzgene dominant. Nur beim Aufeinandertreffen eines dominanten Resistenzgens und eines dominanten Avirulenzgens kommt es zu einer spezifischen Resistenzreaktion. Die direkte oder indirekte Interaktion dieser Genprodukte führt zur Auslösung von Abwehrreaktionen und somit zur Resistenzausprägung (van der Biezen & Jones, 1998; Takken & Joosten, 2000; Dangl & Jones, 2001; Schneider, 2002). Bei allen anderen Kombinationen liegt eine kompatible Interaktion vor und die Pflanze ist anfällig.

Bislang wurden mehr als 40 R-Gene identifiziert (Hammond-Kosack & Parker, 2003). Diese R-Gene verfügen häufig über leucinreiche Sequenzwiederholungen (LRRs, "*leucine rich repeats*") und „*coiled-coil*“-Domänen, wodurch sie in der Lage sind, Protein/Protein-Wechselwirkungen einzugehen (Kobe & Kajava, 2001).

Durch die Erkennung von Pathogenen werden in Pflanzen verschiedene Abwehrmechanismen induziert. Die Erkennung des Pathogens, also die Fähigkeit zwischen "eigen" und "fremd" zu unterscheiden, bildet die Grundlage der Aktivierung von Ab-

wehrmechanismen der sogenannten angeborenen Immunität ("*innate immunity*") (Nürnberger & Brunner, 2002; Nürnberger & Scheel, 2001).

### 1.1.2 Konstitutive und induzierbare pflanzliche Abwehrmechanismen

Pflanzen stehen zur Abwehr von Pathogenen zwei unabhängige Wege zur Verfügung: die konstitutive präformierte Abwehr und die induzierte Abwehr.

Zu den konstitutiven präformierten Abwehrmechanismen zählen vor allem strukturelle und chemische Barrieren, die einen primären Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen darstellen. Hierzu gehören durch Lignineinlagerung verstärkte Zellwände, die Kutikula mit Kutin- und Suberineinlagerungen sowie die Anzahl und Beschaffenheit der Stomata und in der Zellwand gespeicherte antimikrobielle Substanzen, die das Eindringen und das Wachstum der Pathogene hemmen. Antibiotisch wirkende Substanzen findet man auch als Glykosidderivate in der Vakuole, die nach dem Eindringen des Pathogens in die Zelle durch Abspaltung des Zuckerrestes induziert werden können (Osborn, 1996).

Neben den konstitutiven Abwehrmechanismen existieren in Pflanzen eine Vielzahl induzierbarer Abwehrmechanismen, die ein weiteres Eindringen des Pathogens verhindern. Diese können sowohl durch das Pathogen selbst als auch durch Verwundung oder spezifische Signalmoleküle, sogenannte Elicitoren, ausgelöst werden (Maleck & Dietrich, 1999). Als Elicitoren werden Signalsubstanzen bezeichnet, die in Pflanzen Abwehrreaktionen auslösen können (Boller, 1995; Ebel & Scheel, 1997; Nürnberger, 1999). Ursprünglich wurden unter dem Begriff Elicitor nur die Moleküle verstanden, die die Bildung und Akkumulation von Phytoalexinen (niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Substanzen) induzieren (Keen, 1975; Darvill & Albersheim, 1984).

Zu den induzierbaren pflanzlichen Abwehrmechanismen gehören u.a. Modifikationen der pflanzlichen Zellwand, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies ("oxidative burst"), die Bildung von Phytoalexinen und PR - ("pathogenesis-related") Proteinen. Die Induktion von Abwehrmechanismen auf lokaler Ebene erfolgt bereits wenige Minuten bis Stunden nach Kontakt mit dem Pathogen. Die Ausbildung einer systemischen Resistenz als Schutz gegen erneuten Pathogenbefall kann dagegen mehrere Tage dauern.

Zellwandmodifikationen erlauben es der Pflanze, den mechanischen Einwirkungen und der Aktivität hydrolytischer Enzyme von Seiten des Pathogens standzuhalten und somit dessen Eindringen zu verhindern bzw. zu erschweren. Dies kann durch die Einlagerung von Zellwandbestandteilen wie z.B. Kallose, Lignin, Suberin und

prolinreicher Glykoproteine erreicht werden (Bowles, 1990). Diese Substanzen werden z.T. zur weiteren Stabilisierung polymerisiert oder untereinander vernetzt (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

Eine frühe Komponente der pflanzlichen Pathogenabwehr, die bereits wenige Minuten nach Pathogenbefall bzw. Elicitierung auftritt, ist der "*oxidative burst*" (Lamb & Dixon, 1997). Hierbei handelt es sich um eine schnelle und transiente Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies ("*reactive oxygen species*", ROS), wie z.B. Superoxidationen, Hydroperoxyl- und Hydroxylradikalen sowie Wasserstoffperoxid (Lamb & Dixon, 1997). Die reduktive Bildung von ROS aus atmosphärischem Sauerstoff beruht auf der Aktivität membrangebundener NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischer Peroxidasen (Kombrink & Somssich, 1995).

Für ROS werden in Pflanzen verschiedene Funktionen bei der Resistenzantwort diskutiert. In Abwehrreaktionen gegen Pathogene besitzen ROS zunächst direkt antimikrobielle Eigenschaften, sie haben aber auch eine Funktion bei der oxidativen Vernetzung von Glykoproteinen mit der Zellwand, bei der Auslösung von Signaltransduktionskaskaden und der Hypersensitiven Reaktion ((Levine *et al.*, 1994; Lamb & Dixon 1997, Nürnberger *et al.*, 1997; Bolwell, 1999; Mittler, 2002).

Vor allem in inkompatiblen Interaktionen von Pflanzen und Pathogenen kommt es nach einer schnellen Bildung von  $O_2^{\cdot-}$  und  $H_2O_2$  zu einem weiteren, z.T. länger andauernden "*oxidative burst*" (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997; Scheel, 2002), was zum Absterben der Pflanzenzellen am Infektionsort führen kann. Dieser frühe Abwehrmechanismus der Pflanze auf lokaler Ebene wird auch als Hypersensitive Reaktion (HR) bezeichnet. Die HR dient vermutlich dazu, das weitere Eindringen eines Pathogens zu verhindern und seine Ausbreitung auf einen möglichst kleinen Gewebeabschnitt zu beschränken. Da es sich bei der HR um einen aktiven Vorgang handelt, der die Biosyntheseleistung der Pflanze erfordert, wird die HR als Form des programmierten Zelltods (PCD, "*programmed cell death*") betrachtet. Im Zuge der HR kommt es zu Modifikationen der Zellwand, Membranschädigungen, Elektrolytverlust, Lipidperoxidation, Induktion von Enzymen, Dekompartimentierung, Degeneration der DNA und zur Bildung apoptotischer Vesikel (Dangl *et al.*, 1996). Dies führt schließlich zum Kollabieren der Zellen. Durch das Absterben der Zellen wird den biotrophen Pathogenen die Nahrungsgrundlage entzogen und ein weiteres Ausbreiten verhindert (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Dagegen kommt es bei der Besiedlung mit hemibiotrophen Pathogenen häufig zur Freisetzung toxischer Verbindungen aus den Vakuolen (Dangl *et al.*, 1996).

Eine erfolgreiche Abwehrreaktion der Pflanze gegenüber Pathogenen setzt jedoch nicht immer das Auftreten einer HR voraus. So zeigen *Arabidopsis thaliana dnd*

Mutanten ("defense, no death") trotz fehlender Hypersensitiver Reaktion eine erhöhte Resistenz gegenüber pathogenen Bakterien (Clough *et al.*, 2000). Umgekehrt sind die *Arabidopsis thaliana* eds Mutanten ("enhanced disease susceptibility") anfällig gegenüber Pathogenen, obwohl eine Hypersensitive Reaktion auftritt (Rogers & Ausubel, 1997; Dewdney *et al.*, 2000).

Nach Pathogenbefall werden in Pflanzen nahe der Infektionsstelle Phytoalexine akkumuliert (Dixon, 1986). Bei Phytoalexinen handelt es sich um niedermolekulare Substanzen verschiedener Stoffklassen, die sich durch eine antimikrobielle Wirkung auszeichnen (Paxton, 1981). Bennet & Wallsgrave (1994) zeigten eine Korrelation zwischen Phytoalexinsynthese und Resistenz der Pflanze gegen Pathogene. Zunächst wurde vermutet, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Bildung von Phytoalexinen induzieren kann und somit eine direkte Verbindung zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und der Induktion der Phytoalexinproduktion besteht. Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Produktion von ROS nicht unbedingt für die Induktion der Phytoalexinsynthese erforderlich ist (Devlin & Gustine, 1992; Degousée *et al.*, 1994; Wojtaszek *et al.*, 1997).

Wenige Minuten bis Stunden nach Pathogenbefall akkumulieren in Pflanzen die Transkripte einer Vielzahl "pathogenesis-related proteins" (PR-Proteine) und anderer "defense-related proteins". Bisher wurden mindestens 17 PR-Protein-Familien klassifiziert, die β-1,3-Glucanasen, Chitinasen, Proteinase-Inhibitoren, Endoproteinasen und Peroxidasen sowie Proteine mit antifungalen Eigenschaften umfassen (Collinge *et al.*, 2002; Christensen *et al.*, 2002). Die Induktion verschiedener PR-Proteine ist salizylatabhängig (z.B. PR1, PR2 und PR5) und gilt als Marker (vor allem PR1) für die Aktivierung der Pathogenabwehr (Salmeron & Verwoort, 1998; Kinkema *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001).

*Arabidopsis*-Mutanten, die eine veränderte Expression von PR-Genen aufweisen, verdeutlichen die Bedeutung von PR-Proteinen in der Pathogenabwehr. So führt die konstitutive Expression von PR-Genen in den *cpr* Mutanten (*cpr1*, *cpr5* oder *cpr6*: "constitutive expression of pr1", "pr5" bzw. "pr6") zu erhöhter Resistenz (Clarke *et al.*, 1998, 2000; Bowling *et al.*, 1997; Glazebrook, 2001). *npr1* Mutanten ("non expression of pr1") von *A. thaliana*, in denen keine Expression von PR1 stattfindet, verfügen dagegen über eine verminderte Resistenz gegenüber einigen Pathogenen (Glazebrook, 1999; Kinkema *et al.*, 2000).

### 1.1.3 Induzierte Resistenzen (IR)

Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde beobachtet, dass die Behandlung von Pflanzen mit nur schwach virulenten Pathogenrassen vor einer später folgenden Infektion mit einer virulenten Rasse des Pathogens schützen kann (Ray, 1901; Chester, 1933). Die induzierte Resistenz wirkt gegen ein breites Spektrum an Phytopathogenen (Kessmann *et al.*, 1994) und kann mehrere Tage bis Monate anhalten (Schneider *et al.*, 1996).

Bei der salizylsäureabhängigen induzierten Resistenz wird zwischen systemisch erworbener Resistenz (SAR, "*systemic acquired resistance*") und lokal erworbener Resistenz (LAR, "*local acquired resistance*") unterschieden (Ross, 1961a & 1961b). Bei der LAR werden die Abwehrmechanismen durch endogene Signale nur in den Zellen aktiviert, die sich in unmittelbarer Nähe der Infektionsstelle befinden. Dagegen wird bei der SAR der Reiz vom Ort des Befalls über endogene Signale in weiter entfernte, befallsfreie Pflanzenteile geleitet und löst dort die entsprechenden Abwehrmechanismen aus, die zu einer Immunisierung der Pflanze gegen einen weiteren Befall mit Pathogenen führt. Das Auftreten der SAR ist mit der Expression verschiedener Gene verbunden (Ward *et al.*, 1991; Sticher *et al.*, 1997), deren Genprodukte eine direkte antimikrobielle Wirkung gegen Pathogene besitzen, andere gehören z.B. zu den PR-Proteinen (Ryals *et al.*, 1994).

An der durch Rhizobakterien (meist Pseudomonaden) ausgelösten induzierten systemischen Resistenz (ISR), die salizylsäureunabhängig vermittelt wird, sind als Signalmoleküle Ethylen und Jasmonate beteiligt. Die ISR löst Abwehrreaktionen in entfernten Geweben aus, die zur Resistenz gegen Blattpathogene führen und unabhängig von der Expression von PR-Genen sind (van Wees *et al.*, 2000). Sowohl ISR, als auch SAR werden durch *NPR1* vermittelt, ein Gen, das bisher nur in die durch Salizylsäure vermittelte Abwehr von Pathogenen eingeordnet wurde (Cao *et al.*, 1997; Feys & Parker, 2000).

### 1.1.4 Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr

Die Auslösung von Abwehrreaktionen gegen Phytopathogene setzt die Erkennung des Pathogens bzw. eines von ihm freigesetzten Elicitors durch pflanzliche Rezeptoren voraus. Dabei stellen Signaltransduktionskaskaden die Verbindung zwischen der Erkennung durch die Pflanze und der Resistenzantwort dar. Als ein erstes frühes Element der Signaltransduktion auf intrazellulärer Ebene fungieren hierbei Än-

derungen der Ionenpermeabilität der Plasmamembran (Nürnberger & Scheel, 2001). Es kommt zum Öffnen von Ionenkanälen, was den Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  sowie den Ausstrom von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  zur Folge hat (Nürnberger *et al.*, 1994). Der erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel kann einerseits die Auslösung von Phosphorylierungskaskaden bewirken, die wichtige posttranskriptionelle Regulationsmechanismen darstellen. In diesem Zusammenhang wird die Aktivierung von MAPK-Kaskaden diskutiert, die zur Induktion von Abwehrmechanismen führen (Zwerverger & Hirt, 2001). Auf der anderen Seite induzieren der Anstieg des cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes und die Depolarisierung der Plasmamembran die extrazelluläre Produktion von ROS und führen somit zum "oxidative burst" (Scheel, 1998; Blume *et al.*, 2000). Inwieweit ROS als sekundäre Botenstoffe (sogenannte "second messenger") agieren, ist noch nicht völlig geklärt. Es gibt jedoch Hinweise, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht alleine Abwehrreaktionen auslösen, sondern weitere Signalmoleküle erforderlich sind. So wurde zusammen mit ROS auch Stickstoffmonoxid (NO) als "second messenger" bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen beschrieben (Durner & Klessig, 1999; Delledone *et al.*, 1998, 2001).

Als weitere endogene Signalmoleküle kommen Salizylsäure (SA), Jasmonate (JA) und Ethylen, die nach Pathogenkontakt (aber auch nach Verwundung und Umweltstress) synthetisiert werden, in Frage. Diese Moleküle können über den Gasraum, durch Diffusion oder aktiv durch die Leitgewebe transportiert werden.

Eine Schlüsselrolle nimmt hier die Salizylsäure ein, die sowohl an der lokalen Abwehr als auch an der SAR beteiligt ist. *Arabidopsis*-Mutanten, die ein Hybrid-Gen aus zwei bakteriellen Genen der Salizylsäure-Biosynthese exprimieren, weisen einen erhöhten SA-Gehalt im Cytosol und damit einhergehend eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen auf (Mauch *et al.*, 2001). In *nahG*-Pflanzen, die die bakterielle Salizylhydroxylase konstitutiv exprimieren, wird SA zu Katechol abgebaut und kann so nicht mehr akkumulieren (Durner *et al.*, 1997). Diese Pflanzen sind nicht in der Lage, die SAR auszuprägen (Gaffney *et al.*, 1993). Auch die *Arabidopsis*-Mutanten *sid1*- und *sid2* (*salicylic acid-induction deficient*) zeigen bei fehlender SA-Akkumulation eine erhöhte Pathogenanfälligkeit (Nawrath & Métraux, 1999).

Als Teil der Signaltransduktion, die zur Expression von *PR*-Genen führt, wurde in Tabak eine MAP-Kinase identifiziert, die durch SA induziert werden kann: SIPK (*SA-inducible protein kinase*) (Zhang & Klessig, 1997). Ein weiteres Element dieser Signaltransduktion "stromabwärts" der SA-Akkumulation stellt NPR1 dar.

Neben der durch Salizylsäure vermittelten Genaktivierung spielen auch die Phytohormone Ethylen und Jasmonsäure bei Abwehrreaktionen eine bedeutende Rolle (Pieterse & van Loon, 1999). Während der HR nach Pathogenbefall und Verwun-

dung steigt der Ethylengehalt, was zu weiteren Abwehrreaktionen führt. Hier zu nennen sind die beschleunigte Seneszenz, das Abtrennen befallener Organe und die Induktion spezifischer Gene (Chang & Shockey, 1999).

Eng verbunden mit dem durch Verwundung ausgelösten Anstieg des Ethylengehaltes ist die Erhöhung des Jasmonsäure- bzw. Jasmonatgehaltes.

#### 1.1.5 *Pseudomonas syringae* als bakterielles Phytopathogen

In den letzten Jahre rückten verstärkt die beiden nahe verwandten Stämme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) und *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) in das Interesse der *Arabidopsis*-Forschung (Preston, 2000). Bereits 1991 erkannten Whalen *et al.* die Möglichkeit, mit Hilfe der genannten Organismen die Interaktionen zwischen Pflanzen und Bakterien zu studieren. Auch in der vorliegenden Arbeit soll die Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* Pflanzen und den oben genannten Pseudomonaden untersucht werden.

*Pseudomonas syringae* ist ein gram-negatives, obligat aerobes, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Bakterium. Es zählt phylogenetisch zur g-Gruppe der Proteobakterien. Mit über 50 Pathovarietäten besitzt *P. syringae* ein großes Wirtsspektrum. Die Bezeichnung Pathovarietät (pv.) steht dabei für die Fähigkeit eines Stammes, auf einer bestimmten Wirtspflanze pathogen zu sein, d.h. auf dieser Pflanze Krankheiten hervorrufen zu können. Verschiedene Pathovare werden zusätzlich in sogenannte physiologische Rassen eingeteilt. Diese Rassen sind phänotypisch nicht unterscheidbare Untereinheiten eines Pathovars, die nur einzelne Kultivare einer Wirtspflanze befallen können.

#### 1.1.6 Reaktion der Pflanzen auf Ozon

Neben Pathogenen sind Pflanzen, vor allem in Industrieländern, Luftschadstoffen wie Ozon ausgesetzt. Das Gas Ozon (O<sub>3</sub>) wurde 1839 von Christian F. Schönbein bei der Elektrolyse von Wasser entdeckt und nach dem griechischen „ozein“ (das Duftende) benannt. Ozon ist ein bei Raumtemperatur blaues Gas und zeichnet sich besonders durch seine hohe Reaktivität aus. Es reagiert als eines der stärksten Oxidationsmittel besonders mit ungesättigten, organischen Verbindungen. Ozon kommt natürlich in unserer Atmosphäre vor. In der Stratosphäre schützt es die Er-

de vor schädlicher UV-Strahlung, während es in der Troposphäre als Schadgas wirkt.

Zu Beginn der 40er Jahre ergaben erste Beobachtungen, dass Ozon (damals als photochemischer "Smog" bezeichnet) Pflanzen schädigen kann. In den 50er Jahren wurde dann spezifisch Ozon als Luftschadstoff für verschiedene Pflanzenarten entdeckt: Wein (Richards *et al.*, 1958), Kiefer (Miller *et al.*, 1963) und Tabak (Heggstad & Middleton, 1959). Heggstad und Middleton korrelierten bereits 1959 das Auftreten von sogenannten "Wetterflecken" auf Tabakblättern mit erhöhten Ozonkonzentrationen. In Studien an Tabak konnte Heggstad (1991) feststellen, dass Ozonsensitivität ein erbliches Pflanzenmerkmal darstellt.

Die Aufnahme von Ozon in Pflanzen erfolgt fast ausschließlich über die Stomata der Blätter während des Gasaustausches. Die Kutikula zeigte sich als weitgehend impermeabel für das Schadgas. In den Blättern bewirkt Ozon die Verringerung der stomatären Leitfähigkeit und dadurch das Schließen der Spaltöffnungen (Lyons *et al.*, 1999). Dies führt zu einer Verminderung der CO<sub>2</sub>-Aufnahme und Photosyntheserate und folglich zur Verringerung des Wachstums.

Durch die Reaktivität des Ozons und seiner Transformationsprodukte im Apoplasten der Mesophyllzellen werden vor allem die Zellmembranen geschädigt, was im Extremfall zur Entwicklung von sichtbaren Blattschäden führen kann. Diese Blattschäden zeichnen sich zunächst als sogenannte "*water-soaked spots*" ab und entwickeln sich später zu weißen, pergamentartigen Stellen, die stark an die Blattschäden erinnern, die bei der Hypersensitiven Reaktion (HR) einer inkompatiblen Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen beschrieben wurden. Neuere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Antwort der Pflanze auf Ozon teilweise Komponenten der HR gleicht (Kangasjärvi *et al.*, 1994; Sharma & Davis, 1994; Sandermann *et al.* 1998).

Die größte Ähnlichkeit ist wohl das Auftreten von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Die Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Antwort auf Ozon wurde in Tabak (Schraudner *et al.*, 1998) und Birken (Pellinen *et al.*, 1999) beschrieben. In *Arabidopsis thaliana* wurde die ozoninduzierte Akkumulation von sowohl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als auch O<sub>2</sub><sup>-</sup> von Rao & Davis (1999) gezeigt. ROS sind aufgrund ihrer hohen Reaktivität toxisch für Zellen und an der Auslösung des oxidativen Zelltodes beteiligt ("*oxidative cell death*," OCD). ROS stellen weiterhin wichtige Komponenten von Abwehrreaktionen und Signalketten dar (Lamb & Dixon, 1997; Rao *et al.*, 2000b).

ROS können weiterhin eine Reihe von Abwehrgenen induzieren. Levine *et al.* (1994) konnten z.B. die Induktion von Glutathion-S-Transferasen (GST) nachweisen, Chamnongpol *et al.* (1998) detektierten eine erhöhte Expression von *PR1* und Desikan *et al.* (1998) zeigten die Induktion der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (*PAL*).

Neben reaktiven Sauerstoffspezies sind auch die Signalstoffe Jasmonsäure, Salizylsäure und Ethylen an ozoninduzierten Reaktionen beteiligt. In ozoninduzierten Antworten scheint Jasmonsäure die Rolle eines negativen Regulators des Zelltods zu spielen. Jasmonsäure greift an zwei verschiedenen Stellen in die Signalwege ein: auf der einen Seite vermindert Jasmonsäure die Akkumulation von ROS, auf der anderen Seite schwächt sie die Wirkung von Salizylsäure beim Zelltod (Rao *et al.*, 2000b; van Breusegem *et al.*, 2001). Behandelt man Pflanzen vor Beginn der Ozonbehandlungen mit Jasmonsäure, Methyljasmonat oder Verwundung kommt es zu einer deutlichen Verringerung der ozoninduzierten Blattschäden (Örvar *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 2000a).

Ethylen (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) ist ein endogenes Pflanzenhormon, das diverse Entwicklungs- und Wachstumsprozesse in Pflanzen reguliert: Samenkeimung, Zellelongation, Geschlechtsbestimmung, Fruchtreife, Seneszenz von Blüten und Abszission von Blättern (Johnson & Ecker, 1998; Alonso *et al.*, 1999). Ethylen gilt als früher und beständiger Marker für eine erhöhte Ozon-Sensitivität in Pflanzen (Sandermann, 1996). So produzieren ozontolerante Pflanzen kein bzw. deutlich weniger Ethylen als ozonempfindliche Sorten (Wellburn & Wellburn, 1996). Ethylen fördert die ROS-Bildung und Zelltod.

Die durch Ozon induzierte Steigerung der Ethylenemission resultiert aus der Aktivierung verschiedener ethylenbildender Enzyme (Tuomainen *et al.*, 1997). Die Synthese von Ethylen erfolgt aus dem im Yang-Zyklus gebildeten S-Adenosylmethionin (SAM) über 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC; katalysiert durch ACC-Synthase), welches durch ACC-Oxidase zu Ethylen umgewandelt wird (Johnson & Ecker, 1998). Sowohl ACC-Synthase als auch die ACC-Oxidase sind durch Ozon regulierte Enzyme (Tuomainen *et al.*, 1997).

Salizylsäure spielt nicht nur bei der Abwehr von Pathogenen eine wichtige Rolle. Auch nach Ozonexposition wird Salizylsäure akkumuliert. Im Vergleich zweier *Arabidopsis thaliana* Ökotypen bildet der empfindlichere (Cvi-0) deutlich mehr Salizylsäure als der ozontolerante Ökotyp (Col-0) (Rao & Davis, 1999).

Während der durch Ozon ausgelösten Läsionenbildung sind Ethylen und Salizylsäure notwendig, um sichtbare Läsionen auszulösen. Jasmonsäure hingegen vermittelt Fortschreiten bzw. Einschränkung der Läsionenausbreitung (Overmyer *et al.*, 2003).

## 1.2 Jasmonate als pflanzliche Signalstoffe und deren Biosynthese

Wie bereits in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, spielen Jasmonate (Jasmonsäure und ihre Derivate) eine wichtige Rolle bei der Reaktion der Pflanze auf Stress, der z.B. bei Befall durch Phytopathogene oder durch Applikation von Ozon entsteht.

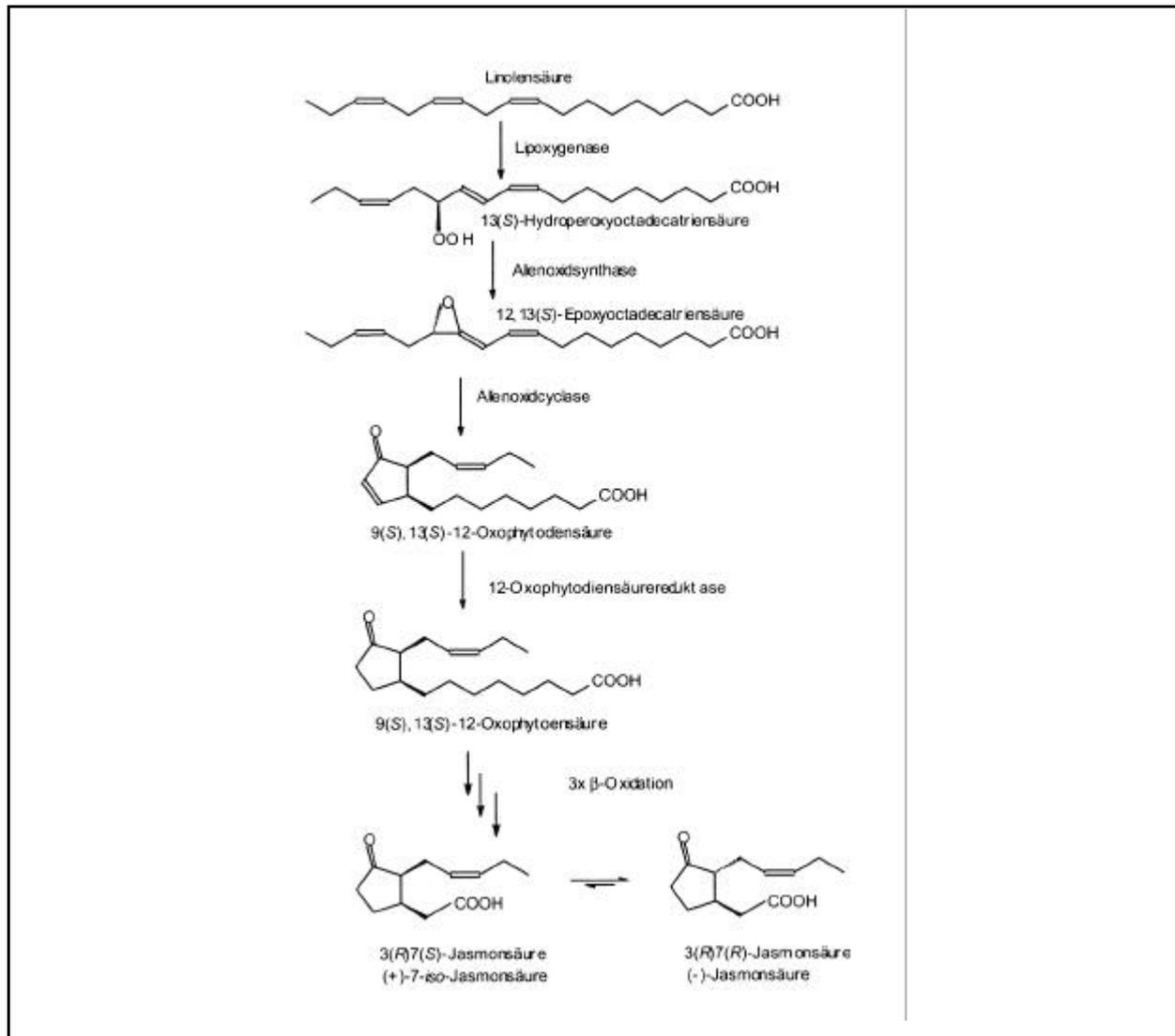
Jasmonate bilden eine eigene Klasse von Phytohormonen. Wie alle Phytohormone sind auch Jasmonate ubiquitär im Pflanzenreich verbreitet (Meyer *et al.*, 1984).

Der Methyl ester der Jasmonsäure, das Methyljasmonat (MeJA), wurde bereits 1962 von Demole *et al.* als Hauptkomponente des ätherischen Öls von *Jasminum grandiflorum* L. isoliert.

Die Biosynthese der Jasmonsäure wurde 1984 von Vick & Zimmermann aufgeklärt (Abb. 1.1). Eingebettet im pflanzlichen Oxylipinstoffwechsel dient als Ausgangssubstrat die Linolensäure, die durch eine Lipoxigenase (LOX) zur 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure umgewandelt wird. Durch die Allenoxidsynthase (AOS) wird dann das Allenoxid, die 12,13-Epoxyoctadecatriensäure gebildet. Im nächsten Schritt wird diese von einer Allenoxidcyclase (AOC) zu 12-Oxophytodiensäure zyklisiert. Anschließend katalysiert die 12-Oxophytodiensäurereduktase (OPR) die Reduktion der ringständigen Doppelbindung unter Bildung von 12-Oxophytoensäure. Nach drei terminalen  $\beta$ -Oxidations-schritten an der Carboxylseitenkette entsteht die (+)-7-iso-Jasmonsäure, die im Gleichgewicht mit der isomeren (-)-Jasmonsäure steht.

Die Wirkungen von Jasmonaten in der Pflanze sind sehr vielfältig. Im allgemeinen werden nach der Applikation hemmende Effekte auf das Keimlings- und Wurzelwachstum sowie auf die Samenkeimung beobachtet. Es gibt aber auch Prozesse, die durch Jasmonate unterstützt werden, wie Fruchtreife, Seneszenz, Knollenbildung, Rankenwindung und Pollenbildung (Creelman & Mullet, 1997).

Ähnliche Effekte wie die Jasmonate, insbesondere MeJA (Herrmann *et al.*, 1987) zeigt auch die Biosynthesevorstufe 12-Oxophytodiensäure (OPDA) (Weiler *et al.*, 1993) oder das bakterielle Phytotoxin Coronatin (Feys *et al.*, 1994; Weiler *et al.*, 1994; Benedetti *et al.*, 1995 & 1998).



**Abbildung 1.1:** Jasmonsäure-Biosynthese ausgehend von der Linolensäure (nach Hamberg & Gardner, 1992)

### 1.3 *Arabidopsis thaliana* Mutanten mit Veränderungen der JA-Biosynthese und JA-Signaltransduktion

Für die Untersuchung verschiedener Signaltransduktionswege, einschließlich der Jasmonatsignaltransduktion erwiesen sich *Arabidopsis thaliana* Mutanten als wertvolles "Werkzeug".

Die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. gilt als das herausragende Untersuchungsobjekt für Pflanzenforscher auf der ganzen Welt. Diese Blütenpflanze, die zu den Brassicaceae gehört, wurde im 16. Jahrhundert vom Arzt Johannes Thal entdeckt und beschrieben. Bereits 1943 entdeckte der Frankfurter Botaniker Friedrich Laibach das Potential der Ackerschmalwand als genetischer Modell-

organismus. *A. thaliana* wird im Zustand der Samenreife, den sie nach einer Generationsdauer von etwa sechs Wochen erreicht, ca. 30 cm hoch. An der Basis bildet sie eine Rosette aus. Die Infloreszenz besteht aus ca. 200 Blüten. Normalerweise geht aus jeder Blüte nach Selbstung eine Schote hervor. Eine Pflanze bringt bis zu 10.000 Samen hervor. Die Pflanze ist sowohl in Erde als auch auf künstlichen Medien kultivierbar und kann wegen ihrer leicht zugänglichen Blüten relativ einfach gekreuzt werden. Das Genom von *A. thaliana* ist auf nur fünf Chromosomen lokalisiert. Mit ungefähr 125 Mb besitzt die Ackerschmalwand ein für Pflanzen kleines Genom. Die Sequenzierung des Genoms im Jahre 2000 führte zu einem Quantensprung in der *Arabidopsis*-Forschung. All diese Besonderheiten prädestinieren *A. thaliana* als Modellpflanze für die molekulare Genetik.

Für die Untersuchung von jasmonatregulierten Prozessen wurden in letzter Zeit immer häufiger *A. thaliana* Mutanten mit Störungen in der JA-Biosynthese, JA-Perzeption oder JA-Signaltransduktion genutzt (Berger, 2002, Devoto & Turner, 2003).

Jasmonat-Biosynthese-Mutanten sind nicht mehr in der Lage, Jasmonsäure oder ihre Vorstufen zu synthetisieren. Alle bisher bekannten JA-Biosynthese-Mutanten sind männlich steril bzw. weisen eine stark reduzierte Fertilität auf (Tab.1.1), wobei die Sterilität durch exogene Applikation von Jasmonaten überwunden werden kann.

Die jasmonatdefizienten *fad3-2fad7-1fad8* Mutanten ("*triple fad*") enthalten nur geringfügige Mengen an dreifach ungesättigten C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>- Fettsäuren und sind somit nicht in der Lage, ausreichende Mengen an Jasmonsäure zu bilden (McConn & Browse, 1996).

Eine weitere Biosynthese-Mutante *opr3* bildet zwar noch OPDA, aber da das Gen, das die OPDA-Reduktase kodiert, mutiert ist, können diese Pflanzen keine Jasmonsäure synthetisieren (Stintzi & Browse, 2000). Die männliche Sterilität dieser Mutante kann demzufolge nur durch die Applikation von Jasmonaten, nicht jedoch durch Zugabe von OPDA aufgehoben werden.

Reduzierte Fertilität zeigt die Mutante *aim1* (*abnormal inflorescence meristem1*), bei der möglicherweise eine Störung der  $\beta$ -Oxidationsschritte in der Jasmonatbiosynthese vorliegt (Richmond & Bleecker, 1999).

Neben den jasmonatdefizienten Mutanten sind inzwischen einige jasmonatinsensitive Mutanten bekannt und teilweise gut charakterisiert. Diese Mutanten zeichnen sich durch eine reduzierte Hemmung des Wurzelwachstums unter Einfluss von Methyljasmonat und/oder Coronatin und durch eine Änderung in der Aktivierung jasmonatregulierter Gene im Vergleich zu Wildtyppflanzen aus. Auch unter diesen

Mutanten gibt es einige, die sich durch männliche Sterilität oder reduzierte Fertilität auszeichnen (Tab.1.1.). Anders als bei den Biosynthese-Mutanten lässt sich die männliche Sterilität bei jasmonatinsensitiven Mutanten nicht durch die Applikation von Jasmonaten aufheben.

Da Jasmonate bei der Pathogenabwehr der Pflanze eine entscheidende Rolle spielen, wurden zahlreiche JA-Biosynthese- und JA-Signaltransduktionsmutanten hinsichtlich ihrer Reaktion auf Phytopathogene untersucht (Tab.1.1).

So zeigen "*triple fad*" Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den Pathogenen *Pythium mastophorum* und *Pythium irregulare* (Vijayan *et al.*, 1998; Staswick *et al.*, 1998). Die beobachtete erhöhte Sensitivität gegenüber Insektenbefall (*Bradysia impatiens*) kann durch exogene Applikation von JA aufgehoben werden (McConn *et al.*, 1997).

Im Gegensatz zu den "*triple fad*" Mutanten zeigen *opr3*-Pflanzen keine erhöhte Sensitivität gegenüber *Bradysia impatiens* und *Alternaria brassicicola* (Stintzi *et al.*, 2001).

Die Mutante *coi1* (*coronatine-insensitive*) wurde aufgrund ihrer Insensitivität gegenüber dem Toxin Coronatin (aus *Pseudomonas syringae*) selektiert (Feys *et al.*, 1994). Als Ort der *coi1*-Mutation wurde ein Gen kloniert, das für ein leucinreiches Protein mit einer F-Box-Domäne codiert (Xie *et al.*, 1998). Gegenüber dem bakteriellen Phytopathogen *Pseudomonas syringae* zeichnet sich *coi1* durch eine erhöhte Resistenz aus (Feys *et al.*, 1994). Bei der Infektion mit nekrotrophen Pathogenen, wie *Pythium mastophorum*, *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* findet man hingegen eine erhöhte Suszeptibilität (Vijayan *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998). Die Empfindlichkeit gegenüber dem biotrophen Pilz *Peronospora parasitica* unterscheidet sich jedoch nicht vom Wildtyp.

Umfangreiche Untersuchungen zur Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen liegen für die Mutante *cev1* ("*constitutive expression of VSP1*") vor, deren durch Jasmonate regulierte Signaltransduktionskette konstitutiv aktiv ist (Ellis & Turner, 2001). Diese Mutante zeigt eine erhöhte Resistenz gegenüber dem biotrophen Pilz *Erysiphe cichoracearum*, dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* und der Blattlaus *Bradysia impatiens* (Ellis *et al.*, 2002).

Wie in *cev1* werden auch in der Mutante *cex1* jasmonatregulierte Gene, wie *Vsp*, *Pdf1.2*, *Thi2.1* konstitutiv exprimiert (Ellis & Turner, 2001; Xu *et al.*, 2001).

Für die jasmonatinsensitiven Mutanten *jin1* und *jin4*, deren Charakterisierung Gegenstand dieser Arbeit ist, wurden Untersuchungen zur Sensitivität gegenüber anderen Phytohormonen und zur Expression von jasmonatresponsiven Genen durch Berger *et al.* (1996) durchgeführt.

Gen		männliche Fertilität	Sensitivität gegenüber nekrotropen Pathogenen	Sensitivität gegenüber virulenten Bakterien	Sensitivität gegenüber biotrophen Pilzen	Sensitivität gegenüber Insekten	Ozon-sensitivität	Referenz
<b>JA-Biosynthese-Mutanten</b>								
<i>fad3-2fad7-1fad8</i> ("triple fad")	<i>FAD3</i> , 7, 8 Fettsäure-Desaturase	Steril	erhöht			erhöht	erhöht	Browse <i>et al.</i> , 1993 McConn <i>et al.</i> , 1994 McConn & Browse, 1996
<i>opr3 / dde1</i>	<i>OPR3</i> 12-oxophytodien-säurereduktase	steril	reduziert			reduziert		Sanders <i>et al.</i> , 2000 Stinzi & Browse, 2000 Stinzi <i>et al.</i> , 2001
<i>aim1</i>		reduziert						Richmond & Bleecker, 1999
<i>dad1</i>	<i>DAD1</i> Chloroplasten-Phospholipase A1	steril						Ishiguro <i>et al.</i> , 2001
<i>dde2</i>	AOS Allenoxidsynthase	steril						von Malek <i>et al.</i> , 2002
<i>aos</i>	<i>CYP74A</i> Cytochrom P450, AOS	steril						Park <i>et al.</i> , 2002
<b>Signaltransduktions/Perzeptions-Mutanten</b>								
<i>jin1</i>		fertil				wie Wildtyp		Berger <i>et al.</i> , 1996
<i>jin4 / jar1</i>	JA-Adenylase	fertil	erhöht			wie Wildtyp	erhöht	Staswick <i>et al.</i> , 1992, Berger <i>et al.</i> , 1996
<i>coi1</i>	<i>COI1</i> F-Box-LRR	steril	erhöht	reduziert	wie Wildtyp	erhöht	erhöht	Feys <i>et al.</i> , 1994 Xie <i>et al.</i> , 1998 Kloek <i>et al.</i> , 2001 Ellis <i>et al.</i> , 2002
<i>mpk4</i>	<i>MPK4</i> Mitogen-aktivierte Proteinkinase	reduziert		reduziert	reduziert			Petersen <i>et al.</i> , 2000
<i>axr1-24</i>	<i>AXR1</i> Nedd8/RUB1 aktivierende Enzym- Untereinheit	reduziert	erhöht					Leyser <i>et al.</i> , 1993 Tiryaki & Staswick, 2002
<i>cev1</i>	<i>AtCesA3</i> Zellulosesynthase	fertil		reduziert	reduziert	reduziert		Ellis & Turner, 2001 Ellis <i>et al.</i> , 2002
<i>cet1 bis cet9</i>		fertil						Hilpert <i>et al.</i> , 2001
<i>cex1</i>		fertil, aber keine Samen						Xu <i>et al.</i> , 2001
<i>cas1</i>								Kubigsteltig & Weiler, 2003
<i>joe1 und joe2</i>								Jensen <i>et al.</i> , 2002
<i>jue1 und jue2</i>								Jensen <i>et al.</i> , 2002

**Tabelle 1.1:** Übersicht über bekannte *A. thaliana* Mutanten in der JA-Biosynthese, JA-Perzeption und JA-Signaltransduktion und deren Phänotypen.

*jin4* (*jasmonate-insensitive*), die zu der Mutante *jar1* (*jasmonate-resistent*) allel ist, zeigt eine reduzierte Hemmung des Wurzelwachstums in jasmonathaltigem Medium und ist fertil. Abscisinsäure hemmt die Keimung von *jar1* (Staswick *et al.*, 1992) und *jin4* (Berger *et al.*, 1996) stärker als in den entsprechenden Wildtypen. In *jar1* liegt eine Mutation in einem Gen vor, das eine Jasmonatadenylase kodiert (Staswick *et al.*, 2002).

*jin1* (*jasmonate-insensitive1*) wurde durch Bestrahlung des *Arabidopsis thaliana* - Wildtyps Col-gl1 (WtC) mit Röntgenstrahlen erzeugt. Die Selektion der Mutante erfolgte in der M<sub>2</sub>-Generation auf MeJA-haltigem MS-Medium. Während das Wurzelwachstum im Wildtyp durch Methyljasmonat gehemmt wurde, zeigten sich *jin1*-Pflanzen unempfindlich gegenüber dieser Substanz (Tab.1.1). Die Selektion von *jin4* erfolgte nach dem selben Prinzip. Allerdings wurde eine T-DNA-Insertions-

sammlung (stock no. 3115) vom *Arabidopsis* Biological Resource Center an der Ohio State University durchsucht. Die *jin4* Mutante hat als genetischen Hintergrund den *A. thaliana* - Wildtyp Wassilewskija (WS).

MeJA ( $\mu\text{M}$ )	Wurzellänge(mm)			
	WtC	<i>jin1</i>	WS	<i>jin4</i>
0	45,9 $\pm$ 5,4	39,0 $\pm$ 8,4	44,4 $\pm$ 6,2	46,0 $\pm$ 3,7
10	8,0 $\pm$ 3,0	16,4 $\pm$ 5,6	9,7 $\pm$ 2,5	24,9 $\pm$ 5,1
100	3,8 $\pm$ 1,3	8,1 $\pm$ 2,3	5,2 $\pm$ 1,8	8,7 $\pm$ 2,6

**Tabelle 1.2:** Hemmung des Wurzelwachstums durch MeJA. Die Wurzeln von *jin1* sind auf 10 bzw. 100 $\mu\text{M}$  MeJA ca. 2mal länger als in WtC. *jin4* hat auf 10 $\mu\text{M}$  MeJA etwa 2,5fach und auf 100 $\mu\text{M}$  MeJA ca. 1,6fach längere Wurzeln als der Wildtyp WS. (aus Berger *et al.*, 1996)

Berger *et al.* (1996) untersuchten weiterhin die Sensitivität von *jin1* und *jin4* gegenüber anderen Phytohormonen. Die Samenkeimung beider Mutanten wurde durch ABA gehemmt. Dabei erwies sich *jin4* doppelt so empfindlich gegenüber ABA wie *jin1* und die Wildtypen. Die hemmende Wirkung von Ethylen auf das Wachstum des Hypokotyls war in beiden Mutanten identisch, und es zeigten sich keine Unterschiede im Vergleich zu den korrespondierenden Wildtyppflanzen.

Ferner wurde bereits die Aktivierbarkeit verschiedener jasmonatresponsiver Gene (*AtVsp*, *AtLox1*, *AtLox2*, *AtPal1*) in Wurzeln bzw. in Blättern beider Mutanten untersucht. *AtVsp* kodiert ein Protein, das homolog zu *VSP A* und *VSP B* der Sojabohne ist. Die Akkumulation von *AtVSP*-mRNA steigt in Blättern und Wurzeln nach Behandlung der Keimlinge mit MeJA an (Berger *et al.*, 1995). In Wurzeln von *jin1* und *jin4* zeigten sich nach Applikation von MeJA keine Unterschiede in der Expression von *AtVSP* im Vergleich zu den Wildtypen WtC und WS. In Blättern allerdings war *AtVSP* in WtC und WS nach Applikation von MeJA stärker exprimiert als in den Mutanten.

*Lox1* und *Lox2* kodieren Lipoxigenasen und sind ebenfalls durch MeJA induzierbar. Während *LOX1* vor allem in Wurzeln exprimiert wird (Melan *et al.*, 1993), findet man *LOX2* hauptsächlich in Blättern (Bell & Mullet, 1993). Die Expression von *LOX1* nach MeJA-Behandlung war in Wurzeln von *jin1* und *jin4* unverändert verglichen mit den korrespondierenden Wildtypen. Auch für die Expression von *LOX2* nach MeJA-Applikation zeigte sich in Blättern dasselbe Expressionsmuster in Wildtypen und Mutanten.

Weiterhin wurde die Expression von *PAL1* untersucht, von dem bekannt ist, dass es in anderen Pflanzenarten durch Jasmonate induziert werden kann (Gundlach *et al.*,

1992). Eine schwache Induktion durch MeJA konnte auch in *jin1* und *jin4* nachgewiesen werden, die sich allerdings nicht von der Expression in den entsprechenden Wildtypen unterschied.

Untersuchungen auf Proteinebene zeigten, dass das Expressionsmuster von *AtVSP*-mRNA mit der gebildeten Proteinmenge korreliert. Verglichen mit den Wildtypen wurde in Blättern der Mutanten *jin1* und *jin4* nach MeJA-Applikation deutlich weniger *AtVSP*-mRNA und dementsprechend weniger Protein gebildet.

Berger *et al.* (1996) prüften außerdem die Expression von *AtLOX2* und *AtVSP*, die durch Verwundung induziert werden können. Nach Verwundung von Blättern konnte eine starke Induktion von *AtVSP* in WtC und *jin1* nachgewiesen werden. In *jin4* dagegen fiel das Signal deutlich schwächer aus als im entsprechenden Wildtyp WS. *AtLOX2* wurde sowohl in den Mutanten als auch in den Wildtypen nach Verwundung stark exprimiert.

## **1.4 Kartierung von Mutationen**

Das Genom von *A. thaliana* besteht aus etwa 125 Millionen Basenpaaren und kodiert für ca. 25000 Proteine (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Die Gene werden funktionell durch ihre mutanten Phänotypen charakterisiert. Prinzipiell werden zwei Wege unterschieden: die "Vorwärtsgenetik" und die "Rückwärtsgenetik". Bei der "Rückwärtsgenetik" wird eine bekannte DNA-Sequenz durch Mutation auf ihre biologische Funktion überprüft (T-DNA-Insertionslinien).

Bei der "Vorwärtsgenetik" werden zunächst Mutanten isoliert, von denen das betroffene Gen isoliert und charakterisiert wird. Diese Strategie wurde in der vorliegenden Arbeit zur Kartierung der *jin1* Mutante genutzt. Das kartierungsgestützte Klonieren ("*map-based cloning*") eines Gens erfordert zwei Voraussetzungen. Zum einen müssen molekulare Marker vorhanden sein mit denen die Mutation kartiert werden kann und zum anderen muss eine genomische DNA-Bibliothek existieren, aus der überlappende DNA-Fragmente aus der Region des zu isolierenden Gens zu einem zusammenhängenden DNA-Abschnitt ("*contig*") zusammengefügt werden können.

### 1.4.1 Molekulare Marker

Als molekulare Marker können DNA-Polymorphismen genutzt werden, die sich zwischen Individuen oder Populationen unterscheiden und an homologen Stellen im Genom vorkommen.

Beim RFLP (Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus) unterscheiden sich homologe DNA-Abschnitte (Allele) im Abstand zwischen zwei Schnittstellen oder im Vorkommen einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Durch einen Restriktionsverdau entstehen verschieden lange DNA-Fragmente.

Bei CAPS ("*cleaved amplified polymorphic sequence*") Markern unterscheiden sich homologe DNA-Abschnitte mit bekannter Sequenz im Vorkommen einer Schnittstelle für ein Restriktionsenzym. Nach PCR-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern werden die PCR-Produkte mit einem Restriktionsenzym verdaut, wodurch unterschiedliche Fragmente entstehen.

Eine andere Klasse von Markern sind die SSLP- ("*simple sequence length polymorphism*") oder Mikrosatellitenmarker. Mittels sequenzspezifischer Primer werden unterschiedlich lange Wiederholungen repetitiver Sequenzen (Dinukleotidwiederholungen, "*tandem repeat*"), z.B. (CA)<sub>n</sub> von genomischer DNA amplifiziert.

Bei den SNP- Markern ("*single nucleotide polymorphism*", Einzelnukleotidpolymorphismus) findet man Unterschiede (Polymorphismen) von einzelnen Basen innerhalb eines Genoms bei verschiedenen Individuen.

#### 1.4.2 Meiotische Rekombinationskartierung

Die meiotische Rekombinationskartierung folgt dem gleichen Prinzip wie die "klassische" Rekombinationsanalyse, bei der zwei Mutationen gegeneinander kartiert werden. Wichtig für die Genkartierung mit molekularen Markern ist, dass sich die mutanten Pflanzen von den Wildtyp-Pflanzen in der DNA-Sequenz hinreichend unterscheiden. Bei *Arabidopsis* verwendet man für die molekulare Genkartierung sogenannte Ökotypen. Das sind Linien verschiedener geographischer Herkunft, die sich in ca. 1% der Nukleotidsequenzen unterscheiden. Die am häufigsten verwendeten Ökotypen sind Columbia (Col) und Landsberg *erecta* (Ler).

## 1.5 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Als Modellpflanze bietet *Arabidopsis thaliana* die Möglichkeit, verschiedene Signaltransduktionswege mit Hilfe von Mutanten zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit sollte die durch Jasmonate vermittelte Signaltransduktion untersucht werden. Die Mutanten *jin1* und *jin4* zeichnen sich durch eine verringerte Sensitivität gegenüber Jasmonaten aus, sind aber in der Jasmonatbiosynthese nicht gestört. Da Jasmonsäure eine entscheidende Rolle in den Abwehrreaktionen der Pflanze spielt (Vijayan *et al.*, 1998), sollten diese Mutanten hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber dem phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* charakterisiert werden. Dies sollte zum einen über die Bestimmung des Bakterienwachstums in der Pflanze zum anderen über die Expression verschiedener Abwehrgene erfolgen.

Jasmonsäure ist aber auch an der Signaltransduktion nach Ozonstress beteiligt. In Tabak wurde gezeigt, dass vor Ozonbehandlung applizierte Jasmonsäure die Pflanzen sogar bei hohen Ozonkonzentrationen vor Nekrosen schützt (Örvar *et al.*, 1997). Im Rahmen eines DAAD-Austauschprogramms mit der Universität Helsinki (Institute of Biotechnology) sollte die Reaktion von *jin1*, *jin4* und weiteren in verschiedenen Signaltransduktionswegen betroffenen Mutanten (*ein2*, *rcd1*) auf Ozonstress untersucht werden. Die Untersuchung von Doppelmutanten sollte Hinweise auf die Verknüpfung der in diesen Mutanten betroffenen Signaltransduktionswege mit den Wirkungen von Ozon geben.

Ziel dieser Arbeit war weiterhin die Isolierung des in *jin1* mutierten Gens, um ein Element der Jasmonat-Signaltransduktionskette zu isolieren. Da das *Jin1* Genprodukt nicht bekannt ist, sollte die Kartierung über das "map-based cloning" erfolgen, das keine Informationen über das Protein erfordert. Nach der Sequenzierung von *jin1* sollte der mutante Phänotyp durch ein Wildtyp-Allel komplementiert werden.

In Northern Blot-Analysen sollten ferner die zeitlichen und räumlichen Expressionsmuster des in *jin1* mutierten Gens sowie dessen Induzierbarkeit durch Jasmonate, andere Phytohormone und durch Verwundung untersucht werden.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Verwendete Materialien**

#### 2.1.1 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Sigma (München), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs, Schweiz), Invitrogen (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Roche (Mannheim), Amersham Bioscience (Freiburg) und Merck (Darmstadt) bestellt.

Die für molekularbiologische Arbeiten notwendigen Enzyme wurden von MBI Fermentas (St. Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Promega (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe) oder Roche (Mannheim) bezogen.

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

#### 2.1.2 Geräte

Soweit nicht gesondert angegeben, kamen folgende Geräte zum Einsatz:

Autoklav	Varioklav® Dampfsterilisator Typ 400 und Typ 500 (H+P Laborservice, Oberschleißheim)
Elektrophoresekammern	Horizon™ (Life Technologies, Karlsruhe)
Hybridisierungsinkubator	7602 (GFL, Burgwedel)
Inkubationsschüttler	Unitron, HT (Infors, Schweiz)
Laborschüttler	KS 250basic (IKA Labortechnik, Staufen)
Netzgerät	Elektrophoresis Powersupply PHERO-stab. 500 (Biotec-Fischer, Reiskirchen)
pH-Meter	pH 526 (WTW, Weilheim)
Phosphor Imager	Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale CA, USA)
Photometer	RNA/DNA Calculator GeneQuant (Pharmacia, Freiburg) UltrospecIII LKB (Pharmacia, Freiburg)
Schüttelinkubator	3032 (GFL, Burgwedel)
Vakuumtrockner	SpeedVac SC100 (Savant, Instruments, Farmingdale, NY, USA)
Thermomixer	5436 (Eppendorf, Hamburg)

Transilluminator	UVT 2020 (302 nm) (Herolab GmbH Laborgeräte, Wiesloch)
Vortex	Genie 2 (Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz)
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5403 (Eppendorf, Hamburg) Centrifuge 5810 R (Eppendorf, Hamburg) Avanti™J-25 Centrifuge (Beckmann, München)
Wasserbad	Schüttelwasserbad GFL 1083 (GFL, Burgwedel)

### 2.1.3 Software und Websites

#### 2.1.3.1 Software

Adobe Photoshop 6.0

CorelDraw 10

Microsoft Excel, Microsoft Corporation

Microsoft Powerpoint, Microsoft Corporation

Microsoft Word, Microsoft Corporation

BioEdit sequence alignment editor

#### 2.1.3.2 Websites

<http://www.arabidopsis.org>

<http://www.arabidopsis.org/Cereon/index.jsp>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://mips.gsf.de>

### 2.1.4 Antibiotika

Amp      Ampicillin

Gent      Gentamycin

Kan      Kanamycin

Rif      Rifampicin

Spec      Spectinomycin

Tet      Tetracyclin

Alle Antibiotika wurden von Sigma (München) bezogen.

### 2.1.5 Radiochemikalien

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP, 3000Ci/mmol                      ICN, Eschwege

### 2.1.6 Molekularbiologische „Kit“ Systeme

Megaprime DNA-labelling Kit	Amersham Pharmacia, Freiberg
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAEX®II Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.7 Enzyme

<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega, Mannheim (3 units pro $\mu$ l)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe (5 units pro $\mu$ l)
T4 DNA Ligase	Promega, Mannheim (1-3 units pro $\mu$ l)

### 2.1.8 Restriktionsenzyme

*Pst* I, *Bam* HI, *Bsp*HI, *Eco* RI, *Hind* III, *Kpn* I, *Nco* I, *Not* I, *Sal* I, *Sca* I, *Xba*I, *Xcm* I, *Eco* 72I, *Eco* RII, *Eco* 31I

Alle Restriktionsenzyme wurden bei Roche (Mannheim), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) oder New England Biolabs (Frankfurt/Main) bestellt und mit den entsprechenden Puffern verwendet.

## **2.2 Gängige Lösungen, Puffer und Medien**

Alle Lösungen, Puffer und Medien wurden mit Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) hergestellt.

### 2.2.1 Herstellung häufig verwendeter Medien

Alle Angaben beziehen sich auf 1 Liter Gesamtvolumen.

Medium	Zusammensetzung und Herstellung
LB-Medium	10g Trypton, 5g Hefe-Extrakt, 10g NaCl, pH 7,0, autoklavieren
King's B-Medium (KB) (King <i>et al.</i> , 1954)	20g Glycerin, 40g Proteose Pepton No. 3, autoklavieren, nach Abkühlen Zugabe von 10ml 10% $K_2HPO_4$ (w/v) (sterilfiltriert), 10ml 10% $MgSO_4$ (sterilfiltriert) und 50 $\mu$ g/ml Rif
MS-Medium (Muraishige & Skoog, 1962)	4g MS-Salz 5519 (Sigma, München), 10g Saccharose, 0,5g MES, pH=5,7 (KOH), autoklavieren

Für LB- und KB-Platten wurden dem entsprechenden Medium jeweils 15g Agar/Liter und für MS-Platten 8g Phytigel/Liter (Sigma, München) zugesetzt.

Für Selektionsmedien und -platten wurde das entsprechende Antibiotikum nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 50°C zugegeben (Amp 50mg/l, Kan 50mg/l, Tet 12,5 mg/l, Gent 10mg/l, Rif 50 bzw. 100mg/l). Für die Selektion des jasmonatensensitiven Phänotyps wurde das MS-Medium nach dem Abkühlen mit 10  $\mu$ M Methyljasmonat (NIPPON ZEON, Tokyo, Japan) versetzt.

### 2.2.2 Herstellung häufig verwendeter Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung und Herstellung
5xDNA-Stop	20mM Tris-HCl pH 8,0 120mM EDTA 50% Glycerin 0,1% Bromphenolblau (w/v)
10xRNA-Stop	1mM EDTA 50% Glycerin 0,25% Bromphenolblau (w/v)
20xSSC	3M NaCl 0,3M $Na_3$ Citrat pH 7,0
10xTAE	0,4M Tris-HCl, 0,2M Natriumacetat 10mM EDTA, pH 8,2
1xTBE	89mM Tris-Borat 2mM EDTA pH 8,0 pH=8,3
1xTE	10mM Tris-HCl 1mM EDTA pH 8,0
10xMOPS	0,4M MOPS (pH 7,0) (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) 0,1M Natriumacetat 10mM EDTA (pH 8,0)

## 2.3 Verwendete Organismen

### 2.3.1 Pflanzen

*A. thaliana* L.

Ökotypen: Columbia (Col-gl1) WtC

Landsberg *erecta* (Ler)

Wassilewskija (WS)

Mutanten: *jin1* (Berger *et al.*, 1996)

*jin4* (Berger *et al.*, 1996)

*rcd1* (Overmyer *et al.*, 2000)

*coi1* (Feys *et al.*, 1994)

*ein2* (Alonso *et al.*, 1999)

*cpr5* (Boch *et al.*, 1998)

### 2.3.2 Bakterien

*Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz & Schell, 1986)

*Pseudomonas syringae*:

- *P. syringae* pv. *tomato* DC3000
- *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1*
- *P. syringae* pv. *maculicola* *avrRpm1* (*Psm M2*) (Debener *et al.*, 1991)
- *P. syringae* pv. *maculicola* CR299 (Ritter & Dangl, 1995)

*Escherichia coli*

Stamm	Genotyp
DH5a	supE44 .lacU169 (F80 lacI q Z .? 15)hsdR17 recA1 end A1 gyr A96 thi-1 rel A1
One Shot TOP10 (In-vitrogen, Karlsruhe)	F - mcrA .(mrr-hsdRMS-mcrBC) f 80 lacZ .M15 lacZX74 deoR araD139 .(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str r ) endA1 nupG

## 2.4 Pflanzenanzucht und Stressbehandlung

### 2.4.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte bei 23°C und einer Lichtstärke von ca. 250µmol/m²s in Klimaschränken bzw. in klimatisierten Phytokammern (Percival

Scientific, bezogen über CLF Laborgeräte, Emersacker). Für vegetatives Wachstum wurden die Pflanzen unter Kurztagsbedingungen (8h Tag, 16h Nacht), für generatives Wachstum unter Langtagsbedingungen (16h Tag, 8h Nacht) kultiviert.

Das Kultursubstrat bestand aus einem Gemisch aus Erde und Vermiculite (2-3mm Körnung, Marmullar, Witten).

### 2.4.2 Sterilisation von *A. thaliana* Samen

Für die *in vitro* Anzucht von *Arabidopsis* Pflanzen wurden die Samen für zwei Minuten mit 70%igem Ethanol behandelt und anschließend 10 Minuten in einer Natriumhypochloridlösung (ca. 5% aktives Chlor, 0,15% Tween® 20) leicht geschüttelt. Danach wurden die Samen viermal mit sterilem Wasser gewaschen.

### 2.4.3 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana*

Die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *A. thaliana* erfolgte nach der Blütentauchmethode (*floral dip*) (Clough & Bent, 1998). Dafür wurden zunächst 500ml LB-Medium (mit Kan, Rif, Gent) mit einer 50ml Agrobakterien-Übernachtskultur angeimpft und erneut über Nacht bei 28°C kultiviert. Anschließend wurden die Agrobakterien abzentrifugiert (10min, 4000 x g) und das Bakterienpellet in 100ml 5%iger Saccharose-Lösung mit 0,05% Silwet L-77 aufgenommen. In diese Suspension wurden die Blütenstände und Blattrosetten von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen für einige Sekunden getaucht.

Die getauchten Pflanzen wurden mit Frischhaltefolie abgedeckt, für 24 Stunden dunkel gestellt und bis zum Reifen der Samen unter Langtagbedingungen kultiviert. Für die Selektion transgener Pflanzen mit dem BAR-Gen als Resistenzmarker wurden die Samen auf Erde ausgesät und die Pflanzen im Keimblattstadium mit einer 1:5000-Verdünnung des Herbizids Basta® (Hoechst Schering AgrEvo GmbH) besprüht. Falls erforderlich wurde die Behandlung im Abstand von 5-10 Tagen wiederholt, bis eine ausreichende Selektion der transgenen Pflanzen erkennbar war.

Die Kultur erfolgte bei 23°C unter Kurztagbedingungen.

### 2.4.4 Ozon-Experimente

#### 2.4.4.1 Ozon-Behandlung

Drei Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen wurden in Klimaschränken für 6 Stunden Ozonkonzentrationen von 250nl/l ausgesetzt. Das Ozon wurde durch einen Ozongenerator aus reinem Sauerstoff erzeugt und in die Klimaschränke geleitet. In den Klimaschränken wurde die Ozonkonzentration durch einen Ozonanalyzer (Dasibi 1008-RS, Amko Systems Inc., Ontario, Canada) kontrolliert (Pellinen *et al.*, 1999). Für Northern-Analysen wurden ganze Pflanzen (ohne Wurzel) 0, 6 und 24 Stunden nach der Ozonbehandlung geerntet.

#### 2.4.4.2 Quantifizierung des Zelltodes nach Ozonbehandlungen

##### *Visuelle Einschätzung der geschädigten Pflanzen*

Im unmittelbaren Anschluss an die Ozonbehandlung wurden die durch Ozon geschädigten Pflanzen sowie die Anzahl der geschädigten Blätter pro Pflanze gezählt. Die Zählung wurde nach 6 und 24 Stunden wiederholt.

##### *„Ion leakage“ (Ionendurchlässigkeit)*

Die Bestimmung des „Ion leakage“ erfolgte 2 Stunden nach Ende der Ozonbehandlung. Dafür wurden je drei Pflanzen (ohne Wurzel) in 15ml MilliQ-Wasser eine Stunde bei 250rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Leitfähigkeit in  $\mu\text{S}/\text{cm}$  gemessen, um die Konzentration ausgetretener Ionen zu bestimmen. Die selben Proben wurden nun 30 Minuten gekocht und eine weitere Stunde geschüttelt, bevor die Leitfähigkeit erneut gemessen wurde (Gesamtionen). Der „Ion leakage“ wird als % der Gesamtionen ausgedrückt.

### 2.4.5 Pathogenbehandlungen

#### 2.4.5.1 Anzucht von *Pseudomonas syringae*

Die Anzucht der *P. syringae*-Bakterien erfolgte in King's B-Medium mit den entsprechenden Antibiotika bei 28°C für 2 Tage. Zur Konservierung wurden die Stämme als Glycerinkultur bei - 80°C gelagert.

### 2.4.5.2 Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit *P. syringae*

Für Pflanzeninfektionen wurden *P. syringae* Bakterien aus einer 3ml Übernachtskultur in 50ml frisches Flüssigmedium überimpft und bis zu einer  $OD_{600nm}$  von 0,2 (entspricht  $10^8$  cfu/ml) wachsen gelassen. Anschließend wurde die Kultur abzentrifugiert ( $1000 \times g$ , 10 min) und in sterilem 10mM  $MgCl_2$  resuspendiert.

Für Wachstumskurven wurde eine Suspension  $5 \times 10^5$ cfu/ml verwendet. Die Inokulation der Pflanzen erfolgte von der Blattunterseite mit einer 1ml Spritze ohne Kanüle (in eine Fläche von 0,5cm im Durchmesser). Das Volumen pro Inokulation betrug etwa 10 $\mu$ l.

Für die Isolierung von RNA aus Blättern für spätere Northern-Analysen erfolgte die Inokulation mit einer Suspension von  $10^8$  cfu. Als Negativkontrolle wurde 10mM  $MgCl_2$  infiltriert.

### 2.4.5.3 Bestimmung der *Pseudomonas* Vermehrung in der Pflanze

Für Wachstumskurven wurden Blätter mit einer Bakteriensuspension von  $5 \times 10^5$  cfu infiltriert. Für jeden Zeitpunkt wurden je 2 Blattscheibchen von 3 verschiedenen Pflanzen mit einem Korkbohrer (Durchmesser: 0,7cm) ausgestanzt, je 2 Blattscheiben in einer Probe vereint und in 1ml steriler 10mM  $MgCl_2$  - Lösung gemörserst. Die Anzahl der Bakterien wurde 0, (12), 24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation bestimmt. Die aufgemörserteren Proben wurden in einer Verdünnungsreihe (1:10 bis 1:10000, in 1:10 Verdünnungsschritten) auf KB-Platten (mit den entsprechenden Antibiotika) ausplattiert. Nach 2 bis 3-tägiger Inkubation bei 28°C wurden die Kolonien gezählt.

## 2.4.6 Bestimmung des Chlorophyllgehalts in *Arabidopsis* Blättern

### 2.4.6.1 Aceton-Methode

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurden je acht Blätter in einer Probe vereint, mit 8ml 80%-igem Aceton versetzt und mit einem Stab zerkleinert. Der Ansatz wurde für mindestens 12 Stunden im Dunkeln inkubiert und einige Male geschüttelt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand bei 645nm und 663nm photometrisch vermessen.

Die Berechnung des Gesamtchlorophyllgehaltes erfolgte nach der Formel:

$$\text{Chl (mg/ml)} = \text{OD}_{645} \times 20,2 + \text{OD}_{663} \times 8,02$$

Da von den geernteten Blättern das Frischgewicht bestimmt wurde, konnte anschließend der Chlorophyllgehalt pro mg Frischgewicht errechnet werden.

#### 2.4.6.2 Bestimmung mittels SPAD-Analyser

Für die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde ein SPAD-Analyser (Soil Plant Analysis Development) der Firma Minolta/Hydro Agri, Dülmen verwendet, der die Transmissionen der Wellenlängen misst, die von Chlorophyllen absorbiert wird. Der Bestimmung des Chlorophyllgehaltes liegt eine Transmissionsmessung an intakten Blättern zugrunde (Heise, 2004).

Auf einer definierten Blattfläche konnte so der relative Chlorophyllgehalt bestimmt werden.

Für jede Bestimmung wurden 10 *Arabidopsis* Blätter vermessen.

#### 2.4.7 Flottieren von Pflanzen

Die Applikation von Phytohormonen (MeJA, ABA) erfolgte durch Flottieren von ganzen Pflanzen (ohne Wurzel) in wässrigen Lösungen in Klimaschränken. Zu definierten Zeitpunkten wurden Blätter geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung für Northern-Analysen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.5 Molekularbiologische Techniken

### 2.5.1 Verwendete Bakterienvektoren

Plasmid	wesentliche Merkmale	Wirt	Herkunft
pRT100	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp <sup>r</sup> , CaMV-35-S-Promotor und -Poly(A)-Signal	DH5a	(Töpfer <i>et al.</i> , 1987)
pCB302	RK2 ori, <i>npfII</i> , MCS1, MCS2, Tnos-Promotor - bar-Pnos-Terminator	DH5a	(Xiang <i>et al.</i> , 1999)
pCR®2.1	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , SP6 und T7-Promotor	INVaF' DH5a	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.5.2 Methoden zur Nukleinsäurechemie

#### 2.5.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Das aufzuarbeitende Bakteriensediment wurde hergestellt, indem zweimal 3ml LB-Medium (versetzt mit dem entsprechendem Antibiotikum) mit *E. coli* (aus einer Glycerin-Stammkultur bzw. von einer Selektionsplatte) angeimpft wurden. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C und 180rpm inkubiert. Beide Ansätze wurden vereint und für 3-4min bei 800 x g abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

Der Bakterienaufschluss erfolgt nach dem Prinzip der alkalischen Lyse. Durch die Bindung der dabei freigesetzten Plasmid-DNA an das Säulenmaterial wird eine Abtrennung der rekombinanten Plasmide von der chromosomalen Bakterien-DNA erreicht. Um die DNA zu eluieren wurde die Säule mit 50µl tridest. H<sub>2</sub>O versetzt, 60sec inkubiert und anschließend zentrifugiert.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Agrobakterien erfolgte nach dem gleichen Prinzip ebenfalls mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen. Hierbei wurde die isolierte Plasmid-DNA direkt für die Transformation kompetenter *E.coli* DH5a verwendet. Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte erst nach Rücktransformation in *E.coli* und anschließender Plasmid-Präparation.

#### 2.5.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA aus Pflanzengewebe (Quick DNA MiniPrep)

Die DNA-Minipräparation erfolgte nach Roger & Bendich (1988).

Von den zu untersuchenden Pflanzen wurde je ein Blatt abgeschnitten und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Aufarbeitung wurde das Pflanzenmaterial mit einem Glasstab zerkleinert und anschließend mit 200µl 2xCTAB-Puffer (2xCTAB-Puffer: 2% CTAB; 100mM Tris pH 8,0; 20mM EDTA pH 8,0; 1,4M NaCl; 1% PVP Mr 40000) vermischt.

Die Aufschlüsse wurden 0,5 bis 2h bei 65°C inkubiert, mit 200µl Chloroform vermischt und 5min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit 3 Volumen reinem EtOH vermischt und für 20min bei -20°C gefällt. Danach wurde bei 4°C und 17000 x g für 15min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 50µl TE gelöst.

Von den isolierten DNA-Lösungen wurden 1 bis 2µl für PCRs eingesetzt.

### 2.5.2.3 DNeasy Plant Kit

Eine weitere Möglichkeit der DNA-Isolierung war die Präparation mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Dafür wurden zwei bis drei Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren, gemörsert und anschließend nach dem Protokoll des Herstellers weiterbehandelt. Bei dieser Isolierung werden zuerst Proteine und Polysaccharide ausgefällt und durch Zentrifugieren über eine „QIAshredder“-Säule zurückgehalten. Die DNA wird dann unter hohen Salzkonzentrationen an eine Membran aus Silikagel gebunden und durch mehrere Waschschriffe von restlichen Protein-, Polysaccharid- und Salzanteilen befreit. Die Elution erfolgte in 50µl TE oder H<sub>2</sub>O.

Da im Kit auch RNaseA eingesetzt wird, ist gewährleistet, dass keine RNAs mitisoliert werden.

Von der erhaltenen DNA wurden je 1 bis 2µl für PCRs bzw. 10µl für inverse PCRs eingesetzt.

### 2.5.2.4 DNA-Isolation aus Blättern

Für Southern-Blot-Analysen wurde genomische DNA nach der folgenden Methode isoliert: In flüssigem Stickstoff gemörsertes Blattmaterial (2 bis 3 Blätter) wurde mit 1ml Extraktionspuffer (100mM Tris-HCl pH8, 50mM EDTA, 500mM NaCl, 1,5% SDS, 10mM 2-Mercaptoethanol, H<sub>2</sub>O) vermischt und 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 300µl 5M Kaliumacetat pH4,8 wurden die Proben 1h auf Eis gestellt und anschließend 10min bei 17000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde einer Phenol-Chloroform-Extraktion unterzogen. Nach der Phasentrennung (5min bei 15000 x g zentrifugieren) wurde die DNA mit Isopropanol aus der wässrigen Phase ausgefällt. Das erhaltene Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50µl TE+RNaseA (100µg/ml) gelöst.

### 2.5.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurde Trizol®-Reagent der Firma Invitrogen (Karlsruhe) verwendet und nach Herstellerangaben verfahren. Die Elution der RNA erfolgte in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O.

### 2.5.2.6 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA

Die Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen wurden spektroskopisch ermittelt. Dazu wurde die Extinktion der Lösungen bei 260nm bestimmt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand des Absorptionwertes bei 260nm auf der Grundlage, dass die  $OD_{260nm}$  1 beträgt, wenn RNA in einer Konzentration von 40 $\mu$ g/ml und DNA in einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml vorliegt.

### 2.5.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 0,8-bis 3%igen Agarosegelen (mit EtBr, Sigma) mit 1xTBE (bzw. 1xTAE) als Puffer bei ca. 3V/cm. Vor der Elektrophorese wurden die Proben mit 5xDNA-Stop versetzt.

Als Größenstandard wurde die GeneRuler™ 1kb-bzw. 50bp-DNA-Leiter (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen.

Nach dem Lauf wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und photographiert.

### 2.5.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (RNA)

Für die Auftrennung von RNA im Agarosegel wurden 8 bis 10 $\mu$ g RNA auf ein Volumen von 3,4 $\mu$ l eingestellt und mit 1,5 $\mu$ l 10xMOPS-Puffer, 1,5  $\mu$ l Formamid und 2,6 $\mu$ l Formaldehyd versetzt und 10min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben mit 1,7 $\mu$ l 10xRNA-Stop vermischt und auf 1%-ige Agarosegele (mit EtBr) aufgetragen. Als Laufpuffer diente 1xMOPS-Puffer. Nach dem Lauf (ca. 3h bei 70V) wurden die Gele unter UV-Licht betrachtet und photographiert.

### 2.5.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus 1- bzw. 1,5%igen Agarosegelen erfolgte unter Anwendung des QIAEX®II Gel Extraction Kit bzw. des QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die Isolierung erfolgte strikt nach Herstellerangaben. Für die Elution der DNA-Fragmente wurden 20 $\mu$ l tridest H<sub>2</sub>O eingesetzt.

### 2.5.2.10 Restriktionsverdau

Der Restriktionsansatz wurde so eingestellt, dass das Volumen der eingesetzten Enzymlösung 1/10 des Gesamtansatzes nicht überschreitet, um eine Inhibition

durch das im Lagerungspuffer der Enzyme befindliche Glycerin zu vermeiden. Pro  $\mu\text{g}$  zu spaltender DNA wurden 3 bis 5 units Enzym eingesetzt und die Reaktion in dem spezifischen Reaktionspuffer bei der für das Enzym optimalen Reaktionstemperatur durchgeführt.

Als Reaktionszeit wurden für die hier verwendeten Enzyme ein bis zwei Stunden (Plasmide) und über Nacht (genomische DNA) für den Verdau zugelassen.

### 2.5.2.11 Ligation

Bei einer Standardligation wurden Vektor und Insert im molaren Verhältnis 1:5 eingesetzt. Die in  $10\mu\text{l}$  Gesamtvolumen durchgeführte Ligation enthielt außer den beiden DNA-Fragmenten :

1  $\mu\text{l}$  10xLigase-Puffer (Promega, Mannheim)

0,5  $\mu\text{l}$  T4 DNA-Ligase (Promega, Mannheim)

Die Ligation erfolgte bei  $15^\circ\text{C}$  für 20 bis 24h.

### 2.5.3 Transfer-Techniken

#### 2.5.3.1 Northern Blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA mittels Kapillarblot auf eine Nylon-Membran (Roche, Mannheim) übertragen. Als Transferpuffer wurde 10xSSC genutzt. Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die RNA mit UV-Licht (Stratalinker™1800, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

#### 2.5.3.2 Southern Blot

Die mit Restriktionsenzymen verdaute genomische DNA wurde zunächst im Agarosegel aufgetrennt. Danach wurde das Gel 1 bis 2h in Denaturierungslösung (1,5M NaCl, 1M NaOH) und anschließend 2 mal 20min in Neutralisierungslösung (1,5M NaCl, 1M Tris-Cl, pH 7,0) gewaschen. Mittels Kapillartransfer wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (Roche Mannheim) überführt. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 20xSSC als Transferpuffer.

Bevor die kovalente Bindung der DNA an die Membran erfolgte (Stratalinker™1800, Stratagene, Heidelberg), wurde die Membran kurz in 2xSSC gespült.

### 2.5.4 Radioaktive Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten

Zum Nachweis von DNA und RNA in Hybridisierungsexperimenten wurden radioaktiv markierte Sonden mit Hilfe des „Megaprime DNA-labelling Kit“ der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) mit  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dATP nach der „random prime“-Methode hergestellt (Feinberg & Vogelstein, 1984). Dabei wurden pro Markierung 25ng cDNA eingesetzt. Die Vorgehensweise richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Nicht inkorporierte Radioaktivität wurde über Säulen („Probe QuantTMG-50“), ebenfalls von Amersham Pharmacia (Freiburg), entfernt.

#### 2.5.4.1 DNA-Hybridisierungsexperimente (Southern-Analysen)

Die radioaktiv markierte Sonde (Kap. 2.5.4) wurde nach der Denaturierung (5-10min bei 95-100°C, Abkühlen im Eisbad) in 10ml ExpressHyb (Clontech, Heidelberg) auf die prähybridisierte Membran (1h 60°C) appliziert und anschließend über Nacht bei 60°C im Hybridisierungsinkubator hybridisiert. Das Vorgehen bei der Prähybridisierung, Hybridisierung und den anschließenden Waschschritten erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 2.5.4.2 RNA-Hybridisierungsexperimente (Northern-Analysen)

Die Northern-Hybridisierungen erfolgten wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben. Allerdings erfolgte sowohl die Prähybridisierung als auch die Hybridisierung bei 68°C.

#### 2.5.4.3 Visualisierung mittels Phosphorscreen

Die Visualisierung der Signale erfolgte sowohl bei Northern- als auch bei Southern-Analysen mittels Phosphorscreen.

Die hybridisierten Membranen wurden in Saran-Folie™ (Roth, Karlsruhe) verpackt und für ein bis drei Tage auf einem PhosphorScreen (Molecular Dynamics, Krefeld bzw. Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert, mittels Phosphorimager (Amersham Biosciences, Freiburg) detektiert und mit Hilfe der Software ImageQuant analysiert.

2.5.5 PCR

## 2.5.5.1 Standard-PCR

Die PCR-Reaktionen wurden in den Thermocyclern GeneAmp PCR System 2400 und GeneAmp PCR System 9700 (Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt.

PCR-Ansatz: "Template" DNA  
 MQ-Wasser  
 2µl 10xReaktionspuffer (Invitrogen, Karlsruhe)  
 2µl Vorwärts-Primer (30µM)  
 2µl Rückwärts-Primer (30µM)  
 0,8µl MgCl<sub>2</sub> (50mM)  
 0,32 µl dNTPs (12,5mM)  
0,25µl Taq DNA Polymerase (5u/µl) (Invitrogen, Karlsruhe)  
 Gesamtvolumen : 20µl

Alle Standard-PCR-Programme leiteten sich von dem folgenden Schema ab:

1. Denaturierung	5 min	95°C
2. Denaturierung	30 sec	95°C
3. "Annealing"	30 sec	T opt
4. Elongation	30 sec bis 4 min	72°C
5. 25 bis 45 Zyklen der Schritte 2 bis 4		
6. Abschluß-Elongation	7 min	72°C
7. Abkühlen		4°C

Die "Annealing"-Temperatur lag 1 bis 2°C unter der Schmelztemperatur der Primer (meist zwischen 50 und 65°C). Die Elongationszeit richtete sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragments und betrug 1min/kb (*Taq* DNAPolymerase) bzw. 2min/kb (*Pfu* DNA Polymerase).

Die optimalen PCR-Bedingungen wurden durch Variieren der Annealing-Temperatur, MgCl<sub>2</sub>-Konzentration, DNA-Konzentration bzw. Zyklenzahl gefunden.

### 2.5.5.2 Semiquantitative RT-PCR

#### *Reverse Transkription*

Für die cDNA-Synthese mit Oligo-dt-Primern wurden 5µg der nach der Trizol-Methode präparierten RNA und der RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MBI Fermentas verwendet. Es wurde strikt nach Herstellerangaben verfahren.

#### *Amplifizierung der revers transkribierten DNA*

2µl des in der reversen Transkription entstandenen Produkts wurden als "Template"-DNA in eine Standard-PCR eingesetzt.

### 2.5.5.3 Inverse PCR

Die inverse PCR dient zur Amplifizierung unbekannter Sequenzen auf beiden Seiten einer bekannten Sequenz (Pang & Knecht, 1997). Mit dieser Methode ist es möglich, gezielt Abschnitte am 5'-oder 3'-Ende der bekannten Sequenz zu amplifizieren, indem man ein Restriktionsenzym wählt, das in der bereits bekannten Sequenz schneidet. Es werden dann nur die unbekannteren Abschnitte amplifiziert, die auf der selben Seite der Restriktionsschnittstelle liegen wie die Primer. Dazu wurde genomische DNA (2µg) mit einem Restriktionsenzym verdaut und die entstandenen DNA-Fragmente durch Behandlung mit T4-DNA-Ligase zirkularisiert. Diese zirkulären Produkte wurden zunächst in einer PCR mit auswärts gerichteten Primern amplifiziert. In einer zweiten PCR mit "nested" Primern sollte sicher gestellt werden, dass keine unspezifischen PCR-Produkte entstehen.

### 2.5.5.4 3'Race-PCR

Die Race-PCR ("Rapid Amplification of cDNA Ends") ermöglicht die Amplifikation von 5'- und 3'- cDNA-Enden und wird eingesetzt, wenn nur ein Teilstück der DNA-Sequenz bekannt ist (Frohman *et al.*, 1988).

Die Synthese der cDNA wurde mit Hilfe des RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit (MBI Fermentas) durchgeführt. Dazu wurde ein genspezifischer Primer als Vorwärts-Primer und ein Primer, der an den poly(A)-Schwanz am 3'-Ende bindet,

als Rückwärts-Primer eingesetzt. Eine anschließende PCR mit "nested" Primern sollte verhindern, dass unspezifische PCR-Produkte amplifiziert werden.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben kloniert und anschließend sequenziert.

### 2.5.5.5 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden einzelne Bakterienkolonien mit sterilen Zahnstochern direkt in die vorbereiteten Standard-PCR-Ansätze überführt. Die Zellen wurden während der initialen Denaturierung 10min lysiert, so dass die Plasmid-DNA als "Template" in der folgenden PCR unter Standardbedingungen zur Verfügung stand.

### 2.5.6 Klonierung von PCR-Produkten

Die zu klonierenden PCR-Produkte wurden zunächst in einer PCR mit einem Gemisch aus *Taq*- und *Pfu*-Polymerase (1:20) amplifiziert (als PCR-Puffer wurde 10x*Pfu*-Puffer verwendet), gelelektrophoretisch aufgetrennt und wie im Kap. 2.5.2.9 beschrieben aus dem Agarosegel eluiert.

Die Klonierung und Transformation erfolgte mit dem TOPO TA Cloning® Kit der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Herstellerangaben.

In einer Kolonie-PCR mit genspezifischen Primern wurde überprüft, ob das gewünschte PCR-Produkt erfolgreich kloniert wurde.

### 2.5.7 Sequenzierung

#### 2.5.7.1 Automatisierte Sequenzierung

Das zu sequenzierende DNA-Fragment wurde zunächst mit Hilfe des TOPO TA Cloning®-Kit (Invitrogen, Karlsruhe) strikt nach Herstellerangaben kloniert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

Die automatisierte Sequenzierung wurde von Frau Regina Weiß (IPB Halle) nach der Methode des "cycle sequencing" auf einem LICOR (4000L oder Longreadir 4200, MWG-Biotech, Ebersberg) durchgeführt. Es wurden die vektorspezifischen fluoreszenzmarkierten M13-Primer (IRD700 bzw. IRD800, MWG-Biotech, Ebersberg) verwendet.

### 2.5.7.2 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit den Programmen BioEdit, EditSeq, MapDraw, SeqMan II und Protean (DNA-Star Inc., USA).

Sequenzvergleiche mit Datenbanken erfolgten unter Verwendung des „BLAST“-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990, 1997)

## 2.6 Mikrobiologische Methoden

### 2.6.1 Herstellung von Glycerinkulturen

Zur Herstellung von Stammkulturen wurden 850µl einer Übernacht-Kultur von Bakterien einer Einzelkolonie mit 150µl sterilem 99%igem Glycerin gründlich durchmischt. Diese Dauerkultur wurde bei -80°C gelagert.

Von dieser Stammkultur konnten Aliquots z.B. mit einer sterilen Impföse zur Kultivierung in Nährmedien entnommen werden.

### 2.6.2 Herstellung kompetenter Zellen (*Escherichia coli*)

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte mit Hilfe der CaCl<sub>2</sub>-Methode (Ausubel *et al.*, 1989). Dazu wurden 200ml LB-Medium mit einer Vorkultur aus DH5a-Zellen angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bis 0,6 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen 15min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (10min, 4°C, 800 x g) und das Pellet in 10ml kaltem CaCl<sub>2</sub> (100mM) resuspendiert. Die Zellen wurden 1 Stunde auf Eis inkubiert, zentrifugiert (5min, 4°C, 800 x g) und in 100mM CaCl<sub>2</sub> und 15% Glycerin resuspendiert. Nach einer 30minütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### 2.6.3 Transformation von *Escherichia coli*

Kompetente DH5a Zellen wurden mittels Hitzeschock transformiert. Die zu transformierenden Plasmide wurden zu den kompetenten Zellen gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Sie wurden anschließend für 60sec einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt und für weitere 2min auf Eis inkubiert. Danach wurde flüssiges LB-

Medium ohne Antibiotikum zugegeben und die Kulturen für 1h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots auf LB-Selektionsplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### 2.6.4 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Mit der auf Höfgen & Willmitzer (1988) zurückgehenden Methode zur Übertragung isolierter DNA auf Agrobakterien wurden ausreichende Transformationsraten erzielt. Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 3ml einer Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 in 100ml LB-Flüssigmedium mit Gentamycin und Rifampicin gegeben und für 6-10h im Schüttelinkubator bei 28°C und 160rpm kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 10min bei 3000 x g sedimentiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 1ml LB-Medium resuspendiert, zu jeweils 200µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 200µl Aliquot kompetenter Zellen im Eisbad aufgetaut, 1-5µg Plasmid-DNA zugegeben und 5min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in flüssigem Stickstoff für 5min eingefroren. Als Hitzeschock wurden die Zellen 5min in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 1ml LB-Medium wurden die Zellen 2-4h bei 28°C und 160rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion auf transformierte Zellen wurden 100µl des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und ca. 48h bei 28°C bebrütet.

## 2.7 Übersicht über die verwendeten Primer

Das Design der meisten Primer erfolgte unter Verwendung des Programmes „PRIMER3“ (Rozen & Skaletsky, 2000).

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Funktion/Ziel	Herkunft
<b>F2G19</b>	F: CTG ACG GGG AAA TCT TCG ATG R: CCG TAC ATC ATC TTC CAC CTC	Kartierung	TAIR Simple Repeat Table
<b>F2J6_A</b>	F: CCT CAC TCC AAT ATG CAG AC R: GCA ACG AGA CCA TGA AGC TC	Kartierung	Cereon IND
<b>F5D14</b>	F: CCA CAA CGA AAA CTC ATC ACA TG R: CCA CAT ATA TTT ATG GCT CC	Kartierung	Cereon IND
<b>F6N18</b>	F: GAG TCT CTC TGT GTC AAG R: CAT CGG TTT CGG TTC GGT AC	Kartierung	Cereon IND
<b>F9L11</b>	F: GTC CGG CAC ACT AAG TCA C R: CAA AAT GGT AAA TAT GTT TGC	Kartierung	TAIR Simple Repeat Table
<b>F13K9</b>	F: CAT ATG CTT GCT CTC TGT AAC T R: GAG GTC ATC TCT TTC TAC CAG A	Kartierung	Cereon IND
<b>F14J22neu</b>	F: GGT TTG AAA TTG TGC AAG GC R: CAT ACC TCT TGG AGC ATT CG	Kartierung	Cereon IND
<b>F23M19</b>	F: GTT TGG CTG ATA ACA TTC ATG R: CAA ATG ATG TCG AAA AGA ATC	Kartierung	TAIR Simple Repeat Table
<b>F28J9</b>	F: TTC TCG ATC ATT TTC TCT ACC T R: ACC TGT TCT CAC TTT ATG TTC C	Kartierung	Cereon IND
<b>F28K20</b>	F: GTT CCC TTT TTC TCT ACT GC R: CTG CTA CTT CTG CAG GTA AC	Kartierung	Cereon IND
<b>nga280</b>	F: CTG ATC TCA CGG ACA ATA GTG C R: GGC TCC ATA AAA AGT GCA CC	Kartierung	SSLP (Tair)
<b>T27K12</b>	F: GGA CAA CGT GTC AAA CGG TT R: GGA GGC TAT ACG AAT CTT GAC	Kartierung	SSLP (Tair)
<b>F28H19</b>	F: TAC ATT TGA TGA AGA AGC R: AAG TTT ACC TTG AAG	Kartierung	SSLP (Tair)
<b>F9C16</b>	F: CTA GTA GAT GCC TCA ACC TG R: GTA TTA CTT TCC TCA AGC CC	Kartierung	TAIR Simple Repeat Table
<b>T18F15</b>	F: CGT CAA ATT GAT AGC CTA ATC R: GCT AAC AGT GCG ATT GTC AAG	Kartierung	Cereon IND
<b>T12C22_4</b>	F: GGT GGA AAC CAG ACT TGT C R: GAT AAA TTT ACG GCC ATC C	Kartierung	Cereon IND
<b>F27F5</b>	F: GTA TGG TCT TAG AGC CAT GAG R: GCA AAA CTT TCA TTT GCA AGG	Kartierung	Cereon IND
<b>T3F24</b>	F: GTC TCT AGC TTT GGT TGT GG R: CTT CAG GAA GCT ACA ATA ACC	Kartierung	Cereon IND
<b>coil</b>	F: GGT TCT CTT TAG TCT TTA C R: CAG ACA ACT ATT TCG TTA CC	Selektion homo-zygoter Pfl.	CAPS (TAIR)
<b>At1g32640.1</b>	F: GAT CAC TCC GAT CTA GAAG C R: ATT TTT GAA ATC AAA CTT GCT C	RT-PCR	MIPS

Name	Sequenz in 5'-3' Richtung	Funktion/Ziel	Herkunft
<b>MYC2</b>	F: GAA TGA CTG ATT ACC GGC TAC AA R: CTT TTA ACC GAT TTT TGA AAT CA	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_1</b>	F: GGT CAC CGG TTT ATG GAA TG R: GGT TAT TGT GCT TGA GCT AC	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_2</b>	F: GTC TAT TCA GTT TGA GAA ACG R: CTA AAC TTC CCA AAA CAG ACC C	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_2NEU</b>	F: TCT ATT CAG TTT GAG AAC GGT A R: AAT TAT GAT TTG ACC CCA TAA C	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3</b>	F: GATCACTCCGATCTAGAAGC R: AGG TTT TAT GTG TGTGTC TT	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3 A</b>	F: ATG CAT ACT ATT GCG TGT ATT C R: TAG TTC TTG TGA GTC GGT TAA A	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3 B</b>	F: ATG CAT ACT ATT GCG TGT ATT C R: ATC CAC TTA TGC CAT AAA ACC	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3 C</b>	F: ATG CAT ACT ATT GCG TGT ATT C R: TCG AGG AGA AGG AAG ACT ATT A	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3 D</b>	F: ATG CAT ACT ATT GCG TGT ATT C R: GGT TCA ACA AAG AAA AAT TCA T	Sequenzierung	MIPS
<b>MYC2_3 E</b>	F: ATG CAT ACT ATT GCG TGT ATT C R: TCT CAT TTC TAC ATG TTC TCC TT	Sequenzierung	MIPS
<b>P1</b>	re: GAA ACG AGG AAG AAA GCC AG li: TTT GGA CGT TTC TCT ACT GC	inverse PCR Sequenzierung	MIPS
<b>P2 (nested)</b>	re: CAA ACG GTA GAG AAG AGC CA li: TAC TTC TTT CAC GAC GGA AG	inverse PCR Sequenzierung	MIPS
<b>RACE1</b>	GAA AGA AGT AGC AGT AGA GA	RACE-PCR	MIPS
<b>RACE2 (nested)</b>	CTA TCA TTC GGA GAT AAA	Sequenzierung	
<b>RACE3</b>	NVT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TT		
<b>MycNEU</b>	F: CAG AGA AAC TCC AAA TCA AGA ACC A R: TCT ACG CGA GAA GAG CTG AAG AAT A	Bestätigung Sequenzierung	MIPS
<b>Kompl. 35S</b>	F: ACC ATG GAA TGA CTG ATT ACC GGC TAC AA R: AGG TAC CTT TTA ACC GAT GAT TTT TGA AAT CA	Komplementation	MIPS
<b>Kompl. endoPr</b>	F: ACT GCA GAT GTC TCA GAA AAT TAT ATT C R: AGG TAC CTT CGT GTG TTC CTT CAA TCA AAG C	Komplementation	MIPS
<b>AtMyc2</b>	F: CAA GGT TCG AAT TCT TTT CA R: TTA GTG GCT CTT CTC TAC CG	RT-PCR	MIPS
<b>EFa</b>	F: CAA CCT TGA CTG GTA CAA GG R: AGA ACG CCT GTC AAT CTT GG	Kontrolle RT-PCR	Michael Weber

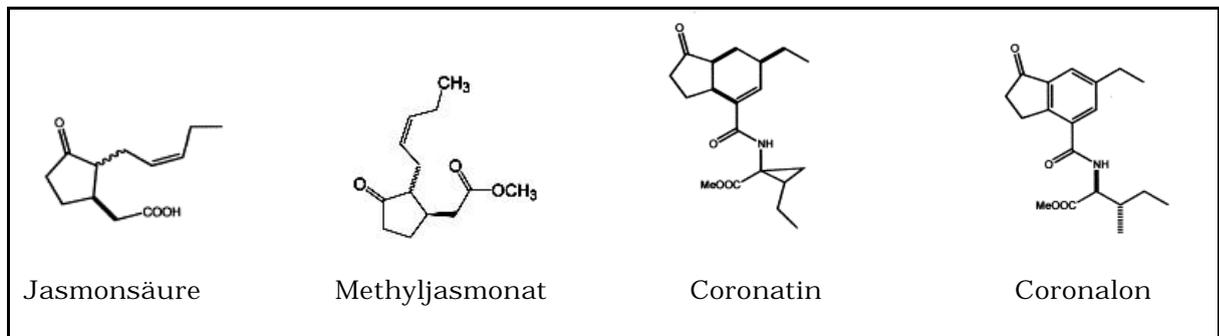
## 3. Ergebnisse

### 3.1 Charakterisierung der Mutanten *jin1* und *jin4*

#### 3.1.1 Einfluss von Methyljasmonat und Coronalon auf das Wurzelwachstum

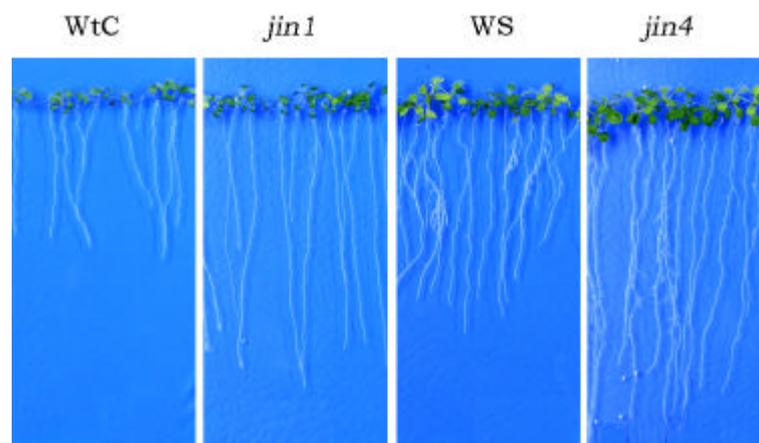
Phänotypisch unterscheiden sich *jin1* und *jin4* zunächst nicht von ihren Wildtypen Col-g11 (WtC) und Wassilewskija (WS). Erst durch Applikation von Jasmonaten bzw. Coronalon wird der jasmonatinsensitive Phänotyp der Mutanten sichtbar.

Methyljasmonat (MeJA), der Methyl ester der Jasmonsäure (Abb.3.1.1), hemmt stark das Wurzelwachstum der Wildtypen WtC und WS. Auf MS-Medium, das



**Abbildung 3.1.1:** Strukturformeln der in ihrer Wirkungsweise ähnlichen Verbindungen. (verändert nach Schüler *et al.*, 2004)

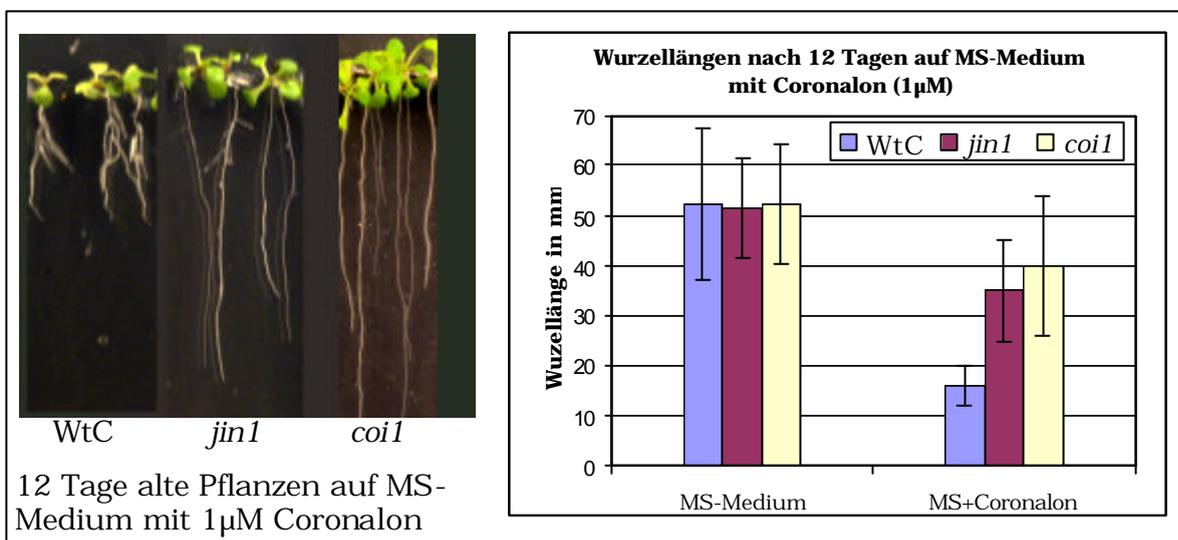
10 $\mu$ M MeJA enthält, sind die Wurzeln von *jin1* ca. 2mal länger als bei WtC. Im Fall von *jin4* sind die Wurzeln ebenfalls ca. 2fach länger als im entsprechenden Wildtyp WS (Abb.3.1.2).



**Abbildung 3.1.2:** 12 Tage alte Pflanzen auf MS-Medium, das 10 $\mu$ M MeJA enthält

Neben dem deutlich sichtbaren Wurzelphänotyp unter Einfluss von MeJA ist bei beiden Wildtypen oftmals ein hellgrüner bis gelblicher Farbton der Blätter erkennbar, während in den Mutanten kein Ausbleichen der Blätter und somit kein Chlorophyllabbau nach Applikation von MeJA auftritt.

Die Mutante *coi1*, die wie *jin1* aus dem Col-0 Hintergrund stammt, wurde auf Insensitivität gegenüber Coronatin selektiert, sie ist aber gleichzeitig auch insensitiv gegenüber Methyljasmonat (Feys *et al.*, 1994). Coronatin ist ein Phytotoxin, das aus *Pseudomonas syringae* isoliert werden kann und in höheren Pflanzen eine ähnliche Wirkung wie OPDA und Jasmonate hat (Weiler *et al.*, 1994). Schüler *et al.* (2004) gelang es, eine dem Coronatin und der Jasmonsäure in Struktur und Wirkung ähnliche Substanz zu synthetisieren: das Coronalon (2-[(6-ethyl-1-oxo-indane-4-carbonyl)-amino]-3-methyl-pentanoic acid methyl ester) (Abb.3.1.1). Auf coronalonhaltigem MS-Medium wurde das Wurzelwachstum des Wildtyps WtC stark gehemmt. Die Wurzeln der Mutante *coi1* (Positivkontrolle) waren nach 12 Tagen ca. 2,5fach länger; die Wurzeln von *jin1* waren zwar etwas kürzer als die von *coi1*, aber noch etwa 2,2fach länger als in WtC (Abb.3.1.3).



**Abbildung 3.1.3:** Einfluss von Coronalon (1µM) auf das Wurzelwachstum von WtC, *jin1* und *coi1*. n = 20; Mittelwerte  $\pm$  SD

Außerdem zeigen die Blätter von *coi1* und *jin1* einen sattgrünen Farbton, während die Blätter des Wildtyps als Folge des stressbedingten Chlorophyllabbaus gelblich-grün erscheinen.

### 3.1.2 Infiltration von *Pseudomonas syringae*

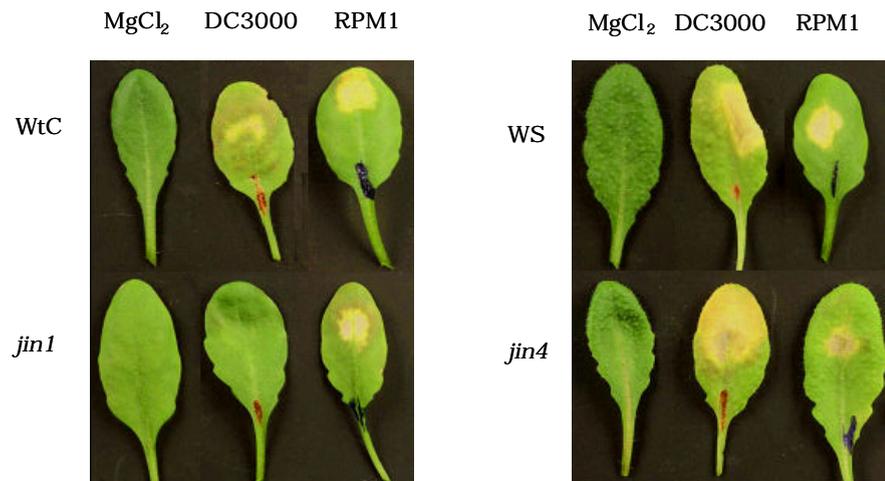
In den letzten Jahren wurde verstärkt die Interaktion zwischen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) sowie dem nahe verwandten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) und verschiedenen Pflanzenspezies untersucht (Preston, 2000). *Psm* führt in Brassicaceen (also auch in *A. thaliana*) zur Bakterienblattpfleckkrankheit, *Pst* löst in Tomaten (*Lycopersicon lycopersicum*) die bakterielle Blatt- und Fruchtpfleckkrankheit aus. Eine Besonderheit stellt der Stamm *Pst* DC3000 dar, der auch *A. thaliana* befallen kann.

Im folgenden wurden vier *Pseudomonas*-Stämme verwendet, um die Sensitivität von *jin1* und *jin4* zu testen: *Pst* DC3000 (mit und ohne *avrRpm1*-Avirulenzgen), *Psm* M2*avrRpm1* und *Psm* CR299, der durch eine Tn3-Spice Insertion im *avrRpm1*-Gen des Elternstammes *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 entstand (Ritter & Dangl, 1995). *Pst* ist im Gegensatz zu *Psm* in der Lage, das bakterielle Phytotoxin Coronatin zu bilden.

#### 3.1.2.1 Makroskopische Beobachtungen

Nach Infiltration mit dem avirulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000*avrRpm1* tritt in den getesteten Wildtypen WtC und WS sowie in den Mutanten *jin1* und *jin4* eine deutlich ausgeprägte hypersensitive Reaktion auf (Abb.3.1.4). Diese äußert sich zunächst durch die Ausprägung von Läsionen, die später in helle Nekrosen übergehen. Die HR ist auf einen bestimmten Blattabschnitt in unmittelbarer Nähe der Infektionsstelle beschränkt und dehnt sich nicht auf weitere Teile des Blattes aus.

Nach einer Infiltration mit virulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-Bakterien zeigen beide Wildtypen und die Mutante *jin4* ausgeprägte Krankheitssymptome, die nicht nur auf die Infiltrationsstelle beschränkt sind, sondern sich auf weite Blattabschnitte ausdehnen. Die Mutante *jin4* erscheint ausgehend von diesen makroskopischen Beobachtungen sensitiver gegenüber DC3000 als ihr entsprechender Wildtyp WS zu sein. In der Mutante *jin1* ist das Fehlen von Krankheitssymptomen nach der Infiltration von DC3000 auffällig, während der korrespondierende Wildtyp WtC ausgeprägte Krankheitsmerkmale aufweist.



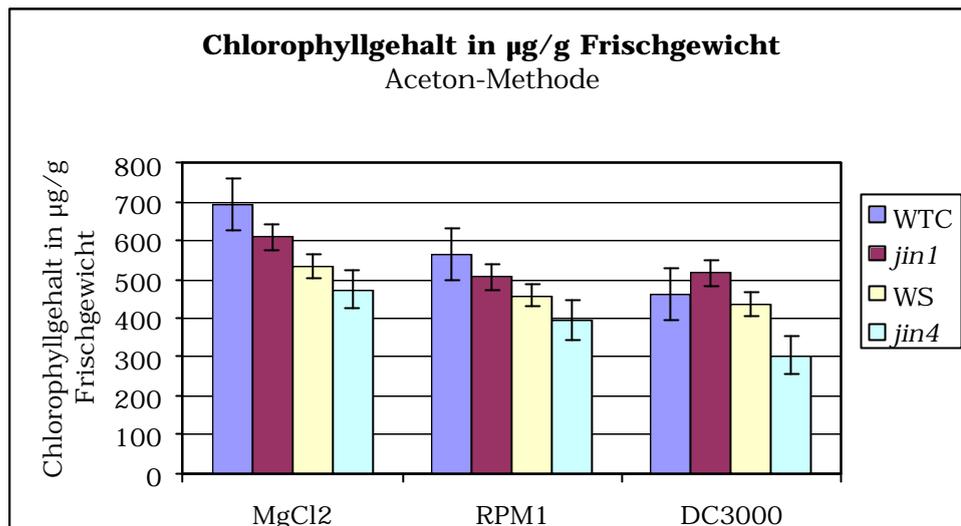
**Abbildung 3.1.4:** *Arabidopsis*-Blätter 7 Tage nach Infiltration mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* mit und ohne *avrRpm1* (Bakteriendichte:  $5 \times 10^5$  cfu/ml) und  $MgCl_2$ -Kontrolle (10mM)

Um diese Beobachtungen zu verifizieren, wurde der Chlorophyllgehalt der Blätter nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* sowie in Wachstumskurven die Ausbreitung der Bakterien in den Pflanzen bestimmt.

### 3.1.2.3 Einfluss von *Pseudomonas syringae*-Infiltrationen auf den Chlorophyllgehalt der Blätter

Der Gesamtchlorophyllgehalt von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* -infiltrierten Blättern wurde zunächst mit Hilfe der Aceton-Methode ermittelt (Abb.3.1.5). Deutliche Unterschiede im Chlorophyllgehalt zwischen den Wildtypen und Mutanten konnten mit dieser Methode nicht festgestellt werden. Tendenziell lässt sich jedoch für die Infiltration mit dem virulenten Stamm DC3000 sagen, dass *jin1* einen höheren Blattchlorophyllgehalt aufweist als der entsprechende Wildtyp WtC. Dagegen ist der Chlorophyllgehalt nach DC3000-Infiltration in *jin4*-Blättern im Vergleich mit WS reduziert.

Der Chlorophyllgehalt der Blätter nach Infiltration des avirulenten Stammes *Pst* DC3000*avrRpm1* ist in allen getesteten Pflanzen geringer als in den  $MgCl_2$ -Kontrollen. Unterschiede zwischen Wildtypen und Mutanten sind hier nicht erkennbar. Dies korreliert mit der in allen Fällen deutlich ausgeprägten HR.



**Abbildung 3.1.5:** Gesamtchlorophyllgehalt der Blätter in µg/g Frischgewicht (bestimmt mittels Aceton-Methode), gemessen 10 Tage nach Infiltration mit einer Bakteriendichte von  $5 \times 10^5$  cfu/ml.  $n = 8$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD

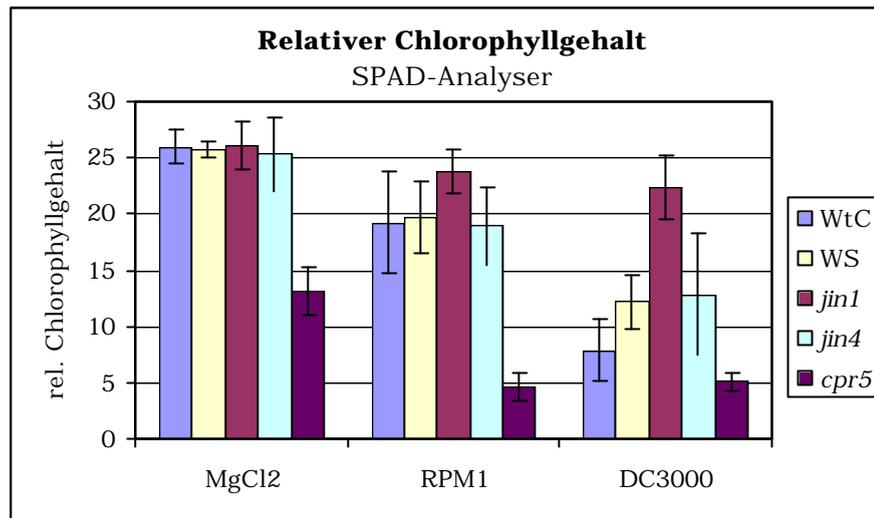
Für eine exaktere Bestimmung des Chlorophyllgehaltes wurde im nächsten Schritt ein SPAD-Analyser genutzt, der den relativen Chlorophyllgehalt auf einer definierten Blattfläche misst (Abb.3.1.6).

Als interne Kontrolle wurde die Mutante *cpr5* mitgeführt, von der bekannt ist, dass sie eine erhöhte Resistenz gegenüber dem virulenten *Pseudomonas*-Stamm DC3000 aufweist (Boch *et al.*, 1998), was sich auch im Chlorophyllgehalt der Blätter widerspiegeln sollte.

Aus Abb.3.1.6 geht hervor, dass der Chlorophyllgehalt nach DC3000*avrRpm1*-Infiltration in den Wildtypen WtC und WS sowie in den Mutanten *jin1* und *jin4* keinen großen Abweichungen unterliegt. Dies korreliert mit den makroskopischen Beobachtungen und der Ausprägung der HR. Deutliche Unterschiede zwischen den getesteten Pflanzen treten jedoch nach Infiltration mit DC3000 zu Tage. Die Mutante *jin1*, die bereits durch das Fehlen von Krankheitssymptomen auffällt, zeigt im Vergleich mit den Kontrollen nur gering reduzierte Chlorophyllgehalte in den infiltrierten Blättern.

Die Mutante *jin4*, die makroskopisch durch DC3000 scheinbar stärker geschädigt wird als ihr entsprechender Wildtyp WS, weist hier einen identischen Blattchlorophyllgehalt wie WS auf.

Interessant ist der Chlorophyllgehalt in den Blättern von *cpr5*. Verglichen mit den anderen getesteten Pflanzen zeigen bereits die mit MgCl<sub>2</sub> infiltrierten Kontrollpflanzen einen geringen Chlorophyllgehalt. Dies ist sicher auf das spontane Auf-



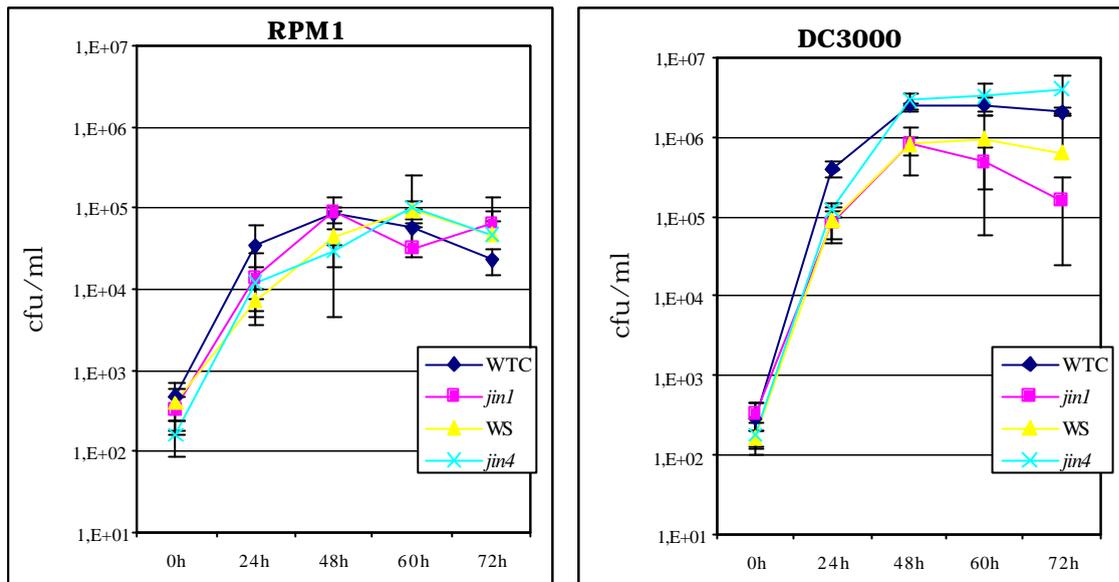
**Abbildung 3.1.6:** Relativer Chlorophyllgehalt, Bestimmung mittels SPAD-Analyser 4 Tage nach Infiltration mit einer Bakteriendichte von  $5 \times 10^5$  cfu/ml.  $n = 10$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD

treten von Läsionen in dieser Mutante zurückzuführen ("*lesion-mimic phenotype*"), die unabhängig von Pathogenattacken entstehen. Nach Infiltration mit *Pst* sinkt der Chlorophyllgehalt in den Blättern von *cpr5* weiter ab und korreliert nicht mit dem verminderten Bakterienwachstum.

#### 3.1.2.4 Vergleich der Bakterienausbreitung in Wildtyppflanzen und Mutanten

Um die Vermehrung der Bakterien in der Pflanze zu bestimmen, wurden verschiedene *Pseudomonas syringae*-Stämme in die Blätter der zu untersuchenden Wildtypen und Mutanten infiltriert und die Bakterien aus den Blättern isoliert und quantifiziert. Alle Experimente wurden mindestens viermal wiederholt.

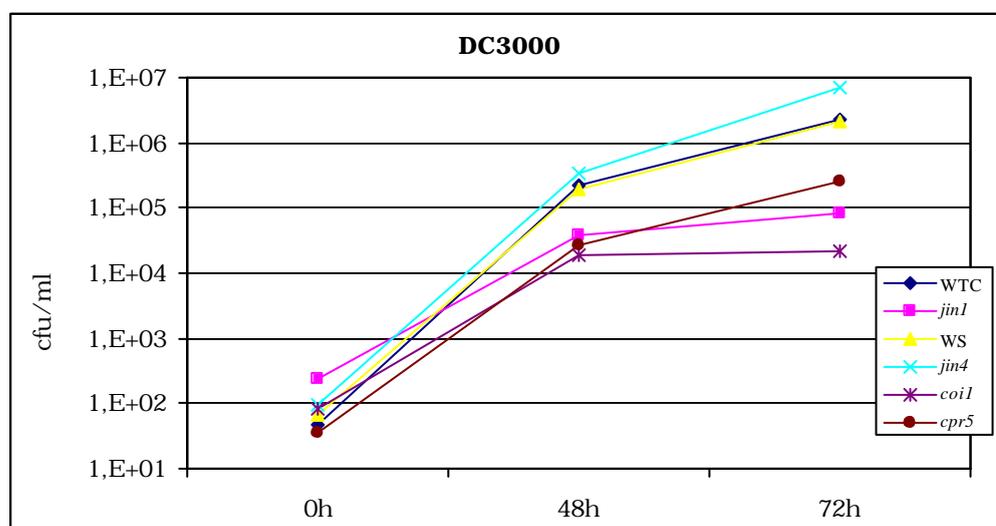
Nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *avrRpm1* zeigen die untersuchten Wildtypen WtC und WS sowie die Mutanten *jin1* und *jin4* einen ähnlichen Verlauf des Bakterienwachstums in den Blättern (Abb.3.1.7). Im Vergleich zu dieser inkompatiblen Interaktion ist das Bakterienwachstum nach Infiltration mit dem virulenten Stamm DC3000 um etwa 1,5 bis 2 Zehnerpotenzen höher. Eine Ausnahme bildet die Mutante *jin1*. Was die makroskopischen Beobachtungen und die Messung des Chlorophyllgehaltes nach DC3000-Infiltration bereits andeuteten, bestätigt sich in der Wachstumskurve: Die Mutante *jin1* ist verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp WtC resistenter gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Dies äußert sich durch die um eine Zehnerpotenz reduzierte Anzahl an Bakterien.



**Abbildung 3.1.7:** Wachstumskurve: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (infiltrierte Bakteriendichte:  $5 \times 10^5$  cfu/ml). n = 6; Mittelwerte  $\pm$  SD

In der Mutante *jin4* ist die Bakterienmenge nach DC3000-Infiltration verglichen mit WS um etwa eine Zehnerpotenz erhöht. Auch dies korreliert mit den makroskopischen Beobachtungen.

Vergleichend wurden in einigen Experimenten die Mutanten *coi1* und *cpr5* mitgeführt, die eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 aufweisen (Kloek *et al.*, 2001; Boch *et al.*, 1998). Die Mutante *coi1* zeigt wie *jin1* keine sichtbaren Krankheitssymptome. Aus Abb.3.1.8 geht hervor, dass die Bakterienmenge in *jin1* zwischen dem der Mutanten *coi1* und *cpr5* liegt.

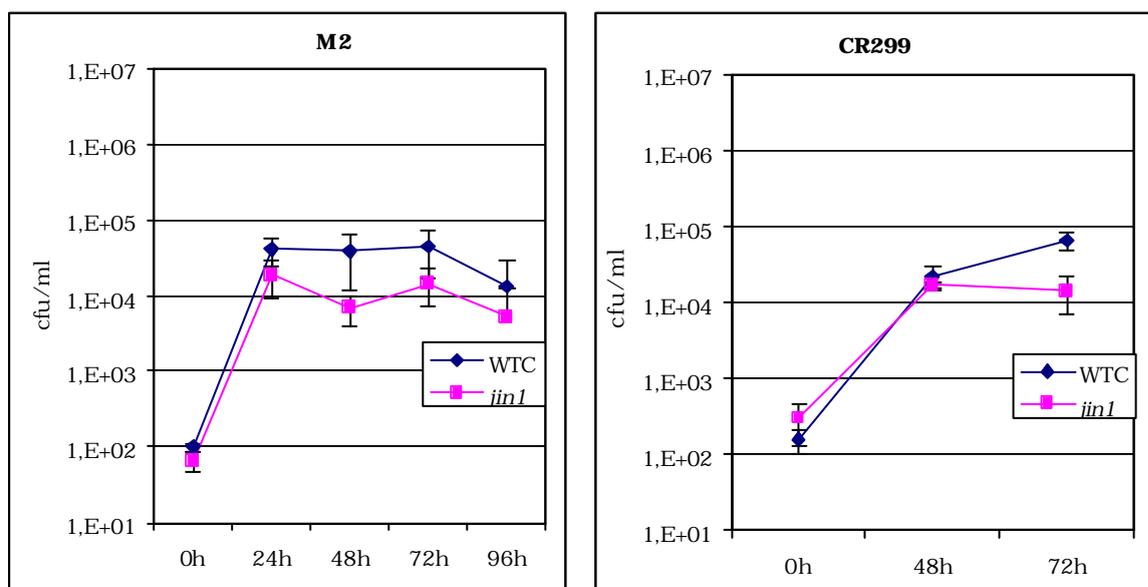


**Abbildung 3.1.8:** Wachstumskurve: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (infiltrierte Bakteriendichte:  $5 \times 10^5$  cfu/ml). n = 6; Mittelwerte  $\pm$  SD

Der Verlauf der Wachstumskurve für *jin1* in Abb.3.1.8 unterscheidet sich etwas von Abb.3.1.7. Während in Abb.3.1.7 die Menge an Bakterien in *jin1* zwischen 48 und 72 Stunden nach Infiltration deutlich absinkt, stagniert die Bakterienmenge in dieser Mutante nach 48 Stunden in Abb.3.1.8 und sinkt nicht weiter ab.

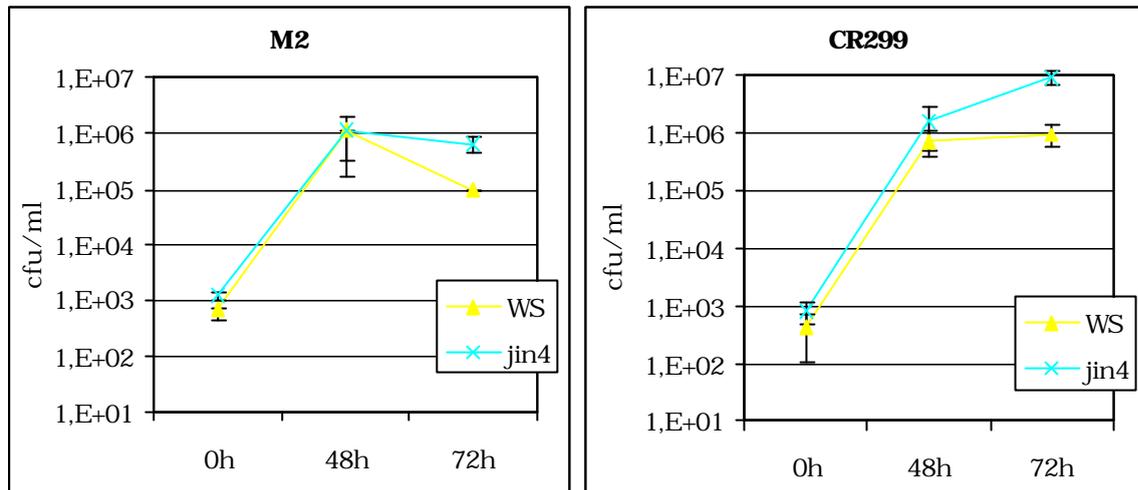
In der Mutante *jin4* ist die Anzahl der Bakterien wieder am höchsten und spricht für die beobachtete erhöhte Sensitivität.

Die bisher getesteten *Pseudomonas*-Stämme zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, Coronatin zu bilden. Um den Einfluss von Coronatin ausschließen zu können, wurden im folgenden die Stämme *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2 und *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* CR299 (Ritter & Dangl, 1995), die kein Coronatin produzieren, genutzt. CR299 entstand durch eine Tn3-Spice Insertion im *avrRpm1*-Gen des Elternstammes *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* M2. Bei der Bestimmung der Bakterienmenge beider Stämme in den Pflanzen fällt die reduzierte Anzahl an Bakterien im Vergleich mit *Pst* DC3000 auf (Abb.3.1.9). Nach Infiltration mit dem avirulenten Stamm *Psm* M2 tritt in WtC und *jin1* eine deutlich ausgeprägte HR auf. Die Bakterienmenge in *jin1* ist leicht, aber nicht signifikant reduziert. CR299 löst als virulenter Stamm weder in WtC noch in *jin1* eine HR aus. Die Bakterienmenge ist gegenüber *Psm* M2 kaum erhöht. In der Mutante *jin1* lässt sich 72 Stunden nach der Infiltration ein leichtes Absinken der Wachstumskurve beobachten, während in WtC die Anzahl an Bakterien weiter zunimmt.



**Abbildung 3.1.9:** Wachstumskurve: *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (infiltrierte Bakteriendichte:  $5 \times 10^5$  cfu/ml). n = 6; Mittelwerte  $\pm$  SD

In WS und *jin4* ist die Bakterienmenge nach Infiltration von *Psm* M2 und CR299 um 1 bis 2 Zehnerpotenzen höher als in WtC und *jin1* (Abb.3.1.10). Sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion ist die Anzahl der Bakterien in *jin4* um etwa eine Zehnerpotenz höher als in WS.



**Abbildung 3.1.10:** Wachstumskurve: *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (infiltrierte Bakteriendichte:  $5 \times 10^5$  cfu/ml). n = 6; Mittelwerte  $\pm$  SD

### 3.1.2.5 Genexpression nach Infiltration von *Pseudomonas syringae*

In Northern-Blot-Analysen wurde die Transkript-Akkumulation von bekannten und für die Pathogenabwehr bedeutsamen Genen untersucht. Die Analysen der Genexpression in Blättern von verschiedenen *Arabidopsis*-Mutanten und Wildtypen erfolgte nach Infiltration von *Pst* DC3000 (mit und ohne *avrRpm1*) sowie *Psm* M2*avrRpm1* und *Psm* CR299 zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 6 und 24 Stunden). Als Kontrolle wurde 10mM  $MgCl_2$  infiltriert.

#### Akkumulation von *PR1*-mRNA (Pathogenesis Related Protein 1)

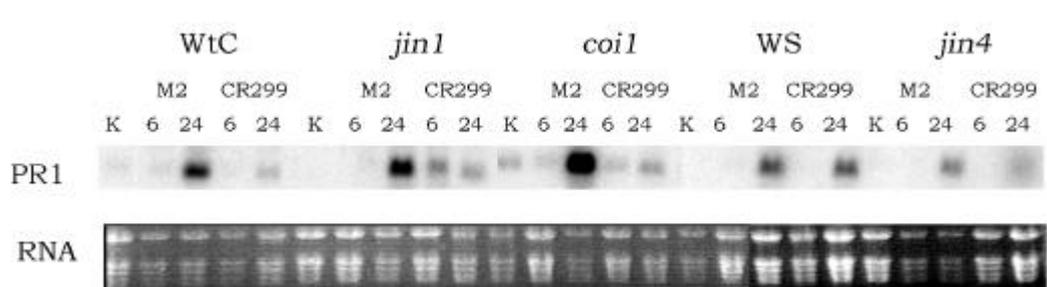
*PR1* ist ein Abwehrgen des salizylatabhängigen Signalweges. Die Induktion kann durch eine Vielzahl von Pathogenen erfolgen. In *A. thaliana* gilt *PR1* als klassisches Marker-Gen sowohl für lokale Resistenzantworten als auch für die SAR (Cao *et al.*, 1997). In *jin1* und *jin4* sowie in den dazugehörigen Wildtypen akkumuliert *PR1*-mRNA 24 Stunden nach Infiltration von *Pst* DC3000 und *Pst*

DC3000*avrRpm1* (Abb.3.1.11). In beiden Mutanten ist die Transkriptmenge nach DC3000-Infiltration (mit und ohne *avrRpm1*) im Vergleich mit den Wildtypen erhöht.



**Abbildung 3.1.11:** Akkumulation von *PR1*-mRNA nach Infiltration von *MgCl<sub>2</sub>* (Kontrolle) *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu\text{g}$  Gesamt-RNA

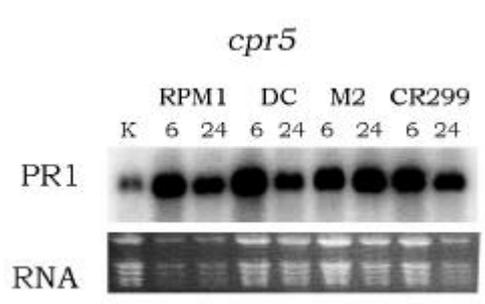
Auch nach Infiltration von *Psm* M2 kommt es vor allem in WtC, *jin1* und *coil* nach 24 Stunden zur Anreicherung von *PR1*-Transkripten (Abb.3.1.12). In WS und *jin4* ist die Transkriptmenge vergleichsweise gering. Nach Infiltration des Stammes *Psm* CR299 sind die *PR1*-Transkripte fast nicht detektierbar. Dies korreliert mit dem Fehlen von sichtbaren Krankheitssymptomen nach CR299-Infiltration. Während durch *Psm* M2 eine deutliche HR ausgelöst wird. Höhere Transkriptmengen nach CR299-Behandlung finden sich nur im Wildtyp WS.



**Abbildung 3.1.12:** Akkumulation von *PR1*-mRNA nach Infiltration von *Psm* M2 *avrRpm1* und *Psm* CR299, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu\text{g}$  Gesamt-RNA

In der Mutante *cpr5* erfolgt die Akkumulation von *PR1*-Transkripten bereits 6 Stunden nach Infiltration von *Pseudomonas*-Bakterien (Abb.3.1.13). Nach 24 Stunden sinken die Transkriptmengen wieder ab, sind aber immer noch wesentlich höher als in den Kontrollpflanzen, die bereits konstitutiv *PR1* exprimieren. Signifikante Unterschiede im Expressionsmuster nach Infiltration der verschiedenen Stämme (*Pst* DC3000 +/- *avrRpm1*, *Psm* M2 und CR299) treten nicht zu

Tage. Im Vergleich zu den bisher untersuchten Mutanten wird *PR1* in *cpr5* auch nach Behandlung mit *Psm* CR299 stark induziert.

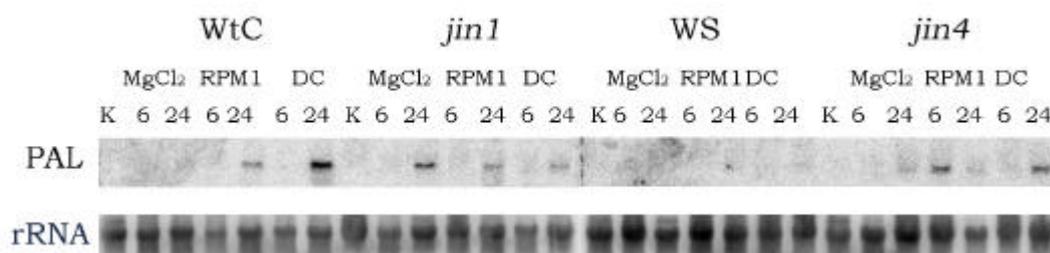


**Abbildung 3.1.13:** Akkumulation von *PR1*-mRNA in Blättern der Mutante *cpr5* nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, *Psm* M2 und CR299, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu\text{g}$  Gesamt-RNA

#### Akkumulation von *PAL*-mRNA (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase)

*PAL* ist als ein zentrales Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels bekannt, das sowohl zur Biosynthese von SA als auch zahlreicher phenolischer Phytoalexine notwendig ist (Weisshaar & Jenkins, 1998). Es fungiert bekanntermaßen als Stressenzym. Alternativ wird in letzter Zeit die Möglichkeit eines weiteren Biosynthesewegs der Salizylsäure diskutiert (Wildermuth *et al.*, 2001).

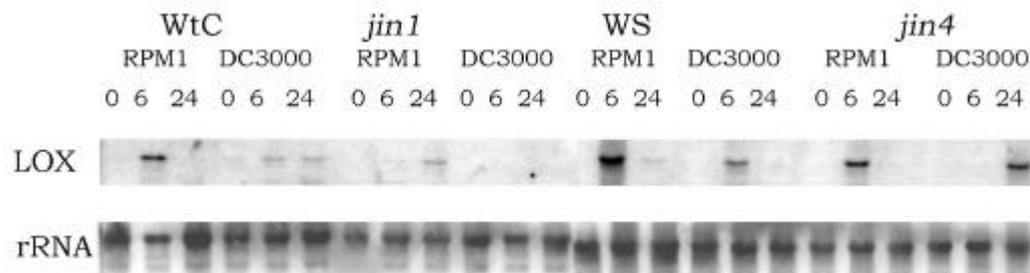
In unbehandelten Proben sowie nach  $\text{MgCl}_2$ -Infiltration sind *PAL*-Transkripte in den untersuchten Pflanzen (Ausnahme: *jin1*) nicht nachweisbar (Abb.3.1.14). Das Maximum der Expression nach DC3000 ist in WtC und *jin1* nach 24 Stunden erreicht. Im Wildtyp WtC akkumuliert 24 Stunden nach Infiltration mit dem virulenten Stamm mehr *PAL*-mRNA als nach Behandlung mit dem avirulenten Stamm. Die *PAL*-Transkriptlevel sind in *jin1* nach DC3000-Infiltration im Vergleich zu WtC deutlich verringert. Dies korreliert mit den fehlenden Krankheits-symptomen und der Reduktion der Bakterienzahl in dieser Mutante. In der gegenüber *Pst* DC3000 anfälligen Mutante *jin4* sind die Transkriptmengen hingegen erhöht.



**Abbildung 3.1.14:** Akkumulation von *PAL*-mRNA nach Infiltration von  $10\text{mM}$   $\text{MgCl}_2$  (Kontrolle) *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu\text{g}$  Gesamt-RNA.

### Akkumulation von *LOX1*-mRNA (Lipoxigenase 1)

Das Abwehrgen *AtLox1* kodiert eine Lipoxigenase und kann durch Methyljasmonat, Abscisinsäure und Pathogene induziert werden (Melan *et al.*, 1993). In der inkompatiblen Interaktion mit *Pst* DC3000*avrRpm1* kommt es in den getesteten Pflanzen zu einem Anstieg der *LOX1*-Transkripte, der in *jin1*, allerdings auch in *jin4* geringer als in den entsprechenden Wildtypen ausfällt. Ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Mutanten zeigt sich in den Transkriptmengen nach Infiltration des virulenten Stammes DC3000. In diesem Fall sind in *jin1* keine *LOX1*-Transkripte nachweisbar, während diese in *jin4* geringfügig höher als im Wildtyp exprimiert werden (Abb.3.1.15). Die Infiltration von  $MgCl_2$  führte zu keiner Akkumulation von *LOX1*-mRNA (ohne Abb.).



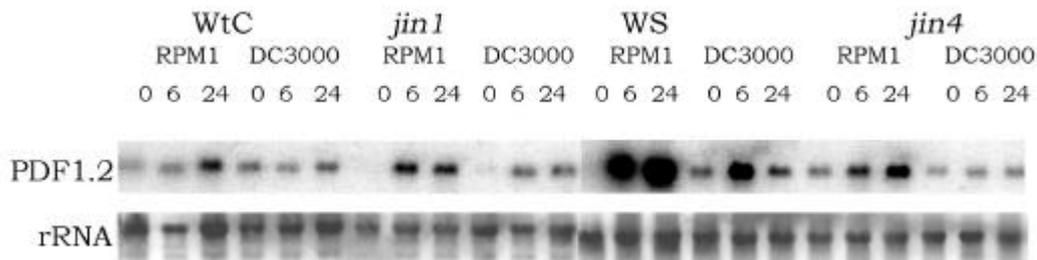
**Abbildung 3.1.15:** Akkumulation von *LOX1*-mRNA nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu g$  Gesamt-RNA

### Akkumulation von *PDF1.2*-mRNA ("plant defensin")

*Pdf1.2* kodiert ein pflanzliches Defensin mit antimikrobiellen Eigenschaften, dessen Transkription nach Pathogenbefall induziert wird. Die Induktion erfolgt salizylsäureunabhängig, erfordert allerdings funktionelle Komponenten des Jasmonat- und Ethylen-Signalweges (Penninckx *et al.*, 1996).

*PDF1.2*-Transkripte sind bereits in unbehandelten Pflanzen in geringen Mengen nachweisbar (Abb.3.1.16). Nach Infiltration des avirulenten Stammes *Pst* DC3000*avrRpm1* erreicht die Akkumulation von mRNA nach 6 bis 24 Stunden ein Maximum. Besonders stark wird *PDF1.2* in WS exprimiert. Die Infiltration des virulenten Stammes führt in *jin1* zu einer gegenüber dem Wildtyp leicht erhöhten Transkriptmenge. Die verstärkte Akkumulation beginnt in *jin1* bereits nach 6 Stunden, in WtC erst nach 24 Stunden. In *jin4* wird nach der Inokulation von *Pst*

DC3000 deutlich weniger *PDF1.2*-mRNA akkumuliert als im entsprechenden Wildtyp WS. Somit korreliert die Expression von *PDF1.2* mit der Ausbildung von Krankheitssymptomen und der Vermehrung der Bakterien in Mutanten und Wildtypen. Die Infiltration von  $MgCl_2$  führte zu keiner Anreicherung von *PDF1.2*-mRNA (ohne Abb.).

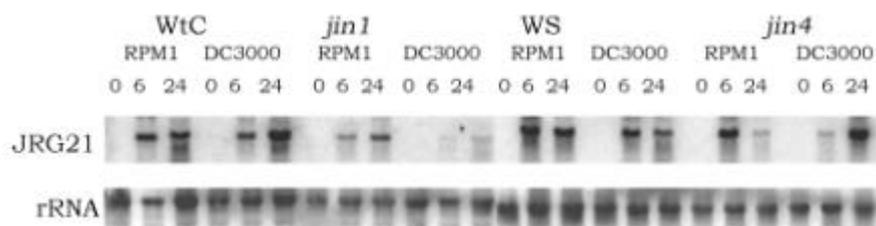


**Abbildung 3.1.16:** Akkumulation von *PDF1.2*-mRNA nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu g$  Gesamt-RNA

#### Akkumulation von *AtJRG21*-mRNA (Jasmonatreguliertes Gen 21)

Die Expression von *AtJRG21* kann durch Pathogene und MeJA induziert werden und dient als Marker für Antworten "downstream" des Jasmonat-Biosyntheseweges. Das durch *AtJrg21* kodierte Protein weist Homologie zu Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen auf, deren genaue Funktion allerdings noch nicht aufgeklärt ist (Bau, 2001).

Nach Infiltration von *Pst* DC3000 *avrRpm1* in WtC, WS, *jin1* und *jin4* beginnt nach sechs Stunden die Akkumulation von *AtJRG21*-Transkripten und erreicht (außer in der Mutante *jin4*) nach 24 Stunden ihren Höhepunkt (Abb.3.1.17).



**Abbildung 3.1.17:** Akkumulation von *AtJRG21*-mRNA nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden  $8\mu g$  Gesamt-RNA

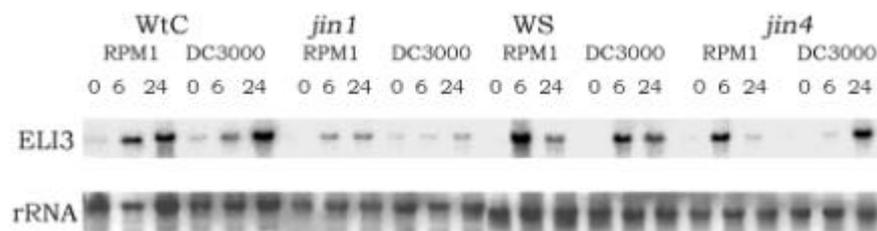
In *jin1* wird *AtJRG21*-mRNA in deutlich geringeren Mengen als in WtC gebildet,

sowohl nach Behandlung mit dem avirulenten als auch dem virulenten *Pseudomonas*-Stamm. In *jin4* hingegen akkumulieren 24 Stunden nach *Pst* DC3000-Infiltration mehr Transkripte. In den  $MgCl_2$ -Kontrollen konnte keine Expression von *AtJRG21* nachgewiesen werden (ohne Abb.).

#### Akkumulation von *ELI3*-mRNA (Elicitor Induced 3)

*AtEli3* kodiert ein Abwehrprotein, eine NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Somssich *et al.*, 1996). Die Akkumulation von *ELI3*-mRNA kann durch verschiedene phytopathogene Bakterien und Elicitoren ausgelöst werden.

Die Induktion von *ELI3* erfolgt nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne Avirulenzgen in beiden getesteten Wildtypen und Mutanten (Abb.3.1.18). Während in *jin1* die *ELI3*-Transkriptmenge nach DC3000-Behandlung im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist, wird in *jin4* nach 24 Stunden etwas mehr mRNA als im Wildtyp WS gebildet. Sechs Stunden nach DC3000-Infiltration sind in *jin4* allerdings fast keine Transkripte nachweisbar, während in WS zu diesem Zeitpunkt *ELI3* schon exprimiert wird. Die Infiltration von  $MgCl_2$  führte zu keiner Akkumulation von *ELI3*-mRNA (ohne Abb.).



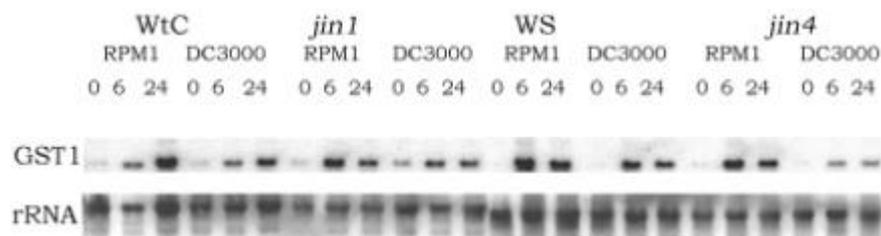
**Abbildung 3.1.18:** Akkumulation von *ELI3*-mRNA nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakteriendichte:  $10^8$  cfu/ml; geladen wurden 8  $\mu$ g Gesamt-RNA

#### Akkumulation von *GST1*-mRNA (Glutathion-S-Transferase 1)

GSTs, von denen das *Arabidopsis*-Genom 47 enthält, sind multifunktionale Enzyme, die endobiotische und xenobiotische Substanzen entgiften (Lieberherr *et al.*, 2003). *Gst1* stellt ein Glutathion-S-Transferase-Gen dar, das als Marker für oxidativen Stress angesehen wird (Grant *et al.*, 2000). Der oxidative Stress kann

durch Verletzung, Pathogene, Ozon, Ethylen oder Schwermetalle ausgelöst werden.

*GST1*-Transkripte sind in geringen Mengen bereits zum Zeitpunkt Null in allen untersuchten Pflanzen vorhanden (Abb.3.1.19). In den Wildtypen steigt die Transkriptmenge nach 6 bis 24 Stunden sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion deutlich an. Nach Infiltration von DC3000 wird in *jin4* deutlich weniger *GST1*-mRNA gebildet als im Wildtyp WS. In WtC und *jin1* sind die Transkriptmengen nach 24 Stunden identisch. Sechs Stunden nach Infiltration mit *Pst* DC3000*avrRpm1* wird in *jin1* nur geringfügig mehr mRNA als im Wildtyp gebildet. In den MgCl<sub>2</sub>-Kontrollen konnte keine Transkriptanreicherung festgestellt werden (ohne Abb.).



**Abbildung 3.1.19:** Akkumulation von *GST1*-mRNA nach Infiltration von *Pst* DC3000 mit und ohne *avrRpm1*, infiltrierte Bakterienkonzentration: 10<sup>8</sup> cfu/ml; geladen wurden 8µg Gesamt-RNA

### 3.2 Vergleichende Untersuchungen zur Ozonempfindlichkeit der Mutanten *jin1* und *jin4*

Wie bereits bekannt ist, spielen Jasmonate und Ethylen bei der Reaktion der Pflanze auf Ozon eine bedeutende Rolle. Es ist daher naheliegend, dass sich jasmonat- oder ethyleninsensitive Mutanten durch unterschiedliche Ozonempfindlichkeit auszeichnen.

Während eines DAAD-Austauschprogramms mit der Universität Helsinki sollte daher untersucht werden, ob und wie sich *jin1* und *jin4* hinsichtlich ihrer Antwort auf Ozon voneinander, von ihrem Wildtyp-Hintergrund bzw. von anderen *Arabidopsis*-Mutanten unterscheiden.

Um erste Einblicke zu erhalten, wie Ozon-Wirkung, Jasmonat- und Ethylen-Signaltransduktion miteinander verknüpft sind, wurden weiterhin die ethyleninsensitive Mutante *ein2* und verschiedene Doppelmutanten (*jin1 x jin4*, *jin1 x ein2*) untersucht.

#### 3.2.1 Untersuchte Wildtypen, Mutanten und Doppelmutanten

Alle untersuchten Mutanten entstammen entweder dem WtC (Col-gl1 bzw. Col-0) oder WS-Hintergrund.

##### *rcd1*

Während der Ozonbehandlungen wurde die Mutante *rcd1* ("radical-induced cell death") als Positivkontrolle mitgeführt. Diese Mutante ist sensitiv gegenüber extrazellulären Sauerstoffradikalen und zeigt eine extensive Bildung von HR-ähnlichen Läsionen (Overmyer *et al.*, 2000). Deshalb ist sie als Kontrolle für eine erfolgreiche Ozonbehandlung besonders geeignet. *RCD1* gehört zur Unterfamilie der WWW-Domänen enthaltenen Proteine (Ahlfors *et al.*, 2004).

Overmyer *et al.* (2000) zeigten weiterhin, dass in der Mutante *rcd1* Ethylen an der Regulation der Läsionenausbreitung beteiligt ist, während Jasmonate in die Eindämmung von Läsionen involviert sind.

##### *ein2*

Die Mutante *ein2* ("ethylene insensitive") zeigt einen pleiotrophen ethyleninsensitiven Phänotyp. Das Gen, das in *ein2* gestört ist, kodiert ein Transmembranprotein mit einer Protein-Protein-Interaktionsdomäne. Es besitzt Homo-

logie zu Eisen-Ionen-Transportern (Alonso *et al.*, 1999). Overmyer *et al.* (2000) zeigten, dass sich *ein2* tolerant gegenüber Ozon verhält.

#### *jin1 und jin4*

Für die Mutanten *jin1* und *jin4* lagen zu Beginn der Arbeiten noch keine Erkenntnisse in Bezug auf ihr Verhalten gegenüber Ozon vor. Allerdings war für die zu *jin4* allele Mutante *jar1* eine erhöhte Ozonsensitivität publiziert worden (Overmyer *et al.*, 2000). In Untersuchungen der finnischen Arbeitsgruppe erwies sich auch die coronatininsensitive Mutante *coi1* als ozonsensitiver als ihr entsprechender Wildtyp (Jaakko Kangasjärvi, persönliche Mitteilung).

#### Doppelmutanten

Zur Erzeugung der Doppelmutanten wurden die gewünschten Mutanten miteinander gekreuzt und die segregierenden F2-Populationen auf Pflanzen selektiert, die für beide Loci homozygot sind.

#### Selektion von homozygoten *jin1 x jin4* Doppelmutanten

Die Selektion der F2 erfolgte zunächst auf MS-Platten mit 10µM MeJA. Pflanzen mit signifikant längeren Wurzeln als die Wildtypen wurden zur weiteren Selektion genutzt. Da *jin1* im Col-gl1 Hintergrund ist und somit keine Trichome besitzt, während *jin4* im WS-Hintergrund über Trichome verfügt, war dies ein weiteres Unterscheidungsmerkmal, das genutzt wurde.

Von *jin4* war bekannt, dass die Keimrate der Samen durch Applikation von ABA verringert ist (Berger *et al.*, 1996). Deshalb wurde zusätzlich die Keimung der Doppelmutanten unter Einfluss von ABA (5µM) auf MS-Platten getestet.

Nachdem alle Tests abgeschlossen waren, konnten vier Pflanzen als homozygot für sowohl den *jin1* - als auch den *jin4* -Locus bestimmt werden:

*jin1 x jin4* Linie A3

*jin1 x jin4* Linie C2

*jin1 x jin4* Linie C13

*jin1 x jin4* Linie C14

#### Selektion von homozygoten *jin1 x ein2* Doppelmutanten

Für die Selektion dieser Doppelmutanten wurde zunächst die verringerte Sensitivität von *jin1* gegenüber MeJA genutzt. F2 Pflanzen wurden auf MS-Platten mit 10µM MeJA ausgebracht und auf Wurzellänge selektiert. Pflanzen mit deutlich

längeren Wurzeln als der Wildtyp sind homozygot für den *jin1*-Locus. Samen von Nachkommen dieser Pflanzen wurden auf MS-Platten mit 40µM ACC (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure) ausplattiert und zwei Tage im Kühlschrank und fünf weitere Tage im Dunkeln wachsen gelassen. Die Selektion für den *ein2*-Locus erfolgte über das Fehlen der sogenannten "*triple response*" (Guzman & Ecker, 1990).

Aus der Kreuzung *jin1 x ein2* erwies sich nur die Linie E8 als homozygot für beide Loci.

### 3.2.2 Ozonbehandlungen

Es wurden drei voneinander unabhängige Ozonexperimente durchgeführt. Dabei wurden drei Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen sechs Stunden konstanten Ozonkonzentrationen von 250nl/l ausgesetzt. Bereits am Ende der Ozonbehandlung konnten bei einigen der getesteten Pflanzen Blattschäden beobachtet werden, die sich zunächst als sogenannte "*water-soaked spots*", d.h. etwas dunklere, wie mit Flüssigkeit gefüllt wirkende Stellen, erkennen lassen. Diese entwickelten sich dann im Laufe von 12 bis 48 Stunden zu kleinen punktförmigen, gelblich-weißen pergamentartigen Stellen oder großflächigen Läsionen (Abb.3.2.1).

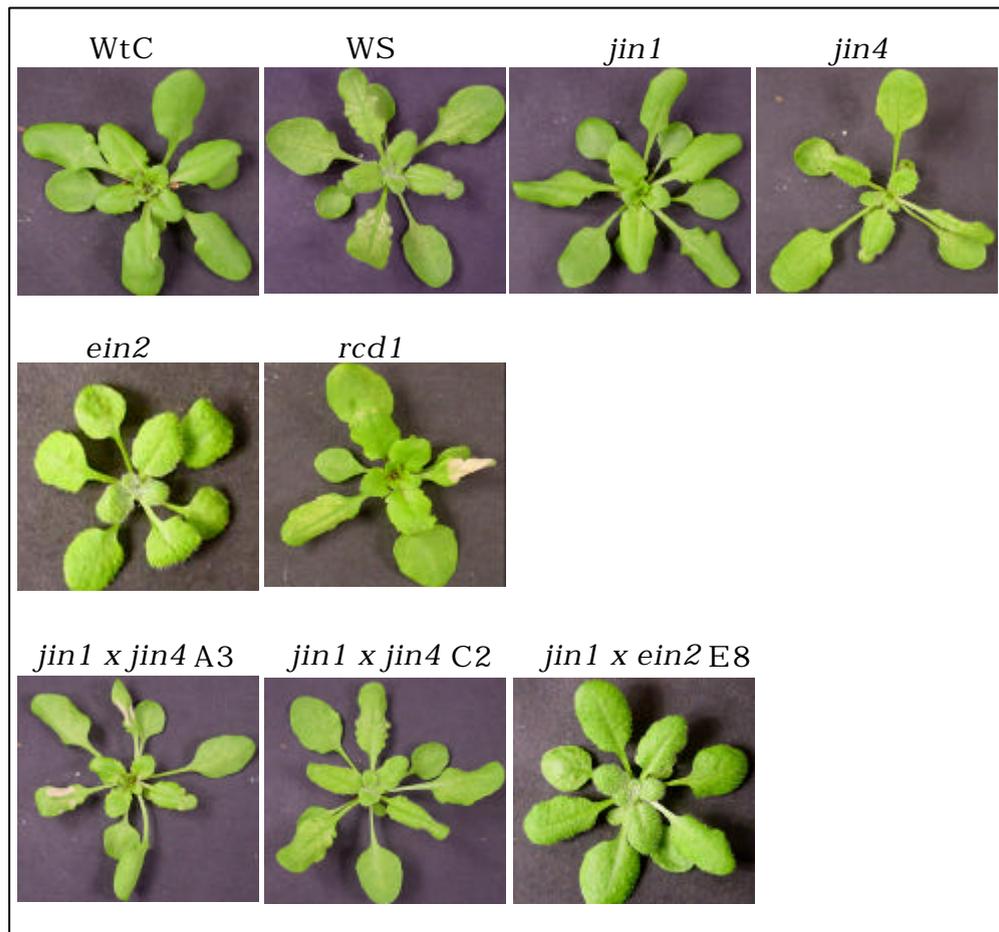


**Abbildung 3.2.1:** 48 Std. nach Beginn der Ozonbehandlung (6Std., 250nl/l); links: punktförmige gelblich-weiße pergamentartige Stellen; rechts: großflächige Läsionen.

Sechs und zwölf Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung wurde die Anzahl von Pflanzen mit "*water-soaked spots*" bestimmt. 48 Stunden nach Beginn der Behandlung wurde die endgültige Anzahl von Pflanzen mit Läsionen ermittelt (Abb.3.2.2 und Abb.3.2.3). Dabei zeigte sich, dass WtC, *jin1*, *ein2* sowie die Dop-

pelmutante *jin1 x ein2* (E8) nur in wenigen Fällen Läsionen entwickelten. Die bei diesen Pflanzen aufgetretenen Blattschäden waren auch nicht als großflächige Läsionen entwickelt, sondern nur als kleine punktförmige gelblich-weiße Stellen zu erkennen.

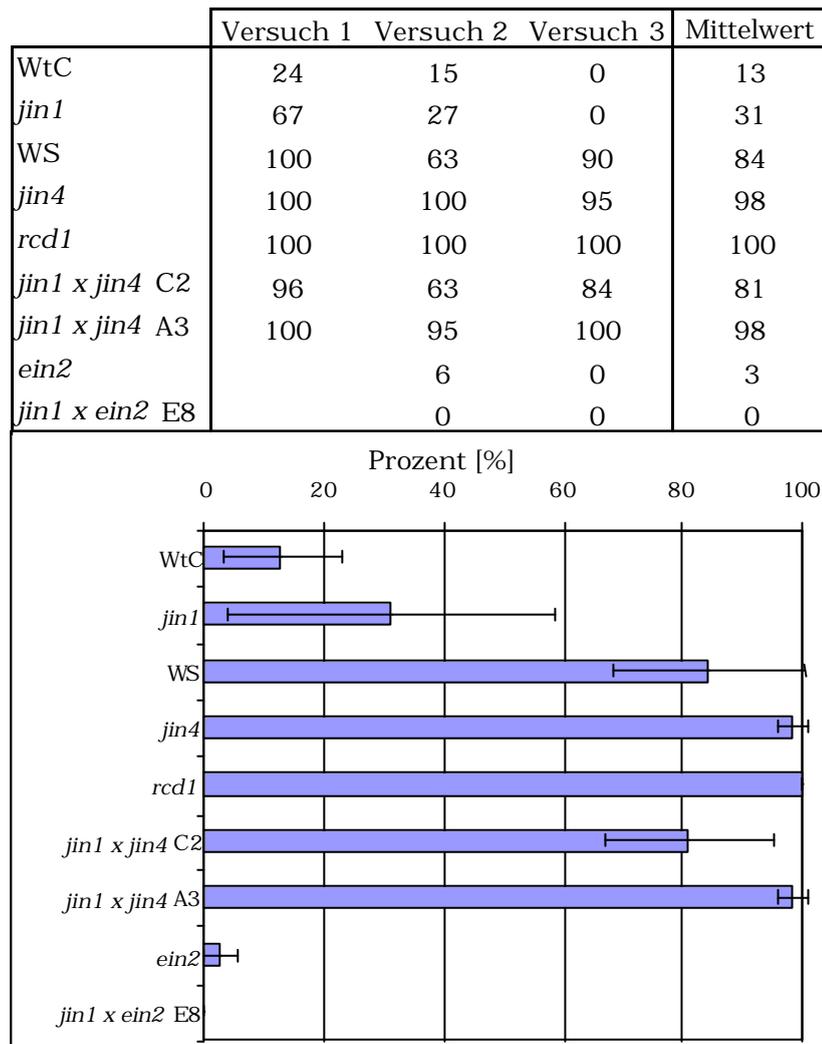
Somit sind die Mutanten *jin1* und *ein2* nicht ozonsensitiver als ihr entsprechender Wildtyp WtC. Dagegen wurden WS, *jin4* und die Doppelmutante *jin1 x jin4*



**Abbildung 3.2.2:** Pflanzen 48 Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung (6 Std., 250nl/l) mit Blattschäden / "water-soaked spots"

(Linien C2 und A3) durch Ozon stark geschädigt. Zwischen 84% (WS) und 98% (*jin1 x jin4* A3) der Pflanzen bildeten großflächige Läsionen und/oder zahlreiche kleinere punktförmige Blattschäden aus (Abb.3.2.3). Die Mutante *jin4* erscheint etwas empfindlicher gegenüber Ozon als der korrespondierende Wildtyp WS. Da aber diese Mutante im Hintergrund WS ist, lässt sich bei ihr nicht eindeutig sagen, inwieweit die erhöhte Ozonsensitivität auf den Einfluss des Wildtyps zurückzuführen ist. Die Doppelmutanten *jin1 x jin4* weisen ebenfalls eine erhöhte Ozonsensitivität auf, ähneln also in ihrem Phänotyp der *jin4* Mutante. Auch bei den

*jin1 x jin4* Doppelmutanten ist unklar, ob die gesteigerte Ozonsensitivität auf den WS-Hintergrund oder die *jin4*-Mutation zurückgeht. Da für die Mutante *jar1*, die zwar zu *jin4* allel ist, sich aber im Col-0-Hintergrund befindet, eine erhöhte Ozonsensitivität beschrieben wurde (Overmyer *et al.*, 2000), könnte die Untersuchung der Doppelmutante *jin1 x jar1* dieses Problem lösen. Leider stand diese Doppelmutante im Projektzeitraum nicht zur Verfügung.

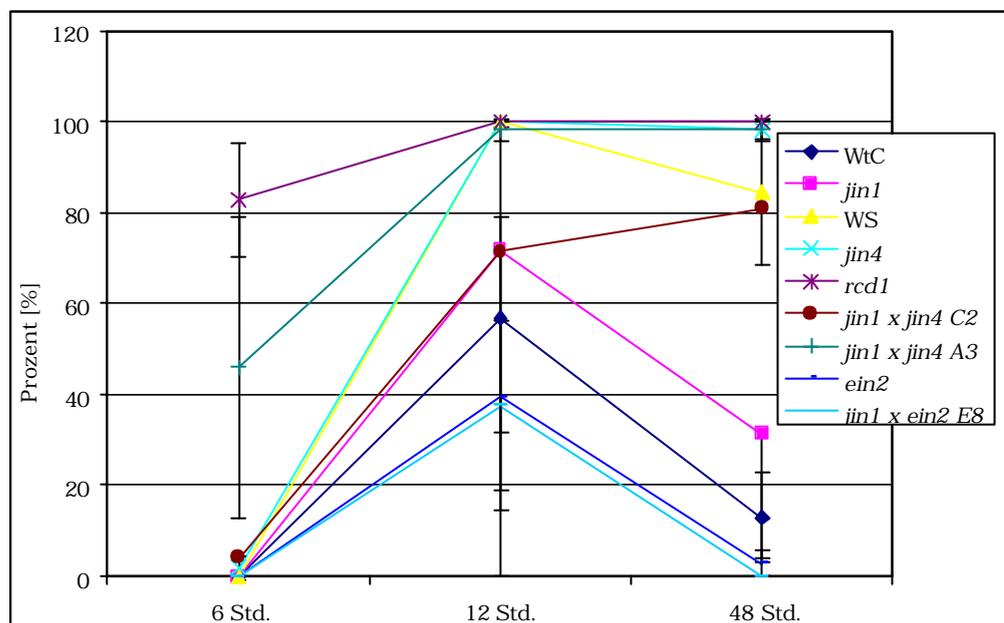


**Abbildung 3.2.3:** Anzahl von Pflanzen, die 48 Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung Läsionen zeigten (in % der gesamt behandelten Pflanzen). Im Diagramm ist der Mittelwert aus drei voneinander unabhängigen Ozonbehandlungen dargestellt.  $n = 50$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD

Sechs Stunden nach dem Beginn der Ozonbehandlung hatten sich in den meisten der untersuchten Mutanten und Wildtypen noch keine (WtC, WS, *jin1*, *ein2*, *jin1 x ein2* E8) oder nur sehr wenige (*jin4*, *jin1 x jin4* C2) "water-soaked spots" gebildet (Abb.3.2.4). In der anderen *jin1 x jin4* Doppelmutante (A3) hatten zu dem

Zeitpunkt bereits 46% der Pflanzen "water-soaked spots" entwickelt. In *rcd1* waren über 80% der untersuchten Pflanzen betroffen.

Zwölf Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung (und somit sechs Stunden nach deren Ende) konnten in allen untersuchten Mutanten und Wildtypen "water-soaked spots" beobachtet werden. Dabei hatten in WS, *jin4* und *rcd1* 100% der Pflanzen diese "spots" entwickelt. In *ein2* sowie in der Doppelmutante *jin1 x ein2* E8 war die Anzahl der Pflanzen mit "water-soaked spots" am geringsten (39,5 bzw. 37,5%); in *jin1* und *jin1 x jin4* C2 waren es ca. 71%. In der Doppelmutante *jin1 x jin4* A3 hatten bereits über 98% der Pflanzen visuelle Schäden an den Blättern.

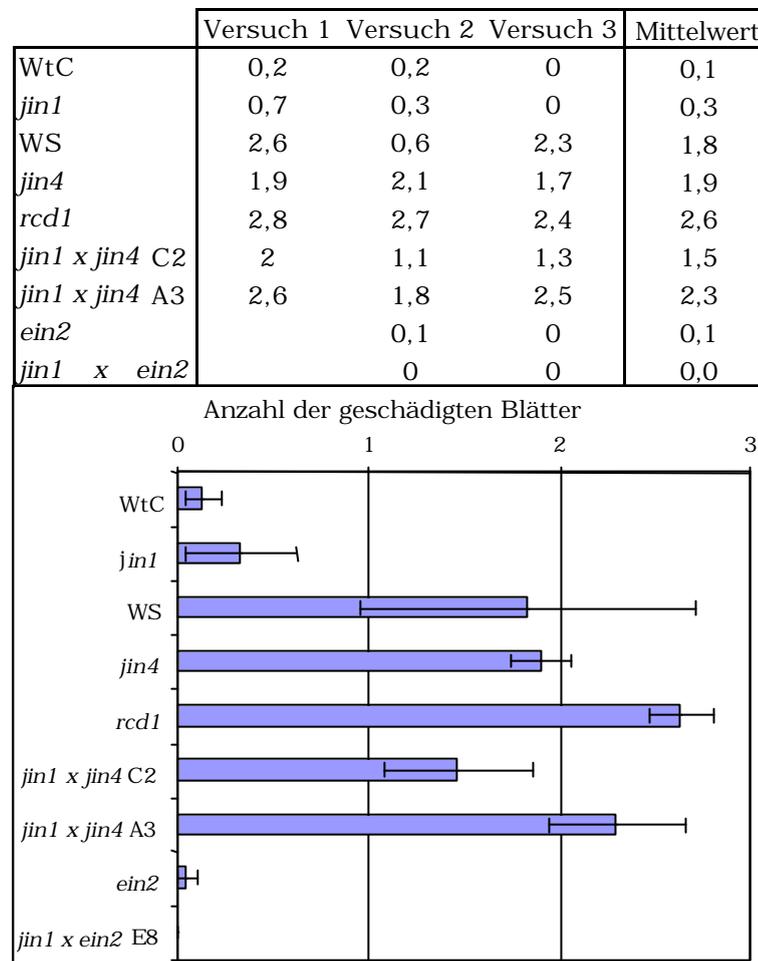


**Abbildung 3.2.4:** % der Pflanzen mit "water-soaked spots" bzw. Läsionen 6, 12 und 48 Stunden nach Beginn der Ozonbehandlungen (6 Std., 250nl/l) n = 50; Mittelwerte  $\pm$  SD

48 Stunden nach Beginn der Behandlung hatten sich in WtC, *ein2* und *jin1 x ein2* E8 bei den meisten Pflanzen die "water-soaked spots" zurückgebildet. Auch in *jin1* konnten nur bei ca. 30% der Pflanzen Läsionen beobachtet werden. Zahlreiche Läsionen wiesen dagegen WS, *jin4* und die beiden *jin1 x jin4*-Doppelmutanten auf.

Betrachtet man die Anzahl von Blättern pro Pflanze, die nach der Ozonbehandlung Läsionen entwickelt haben, bestätigt sich diese Tendenz. Während in WtC, den Mutanten *jin1*, *ein2* und *jin1 x ein2* E8 durchschnittlich weniger als ein Blatt pro Pflanze Läsionen entwickelte, sind es bei den anderen getesteten Mutanten

(*jin4* und *rcd1*) und Doppelmutanten *jin1 x jin4* Linie C2 und A2 sowie dem Ökotyp WS 1,5 bis 2,6 Blätter pro Pflanze (Abb.3.2.5).



**Abbildung 3.2.5:** Anzahl von Blättern mit Läsionen pro Pflanze 48 Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung (6 Std., 250nl/l). Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. n = 50; Mittelwerte  $\pm$  SD

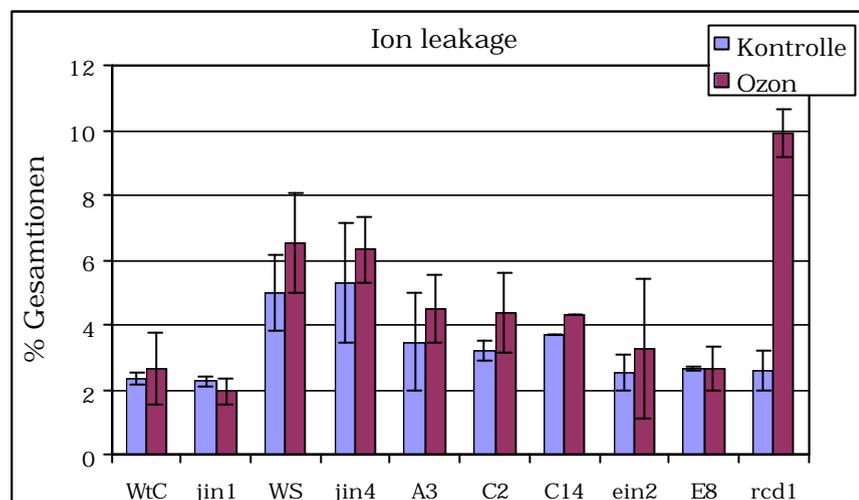
Eine in der finnischen Arbeitsgruppe etablierte Methode zur Quantifizierung des Zelltodes nach Ozonbehandlungen ist die Messung des "Ion leakage", der die relative Ionendurchlässigkeit der Zellmembranen und somit die Ozonsensitivität ausdrückt.

Der "Ion leakage" repräsentiert die Anzahl an Ionen, die aus den Blättern gelöst werden kann, d.h. je höher der gemessene "Ion leakage" ist, umso größer ist die Anzahl von Zellen mit defekter Plasmamembran.

Aus Abb.3.2.6 geht hervor, dass sich bereits die Wildtypen WtC und WS in ihrer Ozonsensitivität, widergespiegelt im "Ion leakage", deutlich unterscheiden. Die

Sensitivität der Mutanten *jin1*, *jin4* und *ein2* entspricht im Prinzip der des korrespondierenden Wildtyps. Deutlich erhöht ist der "Ion leakage" lediglich in der Mutante *rcd1* verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp WtC.

Für die untersuchten Doppelmutanten gestaltet sich die Aussage über die Ozonempfindlichkeit anhand des "Ion leakage" schwieriger. Die relative Ionendurchlässigkeit nach Ozonbehandlung in den *jin1 x jin4* Doppelmutanten ist nicht wesentlich erhöht, obwohl ähnlich großflächige Läsionen wie in der ozonsensitiven Mutante *rcd1* aufgetreten sind. In *ein2* und der *jin1 x ein2* Doppelmutante liegt der "Ion leakage" höher als man es durch die gering oder nicht ausgeprägten Läsionen nach der Ozonbehandlung erwarten würde.



**Abbildung 3.2.6:** relative Ionendurchlässigkeit der Blätter 2 Std. nach Beendigung der Ozonbehandlung (6Std., 250nl/l) n = 8; Mittelwerte + SD

Somit scheint der "Ion leakage" zwar im Fall der ozonsensitiven Mutante *rcd1* eine geeignete Methode zur Quantifizierung des Zelltodes nach Ozonbehandlung zu sein, im Fall der anderen untersuchten Mutanten erscheint diese Methode jedoch als unzureichend. Dies spiegelt sich auch in den extremen Schwankungen der Messungen, erkennbar an den überlappenden Fehlerbalken, wider.

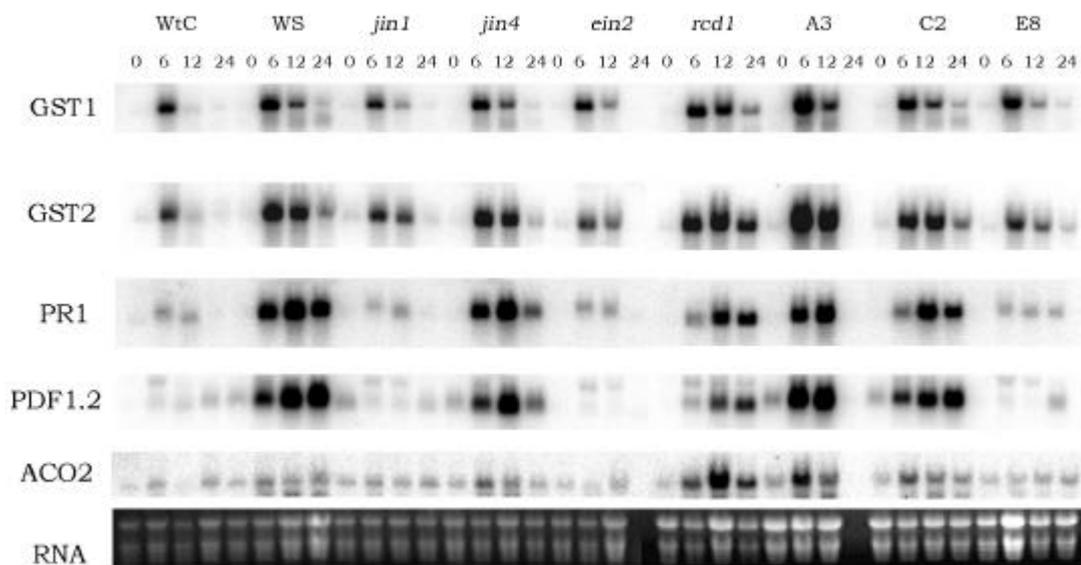
### 3.2.3 Expression ozonresponsiver Gene

In Northern-Blot-Analysen wurde die Expression von Genen untersucht, von denen z.T. bekannt war, dass sie in der ozonsensitiven Mutante *rcd1* nach Ozonbehandlung stärker induziert werden als im Wildtyp WtC (Ove rmyer *et al.*, 2000).

Untersucht wurde zunächst das Expressionsmuster von *GST1* und *GST2*, die beide Glutathion-S-Transferasen kodieren.

Wie die Abb.3.2.7 zeigt, sind die mRNA-Spiegel von *GST1* und *GST2* in den Pflanzen erhöht, die auch größere Blattschäden nach der Ozonbehandlung zeigen, also in *rcd1*, WS, *jin4* und den Doppelmutanten *jin1 x jin4* Linie A3 und C2. Die Akkumulation trat bereits nach sechs Stunden Ozonbehandlung auf und dauerte in einzelnen Pflanzen bis zu 24 Stunden an. In Pflanzen, die weniger oder keine Blattschäden zeigten, akkumulierten ebenfalls die Transkripte von *GST1* und *GST2*, sanken aber nach 12 bzw. 24 Stunden wieder auf das Niveau der unbehandelten Kontrollen.

Ein ähnliches Expressionsmuster zeigen auch *PR1* und *PDF1.2* nach Ozonbehandlung. Auch hier korreliert die Expression mit den beobachteten Ozonschäden der Blätter. Das maximale Transkriptlevel wird 12 Stunden nach der Ozonbehandlung erreicht. Hohe *PR1*- und *PDF1.2*-mRNA-Spiegel finden sich auch nach 24 Stunden noch in den Pflanzen, die stark durch Ozon geschädigt werden.



**Abbildung 3.2.7:** Expression von *GST1*, *GST2*, *PR1*, *PDF1.2* und *ACO2* nach Ozonbehandlung (6 Std., 250nl/l). Beladungskontrolle: EtBr-gefärbtes Gesamt-RNA-Gel; es wurden 8µg Gesamt-RNA geladen

*AtAco2* kodiert eine ACC-Oxidase (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure-Oxidase) (Raz & Ecker, 1999), die die Umwandlung von ACC (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure) in Ethylen katalysiert. Hohe Transkriptmengen finden sich in *rcd1* und den *jin1 x jin4* Doppelmutanten, aber auch in WS und *jin4*, also in jenen Pflanzen, die auf Ozonbehandlung sensitiv reagieren.

### 3.3 Kartierung des *jin1* Locus

#### 3.3.1 Vorarbeiten (Grobkartierung)

Die Mutante *jin1* entstand durch Röntgenbestrahlung (50 krad) von *Arabidopsis thaliana* Samen (WtC). Nach Selbstung wurden Samen der M2-Generation auf Medium mit 75µM MeJA ausgelegt und die Pflanzen selektiert, die ein stärkeres Wurzelwachstum als der Wildtyp und somit einen jasmonatinsensitiven Phänotyp zeigten (Berger *et al.*, 1996).

Um das in *jin1* mutierte Gen über kartengesteuerte Klonierung ("map-based cloning") zu isolieren, wurden homozygote *jin1*-Pflanzen mit dem Ökotyp Landsberg *erecta* gekreuzt. Da der *jin1* Phänotyp rezessiv vererbt wird, wurde durch diese Kreuzung und anschließende Selbstung eine für den mutanten Phänotyp segregierende F2-Generation erhalten. Für das Ökotypenpaar Columbia und Landsberg *erecta* sind viele Polymorphismen und molekulare Marker bekannt, die im Weiteren zur Kartierung des *jin1* Mutationsortes genutzt werden konnten.

Vorarbeiten zur Grobkartierung mittels SSLP-Markern (durchgeführt von Dr. Susanne Berger) lokalisierten die *jin1* Mutation auf Chromosom 1 (Tab.3.3.1).

Marker	nga63	nga111	nga1126	nga168	nga126	nga6	nga8	nga1139	nga151	nga76	nga129
<b>Chromosom</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>AGI in kb</b>		27356 - 27357		16298 - 16299		23042 - 23042	5628 - 5628	16444 - 16444	4669 - 4670	10418 - 10418	
<b>RI in cM</b>	11,48	115,55	50,65	73,77	16,35	86,41	26,56	83,41	29,62	68,40	105,41
<b>Pflanzen gesamt</b>	66	66	60	62	36	68	64	12	66	62	64
<b>C</b>	38	35	29	33	21	32	34	9	32	29	35
<b>L</b>	28	31	31	29	15	36	30	3	34	33	29

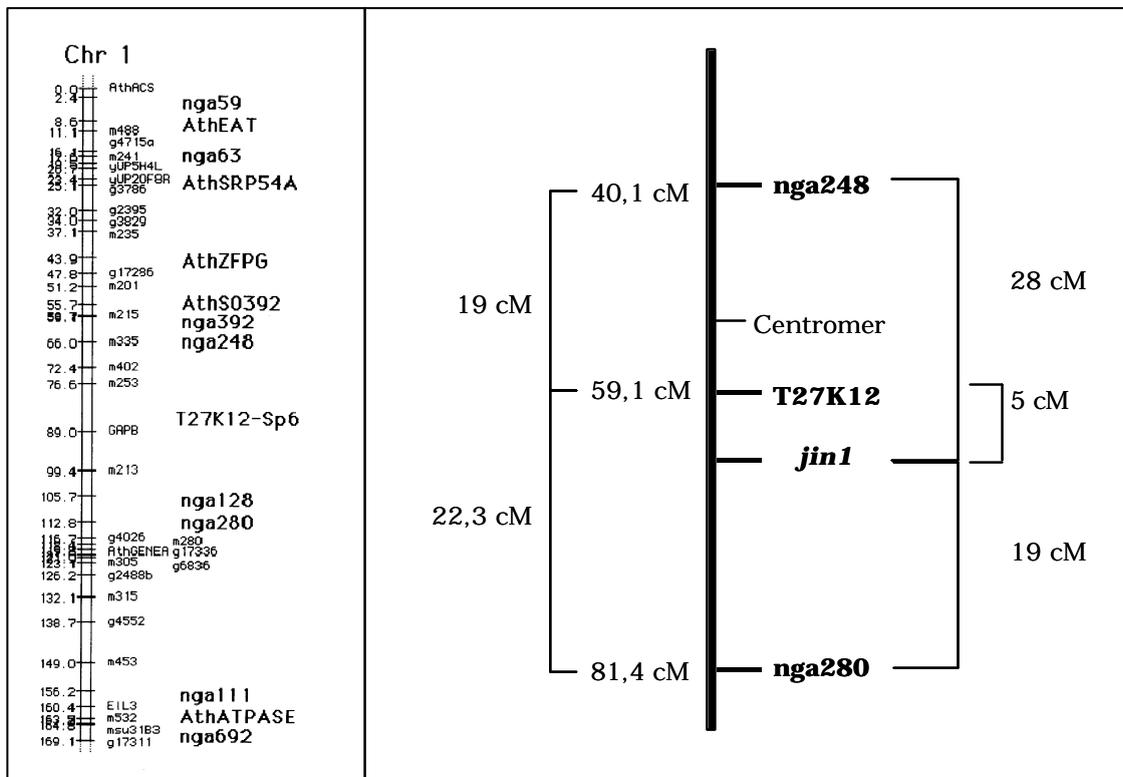
**Tabelle 3.3.1:** Lokalisierung der *jin1*-Mutation auf Chromosom 1. (Daten von S. Berger)

Zur weiteren Kartierung wurden von S. Berger auf Chromosom 1 liegende SSLP-Marker genutzt (Tab.3.3.2). Mit diesen Markern gelang es, den vermutlichen Mutationsort von *jin1* weiter einzuschränken.

Marker	nga63	nga248	T27K12	nga280	nga111
<b>AGI in kb</b>				20877 - 20877	27356 - 27357
<b>RI in cM</b>	11.48 cM	42.17 cM	61.21	83.83	115.55 cM
<b>CC</b>	11	41	227	139	11
<b>LL</b>	6	1	1	4	9
<b>CL</b>	16	28	23	53	13
<b>Pflanzen gesamt</b>	33	70	251	196	33
<b>P</b>	0.42	0.21	0.05	0.16	0.47
<b>D in cM (Haldane)</b>	<b>94,4</b>	<b>28,0</b>	<b>5,2</b>	<b>18,6</b>	<b>140,2</b>

**Tabelle 3.3.2:** Grobkartierung der *jin1*-Mutation (Daten von S. Berger)

Über die Berechnung der genetischen Distanz ergab sich für den gesuchten Mutationsort eine Lokalisation ca. 5cM südlich des Markers T27K12 (Abb.3.3.1).



**Abbildung 3.3.1:** links: Übersicht Chromosom 1; rechts: vermutete Position des *jin1*-Mutationsortes (übernommen von S. Berger)

### 3.3.2 Feinkartierung von *jin1*

Zur Feinkartierung wurde eine neue Kartierungspopulation mit größerer Individuenzahl erstellt. Samen der F<sub>2</sub>-Generation aus der Kreuzung Landsberg *erecta* x *jin1* wurden auf MeJA-haltigem MS-Medium auf Pflanzen selektiert, die den Mutantenphänotyp zeigen und somit am *jin1*-Locus homozygot sein müssen. DNA dieser Pflanzen wurden nun in PCRs mit verschiedenen molekularen Markern getestet.

Die Berechnung der genetischer Distanz (D) zwischen molekularen Markern erfolgte über die Rekombinationshäufigkeit (p) zwischen molekularen Markern im Genom von F<sub>2</sub>-Pflanzen der Kartierungspopulation.

$$p = \frac{h + 2b}{2n} \quad \text{SR} = \pm \sqrt{\frac{p(1-p)}{2n}}$$

- p      Rekombinationsfrequenz  
h      Anzahl heterozygot rekombinanter F<sub>2</sub>-Pflanzen  
b      Anzahl homozygot rekombinanter F<sub>2</sub>-Pflanzen  
n      Anzahl getesteter F<sub>2</sub>-Pflanzen  
SR     Standardabweichung (Rekombinationsfrequenz)

$$r = 100 * p$$

$$D = -50 \ln\left(1 - \frac{r}{50}\right) \quad \text{SD} = \frac{50}{50 - r} * \text{SR}$$

- r      % Rekombination  
D      genetische Distanz nach Haldane (in cM)  
SD     Standardabweichung (genetische Distanz)

In Tab.3.3.3 sind die Ergebnisse der neuen Kartierung dargestellt. Es zeigte sich, dass die *jin1*-Mutation möglicherweise nicht südlich des Markers T27K12 liegt, sondern sich auch auf der anderen Seite des Centromers südlich des Markers F5D14 befinden kann.

Marker	F13K9	F28K20	F5D14	F6N18	F9L11	F23M19	F28J9	Centromer
AGI (kb)	9713 - 9840	11088 - 11165	11638 - 11765	11789 - 11882	11880 - 12003	12446 - 12534	13718 - 13834	ca. 15000
RI (cM)				51.5				
CL	30	11	1	0	0	0	0	
p	0.08	0.03	0.003					
D in cM (Haldane)	8,8	3,1	0,3					

Centromer	T27K12	F2J6	F28H19	F9C16	T18F15	T12C22	F27F5	F2G19	T3F24	F14J22
ca. 15000		16444 - 16552	16526 - 16657	16642 - 16764	16808 - 16890	16889 - 17005	16976 - 17113	17170 - 17303	17332 - 17409	18335 - 18440
	61.22									
	0	0	0	0	3	5	7	15	15	37
					0.01	0.01	0.02	0.04	0.04	0.10
					0,8	1,4	1,9	4,2	4,2	11,2

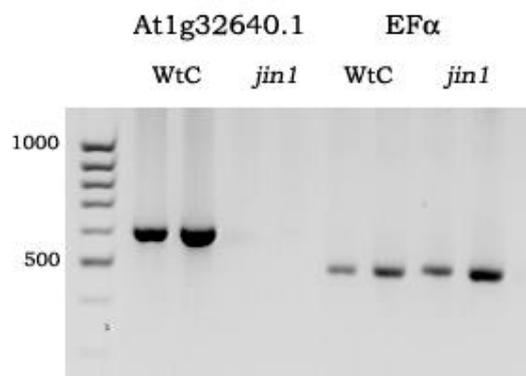
**Tabelle 3.3.3:** Ergebnisse der Feinkartierung mit neuer Kartierungspopulation. Pro Marker wurden zwischen 202 und 572 Chromosomen getestet.

Mit einer Vergrößerung der Kartierungspopulation auf 600 Pflanzen sollten weitere rekombinante Pflanzen gefunden werden, um den Mutationsort weiter einzugrenzen. Leider war es mit dieser Population nicht möglich, rekombinante Pflanzen zwischen dem Centromer und dem Marker F6N18 zu finden. Ein Grund dafür könnte zum einen die unmittelbare Nähe des Mutationsortes sein. Das Fehlen

von Rekombination in diesem Bereich kann aber auch auf die Nähe zum Centromer zurückzuführen sein.

Während eines Treffens an der Universität de Fribourg (Schweiz) sprach Roberto Solano (Departamento de Genetica Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología, CNB-CSIC, Madrid, Spain) über fünf neue jasmonatinsensitive *Arabidopsis*-Mutanten (*jai*), von denen eine (*jai1*) vermutlich zu *jin1* allel ist. *jai1* ist auf Chromosom 1 lokalisiert und wurde von der spanischen Arbeitsgruppe auf dem BAC F6N18 kartiert. Bei dem in *jai1* mutierten Gen handelt es sich um *AtMyc2* (At1g32640.1), das einen MYC Transkriptionsfaktor kodiert.

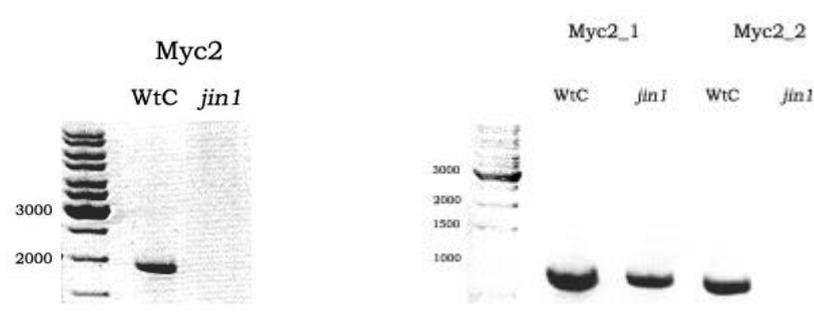
Um zu überprüfen, ob dieses Gen in *jin1* defekt ist, wurden RT-PCRs auf At1g32640.1 durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass in *jin1* mit diesen Primern kein PCR-Produkt erhalten wird (Abb.3.3.2) und somit in diesem Gen eine Veränderung vorliegen muss.



**Abbildung 3.3.2:** RT-PCR At1g32640.1 in WtC und *jin1* (jeweils Doppelproben). 40 Zyklen.  
Kontrolle: Elongationsfaktor EF $\alpha$ .  
At1g32640.1 F: GAT CAC TCC GAT CTA GAAG C  
At1g32640.1 R: ATT TTT GAA ATC AAA CTT GCT C

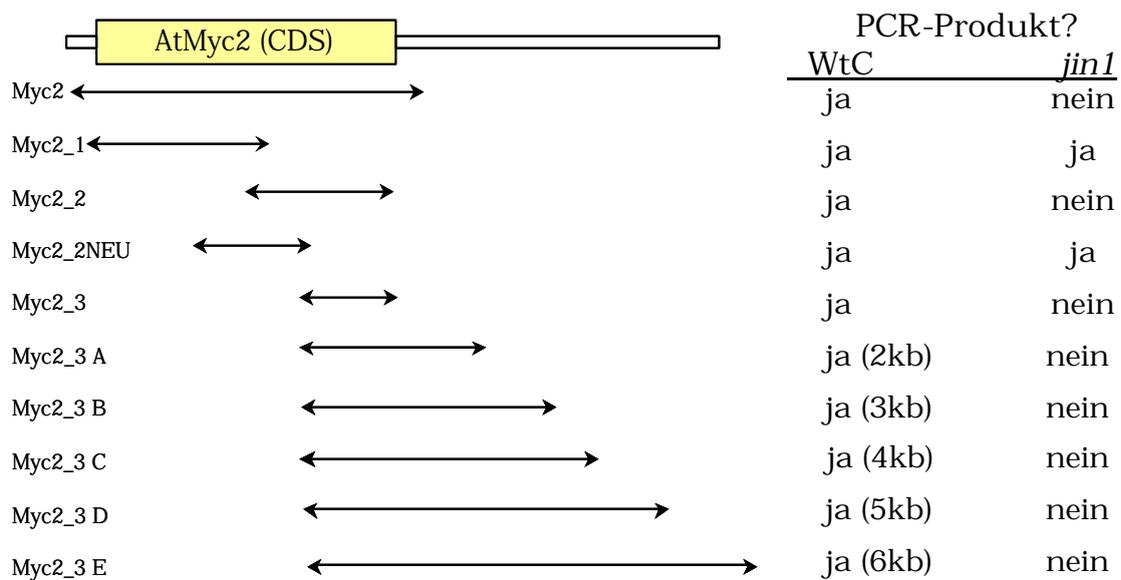
### 3.4 Sequenzierung von *AtMyc2* in *jin1*

Die Sequenzierung von *AtMyc2* gestaltete sich schwierig, da es nicht möglich war, das komplette Gen in der Mutante *jin1* mittels Standard-PCR zu amplifizieren (Abb.3.3.3). Auch Versuche, nur bestimmte Abschnitte des Gens zu amplifizieren, scheiterten in *jin1*, wenn sich der Rückwärts-Primer im letzten Teil der *AtMyc2*-Sequenz befand (Abb.3.3.4).



**Abbildung 3.3.3:** Versuche zur Amplifizierung von *AtMyc2* in WtC und *jin1* mittels Standard-PCR.

Versuche, den in *jin1* vermutlich veränderten letzten Abschnitt von *AtMyc2* zu überbrücken, erfolgten mit den Primern Myc2\_3 A bis Myc2\_3 E (Abb.3.3.4). Aber auch hier gelang es nur, den Bereich im Wildtyp zu amplifizieren, nicht jedoch in *jin1*.



**Abbildung 3.3.4:** Übersicht über die zur Amplifizierung von *AtMyc2* genutzten Primer

Bei der Sequenzierung des ersten Teils von *AtMyc2* in *jin1* wurde eine Punktmutation (Basenaustausch: Thymin statt Cytosin) in Position 725 gefunden (Abb.3.3.5), die in der Aminosäuresequenz in Position 242 zu einem Austausch von Leucin durch Serin führt (Abb.7.1 im Anhang).

Mit Hilfe der inversen PCR, die unbekannte Sequenzen durch eine PCR mit auswärts gerichteten Primern amplifiziert, gelang es, den letzten Teil der *AtMyc2*-Sequenz in *jin1* zu amplifizieren. Das erhaltene PCR-Produkt wurde in den pCR®2.1 TOPO Vektor (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert und anschließend mit vektorspezifischen Primern sequenziert.

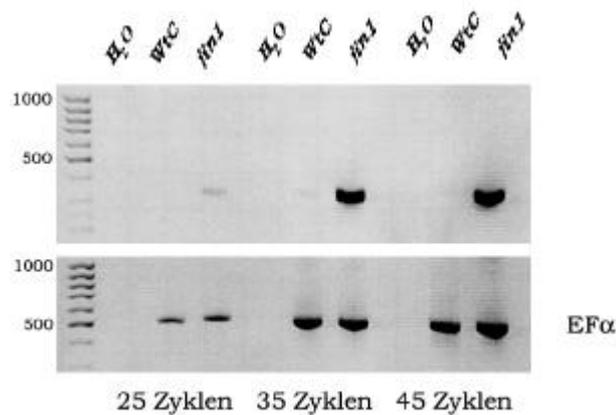
Zur Bestätigung der erhaltenen Sequenz wurde unter Nutzung der 3'RACE-PCR ebenfalls der letzte Abschnitt von *AtMyc2* in *jin1* amplifiziert, in den pCR®2.1 TOPO Vektor kloniert und ebenfalls mit vektorspezifischen Primern sequenziert. Die Auswertung der mit den beiden unterschiedlichen Methoden erhaltenen Sequenzen zeigt, dass in *jin1* die kodierende *AtMyc2*-Sequenz durch ein vorzeitiges STOP-Codon (TAG) um 90 Basenpaare verkürzt ist (Abb.3.3.5). Dies führt zu einer Verkürzung des Proteins um 30 Aminosäuren (Abb.7.1 im Anhang).

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
<i>jin1</i>	ATGACTGATTACCGGCTACAACCAACGATGAATCTTTGGACCACCGAGGACAACGCTTCTATGATGGAAGCTTTCATGAGCTCTCCGATATCTCAACTT									
<i>AtMYC2</i>	ATGACTGATTACCGGCTACAACCAACGATGAATCTTTGGACCACCGAGGACAACGCTTCTATGATGGAAGCTTTCATGAGCTCTCCGATATCTCAACTT									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
<i>jin1</i>	TATGGCCTCCGGCTCGACGACAACCAACGACCGGCGACTGAAACAACCTCCGACCGCGGATGGAGATTCGGCACAGGCGGATTAATCAAGAGAC									
<i>AtMYC2</i>	TATGGCCTCCGGCTCGACGACAACCAACGACCGGCGACTGAAACAACCTCCGACCGCGGATGGAGATTCGGCACAGGCGGATTAATCAAGAGAC									
	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
<i>jin1</i>	TCTTCAGCAACGTTTACAAGCTTTGATTGAAGGAAACACACGAGGTTGGACCTACGCTATATTTCTGGCAACCGTCGTATGATTTCTCCGGCCCTCCGTG									
<i>AtMYC2</i>	TCTTCAGCAACGTTTACAAGCTTTGATTGAAGGAAACACACGAGGTTGGACCTACGCTATATTTCTGGCAACCGTCGTATGATTTCTCCGGCCCTCCGTG									
	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
<i>jin1</i>	CTCGGATGGGGAGATGGTTATTACAAAGTGAAGAAGATAAAGCAAACCCGAGACGGAGATCGAGTTCGCCGCCGTTTCTACTCCGGCGGATCAGGAGT									
<i>AtMYC2</i>	CTCGGATGGGGAGATGGTTATTACAAAGTGAAGAAGATAAAGCAAACCCGAGACGGAGATCGAGTTCGCCGCCGTTTCTACTCCGGCGGATCAGGAGT									
	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
<i>jin1</i>	ACAGGAAAAAAGTGTGAGAGAGCTTAACCTCGTGTCTCCGGTGGTGTGCTCCGTCGGATGACGCTGTTGATGAGGAGGTGACGGATACGGATGGTT									
<i>AtMYC2</i>	ACAGGAAAAAAGTGTGAGAGAGCTTAACCTCGTGTCTCCGGTGGTGTGCTCCGTCGGATGACGCTGTTGATGAGGAGGTGACGGATACGGATGGTT									
	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
<i>jin1</i>	TTTCTTGGTTTCGATGACGACAGCTTCGCTTCCGCTGCGGATAGCTGGTAAAGCGTTTGAACGGGTAACCGGTTTGGGTTCCGGGTCAGATCAA									
<i>AtMYC2</i>	TTTCTTGGTTTCGATGACGACAGCTTCGCTTCCGCTGCGGATAGCTGGTAAAGCGTTTGAACGGGTAACCGGTTTGGGTTCCGGGTCAGATCAA									
	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
<i>jin1</i>	TTATCCGGTCCGGTGTGAACGGGTAAGCAAGGAGGAGTGTGGGATGCATACTATTGCGTGTATTCCTCCGGCAACGGAGTTGTGGAAGTCCGGT									
<i>AtMYC2</i>	TTATCCGGTCCGGTGTGAACGGGTAAGCAAGGAGGAGTGTGGGATGCATACTATTGCGTGTATTCCTCCGGCAACGGAGTTGTGGAAGTCCGGT									
	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
<i>jin1</i>	CAACGGAGCCGATCCGACAGAGTTGGACCTTATTAACAGGTTTCGAATCTTTCAATTCGACGGCGGAGCTGGAGATTTATCCGGTCTTAATGGAA									
<i>AtMYC2</i>	CAACGGAGCCGATCCGACAGAGTTGGACCTTATTAACAGGTTTCGAATCTTTCAATTCGACGGCGGAGCTGGAGATTTATCCGGTCTTAATGGAA									
	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
<i>jin1</i>	TCTTGACCCGGATCAAGGTGAGAACGACCCGCTATGTGGATTAATGACCCGATGGAAACACCTGGATCTAACGAACCCGGTAAACGGAGCTCCAAGTTCT									
<i>AtMYC2</i>	TCTTGACCCGGATCAAGGTGAGAACGACCCGCTATGTGGATTAATGACCCGATGGAAACACCTGGATCTAACGAACCCGGTAAACGGAGCTCCAAGTTCT									
	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000
<i>jin1</i>	AGCTCCAGCTTTTTTCAAAGTCTATTCAAGTTTGAAGCCGTTAGCTCAAGCACAAATAACCGAAAACCCGAATCTGGATCCGACTCCGAGTCCGGTTCATT									
<i>AtMYC2</i>	AGCTCCAGCTTTTTTCAAAGTCTATTCAAGTTTGAAGCCGTTAGCTCAAGCACAAATAACCGAAAACCCGAATCTGGATCCGACTCCGAGTCCGGTTCATT									
	1010	1020	1030	1040	1050	1060	1070	1080	1090	1100
<i>jin1</i>	CTCAGACCCAGAATCCGAAATCAATAACTTTCTCCGAGAATTAATTTTTTCGACGCTCAAGTCTACTTTAGTGAACCAAGATCCGGCGAGATATT									
<i>AtMYC2</i>	CTCAGACCCAGAATCCGAAATCAATAACTTTCTCCGAGAATTAATTTTTTCGACGCTCAAGTCTACTTTAGTGAACCAAGATCCGGCGAGATATT									
	1110	1120	1130	1140	1150	1160	1170	1180	1190	1200
<i>jin1</i>	AAACTTCGGCGATGAAGTAAACGAAGCTCCGAAAACCCGGATCCAAGTTCTTATTCGGGTCAAACACAATTCGAAAACAAAAGAGAGGTTCGATGGTT									
<i>AtMYC2</i>	AAACTTCGGCGATGAAGTAAACGAAGCTCCGAAAACCCGGATCCAAGTTCTTATTCGGGTCAAACACAATTCGAAAACAAAAGAGAGGTTCGATGGTT									
	1210	1220	1230	1240	1250	1260	1270	1280	1290	1300
<i>jin1</i>	TTGAACGAAGATAAAGTTCTATCATTCCGAGATAAAAACCGCGGAGAATCAGATCACTCCGATCTAGAAGCTTCCGTCGTGAAAGAAGTAGCAGTAGAGA									
<i>AtMYC2</i>	TTGAACGAAGATAAAGTTCTATCATTCCGAGATAAAAACCGCGGAGAATCAGATCACTCCGATCTAGAAGCTTCCGTCGTGAAAGAAGTAGCAGTAGAGA									
	1310	1320	1330	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
<i>jin1</i>	AACGTCCAAAGAAACGAGGAAGAAAGCCAGCAAACGGTAGAGAAGAGCCACTAAACCAGTCAAGCAGAGAGACAAAGACGCGAGAACTAAACCAAG									
<i>AtMYC2</i>	AACGTCCAAAGAAACGAGGAAGAAAGCCAGCAAACGGTAGAGAAGAGCCACTAAACCAGTCAAGCAGAGAGACAAAGACGCGAGAACTAAACCAAG									
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470	1480	1490	1500
<i>jin1</i>	ATTCTACGCGTTACGAGCGGTTGTACCAAACGTTTCAAATAATGGATAAAGCTTCGTTACTCGGTGACGCAATCGTTACATCAACGAGCTTAAATCCAAA									
<i>AtMYC2</i>	ATTCTACGCGTTACGAGCGGTTGTACCAAACGTTTCAAATAATGGATAAAGCTTCGTTACTCGGTGACGCAATCGTTACATCAACGAGCTTAAATCCAAA									
	1510	1520	1530	1540	1550	1560	1570	1580	1590	1600
<i>jin1</i>	GTAGTCAAACAGAGTCAGAGAACTCCAATCAAGAACCAGCTCGAGGAAGTGAACCTCGAGCTCGCCGGAAGAAAAGCCGAGTCTAGTGGAGAGATA									
<i>AtMYC2</i>	GTAGTCAAACAGAGTCAGAGAACTCCAATCAAGAACCAGCTCGAGGAAGTGAACCTCGAGCTCGCCGGAAGAAAAGCCGAGTCTAGTGGAGAGATA									
	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
<i>jin1</i>	TGTCGCTTCCGTTCTTCGATTAAACCCGTTGGGATGGAGATTGAAGTGAAGATAAATGGTTGGGACGCAATGATTAGAGTTGAATCTAGTAAGAGGAA									
<i>AtMYC2</i>	TGTCGCTTCCGTTCTTCGATTAAACCCGTTGGGATGGAGATTGAAGTGAAGATAAATGGTTGGGACGCAATGATTAGAGTTGAATCTAGTAAGAGGAA									
	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
<i>jin1</i>	TCATCCGGCGGAGGTTGATGTCGGGTTGATGGATTTGGAGTTGGAAGTGAATCAGCGAGTATGCTCCGGATCCAGTAG.....									
<i>AtMYC2</i>	TCATCCGGCGGAGGTTGATGTCGGGTTGATGGATTTGGAGTTGGAAGTGAATCAGCGAGTATGCTCCGGATCCAGTAG.....									
	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870			
<i>jin1</i>	.....									
<i>AtMYC2</i>	ACGGTGAAGATGGGTTTAGGATCTATACCAAGACAGCTCAGAGCAAGTTTGATTCAAAAATCCGGTTAA									

Abbildung 3.3.5: *AtMyc2*-Sequenz im Wildtyp und *jin1*. Unterschiede sind rot markiert.

Sequenzvergleiche mit Hilfe des BLAST-Algorithmus zeigen, dass in *jin1* der letzte Teil der *AtMyc2*-Sequenz durch eine Sequenz aus einem anderen Bereich des Genoms ersetzt ist. Dieser Bereich weist 100% Homologie zu dem ORF At1g44070 auf dem BAC F9C16 (bzw. T7O23) auf, der für ein Gen der CACTA-ähnlichen Transposon-Familie kodiert. Weitere Homologien zu CACTA-ähnlichen Transposons finden sich in 46 anderen ORFs im *Arabidopsis*-Genom (Abb.7.2 im Anhang).

Zur Bestätigung der erhaltenen Sequenz wurden Primer verwendet, die vorwärts in der noch unveränderten *AtMyc2*-Sequenz und rückwärts im Bereich des ORF At1g44070 binden. Wie Abb. 3.3.6 zeigt, wird mit diesen Primern nur in *jin1* ein PCR-Produkt amplifiziert, nicht jedoch im Wildtyp.



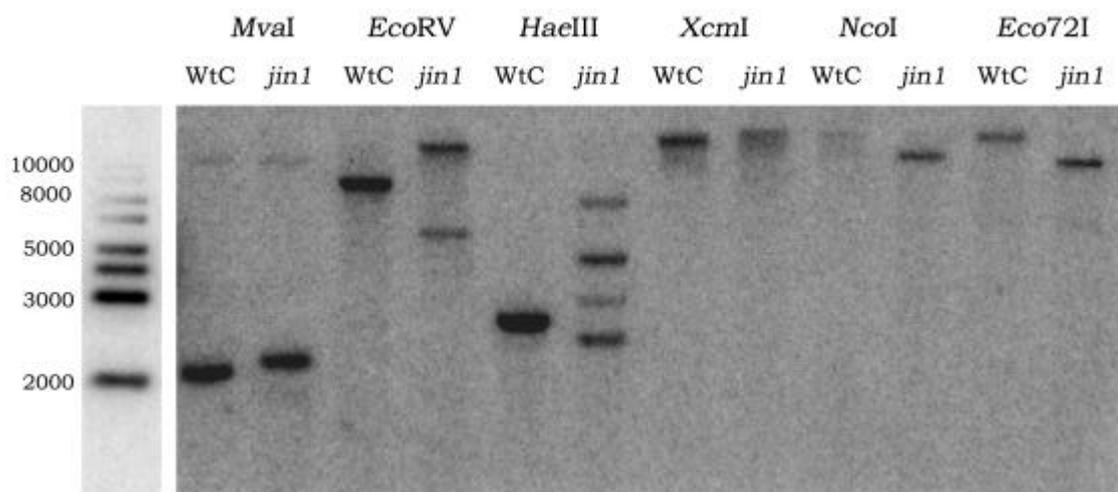
**Abbildung 3.3.6:** PCR zur Bestätigung der Sequenz in *jin1*.  
 MycNEU F: CAG AGA AAC TCC AAA TCA AGA ACC A  
 R: TCT ACG CGA GAA GAG CTG AAG AAT A

### Southern Blot Analyse

Für Southern Blot Analysen wurden Restriktionsenzyme verwendet, die entweder in der *AtMyc2*-Sequenz (*EcoRV*, *HaeIII*, *Eco72I*), innerhalb der SONDENSEQUENZ (*MvaI*) oder nicht innerhalb von *AtMyc2* (*XcmI*, *NcoI*) schnitten (Abb.3.3.7 und Abb.7.3 im Anhang). Mit allen verwendeten Enzymen können Unterschiede im Bandenmuster zwischen WtC und *jin1* nachgewiesen werden. Die erhaltenen Banden unterschieden sich sowohl in der Größe (*MvaI*, *XcmI*, *NcoI* und *Eco72I*) als auch in der Anzahl (*EcoRV* und *HaeIII*). Mit dem Restriktionsenzym *MvaI*, das

innerhalb der Sondensequenz schneidet, wurden im Wildtyp und in *jin1* je zwei Banden erhalten, wobei die größere Bande (ca. 10kb) deutlich schwächer als die kleinere Bande (ca. 2,1kb in WtC bzw. 2,3kb in *jin1*) ist. Nach Verdau mit *XcmI*, *NcoI* und *Eco72I* kann sowohl in WtC als auch in *jin1* nur eine Kopie des Gens nachgewiesen werden. Dies spricht dafür, das *AtMyc2* im *Arabidopsis*-Genom nur einmal vorkommt.

Mit den Enzymen *EcoRV* und *HaeIII* werden in *jin1* mehr Banden als in WtC erhalten. Die Punktmutation in Position 725 führt nicht zu einer neuen Schnittstelle für diese Enzyme und erklärt somit nicht das Auftreten von zusätzlichen Banden in *jin1*. Da *EcoRV* und *HaeIII* auf Methylierungen sensitiv reagieren, ist es möglich, dass die *jin1*-DNA von diesen Enzymen nur partiell verdaut wurde. Für eine stärkere Methylierung der DNA in *jin1* spricht das Vorhandensein des CACTA-ähnlichen Transposons. Das Auftreten von Transposons führt häufig zur Heterochromatisierung von Chromosomenabschnitten (Miura *et al.*, 2004).



Enzym	<b>MvaI</b>	<b>EcoRV</b>	<b>HaeIII</b>	<b>XcmI</b>	<b>NcoI</b>	<b>Eco72I</b>
Sequenz	T CC^AGG GGT^CC A	GAT^ATC CTA^TAG	GG^CC CC^GG	GAANN^NNTTC CTTNN^NNAAG	C^CATGG GGTAC^C	CAC^GTG GTG^CAC
Schnittstelle innerhalb der <i>AtMyc2</i> -Sequenz?	in Position 1362	in Position 590	in Position 605	nein	nein	in Position 185
Methylierungseffekt?	ja	ja	ja	nein	nein	ja

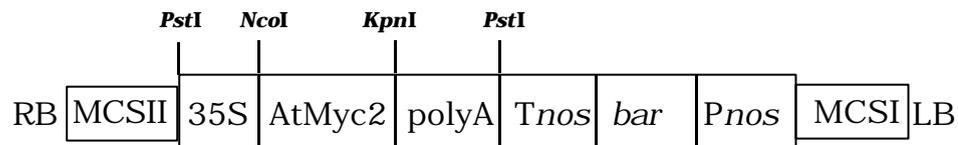
**Abbildung 3.3.7:** Southern Blot Analyse im Wildtyp WtC und in *jin1*. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde, die an den mittleren Teil des *AtMyc2*-Gens bindet (Abb. 7.3 im Anhang).

### 3.5 Komplementation des Mutantenphänotyps

Um zu beweisen, dass es sich bei dem in *jin1* mutierten Gen tatsächlich um *AtMyc2* handelt, sollten *jin1*-Pflanzen mit dem Wildtyp-Allel komplementiert werden. Die Expression von *AtMYC2* sollte zum einen unter Kontrolle des in Pflanzen häufig verwendeten 35S-Promotors aus CaMV ("cauliflower mosaic virus", Blumenkohl-Mosaik-Virus) und zum anderen unter Kontrolle des endogenen Promotors erfolgen.

#### 3.5.1 Komplementation unter Kontrolle des 35S-Promotors

Das zur Komplementation des Mutantenphänotyps genutzte Konstrukt besteht aus einem 1,8 kb langen Fragment der kodierenden *AtMyc2*-Sequenz aus WtC, dem 35S-Promotor und einem *nos*-Terminator (Abb.3.3.8).

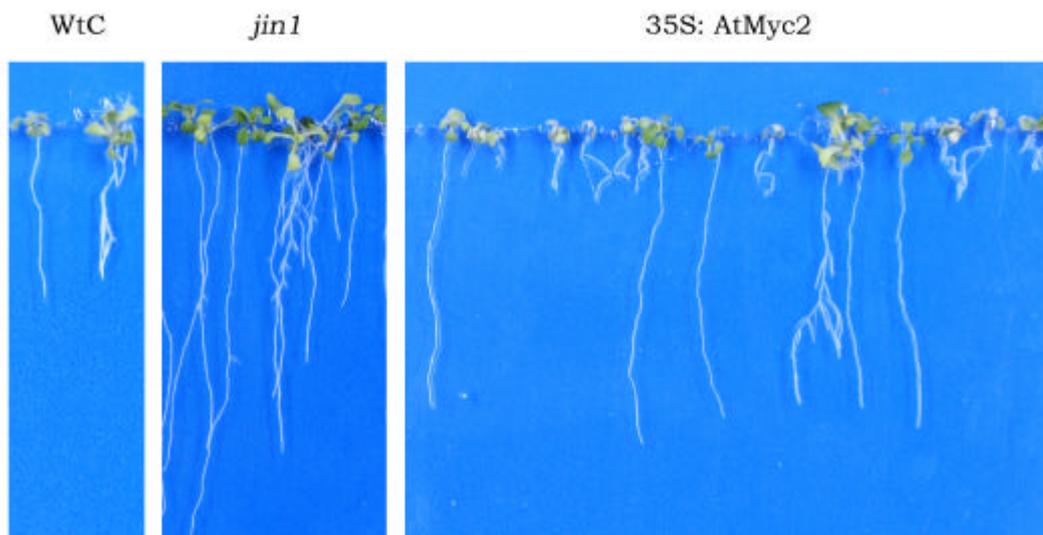


**Abbildung 3.3.8:** Schematische Darstellung des zur Komplementation verwendeten Konstrukts im binären Vektor pCB302.

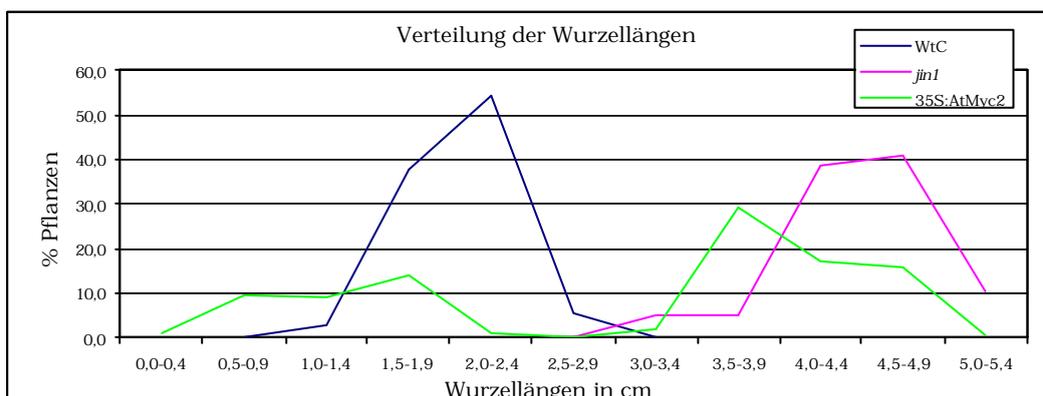
RB und LB bezeichnen die die T-DNA rechts und links eingrenzenden Bordersequenzen, MCS: *multiple cloning sites*; 35S: 35S-Promotor aus dem Blumenkohlmosaikvirus; *bar*: verleiht Resistenz gegen BASTA®; *Pnos* bzw. *Tnos* stehen für Promotor bzw. Terminator der Nopalinsynthase. Ferner sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Das *AtMyc2*-Fragment wurde mittels PCR und gleichzeitiger Einführung der Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *KpnI* zunächst in den Vektor pCR2.1 TOPO (In-vitrogen) und anschließend in den Vektor pRT100 kloniert (Anhang Abb.7.4). Die erhaltene Expressionskassette bestand aus dem 35S-Promotor, dem entsprechenden *AtMyc2*-Fragment und dem *nos*-Terminator. Anschließend wurde diese Expressionskassette nach *PstI*-Verdau in den binären Vektor pCB302 kloniert. Die Transformation in *jin1*-Pflanzen erfolgte unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens*. Nach BASTA-Selektion konnten mehrere unabhängige Transformanten isoliert werden.

Samen der T2-Generation wurden auf MS-Medium mit 10 $\mu$ M MeJA ausgelegt und hinsichtlich der Wurzellänge untersucht. Wie Abb.3.3.9 deutlich macht, wird der Mutantenphänotyp durch *AtMyc2* komplementiert. Da es sich bei dem 35S-Promotor um einen sehr starken Promotor handelt, sind die Wurzeln der transformierten Pflanzen sogar um die Hälfte kürzer als im Wildtyp. Da die T2-Generation segregiert, findet man hier auch Pflanzen mit Mutantenphänotyp, also Pflanzen mit langen Wurzeln.

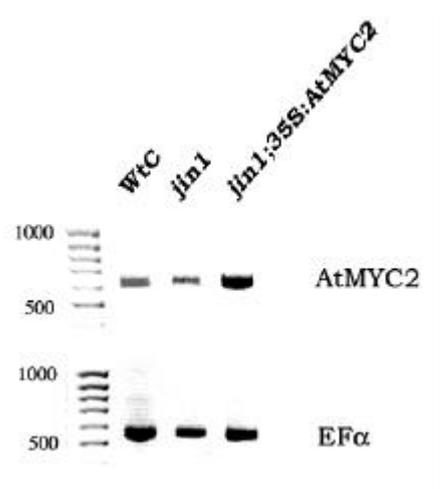


	durchschnittliche Wurzellängen in cm	
<b>WtC</b>	2,1	
<b><i>jin1</i></b>	4,4	
<b>35S:AtMyc2</b>	1,2	Pflanzen mit kurzen Wurzeln
	4,1	Pflanzen mit langen Wurzeln



**Abbildung 3.3.9:** Komplementation des Mutantenphänotyps unter Kontrolle des 35S-Promotors

Um die starke Hemmung des Wurzelwachstums durch MeJA in transformierten Pflanzen zu erklären, wurden RT-PCRs mit *AtMyc2* Primern durchgeführt. Aufgrund des starken 35S-Promotors sind in transformierten *jin1*-Pflanzen tatsächlich höhere *AtMYC2*-mRNA-Spiegel als im Wildtyp nachweisbar (Abb.3.3.10). So kann die starke Hemmung des Wurzelwachstums durch MeJA in den Transformaten durch die Überexpression von *AtMYC2* erklärt werden.



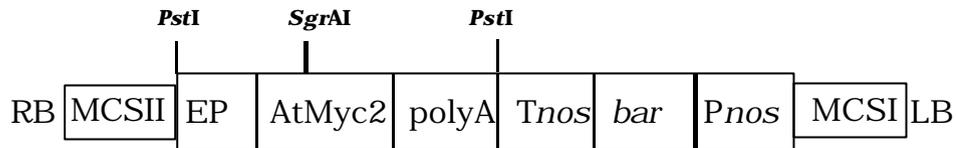
**Abbildung 3.3.10:** RT-PCR *AtMYC2* (25 Zyklen) in WtC, *jin1* und *jin1;35S:AtMYC2*, Kontrolle: Elongationsfaktor  $EF\alpha$   
 Primer: *AtMyc2* F: CAA GGT TCG AAT TCT TTT CA  
*AtMyc2* R: TTA GTG GCT CTT CTC TAC CG

### 3.5.2 Komplementation unter Kontrolle des endogenen Promotors

Ausgangspunkt für die Komplementation unter Kontrolle des endogenen Promotors war zum einen die durch PCR amplifizierte Promotorregion aus WtC, zum anderen das Konstrukt im Vektor pRT100, das bereits aus der "35S-Komplementation" zur Verfügung stand und die kodierende *AtMyc2*-Sequenz enthielt (Anhang Abb.7.5).

Zunächst wurde die Promotorregion (1,6 kb) mittels PCR unter Einführung einer *Pst*I-Schnittstelle amplifiziert und in den pCR2.1 TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert. Nach Verdau mit *Sgr*AI und *Pst*I wurde dieses Fragment in den ebenfalls mit *Sgr*AI und *Pst*I geschnittenen pRT100-Vektor, der die kodierende *AtMyc2*-Sequenz aus der "35S-Komplementation" erhielt, kloniert. Die entstandene Expressionskassette mit endogenem Promotor, *AtMyc2*-Fragment und *nos*-

Terminator wurde nach *Pst*I-Verdau in den binären Vektor pCB302 kloniert (Abb.3.3.11).

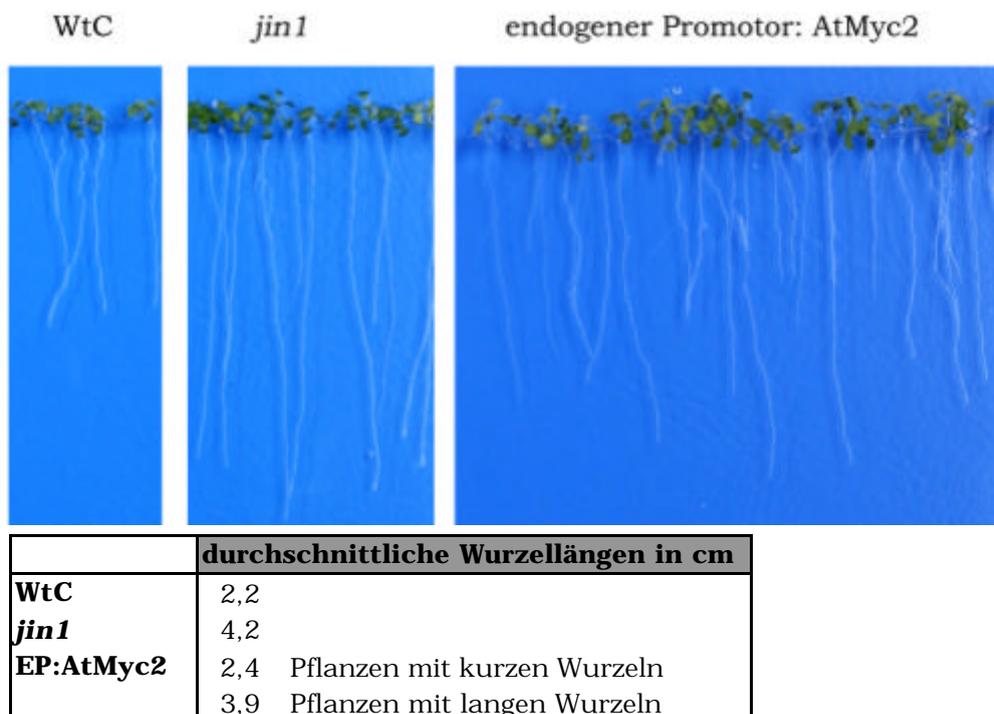


**Abbildung 3.3.11:** Schematische Darstellung des zur Komplementation verwendeten Konstrukts im binären Vektor pCB302.

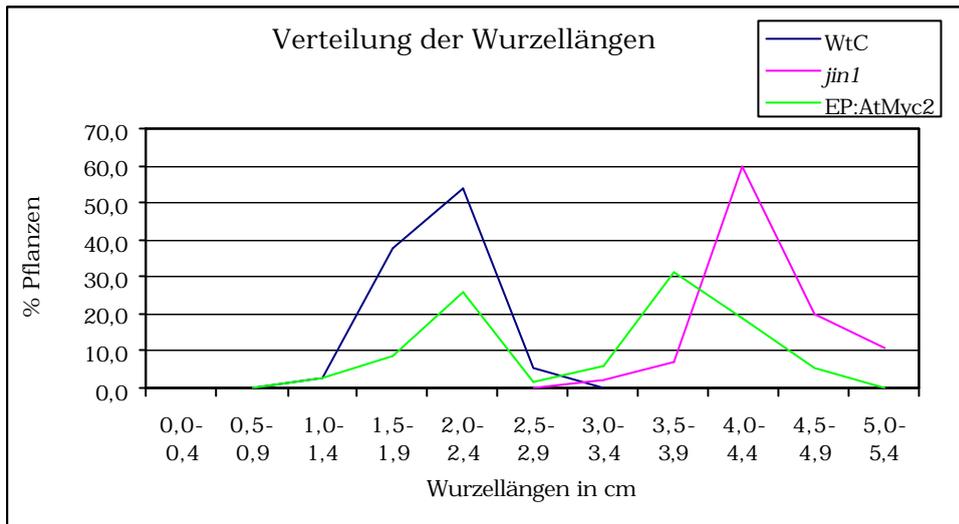
RB und LB bezeichnen die die T-DNA rechts und links eingrenzenden Bordersequenzen, MCS: *multiple cloning sites*; EP: endogener Promotor; *bar*: verleiht Resistenz gegen BASTA®; *Pnos* bzw. *Tnos* stehen für Promotor bzw. Terminator der Nopalinsynthase. Ferner sind die zur Klonierung genutzten Schnittstellen angegeben.

Nach *Agrobacterium tumefaciens* vermittelter Transformation in *jin1*-Pflanzen und anschließender BASTA-Selektion wurden mehrere unabhängige Transformanten gefunden.

Samen der T2-Generation wurden auf MeJA-haltigem (10µM) MS-Medium ausgelegt und anschließend die Wurzellänge der Keimlinge untersucht. Da die T2 aufspaltet, wurden auch hier wieder Pflanzen mit Mutantenphänotyp, aber auch Pflanzen mit kurzen Wurzeln wie im Wildtyp gefunden (Abb.3.3.12).



**Abbildung 3.3.12:** Komplementation des Mutantenphänotyps unter Kontrolle des endogenen Promotors



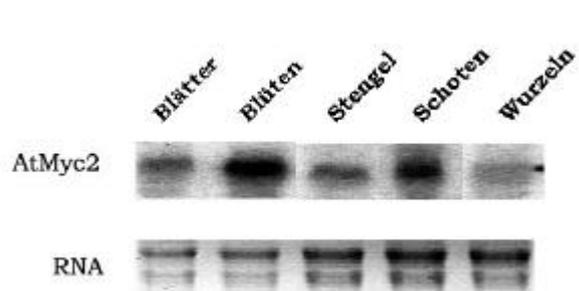
**Fortsetzung Abbildung 3.3.12:** Komplementation des Mutantenphänotyps unter Kontrolle des endogenen Promotors

### 3.6 Untersuchungen zur Expression von *AtMYC2*

In Northern Blot-Analysen wurde untersucht, in welchen Pflanzenteilen *AtMYC2* exprimiert wird. Ferner wurde das Expressionsmuster von *AtMYC2* in WtC und *jin1* nach Verwundung, nach Applikation von Phytohormonen (ABA, MeJA) und nach Pathogenbefall analysiert.

#### 3.6.1 In welchen Pflanzenteilen wird *AtMYC2* exprimiert?

*AtMYC2* mRNA akkumuliert in allen untersuchten oberirdischen Pflanzenteilen (Abb.3.3.13). Hohe Transkriptmengen können in Blüten und Schoten nachgewiesen werden. In Wurzeln wird *AtMYC2* nur schwach exprimiert.



**Abbildung 3.3.13:** Northern-Analyse: Expression von *AtMYC2* in verschiedenen Pflanzenteilen im Wildtyp Columbia. Geladen wurden 8µg Gesamt-RNA.

### 3.6.2 Expression von *AtMYC2* nach Verwundung

Nach einer mechanischen Verletzung der Blätter beginnt sowohl in WtC als auch in *jin1* schon nach zehn Minuten die Akkumulation von *AtMYC2*-mRNA und erreicht nach 20 bis 30 Minuten das Maximum. In *jin1* sind die Transkriptmengen geringer als in WtC, auch die Dauer der Expression ist verkürzt. So sinkt die Transkriptmenge in *jin1* bereits eine Stunde nach dem Verwundungsreiz wieder auf Kontrollniveau ab, während dies in WtC erst nach zwei Stunden der Fall ist (Abb. 3.3.14).

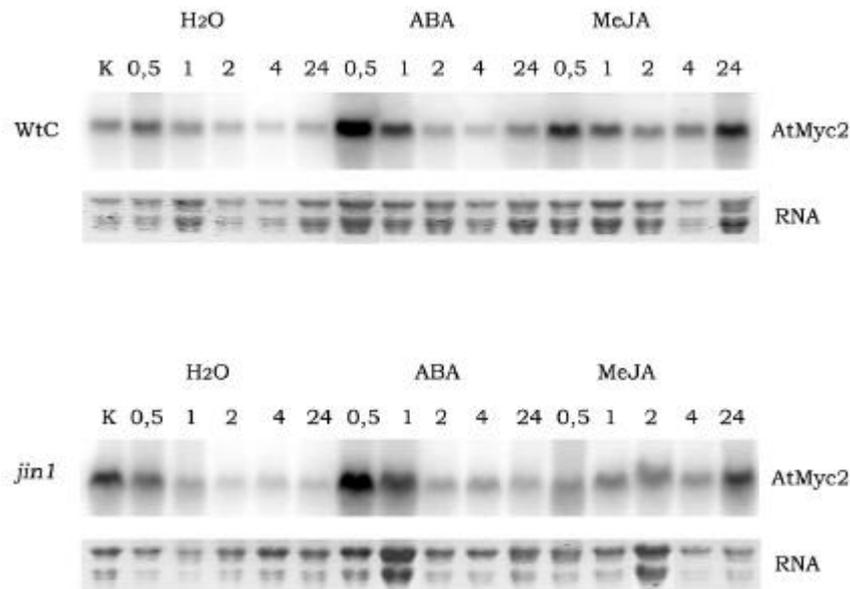


**Abbildung 3.3.14:** Northern-Analyse: Expression von *AtMYC2* in WtC und *jin1* nach Verwundung. Die Verwundung der Blätter erfolgte an der Blattspitze durch Verletzung mit einer Pinzette. Geladen wurden 8µg Gesamt-RNA.

### 3.6.3 Expression von *AtMYC2* nach Applikation von Abscisinsäure und Methyljasmonat

Die Applikation der Phytohormone Abscisinsäure und Methyljasmonat führt im Wildtyp und *jin1* zur Erhöhung der *AtMYC2*-Transkription (Abb.3.3.15). Eine starke Induktion durch ABA erfolgt nach einer halben Stunde sowohl in der Mutante als auch im Wildtyp. Nach zwei Stunden sind die Transkriptlevel wieder mit den wasserbehandelten Kontrollen vergleichbar.

Durch die Applikation von MeJA kommt es in WtC nach 0,5 Stunden zu einer Anreicherung von *AtMYC2*-mRNA. Danach sinkt die Transkriptmenge kontinuierlich ab, nimmt jedoch 24 Stunden nach Applikation wieder zu. Im Vergleich mit dem Wildtyp sind in der Mutante *jin1* *AtMYC2*-Transkripte wenige Stunden nach der Applikation von MeJA noch nicht nachweisbar. Erst nach 24 Stunden können hier erhöhte mRNA-Spiegel detektiert werden.

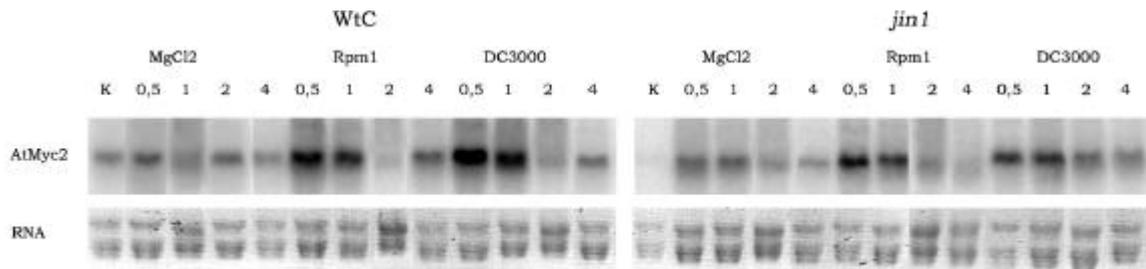


**Abbildung 3.3.15.:** Northern-Analyse: Expression von *AtMYC2* in WtC und *jin1* nach Applikation von ABA (50 $\mu$ M) und MeJA (50 $\mu$ M). Die Applikation erfolgte durch Flottieren von ganzen Pflanzen (ohne Wurzel). Nach 0,5, 1, 2, 4 und 24 Stunden wurden je 3 Blätter von diesen Pflanzen geerntet. Geladen wurden 8 $\mu$ g Gesamt-RNA.

#### 3.6.4 Expression von *AtMYC2* nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Auch die Infiltration von virulenten und avirulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*-Stämmen führt in WtC und *jin1* zur erhöhten Expression von *AtMYC2* bereits zu frühen Zeitpunkten (Abb.3.3.16).

Im Wildtyp sind erhöhte Transkriptmengen nach 0,5 bis 1 Stunde nach Infiltration mit virulenten (DC3000) und avirulenten (DC3000*avrRpm1*) Bakterien nachweisbar. Auch in *jin1* erfolgt die Induktion zu diesen Zeitpunkten. Die Transkriptmengen nach Infiltration mit DC3000*avrRpm1* gleichen denen im Wildtyp. Nach Behandlung mit dem virulenten Stamm DC3000 wird in *jin1* weniger *AtMYC2*-mRNA akkumuliert als im Wildtyp.



**Abbildung 3.3.16:** Expression von *AtMYC2* in *WtC* und *jin1* nach Infiltration von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (mit und ohne *avrRpm1*); infiltrierte Bakterien-dichte:  $10^8$  cfu/ml; Kontrolle: MgCl<sub>2</sub>; geladen wurden 8µg Gesamt-RNA

## **4. Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der jasmonatinsensitiven Mutanten *jin1* und *jin4* bezüglich ihrer Reaktion auf Phytopathogene (*Pseudomonas syringae*) und Ozon, um neue Einblicke in die durch Jasmonate vermittelte Signaltransduktion zu erhalten. Um ein neues Element der Jasmonat-Signaltransduktionskette zu isolieren, sollte das in *jin1* mutierte Gen isoliert werden.

### **4.1 Auswirkung der Jasmonatinsensitivität auf die Pathogenresistenz**

Die Mutanten *jin1* und *jin4* zeichnen sich durch eine geringere Sensitivität gegenüber Jasmonsäure bzw. Methyljasmonat verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aus. Für *jin1* und *jin4* konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Mutanten auch gegenüber Coronalon, einer synthetisch hergestellten Substanz, die dem Phytotoxin Coronatin in Struktur und Wirkungsweise ähnelt (Schüler *et al.*, 2004), weniger sensitiv sind als die Wildtypen (Nickstadt *et al.*, 2004). Coronalon hemmt das Wurzelwachstum von Wildtyp-Pflanzen bereits in Konzentrationen von 1µM, während 10µM MeJA notwendig sind, um ähnliche Effekte zu erzielen. Möglicherweise sind höhere Methyljasmonatkonzentrationen notwendig, da das verwendete MeJA nur einen geringen Anteil des aktiveren *cis*-Isomers enthält (Koda *et al.*, 1992). Die strukturelle Ähnlichkeit von Coronatin, Coronalon und MeJA sowie die gleichen Effekte auf das Wurzelwachstum legen nahe, dass diese Substanzen am selben Ort in den Stoffwechsel eingreifen.

Die Charakterisierung der *jin* Mutanten hinsichtlich ihrer Reaktion auf Phytopathogene und Ozon offenbarte, dass beide Mutanten verschiedene Phänotypen aufweisen. So zeigt *jin1* nicht aber *jin4* eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten *Pseudomonas syringae* Stämmen und auch gegenüber den nekrotrophen Pilzen *Botrytis cinerea* (Nickstadt *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004), *Plectosphaerella cucumerina* (Lorenzo *et al.*, 2004) und *Fusarium oxysporum* (Anderson *et al.*, 2004). Auch bei der Charakterisierung von *jin1* und *jin4* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Ozon, zeigte sich, dass beide Mutanten unterschiedlich reagieren (Tab.4.1). So deutet vieles darauf hin, dass verschiedene Wege existieren, um jasmonatabhängige Antworten zu vermitteln, und diese Wege in *jin1* und *jin4* unterschiedlich betroffen sind.

Sensitivität gegenüber:	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Botrytis cinera</i>	Ozon
<b><i>jin1</i></b>	reduziert	reduziert	tolerant (wie WT)
<b><i>jin4/jar1</i></b>	leicht erhöht	erhöht	erhöht
<b><i>coi1</i></b>	reduziert	erhöht	erhöht

**Tabelle 4.1:** Reaktion verschiedener jasmonat- bzw. coronatininsensitiver *A. thaliana* Mutanten auf Pathogene und Ozon

#### 4.1.1 Welchen Einfluss hat das Phytotoxin Coronatin auf die Resistenz von *jin1* ?

Die gesteigerte Resistenz von *jin1* gegenüber *Pst* DC3000 äußert sich in fehlenden sichtbaren Krankheitssymptomen und der reduzierten Vermehrungsrate der Bakterien in den Pflanzen. Wie kann die gesteigerte Resistenz von *jin1* gegenüber *Pseudomonas syringae* erklärt werden und welche Faktoren sind dafür verantwortlich?

Ein möglicher Faktor, der zur Resistenz von *jin1* gegenüber dem virulenten Stamm beiträgt, könnte in der Antwort jasmonatinsensitiver Mutanten auf Coronatin zu suchen sein, das von dem Stamm *Pst* DC3000 produziert wird. Dies ginge konform mit der reduzierten Virulenz von *Pst* Mutanten, die kein Coronatin bilden können (Bender *et al.*, 1987). Feys *et al.* (1994) zeigten, dass das bakterielle Toxin Coronatin *A. thaliana* und Tomate für Infektionen prädisponiert. So lösen coronatindefiziente *Pst* DC3000 Mutanten im Vergleich mit dem coronatinbildenden Wildtyp-Stamm abgeschwächte Krankheitssymptome aus (Mittal & Davis, 1995).

Die coronatininsensitive Mutante *coi1* weist eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae* pv. *atropurpurea* (Feys *et al.*, 1994) und *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Kloek *et al.*, 2001) auf. In Tomate entspricht die Mutante *jai1* der *A. thaliana* Mutante *coi1*. Auch *jai1* zeichnet sich durch eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* DC3000, einhergehend mit erhöhter *PR*-Expression und verringerter Expression von jasmonat- bzw. verwundungsresponsiven Genen (Zhao *et al.*, 2003).

Auch die Mutanten *jin1* und *jin4* zeichnen sich als insensitiv gegenüber dem Coronatin-Analogon Coronalon aus. Um zu klären, welche Rolle Coronatin bei der Ausbildung von Krankheitssymptomen bzw. der Ausbreitung der Bakterien in den untersuchten Mutanten *jin1* und *jin4* spielt, wurden die Stämme *Psm* M2 und *Psm* CR299 (Ritter & Dangl, 1995), die mit *Pst* nahe verwandt sind (Schaad, 1988), für Infektionen verwendet. Sowohl der avirulente Stamm *Psm* M2 als auch

der virulente Stamm *Psm* CR299 bilden kein Coronatin. *Pst* DC3000 Mutanten, die kein Coronatin bilden können, zeigen in ihren natürlichen Wirtspflanzen eine reduzierte Virulenz, die sich durch eine limitierte Anzahl an Chlorosen und Nekrosen sowie durch eine Einschränkung der Bakterienvermehrung in den Pflanzen äußert (Brooks *et al.*, 2004). Das stimmt mit dem Verlauf der Wachstumskurven für WtC und *jin1* überein. Verglichen mit der *Pst*-Infektion ist die Menge an *Psm*-Bakterien sowohl im Wildtyp als auch in *jin1* deutlich reduziert. Bisher war unklar, ob die Wirkung von Coronatin in *A. thaliana* durch die Stimulierung des Jasmonat-Signalweges oder durch indirekte Unterdrückung des durch Salizylate vermittelten Signalweges zustande kommt. Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass die Wirkung von Coronatin nicht auf die Unterdrückung des salizylatvermittelten Signalweges zurückzuführen ist (Block *et al.*, 2005).

Nach Infiltration des nicht coronatinbildenden virulenten Stammes *Psm* CR299 sind *PR1*-Transkripte fast nicht detektierbar. Dies korreliert mit dem Fehlen von sichtbaren Krankheitssymptomen nach CR299-Infiltration. Die *PR1*-Transkriptmengen liegen in *jin1* geringfügig höher als im Wildtyp, was eine mögliche Erklärung für die vergleichsweise geringere Vermehrungsrate der Bakterien in *jin1* sein könnte.

Auch wächst der nicht coronatinbildende virulente Stamm in *jin1* weniger als im Wildtyp, was darauf hindeutet, dass die Resistenz von *jin1* coronatinunabhängig ist. Ferner scheint auch die Resistenz der Mutante *jai1* (Tomate) gegenüber *P. syringae* coronatinunabhängig vermittelt zu werden (Zhao *et al.*, 2003).

In WS und *jin4* ist die Bakterienanzahl nach Infiltration von *Psm* M2 und CR299 um 1 bis 2 Zehnerpotenzen höher als in WtC und *jin1*. So scheint es, dass das Fehlen von Coronatin zwar auf WtC und *jin1* einen Einfluss hat, nicht jedoch auf WS und *jin4*, was möglicherweise durch den unterschiedlichen genetischen Hintergrund erklärt werden kann.

#### 4.1.2 Sind veränderte Salizylat- oder Jasmonat-Spiegel für die Resistenz von *jin1* verantwortlich?

Kloek *et al.* (2001) zeigten, dass es in *coi1* nach *Pst* DC3000-Infektion zur gesteigerten *PR1*-Expression und zur erhöhten Akkumulation von Salizylsäure kommt. Interessanterweise entwickelten auch *coi1*-Pflanzen, die das *nahG* Transgen tragen, keine Krankheitssymptome. Somit scheint die Resistenz von *coi1* gegenüber

*Pseudomonas syringae* durch zwei verschiedene Mechanismen vermittelt zu werden: Auf der einen Seite wird die Vermehrung der Bakterien durch die Aktivierung des SA-abhängigen Abwehrweges verhindert, auf der anderen Seite wird unabhängig von SA, aber abhängig von der Coronatininsensitivität die Ausbildung von Krankheitssymptomen unterbunden.

Auch in *jin1* konnten nach Pathogenbehandlung zweifach höhere SA-Level als im Wildtyp gemessen werden (Nickstadt *et al.*, 2004). Auch ist die Expression von *PR1* in *jin1* nach Infiltration von *Pst* höher als im Wildtyp. Anders als *coi1* sind *jin1* Pflanzen, die das bakterielle SA-abbauende *nahG* Transgen tragen, gegenüber *Pst* Infektionen voll suszeptibel (Laurie-Berry *et al.*, 2004). Dies spricht dafür, dass die erhöhte Resistenz von *jin1* gegenüber *Pst* auf die erhöhte Akkumulation von Salizylsäure und die gesteigerte Expression des Abwehrgens *PR1* zurückzuführen ist. Auch Mutanten, die *PR1* konstitutiv exprimieren (zum Beispiel *mpk4*, *cpr5*), zeigen gesteigerte Resistenz gegenüber virulenten *P. syringae* Stämmen (Petersen *et al.*, 2000; Bowling *et al.*, 1997).

Obwohl auch die Mutante *jin4* den jasmonat- und coronaloninsensitiven Phänotyp sowie gesteigerte *PR1*-Expression nach Pathogenbehandlung zeigt, weist diese Mutante keine erhöhte Resistenz gegenüber *Pst* DC3000 auf, sondern entwickelt ausgebreitete Krankheitssymptome einhergehend mit gesteigerter Vermehrung der Bakterien verglichen mit dem entsprechenden Wildtyp. Auch die zu *jin4* allele Mutante *jar1* wurde als suszeptibel gegenüber *Pst* DC3000-Infektionen beschrieben (Pieterse *et al.*, 1998; Kloek *et al.*, 2001). In der Mutante *jar1* ist ein Gen mutiert, das eine Jasmonatadenylase kodiert (Staswick *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche deuten darauf hin, dass es sich hier um die einzige Jasmonatadenylase im *Arabidopsis* Genom handelt (Staswick *et al.*, 2002). Bislang war unklar, ob die Bildung von Adenylat für den Jasmonsäuremetabolismus oder die Lokalisierung bedeutend ist. Neuere Ergebnisse zeigen, dass es sich bei JAR1 um eine Jasmonsäure-Aminosäure-Synthetase handelt, die benötigt wird, um die Jasmonsäure für eine optimale Signalweiterleitung zu aktivieren. Dies geschieht durch Konjugation mit der Aminosäure Isoleucin (Staswick & Tiryaki, 2004).

Messungen des Jasmonatgehaltes zeigen, dass der Defekt in *jin4* nicht zu einer erhöhten Akkumulation freier Jasmonsäure führt (Nickstadt *et al.*, 2004). Auch in *jin1* wird nach Pathogenbehandlung (*Psm*) nicht mehr Jasmonsäure als im Wildtyp akkumuliert.

*jin1* x *jar1* Doppelmutanten zeigen nach *Pst* Infektionen einen ähnlich resistenten Phänotyp wie *jin1* (Laurie-Berry *et al.*, 2004), was dafür spricht, dass *JIN1* und

*JAR1/JIN4* an verschiedenen Stellen in den jasmonatvermittelten Signalweg eingreifen.

So scheint es auch, dass die Suszeptibilität gegenüber *Pst* durch einen *JIN1* abhängigen Signalweg vermittelt wird, der unabhängig von der durch *JAR1* vermittelten JA-Modifikation wirkt.

#### 4.1.3. Führt die veränderte Expression von Abwehrgenen zur gesteigerten Resistenz von *jin1* ?

##### 4.1.3.1 Expression jasmonatresponsiver Gene

Die Expression des jasmonatregulierten Gens *AtJrg21*, das unter anderem durch Verwundung, Jasmonate und den phytopathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* aktiviert werden kann (Bau, 2001), ist in *jin1* nach *Pst* Infektion reduziert. Eine mögliche Erklärung für die geringen *AtJrg21* Transkriptmengen in *jin1* könnte im erhöhten SA- und SAG-Spiegel nach Pathogenbehandlung in dieser Mutante zu suchen sein, da SA antagonistisch auf den jasmonatvermittelten Signalweg einwirkt (Felton *et al.*, 1999). Auch in *jin4* ist die Expression von *AtJrg21* zu den meisten untersuchten Zeitpunkten reduziert. Da es sowohl bei *jin1* als auch bei *jin4* um Jasmonat-Signaltransduktions-Mutanten handelt, bietet dies ebenfalls eine Erklärung für die reduzierte Expression von *AtJrg21*.

Die Expression von *LOX1*, die unter anderem durch ABA und MeJA induziert werden kann (Melan *et al.*, 1993) ist in *jin1* nach *Pst* DC3000 Infektion reduziert, in *jin4* jedoch erhöht. In beiden Mutanten sind während der inkompatiblen Interaktion weniger *LOX1* Transkripte nachweisbar als in den Wildtypen.

Die Expression des pflanzlichen Defensins *PDF1.2*, die einem SA-unabhängigen Signalweg folgt (Penninckx *et al.*, 1996), ist in *jin1* nach *Pst* DC3000 Infiltration nur geringfügig höher als im Wildtyp. In *jin4* sind von diesem Gen deutlich weniger Transkripte als in WS nachweisbar. Die Mutante *iop1* ("induced overexpression of *PDF1.2*"), die eine induzierte Überexpression von *PDF1.2* zeigt, ist zwar gegenüber nekrotrophen Pathogenen resistenter, zeigt aber gegenüber biotrophen Pathogenen wie *Pseudomonas syringae* die gleiche Sensitivität wie Wildtyppflanzen (Penninckx *et al.*, 2003). Gegenüber nekrotrophen Pathogenen (*Botrytis cinerea*) zeigt *jin1* eine geringere Suszeptibilität, obwohl die *PDF1.2* Transkriptlevel in *jin1* nach Infektion mit *Botrytis cinerea* niedriger als in WtC liegen (Nickstadt *et*

*al.*, 2004). In der Mutante *coi1* wurden einhergehend mit gesteigerter Suszeptibilität gegenüber *Alternaria brassicicola* eine verringerte *PDF1.2* Expression nachgewiesen (Penninckx *et al.*, 1996).

Zurückzuführen könnte dies wiederum Jasmonatinsensitivität der Mutante oder auf die erhöhten SA und SAG Level sein. Möglich ist auch, dass *jin1* als in der JA-Signaltransduktion gestörte Mutante nicht auf das von *Pst* DC3000 produzierte Coronatin reagiert und es somit nicht zur Anreicherung jasmonatregulierter *PDF1.2* Transkripte kommt. Dies würde ebenfalls die geringen Transkriptlevel in *jin4* erklären.

Die Expression von *PAL* kann unter anderem durch virulente und avirulente *Pseudomonas syringae* Stämme induziert werden (Dong *et al.*, 1991). Als ein Schlüsselenzym der SA-Biosynthese (Weisshaar & Jenkins, 1998) scheint es zunächst widersprüchlich, dass in *jin1* nach Pathogenbefall (*Pst* DC3000) trotz erhöhter SA-Spiegel die Expression von *PAL* reduziert ist. Die Biosynthese von SA erfolgt über das im Shikimatweg gebildete Chorismat. Aus Chorismat wird über mehrere Zwischenstufen Phenylalanin gebildet. Die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure von dem Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (*PAL*) katalysiert. Nach weiteren Zwischenschritten bildet die Benzoessäure-2-Hydroxylase aus Benzoessäure Salizylsäure. Neuere Untersuchungen deuten jedoch an, dass in Pflanzen die Synthese von SA über einen zweiten Biosyntheseweg möglich ist. In verschiedenen Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) wird Salizylsäure aus Chorismat durch Isochorismat-Synthase (ICS) und Pyruvat-Lyase (PL) gebildet. Wildermuth *et al.* (2001) konnten in *Arabidopsis* Isoformen der Isochorismat-Synthase identifizieren. Pathogenbehandlungen (*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* und *Erysiphe orontii*) führten zu einer deutlichen Induktion der Genexpression. Über Sequenzvergleiche in Datenbanken konnten die Autoren zudem zu ICS homologe Sequenzen in Soja und Tomate finden. Damit erscheint die Synthese von Salizylsäure in Pflanzen über diesen zweiten Weg möglich und bietet eine Erklärung für die gesteigerte SA Akkumulation nach Pathogenbefall in *jin1* trotz reduzierter *PAL*-Transkriptmengen

#### 4.1.3.2 Expression nicht jasmonatresponsiver Gene

Die Expression von *GST1* kann in *A. thaliana* zwar durch OPDA, nicht aber durch Jasmonate induziert werden (Stintzi *et al.*, 2001). Das Expressionsmuster von *GST1* in *jin1* während der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion ist mit

dem des Wildtyps nahezu identisch. In *jin4* finden sich jedoch deutlich weniger *GST1* Transkripte in der kompatiblen Interaktion, was die erhöhte Suszeptibilität von *jin4* gegenüber *Pseudomonas syringae* erklären könnte. Unterstützt wird dies durch Untersuchungen der Mutante *mpk4*, die zwei GSTs konstitutiv exprimiert und eine gesteigerte Resistenz gegenüber Phytopathogenen, unter anderem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 zeigt (Petersen *et al.*, 2000).

*ELI3* gilt als spezifischer Marker für *RPM1*-vermittelte Antworten (Ritter & Dangl, 1996), wird aber auch während kompatibler Interaktionen induziert (Kiedrowski *et al.*, 1992). Die Expression von *ELI3* in *jin1* ist sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion deutlich geringer als im Wildtyp.

Mittal & Davis (1995) berichteten, dass nicht coronatinproduzierende *Pseudomonas syringae* Mutanten die Expression verschiedener Abwehrgene, u.a. *Eli3* (aber auch *Pal* und *Gst*), in *A. thaliana* erhöhen. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch das Coronatin, das die beiden für Infektionen genutzten *Pst* Stämme bilden, die Expression dieser Abwehrgene unterdrückt wird. Dass dies in *jin1* stärker als im Wildtyp geschieht, ist möglicherweise durch den jasmonat- bzw. coronatininsensitiven Phänotyp und der damit verbundenen Störung der JA-Signaltransduktion in der Mutante zu erklären.

Untersuchungen an verschiedenen *A. thaliana* Mutanten deuten daraufhin, dass biotrophe Pathogene SA-abhängige Abwehrreaktionen induzieren, während Jasmonate und Ethylen zur Abwehr von nekrotrophen Pathogenen und Herbivoren beitragen (Thomma *et al.*, 2001; McConn *et al.*, 1997). Unter diesem Gesichtspunkt kann die Resistenz von *jin1* gegenüber dem biotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* durch die erhöhte Expression von *PR1* und der erhöhten Akkumulation von Salizylsäure nach Pathogenbehandlung erklärt werden.

Wie in *coi1* (Kloek *et al.*, 2001) ist die gesteigerte Resistenz von *jin1* nicht auf coronatinbildende *Pseudomonas syringae* Stämme beschränkt, sondern besteht auch gegenüber nicht coronatinproduzierenden Stämmen. Dies deutet darauf hin, dass die Resistenz in diesen Mutanten coronatinunabhängig vermittelt wird. Da vermutet wird, dass Coronatin über den jasmonatvermittelten Signalweg wirkt (Weiler *et al.*, 1994), ist diese coronatinunabhängige Resistenz in jasmonat- bzw. coronatininsensitiven Mutanten erklärbar. Neuere Untersuchung an Tomaten zeigten, dass sich Coronatin und Methyljasmonat zwar ähnliche, aber nicht identische Tätigkeiten teilen (Uppalapati *et al.*, 2005). Der genaue Mechanismus, wie Coronatin wirkt, konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden.

Coronatin stimuliert weiterhin JA-abhängige Antworten in *A. thaliana* (Glazebrook *et al.*, 2003). Dass in *jin1* die meisten getesteten JA-responsiven Gene

nach *Pst* Behandlung schwächer induziert sind als im Wildtyp (Tab.4.2), kann somit möglicherweise auf die Insensitivität der Mutante gegenüber dem durch *Pst* gebildeten Coronatin zurückzuführen sein. Glazebrook *et al.* (2003) wiesen weiterhin auf die antagonistische Wirkung von Jasmonaten und Salizylsäure hin. Die Resistenz von *jin1*, die durch eine gesteigerte Aktivierung des salizylatabhängigen Signalweges aber durch reduzierte jasmonatabhängige Abwehrantworten begleitet wird, unterstützt diese Theorie.

		<i>jin1</i>	<i>jin4</i>
JA-responsive Gene	<b><i>Jrg21</i></b>	reduziert	reduziert
	<b><i>LOX1</i></b>	reduziert	erhöht
	<b><i>PDF1.2</i></b>	leicht erhöht	reduziert
	<b><i>PAL1</i></b>	reduziert	erhöht
nicht JA-responsive Gene	<b><i>PR1</i></b>	erhöht	erhöht
	<b><i>GST1</i></b>	wie Wildtyp	reduziert
	<b><i>ELI3</i></b>	reduziert	später als im Wildtyp

**Tabelle 4.2:** Expression jasmonatresponsiver und nicht jasmonatresponsiver Gene in *jin1* und *jin4* nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

## 4.2 Auswirkung der Jasmonatinsensitivität auf die Ozonsensitivität

Bei der Charakterisierung von *jin1* und *jin4* bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Ozon zeigte sich ebenfalls, dass beide Mutanten unterschiedlich reagieren. Während *jin1* gegenüber Ozon keine erhöhte Sensitivität zeigt, ist *jin4* gegenüber dieser Substanz suszeptibel. Diese unterschiedliche Reaktion der Mutanten *jin1* und *jin4* auf Ozon deutet ebenfalls darauf hin, dass verschiedene Wege existieren, um jasmonatabhängige Antworten zu vermitteln, und diese Wege in *jin1* und *jin4* unterschiedlich betroffen sind.

Es ist allerdings nicht eindeutig, ob die leicht erhöhte Ozonsensitivität von *jin4* wirklich auf die Mutation in *jin4* oder auf den genetischen Hintergrund der Mutante zurückzuführen ist, da bereits der Wildtyp WS sensitiv auf Ozon reagiert. Allerdings weist die zu *jin4* allele Mutante *jar1*, die sich, anders als *jin4*, im ozontoleranten Columbia-Hintergrund befindet, ebenfalls eine erhöhte Ozonempfindlichkeit auf (Overmyer *et al.*, 2000). Untersuchungen von Tamaoki *et al.* (2003) ergaben, dass im Wildtyp WS der "Ion leakage" drei Stunden nach Beginn der Ozonbehandlung 5mal höher als im Wildtyp Columbia ist und bestätigten damit die erhöhte Ozonsensitivität von WS.

Die Expression ozoninduzierter Gene wie *Gst1*, *Gst2*, *PR1* und *Pdf1.2* korreliert mit den beobachteten durch Ozon hervorgerufenen Blattschäden.

Die Doppelmutante *jin1 x jin4* erwies sich als ozonsuszeptibel. Jedoch kann auch in diesem Fall nicht gesagt werden, ob die erhöhte Sensitivität auf die *jin4* Mutation oder den ozonsensitiven genetischen Hintergrund WS zurückzuführen ist. Interessant ist in dieser Doppelmutante die deutlich gesteigerte Expression von *Aco2*, das eine ACC-Oxidase kodiert. ACC gilt als Schlüsselenzym der Ethylenbiosynthese. Eine Steigerung der Ethylenemission während und nach der Ozonbehandlung führt zur Bildung von ROS, fördert den Zelltod und gilt als früher Marker für Ozonsensitivität (Tuomainen *et al.*, 1997).

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Mutante *oji1* (*ozone-sensitive and jasmonate-insensitive 1*), in der während der Ozonbehandlung die Ethylenemission erhöht ist (Kanna *et al.*, 2003). Des Weiteren zeigt diese Mutante einen jasmonatinsensitiven Phänotyp, der sich durch eine geringere Hemmung des Wurzelwachstums auf MeJA-haltigem Medium und durch die geringere Expression von *AtVSP2*, einem durch Jasmonate aktivierbaren Gens (Berger *et al.*, 1996), nach Ozonbehandlung äußert (Kanna *et al.*, 2003).

Durch exogene Applikation von MeJA vor der Ozonbehandlung werden die Schädigungen durch Ozon verringert (Overmyer *et al.*, 2000). Kanna *et al.* (2003) zeigten, dass MeJA-Applikation sowohl die ozoninduzierte Freisetzung von Ethylen unterdrückt als auch durch Ozon hervorgerufene Blattschäden verringert.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Rolle der Jasmonate in der Unterdrückung der ozoninduzierten Blattschäden durch Reduzierung der Ethylenemission zu suchen ist.

In *jar1* hingegen führt die exogene Applikation von MeJA zu keiner Verringerung der Blattschäden durch Ozon (Rao *et al.*, 2000a). Auch scheint es, dass JAR1 nicht auf den Prozess der Ethylenbiosynthese einwirkt (Overmyer *et al.*, 2000).

Auch die Unterschiede in der Ozonsensitivität zwischen den Wildtypen WS und Columbia gehen mit Differenzen in der Ethylenemission einher. So ist die Ethylenemission in WS nach drei Stunden Ozonbehandlung 2,5 bis 3fach höher als in Columbia (Tamaoki *et al.*, 2003).

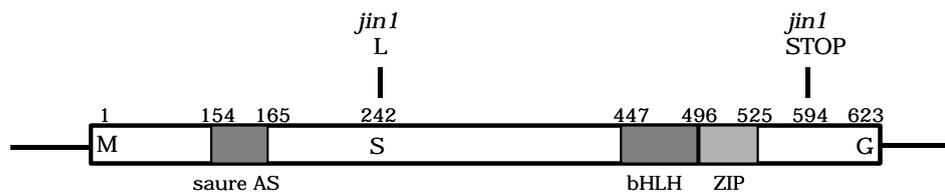
Auch die Mutanten *fad3-2fad7-1fad8* und *coi1* reagieren hypersensitiv auf Ozon (Rao *et al.*, 2000a). Mit der ozontoleranten Mutante *jin1* konnte gezeigt werden, dass nicht alle jasmonat/coronatininsensitiven bzw. jasmonatdefizienten Mutanten hypersensitiv auf Ozon reagieren. Dies lässt vermuten, dass Jasmonate zumindest zwei verschiedene Rollen in ozonvermittelten Antworten spielen.

Die in dieser Arbeit untersuchte Doppelmutante *jin1 x ein2* erwies sich als ozontolerant. Die Doppelmutante *rcd1 x ein2* reagiert während der Ozonapplikation ähnlich sensitiv wie *rcd1* (Overmyer *et al.*, 2000). Allerdings bleibt das weitere Fortschreiten des Zelltodes nach Ende der Ozonbehandlung, wie es in *rcd1* auftritt, aus. Demzufolge ist ein intakter Ethylensignalweg für den fortschreitenden Zelltod erforderlich. Dass in *jin1 x ein2* keine erhöhten *AtACO2* Transkriptspiegel nach Ozonbehandlung nachgewiesen werden konnten, unterstützt diese Theorie.

Während Ethylen das Fortschreiten des Zelltodes fördert, unterdrücken Jasmonate dessen Ausbreitung (Overmyer *et al.*, 2000). Untersuchungen der Doppelmutante *jar1 x ein2* ergaben allerdings, dass *ein2* zwar die Ozonsensitivität von *jar1 x ein2* Pflanzen reduziert, aber nicht vollständig aufhebt (Tuominen *et al.*, 2004). Dies kann möglicherweise durch die erhöhte Akkumulation von Salizylaten, die das Fortschreiten des Zelltodes fördern und auch bei der Ausbildung ozoninduzierter Läsionen eine wichtige Rolle spielen (Rao & Davis, 1999; Overmyer *et al.*, 2003), erklärt werden. In *jar1 x ein2* sind die Salizylatspiegel deutlich höher als in beiden Ausgangsmutanten (Tuominen *et al.*, 2004).

### 4.3 AtMYC2 - ein neues Element der Jasmonat-Signaltransduktion

In Komplementationsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem in *jin1* mutierten Gen um *AtMyc2* handelt. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, ob die Punktmutation in Position 725 oder die Verkürzung der Sequenz um 90 Basenpaare für den Mutantenphänotyp ausschlaggebend ist.



**Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung des *AtMyc2* Gens. Gezeigt sind die verschiedenen Domänen des Proteins und in *jin1* gefundenen Mutationsorte

Wie Abb.4.1 zeigt, enthält *AtMyc2* am C-terminalen Ende eine bHLH ("basic helix-loop-helix") Domäne, die für Transkriptionsfaktoren der MYC Familie typisch ist. Dieser Domäne folgt eine Leucin-Zipper-Domäne. Die kurze Folge saurer Aminosäuren in der N-terminalen Region des Proteins könnte eine mögliche Aktivierungsdomäne dieses Proteins darstellen (Abe *et al.*, 1997). Die in *jin1* gefundenen Mutationen liegen also in keiner dieser Domänen. Beide Mutationsorte befinden sich in konservierten Regionen des Proteins (Anhang Abb.7.7 und 7.8). So könnte sowohl der Aminosäureaustausch von Serin zu Leucin in Position 242 als auch die Verkürzung der Sequenz um 30 Aminosäuren die Funktionalität des Proteins schwächen bzw. ganz aufheben. Gerade der Austausch von Serin durch Leucin relativ am Anfang des Proteins könnte größere Auswirkungen auf die Struktur des Proteins haben, da in diesem Fall eine polare hydrophile durch eine unpolare hydrophobe Aminosäure ersetzt wird. Welche Mutation den *jin1* Phänotyp bestimmt, könnte durch Komplementation der einzelnen Mutationsorte geklärt werden.

Das *AtMYC2* (früher: rd22BP1) Protein und das *AtMYB2* Protein binden spezifisch an den MYC bzw. MYB Erkennungsort in der Promotorregion von *rd22* (Abe *et al.*, 1997). *rd22* wurde als trockenstressresponsives Gen beschrieben, dessen Expression aber auch durch exogene Applikation von ABA induziert werden kann (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1993).

Im letzten Jahr wurden verschiedene andere *AtMyc2* Mutanten beschrieben (Tab. 4.2), die sich durch eine veränderte Sensitivität gegenüber Jasmonaten bzw. Abscisinsäure auszeichnen. Diese Mutanten weisen ebenfalls eine gesteigerte Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *P. syringae* und den nekrotrophen Pilzen *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* und *Plectosphaerella cucumerina* auf. Eine Ausnahme bildet die von Abe *et al.* (2003) beschriebene *atmyc2*, die eine reduzierte Sensitivität gegenüber dem Phytohormon Abscisinsäure aufweist, während die Keimung der anderen allelen Mutanten, einschließlich *jin1*, durch ABA wie in den entsprechenden Wildtypen gehemmt wird. Möglicherweise ist die reduzierte ABA-Sensitivität von *atmyc2* auf den genetischen Hintergrund der Mutante zurückzuführen. Während die anderen beschriebenen Mutanten aus dem Wildtyp Columbia hervorgegangen sind, hat *atmyc2* den Wildtyp Nossen als genetischen Hintergrund. Eine andere mögliche Erklärung stellen Unterschiede zwischen den Allelen dar, so konnte in den *atmyc2* Pflanzen auch keine Expression von *AtMYC2* nachgewiesen werden, während in den anderen allelen Mutanten *AtMYC2* Transkripte detektiert werden können.

	Sensitivität gegenüber		Resistenz gegenüber		Referenz
	JA/MeJA	ABA	bakteriellen Pathogenen	nekrotrophen Pilzen	
<i>jin1</i>	reduziert	wie Wildtyp	erhöht	erhöht	diese Arbeit Nickstadt <i>et al.</i> , 2004
<i>jai1/jin1</i> <i>jin1-1</i> bis <i>jin1-8</i>	reduziert	wie Wildtyp		erhöht	Lorenzo <i>et al.</i> , 2004
<i>atmyc2</i>		reduziert			Abe <i>et al.</i> , 2003
<i>atmyc2-1/jin1-7</i> SALK_040500	reduziert	wie Wildtyp			Boter <i>et al.</i> , 2004
<i>atmyc2-2</i> SALK_083483	reduziert	wie Wildtyp			
<i>jin1-9</i> SALK_017005 <i>jin1-10/atmyc2-2</i> SALK_083483				erhöht	Anderson <i>et al.</i> , 2004

**Tabelle 4.2:** Übersicht über verschiedene *AtMyc2* Mutanten und deren Phänotypen

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten transgenen Pflanzen, die *AtMYC2* überexprimieren, werden im Wurzelwachstum durch Methyljasmonat deutlich stärker gehemmt als Wildtyppflanzen und reagieren somit hypersensitiv auf dieses Phytohormon. Die Hypersensitivität gegenüber MeJA korreliert mit einem erhöhten *AtMYC2* Transkriptlevel in diesen Pflanzen. Auch die von Lorenzo *et al.* (2004) beschriebenen *AtMYC2* überexprimierenden Pflanzen reagieren hypersensitiv auf Jasmonsäure. Hypersensitivität von 35S: *AtMYC2*-Pflanzen gegenüber

ABA wurde vom selben Autor und Abe *et al.* (2003) festgestellt, was auf eine Rolle von *AtMYC2* als positiver Regulator im abscisinsäureabhängigen Signalweg hinweist.

Auch die Induzierbarkeit der Expression von *AtMYC2* durch Jasmonate und ABA spricht für eine Verknüpfung von JA- und ABA-Signalweg.

Weiterhin wird die *AtMYC2*-Expression durch Verwundung induziert, wobei die Transkriptlevel in *jin1* Pflanzen deutlich unter denen des Wildtyps liegen. Auch die Expression des ebenfalls durch Verwundung aktivierbaren Gens *Vsp2* wird durch *AtMYC2* positiv reguliert (Boter *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). So zeigen sowohl *jin1* als auch *AtMyc2* knock out Mutanten reduzierte *Vsp2* Transkriptmengen nach Applikation von Jasmonaten (Berger *et al.*, 1996; Boter *et al.*, 2004).

Nach Pathogenbehandlung (*Pst*) zeigen *jin1* Pflanzen einhergehend mit gesteigerter Resistenz reduzierte *AtMYC2* Transkriptmengen. So scheint die Inaktivierung von *AtMYC2* zu erhöhter Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* und nekrotrophen Pilzen wie *Botrytis cinerea* (Nickstadt *et al.*, 2004), *Plectosphaerella cucumerina* (Lorenzo *et al.*, 2004) und *Fusarium oxysporum* (Anderson *et al.*, 2004) zu führen, was auf eine Rolle von *AtMYC2* als negativer Regulator in pflanzlichen Abwehrreaktionen hinweist.

Die Überexpression von *AtMYC2* hingegen führt zur Unterdrückung der *PDF1.2* Expression (Anderson *et al.*, 2004). Somit reguliert *AtMYC2* negativ die Expression dieses Gens.

*AtMYC2* reguliert unterschiedlich die Expression von zwei verschiedenen Gruppen jasmonatresponsiver Gene. Die eine Gruppe von Genen, die eine Rolle in der Antwort der Pflanze auf Verwundung spielen (wie *Vsp2*), werden durch *AtMYC2* aktiviert, aber durch *ERF1* und Ethylen unterdrückt (Lorenzo *et al.*, 2004). Die andere Gruppe von Genen, die an pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt sind (wie *Pdf1.2*), werden durch *AtMYC2* unterdrückt, jedoch über *ERF1* und den Ethylen-Signalweg aktiviert. Die Expression des Transkriptionsfaktors *ERF1* ("ethylen response factor1") kann durch Ethylen und Jasmonate sowie durch beide Hormone synergistisch aktiviert werden. In Mutanten, die im Jasmonat- bzw. Ethylensignalweg gestört sind (*coi1* bzw. *ein2*), kann die Expression von *ERF1* weder durch Jasmonate noch durch Ethylen induziert werden (Lorenzo *et al.*, 2003). Ausgehend von der bedeutenden Rolle von Ethylen bei der Reaktion der Pflanze auf Ozon (Overmyer *et al.*, 2000), wäre denkbar, dass die Inaktivierung von *AtMYC2* zu Störungen im ethylenvermittelten Signalweg führt.

Dies könnte eine mögliche Erklärung für den ozontoleranten Phänotyp von *jin1* bieten, der sich von allen anderen jasmonatinsensitiven bzw.-defizienten Mutanten unterscheidet. Allerdings wurden von Lorenzo *et al.*, 2004 die erhöhte *PDF1.2* Expression in *jin1* nach Behandlung mit Jasmonsäure gezeigt. Nach Pathogenbefall (*Botrytis cinerea*) akkumuliert in *jin1* deutlich weniger *PDF1.2* mRNA als im Wildtyp (Nickstadt *et al.*, 2004).

*AtMYC2* zeigt eine hohe Sequenzähnlichkeit (Anhang Abb.7.6) mit drei anderen MYC Proteinen im *Arabidopsis* Genom (At4g17880, At5g46760, At5g46830). Von der dominanten Mutante *atr2D* (At5g46760/*AtMyc3*) wurde die konstitutive Expression der jasmonatresponsiven Gene *Pdf1.2* und *Lox2* beschrieben (Smolen *et al.*, 2002). Lorenzo *et al.* (2004) schlussfolgerten, dass *AtMYC2* und *ATR2/AtMYC3* möglicherweise an einem gemeinsamen Zielort agieren. Dass sowohl die Expression von *AtMYC2* als auch *AtMYC3* durch ABA, Trockenstress und Salz (NaCl) induziert werden kann (Abe *et al.*, 2003), unterstützt diese Vermutung. Die Expression von *AtMYC4* (At4g17880) kann jedoch auf diesen Wegen nicht induziert werden (Abe *et al.*, 2003).

Das Vorkommen von mehreren *AtMYC2*-verwandten Proteinen in *Arabidopsis thaliana* kann auch den schwächeren Phänotyp von *jin1* im Vergleich mit *coi1* erklären. So ist in *jin1* sowohl die Insensitivität gegenüber Jasmonaten bzw. Coronalon als auch die Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* schwächer ausgeprägt.

Die Mutagenese von *jin1* erfolgte mittels Röntgenstrahlen (Berger *et al.*, 1996). Diese Art der Mutagenese führt zu Veränderungen, die von einfachen Deletionen, Inversionen und Translokationen bis hin zu komplexen Rearrangements reichen können (Stanford *et al.*, 2001). Für das Vorkommen von komplexen Modifikationen in *jin1* sprechen zum einen die geringen Rekombinationsraten in diesem Bereich des Chromosoms und zum anderen die Schwierigkeiten bei der vollständigen Amplifikation des Gens. So entspricht am 5'-Ende die Sequenz in *jin1* über einen Bereich von mindestens 6000 Basenpaaren nicht der für den Wildtyp annotierten Sequenz. Statt dessen befindet sich dort ein Segment, das 100% Homologie zu At1g44070 aufweist. Dieses Gen kodiert ein Mitglied der CACTA-ähnlichen Transposon-Familie.

Synergistische Effekte zwischen Transposon-Mobilität und durch ionisierende Strahlung erzeugte Chromosomenbrüche wurden im tierischen Modellorganismus *Drosophila melanogaster* beschrieben (Margulies *et al.*, 1989). Wright *et al.* (2003) verwiesen auf einen Zusammenhang zwischen der Anzahl und Verteilung

transponibler Elemente, unter anderem auch Mitglieder der CACTA-Familie, und geringen Rekombinationsraten.

#### 4.4 Weiterführende Arbeiten

Einige Ansatzpunkte für weiterführende Experimente sind in den vorangegangenen Abschnitten bereits angedeutet worden.

So wäre zunächst zu klären, welche Mutation in *jin1* für den Mutantenphänotyp ausschlaggebend ist. Durch eine separate Komplementation der beiden Mutationsorte kann diese Frage geklärt werden.

Da die Inaktivierung von *AtMYC2* zu erhöhter Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* und verschiedenen nekrotrophen Pilzen zu führen scheint, wäre eine interessante Fragestellung, ob sich Pflanzen, die *AtMYC2* überexprimieren, gegenüber diesen Phytopathogenen durch eine gesteigerte Suszeptibilität auszeichnen. Interessant wäre auch, ob und wie sich die Ozonsensitivität in *AtMYC2* überexprimierenden Pflanzen verändert. Auf der anderen Seite wäre es denkbar, dass die gezielte Inaktivierung zusätzlicher *AtMyc2*-verwandter Gene (z.B. *AtMyc3* und *AtMyc4*) sowohl den jasmonatinsensitiven Phänotyp als auch die Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* und verschiedenen nekrotrophen Pilzen erhöht. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch eine Steigerung der Ozontoleranz.

Die Untersuchung von Suppressor-Mutanten könnte zu einem besseren Verständnis über die molekularen Mechanismen, durch die *JIN1/AtMYC2* jasmonatvermittelte Antworten reguliert, führen. Wie in der Suppressor-Mutante *cos1* ("*coi1 suppressor1*", Xiao *et al.*, 2004) könnte vermutet werden, dass sowohl der jasmonatinsensitive Phänotyp als auch die erhöhte Resistenz gegenüber Phytopathogenen und Ozon aufgehoben werden könnte.

Mit Hilfe des Yeast-2-Hybrid-System könnten mögliche Interaktionspartner von *AtMYC2* gefunden werden und so gezeigt werden, welche Gene durch *AtMYC2* reguliert werden.

Da im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die erhöhte Ozonsensitivität von *jin1 x jin4* Doppelmutanten auf den Einfluss von *jin4* oder WS zurückzuführen ist, wäre es interessant, die Ozonsensitivität der Doppelmutante *jin1 x jar1* zu untersuchen. Da sich beide Mutanten im ozontoleranten Co-

lumbia-Hintergrund befinden, könnte mit Hilfe der Doppelmutante diese Frage geklärt werden können.

Durch Expression von *AtMYC2* *in vitro* könnten ausreichende Proteinmengen zur Verfügung gestellt werden, um einerseits die Eigenschaften des Proteins zu untersuchen und andererseits die Herstellung von Antikörpern zu ermöglichen. Durch ein Antiserum könnte die Expression von *AtMYC2* und dessen Regulierung auch auf Proteinebene untersucht werden.

## **5. Zusammenfassung**

Die *Arabidopsis thaliana* Mutanten *jin1* und *jin4* wurden aufgrund ihrer reduzierten Sensitivität gegenüber dem Phytohormon Methyljasmonat selektiert (Berger *et al.*, 1996). Für die Mutante *jin1* konnte gezeigt werden, dass diese auch gegenüber Coronalon, einer synthetisch hergestellten Substanz, die dem Phytotoxin Coronatin in Struktur und Wirkungsweise ähnelt (Schüler *et al.*, 2004), weniger sensitiv ist als der Wildtyp.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mutanten *jin1* und *jin4* hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber biotrophen phytopathogenen Bakterien und Ozon charakterisiert.

In Infiltrationsexperimenten mit verschiedenen *Pseudomonas syringae*- Stämmen zeigte sich, dass sich *jin1* gegenüber den virulenten Stämmen *Pst* DC3000 und *Psm* Cr299 resistenter als der korrespondierende Wildtyp verhält. Die gesteigerte Resistenz von *jin1* gegenüber *Pst* DC3000 spiegelt sich auch im Chlorophyllgehalt der Blätter wider, der im Vergleich mit Wildtyp-Blättern nach *Pst* DC3000-Infiltration erhöht ist. Die gesteigerte Resistenz von *jin1* scheint coronatinunabhängig zu sein und ist möglicherweise durch die Aktivierung des salizylatvermittelten Abwehrweges erklärbar.

Die Mutante *jin4* hingegen weist keine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten *Pseudomonas syringae*-Stämmen auf. Auch hier konnte eine Korrelation mit dem Blattchlorophyllgehalt gezeigt werden, der verglichen mit Wildtyp-Blättern reduziert ist.

Nach Infiltration der entsprechenden avirulenten Stämmen, die das *avrRpm1*-Gen tragen, konnten zwischen *jin1* und *jin4* sowie den korrespondierenden Wildtypen keine Unterschiede in der Entwicklung von Läsionen und der Vermehrung der Bakterien in den Pflanzen festgestellt werden.

Auch nach Applikation von Ozon unterscheiden sich *jin1* und *jin4* hinsichtlich ihrer Sensitivität. Während *jin1* sich tolerant gegenüber Ozon verhält, reagiert *jin4* sensitiv auf dieses Gas. Auch die *jin1* x *jin4* Doppelmutanten zeichnen sich durch eine erhöhte Ozonsensitivität aus. Die in Northern Blot Analysen untersuchte Expression ozonresponsiver Gene (*PR1*, *Pdf1.2*, *Gst1*, *Gst2* und *Aco2*) korreliert mit den durch Ozon hervorgerufenen Läsionen in Wildtypen und Mutanten.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Kartierung des *jin1*-Mutationsortes, dessen Sequenzierung und die Komplementation des mutanten Phänotyps durch ein Wildtyp-Allel des in *jin1* veränderten Gens.

Der *jin1*-Mutationsort wurde auf Chromosom 1 auf dem BAC F6N18 lokalisiert.

Bei dem in *jin1* mutierten Gen handelt es sich um *AtMyc2* (At1g32640.1), das einen MYC Transkriptionsfaktor kodiert. Bei der Sequenzierung von *AtMyc2* in *jin1* wurde eine Punktmutation (Basenaustausch: Thymin statt Cytosin) in Position 725 gefunden, die in der Aminosäuresequenz in Position 242 zu einem Austausch von Leucin und Serin führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass in *jin1* die kodierende *AtMyc2*-Sequenz durch ein vorzeitiges STOP-Codon um 90 Basenpaare verkürzt ist. Dies führt zu einer Verkürzung des Proteins um 30 Aminosäuren.

Durch die Komplementation von *jin1* Pflanzen mit einem *AtMyc2*-Wildtyp-Allel bestätigte sich, dass die Mutation im *AtMyc2*-Gen für den mutanten Phänotyp verantwortlich ist.

In Northern Blot Analysen konnten *AtMYC2*-Transkripte vor allem in oberirdischen Pflanzenteilen nachgewiesen werden. Die Expression von *AtMYC2* in Blättern steigt nach Verwundung, nach Applikation der Phytohormone Abscisinsäure und Methyljasmonat sowie nach Infiltration von virulenten und avirulenten *Pseudomonas syringae* Stämmen auf ein Vielfaches an.

Es konnte gezeigt werden, dass *AtMYC2* die Expression von zwei Gruppen jasmonatresponsiver Gene unterschiedlich reguliert. Die eine Gruppe von Genen, die eine Rolle in der Antwort der Pflanze auf Verwundung spielen, werden durch *AtMYC2* aktiviert. Die andere Gruppe von Genen, die an pflanzlichen Abwehrreaktionen beteiligt sind, werden durch *AtMYC2* unterdrückt.

Möglicherweise können diese zwei Wege jasmonatvermittelter Antworten, die durch *AtMYC2* reguliert werden, auch die Ozontoleranz von *jin1*, die diese Mutante deutlich von anderen jasmonatinsensitiven Mutanten unterscheidet, erklären.

## **6. Literaturverzeichnis**

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K & Yamaguchi-Shinozaki K (2003). "Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling." *Plant Cell* 15(1): 63-78.
- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Hosokawa D & Shinozaki K (1997). "Role of *Arabidopsis* MYC and MYB Homologs in Drought-and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression." *Plant Cell* 9(10): 1859-1868.
- Agrios GN (1997). *Plant pathology*, 4th ed. Academic Press. Dan Diego, CA. 635 pp.
- Ahlfors R, Macioszek V, Rudd J, Brosche M, Schlichting R, Scheel D & Kangasjärvi J (2004). "Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 Belongs to the WWE Protein-Protein Interaction Domain Protein Family and Modulates Abscisic Acid, Ethylene, and Methyl Jasmonate Responses." *Plant Cell* 16(7): 1925-1937.
- Alonso JM, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S & Ecker JR (1999). "EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*." *Science*. 284: 2148-2152.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW & Lipman DJ (1990). "Basic local alignment search tool." *J.Mol.Biol.* 215: 403-410.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR & Kazan K (2004). "Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 16(12): 3460-3479.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*" *Nature* 408(6814): 796-815.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K (1989). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Baker C & Orlandi E (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* 33: 299-321.
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B & Dinesh-Kumar SP (1997). Signalling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.
- Bau, S (2001). "Untersuchungen zur Jasmonat-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* anhand des Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21*." Universität Halle, Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, 26.01.2001.
- Bell AA (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32, 21-81.

- Bell E & Mullet JE (1993). "Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding." *Plant Physiol.* 103: 1133-1137.
- Bender CL, Stone HE, Sims JJ & Cooksey DA (1987). "Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 mutants defective in coronatine production." *Physiol. Mol. Plant Pathol* 30: 273.
- Benedetti CE, Costa CL, Turcinelli SR & Arruda P (1998). "Differential Expression of a Novel Gene in Response to Coronatine, Methyl Jasmonate, and Wounding in the *Coi1* Mutant of *Arabidopsis*." *Plant Physiol.* 116(3): 1037-1042.
- Benedetti CE, Xie D & Turner JG (1995). "COI1-Dependent Expression of an *Arabidopsis* Vegetative Storage Protein in Flowers and Siliques and in Response to Coronatine or Methyl Jasmonate." *Plant Physiol.* 109(2): 567-572.
- Bennet RN & Wallsgrove RM (1994). "Secondary metabolites in plant defense mechanisms." *New Phytol* 127: 617-633.
- Berger S (2002). "Jasmonate-related mutants as tools to study stress-signaling." *Planta* 214: 497-504.
- Berger S, Bell E & Mullet JE (1996). "Two Methyl Jasmonate-Insensitive Mutants Show Altered Expression of *AtVsp* in Response to Methyl Jasmonate and Wounding." *Plant Physiol.* 111(2): 525-531.
- Berger S, Bell E, Sadka A & Mullet JE (1995). "*Arabidopsis thaliana AtVsp* is homologous to soybean *VspA* and *VspB*, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate." : *Plant Mol Biol.* 27(5): 933-942.
- Block A, Schmelz E, Jones JB & Klee HJ (2005). "Coronatine and salicylic acid: the battle between *Arabidopsis* and *Pseudomonas* for phytohormone control." *Mol Plant Pathol* 6(1): 79-83.
- Blume B, Nürnberger N, Nass N & Scheel D (2000): Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-1440.
- Boch JM, Verbsky L, Robertson TL, Larkin JC & Kunkel BN (1998). "Analysis of resistance gene-mediated defense responses in *Arabidopsis thaliana* plants carrying a mutation in *CPR5*." . *Mol Plant Microbe Interact.* 11(12): 1196-1206.
- Boller T (1995). "Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46(1): 189-214.
- Bolwell GP (1999): Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 2: 287-294.
- Boter M, Ruiz-Rivero O, Abdeen A & Prat S (2004). "Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*." *Genes Dev.* 18(13): 1577-1591.
- Bowles DJ (1990). "Defense-related proteins in higher plants." *Annu Rev Biochem* 59: 873-907.

- Bowling SA, Clarke JD, Liu YD, Klessig DF & Dong X (1997). "The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance." *Plant Cell* 9: 1573-1584.
- Brooks DM, Hernandez-Guzman G, Kloek AP, Alarcon-Chaidez F, Sreedharan A, Rangaswamy V, Penaloza-Vazquez A, Bender CL & Kunkel BN. (2004). "Identification and characterization of a well-defined series of coronatine biosynthetic mutants of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." *Mol Plant Microbe Interact.* 17(2): 162-174.
- Browse J, McConn M, James D Jr & Miquel M (1993). "Mutants of *Arabidopsis* deficient in the synthesis of alpha-linolenate. Biochemical and genetic characterization of the endoplasmic reticulum linoleoyl desaturase." *J. Biol. Chem.* 268(22): 16345-16351.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S & Dong X (1997). "The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats." *Cell.* 88: 57-63.
- Chamnongpol S, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, van Montagu M, Inzé D & van Camp W (1998). "Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco." *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5818-5823.
- Chang C & Shockey JA (1999). "The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation." *Current Opinion in Plant Biology* 2(5): 352-358.
- Chester K (1933). "The problem of acquired physiological immunity in plants." *Quart. Rev. Biol.* 8: 129-151.
- Christensen AB, Cho BH, Naesby M, Gregersen PL, Brandt J, Madriz-Ordeñana K, Collinge DB & Thordal-Christensen H (2002). "The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins." *Mol Plant Pathol* 3(3): 135-144.
- Clarke JD, Liu Y, Klessig DF & Dong X (1998). "Uncoupling PR Gene Expression from NPR1 and Bacterial Resistance: Characterization of the Dominant *Arabidopsis cpr 6-1* Mutant." *Plant Cell* 10(4): 557-570.
- Clarke JD, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM & Dong X (2000). "Roles of Salicylic Acid, Jasmonic Acid, and Ethylene in *cpr*-Induced Resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 12(11): 2175-2190.
- Clough SJ & Bent AF (1998). "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*" *Plant J* 16: 735-743.
- Clough SJ, Fengler KA, Yu I, Lippok B, Smith RK Jr. & Bent AF (2000). "The *Arabidopsis dnd1* "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(16): 9323-9328.
- Collinge DB, Gregersen PL & Thordal-Christensen H (2002). The nature and role of defence response genes in cereals. Chapter 10 In : Belanger RR, Bushnell WR (Eds.) *The Powdery Mildews: A Comprehensive Treatise*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. pp 146-160.

- Creelman RA & Mullet JE (1997). "Biosynthesis and action of jasmonates in plants." Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 48(1): 355-381.
- Dangl JL, Dietrich RA & Richberg MH (1996). "Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions." Plant Cell 8(10): 1793-1807.
- Dangl JL & Jones JDG (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature 411(6839): 826-833.
- Darvill AG & Albersheim P (1984): "Phytoalexins and their elicitors--a defense against microbial infection in plants." Ann Rev Plant Physiol 35:243-275.
- Debener T, Lehnackers H, Arnold M & Dangl JL (1991). "Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate." Plant J 1: 289-302.
- Degousee N, Triantaphylides C & Montillet JL (1994) "Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of glyceollin synthesis in soybean." Plant Physiol 104: 945-952.
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA & Lamb C (1998) : "Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance." Nature 394: 585-588.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A & Lamb C (2001): "Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response." Proc Natl Acad Sci USA 98: 13454-13459.
- Demole E, Lederer E & Mercier D (1962). "Isolement et de détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin." Helv. Chim. Acta 45: 675-685.
- Desikan R, Reynolds A, Hancock JT & Neill SJ (1998). "Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures." Biochem J, 330: 115-120.
- Devlin WS & Gustine DL (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation in the hypersensitive reaction. Plant Physiol 100: 1189-1195
- Devoto A & Turner JG (2003). "Regulation of Jasmonate-mediated Plant Responses in *Arabidopsis*." Ann Bot 92(3): 329-337.
- Dewdney J, Reuber TL, Wildermuth MC, Devoto A, Cui J, Stutius LM, Drummond EP & Ausubel FM (2000). "Three unique mutants of *Arabidopsis* identify *eds* loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen." Plant J 24(2): 205-218.
- Dixon RA (1986). "The phytoalexin response: Elicitation, signaling and the control of host gene expression." Biol. Rev. 61: 239-291.
- Dong X, Mindrinos M, Davis KR & Ausubel FM (1991). "Induction of *Arabidopsis* Defense Genes by Virulent and Avirulent *Pseudomonas syringae* Strains and by a Cloned Avirulence Gene." Plant Cell 3(1): 61-72.
- Durner J & Klessig DF (1999): "Nitric oxide as a signal in plants." Curr Opin Plant Biol 2: 369-374.

- Durner J, Shah J & Klessig DF (1997): "Salicylic acid and disease resistance in plants." *Trends Plant Sci* 2: 266-274.
- Ebel J & Scheel D (1997): "Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota Plant Relationships*." Part A. (Carroll, G.C. and Tudzynski, P., eds). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 85-105.
- Ebel J & Scheel D (1992). Elicitor recognition and signal transduction. In: Boller T, Meins F (eds) *Genes involved in plant defense*. Springer, Wien, 184-205.
- Ellis C, Karafyllidis I & Turner JG (2002). "Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*." : *Mol Plant Microbe Interact*. 15(10): 1025-1030.
- Ellis C & Turner JG (2001). "The *Arabidopsis* Mutant *cev1* Has Constitutively Active Jasmonate and Ethylene Signal Pathways and Enhanced Resistance to Pathogens." *Plant Cell* 13(5): 1025-1033.
- Feinberg AP & Vogelstein B (1984). "Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity." *Anal. Biochem.* 137: 266.
- Felton GW, Korth KL, Bi JL, Wesley SV, Huhman DV, Mathews MC, Murphy JB, Lamb C & Dixon RA (1999). "Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory." *Current Biology* 9(6): 317-320.
- Feys B, Benedetti CE, Penfold CN & Turner JG (1994). "*Arabidopsis* Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen." *Plant Cell* 6(5): 751-759.
- Feys B & Parker JE (2000): Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16 (10): 449 - 455.
- Flor HH (1971). "Current status of gene-for-gene concept." *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275-296.
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessman H & Ryals J (1993). "Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance." *Science* 261: 754-756.
- Glazebrook J (1999). "Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*." *Current Opinion in Plant Biology* 2(4): 280-286.
- Glazebrook J (2001). "Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status." *Current Opinion in Plant Biology* 4(4): 301-308.
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C, Me traux JP, Zhu T & Katagiri F (2003). "Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping." *Plant J* 34(2): 217-228.
- Grant JJ, Yun BW & Loake GJ (2000). "Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that functions

- independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity." *Plant J* 24(5): 569-582.
- Gundlach H, Muller MJ, Kutchan TM & Zenk MH (1992). "Jasmonic Acid is a Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures." *Proc Natl Acad Sci USA* 89(6): 2389-2393.
- Guzman P & Ecker JR (1990). "Exploiting the Triple Response of *Arabidopsis* To Identify Ethylene-Related Mutants." *Plant Cell* 2(6): 513-523.
- Hamberg M & Gardner HW (1992). "Oxylipin pathway to jasmonates: Biochemistry and biological significance." *Biochem. Biophys. Acta* 1165: 1-18.
- Hammond-Kosack KE & Jones J (1996). "Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses." *Plant Cell* 8(10): 1773-1791.
- Hammond-Kosack KE & Jones J (2000). "Responses to plant pathogens." In: "Biochemistry and molecular biology of plants." (Buchanan, B., Gruissem, W. und Jones, R.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1102-1156.
- Hammond-Kosack KE & Parker JE (2003). "Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding." *Current Opinion in Biotechnology* 14(2): 177-193.
- Heath, M. I. C. (2000). "Hypersensitive response-related death." *Plant Molecular Biology* 44(3): 321-334.
- Heggestad HE (1991). "Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone." *Environ Pollut* 74: 264-291.
- Heggestad HE & Middleton JT (1959). "Ozone in high concentrations as cause of tobacco leaf injury." *Science* 129: 208-210.
- Heise J (2004). "Regulation von Faktoren der Metallhomöostase und der Metalldetoxifikation unter Schwermetallstress und während der Blattseneszenz in Gerste (*Hordeum vulgare*)." Universität Halle, Fachbereich Biologie 23.06.2004.
- Herrmann G, Kramell HM, Kramell R, Weidhase RA & Sembdner G (1987). "Biological activity of jasmonic acid conjugates. In *Conjugated Plant Hormones: Structure, Metabolism and Function.*" ed. Schreiber K, Schütte HR, Sembdner G, 315-322. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften.
- Hilpert B, Bohlmann H, den Camp R, Przybyla D, Miersch O, Buchala A & Apel K (2001). "Isolation and characterization of signal transduction mutants of *Arabidopsis thaliana* that constitutively activate the octadecanoid pathway and form necrotic microlesions." *Plant J* 26(4): 435-446.
- Höfgen R & Willmitzer L (1988). "Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation." *Nucl. Acids Res.* 16: 9877.
- Ishiguro S, Kawai-Oda A, Ueda J, Nishida I & Okada K (2001). "The DEFECTIVE IN ANTHWER DEHISCENCE1 Gene Encodes a Novel Phospholipase A1 Catalyzing the Initial Step of Jasmonic Acid Biosynthesis, Which Synchronizes Pollen

- Maturation, Anther Dehiscence, and Flower Opening in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 13(10): 2191-2209.
- Jensen AB, Raventos D & Mundy J (2002). "Fusion genetic analysis of jasmonate-signalling mutants in *Arabidopsis*." *Plant J* 29(5): 595-606.
- Johnson PR & Ecker JR (1998). "The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective." *Annu Rev Genet.* 32: 227-254.
- Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M & Karjalainen R (1994). "Plant defense systems induced by ozone." *Plant Cell Environ.* 17: 783-794.
- Kanna M, Tamaoki M, Kubo A, Nakajima N, Rakwal R, Agrawal GK, Tamogami S, Ioki M, Ogawa D, Saji H & Aono M (2003). "Isolation of an Ozone-Sensitive and Jasmonate-Semi-Insensitive *Arabidopsis* Mutant (*oji1*)." *Plant Cell Physiol.* 44(12): 1301-1310.
- Keen NT (1975): "Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens?" *Science*, 187, 7475.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog G, Ward E, Uknes S & Ryals J (1994). "Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals." *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 439-460.
- Kiedrowski S, Kawalleck P, Hahlbrock K, Somssich IE & Dangl JL (1992). "Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance locus." *EMBO J.* 11(13): 4677-4684.
- King EO, Ward MK & Raney DE (1954). "Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin." *J Lab Clin Med.* 44: 301-307.
- Kinkema M, Fan W & Dong X (2000). "Nuclear Localization of NPR1 Is Required for Activation of PR Gene Expression." *Plant Cell* 12(12): 2339-2350.
- Kloek AP, Verbsky ML, Sharma SB, Schoelz JE, Vogel J, Klessig DF & Kunkel BN (2001). "Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive *coi1* mutation occurs through two distinct mechanisms." *Plant J* 26(5): 509-522.
- Kobe B & Kajava AV (2001). "The leucine-rich repeat as a protein recognition motif." *Current Opinion in Structural Biology* 11(6): 725-732.
- Koda Y, Kikuta Y, Kitahara T, Nishi T & Mori K (1992). "Comparisons of various biological activities of stereoisomers of methyl jasmonate." *Phytochemistry* 31: 1111-1114.
- Kombrink E & Somssich IE (1995): "Defense responses of plants to pathogens." In JH Andrews, IC Tommerup, eds, *Advances in Botanical Research (incorporating Advances in Plant Pathology)*, Vol 21. Academic Press, London, pp 1-34
- Koncz C & Schell J (1986). "The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector." *Mol. Gen. Genet.* 204: 383-396.
- Kubigsteltig II & Weiler EW (2003). "*Arabidopsis* mutants affected in the transcriptional

- control of allene oxide synthase, the enzyme catalyzing the entrance step in octadecanoid biosynthesis." *Planta* 217(5): 748-757.
- Laibach F (1943). "*Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen." *Bot. Archiv.* 44: 439-455.
- Lamb C & Dixon RA (1997). "The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48(1): 251-275.
- Laurie-Berry NL, Joardar V & Kunkel BN (2004). Jasmonic acid signaling mutants of *Arabidopsis* exhibit reduced susceptibility to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. American Society of Plant Biologists Annual Meeting: *Plant Biology 2004, Lake Buena Vista, FL USA*.
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R & Lamb C (1994). "H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response." *Cell.* 79: 583-593.
- Leyser HM, Lincoln CA, Timpte C, Lammer D, Turner J & Estelle M (1993). "*Arabidopsis* auxin-resistance gene *AXR1* encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1." *Nature* 364: 161-164.
- Lieberherr D, Wagner U, Dubuis PH, Metraux JP & Mauch F (2003). "The Rapid Induction of Glutathione S-Transferases AtGSTF2 and AtGSTF6 by Avirulent *Pseudomonas syringae* is the Result of Combined Salicylic Acid and Ethylene Signaling." *Plant Cell Physiol.* 44(7): 750-757.
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ & Solano R (2003). "ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense." *Plant Cell* 15(1): 165-178.
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ & Solano R (2004). "JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 16(7): 1938-1950.
- Lyons T, Plöchl M, Turcsányi E & Barnes J (1999). "Extracellular antioxidants: A protective screen against ozone?" In: *Environmental pollution and plant response*, eds. Agrawal S, Agrawal M & Krizek DT, CRC Press/Lewis Publ., Boca Raton, USA, 183-201.
- Maleck K & Dietrich RA (1999). "Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies?" *Trends in Plant Science* 4(6): 215-219.
- Margulies L, Griffith CS, Dooley JC & Wallace SS. (1989). "The interaction between X-rays and transposon mobility in *Drosophila*: hybrid sterility and chromosome loss." *Mutat Res.* 215(1): 1-14.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Gaille C, Kull B, Haas D & Reimann C (2001). "Manipulation of salicylate content in *Arabidopsis thaliana* by the expression of an engineered bacterial salicylate synthase." *Plant J* 25(1): 67-77.
- McConn M & Browse J (1996). "The Critical Requirement for Linolenic Acid Is Pollen Development, Not Photosynthesis, in an *Arabidopsis* Mutant." *Plant Cell* 8(3): 403-416.

- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE & Browse J (1997). "Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 5473–5477.
- McConn M, Hugly S, Browse J & Somerville C (1994). "A Mutation at the *fad8* Locus of *Arabidopsis* Identifies a Second Chloroplast [omega]-3 Desaturase." Plant Physiol. 106(4): 1609-1614.
- Melan MA, Dong X, Endara ME, Davis KR, Ausubel FM & Peterman TK (1993). "An *Arabidopsis thaliana* Lipoxygenase Gene Can Be Induced by Pathogens, Abscisic Acid, and Methyl Jasmonate." Plant Physiol. 101(2): 441-450.
- Meyer A, Miersch O, Büttner C, Dathe W & Sembdner G. (1984). "Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants." J. Plant Growth Regul. 3: 1-8.
- Miller PR, Parmeter JR, Taylor OC & Cardiff EA (1963). "Ozone injury to the foliage of *Pinus ponderosa*." Phytopathology 53: 1072-1076.
- Mittal S & Davis K (1995). "Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*." Mol Plant Microbe Interact. 8(1): 165-171.
- Mittler R (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends Plant Sci 7: 405-410.
- Miura A, Kato M, Watanabe K, Kawabe A, Kotani H & Kakutani T (2004). "Genomic localization of endogenous mobile CACTA family transposons in natural variants of *Arabidopsis thaliana*" Mol Genet Genomics 270(6): 524-532.
- Murashige T & Skoog F (1962). "A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures." Physiol. Plant. 15(473-497).
- Nawrath C & Metraux JP (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.
- Nickstadt A, Thomma BPHJ, Feussner I, Kangasjärvi J, Zeier J, Löffler C, Scheel D & Berger S (2004). "The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens." Mol Plant Pathol 5(5): 425-434.
- Nürnberg T (1999). "Signal perception in plant pathogen defense." Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS) 55(2): 167-182.
- Nürnberg T & Brunner F (2002). "Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns." Current Opinion in Plant Biology 5(4): 318-324.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K & Scheel D (1994). "High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses." Cell 78: 449-460.
- Nürnberg T & Scheel D (2001). "Signal transmission in the plant immune response." Trends in Plant Science 6(8): 372-379.
- Nürnberg T, Wirtz W, Nennstiel D, Hahlbrock K, Jabs T, Zimmermann S & Scheel D.

- (1997). "Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense." *J Recept Signal Transduct Res.* Jan-May;17(1-3):127-36.
- Oerke EC, Dehne HW, Schonbeck F & Weber A (1994). *Crop production and crop protection. Estimated Losses in Major Food and Cash Crops.* Elsevier, New York.
- Örvar BL, McPherson J & Ellis BE (1997). "Pre-activating wounding response in tobacco prior to high-level ozone exposure prevents necrotic injury." *Plant J.* 11: 203-212.
- Overmyer K, Brosche M & Kangasjärvi J (2003). "Reactive oxygen species and hormonal control of cell death." *Trends in Plant Science* 8(7): 335-342.
- Overmyer K, Tuominen H, Kettunen R, Betz C, Langebartels C, Sandermann H & Kangasjärvi J (2000). "Ozone-Sensitive *Arabidopsis* *rcd1* Mutant Reveals Opposite Roles for Ethylene and Jasmonate Signaling Pathways in Regulating Superoxide-Dependent Cell Death." *Plant Cell* 12(10): 1849-1862.
- Osbourn A (1996). "Saponins and plant defence -- a soap story." *Trends in Plant Science* 1(1): 4-9.
- Park JH, Halitschke R, Kim HB, Baldwin IT, Feldmann KA & 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.
- Paxton JD (1981). "Phytoalexins- a working redefinition." *Phytopathol. Z* 101: 106-109.
- Pellinen R, Palva T & Kangasjärvi J (1999). "Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells." *Plant J* 20(3): 349-356.
- Penninckx IAMA, Eggermont K, Schenk PM, Van den Ackerveken G, Cammue BPA & Thomma BPHJ (2003). "The *Arabidopsis* mutant *iop1* exhibits induced over-expression of the plant defensin gene *PDF1.2* and enhanced pathogen resistance." *Mol Plant Pathol* 4(6): 479-486.
- Penninckx, IAMA, Eggermont K, Terras FRG, Thomma BPHJ, Samblanx GWD, Buchala A, Mettraux JP, Manners JM & Broekaert WF (1996). "Pathogen-Induced Systemic Activation of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis* Follows a Salicylic Acid-Independent Pathway." *Plant Cell* 8(12): 2309-2323.
- Petersen MBP, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB & Mundy J. (2000). "*Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance." *Cell.* 103: 1111-1120.
- Pieterse CMJ & van Loon LC (1999). "Salicylic acid-independent plant defence pathways." *Trends in Plant Science* 4(2): 52-58.
- Pieterse CMJ, van Wees SCM, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ & van Loon LC (1998). "A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 10(9): 1571-1580.
- Prell HH (1996). *Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen.* Fischer Verlag Jena.

- Preston GM (2000). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time." *Mol Plant Pathol* 1(5): 263-275.
- Rao MV & Davis KR (1999). "Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis* the role of salicylic acid." *Plant J* 17(6): 603-614.
- Rao MV, Lee H, Creelman RA, Mullet JE & Davis KR (2000a). "Jasmonic Acid Signaling Modulates Ozone-Induced Hypersensitive Cell Death." *Plant Cell* 12(9): 1633-1646.
- Rao MV, Koch JR & Davis KR (2000b). "Ozone: A tool for probing programmed cell death in plants." *Plant Mol Biol* 44: 345-358.
- Rausher MD (2001). "Co-evolution and plant resistance to natural enemies." *Nature* 411(6839): 857-864.
- Ray J (1901). "Les maladies cryptogamiques des vegetaux." *Rev. Gen. Bot.* 13: 163-175.
- Raz V & Ecker J (1999). "Regulation of differential growth in the apical hook of *Arabidopsis*." *Development* 126(16): 3661-3668.
- Richards BL, Middleton JT & Hewitt WB (1958). "Air pollution with relation to agronomic crops: V. Oxidant stipple of grape." *Agron J*, 50: 559-561.
- Richmond TA & Bleecker AB (1999). "A Defect in *beta*-Oxidation Causes Abnormal Inflorescence Development in *Arabidopsis*." *Plant Cell* 11(10): 1911-1924.
- Ritter C & Dangl JL (1995). "The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* is required for virulence on *Arabidopsis*." *Mol Plant Microbe Interact.* 8(3): 444-453.
- Ritter C. & Dangl JL (1996). "Interference between Two Specific Pathogen Recognition Events Mediated by Distinct Plant Disease Resistance Genes." *Plant Cell* 8(2): 251-257.
- Rogers EE & Ausubel FM (1997). "*Arabidopsis* Enhanced Disease Susceptibility Mutants Exhibit Enhanced Susceptibility to Several Bacterial Pathogens and Alterations in PR-1 Gene Expression." *Plant Cell* 9(3): 305-316.
- Rogers SO & Bendich AJ (1988). Extraction of DNA from plant tissues. in *Plant Molecular Biology Manual*. Kluwer, Dordrecht, The Netherlands: 1-10.
- Ross A (1961a). "Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts." *Virology* 14: 329-339.
- Ross A (1961b). "Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants." *Virology* 14: 340-358.
- Rozen S & Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.
- Ryals J, Uknes S & Ward E (1994). "Systemic acquired resistance." *Plant Physiol* 104: 1109-1112.
- Salmeron JM & Vernooij B (1998). "Transgenic approaches to microbial disease

- resistance in crop plants." *Curr. Opin. In Plant Biol.* 1(4): 347-352.
- Sandermann H Jr, Ernst D, Heller W & Langebartels C (1998). "Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions." *Trends Plant Sci.* 3: 47-50.
- Sandermann H Jr (1996). "Ozone and Plant Health." *Annual Review of Phytopathology* 34(1): 347-366.
- Sanders PM, Lee PY, Biesgen C, Boone JD, Beals TP, Weiler EW & Goldberg RB (2000). "The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 Gene Encodes an Enzyme in the Jasmonic Acid Synthesis Pathway." *Plant Cell* 12(7): 1041-1062.
- Schaad, N. W. (1988). "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, 2nd ed. (St. Paul: APS Press)." .
- Scheel D (1998). "Resistance response physiology and signal transduction." *Curr. Opin. in Plant Biol.* 1: 305-310
- Scheel D (2002): Oxidative Burst and the Role of Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions. In *Oxidative Stress in Plants*, eds. Inzé D, Van Montagu M, Taylor and Francis. London, pp. 137-153.
- Schneider DS (2002). "Plant Immunity and Film Noir: What Gumshoe Detectives Can Teach Us about Plant-Pathogen Interactions." *Cell* 109(5): 537-540.
- Schneider M, Schweizer P, Meuwly P & Métraux JP (1996). "Systemic acquired resistance in plants." In: Jeon KW, ed. *International review of cytology, vol. 168*. San Diego: Academic Press, 303-340.
- Schraudner M, Moeder W, Wiese C, van Camp W, Inze D, Langebartels C & Sandermann H (1998). "Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3." *Plant J* 16(2): 235-245.
- Schüler G, Mithofer A, Baldwin IT, Berger S, Ebel J, Santos JG, Herrmann G, Holscher D, Kramell R & Kutchan TM (2004). "Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology." *FEBS Letters* 563(1-3): 17-22.
- Sharma YK & Davis KR (1994). "Ozone-Induced Expression of Stress-Related Genes in *Arabidopsis thaliana*" *Plant Physiol.* 105(4): 1089-1096.
- Smolen GA, Pawlowski L, Wilensky SE & Bender J (2002). "Dominant Alleles of the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor ATR2 Activate Stress-Responsive Genes in *Arabidopsis*." *Genetics* 161(3): 1235-1246.
- Somssich IE, Wernert P, Kiedrowski S & Hahlbrock K (1996). "*Arabidopsis thaliana* defense-related protein ELI3 is an aromatic alcohol: NADP<sup>+</sup> oxidoreductase." *PNAS* 93(24): 14199-14203.
- Stanford WL, Cohn JB & Cordes SP (2001). "Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond." *Nat Rev Genet.* 2: 756-768.
- Staswick PE, Su W & Howell SH (1992). "Methyl Jasmonate Inhibition of Root Growth and Induction of a Leaf Protein are Decreased in an *Arabidopsis thaliana* Mutant." *PNAS* 89(15): 6837-6840.
- Staswick PE, Tiryaki I & Rowe ML (2002). "Jasmonate Response Locus JAR1 and

- Several Related *Arabidopsis* Genes Encode Enzymes of the Firefly Luciferase Superfamily That Show Activity on Jasmonic, Salicylic, and Indole-3-Acetic Acids in an Assay for Adenylation." *Plant Cell* 14(6): 1405-1415.
- Staswick PE & Tiryaki I. (2004). "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16:2117-2127.
- Staswick PE, Yuen GY & Lehman CC (1998). "Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*." *Plant J* 15(6): 747-754.
- Sticher L, Mauch-Mani B & Métraux JP (1997). "Systemic acquired resistance." *Annu Rev Phytopathol.* 35: 235-270.
- Stintzi A & Browse J (2000). "The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(19): 10625-10630.
- Stintzi A, Weber H, Reymond P, Browse J & Farmer EE (2001). "Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones." *Proc Natl Acad Sci USA* 98(22): 12837-12842.
- Takken FLW & Joosten MHAJ (2000). "Plant Resistance Genes: Their Structure, Function and Evolution." *European Journal of Plant Pathology* 106(8): 699-713.
- Tamaoki M, Matsuyama T, Kanna M, Nakajima N, Kubo A, Aono M & Saji H (2003). "Differential ozone sensitivity among *Arabidopsis* accessions and its relevance to ethylene synthesis." *Planta* 216(4): 552-560.
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA & Broekaert WF (1998). "Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens." *Proc Natl Acad Sci USA* 95(25): 15107-15111.
- Thomma BPHJ, Penninckx IA, Broekaert WF & Cammue BP (2001). "The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*." *Current Opin Plant Biology* 13: 63-68.
- Tiryaki I & Staswick PE (2002). "An *Arabidopsis* Mutant Defective in Jasmonate Response Is Allelic to the Auxin-Signaling Mutant *axr1*." *Plant Physiol.* 130(2): 887-894.
- Töpfer R, Matzeit V, Gronenborn B, Schell J & Steinbiss HH (1987). "A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions." *Nucleic Acids Res.* 15: 5890.
- Tuomainen J, Betz C, Kangasjärvi J, Ernst D, Yin ZH, Langebartels C & Sandermann H (1997). "Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes." *Plant J* 12(5): 1151-1162.
- Tuominen H, Overmyer K, Keinänen M, Kollist H & Kangasjärvi J (2004). "Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*." *Plant J* 39(1): 59-69.
- Uppalapati SR, Ayoubi P, Weng H, Palmer DA, Mitchell RE, Jones W & Bender CL (2005). "The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple

- phytohormone pathways in tomato." *The Plant Journal* 42(2): 201-217.
- van Breusegem F, Vranová E, Dat JF & Inzé D (2001). "The role of active oxygen species in plant signal transduction." *Plant Science* 161: 405-414.
- van der Biezen EA & Jones JDG(1998). "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept." *Trends in Biochemical Sciences* 23(12): 454-456.
- van Wees SCM, de Swart EAM, van Pelt JA, van Loon LC & Pieterse CMJ (2000). "Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*." *Proc Natl Acad Sci USA* 97(15): 8711-8716.
- Vick BA & Zimmerman DC (1984). "Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species." *Plant Physiol.* 75: 458-461.
- Vijayan P, Shockey J, Levesque CA, Cook RJ & Browse J (1998). "A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*." *Proc Natl Acad Sci USA* 95(12): 7209-7214.
- von Malek B, Van Der Graaff E, Schneitz K & Keller B (2002). "The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway." *Planta* 216: 187-192.
- Ward E, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Metraux JP & Ryals JA. (1991). "Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance." *Plant Cell* 3(10): 1085-1094.
- Weiler EW, Albrecht T, Groth B, Xia ZQ, Luxem M, Liß H, Andert L & Spengler P (1993). "Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*." *Phytochemistry* 32: 591-600.
- Weiler EW, Kutchan TM, Gorba T, Brodschelm W, Niesel U & Bublitz F (1994). "The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants." *FEBS Letters* 345: 9-13.
- Weisshaar B & Jenkins GI (1998). "Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation." *Current Opinion in Plant Biology* 1(3): 251-257.
- Wellburn FAM & Wellburn AR (1996) Variable patterns of antioxidant protection but similar ethene emission differences in several ozone-sensitive and ozone-tolerant plant selections. *Plant Cell Environ* 19:754-760
- Whalen M, Innes R, Bent A & Staskawicz B (1991). "Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis thaliana* and a bacterial gene determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean." *Plant Cell* 3: 49-59.
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G & Ausubel F (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." *Nature* 414(6863): 562-565.
- Wojtaszek P, Stobiecki M & Bolwell GP (1997). "Changes in the composition of exocellular proteins of suspension-cultured *Lupinus albus* cells in response to fungal elicitors or CuCl<sub>2</sub>." *J Exp Bot* 48: 2015-2021.

- Wright SI, Agrawal N & Bureau TE (2003). "Effects of Recombination Rate and Gene Density on Transposable Element Distributions in *Arabidopsis thaliana*." *Genome Res.* 13(8): 1897-1903.
- Xiang C, Han P, Lutziger I, Wang K & Oliver DJ. (1999). "A mini binary vector series for plant transformation." *Plant Mol Biol.* 40(4): 711-717.
- Xiao S, Dai L, Liu F, Wang Z, Peng W & Xie D (2004). "COS1: An *Arabidopsis coronatine insensitive1* Suppressor Essential for Regulation of Jasmonate-Mediated Plant Defense and Senescence." *Plant Cell* 16(5): 1132-1142.
- Xie DX, Feys BF, James S, Nieto-Rostro M & Turner JG. (1998). "COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility." *Science* 280(5366): 1091-1094.
- Xu LH, Liu FQ, Wang ZL, Peng W, Huang RF, Huang DF & Xie DX (2001). "An *Arabidopsis* mutant *cex1* exhibits constant accumulation of jasmonate-regulated *AtVSP*, *Thi2.1* and *PDF1.2*." *FEBS Letters* 494: 161-164.
- Yamaguchi-Shinozaki K & Shinozaki K (1993). "The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*." *Mol Gen Genet.* 238: 17-25.
- Zhang S & Klessig DF (1997). "Salicylic Acid Activates a 48-kD MAP Kinase in Tobacco." *Plant Cell* 9(5): 809-824.
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, & Howe GA . (2003). "Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway." *Plant J* 36(4): 485-499.
- Zwerger K & Hirt H (2001). "Recent Advances in Plant MAP Kinase Signalling." *Biol. Chem.* 382: 1123-1131.

## 7. Anhang

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 MTDYRLQPTMNLWTTDDNASMMEAFMSSSDISTLWPPASTTTTTATTETPTPAMEIPAQAGFNQETLQQRQLQALIEGTHEGWTYAI
      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 LGWGDGYKGEEDKANPRRRSSSPFSTPADQEYRKKVLRRELNSLISGGVAPSDDAVDEEVIDTEWFFLVSMQTQSFACGAGLAGKAFATGNAV
      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 LSGSGCERAKQGGVFGMHTIACIP SANGVVEVGSTEP IROSDLINKVRILFNFDGGAGDLSGLNWNLDPDQGENDP
      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 SSQLFSKSIQFENGSSSTITENPNLDPTSPVHSQTQNPKNNTFSRELNFSTSSSTLVKPRSGEILNFGDEGKRSSGNPD
      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 LNEDKVLSPGDKTAGESDHSDEASVVKVEVAVEKRPKGRKPANGREPLNHVEAERQRREKLNQRFYALRAVVPNVSKMDKAS
      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 VVKTESEKLQIKNQLEEVKLELAGRKASASGGDMSSSCSSIKPVGMEIEVKIIGWDAMIRVESSKRNHPAARLMSALMDLE
      610     620
jin1  ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
AtMYC2 VVKTESEKLQIKNQLEEVKLELAGRKASASGGDMSSSCSSIKPVGMEIEVKIIGWDAMIRVESSKRNHPAARLMSALMDLE

```

**Abbildung 7.1:** Aminosäuresequenz *AtMYC2* im Wildtyp und in *jin1*. Unterschiede zwischen den Sequenzen sind rot unterlegt.

## BLAST query on *Arabidopsis* sequences

Query performed by the [The Arabidopsis Information Resource \(\)](#) for full BLAST options and parameters, refer to the [NCBI BLAST Documentation](#)

BLASTN 2.2.8 [Jan-05-2004]

### Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

Sequences producing significant alignments:						Score	E
						(bits)	Value
At1g44070	68414.t04646	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">1190</a>	0.0	
At5g29574	68418.t03324	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">1023</a>	0.0	
At1g42718	68414.t04498	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">997</a>	0.0	
At4g07517	68417.t01109	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">965</a>	0.0	
At5g32925	68418.t03597	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">799</a>	0.0	
At3g30393	68416.t03502	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">775</a>	0.0	
At1g36470	68414.t04100	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">775</a>	0.0	
At2g12260	68415.t01255	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">759</a>	0.0	
At1g50860	68414.t05240	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">759</a>	0.0	
At3g33169	68416.t03932	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">753</a>	0.0	
At3g29732	68416.t03415	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">753</a>	0.0	
At2g12305	68415.t01260	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">751</a>	0.0	
At2g06790	68415.t00694	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">647</a>	0.0	
At4g03900	68417.t00503	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">589</a>	e-167	
At3g30680	68416.t03553	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">565</a>	e-160	
At1g40123	68414.t04326	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">565</a>	e-160	
At5g28926	68418.t03264	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">559</a>	e-158	
At5g45085	68418.t05149	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">557</a>	e-158	
At1g35590	68414.t03987	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">549</a>	e-155	
At5g35606	68418.t03928	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">439</a>	e-122	
At1g39190	68414.t04278	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">423</a>	e-117	
At3g42721	68416.t04120	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">409</a>	e-113	
At5g29056	68418.t03304	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">342</a>	4e-93	
At2g06740	68415.t00688	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">328</a>	7e-89	
At5g28165	68418.t03099	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">296</a>	3e-79	
At4g08092	68417.t01252	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">296</a>	3e-79	
At2g10140	68415.t00987	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">270</a>	2e-71	
At4g08000	68417.t01222	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">238</a>	8e-62	
At5g34394	68418.t03716	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">230</a>	2e-59	
At5g34174	68418.t03712	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">230</a>	2e-59	
At2g10480	68415.t01038	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">204</a>	1e-51	
At1g49070	68414.t05033	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">202</a>	5e-51	
At2g10630	68415.t01060	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">198</a>	8e-50	
At5g32563	68418.t03550	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">194</a>	1e-48	
At5g33422	68418.t03685	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">182</a>	5e-45	
At4g06650	68417.t00999	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">182</a>	5e-45	
At3g46484	68416.t04687	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">178</a>	9e-44	
At4g06700	68417.t01025	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">154</a>	1e-36	
At5g31511	68418.t03414	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">140</a>	2e-32	
At1g40135	68414.t04333	CACTA-like	transposase	family (Ptta/En/Sp...	<a href="#">138</a>	9e-32	
At1g40124	68414.t04341	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">138</a>	9e-32	
At5g30470	68418.t03435	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">130</a>	2e-29	
At3g30743	68416.t03581	CACTA-like	transposase	family (Tnp2/En/Sp...	<a href="#">130</a>	2e-29	
At4g08010	68417.t01223	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">122</a>	6e-27	
At5g29580	68418.t03326	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">54</a>	2e-06	
At3g29781	68416.t03447	CACTA-like	transposase	family (En/Spm) ha...	<a href="#">48</a>	1e-04	

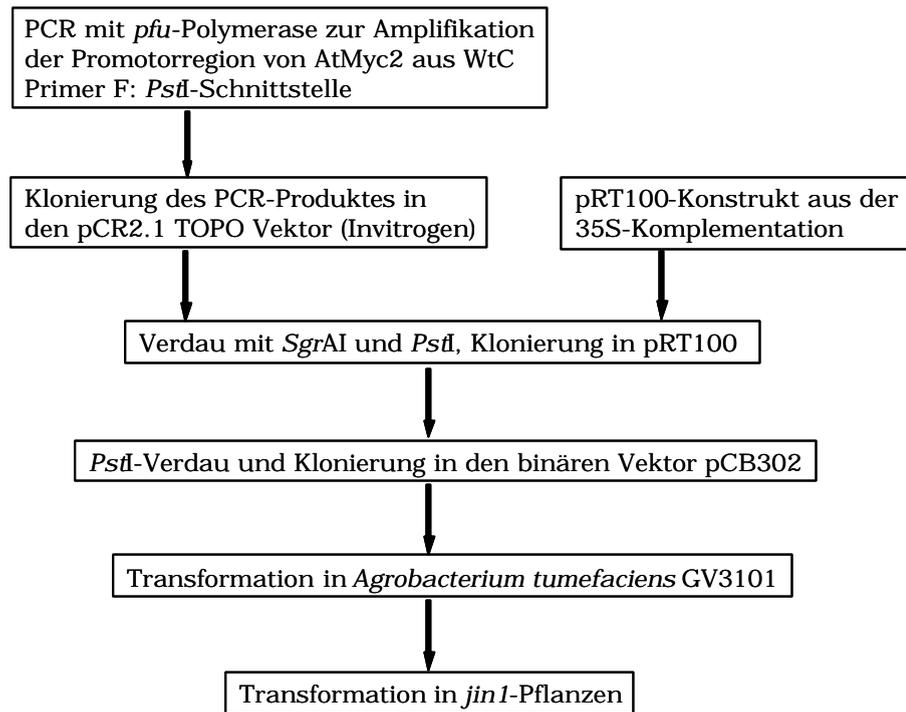
**Abbildung 7.2:** BLAST Sequenzvergleich, der in *jin1* gefundenen Sequenz am Ende des *AtMyc2*-Gens.

**Atmyc2-Sequenz:**

aaaaaataagtaattaatctgtttataaaaaatatattctaaaagttgacaaaacgacaaatataaatcgaaaaaataggtgaaaagttatagtaaagtg  
 ttttccactgagctcacagttcactcttttggtacaaaagaacaatcagttaaaatctaagtcatttaagagcgtgtgata **Eco72I** **cacgtg** cgaccaaac  
 agccgtacgatctcactcacttccgggtcttaattcttaccgctcgatccaacagtcgattgggttaaatcgggatgtgagttcatcgaagcttctctct  
 ctcttacaacctccagtttccaatgaaatctcgccacgtaatatccctaacaacaaatttacacattcacctcaagatcagttacacataataaa  
 tcgcagacgctctccatTTTTctccactacgaagactttctctctctctctctctcattaaaaacgtgttttttttacoggtcaccggtttatgga  
 ATGACTGATTACCGGCTACAACCAACGATGAATCTTTGGACCACCGACGACAACGCTTCTATGATGGAAGCTTTCATGAGCTCTTCC **EcoRV** **GATATC** TCAACTT  
 TA **HaellI** **GGCC** TCCGGCGTCGACGACAACCACGACGGCGACGACTGAAACAACCTCCGACGCCGGCGATGGAGATTCCGGCACAGCGGGGATTTAATCAAGAGAC  
 TCTTCAGCAACGTTTACAAGCTTTGATTGAAGGAACACACGAAGGTTGGACCTACGCTATATTTCTGGCAACCGTCGTATGATTTCTCCGGCGCCTCCGTG  
 CTCGGATGGGAGATGGTTATTACAAAGGTGAAGAAGATAAAGCAAACCCGAGACGGAGATCGAGTTCGCCGCCGTTTTCTACTCCGGCGGATCAGGAGT  
 ACAGGAAAAAAGTGTGAGAGAGCTTAACTCGTTGATCTCCGGTGGTGTGCTCCGTCGGATGACGCTGTTGATGAGGAGGTGACGGATACGGAATGGTT  
 TTTCTGGTTTTCGATGACGACGAGCTTCGCTTGCCTGCGGGATTAGCTGGTAAAGCGTTTGCAACGGGTAACCGGTTTTGGGTTTTCCGGGTGAGATCA  
 TTATCCGGGTCCGGTTGTGAACGGGCTAAGCAAGGAGAGTGTGGGATGCATACTATTGCGTGTATTCCTTCGGCGAACGGAGTTGTGAAGTCCGGT  
 CAACGGAGCCGATCCGACAGAGTTCGGACCTTATTAACAAGGTTCAATTTCTTTCAATTTTCGACGGCGGA **AGCTGGAGATTTATCGGGTCTTAATTGGAA**  
**TCTTGACCCGGATCAAGGTGAGAACGCCCTCTATGTGGATTAATGACCCGATTGGAACA** **MvaI** **CTGC** ATCTAACGAACCCGGTAAACGGAGCTCAAGTTCT  
**AGCTCCAGCTTTTTCAAAGTCTATTCAAGTTGAGAACGGTAGCTCAAGCACAATAACCGAAAACCCGAATCTGGATCCGACTCCGAGTCCGGTTCATT**  
**CTCAGACCCAGAATCCGAAATTCATAACACTTTCTCCCGAGAACTTAATTTTTTCGACGCTCAAGTTCTACTTTAGTGAAACCAAGATCCGGCGAGATATT**  
**AAACTTCGGCGATGAAGGTAACGAAGCTCCGAAACCCGGATCAAGTTCTTATTCGGGTCAAACACAATTGAAAACAAAAGAAGAGGTGATGGTT**  
**TTGAACGAAGATAAAGTTCTATCATTCCGAGATAAAAACCGCGGAGAATCAGATCACTCCGATCTAGAAGCTTCGCTGTGAAAGAAGTAGCAGTAGAGA**  
**AACGTCCTAAAGAAACGAGGAAGAAAGCCAGCAAACGGTAGAGAAGAGCCACTAAA** CCACGTCGAAGCAGAGAGACAAAGACGCGAGAACTAAACCAAAG  
 ATTCTACGCGTTACGAGCGGTTGTACCAAACGTTTCAAAAATGGATAAAGCTTCGTTACTCGGTGACGCAATCGTTACATCAACGAGCTTAAATCCAAA  
 GTAGTCAAAAACAGAGTCAGAGAACTCCAAATCAAGAACCAGCTCGAGGAAGTGAACCTCGAGCTCGCCGGAAGAAAAGCGAGTCTAGTGGAGGAGATA  
 TGTCGTCTTCGTGTTCTTCGATTAACCCGGTGGGATGGAGATTGAAGTGAAGATAAATTGGTTGGGACGCAATGATTAGAGTTGAATCTAGTAAGAGGAA  
 TCATCCGGCGGCGAGGTTGATGTCGGCGTTGATGGATTGGAGTTGGAAGTGAATCACGCGAGTATGTCGGTGGTTAACGATTTGATGATTCAACAAGCG  
 ACGGTGAAGATGGGTTTTAGGATCTATACGCAAGAACAGCTCAGAGCAAGTTGATTTCAAAAATCGGTTAAaagggtgtgttttgggaagtttagaaag  
 ttatggggtcaaatcataatattcgttttagtggttcagtaattttgtagattttagttttgtaagaaaaaatcttaaatagagcgacaagttt  
 ttcttttctctatggttgagtcgtatcgttttattgtgtatctctcaatgagtaaacctgtatataattgatgatagtaaatatgagtttagttactga  
 aaaagttaatatttctacacaatttcatatgataaaaaagaaaaaagaatcgagataaaatgggtctaaaaaagagactaatgggtcatgatcactgattt  
 tgtacatatggtcaaaaatgtctctcctaacacatcaaaacttaggaagagagacaaatcttaagtaagtaagtcgagagggagaccatagcacagttt  
 tcttaagtcagtgatgataatggttctctctgtctaatcaataagacacacacataaaccttagtataat

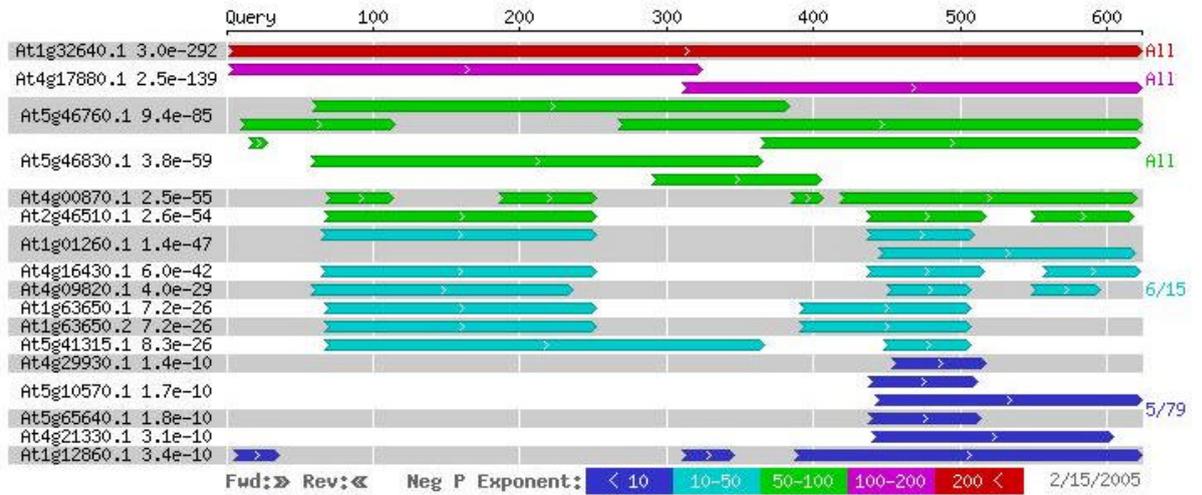
**Abbildung 7.3:** Schnittstellen der in Southern Analysen verwendeten Restriktionsenzyme  
**ROT:** Sondensequenz





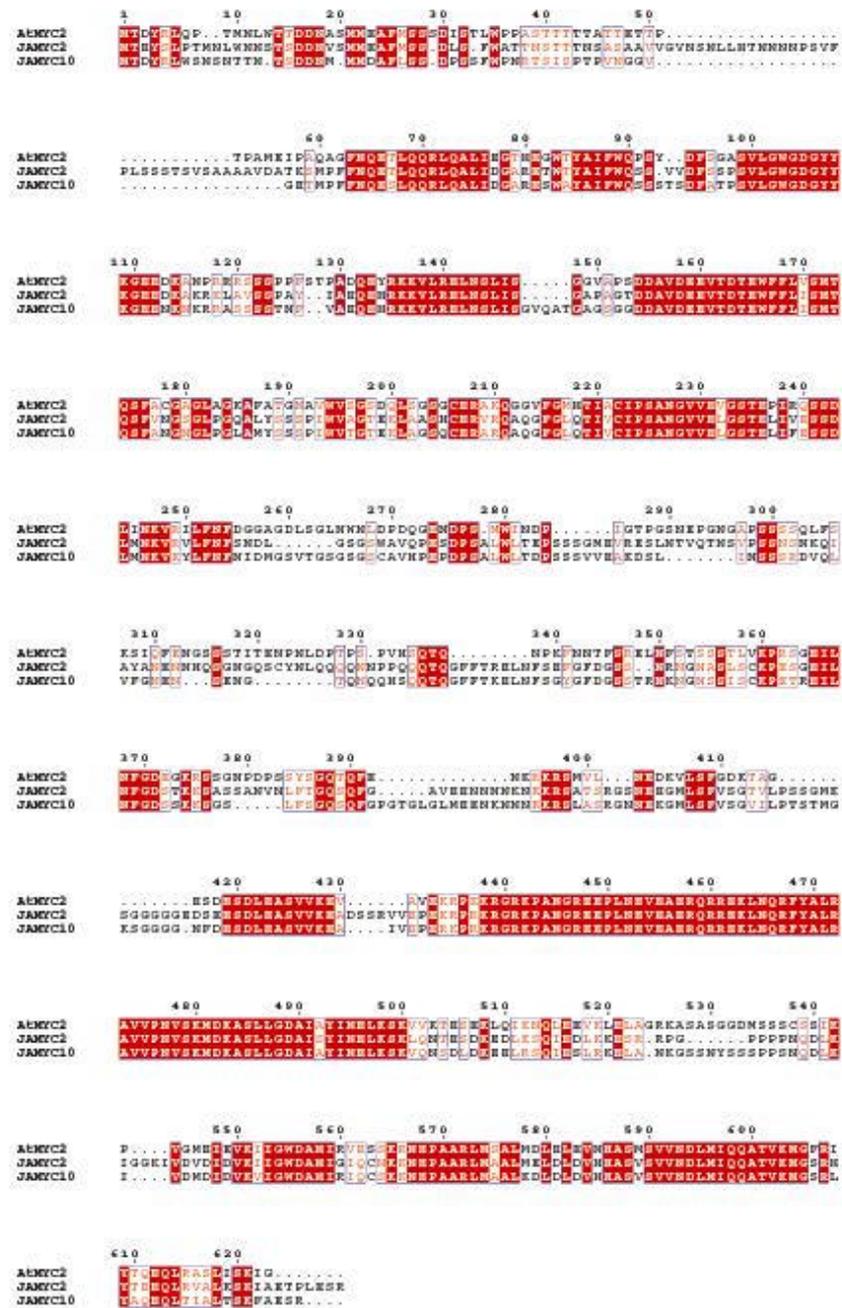
**Abbildung 7.5:** Übersicht über die Vorgehensweise zur Komplementation des *jin1*-Phänotyps unter Kontrolle des endogenen Promotors.  
Primer F: ACT GCA GAT GTC TCA GAA AAT TAT ATT C  
R: AGG TAC CTT CGT GTG TTC CTT CAA TCA AAG C

## Summary of BLAST Results



**Abbildung 7.6:** *AtMYC2* zeigt große Sequenzähnlichkeiten mit weiteren MYC Proteinen im *Arabidopsis* Genom





**Abbildung 7.8:** Die abgeleitete Aminosäuresequenz von *AtMYC2* verglichen mit MYC Proteinen der Tomate (*JAMYC2*, *JAMYC10*)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle für die Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und Beratung sowie für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

Ferner sei an dieser Stelle Frau Dr. Susanne Berger für die intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die Korrekturvorschläge gedankt.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Jaakko Kangasjärvi vom Institut für Biotechnologie Helsinki, sowie der ganzen "*Plant Stress Group*" für die fachliche Unterstützung und gute Arbeitsatmosphäre.

Mandy und Franzi halfen mir, den Rechtschreibteufel aus dieser Arbeit zu verbannen. Dafür meinen Dank. Susan, wir sind ja inzwischen schon ein eingespieltes Team beim Schreiben von Abschlussarbeiten. Danke, dass Du immer ein offenes Ohr und viel Zeit zum Reden für mich hattest.

Ich möchte mich bei meinen Eltern Marion und Eckart Nickstadt, die mir dies alles ermöglicht haben sowie bei meiner ganzen Familie bedanken.

Letztendlich danke ich meiner Tochter Lisa Maria, die mich durch ihre fröhliche und unbekümmerte Art auf ihre ganz eigene Weise angespornt hat.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# **Lebenslauf**

## Persönliche Angaben

Name: Anja Nickstadt  
Wohnort: 06114 Halle/S.  
Geburtsort: Wernigerode

## Schulbildung

09/1981 - 07/1990 POS „W.I.Lenin“ Wernigerode  
09/1990 - 07/1993 „Gerhart-Hauptmann-Gymnasium“ Wernigerode  
Abschluss: Abitur

## Studium

10/1993 – 03/2000 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität  
Halle  
Abschluss: Diplom-Biologin

## Beruflicher Werdegang

06/2000 – 07/2004 Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie  
Halle (Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie)  
08/2004 – 04/2005 Gastrecht am IPB zur Beendigung der Promotion  
seit 05/2005 Wiss. Mitarbeiterin am Leibniz-Institut für Pflanzen-  
biochemie Halle (Abteilung Sekundärstoffwechsel)

Halle, den 17.10.2005

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und nur die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit wurde bisher noch nicht anderweitig als Dissertation eingereicht oder veröffentlicht.

Halle, den 17.10.2005

Anja Nickstadt