

**Der Jasmonsäure-Metabolismus in Tomate
(*Solanum lycopersicum*) – Die Bedeutung von
12-Hydroxyjasmonsäure und ihrer Derivate für die
Wundantwort und die Blütenentwicklung**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt an der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I-Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Diplom-Biochemikerin Jana Neumerkel
geboren am 03. Juni 1979 in Suhl

Gutachter:

- (1) Prof. Dr. Claus Wasternack
- (2) Prof. Dr. Klaus Humbeck
- (3) Prof. Dr. Andreas Schaller

verteidigt in Halle (Saale) am 15.04.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013842

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013842>]

Abkürzungsverzeichnis	vii
1 Einleitung	11
1.1 Jasmonate	12
1.1.1 Die Struktur und Biosynthese der Jasmonsäure	13
1.1.1.1 Der LOX-Stoffwechselweg	13
1.1.1.2 Der AOS-Weg - Die Jasmonat-Biosynthese	14
1.1.1.3 Die Regulation der JA-Biosynthese	15
1.1.2 Der Metabolismus von JA	16
1.1.3 Die Bedeutung der Jasmonate während der pflanzlichen Entwicklung	18
1.1.4 Die Bedeutung der Jasmonate während der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress	19
1.1.4.1 Die Wundantwort in Tomate	19
1.1.5 COI1 als Regulator JA-responsiver Genexpression	21
1.2 Sulfotransferasen	21
1.2.1 Die PAPS-Biosynthese	22
1.2.2 Sulfotransferasen in Säugern	22
1.2.3 Pflanzliche Sulfotransferasen	23
1.2.3.1 Funktionale Motive löslicher Sulfotransferasen	24
1.2.3.2 Sulfotransferasen in Arabidopsis	27
1.3 Die Infloreszenz- und Blütenentwicklung der Tomate	28
1.3.1 Die Termination des Sprosses und Blühinduktion	29
1.3.2 SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)	30
1.3.3 SELF PRUNING (SP)	30
1.3.4 Mutanten mit Veränderungen der Infloreszenz-Architektur	31
1.4 Zielsetzung der Arbeit	31

2	Material und Methoden	34
2.1	Verwendete Materialien	35
2.1.1	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	35
2.1.2	Verwendete Software und Datenbanken	35
2.1.3	Pflanzenmaterial	36
2.1.4	Bakterienstämme	36
2.1.5	Vektoren	37
2.2	Angewandte Methoden	37
2.2.1	Pflanzenanzucht	37
2.2.2	Kultivierung und Transformation von <i>E.coli</i>	37
2.2.3	Kultivierung und Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	38
2.2.4	DNA-Analytik	38
2.2.4.1	Agarosegel-Elektrophorese	38
2.2.4.2	Isolierung pflanzlicher genomischer DNA (gDNA)	38
2.2.4.3	Plasmid-Präparation	38
2.2.4.4	Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	39
2.2.4.5	Sequenzierung	39
2.2.4.6	<i>Genome Walking</i>	40
2.2.4.7	Restriktionsanalysen und Fragment-Reinigung	40
2.2.5	Klonierungsstrategien zur Überexpression der <i>AST-IV</i> , <i>AtST2a</i> , <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i> in <i>E.coli</i> und Tomate	41
2.2.5.1		
2.2.5.2	Klonierung der <i>AST-IV</i> , <i>AtST2a</i> , <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i> in den Überexpressionsvektor pQE30	41
2.2.5.3	Klonierung der <i>LeST2a</i> in den binären Vektor pBI-101-526 in <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Orientierung	42
2.2.6	RNA-Analytik	42
2.2.6.1	RNA-Isolierung aus Tomate und Tabak	42
2.2.6.2	Northern Blot-Analysen	42
2.2.6.3	Semiquantitative Real Time RT-PCR (qPCR)	43
2.2.7	Proteinbiochemische Methoden	45
2.2.7.1	Überexpression in <i>E.coli</i> und Reinigung der <i>AST-IV</i> , <i>AtST2a</i> , <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i>	45
2.2.7.2	SDS-PAGE und Coomassie-Färbung	45
2.2.7.3	Nachweis der Enzymaktivität	46

2.2.8 Stabile Transformation von Tomate durch <i>A. tumefaciens</i> vermittelten Gentransfer	47
2.2.9 Die Gehaltsbestimmung von OPDA und Jasmonaten	48
2.2.10 Verwundungs- und Applikationsexperimente	48
2.2.11 Statistische Auswertung	49
2.2.11.1 Deskriptive Statistik	49
2.2.11.2 Parametrische Verfahren	49
3 Ergebnisse	50
3.1 Das Vorkommen und die Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA	51
3.1.1 Die Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO ₄ -JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung in Tomate und Tabak	51
3.1.2 Die Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO ₄ -JA und 12-O-Gluc-JA nach Applikation verschiedener Jasmonate in Tomate und Tabak	53
3.1.3 Die Abhängigkeit der Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO ₄ -JA und 12-O-Gluc-JA von der Jasmonat-Biosynthese	56
3.2 Die biologische Aktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA	57
3.2.1 Der Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO ₄ -JA auf die Expression JA- und wund-induzierbarer Gene	58
3.2.2 Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO ₄ -JA auf JA-vermittelte Prozesse	60
3.2.2.1 Die Keimung	60
3.2.2.2 Das Wurzelwachstum	61
3.3 Identifizierung und Charakterisierung putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen aus Tomate	62
3.3.2 Die Identifizierung und Klonierung putativer <i>LeST2a</i> -cDNAs	63
3.3.2.1 Die Gewinnung der vollständigen Sequenz putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen	64
3.3.2.2 Die Klonierung und Charakterisierung der <i>LeST2a</i> , <i>LeST3</i> - und <i>LeST6</i> -cDNA	64
3.3.3 Alignment hochkonservierter Domänen	66

3.3.4 Die rekombinante Überexpression in <i>E.coli</i> und Reinigung der putativen 12-OH-JA-Sulfotransferasen	67
3.3.5 Der Nachweis der Enzymaktivität putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen	69
3.3.5.1 Klonierung, Überexpression in <i>E.coli</i> und Reinigung der AtST2a	69
3.3.5.2 Der Nachweis der Enzymaktivität im einfachen Aktivitäts-Assay	70
3.3.5.3 Der Nachweis der Enzymaktivität im gekoppelten Aktivitäts-Assay	70
3.3.6 Die Regulation der Expression der <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i>	74
3.3.6.1 Die Induzierbarkeit der Expression durch Verwundung und verschiedene Jasmonate	74
3.3.6.2 Die COI-Abhängigkeit der <i>LeST2a</i> -Expression	75
3.3.7 Die organspezifische Expression der <i>LeST2a</i>	76
3.3.8 Zusammenfassung	77
3.4 Die Generierung und Selektion transgener Tomatenpflanzen, die die <i>AtST2a</i> in sense- und die <i>LeST2a</i> in sense- und antisense-Orientierung überexprimieren	77
3.4.2 Die Klonierung, der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer und die Regeneration transgener Pflanzen	78
3.4.3 Die Nomenklatur transgener Pflanzen und Linien	79
3.4.4 Die Selektion der Primärtransformanten	79
3.4.4.1 Der Nachweis des Transgens per PCR	79
3.4.4.2 Die Selektion anhand des Expressionslevels	80
3.4.4.3 Die <i>ST2a</i> -Expression und die Jasmonat-Gehalte ausgewählter Pflanzen	82
3.5 Phänotypische Veränderung durch Überexpression der <i>AtST2a</i> und <i>LeST2a</i> in Tomate	86
3.5.1 Selektion der Generation T1	86
3.5.2 Die Bestimmung der Kopienzahl	87
3.5.3 12-OH-JA und 12-HSO ₄ -JA nach Verwundung	88
3.5.4 Phänotypische Veränderungen der Infloreszenzen und Blüten	90
3.5.5 Veränderungen der Jasmonat-Gehalte in den transgenen Infloreszenzen	98
3.5.6 Die Expression verschiedener Meristemidentitätsgene in den transgenen Pflanzen	101
3.5.7 Die Keimung	102
3.5.8 Wurzelwachstum	103
3.5.9 Die lokale Wundantwort	105

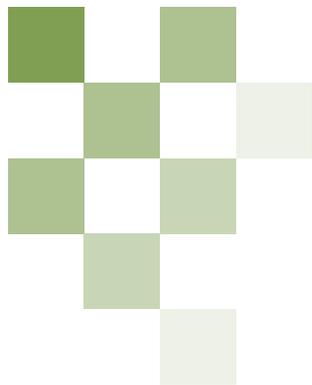
3.6	Phänotypische Veränderungen durch Überexpression der <i>AtST2a</i> in Tabak	106
3.6.1	Die Jasmonat-Gehalte in den Blüten der <i>35S::AtST2a-sense</i> -Tabak-Pflanzen	107
3.6.2	Die Expression einiger Blütenorgan-Identitätsgene in den transgenen Tabak-Blüten	109
4	Diskussion	111
4.1	Die Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA	112
4.2	Die Klonierung und Charakterisierung putativer 12-OH-JA-STs aus Tomate	115
4.2.1	Die Expression der <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i>	117
4.2.2	Post-transkriptionale und post-translationale Regulation der <i>LeST2a</i> und <i>LeST6</i>	119
4.3	Die Bedeutung des JA-Metabolismus	120
4.3.1	Die biologische Aktivität von 12-OH-JA, 12-HSO ₄ -JA und 12-O-Gluc-JA	120
4.3.2	Die Manipulation des JA-Metabolismus	126
4.3.2.1	Die Veränderung der Jasmonat-Gehalte nach Verwundung	127
4.3.2.2	Der Einfluss des Jasmonat-Metabolismus auf die Infloreszenz- und Blütenmorphologie	128
4.3.2.3	Der Einfluss des Jasmonat-Metabolismus auf JA-vermittelte Prozesse	133
4.4	Die Regulation des JA-Metabolismus	135
5	Zusammenfassung	137
6	Literaturverzeichnis	141
7	Anhang	157

11-OH-JA	11-Hydroxyjasmonsäure
12-HSO ₄ -JA	12-Hydroxysulfonyloxyjasmonsäure
12-O-Gluc-JA	12-O-β-D-glucopyranosyljasmonsäure
12-OH-JA	12-Hydroxyjasmonsäure
13-HPOT	(9Z,11E,15Z,13S)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadekatriensäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACX	Acyl-CoA-Oxidase
ADC	Arginin-Decarboxylase
ADP	Adenosindiphosphat
α-LeA	α-Linolensäure
<i>an</i>	<i>anantha</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
APS	5'-Adenylylsulfat
ARF	<i>auxin responsive factor</i>
ARG	Arginase
Arg	Arginin
<i>as</i>	<i>antisense</i>
AS	Aminosäure
AST-IV	Aryl-Sulfotransferase-IV
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminopurin
BB	Blütenblatt
<i>bl</i>	<i>blind</i>
BM	Blütenmeristem
CDI	Cathepsin-D-Inhibitor
cDNA	copy-DNA
CEN	CENTRORADIALIS
<i>cev1</i>	<i>constitutive expression of VSP1</i>
CO	CONSTANS
COI1	CORONATIN-INSENSITIVE 1
CYP	Cytochrom-P450
D	Asparaginsäure
<i>dad1</i>	<i>defective in anther dehiscence 1</i>
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
DC	Dünnschicht-Chromatographie

DES	Divinylether-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithioerithrol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF1a	Elongationsfaktor 1a
ERF	<i>ethylen responsive factor</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
<i>fa</i>	<i>falsiflora</i>
FT	flowering locus t
gDNA	genomische DNA
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gluc	Glukose
HEL	<i>hevein-like protein</i>
His	Histidin
IAA	Indolessigsäure
Ile	Isoleucin
IM	Infloreszenzmeristem
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
<i>j</i>	<i>jointless</i>
JA	Jasmonsäure
<i>jai1</i>	<i>jasmonate insensitive 1</i>
<i>jar1</i>	<i>jasmonate resistant 1</i>
JM	Jasmonsäure-Methylester
JMT	Jasmonsäure-Methyltransferase
KB	Kelchblätter
LAP	Leucin-Aminopeptidase
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Flüssigkeitschromatographie gekoppelt mit Massenspektroskopie
Leu	Leucin
LM	Lateralmeristem
LOX	Lipoxygenase
<i>ls</i>	<i>lateral suppressor</i>
Lys	Lysin
MeOH	Methanol

miRNA	micro-RNA
MS	Murashige-Skoog
MW	<i>molecular weight</i>
NAA	Naphtylessigsäure
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(phosphat)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase II
NtDEF	<i>Nicotiana tabacum</i> DEFICIENS
NtGLO	<i>Nicotiana tabacum</i> GLOBOSA
NtNAG1	<i>Nicotiana tabacum</i> AGAMOUS1
NtPLE36	<i>Nicotiana tabacum</i> PLENA36
NtRPS6	<i>Nicotiana tabacum</i> ribosomal protein S6
ODC	Ornithin-Decarboxylase
OPDA	(9S,13S)-12-Oxo-10,15(Z)-phytodiensäure
OPDAME	OPDA-Methylester
OPR3	OPDA-Reduktase
ORA	<i>octadecanoid responsive Arabidopsis AP2 domain</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDF	<i>plant defensin</i>
Phe	Phenylalanin
PIN	Proteinase-Inhibitor
<i>p</i> -NP	<i>para</i> -Nitrophenol
<i>p</i> -NPS	<i>para</i> -Nitrophenylsulfat
PPO	Polyphenol-Oxidase
<i>pxa1</i>	<i>peroxisomal ABC transporter 1</i>
qPCR	semi-quantitative Real time RT-PCR
RBCS1	kleine Untereinheit S1 der RuBisCo
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
RuBisCo	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
<i>s</i>	<i>compound inflorescence</i>
SA	Salizylsäure
SAM	Sprossapikal-Meristem
SB	Staubblatt

SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sft</i>	<i>single flower truss</i>
SGN	Sol Genomics Network
<i>sp</i>	<i>self pruning</i>
<i>spr2</i>	<i>suppressor of prosystemin-mediated responses 2</i>
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat-Puffer
St	Stempel
ST2a	12-OH-JA-Sulfotransferase
StAbw	Standardabweichung
StFehler	Standardfehler
SU	<i>sympodial unit</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
TD	Threonin-Desaminase
T-DNA	Transfer-DNA
TF	Transkriptionsfaktor
TFL1	<i>terminal flower 1</i>
THI	Thionin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>uf</i>	<i>uniflora</i>
üN	über Nacht
Val	Valin
Vol	Volumen
VSP1	<i>vegetative storage protein 1</i>
WT	Wildtyp
WUS	WUSCHEL
x-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid



1 Einleitung

Für die pflanzliche Entwicklung sind ein geregeltes Wachstum und klar determinierte Differenzierungsschritte von entscheidender Bedeutung. Des Weiteren ist es essentiell für das Überleben einer Pflanze, dass sie auf eine Vielzahl biotischer und abiotischer Umwelteinflüsse reagieren kann. All diese Prozesse erfordern eine Reihe komplexer Signalübertragungsmechanismen. Pflanzen nutzen dafür verschiedene Rezeptorsysteme und eine Vielzahl pflanzlicher Signalstoffe. Einige dieser pflanzlichen Signalstoffe werden auch als Phytohormone bezeichnet. Dabei entsprechen sie allerdings nicht der Definition der tierischen Hormone. Phytohormone kommen in allen höheren Pflanzen vor. Es sind kleine, organische Verbindungen, die bereits in sehr niedrigen Konzentrationen physiologisch wirksam sind. Dabei ist aber oft nicht nur die absolute Konzentration entscheidend, sondern auch das Verhältnis der Phytohormone untereinander oder das Vorkommen und die Verteilung der entsprechenden Rezeptoren.

Zu den bekanntesten Phytohormonen zählen Auxine, Gibberelline, Cytokinine, Abszinsäure und Ethylen. Jahrzehntlang konzentrierten sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf diese klassischen Phytohormone. Später wurden dann auch die Brassinosteroide und Jasmonate entdeckt, die in ihrer Struktur und Wirkung Ähnlichkeiten zu den tierischen Steroiden und Prostaglandinen zeigen (BERGEY *et al.* 1996). Ebenso konnten Peptidhormone in Pflanzen identifiziert werden wie bspw. Systemin (PEARCE *et al.* 1991). Auch Polyamine werden mittlerweile zu den Phytohormonen gezählt (EVANS & MALMBERG 1989). Doch trotz zahlreicher neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der Phytohormone, sind noch viele Fragen über die komplexen Vorgänge der pflanzlichen Signaltransduktion während der Entwicklung oder der Reaktion auf Umwelteinflüsse ungeklärt.

1.1 Jasmonate

Jasmonate sind aus Lipiden gebildete Cyclopentanon-Verbindungen. Zu ihnen zählen die Jasmonsäure (JA) selbst und alle daraus abgeleiteten Verbindungen, wie der Methyl-ester, Aminosäure-Konjugate, hydroxylierte und glykosylierte Derivate. Im Jahre 1962 wurde erstmals der Methylester der Jasmonsäure (JM) im ätherischen Öl von *Jasminum grandiflorum* identifiziert (DEMOLE *et al.* 1962). Im ätherischen Öl von *Rosmarin officinalis* wurden ebenfalls Jasmonate gefunden (CRABALONA 1967). Jasmonate konnten in immer mehr Pflanzen nachgewiesen werden. Inzwischen ist ihr ubiquitäres Vorkommen, beginnend bei den Algen und Pilzen, über Gymnospermen bis hin zu den Angiospermen belegt (z.B.: SEMBDNER & PARTHIER 1993; SEMBDNER *et al.* 1994; MIERSCH *et al.* 1999). Die endogenen Jasmonat-Gehalte variieren jedoch je nach Pflanze, Zell- und Gewebetyp, Entwicklungsstadium oder äußeren Einflüssen.

1.1.1 Die Struktur und Biosynthese der Jasmonsäure

Die Jasmonsäure (JA) besitzt ein Cyclopentanon-Grundgerüst mit einem Pentenyl-Rest und einer Carbonsäure-Seitenkette (Abb. 1.1). Von den vier möglichen Stereoisomeren sind die natürlich vorkommenden Formen der Jasmonsäure die (-)-JA mit der absoluten Konfiguration (3*R*, 7*R*) und die (+)-7-*iso*-JA mit der Konfiguration (3*R*, 7*S*), wobei das thermodynamisch stabilere trans-(3*R*, 7*R*)-Enantiomer bevorzugt auftritt.

JA und deren Derivate werden zusammenfassend als Jasmonate bezeichnet und stammen von ihrem gemeinsamen Vorläufer der 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) ab. OPDA und OPDA-Derivate werden unter dem Begriff Oktadekanoide zusammengefasst. Sie entstehen durch Peroxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren, katalysiert durch Lipxygenasen (LOX), und gehören somit zur großen Gruppe der Oxylipine.

1.1.1.1 Der LOX-Stoffwechselweg

Die Biosynthese der meisten pflanzlichen Oxylipine beginnt mit dem Einbau von Sauerstoff an Position 9 oder 13 der α -Linolen- (α -LeA) oder Linolsäure, beides mehrfach ungesättigte Fettsäuren. Katalysiert wird diese Reaktion durch Lipxygenasen (LOX), die entweder als 13-LOX oder 9-LOX bezeichnet werden, je nachdem ob 13- oder 9-Hydroperoxy-Fettsäuren gebildet werden (FEUSSNER & WASTERNAK 2002). Die durch die LOX gebildeten Fettsäure-Hydroperoxide werden in der Pflanze enzymatisch weiter umgesetzt. Bislang konnten sieben verschiedene Wege und die entsprechenden Enzymfamilien identifiziert werden (FEUSSNER & WASTERNAK 2002):

- (1) Reduktase: Hydroperoxy-Fettsäuren
- (2) Epoxyalkohol-Synthase: Epoxy-Hydroxy-Fettsäuren
- (3) Peroxygenase: Hydroxy- und Epoxy-Fettsäuren
- (4) Allenoxid-Synthase (AOS): Oktadekanoide und Jasmonate
- (5) Hydroperoxid-Lyase (HPL): kurzkettige Aldehyde und ω -oxo-Fettsäuren
- (6) Divinylether-Synthase (DES): Divinylether
- (7) LOX: Keto-Fettsäuren

Die Substrate dieser Enzyme sind entweder 9- oder 13- Hydroperoxy-Fettsäuren, weshalb der Oxylipin-Metabolismus in einen 9-LOX- und einen 13-LOX-Weg unterteilt werden kann (HOWE & SCHILMILLER 2002). Die Enzyme AOS, HPL und DES bilden eine eigene Familie von Cytochrom-P450-abhängigen Enzymen (CYP), die Familie CYP74 (SONG *et al.* 1993; MATSUI *et al.* 1996; ITOH & HOWE 2001). Sie unterscheiden sich von anderen CYPs, da sie weder molekularen Sauerstoff, noch eine NAD(P)H-abhängige Cyto-

chrom-P450-Reduktase benötigen, und sie ausschließlich mit Hydroperoxy-Fettsäuren reagieren (BLEE 2002; FEUSSNER & WASTERNAK 2002). Des Weiteren bilden sie Verzweigungspunkte im LOX-Stoffwechselweg, die letztendlich zur Synthese von Jasmonaten, Traumatin, Phytoalexinen und anderen Verbindungen, deren Funktionen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, führen (FEUSSNER & WASTERNAK 2002).

1.1.1.2 Der AOS-Weg - Die Jasmonat-Biosynthese

Die Aufklärung der Jasmonat-Biosynthese gelang bereits in den 1980er Jahren durch VICK & ZIMMERMANN (1983), sowie HAMBERG & HUGHES (1988). Die Ausgangsverbindung ist α -LeA, eine 18:3-Fettsäure (Abb. 1.1). Sie kann durch eine DAD-ähnliche Phospholipase A1 oder eine Phospholipase A2 aus der Chloroplasten-Membran freigesetzt werden (ISHIGURO *et al.* 2001; NARVAEZ-VASQUEZ *et al.* 1999). Eine 13-LOX katalysiert die Reaktion zu (13S)-Hydroperoxy-Oktadekatriensäure (13-HPOT), einem zentralen Intermediat des LOX-Stoffwechselweges. 13-HPOT wird durch die AOS und die Allenoxid-Cyclase (AOC) zu *cis*-OPDA umgesetzt. Die Aktivität der AOC garantiert dabei die Entstehung der enantiomeren Grundstruktur, die in den natürlich vorkommenden, physiologisch aktiven Oktadekanoiden und Jasmonaten zu finden ist.

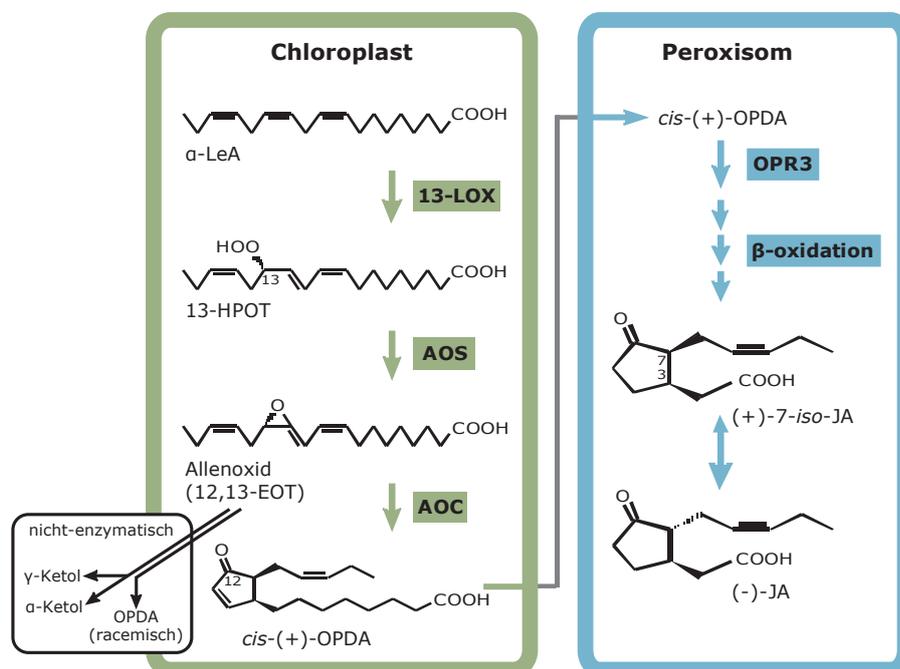


Abb. 1.1: JA-Biosynthese

Das instabile Allenoxid spaltet *in vitro* in Abwesenheit der AOC nicht-enzymatisch zu α - und γ -Ketolen und kann spontan zu racemischer *cis*-OPDA cyclisieren (HAMBERG & FAHLSTADIUS 1990). α - und γ -Ketole konnten in Pflanzen-Extrakten nachge-

wiesen werden, die Bildung racemischer OPDA *in planta* allerdings nicht (THEODOULOU *et al.* 2005; LAUDERT *et al.* 1997). Neben der Bildung von OPDA aus α -LeA entsteht durch die Umwandlung einer plastidären Hexadekatriensäure (16:3) dinor-OPDA (WEBER *et al.* 1997). In *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) liegt ein Großteil OPDA und dinor-OPDA als Bestandteil plastidärer Mono- und Digalactosyl-diacylglyceride vor (STELMACH *et al.* 2001). Dazu zählen die Arabidopside A, B, C, D und E, sowie 13 weitere Verbindungen (HISAMATSU *et al.* 2003; ANDERSSON *et al.* 2006; BUSEMAN *et al.* 2006).

Während die JA-Biosynthese bis zur Bildung von OPDA im Chloroplasten erfolgt, findet die weitere Umsetzung zu JA in den Peroxysomen statt. Dabei ist der Ablauf der Translokation von OPDA noch nicht vollkommen aufgeklärt. Eine Beteiligung des peroxysomalen ABC-Transporters PXA1, sowie ein passiver Transport nach dem Ionenfallen-Prinzip wurde für Arabidopsis postuliert (THEODOULOU *et al.* 2005). OPDA wird im Peroxysom durch eine OPDA-Reduktase (OPR3) zu OPC-8:0 reduziert. Die Verkürzung der Carbonsäure-Seitenkette erfolgt durch 3 Zyklen der Fettsäure- β -Oxidation. Die Beteiligung der Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation an der JA-Biosynthese konnte mehrfach belegt werden (CRUZ CASTILLO *et al.* 2004; AFITLHILE *et al.* 2005; LI *et al.* 2005; DELKER *et al.* 2007). Nach 3 Zyklen entsteht (+)-7-*iso*-JA, die zur thermodynamisch stabileren (-)-JA epimerisiert, wobei beide Verbindungen in einem molaren Verhältnis von 1:9 vorliegen (QUINKERT *et al.* 1982).

1.1.1.3 Die Regulation der JA-Biosynthese

Die JA-Biosynthese kann durch Substratverfügbarkeit, positives *feedback* und Gewebespezifität reguliert werden. Die Bedeutung der Substratverfügbarkeit konnte mit Hilfe transgener *gain-of-function*-Ansätze gezeigt werden. So führte die konstitutive Überexpression der AOS oder AOC erst nach stress-induzierter Bereitstellung des Substrates α -LeA zu erhöhten Jasmonat-Gehalten (LAUDERT *et al.* 2000; STENZEL *et al.* 2003a). Die Expression aller Gene, die für JA-Biosynthese-Enzyme kodieren, ist JA-induzierbar (WASTERNAK *et al.* 2006). Des Weiteren sind die bisher untersuchten Promotoren von AOC und AOS durch JA aktivierbar (KUBIGSTELTIG *et al.* 1999; STENZEL, persönliche Mitteilung). Dieses positive *feedback* durch JA ermöglicht eine rasche Amplifikation des JA-Signals (STENZEL *et al.* 2003a; MAUCHER *et al.* 2004; SASAKI *et al.* 2001). Das gewebespezifische Vorkommen der JA-Biosynthese-Enzyme ist in *Solanum lycopersicum* (Tomate) ebenfalls an der Regulation der Biosynthese beteiligt. In Arabidopsisblättern können LOX, AOS und AOC in allen Geweben nachgewiesen werden (STENZEL *et al.* 2003b). Im Gegensatz dazu ist das Vorkommen der AOC im Tomatenblatt auf das Leitgewebe beschränkt (HAUSE *et al.* 2000). Die Bedeutung der gewebespezifischen Biosynthese von JA für die Wundantwort wird ebenfalls diskutiert (WASTERNAK *et al.* 2006).

1.1.2 Der Metabolismus von JA

Das Gleichgewicht zwischen Biosynthese, Abbau und Metabolisierung bestimmt die Menge aktiver Phytohormone. Für JA sind bislang sieben verschiedene Metabolisierungswege durch Identifizierung der entsprechenden Metabolite bekannt, wobei die Klonierung beteiligter Enzyme bisher nur teilweise gelang (Abb. 1.2):

- (1) Die Konjugation mit Aminosäuren (AS) katalysiert durch die JA-Konjugat-Synthase (JAR; STASWICK & TIRYAKI 2004)
- (2) Die Methylierung durch eine spezifische JA-Methyl-Transferase (JMT; SEO *et al.* 2001)
- (3) Die Hydroxylierung des C11- oder C12-Atoms der Pentenyl-Seitenkette, gefolgt von einer O-Glykosylierung oder Sulfatierung durch eine 12-OH-JA-Sulfotransferase (ST2a; SEMBDNER & PARTHIER 1993; SWIATEK *et al.* 2004; GIDDA *et al.* 2003)
- (4) Die Decarboxylierung zu *cis*-Jasmon (KOCH *et al.* 1997)
- (5) Die Reduktion zu Cucurbinsäure (DATHE *et al.* 1991)
- (6) Die Bildung von Jasmonoyl-1- β -Glukose, Jasmonoyl-1- β -Gentiobiose und Hydroxy-jasmonoyl-1- β -Glukose (SWIATEK *et al.* 2004)
- (7) Die Konjugation mit der Ethylen-Vorstufe ACC (STASWICK & TIRYAKI 2004)

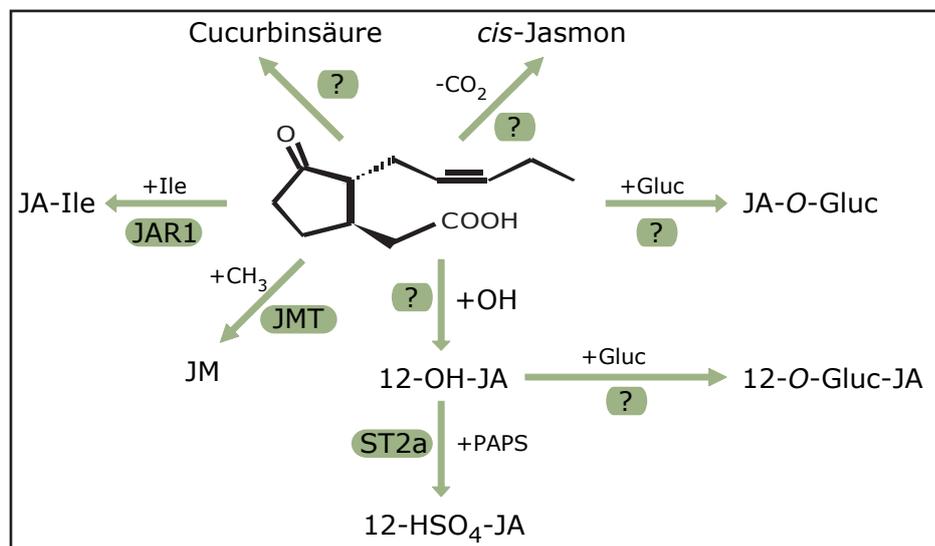


Abb. 1.2: JA-Metabolismus
(grün unterlegt: bisher klonierte bzw. noch unbekannte (?) Enzyme; Abkürzungen: siehe Text)

Im Gegensatz zu Auxin-AS-Konjugaten sind JA-AS-Konjugate auch ohne vorherige Spaltung biologisch aktiv (KRAMPELL *et al.* 1997). Sie sind in der Lage die Expression einiger JA-responsiver Gene zu induzieren (KRAMPELL *et al.* 2000). Das am häufigsten in der Pflanze vorkommende Konjugat ist das Isoleucin-Konjugat (JA-Ile; KRAMPELL *et al.* 1997; HAUSE *et al.* 2000). *JAR1* aus Arabidopsis kodiert für ein JA-konjugierendes Enzym, das

die ATP-abhängige Adenylierung der Carboxyl-Gruppe und die darauf folgende Konjugation mit Ile, Leucin (Leu), Phenylalanin (Phe) oder Valin (Val) *in vitro* katalysiert (STASWICK *et al.* 2002; STASWICK & TIRYAKI 2004). Die Arabidopsis-Mutante *jar1* zeigt eine verminderte Sensitivität gegenüber JA, wobei der Phänotyp durch JA-Ile-Applikation normalisiert werden kann (STASWICK *et al.* 1992; STASWICK & TIRYAKI 2004). Im Gegensatz zum männlich sterilen Phänotyp der JA-insensitiven Mutante *coi1*, sind *jar1*-Pflanzen fertil, was dafür spricht, dass nicht alle Jasmonat-vermittelten Prozesse in *jar1* betroffen sind (STASWICK *et al.* 2002). Nach *down*-Regulation des *JAR1*-Homologen, *JAR4*, in *Nicotiana attenuata* waren die Pflanzen anfälliger gegenüber dem Befall von *Manduca sexta*, weshalb eine Beteiligung von JA-Ile an der Wundantwort postuliert wird (KANG *et al.* 2006). Neben reduzierten JA-Ile-Gehalten in *jar1*-Pflanzen kommt es zu einem Anstieg der Gehalte von ACC- und Phe-Konjugaten, was für die Existenz von mehr als nur einem JA-konjugierenden Enzym spricht (STASWICK & TIRYAKI 2004). Das JA-ACC-konjugierende Enzym ist möglicherweise an der Koordinierung von JA- und Ethylen-Signalwegen beteiligt (STASWICK & TIRYAKI 2004).

Der flüchtige Methylester von JA (JM) zeigt exogen appliziert die gleiche biologische Aktivität wie JA (TAKI *et al.* 2005). Es erfolgt endogen vermutlich die Hydrolyse zu JA, was als das primäre Signalmolekül angesehen wird (FARMER & RYAN 1990; FARMER & RYAN 1992). Eine putative JM-Esterase wurde in Tomate identifiziert (STUHLFELDER *et al.* 2004). Die Überexpression der *JMT* in Arabidopsis führte zu erhöhten JM-Gehalten, wohingegen die JA-Gehalte nicht verändert waren. In diesen Pflanzen wurden JA-responsive Gene konstitutiv exprimiert und die Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* war erhöht (SEO *et al.* 2001). Dies zeigt, dass auch JM regulatorisch wirksam ist.

Der JA-Metabolit *cis*-Jasmon wird durch oxidative Decarboxylierung gebildet, wobei 1,2-Dihydro-JA als Intermediat auftritt (KOCH *et al.* 1997). Die Signalwirkung von *cis*-Jasmon während der pflanzlichen Abwehr ist mehrfach bestätigt worden (BIRKETT *et al.* 2000; HALITSCHKE & BALDWIN 2005).

12-OH-JA (Tuberonsäure) induziert die Knollenbildung der Kartoffel, wobei das O-Glukosid als Transportform von 12-OH-JA angenommen wird (YOSHIHARA *et al.* 1989). Über weitere Funktionen von 12-OH-JA ist wenig bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Expression der Gene, die für den Cathepsin-D-Inhibitor in *Nicotiana tabacum* (Tabak) und Thionin2.1 in Arabidopsis kodieren, nicht durch 12-OH-JA induziert wird (ISHIKAWA *et al.* 1994; GIDDA *et al.* 2003). Die Konsequenzen von Sulfatierung oder Glykosylierung für die biologische Aktivität von 12-OH-JA sind bislang nur spekulativ. Die Sulfatierung wurde als Möglichkeit zur Regulation der 12-OH-JA-Menge und -Aktivität postuliert (GIDDA *et al.* 2003). Es gelang die Klonierung und Charakteri-

sierung einer spezifischen 12-OH-JA-Sulfotransferase aus Arabidopsis (AtST2a; GIDDA *et al.* 2003).

Die Frage nach einem inaktiven JA-Derivat kann derzeit noch nicht eindeutig beantwortet werden. Zum einen kann sich die biologische Aktivität einzelner Jasmonate in verschiedenen Pflanzen unterscheiden. Zum anderen wird angenommen, dass für JA-vermittelte Prozesse nicht nur ein einziges Jasmonat, sondern vielmehr das Verhältnis verschiedener Jasmonate verantwortlich ist. Hinzu kommen noch OPDA und weitere Oxylipine, die ebenfalls an JA-vermittelten Prozessen beteiligt sind, aber auch JA-unabhängig wirken können. Das Vorkommen und die Verhältnisse der einzelnen Signaltstoffe variieren dabei in verschiedenen Pflanzen entwicklungs- und gewebsspezifisch, sowie in Abhängigkeit der Umweltbedingungen und scheinen von regulatorischer Bedeutung zu sein (HAUSE *et al.* 2000; MIERSCH *et al.* 2004). Das Verhältnis der Mengen verschiedener Oxylipine wird daher auch als Oxylipin-Signatur bezeichnet (WEBER *et al.* 1997).

1.1.3 Die Bedeutung der Jasmonate während der pflanzlichen Entwicklung

Zu den ersten physiologischen Effekten, die für JA beobachtet wurden, zählten die Inhibierung des Wurzelwachstums und der Keimung, sowie die Förderung der Blatt-Seneszenz (DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992; CORBINEAU *et al.* 1988; UEDA & KATA 1980). JA-insensitive Mutanten wie *jai1* zeigen keine Reduktion des Wurzelwachstums nach Applikation von JM (LI *et al.* 2004a). Die Arabidopsis-Mutante *cev1* zeigt konstitutiv erhöhte JA-Gehalte und besitzt dementsprechend verkürzte Wurzeln (ELLIS *et al.* 2002). Neben dem hemmenden Einfluss von JA auf das Wachstum der Primärwurzel fördert JA die Bildung von Lateralwurzeln (WANG *et al.* 2002).

Weiterhin beeinflussen Jasmonate die Blütenentwicklung. So sind Arabidopsis-Mutanten, die eine gestörte JA-Biosynthese oder Insensitivität gegenüber JA zeigen, männlich steril. Jasmonate werden in Arabidopsis für die Pollenentwicklung, die Filamentelongation und die Antherendehiszenz benötigt (STINTZI & BROWSE 2000; PARK *et al.* 2002; VON MALEK *et al.* 2002). Während eine Mutation im F-Box-Protein COI1, einem zentralen Element der JA-Signaltransduktion, in Arabidopsis zu männlicher Sterilität führt, sind Tomaten-Pflanzen mit defektem JAI1, dem COI1-Homologen, weiblich steril (FEYS *et al.* 1994; LI *et al.* 2004a). Weitere Hinweise auf eine Beteiligung von Jasmonaten und Oxylipinen ergab der Nachweis des AOC-Proteins in den Samenanlagen, sowie der unterschiedlichen Oxylipin-Signaturen der Blütenorgane von Tomate (HAUSE *et al.* 2000). Die Funktion der Jasmonate während der Blüten- oder Samenentwicklung von Tomate ist allerdings noch nicht aufgeklärt.

Am Auslösen der Rankenkrümmung der Zaunrübe, an der Induktion der Knollenbildung der Kartoffel und an der Bewegung der Blätter von *Albizzia* sind OPDA und JA-Metabolite ebenfalls beteiligt (FALKENSTEIN *et al.* 1991; YOSHIHARA *et al.* 1989; NAKAMURA *et al.* 2006).

Obwohl eine ganze Reihe JA-abhängiger Prozesse in Pflanzen bekannt und charakterisiert sind, ist die Frage nach der spezifischen Funktion der einzelnen Metabolite noch weitestgehend unbeantwortet.

1.1.4 Die Bedeutung der Jasmonate während der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress

Jasmonate sind an einer Vielzahl von Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress beteiligt. Sie induzieren z.B. die Schutzmechanismen gegenüber Ozon- oder UV-Stress, sowie osmotischem Stress (RAO *et al.* 2000; KRAMELL *et al.* 1995). Einer der am besten untersuchten JA-abhängigen Prozesse ist die Wundantwort nach mechanischer Verwundung oder nach Herbivoren-Befall in *Solanaceae*n wie Tomate, Tabak oder Kartoffel (HOWE 2004; HALITSCHKE & BALDWIN 2005).

1.1.4.1 Die Wundantwort in Tomate

Bereits vor über 35 Jahren wurde die wund-induzierte Bildung von Proteinase-Inhibitoren (PINs) in Tomate entdeckt, wobei sie den Protein-Abbau im Darmtrakt von Herbivoren hemmen (GREEN & RYAN 1972). 20 Jahre später gelang die Identifizierung des ersten pflanzlichen Peptidhormons, dem Systemin, das die Bildung von PINs induziert (PEARCE *et al.* 1991). Dass die Bildung von PINs JA-abhängig erfolgt, war zuvor belegt worden (FARMER & RYAN 1990).

Nach Verwundung erfolgt nahe der Verwundungsstelle die Generierung von Systemin durch Spaltung des 200-AS-großen Vorläuferproteins PROSYSTEMIN. Systemin bindet an den Rezeptor SR160 in der Plasmamembran (SCHEER & RYAN 2002). Dies führt zur Freisetzung von α -LeA durch eine Phospholipase A2 (NARVAEZ-VASQUEZ *et al.* 1999). Die Signaltransduktion zwischen Plasmamembran und Chloroplasten erfolgt vermutlich durch MAP-Kinasen und Ca^{2+} -Ionen (STRATMANN & RYAN 1997; STRATMANN *et al.* 2000; CHICO *et al.* 2002; MAYROSE *et al.* 2004). Nach Freisetzung von α -LeA kommt es zur Induktion der JA-Biosynthese und somit zur JA-Akkumulation. JA wiederum ist in der Lage die Expression einer Vielzahl von Genen zu beeinflussen. Diese Gene werden

in frühe und späte Gene unterschieden (RYAN 2000). Zu den frühen Genen gehören u.a. die JA-Biosynthese-Gene und *PROSYSTEMIN*. Zu den späten JA-induzierbaren Genen gehören Abwehr-Gene, die unter anderem für Enzyme des AS-, Sekundär- oder Polyamin-Stoffwechsels kodieren (RYAN 2000; CHEN *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2006). Dazu zählen z.B. Polyphenol-Oxidasen (PPO), Arginasen (ARG), Leucin-Amino-Peptidasen (LAP) und PINs (DUFFEY & FELTON 1991; CONSTABEL *et al.* 1995; CHEN *et al.* 2005; PATOUT *et al.* 1993; LISON *et al.* 2006). Alle diese durch die Pflanze nach Verwundung produzierten Proteine stören vermutlich die Verdauung des fressenden Insekts, wobei ihre eigene Stabilität und Aktivität die Voraussetzung ist. Dies wurde für die Threonin-Desaminase (TD) gezeigt. Im Verdauungstrakt von *Manduca sexta* liegt eine aktive TD nach Fraß von Tomatenblättern vor (CHEN *et al.* 2005). JA ist auch in der Lage die Expression von Genen zu reprimieren. Dazu gehören z.B. Gene, die für Proteine kodieren, die an der Photosynthese beteiligt sind, wie die kleine Untereinheit der RuBisCo oder Chlorophyll-a/b-Bindeproteine (WASTERNAK & HAUSE 2002).

Aufgrund der JA-abhängigen *PROSYSTEMIN*-Expression und der Systemin- und JA-induzierbaren AOC-Expression, sowie der Lokalisation von Prosystemin und den JA-Biosynthese-Enzymen im Leitgewebe wurde die Amplifikation des JA-Signals durch JA selbst vorgeschlagen (STENZEL *et al.* 2003a; NARVAEZ-VASQUEZ & RYAN 2004).

Neben der lokalen Generierung von JA und der Induktion der Abwehr-Gene im verwundeten Blatt gibt es auch eine systemische Wundantwort. JA wird dabei, aufgrund der JA-Generierung im Leitgewebe, als systemisches Signal diskutiert, das die systemische Bildung von PINs und anderen Komponenten der pflanzlichen Abwehrreaktion induziert. Pfropfungsexperimente mit JA-defizienten oder JA-insensitiven Mutanten zeigten, dass die Perzeption des JA-Signals aber nicht die JA-Biosynthese im systemischen Blatt für eine Wundantwort notwendig ist (SCHILLMILLER & HOWE 2005).

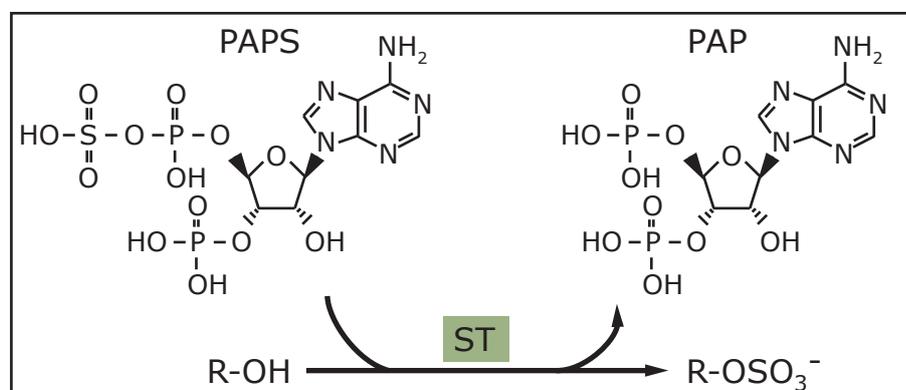
Zusätzlich zu den Signalstoffen Systemin und JA, gibt es eine Reihe weiterer Signale, die die Wundantwort positiv beeinflussen. Dazu zählen Ca^{2+} -Ionen, andere Phytohormone wie Abszissinsäure und Ethylen, H_2O_2 , Oligogalacturonide, Fettsäure-Konjugate und physikalische Ereignisse wie Änderungen von Membranpotentialen, elektrische Impulse oder UV-Strahlung (PENA-CORTES *et al.* 1995; O'DONNELL *et al.* 1996; WILDON *et al.* 1992; STANKOVIC & DAVIES 1996; HERDE *et al.* 1996; OROZCO-CARDENAS *et al.* 2001; DOARES *et al.* 1995a; CONCONI *et al.* 1996; TURLINGS *et al.* 1995). Hemmend auf die Wundantwort wirken Stickoxide und Salizylsäure (OROZCO-CARDENAS & RYAN 2002; DOARES *et al.* 1995b).

1.1.5 COI1 als Regulator JA-responsiver Genexpression

Durch einen Screen nach JA-insensitiven Mutanten von Tomate konnte die Mutante *jai1* identifiziert werden. Sie besitzt einen Defekt in dem Gen, das zum Arabidopsis *CORONATIN-INSENSITIVE1 (COI1)* homolog ist (LI *et al.* 2004a). *COI1* kodiert für ein F-Box-Protein, das Teil eines E3 Ligase Komplexes ist (XIE *et al.* 1998; XU *et al.* 2002; DEVOTO *et al.* 2002). *COI1* vermittelt dabei den Ubiquitin-abhängigen Abbau eines oder mehrerer Target-Proteine, die die Expression JA-responsiver Gene reprimieren (TURNER *et al.* 2002). Vor Kurzem gelang die Identifizierung dieser Target-Proteine als putative Jasmonat-Rezeptoren (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007; YAN *et al.* 2007). Sie gehören zur Familie von JAZ-Repressorproteinen, die in Arabidopsis 10 Mitglieder umfasst. *COI1* ist essentiell für die Expression JA-responsiver Gene, sowie die wund-induzierte Genexpression nach Herbivoren-Befall (DEVOTO *et al.* 2005; REYMOND *et al.* 2000; LI *et al.* 2004a). Des Weiteren ist *COI1* an JA-vermittelten Entwicklungsprozessen beteiligt. So sind Arabidopsis *coi1*-Mutanten u.a. männlich steril und die Tomaten *jai1*-Mutanten sind weiblich steril und in der Trichom-Entwicklung gestört (FEYS *et al.* 1994; LI *et al.* 2004a). Die essentielle Bedeutung von *COI1* für JA-vermittelte Prozesse in Arabidopsis und Tomate, sowie die Existenz von *COI1*-Orthologen in Monokotyledonen, spricht für eine hohe Konservierung dieser Signal-Komponente in höheren Pflanzen.

1.2 Sulfotransferasen

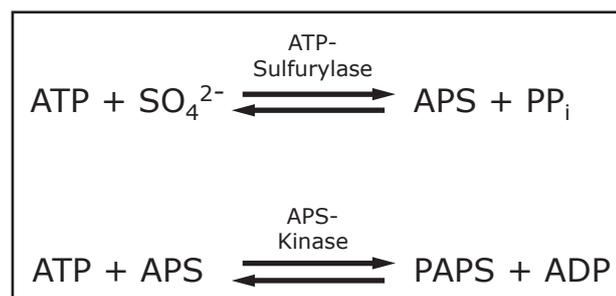
Sulfotransferasen (ST) konnten bislang in nahezu allen Organismen mit Ausnahme der Archaeobakterien identifiziert werden. Die Enzyme katalysieren die Übertragung einer Sulfat-Gruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) auf die Hydroxyl-Gruppe verschiedenster Substrate, wobei neben dem sulfatierten Substrat 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat (PAP) entsteht:



PAP inhibiert verschiedene STs, sowie den Transport von PAPS (KLAASSEN & BOLES 1997). STs werden in membran-gebundene und lösliche Enzyme unterschieden. Membran-gebundene STs akzeptieren hauptsächlich Makromoleküle, wie Proteine, Peptide oder Glucosamine (NIEHRS *et al.* 1994; HABUCHI 2000; HONKE & TANIGUCHI 2002). Substrate der löslichen STs sind vorwiegend kleine organische Verbindungen, wie Flavonoide, Steroide oder diverse Xenobiotika. Die sulfatierten Verbindungen sind dabei besser wasserlöslich als die Ursprungsverbindungen (WEINSHILBOUM & OTTERNESS 1994). Es wird postuliert, dass die Sulfatierung die biologische Aktivität der entsprechenden Verbindungen verändert und so verschiedene physiologische Prozesse beeinflusst werden können (z.B: YANG *et al.* 1999; MARSOLAIS *et al.* 2000; GIDDA *et al.* 2003).

1.2.1 Die PAPS-Biosynthese

Die PAPS-Biosynthese erfolgt aus ATP und endogenem Sulfat über zwei Reaktionsschritte (KLAASSEN & BOLES 1997):



Zuerst katalysiert die ATP-Sulfurylase die Übertragung von Sulfat auf ATP, wobei 5'-Adenylylsulfat und Pyrophosphat entstehen. Dabei liegt das Gleichgewicht dieser Reaktion auf Seiten von ATP. Eine weitere Umsetzung des Pyrophosphats zu anorganischem Phosphat durch eine Pyrophosphatase verschiebt das Gleichgewicht in Richtung APS-Bildung. APS wird entweder durch eine APS-Reduktase metabolisiert, was dem ersten Schritt der Sulfat-Reduktion entspricht oder wird durch eine APS-Kinase ATP-abhängig an 3'-Position phosphoryliert, wobei PAPS entsteht. Sowohl ATP-Sulfurylasen als auch APS-Kinasen konnten aus Arabidopsis kloniert werden (ROTTE & LEUSTEK 2000; LILLIG *et al.* 2001; LEUSTEK 2002)

1.2.2 Sulfotransferasen in Säugern

STs aus Säugern wurden umfangreich charakterisiert. Die hohen Ähnlichkeiten von STs im Allgemeinen können bei der Charakterisierung der Wirkungsweise pflanzlicher

STs nützlich sein. So sind pflanzliche STs und STs aus Säugern auf AS-Ebene zu 25 bis 30 % identisch. Sulfatierungsprozesse sind in Säugern von essentieller Bedeutung. Ein natürlich auftretender Defekt in der Biosynthese des Co-Substrates PAPS ist im Menschen lethal (SUPERTI-FURGA 1994). In Säugern sulfatieren STs eine Vielzahl von Hormonen, Neurotransmittern und Xenobiotika. Dies führt zu einem erhöhten Ausscheiden der sulfatierten Verbindungen über die Nieren, was wiederum zu einer Abnahme der biologischen Wirkung führt. Auf der anderen Seite ist die Sulfatierung auch essentiell für die Aktivierung bestimmter Arzneistoffe (WEINSHILBOUM & OTTERNESS 1994; WEINSHILBOUM *et al.* 1997).

Die Kristallisation und Röntgen-Struktur-Analysen mehrerer löslicher STs aus Säugern zeigte, dass die globulären Proteine aus einer α/β -Domäne mit einem charakteristischen 5-strängigen β -Faltblatt, das die Bindestelle für PAPS und das aktive Zentrum enthält, bestehen (NEGISHI *et al.* 2001). Des Weiteren konnte in humanen und Maus-STs ein Dimerisierungsmotiv identifiziert werden, das als KTVE-Motiv bezeichnet wird (PETROTCHENKO *et al.* 2001). Dieses Motiv befindet sich nahe des C-Terminus (von AS255 bis AS264) der humanen Östrogen-ST SULT1E1. Die AS-Reste Gln256 bis Glu264 bilden vier Wasserstoffbrücken zum Protein-Rückgrat des jeweils anderen Monomers aus. Zu dem treten an beiden Enden ionische Wechselwirkungen des Lys255 des einen Monomers mit dem Glu264 des anderen Monomers auf (Nomenklatur der humanen SULT1E1). Lösliche humane STs liegen im Cytosol dabei als Homo- und Hetero-Dimere vor (WEINSHILBOUM *et al.* 1997).

1.2.3 Pflanzliche Sulfotransferasen

Im Vergleich zu den tierischen STs ist über die pflanzlichen Enzyme noch relativ wenig bekannt. Die bisher identifizierten und charakterisierten, löslichen, pflanzlichen STs sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst. Diese Übersicht gibt einen Einblick in die Substrat-Diversität der STs und das breite Vorkommen sulfatierter Verbindungen. So sind bislang über 80 sulfatierte Flavonoide identifiziert worden (BARRON *et al.* 1988). Allerdings sind über die Funktion der Flavonoide und deren Derivaten nur wenig Informationen vorhanden. In *Flaveria bidentis* ist die Akkumulation der Flavonol-Sulfate entwicklungsabhängig (HANNOUFA *et al.* 1991). Die Expression der entsprechenden Flavonol-ST-Gene kann durch das synthetische Auxin 2,4 D induziert werden (ANANVORANICH 1994). Außerdem inhibieren Flavonol-Aglykone den polaren Auxin-Transport in *Cucurbita pepo* durch Bindung an den Naphthylphthalaminsäure-Rezeptor, während die sulfatierten Verbindungen einen antagonistischen Effekt zeigen (JACOBS & RUBERY 1988; FAULKNER & RUBERY 1992). Die Synthese von Flavonol-Sulfaten erlaubt so möglicherweise den Abtransport von Auxin aus Geweben

mit hoher Auxin-Produktion (ANANVORANICH 1994). Als Funktion der Sulfatierung von Hydroxy-Jasmonaten wird ebenfalls die Regulation der biologischen Aktivität bzw. die Inaktivierung von überschüssigem JA diskutiert (GIDDA *et al.* 2003).

Brassinosteroiden können ebenso durch Sulfatierung inaktiviert werden (ROULEAU *et al.* 1999). Die beiden charakterisierten STs aus *Brassica napus* zeigen ein sehr großes Substrat-Spektrum. Die entsprechenden Gene sind ebenfalls durch Ethanol und verschiedene Xenobiotika, sowie Herbizide induzierbar. Deshalb wurde eine allgemeine Funktion in der Detoxifikation diskutiert (MARSOLAIS *et al.* 2004).

Die Sulfatierung kann aber auch zur Generierung biologisch aktiver Verbindungen führen. So ist z.B. die Sulfatierung des Gallussäure-Glukosids notwendig für die seismonastische Reaktion von *Mimosa pudica* und sulfatierte Choline spielen eine Rolle bei der Toleranz gegenüber Salzstress in *Limonium* Spezies (SCHILDKNECHT & MEIER-AUGENSTEIN 1990; RIVOAL & HANSON 1994). Des Weiteren sind STs an der Biosynthese von Glucosinolaten, die Hauptsekundärmetabolite in *Brassicaceen*, beteiligt. Sie katalysieren den letzten Schritt der Glucosinolat-Biosynthese (PIOTROWSKI *et al.* 2004; KLEIN *et al.* 2006).

1.2.3.1 Funktionale Motive löslicher Sulfotransferasen

Alle löslichen STs aus Pro- und Eukaryoten zeigen hohe strukturelle Ähnlichkeiten. Sie haben in etwa die gleiche AS-Anzahl, ähnliche hydrophobe Eigenschaften und bestehen aus vier Regionen konservierter AS-Reste (VARIN *et al.* 1992). Die 3D-Strukturen der löslichen STs sollten sich also ebenfalls ähneln.

Die meisten der bislang bekannten, funktionalen Motive der pflanzlichen STs konnten durch Untersuchungen der Flavonol-3- und Flavonol-4'-ST aus *Flaveria chloraefolia* identifiziert werden. Diese beiden Enzyme sind ein ideales Untersuchungsobjekt, da es die bisher einzigen charakterisierten STs sind, die an einer klar definierten, sequentiellen Polysulfatierung beteiligt sind (VARIN *et al.* 1992). So konnten zum einen essentielle AS-Reste für die Co-Substrat-Bindung und den Katalyse-Mechanismus und zum anderen Regionen, die die Spezifität für das Akzeptor-Substrat bestimmen, identifiziert werden (MARSOLAIS *et al.* 2000).

Name	Organismus	Akzeptor-Substrate	Referenz
Flavonol-7-ST	<i>Flaveria bidentis</i>	Quercetin-3,3'-Disulfat, Quercetin-3,4'-Disulfat	VARIN & IBRAHIM 1991
Flavonol-3-ST	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Quercetin, Isorhamnetin, Rhamnetin, Kämpferol	VARIN <i>et al.</i> 1992
Flavonol-4'-ST	<i>Flaveria chloraefolia</i>	Quercetin-3-Sulfat, Iso- rhamnetin-3-Sulfat, Kämpferol-3-Sulfat	VARIN <i>et al.</i> 1992
Flavonol-3-ST	<i>Flaveria bidentis</i>	Quercetin, Rhamnetin, Isorhamnetin	ANANVORANICH <i>et al.</i> 1994
Flavonol-7-ST (AtST3a/AtSOT5)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Apigenin-7-Sulfat, Kämpferol-7-Sulfat, Rhamnetin, Quercetin, Myrecetin, Kämpferol, Dihydroquercetin, Genistein	GIDDA & VARIN 2006
BNST3	<i>Brassica napus</i>	(22S,23S)-28-Homobrassinolid, 24-Epibrassinolid, (22S,23S)-28-Homocastasteron, 24-Epicathasteron, 6-Desoxy-24-Epicathasteron, β-Estradiol, β-Estradiol-3-methylether	ROULEAU <i>et al.</i> 1999
BNST4	<i>Brassica napus</i>	(22S,23S)-28-Homobrassinolid, 24-Epibrassinolid, (22S,23S)-28-Homocastasteron, 24-Epicathasteron, 6-Desoxy-24-Epicathasteron, β-Estradiol, β-Estradiol-3-methylether	MARSOLAIS <i>et al.</i> 2004
AtST1 (AtSOT10)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	24-Epicathasteron, 6-Desoxy-24-epicathasteron, 17-β-Estradiol, Dehydroepiandrosteron, Pregnenolon	MARSOLAIS <i>et al.</i> 2007
AtST4a (AtSOT12)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassinolid, Castasteron, 24-Epibrassinolid, (22R,23R)-28-Homobrassinolid, (22R,23R)-28-Homocastasteron	MARSOLAIS <i>et al.</i> 2007
Desulfoglucosinolat-ST	<i>Lepidium sativum</i>	Desulfobenzylglucosinolat, Desulfo-p-hydroxybenzylglucosinolat, Desulfoallylglucosinolat	GLENDENING & POULTON 1990
Desulfoglucosinolat-ST	<i>Brassica juncea</i>	Desulfobenzylglucosinolat	JAIN <i>et al.</i> 1990
AtST5a (AtSOT16)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desulfoglucosinolate (bevorzugt abgeleitet von Phe und Trp)	PIOTROWSKI <i>et al.</i> 2004
AtST5b (AtSOT17)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desulfoglucosinolate (bevorzugt abgeleitet von Met)	PIOTROWSKI <i>et al.</i> 2004
AtST5c (AtSOT18)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Desulfoglucosinolate (bevorzugt abgeleitet von Met)	PIOTROWSKI <i>et al.</i> 2004
Cholin-ST	<i>Limonium sinuatum</i>	Cholin	RIVOAL & HANSON 1994
Gallussäure-Glykosid-ST	<i>Mimosa pudica</i>	Gallussäure-Glukosid	VARIN <i>et al.</i> 1997
AtST2a (AtSOT15)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	11- und 12-OH-JA	GIDDA <i>et al.</i> 2003

Tab. 1.1: Übersicht über alle bisher identifizierten und charakterisierten, löslichen, pflanzlichen STs (grün: Flavonol-STs; gelb: Brassinosteroid-STs; blau: Desulfo-Glucosinolat-STs; lila: andere STs)

Die PAPS-Bindung

Durch Co-Kristallisation der Östrogen-ST aus Maus mit PAPS konnte ein hochkonservierter Lys-Rest identifiziert werden, der essentiell für die PAPS-Bindung ist (KAKUTA *et al.* 1997). Die Bedeutung des entsprechenden Lys59-Restes der Flavonol-3-ST für die PAPS-Bindung wurde durch Affinitäts-Chromatographie-Untersuchungen mit K59R- und Wildtyp-Protein belegt (MARSOLAIS *et al.* 1999). Ebenso konnten zwei weitere Arg-Reste in den Regionen II und IV der Flavonol-3-ST aus *F. chloraefolia* identifiziert werden, die an der Bindung von PAPS beteiligt sind (MARSOLAIS *et al.* 1999).

Der Katalyse-Mechanismus

Die Sulfatierung erfolgt durch nukleophile Substitution. Die für die Katalyse bedeutendsten AS-Reste der Flavonol-3-ST aus *F. chloraefolia* sind der Lys59- und der His119-Rest (MARSOLAIS & VARIN 1995; MARSOLAIS & VARIN 1997). Die Kristallstruktur der Östrogen-ST aus Maus zeigte, dass der dem His119 entsprechende Rest mit der Hydroxyl-Gruppe an Position 3 des β -Östradiol interagiert (KAKUTA *et al.* 1997). Der Austausch dieses Restes mit Alanin führt zur völligen Inaktivierung der Enzymaktivität (MARSOLAIS *et al.* 1999; HOMMA *et al.* 1996; KAKUTA *et al.* 1998). Der Lys59-Rest ist am Katalyse-Mechanismus beteiligt. Untersuchungen von mutierten Proteinen ergaben, dass Lys59 nicht nur mit der Phosphatgruppe von PAPS sondern auch mit der Sulfat-Gruppe interagiert und den nukleophilen Angriff unterstützt (MARSOLAIS *et al.* 1999; KAKUTA *et al.* 1998).

Die Bindung des Akzeptor-Substrates

Durch die Generierung verschiedener Hybrid-Proteine aus Flavonol-3- und Flavonol-4'-ST aus *F. chloraefolia* konnte ein für die Akzeptor-Substrat-Spezifität entscheidendes Segment, die Domäne II, identifiziert werden (MARSOLAIS & VARIN 1997). Sie umfasst die AS 93 bis 195. Innerhalb dieser Domäne konnten durch Sequenzvergleiche tierischer und pflanzlicher STs 2 Subdomänen (AS 99-111 und AS 154-171 der Flavonol-3-ST) ermittelt werden, die möglicherweise an der Bindung des Akzeptor-Substrates in allen STs beteiligt sind (VARIN *et al.* 1995).

1.2.3.2 Sulfotransferasen in Arabidopsis

Nachdem das Arabidopsis-Genom vollständig sequenziert war, wurden mit Hilfe von Sequenzvergleichen 18 putative ST-Sequenzen in Arabidopsis identifiziert (THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE 2000; KLEIN & PAPENBROCK 2004). In diesem Zusammenhang wurde eine neue Nomenklatur der STs vorgeschlagen, die Bezeichnung als AtSOT1 bis AtSOT18 und die Einteilung in sieben Gruppen. In der vorliegenden Arbeit wird jedoch die Nomenklatur nach MARSOLAIS *et al.* (2000) verwendet. Keine der Sequenzen enthält eine Transmembran-Region oder ein Transit-Peptid, weshalb vermutlich alle Arabidopsis-STs löslich sind (KLEIN & PAPENBROCK 2004). Des Weiteren wurde in keiner Sequenz ein KTVE-Motiv identifiziert, so dass vermutlich alle als Monomere aktiv sind. Fast keines der Gene enthält Introns (KLEIN & PAPENBROCK 2004). Ein Alignment der verschiedenen AS-Sequenzen ergab, dass alle 18 STs die konservierten AS-Reste für die PAPS-Bindung und den Katalyse-Mechanismus enthalten (vgl. 1.2.3.1; KLEIN & PAPENBROCK 2004).

Die 12-OH-JA-Sulfotransferase (AtST2a)

Die AtST2a war die erste identifizierte und charakterisierte ST aus Arabidopsis (GIDDA *et al.* 2003). Die rekombinante AtST2a sulfatiert spezifisch 11- und 12-OH-JA, wobei die Affinität für 12-OH-JA größer ist (K_m 12-OH-JA = 10 μ M; K_m 11-OH-JA = 50 μ M). Das pH-Optimum liegt bei 7,5 in Tris-Puffer. Das *AtST2a*-Gen wird vom *AtST2b*-Gen flankiert. Beide AS-Sequenzen zeigen 92% Ähnlichkeit und enthalten alle für die PAPS-Bindung und Katalyse essentiellen AS. Für die rekombinante AtST2b konnte bisher jedoch bisher keinerlei Aktivität nachgewiesen werden.

Die Expression der *AtST2a* wird durch Applikation von OPDA, JM, 12-OH-JA und JA-Ile induziert (GIDDA *et al.* 2003). Die Induzierbarkeit der Expression korreliert mit einem Anstieg der Enzymaktivität *in vivo*. Eine Überexpression oder eine *down*-Regulation der *AtST2a* führte zu Veränderungen des Blühzeitpunktes, weshalb ein Einfluss von 12-OH-JA auf den Blühzeitpunkt von Arabidopsis diskutiert wurde (GIDDA 2001). Dieser Effekt konnte allerdings nicht bestätigt werden (LANGE, persönliche Mitteilung). Es konnten bislang keine phänotypischen Veränderungen in den *AtST2a*-Überexpressionspflanzen oder den *AtST2a*-*knock-out*-Mutanten identifiziert werden (LANGE, persönliche Mitteilung).

Nach heterologer Überexpression der *ATST2a* in Tabak konnte hingegen ein sehr auffälliger Phänotyp beobachtet werden (VARIN *et al.* 2003). Die Staubblätter dieser Pflanzen waren zum Teil zu Blütenblättern umgewandelt. Nicht umgewandelte Staubblätter

waren zudem kürzer. Die Pflanzen waren dennoch fertil und bildeten Samen. Dieser Phänotyp korrelierte mit einem reduzierten 12-OH-JA-Gehalt in den transgenen Staubblättern. Des Weiteren konnte der Blütenphänotyp durch exogene Applikation von 12-OH-JA normalisiert werden. Deshalb wurde eine Funktion von 12-OH-JA in der Blütenentwicklung postuliert.

1.3 Die Infloreszenz- und Blütenentwicklung der Tomate

Die Wuchsform von Pflanzen kann monopodial oder sympodial sein, wobei beide Formen bereits in niederen Pflanzen, wie Mosen und Farnen, auftreten (BELL 1992). Viele einjährige Pflanzen besitzen eine einzige vegetative Phase, die von einer einzigen reproduktiven, den Lebenszyklus abschließenden Phase abgelöst wird. Das Wachstum mehrjähriger Bäume benötigt hingegen sowohl vegetatives als auch reproduktives Wachstum innerhalb der Pflanze.

Pfropfungsexperimente zeigten, dass in Blättern, in Reaktion auf photoperiodische Veränderungen, Signale generiert werden, die im vegetativen Sprossapikalmeristem (SAM) die Bildung von Blüten induzieren (CHAILAKHYAN 1936; ZEEVART 1979). Diese Signale werden als Florigen bezeichnet, wobei dessen genaue Zusammensetzung noch unklar ist. Durch Untersuchungen in Reis und Arabidopsis konnten verschiedene Signalwege identifiziert werden, die verschiedene Umweltsignale integrieren. Die vorherrschenden Lichtbedingungen werden dabei durch den photoperiodischen Signalweg vermittelt. Dabei sind *FLOWERING LOCUS T (FT)* und *CONSTANS (CO)* Hauptkomponenten, die das Blühen in Lang- und Kurztag-Pflanzen beeinflussen (MOURADOV *et al.* 2002; JACK 2004; BOSS *et al.* 2004; BÄURLE & DEAN 2006).

Die Blühinduktion in Tomate ist unabhängig von photoperiodischen Veränderungen, sie ist Tag-neutral. Obwohl es sich um einjährige Pflanzen handelt, zeigt ihr Wachstum Charakteristika mehrjähriger Pflanzen. Das komplexe, aber regelmäßige und vorher-sagbare Wachstum von Tomate bietet eine ideale Grundlage um zu untersuchen, wie die Identität des SAM während wechselnder Übergänge vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum durch bestimmte Gene, die das Blühen induzieren, reguliert wird. Eine Beteiligung von Jasmonaten an diesen Prozessen wurde bislang nicht beschrieben.

1.3.1 Die Termination des Sprosses und Blühinduktion

Der primäre Spross von Wildtyp-Tomaten wird durch die erste Infloreszenz nach 6-16 Blättern terminiert. Dies entspricht dem Blühzeitpunkt. Die Termination ist dabei nicht nur genetisch festgelegt, sondern auch abhängig von verschiedenen Umweltfaktoren, hauptsächlich von der Lichtmenge (ATHERTON & HARRIS 1986). Der scheinbar durchgängige Hauptspross von Tomaten-Pflanzen setzt sich aus dem primären durch eine Infloreszenz terminierten Hauptspross und darauf folgenden, sich ständig wiederholenden lateralen Abzweigungen, den sog. *sympodial units* (SUs), zusammen (Abb. 1.3). Jede SU besteht aus drei vegetativen Nodien und einer terminalen Infloreszenz. Sie stammen vom dritten Nodium der jeweils vorhergehenden SU ab. Auch die echten Seitentriebe werden wie der primäre Hauptspross zuerst nach einer variablen Anzahl von Blättern durch eine Infloreszenz terminiert, bevor sich das dreiblättrige sympodiale Muster etabliert. Die Ausbildung von Infloreszenzen bedeutet in der Tomate im Gegensatz zu Arabidopsis die Termination des vegetativen Apikalmeristems.

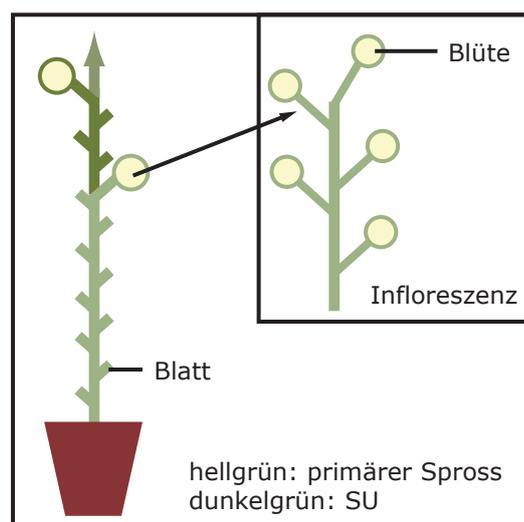


Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung des Sprosses der Tomate inkl. Infloreszenzen (SU - *sympodial unit*)

Bei der Ausbildung der Infloreszenzen schwillt das SAM beim Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum an und wandelt sich in ein Infloreszenzmeristem (IM) um. Das IM wiederum teilt sich in zwei Teile, wovon das eine zum Blütenmeristem (BM) umgewandelt wird und das andere als IM erhalten bleibt. Die Teilung des IM wiederholt sich zur Bildung jeder zusätzlichen Blüte, wodurch sich eine Zick-Zack-Anordnung der Blüten ergibt (Abb. 1.3). Die Infloreszenzen werden terminiert durch die Ausbildung einer letzten Blüte. Die Infloreszenzen können als kondensierte Sprosse angesehen werden, die aus sympodialen Einheiten mit einem Nodium bestehen (CRONQUIST 1988; SZYMKOWIAK & IRISH 2006). Verschiedene Tomaten-Mutanten wie *falsiflora*, *jointless*, *blind*, *single flower truss* oder *uniflora* machen deutlich, dass Infloreszenzen

in der Lage sind sympodiale Sprosse zu bilden, bei denen die einzelnen Blüten größere Abstände voneinander haben oder durch Blätter ersetzt sind (LIFSCHITZ & ESHED 2006; SZYMKOWIAK & IRISH 2006). Da Termination gleichgesetzt werden kann mit der Ausbildung von Infloreszenzen bzw. Blüten und sowohl Spross als auch Infloreszenzen sympodiales Wachstum zeigen, führen Mutationen, die den Blühzeitpunkt verändern, oft zu einer veränderten Spross- und Infloreszenz-Architektur (LIFSCHITZ & ESHED 2006). *SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)* und *SELF PRUNING (SP)* sind die bekanntesten Tomaten-Gene, die den Blühzeitpunkt und die Spross- und Infloreszenz-Architektur beeinflussen (MOLINERO-ROSALES *et al.* 2004; LIFSCHITZ *et al.* 2006; PNUELI *et al.* 1998).

1.3.2 SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)

SFT der Tomate ist *FT* aus Arabidopsis homolog und induziert systemische Signale, die das Wachstum und Blühen regulieren (LIFSCHITZ *et al.* 2006). *sft*-Pflanzen blühen später als der Wildtyp. Der primäre Spross wird erst nach 15-20 Blättern durch die Ausbildung einer Infloreszenz terminiert. Das erste Organ dieser Infloreszenz ist meist eine Blüte, wobei die Infloreszenz nicht terminiert ist und Blätter statt weiterer Blüten ausgebildet werden (MOLINERO-ROSALES *et al.* 2004). Des Weiteren wird diese Infloreszenz selbst zum Hauptspross, der von einer Infloreszenz mit einer oder zwei Blüten terminiert wird. In *sft*-Mutanten ist das Gleichgewicht zwischen vegetativem und reproduktivem Wachstum zu Gunsten des reproduktiven Wachstums verschoben. Die Expression von *SFT* unter Kontrolle eines Blatt-spezifischen Promotors in Arabidopsis und Tabak zeigte, dass *SFT* ein mobiles, universelles Blühinduktionssignal in Blättern generiert (LIFSCHITZ *et al.* 2006).

1.3.3 SELF PRUNING (SP)

SP, das Tomaten-Homologe von *TFL1* und *CEN*, fördert den nicht-terminierten Zustand der Apikalmeristeme (PNUELI *et al.* 1998). *sp*-Mutanten zeigen im Gegensatz zu Wildtyp-Pflanzen determiniertes Wachstum. Je älter die Pflanze wird, umso geringer wird die Anzahl der Blätter pro SU bis die letzte SU eine Infloreszenz ausbildet und der Spross endgültig durch zwei aufeinanderfolgende Infloreszenzen terminiert wird (PNUELI *et al.* 1998). *SP* erhält die 3-blättrigen SUs durch Inhibierung einer frühzeitigen Terminierung des sympodialen Apikalmeristems (PNUELI *et al.* 1998).

SP und *SFT* gehören zur selben Proteinfamilie und nur wenige AS bestimmen den fördernden oder inhibierenden Effekt auf die Blühinduktion (HANZAWA *et al.* 2005; AHN *et al.* 2006). *SP* und *SFT* sind jedoch nicht bloße Antagonisten, vielmehr reguliert das

Verhältnis beider den Zeitpunkt der Termination des Sprosses und der Ausbildung der Infloreszenzen (LIFSCHITZ & ESHED 2006). Über den genauen Ablauf und die molekularen Komponenten dieses Signalweges und die Beteiligung von Phytohormonen ist in Tomate bislang nur wenig bekannt.

1.3.4 Mutanten mit Veränderungen der Infloreszenz-Architektur

In Tabelle 1.2 (Seite 33) sind Tomaten-Mutanten mit veränderter Infloreszenz-Architektur zusammengefasst. Häufig gehen diese Veränderungen mit einer Veränderung des Blühzeitpunktes einher. Über die genaue Regulation der einzelnen Gene und die Gene selbst ist wenig bekannt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Bislang ist noch wenig über die Funktion der verschiedenen JA-Metabolite bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Bedeutung von 12-OH-JA näher untersucht werden. Die bisher einzige, belegte Funktion von 12-OH-JA ist die Induktion der Knollenbildung der Kartoffel (YOSHIHARA *et al.* 1989). Zu Beginn dieser Arbeit wurde eine Beteiligung von 12-OH-JA an der photoperiodisch regulierten Blühinduktion von *Arabidopsis* postuliert (GIDDA 2001). Des Weiteren zeigten transgene Tabak-Pflanzen mit einem veränderten 12-OH-JA-Metabolismus Veränderungen der Blütenmorphologie (VARIN *et al.* 2003). Es sollte daher primär die Bedeutung von 12-OH-JA für die Blütenentwicklung einer Tag-neutralen Pflanze wie Tomate aufgeklärt werden. Für Tomate standen eine Reihe von transgenen Linien und Mutanten mit gestörter JA-Biosynthese, sowie gestörter JA-Signaltransduktion zur Verfügung. Die Untersuchungen zur Funktion von 12-OH-JA in *Arabidopsis* werden im Rahmen eines anderen Forschungsprojektes innerhalb der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Für die Funktionsanalyse von 12-OH-JA in Tomate wurden verschiedene Ansätze gewählt:

Zuerst wurde das natürliche Vorkommen von 12-OH-JA, sowie seiner Metabolite 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA untersucht. Dem folgte die Frage, ob alle drei Verbindungen während der Wundantwort akkumulieren und ob ihre Bildung JA-abhängig erfolgt.

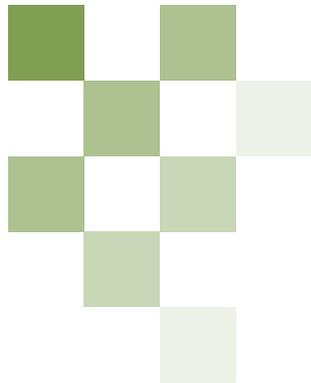
Die Frage nach der biologischen Aktivität oder Inaktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA wurde durch Analysen JA-vermittelter Prozesse, wie die Expression JA-

responsiver Gene, die Keimung oder das Wurzelwachstum, untersucht. Dies erfolgte durch Applikationsexperimente.

Da Applikationen nur bedingt die Wirkungen von 12-OH-JA und seinen Metaboliten auf die bzw. in der Pflanze wiedergeben, wurde ebenfalls ein Ansatz zur Modulation des endogenen 12-OH-JA-Gehaltes verfolgt. Das Enzym, das die Reaktion von JA zu 12-OH-JA katalysiert, ist nicht bekannt, wohl aber die bereits oben beschriebene ST2a aus Arabidopsis, die die Sulfatierung von 12-OH-JA katalysiert (GIDDA *et al.* 2003). Zur Modulation des endogenen 12-OH-JA-Gehaltes sollte die Menge des entsprechenden Enzyms aus Tomate verändert werden. Ein *loss of function*-Ansatz sollte die 12-OH-JA-Menge erhöhen und ein *gain of function*-Ansatz sollte sie verringern. Phänotypische Veränderungen der entsprechenden transgenen Pflanzen sollten Hinweise darauf geben, an welchen Prozessen 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA beteiligt sind. Es sollte daher die Identifizierung und Charakterisierung putativer 12-OH-JA-STs aus Tomate erfolgen sowie die Generierung und phänotypische Charakterisierung transgener *loss* und *gain of function* Pflanzen. Zusätzlich erfolgte die heterologe Überexpression der *AtST2a* in Tomate. Dies ermöglichte einen Vergleich zwischen homologer und heterologer Überexpression und sollte Hinweise für mögliche post-translationale Modifikationen der 12-OH-JA-ST aus Tomate liefern. Darüberhinaus wurden die oben beschriebenen *35S::AtST2a-sense*-Tabak-Pflanzen eingehender untersucht. Dies erlaubte einen Vergleich von Tomate und Tabak in Bezug auf die 12-OH-JA-Funktion.

Mutante	Gen	Gen-Funktion	Arabidospis-Homolog	Blühzeitpunkt	Infloreszenzen	Blätter pro SU	Referenz (Bsp.)
<i>self pruning (sp)</i>	<i>SP</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>TFL1</i>	normal	vegetative Infloreszenzen	3-0	PNUELI <i>et al.</i> 1998
<i>single flower truss (sft)</i>	<i>SFT</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>FT</i>	verzögert	vegetative Infloreszenzen, reduzierte Blütenzahl	8-10	LIFSCHITZ <i>et al.</i> 2006
<i>jointless (j)</i>	<i>J</i>	Regulation der IM-Identität	unbekannt	leicht verzögert	Reversion zu vegetativen Sprossen	3	SZYMKOWIAK & IRISH 2006
<i>falsiflora (fa)</i>	<i>FA</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>LEAFY</i>	verzögert	stark verzweigte Infloreszenzen, Blätter anstelle von Blüten	3-4	MOLINERO-ROSALES <i>et al.</i> 2004
<i>blind (bl)</i>	<i>BL</i>	Kontrolle der LM-Bildung	<i>BLIND</i>	verzögert	1-2 Blüten pro Infloreszenz	5-10	SCHMITZ <i>et al.</i> 2002
<i>compound inflorescence (s)</i>	unbekannt	Regulation der BM-Identität	unbekannt	verzögert	stark verzweigte Infloreszenzen	3	QUINET <i>et al.</i> 2006
<i>anantha (an)</i>	unbekannt	Regulation der BM-Proliferation	unbekannt	normal	blumenkohlartig, steril	3	ALLEN & SUSSEX 1996
<i>uniflora (uf)</i>	unbekannt	Regulation der IM-Identität und des Blühzeitpunktes	unbekannt	stark verzögert	einzelne Blüten	5-10	DIELEN <i>et al.</i> 2004

Tab. 1.2: Mutanten von Tomate mit gestörter Spross-Termination oder veränderten Infloreszenzen



2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Falls nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologischen Reagenzien von folgenden Herstellern bezogen:

Farbstoffe: Roth und Serva

Laborchemikalien und Lösungsmittel: Biorad, GibcoBRL, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich

DNA- und Protein-Marker: MBI Fermentas, Eurogentec

Nährmedien, Antibiotika und Phytohormone: Duchefa, Sigma-Aldrich

Oligonukleotide: MWG-Biotech

Radioaktiv-markierte Substanzen: ICN

Restriktionsenzyme: MBI Fermentas

Weitere Enzyme (wie in den Protokollen angegeben): MBI Fermentas, Invitrogen, Roche, Sigma-Aldrich und TaKaRa

SYBR Green PCR Master Mix: Applied Biosystems

pDrive-Klonierungs-Kit: Qiagen

Hexanukleotid-Labeling Kit: MBI Fermentas

2.1.2 Verwendete Software und Datenbanken

Datenbanken und Sequenzbearbeitung:

NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

TAIR (The Arabidopsis Information Resource; <http://www.arabidopsis.org>)

Genevestigator (Zimmermann et al., 2004; <https://www.genevestigator.ethz.ch>)

TGI (The Gene Index Project; <http://tigrblast.tigr.org/tgi/>)

SGN (Sol Genomics Network; <http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>)

Chromas 2.01 (Technelysium Pty Ltd)

DNA-Club

Online-Software/ Web-Tools:

ClustAlw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>)

pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)

CBS Prediction Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)

qPCR:

Primer-Design - PrimerExpress 2.0 (Applied Biosystems)
Auswertung – MxPro Software (Stratagene)

Daten- und Bildbearbeitung:

Microsoft Office (Microsoft)
Adobe Photoshop (Adobe)
Adobe Illustrator (Adobe)
Statistica 6.0 (StatSoft)
Phosphoimaging-Systems (Molecular Dynamics)

2.1.3 Pflanzenmaterial**Tomate (*Solanum lycopersicum*):**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ehemalige Abkürzung *Le* für *Lycopersicon esculentum* verwendet.

Wildtypen: *cv.* Lukullus und *cv.* Castlemart

Mutanten: *acx1* (*cv.* Castlemart; Li *et al.* 2005) und
jai1 (*cv.* Castlemart; Li *et al.* 2004a)

wurden von Gregg A. Howe (University of Michigan, USA)
zur Verfügung gestellt

Transgene Pflanzen: *35S::AtST2a-sense*, *35S::LeST2a-sense* und *35S::LeST2a-antisense*
(*cv.* Lukullus; wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert)

Tabak (*Nicotiana tabacum*):

Wildtyp: *cv.* Samsun (SNN)

Transgene Pflanzen: *35S::AtST2a-sense* (VARIN *et al.* 2003)

2.1.4 Bakterienstämme

Vermehrung von Plasmiden in *E.coli*: DH5 α

Überexpression der *AtST2a*, *LeST2a* und *LeST6* in *E.coli*: M15 (pREP4), XL1-blue, BL21

Agrobacterium tumefaciens zur stabilen Transformation von Tomate: GV3101

2.1.5 Vektoren

Klonierung von DNA-Fragmenten: pDrive (Qiagen PCR Cloning Kit, Qiagen)

Überexpression der *AtST2a*, *LeST2a* und *LeST6* in *E.coli*: pQE30 (Qiagen)

Stabile Transformation von Tomate: pBI-101-526 (DALTA *et al.* 1993; GIDDA 2001)

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Pflanzenanzucht

Alle verwendeten Tomaten- und Tabak-Samen wurden auf Erde ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert [16 Stunden Licht (Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung; 25 °C), 8 Stunden Dunkelheit (22 °C), 65 % Luftfeuchte].

Für die stabile Transformation von Tomate, sowie für die Untersuchung der Keimung und des Wurzelwachstums von Tomate erfolgte die sterile Kultivierung. Oberflächens-sterilisierte Samen wurden auf Murashige-Skoog-Medium [0,44 % (w/v) MS-Salze (inkl. Vitamine, Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose, 0,6 % (w/v) Plant Agar, pH 5,8] ausgelegt. Zur Selektion Kanamycin-resistenter transgener Pflanzen wurden dem Medium 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt. Für die Untersuchung der Keimung und des Wurzelwachstums wurden die ausgesäten Samen für 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C, 3 Tage im Dunkeln bei 23 °C und weiter im Dauerlicht bei 23 °C kultiviert.

2.2.2 Kultivierung und Transformation von *E.coli*

E.coli-Bakterienstämme wurden in LB-Flüssig-Medium bzw. auf LB-Agar-Platten kultiviert (SAMBROOK *et al.* 1989). Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 0,1-3 µg Plasmid-DNA mit 200 µl kompetenten Zellen vermischt. Der Ansatz wurde 25 Minuten auf Eis, 30 Sekunden bei 42 °C und 5 Minuten auf Eis inkubiert (M15-Zellen: 90 Sekunden bei 42 °C). Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium (SAMBROOK *et al.* 1989) wurden die Zellen 45 Minuten (M15-Zellen: 90 Minuten) bei 37 °C geschüttelt und anschließend ausplattiert.

Selektion:

- pDrive – 100 µg/ml Carbenicillin und 50 µg/ml Kanamycin; 50 µM IPTG und 80 µg/ml X-Gal (blau/weiss-Selektion)
- pQE30 – 100 µg/ml Carbenicillin
- pREP4 – 25 µg/ml Kanamycin

2.2.3 Kultivierung und Transformation von *A. tumefaciens*

A. tumefaciens wurde in YEB-Flüssig-Medium [0,1 % (w/v) Hefeextrakt, 0,5 % (w/v) Fleischextrakt, 0,5 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Saccharose, 2 mM MgSO₄, 100 µg/ml Rifampicin] bzw. auf YEB-Agar-Platten [YEB-Medium, 1,5 % (w/v) Micro Agar] kultiviert. Die Selektion nach Transformation mit pBI-101-526 erfolgte durch 50 µg/ml Kanamycin. Zur Transformation wurde 0,1-3 µg Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten Zellen vermischt. Der Ansatz wurde für jeweils 5 Minuten auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Flüssig-Medium wurden die Zellen für 3 Stunden bei 28 °C geschüttelt, ausplattiert und anschließend für 3 Tage bei 28 °C inkubiert.

2.2.4 DNA-Analytik

2.2.4.1 Agarosegel-Elektrophorese

DNA-Proben wurden mit 6x Orange Loading Dye (Fermentas) versetzt und im Agarosegel [1-2 % Agarose, 0,5 g/l Ethidium-Bromid (EtBr) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 10 mM EDTA (pH 8,0), 0,115% (v/v) Eisessig)] elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: 1x TAE). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

2.2.4.2 Isolierung pflanzlicher genomischer DNA (gDNA)

Schnell-Extraktion für den PCR-Test transgener Pflanzen: Die Extraktion von gDNA erfolgte durch alkalische Lyse in 50 µl Gesamt-Volumen nach KLIMYUK *et al.* (1993). Für eine anschließende PCR-Reaktion wurden 2 µl gDNA eingesetzt.

Extraktion für Genome Walking: Die Isolierung hochmolekularer gDNA erfolgte mit dem Plant DNAzol Reagent (Invitrogen) laut Herstellerangaben.

2.2.4.3 Plasmid-Präparation

E. coli: Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (SAMBROOK *et al.* 1989). Für die Isolierung von Plasmid-DNA zur Sequenzierung wurden 2 ml üN-Kultur mit dem Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet.

A.tumefaciens: Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *A.tumefaciens* erfolgte ebenfalls durch alkalische Lyse (vgl. oben). Für weitere Analysen wie Restriktionen oder Sequenzierung wurde die gewonnene Plasmid-DNA in *E.coli* (DH5 α) retransformiert, vermehrt und wieder isoliert.

2.2.4.4 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, unter Verwendung rekombinanter Taq-Polymerase (hergestellt nach ENGELKE *et al.* 1990).

Reaktionsansatz: 2 μ l DNA, 2,5 μ l 10xPCR-Puffer [500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 9,0), 1 % (v/v) Triton X-100], 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM dNTPs, 5 U rekombinante Taq-Polymerase, je 0,5 μ M Primer, ad 25 μ l H₂O

PCR-Programm:

2 min	95 °C (initiale Denaturierung)	} 30-40 Zyklen
2 min	95 °C (Denaturierung)	
30 sec	T _m (Annealing)	
1 min/ kb	72 °C (Elongation)	
10 min	72 °C (finale Elongation)	

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung erfolgte unter Verwendung der Ex-Taq-Polymerase (TaKaRa) nach Herstellerangaben.

Verwendete Primer (inkl. Schmelztemperaturen) sind im Anhang zu finden.

2.2.4.5 Sequenzierung

Entsprechend gereinigte Plasmid-DNA (vgl. 2.2.4.3) wurde photometrisch quantifiziert und durch die zentrale Sequenzierereinrichtung des Instituts unter Nutzung fluoreszenzmarkierter Primer sequenziert.

Verwendete Primer:

- pDrive – M13 forward (-40) und M13 reverse
- pQE30 – Type III/IV forward und reverse

2.2.4.6 Genome Walking

Das *Genome Walking* wurde mit einigen Modifikationen nach dem BD GenomeWalker Universal Kit User Manual (BD Biosciences Clontech) durchgeführt. Hochmolekulare gDNA wurde wie oben beschrieben aus Blattmaterial von Tomate isoliert (vgl. 2.2.4.2) und mit den *blunt-end-cutting* Restriktionsenzymen *EcoRV* oder *DraI* (MBI Fermentas) verdaut. Die Ligation der Adapter (MWG) erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) nach Herstellerangaben. Der Ligationsansatz wurde 1:10-verdünnt als Template für die erste PCR eingesetzt. Dieser Ansatz wurde 1:25-verdünnt in der 2. PCR eingesetzt. Beide PCR-Reaktionen wurden mit dem Long-PCR-Enzyme-Mix von Fermentas durchgeführt:

Reaktionsansatz	PCR-Programm	
2 µl DNA	2 min 94 °C	
5 µl PCR-Puffer [10x]	25 sec 94 °C	
1 µl dNTPs [je 10 mM]	3 min 72 °C	} 7 Zyklen
2,5 µl genspez. Primer [10 µM]	25 sec 94 °C	
2,5 µl GW_AP1 bzw. GW_AP2 [10 µM]	3 min (+1 sec/Zyklus) 67 °C	} 32 Zyklen
0,4 µl Taq-Mix [5U/µl]	10 min 67 °C	
ad 50 µl H ₂ O		

Es wurde jeweils ein Adapter-spezifischer Primer (GW_AP1 bzw. GW_AP2) und ein genspezifischer Primer eingesetzt (Primersequenzen siehe Anhang). Die amplifizierten Fragmente wurden in den Vektor pDrive (Qiagen) laut Herstellerprotokoll ligiert, in DH5 α -Zellen transformiert (vgl. 2.2.2) und vermehrt. Isolierte Plasmid-DNA (2.2.4.3) wurde sequenziert. Pro Fragment wurden mindestens 4 unabhängige Klone sequenziert.

2.2.4.7 Restriktionsanalysen und Fragment-Reinigung

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von MBI Fermentas bezogen und nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Inkubationszeit bei 37 °C wurde allerdings auf 4 bis 20 Stunden verlängert. Verdaute DNA wurde im 1-2 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (vgl. 2.2.4.1). Eventuell erforderliche Fragment-Isolierung bzw. Fragment-Reinigung erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) laut Herstellerprotokoll.

2.2.5 Klonierungsstrategien zur Überexpression der *AST-IV*, *AtST2a*, *LeST2a* und *LeST6* in *E.coli* und Tomate

2.2.5.1 Klonierung der *AST-IV*, *LeST2a* und *LeST6*

Aus Tomaten-Blüten isolierte RNA bzw. kommerziell erworbene RNA aus Ratten-Leber wurde durch reverse Transkription unter Verwendung der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) laut Herstellerprotokoll in cDNA umgeschrieben. *LeST2a* und *LeST6*-DNA-Fragmente wurden per PCR unter Verwendung spezifischer Primer (vgl. Anhang) aus Blüten-cDNA amplifiziert, die *AST-IV* (Aryl-ST-IV) aus der Ratten-cDNA. Dabei wurde der *forward*-Primer jeweils so gewählt, dass am 5'-Ende eine *Bam*HI-Schnittstelle eingefügt wurde. Die so gewonnenen Fragmente wurden in den Vektor pDrive (Qiagen) nach Herstellerangaben ligiert. Die Ligationzeit wurde jedoch auf 16 Stunden erhöht. Es erfolgte die Transformation und Vermehrung in *E.coli* DH5 α -Zellen. Die Insertion wurde mittels Restriktion mit *Bam*HI und Sequenzierung überprüft.

2.2.5.2 Klonierung der *AST-IV*, *AtST2a*, *LeST2a* und *LeST6* in den Überexpressionsvektor pQE30

Die *AST-IV*-, *LeST2a*- und *LeST6*-DNA-Fragmente wurden durch Restriktion mit *Bam*HI aus dem Vektor pDrive geschnitten und gereinigt (vgl. 2.2.5.1). Die *AtST2a*-Sequenz wurde aus dem binären Vektor pBI-101-526 (DALTA *et al.* 1993), der verwendet wurde, um die *AtST2a* in Arabidopsis und Tabak zu überexprimieren (Abb. 2.1; GIDDA 2001; VARIN *et al.* 2003) mit *Bam*HI ausgeschnitten und anschließend gereinigt. Unter Verwendung der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) wurden die *AST-IV*-, *AtST2a*-, *LeST2a*- und *LeST6*-Fragmente nach Herstellerprotokoll in den Vektor pQE30 (zuvor geschnitten mit *Bam*HI) ligiert. Die Ligationzeit wurde allerdings auf 16 Stunden verlängert. Die Insertion und Orientierung der Insertion wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

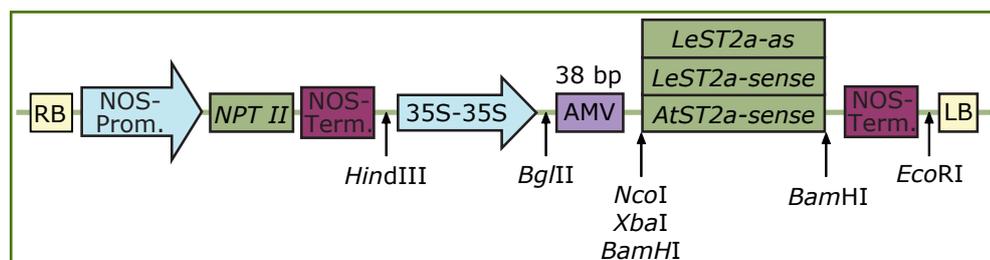


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der T-DNA des binären Vektors pBI-101-526, der zur stabilen Transformation von Tomaten eingesetzt wurde (Prom. - Promotor; Term. - Terminator; LB/RB - left/ right border).

2.2.5.3 Klonierung der *LeST2a* in den binären Vektor pBI-101-526 in *sense*- und *antisense*-Orientierung

Die *LeST2a*-Sequenz wurde durch Restriktion mit *Bam*HI aus dem Vektor pDrive ausgeschnitten (vgl. 2.2.5.1) und nach Entfernen der *AtST2a*-Sequenz aus dem binären Vektor pBI-101-526 (vgl. 2.2.5.2) in diesen Vektor ligiert (Abb. 2.1). Es wurde die T4-DNA-Ligase laut Herstellerprotokoll verwendet, wobei die Ligationszeit erneut auf 16 Stunden verlängert wurde. Da die Klonierung ungerichtet verlief, wurde die *LeST2a* sowohl in *sense*- als auch in *antisense*-Orientierung, was durch Sequenzierung überprüft wurde, in den binären Vektor ligiert.

2.2.6 RNA-Analytik

2.2.6.1 RNA-Isolierung aus Tomate und Tabak

RNA-Isolierung für Northern Blot-Analysen: Circa 1 g gemörstertes Pflanzenmaterial wurde in 8 ml Extraktionspuffer [4 M Guanidinthiocyanat, 50 mM Na-Citrat (pH 4,0), 0,5 % (w/v) N-Lauroyl-Sarcosin, 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol], 8 ml Phenol und 4 ml Chloroform resuspendiert und für 15 Minuten geschüttelt. Die Proben wurden für 10 min bei 4 °C und 4000xg zentrifugiert. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase mit 0,75 Vol Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 4000xg) pelletiert, mit 75 % (v/v) EtOH gewaschen, getrocknet und anschließend in 500 μ l RNase-freiem Wasser (mit 12 U RNaseOUT, Invitrogen) gelöst.

RNA-Isolierung für Transkriptanalysen per semiquantitativer Real time-RT-PCR (qPCR): Gesamt-RNA wurde aus 0,1 g homogenisiertem Pflanzenmaterial unter Verwendung von TRIzol Reagent (Invitrogen) nach modifiziertem Hersteller-Protokoll isoliert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die RNA durch Zugabe von 300 μ l 0,8 M Na-Citrat/ 1,2 M NaCl und 300 μ l Isopropanol aus der wässrigen Phase gefällt. Das RNA-Pellet wurde 2mal mit 75% (v/v) EtOH gewaschen und in 25 μ l RNase-freiem Wasser gelöst.

2.2.6.2 Northern Blot-Analysen

RNA-Elektrophorese und Blotting: Extrahierte Gesamt-RNA (vgl. 2.2.6.1) wurde photometrisch quantifiziert. 10 μ g RNA wurden unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde dazu mit 20 μ l Denaturierungspuffer

[10 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,5), 50 % (v/v) Formamid, 2,2 M Formaldehyd, 10 mM EDTA (pH 8,0)] versetzt, 15 Minuten bei 65 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 5 µl Ladepuffer [0,5 % (w/v) SDS, 25 % (v/v) Glycerin, 0,025 % (w/v) Bromphenolblau, 25 mM EDTA (pH 8,0), 0,5 g/ml EtBr] versetzt. Die so vorbereiteten RNA-Proben wurden im denaturierenden Agarosegel [1,5 % Agarose in RNA-Laufpuffer (10 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6,5), 3,7 % (v/v) Formaldehyd)] elektrophoretisch aufgetrennt. Danach erfolgte der Transfer auf eine Nylon-Membran (Schleicher&Schuell) mittels Kapillar-Blot unter Verwendung von 20x SSC [3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat (pH 7,0)]. Die Fixierung erfolgte durch UV-*cross-linking*.

Herstellung radioaktiv-markierter DNA-Sonden: Als Templates für die Sonden-Herstellung dienten klonierte DNA-Fragmente, die aus den entsprechenden Vektoren durch Restriktionsverdau ausgeschnitten und durch Gelextraktion gereinigt wurden. Die Klonierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit bzw. durch Dr. Irene Stenzel innerhalb der Arbeitsgruppe. Eine Liste der verwendeten Sonden, sowie der jeweiligen Vektoren und Restriktionsenzyme findet sich im Anhang dieser Arbeit. Die Herstellung der Sonden erfolgte mit dem Megaprime DNA Labelling Kit (MBI Fermentas) nach Herstellerangaben unter Verwendung von [α -³²P]-dATP.

Hybridisierung und Detektion: Nach Prähybridisierung der Membran für mindestens 3 Stunden bei 60 °C in ExpressHyb-Hybridisierungslösung (Clontech) erfolgte die Zugabe der radioaktiv-markierten, denaturierten DNA-Sonden und die Inkubation für mindestens 4 Stunden bei 60 °C. Anschließend wurde die Membran wie folgt bei 60 °C gewaschen: 30 Minuten mit 2x SSC/0,1 % (w/v) SDS, 30 Minuten mit 1x SSC/0,1 % (w/v) SDS, 20 Minuten mit 0,5x SSC/0,1 % (w/v) SDS. Die Detektion erfolgte durch Nutzung eines Phosphoimaging-Systems (Molecular Dynamics) am Storm 860 Scanner (Molecular Dynamics).

2.2.6.3 Semiquantitative Real Time RT-PCR (qPCR)

RNA-Quantifizierung und Überprüfung der Qualität: Isolierte Gesamt-RNA (vgl. 2.2.6.1) wurde photometrisch quantifiziert. Die Qualität der RNA wurde durch Agarosegel-Elektrophorese unter nativen Bedingungen überprüft. 1-2 µg Gesamt-RNA wurden dafür wie zur denaturierenden Gelelektrophorese vorbereitet (vgl. 2.2.6.2) und in einem 1,5 % nativen Agarosegel aufgetrennt (vgl. 2.2.4.1).

DNase-Verdau: Zur Entfernung eventueller DNA-Kontaminationen wurde die isolierte Gesamt-RNA vor cDNA-Synthese mit DNase I (Roche) behandelt:

5 µg RNA
1 µl 10x DNaseI-Puffer (Roche)
10 U rekombinante DNaseI (Roche)
15 Minuten bei 37 °C
2 µl 50 mM EDTA, pH 8.0
10 Minuten bei 72 °C

Die Integrität der RNA wurde nach dem DNase-Verdau nochmals durch native Gelelektrophorese (vgl. oben) untersucht. 20 ng verdaute RNA wurden per Real Time PCR unter Verwendung von *LeEF1a*- bzw. *NtRPS6*-spezifischen Primern amplifiziert, um Kontaminationen mit DNA auszuschließen.

cDNA-Synthese: Die cDNA-Synthese erfolgte mit der SuperScriptIII reversen Transkriptase (Invitrogen). Das Herstellerprotokoll wurde dabei einer geringeren RNA-Menge angepasst:

9,5 µl RNA (DNaseI-behandelt)
0,5 µl Oligo-(dT) ₁₈ -Primer [100 µM]
0,5 µl dNTPs [je 10 mM]
ad 13,5 µl H ₂ O (RNase-frei)
5 Minuten bei 65 °C
auf Eis
4 µl first strand buffer [5x] (Invitrogen)
1 µl DTT [100 mM]
0,5 µl RNaseOUT (Invitrogen)
1 µl SuperScriptIII reverse Transkriptase (Invitrogen)
60 Minuten bei 50 °C
15 Minuten bei 70 °C
auf Eis

qPCR: Die PCR wurde im Thermocycler Mx3005P (Stratagene) unter Verwendung des Power SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems) durchgeführt (verwendete Primer: siehe Anhang):

Reaktionsansatz (10 µl):	PCR-Programm:
20 ng cDNA	10 min 95 °C
0,025 µM Primer-Mix	30 sec 95 °C
5 µl Power SYBR Green	1 min 60 °C
PCR Mastermix	30 sec 72 °C
	1 min 95 °C
	30 sec 60 °C
	30 sec 95 °C
	Dissoziationsprotokoll: 60 - 95 °C

One Step-qPCR: One Step-qPCR erfolgte mit 20 ng DNaseI-verdauter RNA und dem FullVelocity SYBR Green QRT-PCR Master Mix (Stratagene) laut Herstellerprotokoll.

Auswertung: Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der Software MxPro QPCR (Stratagene). Der PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz über Hintergrundniveau ansteigt wird als Ct-Wert beschrieben. Er ist umso größer, je weniger cDNA im Ansatz vorhanden ist. Die Bestimmung der relativen Transkriptmengen erfolgte über Normalisierung mit den Transkriptmengen eines konstitutiv exprimierten Gens. So ergibt sich der Δ Ct-Wert einer Probe für ein bestimmtes Gen aus der Differenz des Ct-Wertes für dieses Gen und dem Ct-Wert des konstitutiv exprimierten Kontroll-Gens *LeEF1a* bzw. *NtRPS6*. Der $\Delta\Delta$ Ct-Wert ist die Differenz aus dem Δ Ct-Wert einer Verwundung/ Applikation/transgenen Pflanze und dem Δ Ct-Wert der entsprechenden Frisch-/Wasser-/Wildtyp-Kontrolle. Unterschiede kleiner als 2 Zyklen wurden als nicht relevant betrachtet.

2.2.7 Proteinbiochemische Methoden

2.2.7.1 Überexpression in *E.coli* und Reinigung der AST-IV, AtST2a, LeST2a und LeST6

Die Überexpression und Reinigung der AtST2a und LeST2a erfolgte zunächst nach GIDDA *et al.* (2003). Dieses Protokoll wurde wie folgt modifiziert:

- (1) *E.coli*-Stamm: M15 und BL21
- (2) IPTG-Konzentration: 0,5 bis 4 mM IPTG
- (3) Inkubationstemperatur und -dauer: 4 Stunden bei 37 °C, 16 Stunden bei 18 und 25°C, 20 Stunden bei 4 °C
- (4) Puffer-System: 25, 50 oder 100 mM Tris-Puffer pH 7,0 (anstelle eines Na-Phosphatpuffers)

Überexpression und Reinigung der AST-IV, AtST2a, LeST2a und LeST6 erfolgte für die Aktivitätsbestimmung im gekoppelten Test nach BURKART & WONG (1999). Die Inkubation des an die Nickel-Agarose-gebundenen Proteins mit Alkalischer Phosphatase ist nur für die AST-IV notwendig und wurde für die anderen STs nicht durchgeführt.

2.2.7.2 SDS-PAGE und Coomassie-Färbung

Die Protein-Proben wurden mit 2x Proteinladepuffer [140 mM Tris-HCl (pH 7,8), 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 200 mM DTT, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau] versetzt,

5 Minuten bei 95 °C denaturiert und in 12 %igen SDS-Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS). Die Gele wurden mit Coomassie-Färbelösung [10 % (v/v) Essigsäure, 40 % (v/v) MeOH, 50 % (v/v) H₂O, 0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250] gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärber [10 % (v/v) Essigsäure, 30 % (v/v) MeOH, 60 % (v/v) H₂O] entfärbt.

2.2.7.3 Nachweis der Enzymaktivität

Nachweis der Aktivität im einfachem Enzym-Assay: Der einfache Enzym-Assay wurde für die AtST2a und LeST2a nach GIDDA *et al.* (2003) durchgeführt. 50 µl Reaktionsansatz enthielten 0,2 bis 1 µg rekombinantes, gereinigtes Protein, 1 µM PAPS (nicht radioaktiv-markiert) und 1 µg 12-OH-JA (nicht markiert oder ¹⁴C-markiert) in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5). Der Ansatz wurde für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert und der Nachweis des Umsatzes erfolgte zum einen per DC und zum anderen per LC-MS/MS. Da der Nachweis der Enzym-Aktivität nicht gelang, wurde der Assay modifiziert:

- (1) Die Substrat-Konzentrationen wurden variiert und die Protein-Menge erhöht,
- (2) es wurde Rohextrakt anstelle von gereinigtem Protein eingesetzt,
- (3) der pH wurde zwischen 6 und 8 variiert,
- (4) das Puffer-System wurde gewechselt (von Tris-Puffer zu Na-Phosphat-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen und pH-Werten),
- (5) verschiedene Zusätze wurden eingesetzt (100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5 mM Mg²⁺, 5 mM Mn²⁺ oder 1 mM DTT).

Nachweis der Aktivität im gekoppelten Test: Der gekoppelte Enzym-Test wurde für die AtST2a, LeST2a und LeST6 durchgeführt nach BURKART & WONG (1999). Zur Überprüfung der Aktivität der AST-IV sowie zur Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden 2 mM *p*-Nitrophenylsulfat (*p*-NPS), 20 µM PAP und 2 bis 40 µg rekombinante, gereinigte AST-IV in ST-Puffer [100 mM bis-Tris-Propan (pH 7,0), 5 mM β-Mercaptoethanol] für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 400 nm verfolgt ($\epsilon_{p\text{-NPS}} = 10500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Es ergab sich eine spezifische Aktivität von rund 0,1 U/ mg Protein, wobei eine Unit definiert ist als die Menge Enzym, die 1 µmol Substrat in einer Minute umsetzt. Um sicherzustellen, dass die AST-IV 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA nicht umsetzt, wurde der Aktivitätstest auch mit 12-OH-JA und PAPS, bzw. 12-HSO₄-JA und PAP durchgeführt. Für den Nachweis der Aktivität der ATST2a, LeST2a und LeST6 wurden 40 µg rekombinante, gereinigte AST-IV (=4 mU), 20 µM PAPS, 2 mM *p*-NPS in ST-Puffer für 30 Minuten bei RT inkubiert um die Verunreinigung von PAPS mit PAP zu beseitigen. Darauf folgte die Zugabe von 20 µM 12-OH-JA und:

- (1) 100 mM Tris-HCl (pH 7.6; Negativ-Kontrolle),
- (2) weiteren 40 µg AST-IV (Negativ-Kontrolle),
- (3) Hitze-denaturierte Proteine (Negativ-Kontrolle) oder
- (4) 100 µg rekombinante, gereinigte AtST2a, LeST2a bzw. LeST6.

Der Reaktionsansatz (= 800 µl) wurde weitere 60 Minuten bei RT inkubiert. Der Umsatz wurde photometrisch bei 400 nm verfolgt.

2.2.8 Stabile Transformation von Tomate durch *A. tumefaciens* vermittelten Gentransfer

Aussaat und Präparation der Kotyledonen: Oberflächen-sterilisierte Tomaten-Samen (WT Lukullus) wurden auf MS-Medium ausgesät (vgl. 2.2.1). Es folgte die Inkubation für 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C, weitere 14 Tage im Dunkeln bei 23 °C. Die Kotyledonen wurden präpariert, indem Blattspitze und Blattbasis entfernt und sie einmal quer über die Mittelvene eingeritzt wurden. Die Kotyledonen wurden mit der Oberseite nach unten auf Konditionierungsmedium [0,44 % MS-Salze (inkl. Vitamine, Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose, 1 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 0,6 % (w/v) Plant Agar, pH 5,8] überführt und für 3 Tage im Dunkeln bei 23 °C inkubiert.

Anzucht von *A. tumefaciens*: Die binären Vektoren wurden in *A. tumefaciens* (Stamm: GV3101) transformiert (vgl. 2.2.3) und die Zellen in YEB-Medium bei 28 °C vermehrt (vgl. 2.2.3). Mit 1 ml Vorkultur wurden 100 ml Agro-Konditionierungsmedium [10 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-trypton, 5 g/l NaCl, 10 mg/l Kanamycin, 0,2 mM Acetosyringon, 100 µg/ml Rifampicin] angeimpft und üN bei 28 °C geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde mit 10 mM MgSO₄ auf eine Zelldichte von 10⁸Zellen/ml (OD_{600nm} = 1).

Transformation und Co-Kultivierung der Kotyledonen mit *A. tumefaciens*: Die konditionierten Kotyledonen wurden 10 Minuten in ca. 20 ml *A. tumefaciens*-Suspension geschwenkt, mit Filterpapier trockengetupft, mit der Oberseite nach unten zurück auf Konditionierungsmedium überführt und für 2 Tage im Dunkeln bei 23 °C inkubiert.

Selektion und Regeneration: Die transformierten Kotyledonen wurden auf Selektionsmedium [0,44 % MS-Salze (inkl. Vitamine, Duchefa), 3 % (w/v) Saccharose, 1 mg/l *trans*-Zeatin, 50 mg/l Kanamycin, 250 mg/l Ticarcillin, 0,6 % (w/v) Plant Agar, pH 5,8] überführt und alle 7 bis 14 Tage auf frisches Selektionsmedium umgesetzt. Sich bildende Kalli wurden von den Blattstückchen getrennt und in direkten Kontakt mit dem Selektionsmedium gebracht. Sich entwickelnde Sprosse wurden von den Kalli getrennt und auf Bewurzelungsmedium [0,44 % MS-Salze (inkl. Vitamine, Duchefa), 3 % (w/v)

Saccharose, 0,1 mg/l IAA, 20 mg /l Kanamycin, 500 mg/l Vancomycin, 0,6 % (w/v) Plant Agar, pH 5,8] überführt. Die regenerierten Pflanzen wurden in Sterilkultur vermehrt und für weitere Untersuchungen auf Erde ausgepflanzt und weiter unter Gewächshaus-Bedingungen kultiviert.

Selektion per PCR: Bevor die regenerierten Pflanzen vermehrt oder ausgepflanzt wurden, wurde das Vorhandensein des Transgens per PCR überprüft. Dafür wurden kleine Blattstücke geerntet und gDNA extrahiert (vgl. 2.2.4.2). Es erfolgte die PCR mit einem Primer der spezifische an die AMV-Enhancer- und einem Primer der spezifisch an die *AtST2a*- bzw. *LeST2a*-Sequenz bindet (vgl. Abb. 2.1; Anhang).

2.2.9 Die Gehaltsbestimmung von OPDA und Jasmonaten

Für die Bestimmung der OPDA-, JA-, 12-OH-JA-, 12-HSO₄-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte wurde das entsprechende Pflanzenmaterial gefroren gemörsert. 0,2 bis 0,5 g Material wurden mit 10 ml MeOH und pro 0,5 g Material mit 100 ng (²H₆)JA, (²H₅)OPDA, 11-(²H₃)OAc-JA und 12-(²H₃)OAc-JA, sowie 250 ng 12-HSO₄-JA-(²H₃)Me-Ester und 12-O-(²H₇)Gluc-JA als interne Standards versetzt. Das homogenisierte Material wurde filtriert, das Eluat eingengt und mit 200 µl Pyridin und 100 µl Essigsäureanhydrid in bei RT acetyliert. Der Extrakt wurde eingengt, in 2 ml Ethylacetat aufgenommen und über eine Chromabond-SiOH-Säule (Macherey-Nagel) aufgetrennt. Der Durchlauf enthält JA, OPDA und 12-OH-JA (Extrakt A) und Extrakt B (12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA) wurde mit 5 ml MeOH eluiert. Beide Extrakte wurden vollständig eingengt.

Extrakt A: Die Aufarbeitung des Extraktes A erfolgt nach STENZEL *et al.* (2003b)

Extrakt B: Die Aufarbeitung des Extraktes B erfolgte nach MIERSCH *et al.* (im Druck)

2.2.10 Verwundungs- und Applikationsexperimente

Die Verwundungs- und Applikationsexperimente mit Tomate wurde an Blättern von 6 Wochen alten Pflanzen, die auf Erde ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert worden, durchgeführt. Die Verwundung erfolgte an der Pflanze, indem das Blatt mehrmals quer über die Mittelvene mit einer Pinzette gequetscht wurde. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet. Als Kontrolle dienten unverwundete Blätter. Für die Applikation von H₂O (als Kontrolle), 100 µM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA wurden die Blätter von der Pflanze getrennt und für 2, 6 und 24 Stunden in die entsprechenden Lösungen eingestellt.

Für die Keimungsversuche wurde JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA (je 5, 10, 20 und 50 µM, Stammlösungen in H₂O) direkt dem MS-Medium (nach autoklavieren, vgl. 2.2.1) zugesetzt.

Für die Untersuchung des Wurzelwachstums wurden Oberflächen-sterilisierte Samen auf MS-Medium ohne Zusätze ausgesät (vgl. 2.2.1). Nach der Keimung (ca. 1 mm sichtbare Wurzelspitze) wurden die Keimlinge auf MS-Medium, das 0, 5 bzw. 10 µM JM, 12-OH-JA oder 12-HSO₄-JA enthielt umgesetzt (=Tag 0). Die Wurzellänge wurde alle 2 Tage (Tag 2, 4, 6 und 8) bestimmt. Das Wurzelwachstum entspricht der Differenz der Wurzellänge zwischen 2 Messungen.

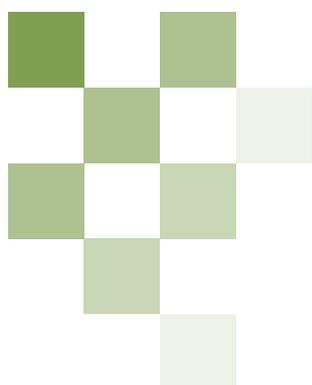
2.2.11 Statistische Auswertung

2.2.11.1 Deskriptive Statistik

Die in dieser Arbeit ermittelten Messwerte wurden zunächst einer grundlegenden deskriptiven Statistik unterzogen, um die Voraussetzungen für weiterführende statistische Analysen zu überprüfen. Das arithmetische Mittel, die Standardabweichung (StAbw) und der Standardfehler (StFehler) wurden mit Microsoft Excel berechnet und graphisch dargestellt. Per Kolmogorov-Smirnof-Test wurde die Normalverteilung mit Hilfe der Software Statistica 6.0 überprüft. Bei normalverteilten Daten wurde die Homogenität der Varianzen durch einen Levene-Test überprüft (Statistica 6.0). Da in allen Fällen Normalverteilung und Homogenität der Varianzen vorlag, erfolgten weitere Analysen mit parametrischen Verfahren.

2.2.11.2 Parametrische Verfahren

Zur weiteren statistischen Analyse der erhobenen Daten wurde eine einfaktorielle oder mehrfaktorielle ANOVA in Abhängigkeit der experimentell bestimmten Faktoren durchgeführt (Statistica 6.0). Durch diese Analyse wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mindestens 2 Proben bestanden. War dies der Fall wurde bei gleicher Stichprobenmenge ein Tukey-Test als *post hoc* Test verwendet, bei ungleicher Stichprobenmenge ein Scheffe-Test (Statistica 6.0).



3 Ergebnisse

3.1 Das Vorkommen und die Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA

Das natürliche Vorkommen der JA-Metabolite 11-OH-JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA konnte bereits in verschiedenen Pflanzen in erheblich unterschiedlichen Mengen nachgewiesen werden (MIERSCH *et al.* im Druck). Selbst in verschiedenen Organen und Geweben einer Pflanze traten zum Teil sehr unterschiedliche Mengen an 11-OH-JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA auf und überstiegen dabei den JA-Gehalt um ein Vielfaches. In Samen von *Glycine max* konnten beispielsweise rund 70 ng pro Gramm Frischgewicht 12-OH-JA nachgewiesen werden, was den JA-Gehalt um das rund 300-fache überstieg. Der 12-HSO₄-JA-Gehalt entspricht etwa der Hälfte des 12-OH-JA-Gehaltes. Die Samen von *Zea mays* enthielten hingegen kaum JA oder 12-OH-JA und im Vergleich zu *Glycine max* nur wenig 12-HSO₄-JA (MIERSCH *et al.* im Druck).

3.1.1 Die Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung in Tomate und Tabak

Das natürliche Vorkommen und Verteilungsmuster der einzelnen JA-Derivate in verschiedenen Pflanzen stellte die Frage nach ihrer biologischen Relevanz. Darüberhinaus ergab sich die Frage, ob diese Metabolite während der JA-Biosynthese, wie z.B. während der Wundantwort, gebildet werden. Die Verwundung von Blättern führt zur Induktion der JA-Biosynthese, was bereits in mehreren Pflanzen im Detail charakterisiert wurde, z.B. in Arabidopsis, Tabak und Tomate (zur Übersicht: HOWE 2004; HALITSCHKE & BALDWIN 2005; PIETERSE *et al.* 2006). Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion von 12-OH-JA in Tomaten. Deshalb wurde die wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Tomate analysiert. Da für Tabak die JA-vermittelte Wundsignaltransduktion etwa nach Herbivoren-Befall sehr gut charakterisiert ist, wurde zusätzlich die gleiche Fragestellung in Tabak untersucht (HALITSCHKE & BALDWIN 2005).

Im unverwundeten Tomatenblatt sind geringe Mengen 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nachweisbar (Abb. 3.1). Der charakteristische transiente JA-Anstieg nach Verwundung war nachweisbar (STENZEL *et al.* 2003a). Ihm folgte verzögert ein transients 12-OH-JA-Anstieg. 12-HSO₄-JA akkumulierte ebenfalls transient mit einem Maximum zwischen 2 und 6 Stunden nach Verwundung. Mit der Abnahme des 12-HSO₄-JA-Gehaltes steigt der 12-O-Gluc-JA-Gehalt an, und akkumuliert innerhalb von 24 Stunden zu 5-mal höheren Mengen als die maximal nachgewiesene JA-Menge.

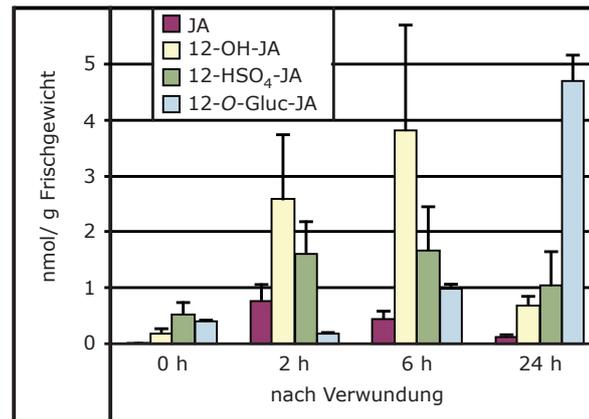


Abb. 3.1: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Tomatenblättern.
(Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben, sowie der Standardfehler.)

Die Kinetik der JA- und 12-OH-JA-Akkumulation im Tabak nach Verwundung ähnelte der von Tomate, wobei JA zu ähnlichen Mengen und 12-OH-JA dagegen bis zur doppelten Menge akkumulierten (Abb. 3.2). Im Gegensatz zu Tomate erfolgt die Akkumulation von 12-HSO₄-JA im Tabakblatt erst 24 Stunden nach Verwundung, wobei die Menge hier rund 10mal höher war als in Tomate. Eine erste Zunahme der 12-O-Gluc-JA-Menge konnte bereits 2 Stunden nach Verwundung beobachtet werden und danach erfolgte eine leichte Abnahme. Wie auch 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA akkumulierte 12-O-Gluc-JA (nach Verwundung) im Tabakblatt (im Vergleich zum Tomatenblatt) zur doppelten Menge.

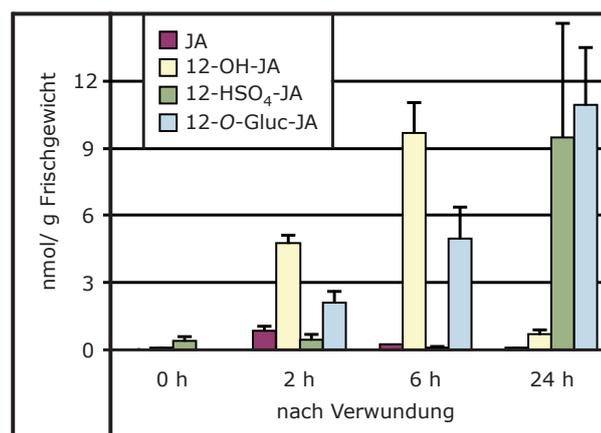


Abb. 3.2: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Tabakblättern.
(Blätter von 8 Wochen alten Tabak-Pflanzen (WT SNN) wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben, sowie der Standardfehler.)

In beiden untersuchten Pflanzen erfolgte nach Verwundung zuerst die Bildung von JA gefolgt von der Generierung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA. Dabei akkumulierten die JA-Metabolite in weitaus höheren Mengen als JA selbst. Das natürliche Vorkommen von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in verschiedenen Pflanzen sowie die Bildung dieser JA-Derivate nach Verwundung führte zu folgenden Fragen:

- (1) Ist eine Bildung dieser Metabolite abhängig von der JA-Biosynthese?
- (2) Welche biologische Funktion bzw. Wirkung haben diese Metabolite?
- (3) Ist die Metabolisierung eine Möglichkeit der JA-Speicherung?
- (4) Erfolgt nach Verwundung eine Neusynthese oder die Freisetzung gespeicherter Metabolite?

3.1.2 Die Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Applikation verschiedener Jasmonate in Tomate und Tabak

Es konnte gezeigt werden, dass nach Verwundung sowohl in Tomate als auch in Tabak 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA vermehrt akkumulierten. Es sollte deshalb untersucht werden, welchen Einfluss die exogene Applikation von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Kinetik der Akkumulation der einzelnen Jasmonate hat. Hierfür wurden Tomaten- bzw. Tabakblätter für 2, 6 und 24 Stunden in die entsprechenden Lösungen eingestellt und anschließend die Gehalte der Jasmonate bestimmt. Anstelle von JA wurde allerdings JM appliziert. Der Methylester von JA kann endogen zu JA umgewandelt werden (MIERSCH & WASTERNAK 2000) und besitzt annähernd die gleichen Signalwirkungen wie JA (TAKI *et al.* 2005).

In Tomate konnte nach Applikation von JM eine sehr große Menge JA in den Blättern nachgewiesen werden, zum einen resultierend aus der endogenen Spaltung des exogen applizierten JM (Abb. 3.3). Zum anderen resultierte dieser Anstieg wahrscheinlich aus der Induktion der JA-Biosynthese. Dafür sprach die nachweisbare Zunahme des OPDA-Gehaltes, einem Vorläufer von JA. Außerdem konnte sowohl die Induktion der Expression verschiedener JA-Biosynthese-Gene als auch die Zunahme des JA-Gehaltes nach JM-Applikation bereits in verschiedenen Pflanzen gezeigt werden (STENZEL *et al.* 2003a; WASTERNAK & HAUSE 2002). Des Weiteren kam es 24 Stunden nach JM-Applikation zu einem starken Anstieg der 12-OH-JA-Menge. Der 12-OH-JA-Gehalt nach 24 Stunden JM-Applikation überstieg die maximale Akkumulation nach Verwundung um das 8-fache. Ebenso akkumulierte 12-O-Gluc-JA um ein Vielfaches mehr als nach Verwundung. Im Gegensatz dazu konnte keine Zunahme der 12-HSO₄-JA-Menge beobachtet werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass nach Applikation von JM zuerst eine Spaltung zu JA erfolgt, das dann zu 12-OH-JA und 12-O-Gluc-JA metabolisiert wird.

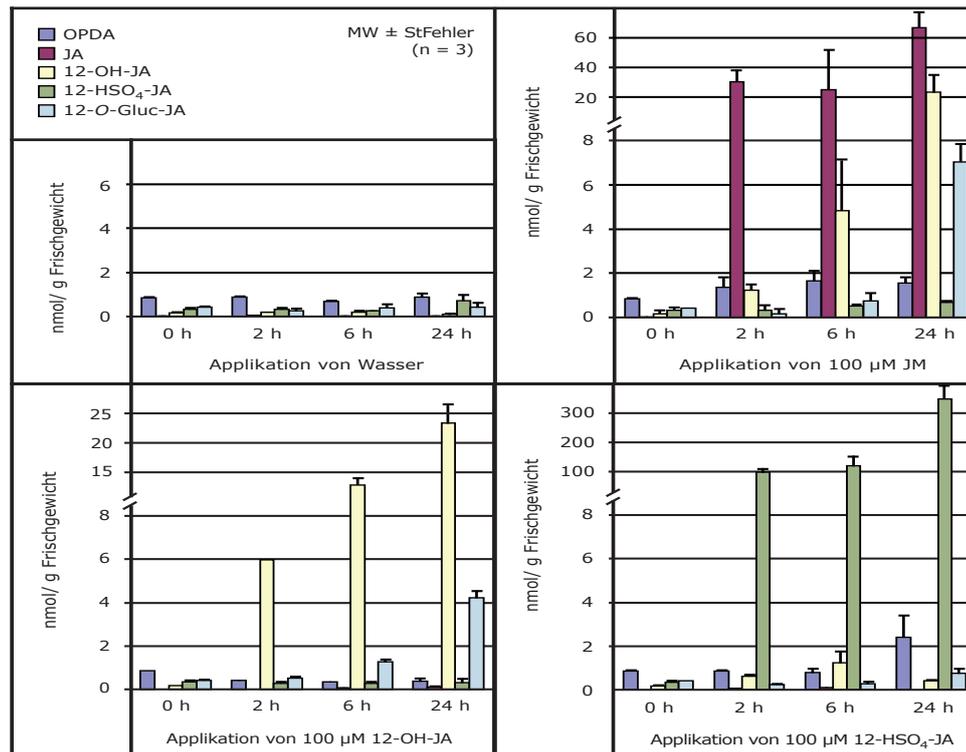


Abb. 3.3: Akkumulation von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA in Tomatenblättern. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden in 100 μM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA eingestellt. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Jasmonat-Gehalte bestimmt. Die Applikation von Wasser diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben, sowie der Standardfehler.)

Nach Applikation von 12-OH-JA kam es zu keiner Zunahme des JA-Gehaltes. Dies weist darauf hin, dass exogen appliziertes 12-OH-JA weder in der Lage ist die JA-Biosynthese anzuschalten, noch selbst endogen zu JA umgewandelt werden kann. Es kam ebenso wie nach JM-Applikation zu einem Anstieg der 12-O-Gluc-JA-Menge und der 12-HSO₄-JA-Gehalt betrug weniger als 5 % der endogen nachweisbaren 12-OH-JA-Mengen. Nach Applikation von 12-HSO₄-JA konnte nur die Zunahme der applizierten Verbindung beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass auch exogen appliziertes 12-HSO₄-JA nicht in der Lage ist, die Jasmonat-Biosynthese zu induzieren oder selbst endogen zu einem der untersuchten Jasmonate umgewandelt werden kann. Die leichte Zunahme der 12-OH-JA-Menge nach 6 Stunden und die Zunahme der OPDA-Menge nach 24 Stunden war im Vergleich zur Wasser-Kontrolle nicht signifikant.

Die untersuchten Jasmonat-Gehalte nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA zeigten in Tabak das gleiche Muster wie in Tomate, wobei sich die absoluten Mengen von denen in den Tomatenblättern unterschieden (Abb. 3.4). Die Unterschiede der Mengen der einzelnen Jasmonate zwischen Tabak und Tomate könnten jedoch schon aus unterschiedlichen Aufnahmekapazitäten der beiden Pflanzen resul-

tieren. Im Tabak konnten nach 24 Stunden Applikation von JM oder 12-OH-JA ebenfalls große Mengen 12-O-Gluc-JA nachgewiesen werden und kaum 12-HSO₄-JA. Es erfolgte ebenfalls keine Veränderung der Gehalte der anderen untersuchten Jasmonate nach Applikation von 12-HSO₄-JA.

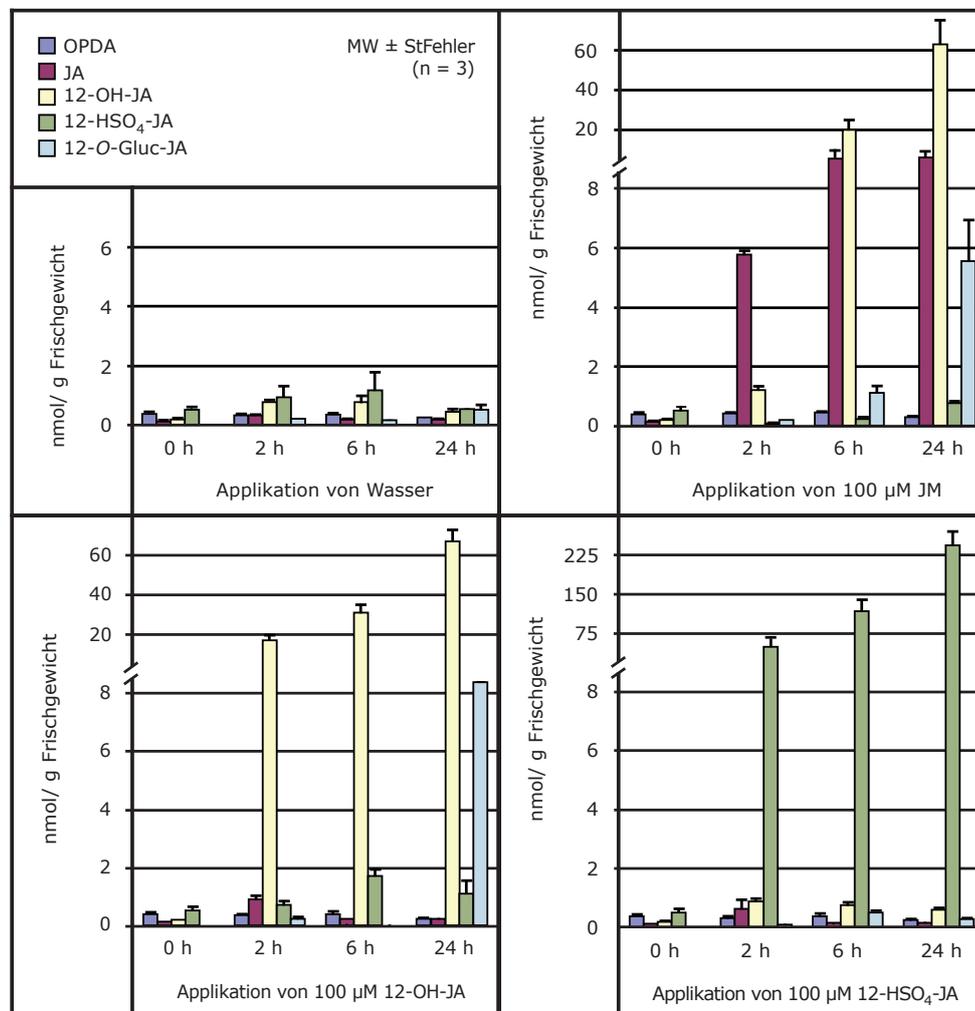


Abb. 3.4: Akkumulation von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA in Tabakblättern. (Blätter von 8 Wochen alten Tabak-Pflanzen (WT SNN) wurden in 100 μM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA eingestellt. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Jasmonat-Gehalte bestimmt. Die Applikation von Wasser diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben, sowie der Standardfehler.)

Der Anstieg der JA-, 12-OH-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte nach JM-Applikation spricht dafür, dass exogen appliziertes JM zuerst zu JA gespalten wird und dann zu 12-OH-JA und 12-O-Gluc-JA metabolisiert wird. Dies gibt einen ersten Hinweis darauf, dass die Generierung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA JA-abhängig ist. Appliziertes 12-OH-JA wird fast ausschließlich zu 12-O-Gluc-JA umgewandelt. Eine Spaltung zu JA oder eine Metabolisierung zu 12-HSO₄-JA erfolgte kaum. Appliziertes 12-HSO₄-JA wurde zu keinem der nachgewiesenen JA-Derivate umgewandelt.

3.1.3 Die Abhängigkeit der Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA von der Jasmonat-Biosynthese

Das natürliche Vorkommen von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA und ihre beachtliche Akkumulation nach Verwundung und Applikation warf die Frage auf, ob diese Verbindungen ausschließlich JA-abhängig gebildet werden. Es wäre vorstellbar, dass bereits ein JA-Vorläufer, wie z.B. α -Linolensäure, 13-HPOT oder OPDA, hydroxyliert wird. Diese Frage konnte mit Hilfe verschiedener Mutanten bzw. transgener Linien, die in verschiedenen Schritten der JA-Biosynthese gestört sind, beantwortet werden.

Der Mutante *spr2* fehlt eine funktionale ω -3-Fettsäure-Desaturase. Deshalb ist die Bildung von α -LeA, einer 18:3-Fettsäure, der Ausgangsverbindung der JA-Biosynthese, eingeschränkt (LI *et al.* 2003). Die *35S::AOCas*-Pflanzen sind ebenfalls, aufgrund des Mangels an AOC-Protein, einem Schlüsselenzym der JA-Biosynthese, kaum in der Lage JA zu bilden (STENZEL *et al.* 2003a), wohl aber 13-HPOT und Allenoxid. Somit standen Pflanzen zur Verfügung, deren JA-Biosynthese am Anfang und im mittleren Teil gestört war. Sowohl in den *spr2*- als auch in den *35S::AOCas*-Pflanzen war nach Verwundung im Gegensatz zum entsprechenden Wildtyp kaum 12-OH-JA nachweisbar (MIERSCH *et al.* im Druck). Dies zeigt die Notwendigkeit der ersten Schritte der JA-Biosynthese für die Bildung von 12-OH-JA und damit auch für die Bildung von 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine weitere Mutante, *acx1*, untersucht. Die *acx1*-Mutante ist in der Fettsäure- β -Oxidation gestört (LI *et al.* 2005). Dies führt u.a. dazu, dass diese Pflanzen zwar OPDA bilden können, aber aufgrund der beeinträchtigten β -Oxidation die Umwandlung von OPDA zu JA nicht möglich ist. Um zu überprüfen, ob die Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA auch aus OPDA möglich ist bzw. ob eine vollständige JA-Biosynthese Voraussetzung ist, wurden die Jasmonat-Gehalte in den *acx1*- und den entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (WT Castlemart) nach Verwundung bestimmt.

Im Wildtyp Castlemart akkumulierten ebenso wie im Wildtyp Lukullus sowohl OPDA und JA als auch 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung (Abb. 3.5). Der Anstieg des 12-HSO₄-JA-Gehaltes war im Wildtyp Castlemart jedoch nur äußerst gering und die 12-O-Gluc-JA-Menge war schon im unverwundeten Blatt deutlich höher als im Wildtyp Lukullus (vgl. Abb. 3.1). Wie erwartet blieb in den *acx1*-Pflanzen ein Anstieg des JA-Gehaltes nach Verwundung aus (Abb. 3.5). Es konnte lediglich eine Zunahme der OPDA-Menge nach Verwundung beobachtet werden, die jedoch im Vergleich zum Wildtyp gering ausfiel. Eine Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA war in den *acx1*-Pflanzen nach Verwundung nicht nachweisbar. Dies

schließt OPDA als Ausgangsverbindung für ihre Bildung aus und spricht ebenfalls dafür, dass die Bildung dieser JA-Derivate von einer vollständigen JA-Biosynthese abhängig ist.

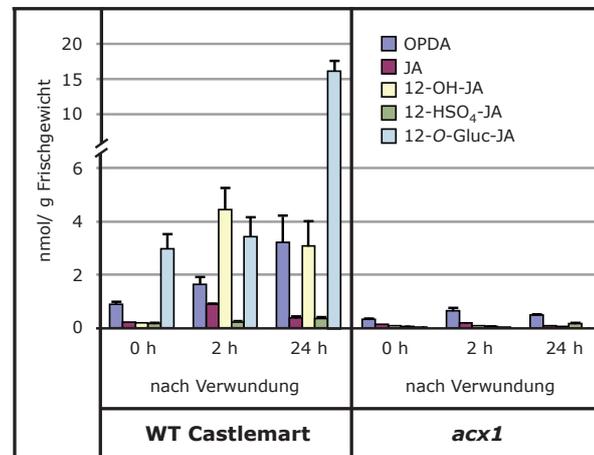


Abb. 3.5: Wund-induzierte Akkumulation von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in der Mutante *acx1* und dem korrespondierenden WT Castlemart. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen werden verwundet. 2 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben, sowie der Standardfehler.)

3.2 Die biologische Aktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA

Außer der Knollen-induzierenden Wirkung in Kartoffel (YOSHIHARA *et al.* 1989) ist bislang nur wenig über die Funktion von 12-OH-JA bekannt. Für 12-HSO₄-JA wird in Analogie zum tierischen Hormonsystem angenommen, dass es sich um ein physiologisch inaktives Hormon-Derivat handelt (GIDDA *et al.* 2003). Um weitere Aussagen über die biologische Aktivität bzw. Inaktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Vergleich zu JA treffen zu können, wurde der Einfluss der beiden JA-Derivate auf verschiedene durch JA beeinflussbare Prozesse untersucht. Da JA in der Lage ist, die Expression einer Vielzahl von Genen zu induzieren oder zu reprimieren (RYAN 2000; WASTERNAK & HAUSE 2002), wurde dies exemplarisch auch für 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf Keimung und Wurzelwachstum untersucht. Die Hemmung der Keimung und des Wurzelwachstums sind seit mehreren Jahrzehnten bekannte JA-Wirkungen (DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992; CORBINEAU *et al.* 1988).

3.2.1 Der Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Expression JA- und wund-induzierbarer Gene

Nach Verwundung, in der Natur meist verursacht durch Herbivoren-Befall, kommt es zur Bildung von JA (vgl. 3.1.1, 1.1.4). JA ist ein wichtiger Regulator der Wundantwort, da es die Expression einer Vielzahl wundinduzierbarer Gene beeinflusst (vgl. 1.1.4.1; RYAN 2000; WASTERNAK & HAUSE 2002). Durch exogene Applikation von JA bzw. JM erfolgen die gleichen Veränderungen der Genexpression wie nach Verwundung (TAKI *et al.* 2005). Teile der Wundantwort können durch Applikation von JA simuliert werden. Sowohl 12-OH-JA als auch 12-HSO₄-JA werden nach Verwundung gebildet (vgl. 3.1.1). Damit stellte sich die Frage, ob sie an den Veränderungen der Genexpression nach Verwundung beteiligt sind bzw. ob sie die gleiche Wirkung haben wie JA bzw. JM. Als Positiv-Kontrolle diente die Verwundung und die Applikation von JM und als Negativ-Kontrolle die Applikation von Wasser. Die Veränderung der Expression verschiedener Gene wurde sowohl per Northern-Blot-Analyse als auch per semi-quantitativer Real-Time-RT-PCR (qPCR) bestimmt.

Die Expression von *LeAOC* (JA-Biosynthese), *LePIN2* (Abwehr) und *LeODC* (Polyamin-Biosynthese) war, wie bereits in der Literatur beschrieben, durch JM induzierbar (Abb. 3.6; FARMER & RYAN 1992; STENZEL *et al.* 2003a; CHEN *et al.* 2006). Auch nach Verwundung wurden diese Gene verstärkt exprimiert. Die Expression des Gens, das für die kleine Untereinheit der RuBisCO (*LeRBCS1*; Photosynthese) kodiert war hingegen, wie zu erwarten, durch JM reprimiert. Nach Verwundung konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. 12-HSO₄-JA war nicht in der Lage die Expression eines der untersuchten Gene zu induzieren bzw. zu reprimieren. Dies weist darauf hin, dass 12-HSO₄-JA, zumindest was die Expression der untersuchten JA-induzierbaren Gene angeht, ein inaktives Metabolit ist. 12-OH-JA war im Gegensatz zu JM nicht fähig die Expression der *LeAOC* zu induzieren. Allerdings reprimiert es in gleichem Maße wie JM die Expression der *LeRBCS1* und induziert die Expression von *LePIN2* und *LeODC*, wenn auch bei weitem nicht so stark wie JM. Dies zeigt nicht nur Unterschiede zur JM-Wirkung, sondern deutet auch auf unterschiedliche Wirkungen von 12-OH-JA und seinem Sulfat hin.

Genauere Aussagen sind aber aufgrund mangelnder Sensitivität der Northern Blot-Analysen nicht möglich. Deshalb wurde die Expression zusätzlich, unter Einbeziehung weiterer Gene, durch qPCR untersucht.

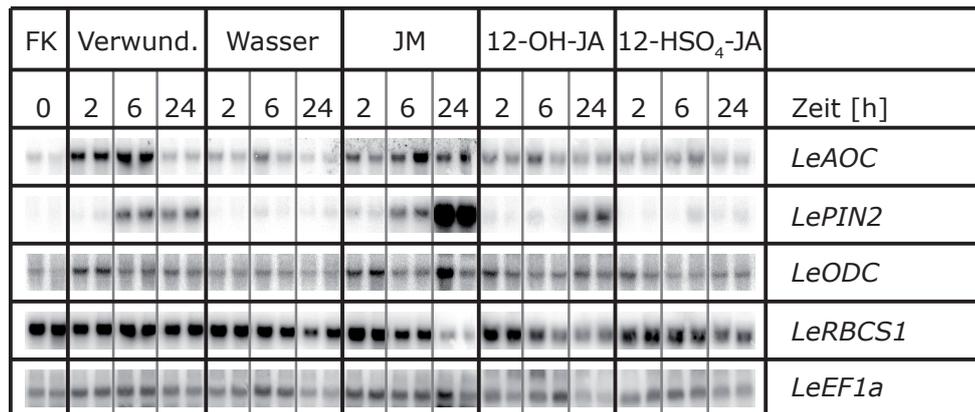


Abb. 3.6: Northern Blot-Analyse der Transkript-Akkumulation von *LeAOC*, *LePIN2*, *LeODC* und *LeRBCS1* nach Verwundung und Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden verwundet bzw. in 100 µM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA eingestellt. Wasser-Applikation diente als Kontrolle. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Es wurden jeweils 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Hybridisierung erfolgte mit spezifischen DNA-Sonden. Eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen *LeEF1a* diente als Beladungskontrolle. Dargestellt sind jeweils 2 unabhängige biologische Proben.)

Die im Northern Blot beobachtete Wirkung von exogen appliziertem JM konnte durch qPCR-Untersuchungen bestätigt werden (Abb. 3.7). Auch die Expression von *LeTD* (AS-Stoffwechsel) und *LeLAP* (Abwehr), deren Transkripte nicht per Northern Blot untersucht worden waren, wurde durch JM induziert. Die geringere, induzierende Wirkung von 12-OH-JA auf die Expression von *LePIN2* und die reprimierende Wirkung auf die Expression der *LeRBCS1* wurde bestätigt. Der geringe induzierende Effekt von 12-OH-JA auf die *LeODC*-Expression bestätigte sich nicht. Ganz im Gegenteil konnte eine drastischen Repression der *LeODC*-Expression beobachtet werden. Auch die Expression von *LeAOC* und *LeLAP* wurde durch 12-OH-JA stark reprimiert. Die Expression der *LeTD* war durch 12-OH-JA kaum beeinflusst. Eine induzierende Wirkung von 12-HSO₄-JA auf die Expression konnte für keines der Gene beobachtet werden. Es erfolgte jedoch die Repression der Expression von *LeAOC* und *LeLAP*.

Es wurde weiterhin die Expression einer Vielzahl anderer JA-induzierbarer Gene nach Applikation von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA per qPCR untersucht (Daten nicht gezeigt; MIERSCH *et al.* im Druck). Darunter waren u.a. Gene die für JA-Biosynthese-Enzyme und Enzyme des AS-Stoffwechsels kodieren. Die oben beschriebenen Ergebnisse lassen sich dabei auf diese Gene übertragen. Die Expression von beinahe allen untersuchten wundinduzierbaren Genen wurde durch 12-OH-JA reprimiert. 12-HSO₄-JA hatte entweder keine oder eine schwach reprimierende Wirkung auf die Expression.

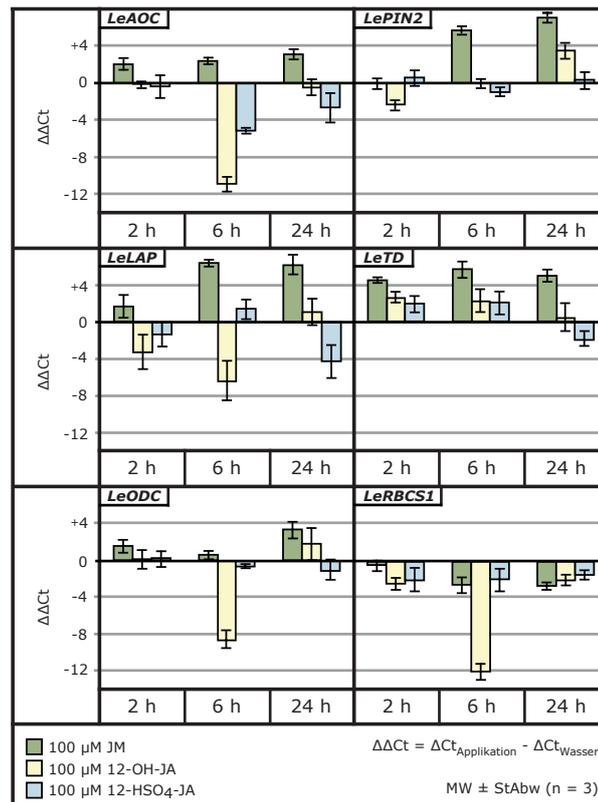


Abb. 3.7: qPCR-Analyse der Transkript-Akkumulation von *LeAOC*, *LePIN2*, *LeODC*, *LeRBCS1*, *LeTD* und *LeLAP* nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden in 100 μM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA eingestellt. Wasser-Applikation diente als Kontrolle. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. 5 μg Gesamt-RNA wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt und die PCR erfolgte mit 20 ng cDNA als Template. Der ΔCt-Wert einer Probe für ein bestimmtes Gen ergibt sich aus der Differenz des Ct-Wertes für dieses Gen und dem Ct-Wert des Referenz-Gens *LeEF1a*. Der dargestellte ΔΔCt-Wert ist die Differenz aus dem ΔCt-Wert einer Applikation und dem ΔCt-Wert der entsprechenden Wasser-Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben und je 2 technischen Replikaten, sowie die Standardabweichung.)

Die qPCR-Untersuchungen bestätigten die unterschiedliche Wirkung von JA bzw. JM verglichen mit 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Genexpression der untersuchten Gene. Die Repression durch 12-OH-JA oder 12-HSO₄-JA entspricht einer Signalmodulation bzw. Signalinaktivierung von JA nach Verwundung.

3.2.2 Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf JA-vermittelte Prozesse

3.2.2.1 Die Keimung

Exogen appliziertes JA und JM inhibieren die Keimung (CORBINEAU *et al.* 1988). Um die biologische Aktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA während dieses Prozesses mit der von JA zu vergleichen, wurde die Keimung von Wildtyp Lukullus-Samen auf MS-Medium, das JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt,

untersucht (Abb. 3.8). Als Kontrolle erfolgte die Aussaat auf MS-Medium ohne Zusätze. Dabei lag der Anteil gekeimter Samen bei knapp 90 %. Erwartungsgemäß inhibierte JM die Keimung. Der Anteil gekeimter Samen nahm mit steigender JM-Konzentration im Medium signifikant ab. Im Gegensatz dazu wurde die Keimung weder durch 12-OH-JA noch 12-HSO₄-JA signifikant beeinflusst. Das zeigt, dass 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA biologisch inaktiv in Bezug auf die Keimung sind.

3.2.2.2 Das Wurzelwachstum

Als ein ebenfalls durch JA hemmbarer Prozess wurde das Wurzelwachstum untersucht (DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992). Um das Wurzelwachstum getrennt vom hemmenden Effekt auf die Keimung zu messen, wurden Wildtyp Lukullus-Samen auf MS-Medium ohne Zusätze ausgelegt. Nach der Keimung wurden die Samen auf Medium umgesetzt, das JM, 12-OH-JA oder 12-HSO₄-JA in unterschiedlichen Konzentrationen enthielt. Anschließend wurde die Wurzellänge alle 2 Tage bestimmt. Dargestellt ist hier die Änderung der Wurzellänge zwischen Tag 4 und Tag 6 nach Umsetzen der Keimlinge auf JM-, 12-OH-JA oder 12-HSO₄-JA-haltiges Medium (Abb. 3.9). Die Verbindungen wurden in relativ hohen Konzentrationen eingesetzt, da es nicht Ziel war, einen Schwellenwert für die Wirkung zu bestimmen. Es wurde in einem Konzentrationsbereich gearbeitet, in dem zumindest für JA eine definitive, inhibitorische Wirkung bekannt ist (STASWICK *et al.* 1992).

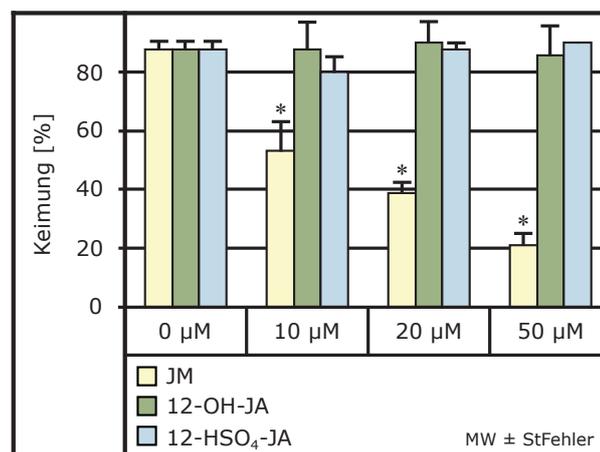


Abb. 3.8: Der Einfluss von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Keimung von Tomate. (Jeweils 30 Samen (WT Lukullus) wurden sterilisiert und auf MS-Medium ausgelegt, das 0, 10, 20 oder 50 µM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA enthielt. Die Platten wurden anschließend 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C, 3 Tage im Dunkeln bei 23 °C und weiter im Dauerlicht bei 23 °C inkubiert. Nach insgesamt 14 Tagen wurde die Anzahl gekeimter Samen bestimmt. Der Versuch wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte, sowie der Standardfehler (n=3). Sternchen markieren signifikante Unterschiede - Tukey HSD: p < 0.05)

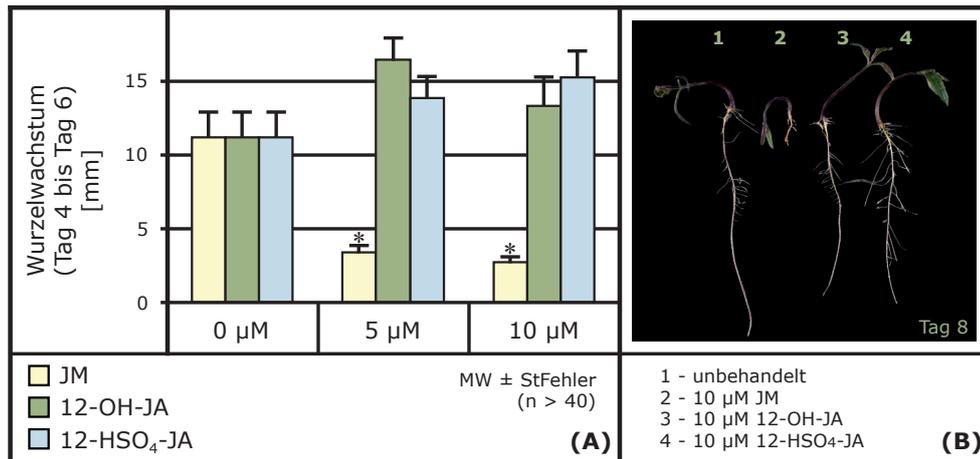


Abb. 3.9: Der Einfluss von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf das Wurzelwachstum von Tomate. Dargestellt sind das Wurzelwachstum (Zunahme der Wurzellänge zw. Tag 4 und 6; A) und verschieden behandelte Keimlinge an Tag 8 (B). (Tomaten-Samen (WT Lukullus) wurden auf MS-Medium ohne weitere Zusätze ausgesät. Bei beginnender Keimung (ca. 1 mm sichtbare Wurzel) wurden jeweils 25 bis 30 Samen auf MS-Medium, das 0, 5 oder 10 µM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA enthielt, umgesetzt. Dieser Zeitpunkt entspricht Tag 0. Die Wurzellänge wurde jeweils nach 2, 4, 6 und 8 Tagen bestimmt. Der Versuch wurde dreimal wiederholt. Dargestellt sind Mittelwerte, sowie die Standardfehler (n>41). Sternchen markieren signifikante Unterschiede - Scheffe-Test: p < 0.05)

Der inhibierende Einfluss von JM auf das Wurzelwachstum war eindeutig erkennbar und nimmt mit steigender JM-Konzentration zu (Abb. 9A und 9B). Die Zunahme der Wurzellänge ist bei JM-Behandlung signifikant geringer als auf Medium ohne Zusätze. Bei Zusatz von 12-OH-JA oder 12-HSO₄-JA kommt es nicht zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums. Ganz im Gegenteil scheinen die beiden Verbindungen sogar einen fördernden Einfluss auf das Wurzelwachstum zu haben. Es kommt zu einer leichten Zunahme des Wurzelwachstums. Der Unterschied zu unbehandelten Wurzeln ist jedoch nicht signifikant. Es ist allerdings eindeutig, dass die beiden Stoffe das Wurzelwachstum anders als JM nicht inhibieren. Es zeigt sich erneut die unterschiedliche Wirkung von JA/JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen aus Tomate

Um die biologische Wirkung von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA näher zu charakterisieren, sollte der endogene 12-OH-JA-Gehalt in der Pflanze mit einem transgenen Ansatz verändert werden. Dazu sollte die Menge des Enzyms verändert werden, das die Reaktion von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA katalysiert. Ein *loss of function*-Ansatz würde theoretisch die 12-OH-JA-Menge erhöhen und ein *gain of function*-Ansatz würde sie verringern. Phänotypische Veränderungen der entsprechenden transgenen Pflanzen gäben Hinweise darauf, an welchen Prozessen 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA beteiligt sind. Bereits vor einigen Jahren gelang die Identifizierung und Charakterisierung der 12-OH-JA-

Sulfotransferase, kurz ST2a, aus Arabidopsis (GIDDA *et al.* 2003). Es sollten nun putative 12-OH-JA-Sulfotransferasen aus Tomate identifiziert und charakterisiert werden.

3.3.2 Die Identifizierung und Klonierung putativer *LeST2a*-cDNAs

Bislang wurde keine Sulfotransferase (ST) aus Tomate identifiziert oder charakterisiert. Als Grundlage zur Identifizierung putativer Tomaten Sequenzen, die für eine 12-OH-JA-ST kodieren, diente die AS-Sequenz der *AtST2a*. Es erfolgte eine Suche nach möglichen ESTs in den Datenbanken TGI (The Gene Index Project; <http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) und SGN (Sol Genomics Network; <http://www.sgn.cornell.edu/index.pl>). Es konnten 6 ESTs, die alle als putative Sulfotransferasen geführt wurden, identifiziert werden (Tab. 3.1). Im Arabidopsis-Genom konnten 18 STs identifiziert werden. Es ist wahrscheinlich, dass in Tomate ebenfalls mehr als 6 STs existieren. Als einer der aussichtsreichsten Kandidaten wurde der EST TC117818, im folgenden bezeichnet als *LeST2a*, ausgewählt. Die Homologie zur *AtST2a* war im Vergleich zu den anderen ESTs sowohl auf DNA- als auch auf Protein-Ebene mit 52 % bzw. 44 % hoch (Tab. 3.1). Die Homologie der *LeST2a* zu anderen STs aus Arabidopsis lag jedoch auch zwischen 40 und 50 %, so dass die Homologievergleiche allein keine Hinweise auf die Funktion der *LeST2a* gaben.

Die übrigen putativen Sulfotransferasen wurden zur Vereinfachung, wie in Tabelle 3.1 aufgeführt, nummeriert, wobei die Nummerierung keinerlei Hinweis auf mögliche Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten STs anderer Organismen gibt. Die Sequenzen der ESTs *LeST1*, 3, 4, 5 und 6 zeigten ebenfalls Übereinstimmungen mit der Sequenz der *AtST2a* (Tab 3.1). Die Homologie der ESTs *LeST1*, 5 und 6 zur *AtST2a* auf Protein-Ebene war ähnlich hoch wie die der *LeST2a*. Die Homologie der *LeST4* und 5 lag unter 40 %.

Welcher bzw. welche der Tomaten-ESTs für eine 12-OH-JA-ST kodierten, sollte der Nachweis der Enzymaktivität zeigen. Dafür sollten die cDNAs kloniert und in *E.coli* überexprimiert werden.

EST	Name	Homologie zu ATST2a (Protein; in %)	Homologie zu ATST2a (DNA; in %)	vollständige Sequenz in der Datenbank
TC131400	LeST1	40	51	nein
TC117818	LeST2a	44	52	ja
TC117767	LeST3	37	43	nein
TC128594	LeST4	33	19	nein
U155476	LeST5	25	26	nein
U163368	LeST6	47	55	nein

Tab. 3.1: ESTs, die für putative 12-OH-JA-STs kodieren. (Die ESTs wurden in den Datenbanken TGI und SGN mit Hilfe der AtST2a-Aminosäure-Sequenz identifiziert. Homologievergleiche wurden mit Hilfe der Online-Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt.)

3.3.2.1 Die Gewinnung der vollständigen Sequenz putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen

Bei den ESTs *LeST1*, 3, 4, 5 und 6 handelte es sich um nicht-vollständige ORFs (Tab. 3.1). Lediglich für die *LeST1* war das 3'-Ende bekannt. Per Genome Walking-Technik sollten die fehlenden Sequenzinformationen gewonnen, sowie die Vollständigkeit der *LeST2a*-Sequenz überprüft werden. Dafür wurde hochmolekulare genomische DNA aus Tomatenblättern (WT Lukullus) isoliert und mit verschiedenen *blunt-end-cutting* Restriktionsenzymen geschnitten. Darauf folgte die Ligation speziell modifizierter Adapter. Die gewünschten Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert, wobei ein Adapter-spezifischer Primer und ein EST-spezifischer Primer zum Einsatz kamen (vgl. 2.2.4.6). Die so gewonnenen Fragmente wurden kloniert und anschließend mehrfach sequenziert.

Der Genome Walking-Ansatz bestätigte, dass es sich bei der Datenbank-Sequenz der *LeST2a* um den vollständigen ORF handelte. Es konnten keine weiteren möglichen Start-Codons identifiziert werden. Für die ESTs *LeST3* und *LeST6* konnte die vollständige Sequenzinformation gewonnen werden (Sequenzen siehe Anhang). Für die ESTs *LeST1*, 4 und 5 konnten keine zusätzlichen Sequenz-Informationen gewonnen werden.

3.3.2.2 Die Klonierung und Charakterisierung der *LeST2a*, *LeST3*- und *LeST6*-cDNA

Die Größen der ORFs der *LeST2a*, *LeST3* und *LeST6* und der entsprechenden Proteine sind in Tabelle 3.2 zusammengefasst. Für keine der putativen STs konnte eine Signal-

Peptid-Sequenz vorhergesagt werden. Sie gehören vermutlich zur Gruppe der löslichen STs. Da die meisten Gene, die für lösliche, pflanzliche STs kodieren, keine Introns besitzen, sollte dies auch für die *LeST2a*, 3 und 6 überprüft werden. Die Sequenzen wurden dafür mittels PCR amplifiziert, wobei zum einen genomische DNA und zum anderen cDNA aus Tomaten-Blüten (beides WT Lukullus) als Template dienten. Mit beiden Templates konnten für alle drei STs Fragmente der gleichen Größe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Demnach besitzen sie ebenso wie die *AtST2a* keine Introns. Die höchste Homologie zur *AtST2a* zeigten die *LeST2a* und die *LeST6*. Da sich *LeST2a* und *LeST6* auch untereinander sehr ähnlich waren, könnte es sich um Isoenzyme handeln.

Für die Klonierung der *LeST2a*- und der *LeST6*-cDNA wurden per PCR Fragmente mit der erwarteten Größe von ca. 1000 bp amplifiziert (Abb. 3.10). Dabei diente cDNA aus Tomaten-Blüten (WT Lukullus) als Template. Nach Reinigung der Fragmente wurden diese in den Klonierungsvektor pDrive (Qiagen, Hilden) ligiert. Durch Restriktionsanalysen wurde das Vorhandensein und die richtige Orientierung der Insertion überprüft. Die Übereinstimmung der klonierten Sequenz mit der in der Datenbank wurde durch mehrfache Sequenzierung bestätigt (Details zur Klonierungsstrategie siehe 2.2.5). Die Klonierung der *LeST3* gelang bisher nicht.

	LeST2a	LeST3	LeST6	AtST2a
ORF	1011 bp	1221 bp	987 bp	1077 bp
Protein (MW)	336 AS (39.9 kDa)	406 AS (36.26 kDa)	328 AS (38.34 kDa)	359 AS (41.3 kDa)
Introns	nein	nein	nein	nein
Signal-Peptid	nein	nein	nein	nein
Homologie zu <i>AtST2a</i> (DNA/Protein)	52 % / 44 %	17 % / 40%	53 % / 44 %	---
Homologie zu <i>LeST2a</i> (DNA/Protein)	---	44 % / 41 %	82 % / 73 %	52 % / 44 %

Tab. 3.2: Eigenschaften der Volllänge cDNAs putativer 12-OH-JA-STs (Die Berechnung des MW erfolgte mit dem Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) und die Homologie-Vergleiche mit der Online-Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>.)

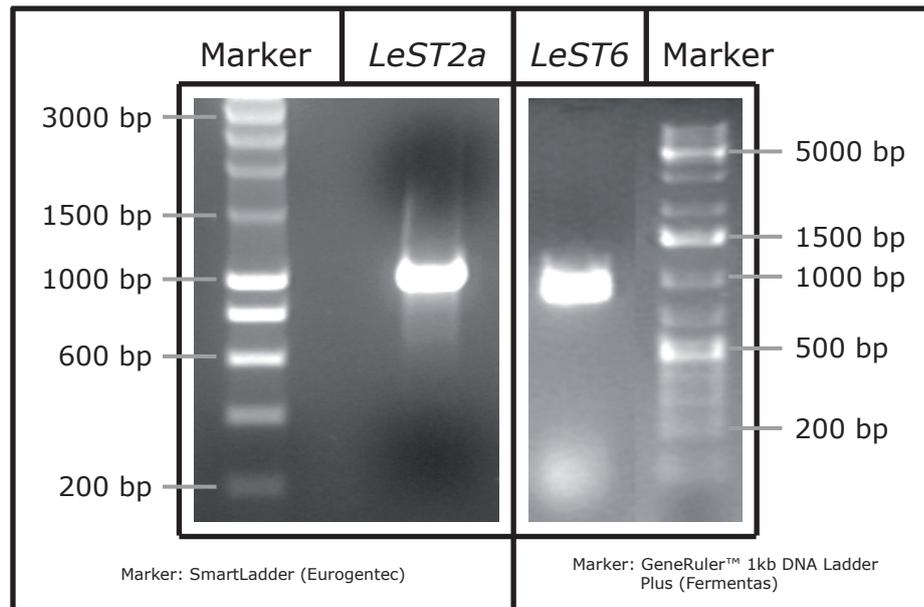


Abb. 3.10: Amplifizierung der *LeST2a*- und *LeST6*-cDNA per PCR
(Die PCR erfolgte mit spezifischen Primern und cDNA aus Tomaten-Blüten (WT Lukullus) als Template. Nach Reinigung der Fragmente erfolgte die Klonierung in den Vektor pDrive, Qiagen.)

3.3.3 Alignment hochkonservierter Domänen

Lösliche STs zeigen hohe strukturelle Ähnlichkeiten. Zwischen Pflanzen- und Säuger-STs beträgt die Identität auf AS-Level 25 bis 30 %. Lösliche STs besitzen alle in etwa die gleiche AS-Anzahl und bestehen aus 4 Regionen mit konservierten AS-Resten (VARIN *et al.* 1992). Des Weiteren konnten für die PAPS-Bindung und Katalyse essentielle AS-Reste identifiziert werden (MARSOLAIS & VARIN 1995; KAKUTA *et al.* 1997; MARSOLAIS & VARIN 1997; MARSOLAIS *et al.* 1999). Außerdem wurde ein Bereich identifiziert, bezeichnet als Domäne II, der für die Spezifität hinsichtlich des Akzeptor-Substrates verantwortlich ist (VARIN *et al.* 1995).

Die Identifizierung der oben genannten kritischen AS-Reste und der Domäne II gelang hauptsächlich durch Untersuchungen der Flavonol-3-ST aus *Flaveria chloraefolia* (Fc3ST; VARIN *et al.* 1992). Ein Alignment der AS-Sequenz dieser ST mit der der *AtST2a*, *LeST2a* und *LeST6* zeigte, dass alle Proteine die für die PAPS-Bindung und Katalyse verantwortlichen AS-Reste enthielten (Abb. 3.11). Auch die konservierten Regionen I und IV waren vorhanden. Wie oben beschrieben handelt es sich bei der *LeST2a* und 6 vermutlich um lösliche STs. Es gab eine Vielzahl von Übereinstimmungen der Sequenz der *LeST2a* und *LeST6* mit der *AtST2a* und Unterschiede zur Fc3ST innerhalb der Domäne II. Da aber für die *AtST2a* noch keine AS-Reste gefunden wurden, die die Spezifität für 12-OH-JA als Substrat festlegen, sind genauere Aussagen hinsichtlich des Akzeptor-Substrates der *LeST2a* und *LeST6* nicht möglich. Im Gegensatz zur *AtST2a* und Fc3ST

enthielten die LeST2a- und LeST6-Sequenz ein Dimerisierungsmotiv (Abb. 3.11). Die Dimerisierungssequenz in tierischen STs lautet KXXXTVXXE und wird als KTVE-Motiv bezeichnet. In den beiden Tomaten-STs war dabei Glutaminsäure (E) durch Asparaginsäure (D) ersetzt. Beide AS unterscheiden sich nur in der Länge der Seitenkette. Die für die Dimerisierung notwendige Wasserstoffbrückenbindung, sowie die ionischen Wechselwirkungen könnten auch mit Asparaginsäure ausgebildet werden (vgl. 1.2.2). Über die Funktionalität dieses Motives lassen sich keine Aussagen treffen, aber eine Dimerisierung beider Enzyme *in vivo* wäre vorstellbar. Des Weiteren konnten in der LeST2a- und LeST6-Sequenz putative Phosphorylierungsstellen vorhergesagt werden (NetPhos 2.0, Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark (Lyngby); Daten nicht gezeigt).

LeST2a	-----MTKSQTSSPTPHKYLQE-----DDVSEDCCKLLSTLPKERGWVGSVYV	43
LeST6	-----MTTSLP-----EYLEE-----DNLSEECCKLISILPKKEGWVRS-VY	36
AtST2a	MKSIPMAIPSPSMCHKLELLKEGKTRDVPKAEDEDEGLSCEFQEMLDLSPKERGWRTYLY	60
FcST3	-----MEDI IKTLPQHTCSFLKHR----FTLY	23
	Region I	
LeST2a	NYQGFWALPRLIQGVIAQQRQYQAQDNDI ILVTAPEKSGTTLWKALLFSLVNRKKYPVF EK	103
LeST6	NYQGFWTSKFLQGVIAQQQFQARDSDI ILVTSPEKSGSTWLKSLLFALVNRVKHPFVFP	96
AtST2a	LFQGFWCQAKEIQAIMSFQKHFFQSLENDVVLATIPKSGTTLWKALFTTILNRRHRFDPVAS	120
FcST3	KYKDAWNHQEFLEGRILSEQKFKAHPNDFVLASYPEKSGTTLWKALAFAIITREKFDSDS	83
	↑	
LeST2a	--NHPLLKVNPHDLVPLEQDLYVDGQVPDFSLFTSPTLIATHVFFASLPKSVQNSRTKL	161
LeST6	--NHPLLVENPHVLVPLEHTLYVDGQVIDFSTNTSPRLLATHVFFASLPESVHDSKTKL	154
AtST2a	STNHPLFTSNPHDLVPPFEYKLYANGDVPDLSGLASPRTFATHLPFGSLKETIEKPGVKV	180
FcST3	---PLTTMPHDCIPLLEKDLEKIQENQRNSLYTP---ISTHFHYKSLPESARTSNCKI	136
	↑	
LeST2a	VYLCRNPRDTFISMWQFTNNLRLDSDHRDTSIEEMFDHFCKGVGLYGFWDHVLGYWKES	221
LeST6	IYLCRNPRDTFISMWHFANNLLH-HKDTNSIEEMFDLFCRGVSLYGFWNHVLGYWKQS	213
AtST2a	VYLCRNPFDTFISWHYTNNIKSE-SVSPVLLDQAFDLYCRGVIGFGPFWEHMLGYWRES	239
FcST3	VYIYRNMKDVIYSYHFLRQIVKL-SVEEAPFEEAFDEFQCGISSCGPYWEHIRGYWKAS	195
	↑	
LeST2a	IENSDKVLFLMYEIEIKKQPKIQKRLAEFLDCPFSEIEEDCRVVDEILRMCSFGNLRNLE	281
LeST6	IQNPNIKLFMYEIEIKKPKIQKRLAKFLECFSEIEENSRVVDEILKMCSEFNLRNLE	273
AtST2a	LKRPEKVFFLRYEDLKDIDETNLKRLATFLELPFTEEEERKGVVKAIAELCSFENLKKLE	299
FcST3	LEKPEIFLFLKYEDMKDPVPSVKKLADFIGHPPTPKEEEAGVIEDIVKLCSEFKLSLE	255
	↑	
	Region VI	
LeST2a	VNVNGNM---SAGMANKNFRRGEVGDWKNYFTVEMNDRLNHIIEQKFGHSGLKFVYI	336
LeST6	VNTNGKF---STGEPYKVFRRGEIGDWKNYFTVEMIDKLNHIIEEKFGAGLKFVYV	328
AtST2a	VNKSNS---IKNFENRFLFRKGEVSDWVNYLSPSQVERLSALVDDKLGSGLTFRLS	354
FcST3	VNKS GMHRPEEAHSIENRLYFRKGDGDKWNYFTDEMTOQIDKLIIDEKLGATGLVVK--	312
	↑	

Abb. 3.11: Alignment der Aminosäure-Sequenz der AtST2a, LeST2a, LeST6 und der Flavonol-3-ST aus *Flaveria chloraefolia* (Fc3ST).

(Das Alignment wurde mit der Online-Software ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) durchgeführt. Pfeile: für die PAPS-Bindung und den Katalyse-Mechanismus essentielle Aminosäuren. Grün umrandet: in allen löslichen STs konservierte Regionen I und IV. Blau unterlegt: Domäne II, blau umrandet: Regionen, die vermutlich die Spezifität für das Akzeptor-Substrat bestimmen; gelb unterlegt: KTVE-Motiv.)

3.3.4 Die rekombinante Überexpression in *E.coli* und Reinigung der putativen 12-OH-JA-Sulfotransferasen

Nach erfolgreicher Klonierung der *LeST2a*- und *LeST6*-cDNA wurde die Enzymaktivität dieser putativen 12-OH-JA-Sulfotransferase überprüft. Dazu wurden die Proteine in *E.coli* überexprimiert. Die in den Vektor pDrive klonierten Fragmente (vgl. 3.3.1.2)

wurden ausgeschnitten und in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) ligiert (vgl. 2.2.5). Dieser Vektor ermöglicht die IPTG-induzierte Überexpression in *E.coli* und die anschließende Reinigung mittels Nickel-Agarose-Affinitätschromatographie. Die korrekte Insertion wurde mit Hilfe von Kontroll-Restriktionen und anschließender Sequenzierung überprüft.

Nach Überexpression der *LeST2a* in *E.coli* und anschließender Reinigung des Proteins durch Nickel- und PAP-Agarose-Chromatographie nach GIDDA (2001) konnte im denaturierenden SDS-Gel ein Protein der erwarteten Größe von ca. 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Das Protein lag nicht in *inclusion bodies* vor. Da nur eine schwache Überexpression im SDS-Gel nachweisbar war, wurden verschiedene Parameter wie z.B. die IPTG-Konzentration oder die Inkubationstemperatur und -dauer variiert (vgl. 2.2.7.1). Es konnte jedoch nie eine stärkere Überexpression beobachtet werden.

Für die *LeST6* konnte nach Überexpression in *E.coli* und darauf folgender Reinigung durch Nickel-Agarose-Chromatographie nach BURKART & WONG (1999) im SDS-Gel eine Bande der erwarteten Größe (ca. 40 kDa) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

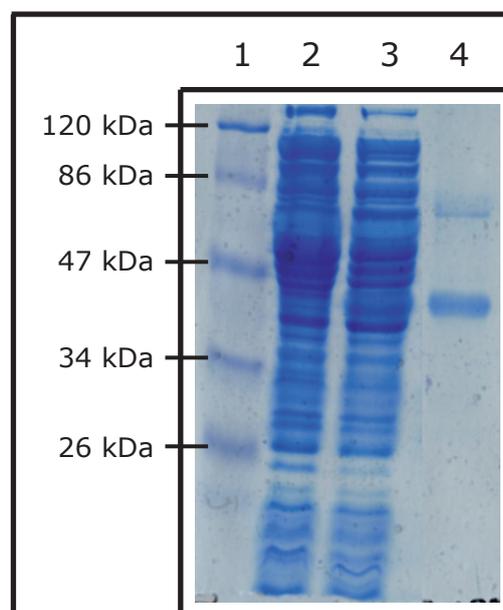


Abb. 3.12: Rekombinante Überexpression in *E.coli* und Reinigung der LeST2a (SDS-PAGE von Fraktionen vor und nach Reinigung der rekombinanten LeST2a. 1 - Marker (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas); 2 - Rohextrakt der Leer-Vektor-Kontrolle; 3 - Rohextrakt mit LeST2a; 4 - rekombinante LeST2a nach Nickel-Agarose- und PAP-Agarose-Chromatographie.)

3.3.5 Der Nachweis der Enzymaktivität putativer 12-OH-JA-Sulfotransferasen

3.3.5.1 Klonierung, Überexpression in *E.coli* und Reinigung der AtST2a

Die AtST2a sollte als Kontrolle für den *in vitro* Umsatz von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA dienen. Ihre enzymatische Aktivität und Spezifität für 12-OH-JA konnte bereits gezeigt werden (GIDDA *et al.* 2003). Der binäre Vektor (pBI-101-526), der verwendet wurde, um die AtST2a in Arabidopsis und Tabak unter Kontrolle des 35S-Promotors zu exprimieren, lag vor (GIDDA 2001; DALTA *et al.* 1993). Die funktionale Überexpression wurde anhand vermehrter 12-HSO₄-JA-Bildung nachgewiesen (GIDDA 2001; vgl. 3.6).

Die AtST2a-Sequenz wurde mittels Restriktionsverdau aus dem binären Vektor ausgeschnitten. Das gereinigte Fragment wurde anschließend in den Überexpressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden; Details zur Klonierungsstrategie vgl. 2.2.5) kloniert. Durch Sequenzierung wurde die Übereinstimmung der klonierten Sequenz mit der in der TAIR-Datenbank bestätigt. Der Überexpressionsvektor wurde in *E.coli*-Zellen transformiert und es erfolgte die Überexpression und Reinigung der AtST2a nach GIDDA (2001). Im SDS-Gel konnte ein Protein der erwarteten Größe von ca. 40 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.13).

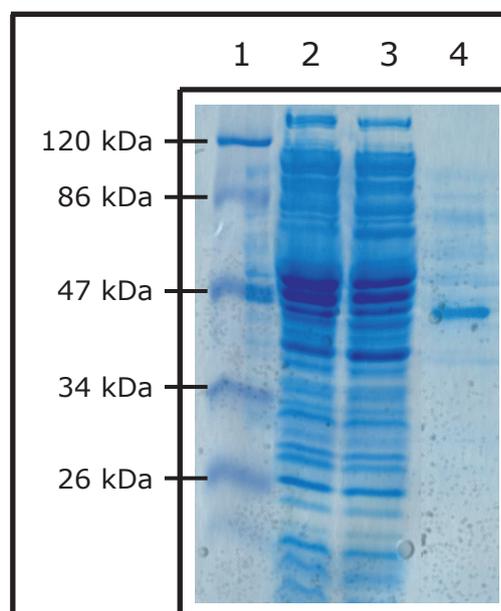


Abb. 3.13: Rekombinante Überexpression in *E.coli* und Reinigung der AtST2a (SDS-PAGE von Fraktionen vor und nach Reinigung der rekombinanten AtST2a. 1 - Marker (Prestained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas); 2 - Rohextrakt der Leervektor-Kontrolle; 3 - Rohextrakt mit AtST2a; 4 - rekombinante AtST2a nach Nickel-Agarose- und PAP-Agarose-Chromatographie.)

3.3.5.2 Der Nachweis der Enzymaktivität im einfachen Aktivitäts-Assay

Bei der Sulfatierung von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA dient PAPS, wie bei allen bisher charakterisierten ST-katalysierten Sulfatierungen, als Sulfat-Donor. PAPS wird während der Reaktion zu PAP umgesetzt. Der einfache Aktivitäts-Assay wurde zuvor erfolgreich für die AtST2a angewendet (GIDDA, 2001). Es wurde ³⁵S-markiertes PAPS eingesetzt, und die sulfatierten Produkte wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) und Scintillationsmessung nachgewiesen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Aktivitätstest modifiziert. PAPS wurde nicht radioaktiv markiert verwendet. 12-OH-JA kam sowohl unmarkiert als auch ¹⁴C-markiert zum Einsatz. Der Nachweis des Umsatzes erfolgte mittels DC und LC-MS/MS. Dieser Test wurde nur für die LeST2a und nicht für die LeST6 durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle diente die AtST2a und als Negativ-Kontrolle fungierte zum einen Protein-Rohextrakt aus *E.coli*-Zellen, die den leeren pQE30-Vektor trugen und zum anderen Hitze-denaturiertes AtST2a- bzw. LeST2a-Protein. Der Umsatz von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA konnte für keinen Ansatz nachgewiesen werden, so dass der Aktivitäts-Assay modifiziert wurde.

Es wurden u.a. die Expressionsbedingungen der Proteine verändert, die Konzentrationen aller Assay-Komponenten variiert und verschiedene Temperaturen und Zusätze kamen zum Einsatz (vgl. 2.2.7.3). Des Weiteren wurden Rohextrakte eingesetzt, um auszuschließen, dass die fehlende Aktivität aus der Instabilität der Proteine resultiert. Es konnte jedoch weder für die LeST2a noch für die Positiv-Kontrolle AtST2a-Aktivität nachgewiesen werden.

Eine mögliche Ursache könnte bei dem zweiten Substrat PAPS liegen. PAPS ist sehr instabil (bis zu 17 % Umwandlung pro Tag bei 37 °C) und kann nur als unreine Verbindung geliefert werden. Die Hauptverunreinigung ist dabei PAP, für das gezeigt wurde, dass es verschiedene Sulfotransferasen bereits in geringen Konzentrationen kompetitiv inhibiert (KLAASSEN & BOLES 1997). Aus diesem Grund wurde ein anderer Aktivitäts-Assay angewendet.

3.3.5.3 Der Nachweis der Enzymaktivität im gekoppelten Aktivitäts-Assay

Der gekoppelte Aktivitätstest nach BURKART & WONG (1999) verwendet eine weitere ST, die β -Form der Aryl-ST IV aus Ratten-Leber (AST-IV; *genebank*-Zugriffsnummer: X52883). Die AST-IV sulfatiert Aryl-Alkohole unter Verwendung von PAPS als Sulfat-Donor *in vivo* und dient so der Detoxifikation (CHEN *et al.* 1992). Bei diesem gekoppelten Assay katalysiert die AST-IV jedoch die Reaktion von PAP zu PAPS unter Verwendung

von *p*-Nitrophenylsulfat (*p*-NPS) im Überschuss, so dass PAPS aus desulfatiertem PAP regeneriert werden kann (Abb. 3.14).

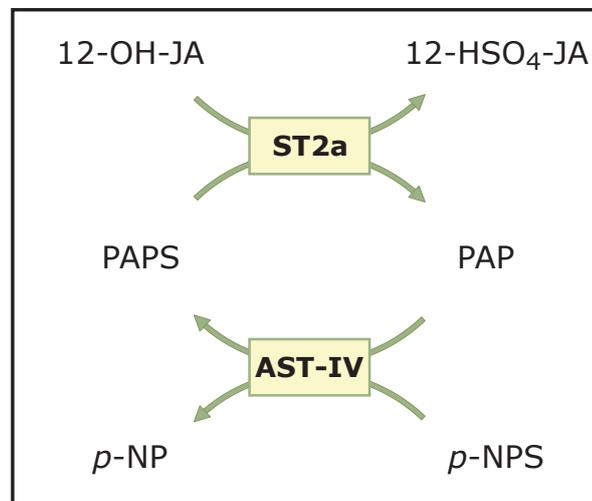


Abb. 3.14: Nachweis der ST2a-Aktivität im gekoppelten Test mit rekombinanter AST-IV und *p*-NPS.

Die Sulfat-Abspaltung von *p*-NPS kann photometrisch verfolgt werden, da entstehendes *p*-Nitrophenol (*p*-NP) Licht mit einer Wellenlänge von 400 nm absorbiert. Von Vorteil sind die Regeneration des Substrates und die Verhinderung der Inhibierung der Sulfotransferasen durch PAP. Des Weiteren kann die Verunreinigung von kommerziell erhältlichem PAPS mit PAP beseitigt werden. Dieser Assay wurde bisher kaum für tierische und noch nie für pflanzliche STs angewendet.

Die Klonierung, Überexpression in *E.coli* und Reinigung der AST-IV

Zur Durchführung des gekoppelten Aktivitäts-Assays zum Nachweis der Aktivität der LeST2a und LeST6 und der AtST2a (als Kontrolle) wurde zuerst die *AST-IV* aus Rattenleber kloniert und überexprimiert. Die cDNA besteht zwischen Start und Stop-Codon aus 966 Nukleotiden und kodiert für 321 AS. Per RT-PCR wurde die *AST-IV*-cDNA amplifiziert, wobei kommerziell erworbene RNA aus Ratten-Leber als Template verwendet wurde. Nach erfolgreicher Klonierung in den Überexpressionsvektor pQE30 (Qiagen, Hilden) erfolgte die Überexpression in *E.coli*-Zellen und eine anschließende Reinigung wie in der Literatur beschrieben (BURKART & WONG 1999). Ein Protein der erwarteten Größe von ca. 34 kDa konnte im denaturierenden SDS-Gel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der Aktivität der AST-IV

Vor Untersuchung der Aktivität der AtST2a, LeST2a und LeST6 in Bezug auf den Umsatz von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA wurde die Aktivität der AST-IV überprüft. Es wurden gereinigte AST-IV in unterschiedlichen Mengen (von 2 bis 40 µg pro Ansatz) und als Substrat 2 mM *p*-NPS und 20 µM PAP verwendet (BURKART & WONG 1999). Die Reaktion wurde photometrisch bei 400 nm verfolgt. Bei der Umsetzung von PAP zu PAPS, katalysiert durch die AST-IV, wird *p*-NPS zu *p*-NP umgesetzt, das Licht mit der Wellenlänge von 400 nm absorbiert. Die Aktivität der AST-IV konnte durch Zunahme der Absorption nachgewiesen werden (Abb. 3.15). Eine Erhöhung der eingesetzten Proteinmenge führte dabei zu einem erhöhten und schnelleren Substratumsatz. Bei einem Einsatz von 40 µg Protein wurden 82 % des eingesetzten PAP innerhalb von 10 Minuten zu PAPS umgesetzt (Abb. 3.15). Weitere Versuche zeigten, dass dieser Umsatz bereits innerhalb der ersten Minute erfolgt, der gekoppelte Assay also nicht durch die AST-IV limitiert werden sollte. Deshalb wurde die Menge von 40 µg bei allen folgenden Versuchen eingesetzt und entspricht ca. 4 mU. Nachdem die Aktivität der AST-IV nachgewiesen werden konnte, wurde weiterhin sichergestellt, dass sie nicht in der Lage ist, 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA umzusetzen (Daten nicht gezeigt).

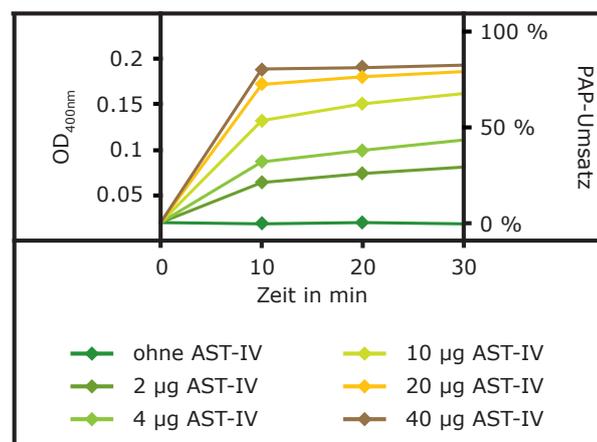


Abb. 3.15: Nachweis der Aktivität der rekombinanten AST-IV (Gereinigte AST-IV in unterschiedlichen Mengen (von 2 bis 40 µg), 2 mM *p*-NPS und 20 µM PAP (in 100 mM bis-tris-Propan, pH 7,0) wurden 30 min bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde photometrisch bei 400 nm verfolgt. Die Messung erfolgte alle 10 min.)

Der Nachweis der Aktivität der AtST2a, LeST2a und LeST6

Sowohl die Überexpression und Reinigung als auch der gekoppelte Enzymtest für AtST2a, LeST2a und LeST6 wurden nach BURKART & WONG (1999) durchgeführt. Als Substrate kamen 20 µM 12-OH-JA, 20 µM PAPS und 2 mM *p*-NPS zum Einsatz. Es wurden 40 µg des Hilfsenzym AST-IV und 100 µg AtST2a, LeST2a bzw. LeST6 eingesetzt.

Der Ansatz wurde ohne AtST2a, LeST2a bzw. LeST6 und 12-OH-JA 30 Minuten vorinkubiert, um Verunreinigungen des PAPS mit PAP zu eliminieren. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die eingesetzte PAPS-Lösung ca. 30 % PAP enthielt, das durch die AST-IV innerhalb von 15 Minuten zu PAPS umgewandelt wird (Daten nicht gezeigt).

Die Aktivität der rekombinanten AtST2a konnte nachgewiesen werden. Es kam zu einem Anstieg der Absorption bei 400 nm nach Zugabe von AtST2a und 12-OH-JA (Abb. 3.16). Auch für die LeST2a gelang der Aktivitätsnachweis. Ein Anstieg der Absorption bei 400 nm konnte ebenfalls nach Zugabe von LeST6 und 12-OH-JA nachgewiesen werden. Die Absorptionsänderungen entsprachen dabei für die AtST2a und die LeST2a einem Substrat-Umsatz von ca. 15 % und für die LeST6 von ca. 7 %. Als Kontrolle diente die Zugabe von AST-IV bzw. Puffer nach Vorinkubation, wobei keine Zunahme der Absorption gemessen werden konnte.

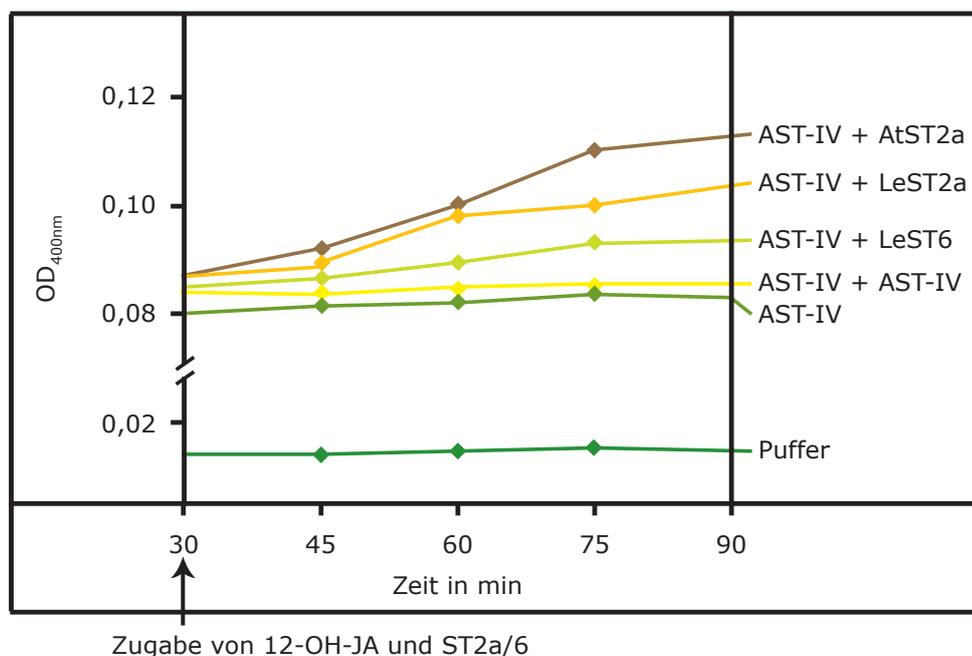


Abb. 3.16: Nachweis der Aktivität rekombinanter AtST2a, LeST2a und LeST6 im gekoppelten Test (20 μ M PAPS, 2 mM *p*-NPS und 40 μ g des Hilfsenzym AST-IV (in 100 mM bis-tris-Propan, pH 7,0) wurden 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 20 μ M 12-OH-JA und 100 μ g AtST2a, LeST2a bzw. LeST6. Der Ansatz wurde eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Die Absorptionsmessung bei 400 nm erfolgte alle 15 Minuten.)

Eine genauere enzymatische Charakterisierung der LeST2a und der LeST6 ist bislang nicht erfolgt. Es konnte aber gezeigt werden, dass die LeST2a in der Lage ist, 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA umzusetzen, und die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich hauptsächlich auf diese ST. Auch die LeST6 konnte diese Reaktion katalysieren, was bedeuten würde, dass in Tomate mehr als nur eine 12-OH-JA-ST existiert. Da allerdings keine weiteren Substrate getestet werden konnten und der Umsatz von 12-OH-JA

gering ausfiel, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die LeST2a und LeST6 auch andere Substrate umsetzen würden.

3.3.6 Die Regulation der Expression der *LeST2a* und *LeST6*

3.3.6.1 Die Induzierbarkeit der Expression durch Verwundung und verschiedene Jasmonate

Für die *AtST2a* war bekannt, dass ihre Expression durch Verwundung, OPDA, JA und 12-OH-JA im Blatt induzierbar ist (GIDDA *et al.* 2003). Des Weiteren wird die Transkription durch artifiziiell lange Dunkelphasen (24 Stunden) induziert (LANGE, persönliche Mitteilung). Recherchen in der Genevestigator Arabidopsis Microarray Datenbank ergaben, dass von den 18 bekannten STs aus Arabidopsis neben der Expression der *AtST2a* nur die der *AtST5b* (eine Desulfo-Glucosinolat-ST; PIOTROWSKI *et al.* 2004) durch JM im Blatt induzierbar ist (ZIMMERMANN *et al.* 2004; <https://www.genevestigator.ethz.ch>). Nach Verwundung wird nur die *AtST2a* exprimiert. Die Induzierbarkeit der Expression der *LeST2a* und *LeST6* durch verschiedene Jasmonate oder Verwundung kann auf ihre Funktion als 12-OH-JA-ST hinweisen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der *LeST2a* durch Northern Blot-Analysen untersucht, wobei vermutlich *LeST2a*- und *LeST6*-Transkript aufgrund ihrer hohen Homologie (vgl. Tab 3.2) gleichzeitig detektiert wurden. Die Expression der *LeST2a/6* war durch Verwundung und exogene Applikation von JM und 12-OH-JA induzierbar, es erfolgte eine Transkript-Akkumulation innerhalb von 24 Stunden (Abb. 3.17). Nach 12-HSO₄-JA-Applikation erfolgte keine Induktion.

FK	Verwund.			Wasser			JM			12-OH-JA			12-HSO ₄ -JA			
0	2	6	24	2	6	24	2	6	24	2	6	24	2	6	24	Zeit [h]
																<i>LeST2a/6</i>
																<i>LeEF1a</i>

Abb. 3.17: Der Einfluss von Verwundung, JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Expression der *LeST2a* und *LeST6*. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden verwundet bzw. in 100 μM JM, 12-OH-JA bzw. 12-HSO₄-JA eingestellt. Wasser-Applikation diente als Kontrolle. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Es wurden jeweils 10 μg Gesamt-RNA eingesetzt. Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*LeST2a*-DNA-Sonde, die aufgrund der hohen Ähnlichkeit vermutlich auch die *LeST6*-mRNA detektiert. Eine Hybridisierung mit einer Sonde gegen *LeEF1a* diente als Beladungskontrolle. Dargestellt sind jeweils 2 unabhängige biologische Proben.)

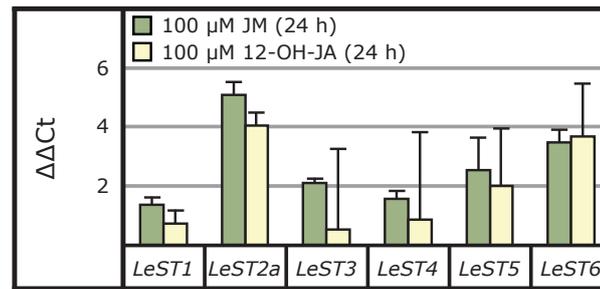


Abb. 3.18: qPCR-Analyse der Expression putativer 12-OH-JA-STs nach JM- und 12-OH-JA-Applikation (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) wurden in 100 μ M JM bzw. 12-OH-JA eingestellt. Wasser-Applikation diente als Kontrolle. Nach 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. 5 μ g Gesamt-RNA wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt und die PCR erfolgte mit 20 ng cDNA als Template. Der Δ Ct-Wert einer Probe für ein bestimmtes Gen ergibt sich aus der Differenz des Ct-Wertes für dieses Gen und dem Ct-Wert des Kontroll-Gens *LeEF1a*. Der dargestellte $\Delta\Delta$ Ct-Wert ist die Differenz aus dem Δ Ct-Wert einer Applikation und dem Δ Ct-Wert der entsprechenden Wasser-Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen biologischen Proben und je 2 technischen Replikaten, sowie die Standardabweichung.)

Zur eindeutigen Unterscheidung der *LeST2a*- und *LeST6*-Transkripte wurde die Induzierbarkeit der Expression durch JM und 12-OH-JA per qPCR überprüft und bestätigt (Abb. 3.18). Die Expression der anderen vier putativen 12-OH-JA-ST-Gene (vgl. Tab. 3.1), für die keine vollständigen Sequenzinformationen vorhanden waren, wurde ebenfalls nach Applikation von JM und 12-OH-JA per qPCR untersucht. Dies sollte einen Hinweis darauf geben, ob unter ihnen noch weitere putative 12-OH-JA-Sulfotransferasen existieren könnten. Weder für *LeST1*, 3, 4 oder 5 konnte eine Induktion der Expression nach JM bzw. 12-OH-JA-Applikation nachgewiesen werden (Abb. 3.18).

3.3.6.2 Die COI-Abhängigkeit der *LeST2a*-Expression

Die Expression einer Vielzahl von JA-induzierbaren Genen ist abhängig von COI1. Da die Expression der *LeST2a* bzw. *LeST6* JA-induzierbar ist, stellte sich die Frage, inwieweit dies abhängig von COI1 ist. Um dieser Frage nachzugehen kam die Mutante *jai1* zum Einsatz. *JAI1* ist das Tomaten-Homologe zu Arabidopsis *COI1* in Tomate (Li *et al.* 2004a). Es erfolgte die Applikation von JM und 12-OH-JA an *jai1*- und den entsprechenden Wildtyp-Blättern (WT Castlemart). Nach 2 und 24 Stunden wurde die Expression der *LeST2a/6* mittels Northern Blot-Analyse nachgewiesen.

In den Blättern des Wildtyps Castlemart war, wie erwartet, die Induktion der Expression von *LeST2a/6* nach Applikation von 12-OH-JA und JM nachweisbar (Abb. 3.19). In der Mutante *jai1* war hingegen keine Transkript-Akkumulation nach Applikation von JM oder 12-OH-JA zu beobachten. Dies zeigt, dass die Expression der *LeST2a/6* von COI abhängig ist.

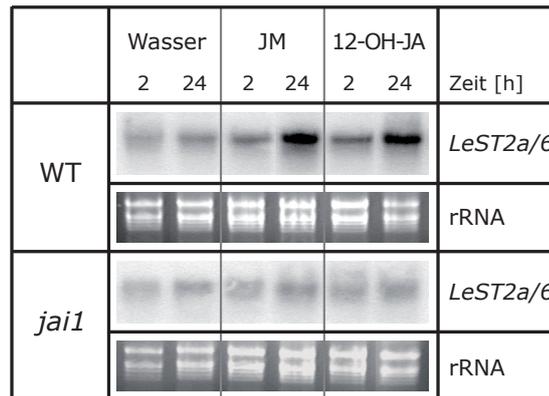


Abb. 3.19: Northern Blot Analyse der COII-abhängigen Expression der *LeST2a* und *LeST6* (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (WT Castlemart und Mutante *jai1-1*) wurden in 100 μ M JM bzw. 12-OH-JA eingestellt. Wasser-Applikation diente als Kontrolle. Nach 2 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. Es wurden jeweils 10 μ g Gesamt-RNA eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*LeST2a*-DNA-Sonde, die aufgrund der hohen Ähnlichkeit vermutlich auch die *LeST6*-mRNA detektiert. EtBr-gefärbte rRNA diente als Beladungskontrolle.)

3.3.7 Die organspezifische Expression der *LeST2a*

Aufgrund des nachgewiesenen 12-OH-JA-Umsatzes durch die *LeST2a* und *LeST6*, sowie der Induzierbarkeit der Genexpression durch Verwundung, JM und 12-OH-JA ist es wahrscheinlich, dass es sich um 12-OH-JA-STs handelt. Für die Aufklärung möglicher Funktionen von 12-OH-JA kann die organspezifische Expression der *LeST2a/6* Hinweise liefern. Sie gibt Aufschluss darüber, in welchen Geweben bzw. Organen eine Metabolisierung von 12-OH-JA oder ein Abschalten des JA-Signals durch Metabolisierung stattfinden kann (vgl. 3.2). Die organspezifische Expression wurde mittels Northern Blot-Analysen im Wildtyp Lukullus untersucht. Dabei war eine Unterscheidung zw. *LeST2a*- und *LeST6*-Transkript im Northern Blot aufgrund ihrer hohen Homologie nicht möglich.

In den vegetativen Organen Wurzel, Stengel und Blatt war die Expression der *LeST2a/6* nicht nachweisbar (Abb. 3.20). Dem entspricht der geringe 12-OH-JA- und 12-HSO₄-JA-Gehalt im unverwundeten Blatt (vgl. 3.1.1). In der Wurzelspitze wurde *LeST2a/6*-Transkript nachgewiesen. In diesem Pflanzenteil konnte auch 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden (OKA, persönliche Mitteilung). Im Keimling, in Knospen und in offenen Blüten wurde *LeST2a/6*-mRNA abundant detektiert. Da in den einzelnen Blütenteilen von Tomate verschiedene Jasmonate in unterschiedlichen Mengen und Verhältnissen nachgewiesen wurden (HAUSE *et al.* 2000) und in den Blüten des 35S::*AtST2a-sense*-Tabaks sehr auffällige phänotypische Veränderungen der Staubblätter auftraten (vgl. 1.2.3.3), wurden die einzelnen Blütenteile hinsichtlich der Expression der *LeST2a/6* genauer un-

tersucht. So erfolgt die Expression im Blütenstiel, den Kelchblättern und dem Stempel. Dagegen konnte in den Blüten- und Staubblättern keine Expression detektiert werden.

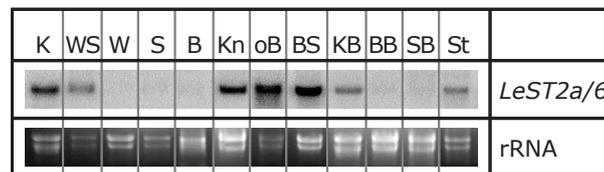


Abb. 3.20: Organspezifische Expression der *LeST2a* und *LeST6*. (Gesamt-RNA wurde aus den entsprechenden Organen von Tomaten-Pflanzen (WT Lukullus) isoliert. Jeweils 15 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*LeST2a*-DNA-Sonde, die aufgrund der hohen Ähnlichkeit vermutlich auch die *LeST6*-mRNA detektiert. Die EtBr-gefärbte rRNA diente als Beladungskontrolle. K-Keimling, WS-Wurzelspitze, W-Wurzel, S-Stengel, B-Blatt, Kn-Knospe, oB-offene Blüte, BS-Blütenstiel, KB-Kelchblätter, BB-Blütenblätter, SB-Staubblätter, St-Stempel)

Für die Blütenorgane und Knospen wurden die Transkript-Analysen per qPCR wiederholt. Dabei konnten die Transkripte der *LeST2a* und *LeST6* von einander unterschieden werden. Es zeigte sich, dass die *LeST6* kaum exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Das *LeST2a*-Transkript konnte hingegen in allen Blütenteilen, bis auf die Staubblätter nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.3.8 Zusammenfassung

Es konnten, ausgehend von der *AtST2a*-Sequenz, zwei cDNAs identifiziert werden, die für mögliche 12-OH-JA-Sulfotransferasen in Tomate kodieren (*LeST2a* und *LeST6*). Es gelang die Klonierung und Überexpression der beiden LeSTs, und der enzymatische Umsatz von 12-OH-JA konnte für beide LeSTs gezeigt werden. Beide Proteine besitzen kein Signal-Peptid und gehören somit höchstwahrscheinlich zur Gruppe der löslichen STs. Des Weiteren konnte eine organspezifische Expression und die Induzierbarkeit der Expression durch Verwundung, JM- oder 12-OH-JA-Applikation, sowie die COI-Abhängigkeit der Expression gezeigt werden. Diese Daten sprechen dafür, dass *LeST2a* und *LeST6* für funktionale 12-OH-JA-STs kodieren.

3.4 Die Generierung und Selektion transgener Tomatenpflanzen, die die *AtST2a* in *sense*- und die *LeST2a* in *sense*- und *antisense*-Orientierung überexprimieren

Zur Modulation des endogenen 12-OH-JA- und 12-HSO₄-JA-Gehaltes sollte eine cDNA, die für eine 12-OH-JA-Sulfotransferase in Tomate kodiert, unter Kontrolle des 35S-Promotors in *sense*- und *antisense*-Orientierung exprimiert werden. Ein *sense*-Ansatz

sollte den Gehalt an 12-OH-JA erniedrigen und den von 12-HSO₄-JA erhöhen. Für eine Expression in *antisense*-Orientierung wurde ein gegenteiliger Effekt erwartet. Durch stabile Transformation sollte zum einen die *LeST2a* überexprimiert werden und zum anderen sollte durch einen *antisense*-Ansatz ein Abbau des endogen gebildeten *LeST2a*-Transkripts erfolgen. Da der Nachweis der Aktivität der *LeST2a* Teil dieser Arbeit war und zu Beginn der Transformationsarbeiten noch nicht abgeschlossen war, wurde zusätzlich die *AtST2a* heterolog überexprimiert. Die *AtST2a* konnte bereits als enzymatisch aktiv nachgewiesen werden (GIDDA *et al.* 2003). Bei heterologer Expression der *AtST2a* in Tabak traten phänotypische Veränderungen der Blüten auf (VARIN *et al.* 2003; vgl. 3.6.1). Des Weiteren ermöglichte die Überexpression der *AtST2a* in Tomate einen Vergleich zwischen homologer und heterologer Überexpression und kann Hinweise auf mögliche post-translationale Modifikationen der *LeST2a* geben. Auftretende phänotypische Veränderungen der transgenen Tomaten-Pflanzen sollten Rückschlüsse auf Prozesse, an denen 12-OH-JA beteiligt ist, erlauben.

3.4.2 Die Klonierung, der Agrobacterium-vermittelte Gentransfer und die Regeneration transgener Pflanzen

Der binäre Vektor pBI-101-526, der verwendet wurde, um die *AtST2a* sowohl in Tabak als auch in Arabidopsis zu exprimieren, lag vor (GIDDA 2001; Abb. 3.21). Der Vektor pBI-101-526 enthält neben dem 35S-Promotor und einer AMV-Enhancer-Sequenz ebenfalls das *NPTII*-Gen, unter Kontrolle des NOS-Promotors (DALTA *et al.* 1993). Dies erlaubt die Selektion transgener Pflanzen durch Kanamycin-Behandlung. Zur Expression der *AtST2a* in *sense*-Orientierung wurde der vorhandene Vektor, nach Überprüfung der Sequenz durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung, unverändert eingesetzt. Zur Expression der *LeST2a* in *sense*- bzw. *antisense*-Orientierung wurde die *AtST2a*-Sequenz durch Restriktionsverdau entfernt und durch die *LeST2a*-Sequenz ersetzt (vgl. 2.2.5.3). Dies wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Die drei Konstrukte wurden in *A. tumefaciens* transformiert. Diese wiederum wurden zur stabilen Transformation von Kotyledonen-Stücken von 14-Tage alten Tomaten-Keimlingen eingesetzt. Nach der Bildung von Sprossen aus Kalli wurden diese von den Kalli getrennt und auf Bewurzelungsmedium überführt. Zu einer ersten Selektion enthielt das Bewurzelungsmedium Kanamycin. Nahezu 80 % aller umgesetzten Sprosse bildeten innerhalb von 2 Wochen Wurzeln. Aus einem Kallus wurden bis zu 12 Pflanzen regeneriert. Die Pflanzen, die von einem Kallus stammten, gingen aus demselben Transformationsereignis hervor. Es handelte sich somit um genetisch identische Pflanzen. Als unabhängige transgene Linien wurden nur Pflanzen bezeichnet, die von verschiedenen Kalli abstammten.

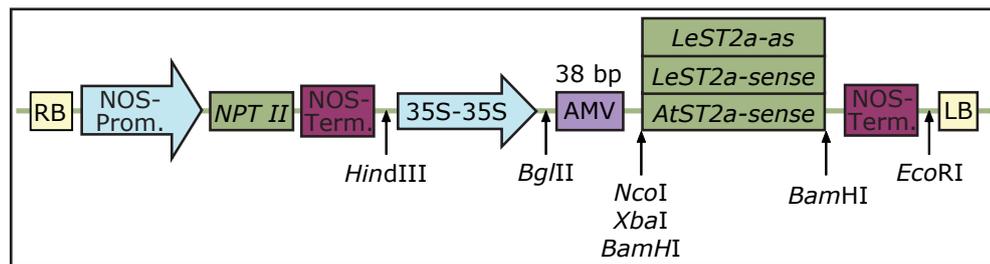


Abb. 3.21: Schematische Darstellung der T-DNA des binären Vektors pBI-101-526, der zur stabilen Transformation von Tomaten eingesetzt wurde (Prom. - Promotor; Term. - Terminator; LB/RB - left/right border).

3.4.3 Die Nomenklatur transgener Pflanzen und Linien

Im Folgenden wird zum besseren Verständnis die Nomenklatur der generierten transgenen Pflanzen bzw. Linien am Bsp. der Pflanze A12-3-4 beschrieben:

- A – Transformationsansatz
- A12 – Nummer des Kallus
- A12-3 – der dritte bewurzelte Spross, der aus dem Kallus A12 hervorgegangen ist (Primärtransformante), dient für die folgenden Generationen als Bezeichnung für eine unabhängige transgene Linie
- A12-3-4 – vierter Nachkomme der Pflanze A12-3 (Generation T1)

Bei den Ansätzen A bis D erfolgte die Transformation mit dem *35S::AtST2a-sense*-Konstrukt, beim Ansatz E mit *35S::LeST2a-antisense*-Konstrukt und bei den Ansätzen F, G und J mit dem *35S::S-LeST2a-sense*-Konstrukt.

3.4.4 Die Selektion der Primärtransformanten

3.4.4.1 Der Nachweis des Transgens per PCR

Nachdem die von den Kalli getrennten, Kanamycin-resistenten Sprosse Wurzeln gebildet hatten, wurde das Vorhandensein des Transgens per PCR nachgewiesen. Als Template für die PCR diente dabei aus Blattstückchen gewonnene genomische DNA. Es wurde ein Primer verwendet, der spezifisch an die AMV-Enhancer-Sequenz bindet und ein Primer, der spezifisch an die *LeST2a*- bzw. *AtST2a*-Sequenz bindet. Im nativen Agarose-Gel war für das *AtST2a-sense*-Konstrukt eine Bande von ca. 700 bp und für das *LeST2a-sense*- bzw. *LeST2a-antisense*-Konstrukt eine Bande von ca. 1100 bp nachweisbar (Abb. 3.22).

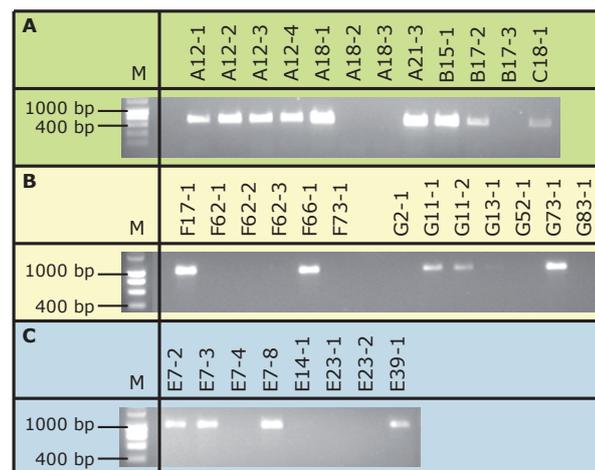


Abb. 3.22: Selektion der Primärtransformanten per PCR (Bsp.)

(Aus Blättern gewonnene genomische DNA diente als Template für eine PCR zum Nachweis einer erfolgreichen Transformation. Ein Primer bindet dabei spezifisch an die AMV-Enhancer-Sequenz und der andere an die *AtST2a*- bzw. *LeST2a*-Sequenz. Das daraus resultierende Fragment besitzt eine Größe von ca. 700 bzw. 1100 bp. M: Marker - Smart Ladder (Eurogentech); grün: *35S::AtST2a-sense*; gelb: *35S::LeST2a-sense*; blau: *35S::LeST2a-antisense*)

In 38 von 83 regenerierten Pflanzen konnte das *35S::AtST2a-sense*-Konstrukt nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in 37 von 103 regenerierten Pflanzen das *35S::LeST2a-sense*-Konstrukt und in 5 von 51 Pflanzen das *35S::LeST2a-antisense*-Konstrukt detektiert. Die positiv getesteten Pflanzen stammten jedoch nicht alle von unterschiedlichen Kalli. Die Zahl der unabhängigen transgenen Linien reduzierte sich folgendermaßen:

- 35S::AtST2a-sense* – 25 Linien,
- 35S::LeST2a-sense* – 26 Linien,
- 35S::LeST2a-antisense* – 1 Linie.

3.4.3.2 Die Selektion anhand des Expressionslevels

Da das Vorhandensein des Konstruktes noch keine Aussage über den Grad der Expression des Transgens zuließ, wurde die Expression durch Northern Blot-Analysen untersucht. Die *AtST2a*- bzw. *LeST2a*-mRNA wurde mit Hilfe von spezifischen Volllänge-DNA-Sonden nachgewiesen. Im Fall der *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen wurde unbehandeltes Blattmaterial verwendet, da aufgrund des 35S-Promotors die Expression konstitutiv sein sollte. Für den Nachweis des *antisense*-Effektes wurden die Blätter verwundet, da die Expression der *LeST2a* im Blatt erst dann erfolgt und der *antisense*-Effekt sichtbar wird. Vier Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet. Für alle Versuche dienten entsprechend verwundete bzw. unverwundete Wildtyp-Pflanzen als Kontrolle.

Eine Überexpression der *AtST2a* im Vergleich zum Wildtyp Lukullus zeigten die Pflanzen A12-2, -3 und -4, B15-1 und -2, B4-2, C18-1 und -4, D8-2, D20-1 und D54-1 und -3 (Abb. 3.23). Die anderen Linien zeigten nur eine schwache bzw. keine Überexpression. Im Wildtyp war, wie erwartet, keine Expression der *AtST2a* nachweisbar. Eine Überexpression der *LeST2a* konnte für die Pflanzen F62-4, G10-1, G11-4, G33-2 und -3 und G73-1 nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Der *LeST2a-antisense*-Effekt konnte in 2 Pflanzen gezeigt werden (Abb. 3.25). Allerdings stammten beiden Pflanzen von derselben Primärtransformante ab und waren daher sehr wahrscheinlich nicht als unabhängige Linien anzusehen.

Aufgrund der erfolgten Northern Blot-Analysen wurden folgende Pflanzen für eine nähere Charakterisierung hinsichtlich ihres 12-OH-JA-Gehaltes, der Wiederholung der Transkript-Analyse und zur Samengewinnung ausgewählt:

35S::*AtST2a-sense*: A12-3, B15-1, C18-1, D20-1 D54-1

35S::*LeST2a-sense*: F67-2, G11-4, G13-5, G33-3, G73-1

35S::*LeST2a-antisense*: E7-1, E7-2, E7-3.

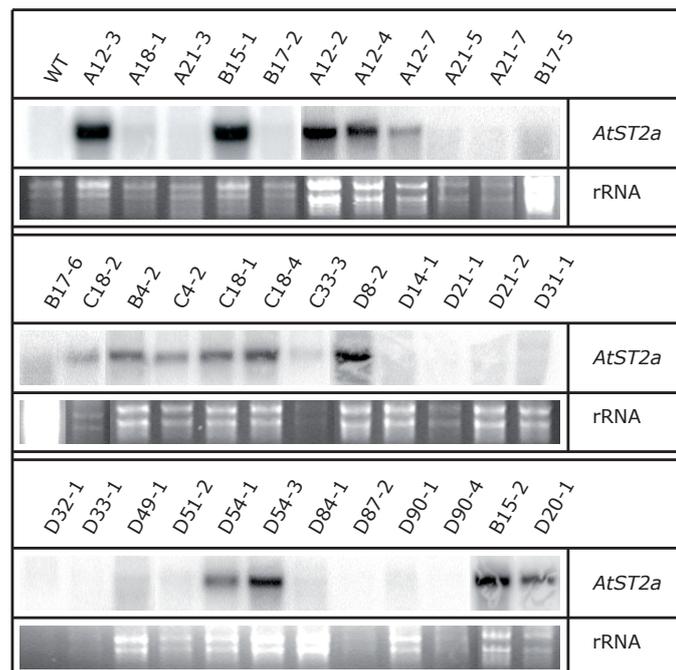


Abb. 3.23: Northern Blot-Analyse der Expression der *AtST2a* in den Primärtransformanten

(35S::*AtST2a-sense*)

(Es wurde Gesamt-RNA aus Blättern von ca. 6 Wochen alten Pflanzen (verschiedene Primärtransformanten und WT Lukullus als Negativ-Kontrolle) isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*AtST2a*-DNA-Sonde. Als Beladungskontrolle diente EtBr-gefärbte rRNA.)

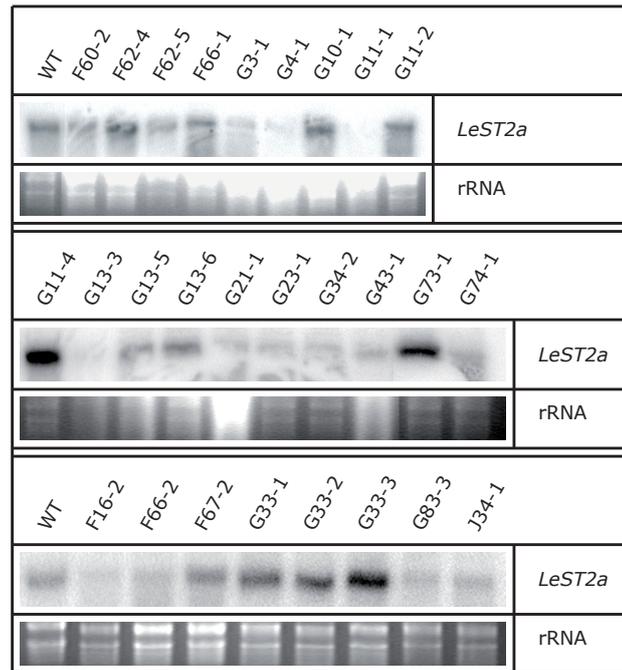


Abb. 3.24: Northern Blot-Analyse der Expression der *LeST2a* in den Primärtransformanten (*35S::LeST2a-sense*)
(Es wurde Gesamt-RNA aus Blättern von ca. 6 Wochen alten Pflanzen (verschiedene Primärtransformanten und WT Lukullus als Negativ-Kontrolle) isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*LeST2a*-DNA-Sonde. Als Beladungskontrolle diente EtBr-gefärbte rRNA.)

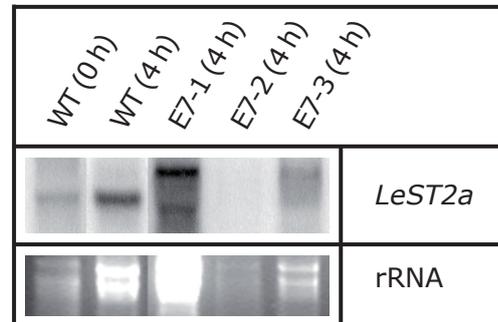


Abb. 3.25: Northern Blot-Analyse der Expression der *LeST2a* in den Primärtransformanten (*35S::LeST2a-antisense*)
(Es wurde Gesamt-RNA aus Blättern, 4 Stunden nach Verwundung, von ca. 6 Wochen alten Pflanzen (verschiedene Primärtransformanten und WT Lukullus als Negativ-Kontrolle) isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*LeST2a*-DNA-Sonde. Als Beladungskontrolle diente EtBr-gefärbte rRNA.)

3.4.3.3 Die *ST2a*-Expression und die Jasmonat-Gehalte ausgewählter Pflanzen

Zur Bestätigung der Überexpression des Transgens bzw. des *antisense*-Effektes wurden die Northern Blot-Analysen für die ausgewählten transgenen Pflanzen wiederholt (vgl. 3.4.3.2). Des Weiteren sollte überprüft werden, ob und wie der 12-OH-JA- und 12-HSO₄-JA-Gehalt in den transgenen Pflanzen verändert war. Hierfür wurden die Pflanzen verwundet. Wie bereits mehrfach beschrieben, induziert Verwundung die

JA-Bildung, was notwendig ist für die Bildung von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA (vgl. 3.1.1 und 3.1.3). 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Gehalte von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA bestimmt. Da es sich um Primärtransformanten handelte und somit dieser Versuch nur erste Hinweise auf veränderte Jasmonat-Gehalte aufgrund der Expression der Transgene geben sollte, wurden nur Einfach-Bestimmungen durchgeführt. Die *ST2a*-Expression wurde 6 Stunden nach Verwundung mittels Northern Blot-Analysen überprüft.

Die Überexpression der *AtST2a* und der *LeST2a* konnte ebenso wie der *antisense*-Effekt bestätigt werden (Abb. 3.26).

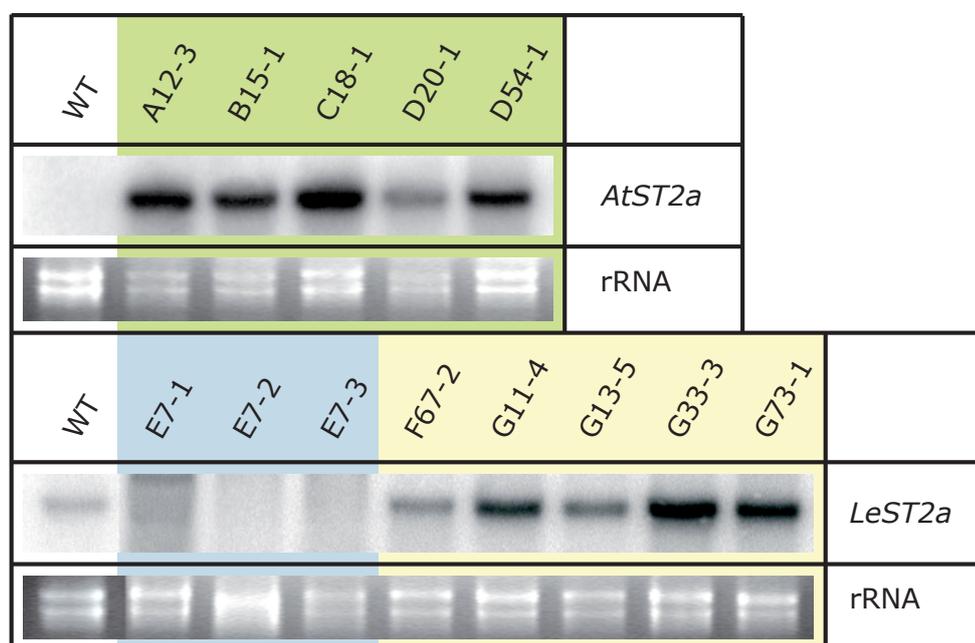


Abb. 3.26: Northern Blot-Analyse der Expression der *AtST2a* und *LeST2a* in ausgewählten transgenen Linien
(Es wurde Gesamt-RNA aus Blättern, 6 Stunden nach Verwundung, von ca. 6 Wochen alten Pflanzen (Primärtransformanten und WT Lukullus als Negativ-Kontrolle) isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*At/LeST2a*-DNA-Sonde. Als Beladungskontrolle diente die EtBr-gefärbte rRNA. grün: 35S::*AtST2a-sense*; blau: 35S::*LeST2a-antisense*; gelb: 35S::*LeST2a-sense*)

Alle Pflanzen, die die *AtST2a* überexprimierten, zeigten 6 Stunden nach Verwundung eine Reduktion des 12-OH-JA-Gehaltes und eine drastische Erhöhung des 12-HSO₄-JA-Gehaltes gegenüber dem Wildtyp (Abb. 3.27). Demnach ist das Transgen funktional. Eine Veränderung der JA-Gehalte gegenüber dem Wildtyp konnte nicht beobachtet werden.

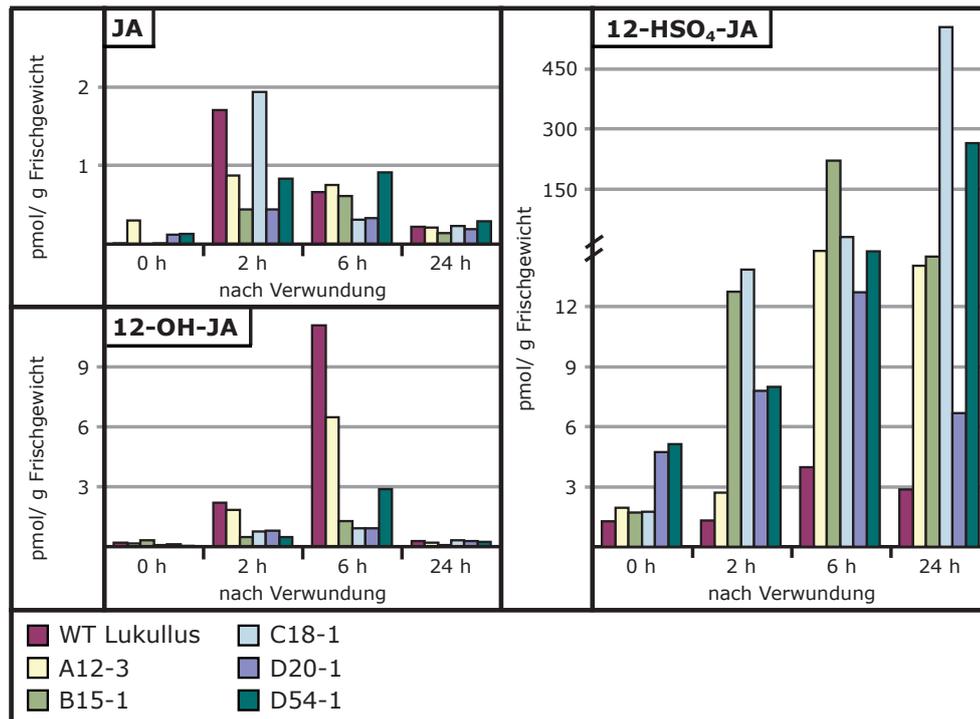


Abb. 3.27: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Wildtyp Lukullus und ausgewählten 35S::AtST2a-sense-Pflanzen. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt.)

Eine Verringerung des 12-OH-JA-Gehaltes in Bezug auf den Wildtyp erfolgte 6 Stunden nach Verwundung auch in den *LeST2a-sense*-Pflanzen (Abb. 3.28). Eine dramatische Zunahme der 12-HSO₄-JA-Menge wie bei den *AtST2a-sense*-Pflanzen lässt sich nicht nachweisen. Lediglich die Linien G11-4, G73-1 und G33-3, die auch die stärkste *LeST2a*-Überexpression aufwiesen, zeigten einen um das ca. 5-fache erhöhten 12-HSO₄-JA-Gehalt. Dabei trat dies bei den ersten beiden Linien schon und nur im unverwundeten Zustand auf und bei der Linie G33-3 nur 24 Stunden nach Verwundung. Die *LeST2a-sense*-Pflanzen zeigten gegenüber dem Wildtyp keine Veränderungen der JA-Gehalte.

Die Reduktion des Transkripts in den *LeST2a-antisense*-Pflanzen spiegelte sich im 12-OH-JA- und 12-HSO₄-JA-Gehalt nicht wieder (Abb. 3.29). Der *antisense*-Effekt konnte auf Ebene der Jasmonat-Werte nicht gezeigt werden.

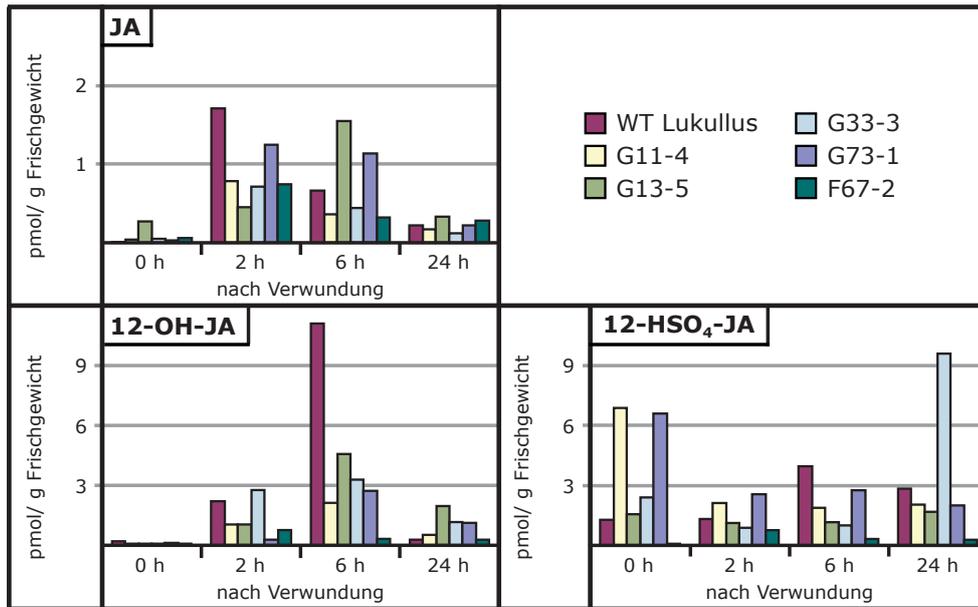


Abb. 3.28: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Wildtyp Lukullus und ausgewählten 35S::LeST2a-sense-Pflanzen. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt.)

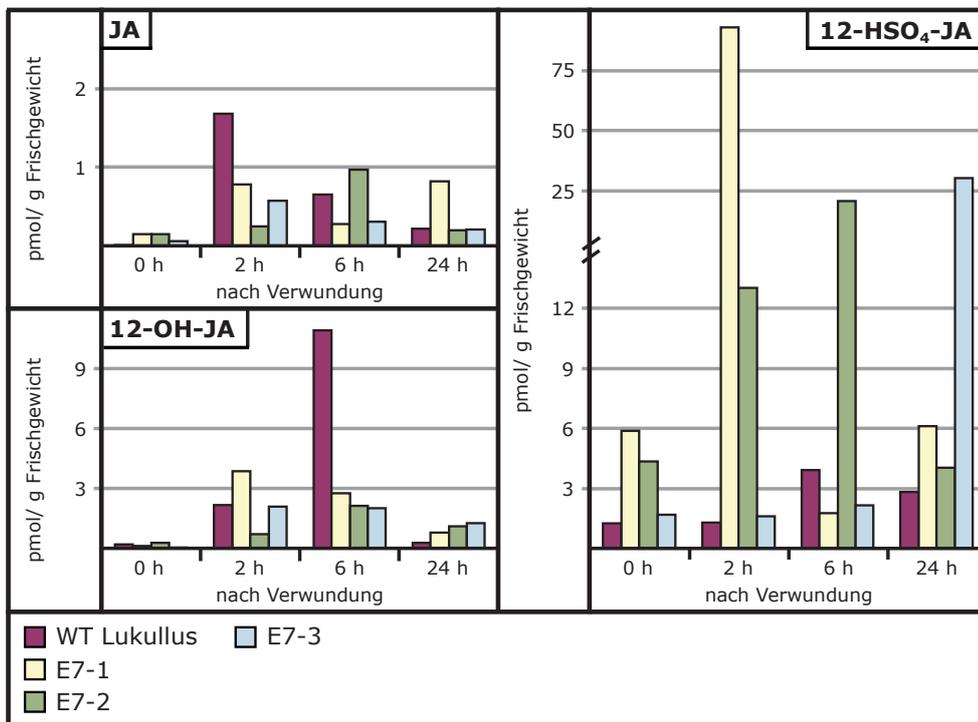


Abb. 3.29: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Wildtyp Lukullus und ausgewählten 35S::LeST2a-antisense-Pflanzen. (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt.)

Dieser Versuch sollte erste Hinweise bezüglich veränderter Jasmonat-Gehalte in den transgenen Pflanzen ergeben. Die untersuchten *AtST2a-sense*-Pflanzen und einige der *LeST2a-sense*-Pflanzen zeigten die aufgrund der Überexpression erwarteten Veränderungen, die *LeST2a-antisense*-Pflanzen hingegen nicht. Da es sich noch um Primärtransformanten handelte, sind genauere Aussagen erst nach Untersuchung der Folgenerationen möglich. Die Überexpression bzw. der *antisense*-Effekt wurde in allen untersuchten Pflanzen nachgewiesen. Deshalb wurde Saatgut dieser Linien für weitere Analysen der nachfolgenden Generationen hinsichtlich Expression, Veränderungen der Jasmonat-Gehalte sowie des Phänotyps, gewonnen.

3.5 Phänotypische Veränderung durch Überexpression der *AtST2a* und *LeST2a* in Tomate

Welche Auswirkungen eine Modulation des endogenen 12-OH-JA- bzw. 12-HSO₄-JA-Gehaltes durch Überexpression der *AtST2a* in *sense*- bzw. der *LeST2a* in *sense*- und *antisense*-Orientierung hat, sollte eine phänotypische Charakterisierung der transgenen Pflanzen der Generation T1 zeigen. Veränderungen des Phänotyps würden Rückschlüsse darüber erlauben, welche Prozesse durch 12-OH-JA beeinflusst werden. Die heterologe Überexpression der *AtST2a* in Tabak führte zu einer veränderten Blütenmorphologie (VARIN *et al.* 2003). Deshalb wurde zum einen der Blütenphänotyp der transgenen Tomaten untersucht und zum anderen erfolgte eine genauere Analyse des Tabak-Phänotyps bezogen auf eventuelle Ähnlichkeiten zu Tomate. Da der JA-Metabolismus in den transgenen Pflanzen verändert war, wurden weiterhin durch JA beeinflussbare Prozesse, wie Keimung, Wurzelwachstum und Wundantwort, untersucht. Zuvor wurden alle untersuchten Pflanzen auf Vorhandensein des Konstruktes und hinsichtlich der Expression der *AtST2a* bzw. *LeST2a* getestet. Des Weiteren wurde die Kopienzahl der einzelnen Linien bestimmt und analysiert, ob eine vermehrte bzw. verringerte Bildung von 12-HSO₄-JA vorlag.

3.5.1 Selektion der Generation T1

Alle ausgesäten bzw. für die Experimente verwendeten Pflanzen wurden zuerst per PCR auf die Anwesenheit des Transgens getestet (vgl. 3.4.3.1). Nur positiv getestete Pflanzen wurden weiter verwendet. Negativ getestete Pflanzen dienten als Kontrolle, um auszuschließen, dass auftretende phänotypische Veränderungen durch Veränderungen des Genoms als Begleiterscheinung der eigentlichen Transformation hervorgerufen wurden.

Die Überexpression bzw. der *antisense*-Effekt wurden per Northern Blot-Analyse bzw. qPCR überprüft. Die Überexpression der *AtST2a* und die der *LeST2a* konnte bestätigt werden (Abb. 3.30). Der *antisense*-Effekt hingegen konnte in der Generation T1 der *35S::LeST2a-antisense*-Linien nicht gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden sind deshalb nur die Ergebnisse der Untersuchungen der *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen dargestellt.

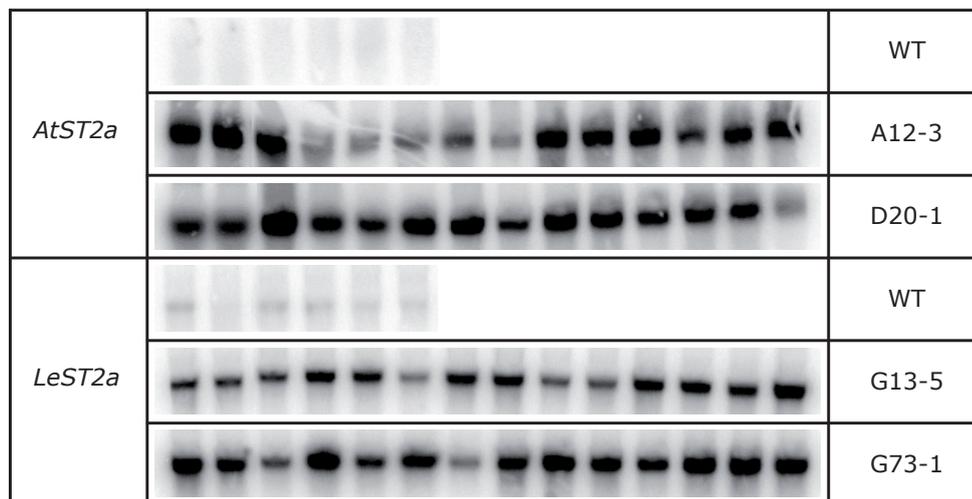


Abb. 3.30: Northern Blot-Analyse der Expression der *AtST2a* und *LeST2a* in 6 Wildtyp Lukullus- und je 14 transgenen Pflanzen der Generation T1 (Es wurde Gesamt-RNA aus Blättern von ca. 6 Wochen alten Pflanzen isoliert. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Volllänge-*At/LeST2a*-DNA-Sonde. *35S::AtST2a-sense*: A12-3 und D20-1; *35S::LeST2a-sense*: G13-5 und G73-1)

3.5.2 Die Bestimmung der Kopienzahl

Die Anzahl der Insertionen der *AtST2a-sense*- bzw. *LeST2a-sense*-Konstrukte wurde durch die Untersuchung des Segregationsmusters der Pflanzen der Generation T1 bestimmt. Bei einer Kopie entspricht das Verhältnis transgen zu Wildtyp 4:1, bei zwei Kopien 16:1 und bei mehr als zwei Kopien ist die Wahrscheinlichkeit, dass keine Kopie vererbt wird, also nicht-transgene Pflanzen nachgewiesen werden können, annähernd null. Eine Ausnahme tritt auf, wenn zwei oder mehr Kopien auf demselben Chromosom nicht weit genug voneinander entfernt liegen und damit durch *crossing-over* während der Meiose nicht getrennt vererbt werden können.

Folgende Pflanzen, die auch für alle anderen Versuche eingesetzt wurden, wurden hinsichtlich der Kopienzahl analysiert:

35S::AtST2a-sense – A12-3, C18-1, D20-1 und D54-1

35S::LeST2a-sense – G11-4, G13-5, G33-3 und G73-1.

Es wurde die Anzahl der keimenden Samen bestimmt, sowie die Anzahl der transgenen und nicht-transgenen Keimlinge. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Linien in Tabelle 3.3 zusammengefasst. Für alle Linien konnten unter den Keimlingen der Generation T1 nicht-transgene Pflanzen nachgewiesen werden. Es erfolgte eine Segregation in Wildtyp- und transgene Pflanzen, was bedeutet, dass wahrscheinlich alle untersuchten Linien maximal 2 Kopien des entsprechenden Konstruktes tragen. Unter den Samen der Pflanze C18-1 (*AtST2a-sense*) und G73-1 (*LeST2a-sense*) waren rund 5 % bis 8 % Wildtyp, was in etwa einer Aufspaltung von 16:1 und somit 2 Kopien entspricht. Unter den Nachkommen der Linie A12-3 waren 15 % Wildtyp-Pflanzen. Es könnte sich sowohl um eine als auch zwei Kopien handeln. Für die übrigen Linien lag der Anteil an Wildtyp-Pflanzen bei mindestens 21 %, womit höchstwahrscheinlich nur eine Kopie des Konstruktes im Genom vorhanden war.

Linie	ausgesät	gekeimt	transgen	Wildtyp	Anteil Wildtyp (%)
A12-3	47	32	25	7	15
C18-1	95	38	30	8	8
D20-1	164	125	29	96	59
D54-1	107	86	59	27	25
G11-4	56	41	26	15	27
G13-5	80	50	35	15	19
G33-3	24	14	9	5	21
G73-1	56	35	32	3	5

Tab. 3.3: Segregationsanalyse transgener Pflanzen der Generation T1 (35S::*AtST2a-sense*: A12-3, C18-1, D20-1 und D54-1; 35S::*LeST2a-sense*: G11-4, G13-5, G33-3 und G73-1)

3.5.3 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA nach Verwundung

Bei Überexpression der *AtST2a* bzw. *LeST2a* sollten die 12-HSO₄-JA-Gehalte erhöht und die 12-OH-JA-Gehalte reduziert sein. Es wurden die Gehalte von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung im Tomatenblatt bestimmt. Die Nachkommen (T1) der folgenden Pflanzen wurden untersucht:

35S::*AtST2a-sense* – A12-3, D20-1 und D54-1

35S::*LeST2a-sense* – G13-5 und G73-1.

Die Jasmonat-Gehalte innerhalb der *AtST2a*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen waren annähernd gleich, weshalb nur die Ergebnisse für die Linien D20-1 und G13-5 in Abbildung 3.31 dargestellt sind. Der OPDA-Gehalt war nach Verwundung in den transgenen Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Im Grundzustand

waren die einzelnen Jasmonate in allen Linien, sowie im Wildtyp kaum nachweisbar. Nach Verwundung kam es zu einem transienten Anstieg der JA-Gehalte, der in den *AtST2a-sense*-Linien in etwa dem im Wildtyp entsprach und in den *LeST2a-sense*-Linien nur etwa halb so stark ausfiel. 24 Stunden nach Verwundung entsprach der JA-Gehalt in allen Pflanzen wieder dem Ausgangszustand vor Verwundung. Eine transiente Akkumulation von 12-OH-JA konnte ebenfalls im Wildtyp und allen transgenen Linien nachgewiesen werden, wobei dieser in den transgenen Pflanzen schwächer ausfiel. Die 12-OH-JA-Gehalte entsprachen 6 Stunden nach Verwundung in den *AtST2a-sense*-Linien etwa einem Drittel und in den *LeST2a-sense*-Linien etwa der Hälfte des Wildtyp-Gehaltes. Der Anstieg des 12-O-Gluc-JA-Gehaltes innerhalb von 24 Stunden nach Verwundung war in den *AtST2a-sense*-Pflanzen nur etwa halb so groß wie im Wildtyp. Die Reduktion des 12-OH-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehaltes entsprach den Erwartungen nach Überexpression der *AtST2a*. Parallel dazu sollte eine Zunahme des 12-HSO₄-JA-Gehaltes gegenüber dem Wildtyp erfolgen. Dies konnte jedoch nur für die *AtST2a-sense*-Pflanzen quantitativ sehr deutlich nachgewiesen werden. In diesen Pflanzen konnte mindestens 5mal mehr 12-HSO₄-JA nach Verwundung nachgewiesen werden. Das nur geringe Vorkommen von 12-HSO₄-JA in den *AtST2a-sense*-Pflanzen vor Verwundung macht die Substrat-Abhängigkeit der Sulfat-Generierung deutlich. In den *LeST2a-sense*-Pflanzen konnte hingegen keine Zunahme der 12-HSO₄-JA-Menge oder eine Reduktion der 12-O-Gluc-JA-Menge im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Ganz im Gegenteil konnte selbst nach Verwundung nur sehr wenig 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden. Mit weniger als 0.1 nmol pro Gramm Frischgewicht entsprach der Gehalt 6 Stunden nach Verwundung nur etwa einem 20tel des Wildtyp-Gehaltes.

In den *AtST2a-sense*-Pflanzen waren erwartungsgemäß im Vergleich zum Wildtyp der 12-OH-JA- und der 12-O-Gluc-JA-Gehalt reduziert und der 12-HSO₄-JA-Gehalt dramatisch angestiegen. Da 12-HSO₄-JA vor Verwundung kaum nachweisbar war und die Menge nach Verwundung den JA-Gehalt um das bis zu 20fache überstieg, stellt sich die Frage, wo der Ursprung für diese dramatische Zunahme liegt. Allein durch die Reduktion des 12-OH-JA und 12-O-Gluc-JA-Gehaltes kann dies nicht erklärt werden. Eine vermehrte AOC-Expression, die für eine verstärkte JA-Biosynthese sprechen würde, konnte in den transgenen Pflanzen nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.5.9). Die Reduktion anstelle der Zunahme des 12-HSO₄-JA-Gehaltes in den *LeST2a-sense*-Pflanzen würde für eine post-translationale Regulation der LeST2a-Aktivität sprechen.

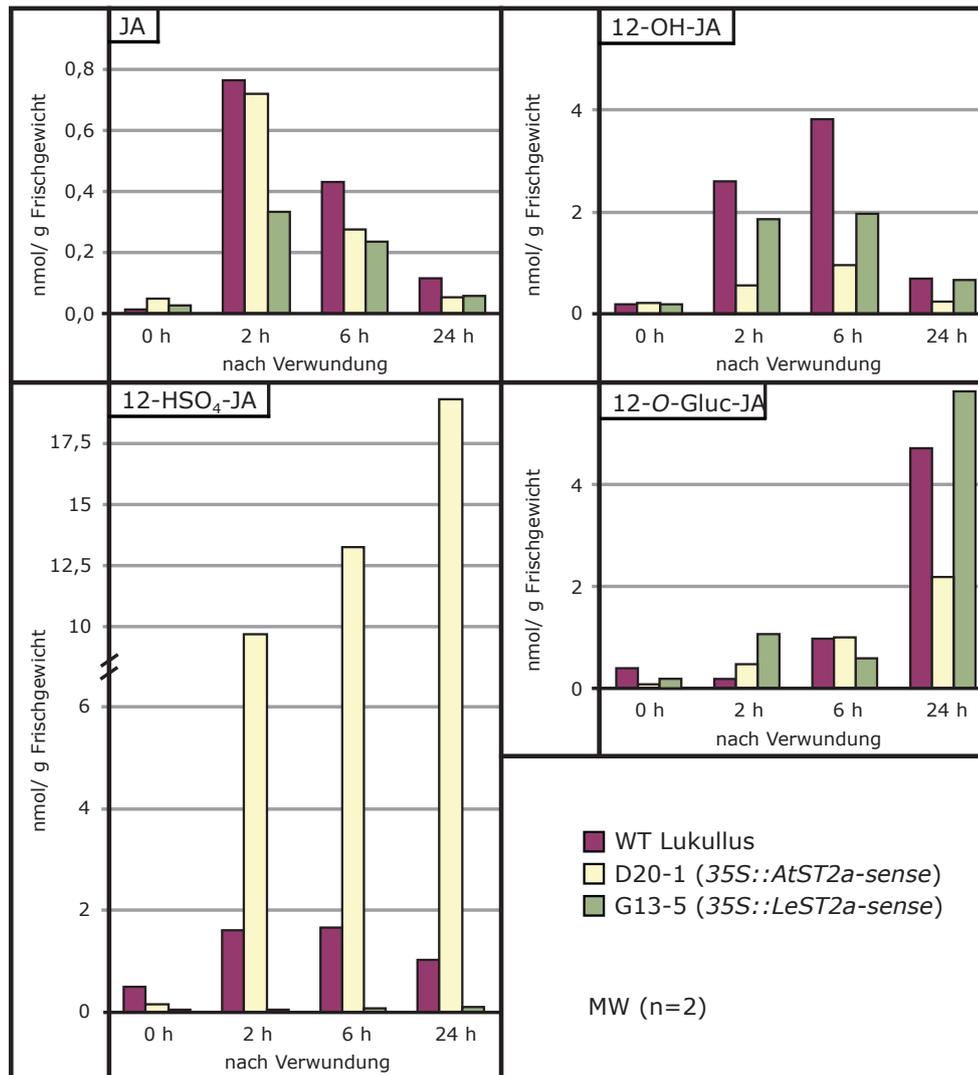


Abb. 3.31: Wund-induzierte Akkumulation von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Wildtyp Lukullus und transgenen Pflanzen der Generation T1 (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen wurden verwundet. 2, 6 und 24 Stunden nach Verwundung wurden die Blätter geerntet und die Gehalte der verschiedenen Jasmonate bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Proben)

3.5.4 Phänotypische Veränderungen der Infloreszenzen und Blüten

Erste Hinweise für einen Einfluss von 12-OH-JA auf die Blütenentwicklung ergaben Untersuchungen von transgenen Tabak-Pflanzen, die die *AtST2a* überexprimieren (VARIN *et al.* 2003). Die Pflanzen wiesen eine veränderte Blütenmorphologie auf. Es sollte untersucht werden, ob die transgenen Tomaten-Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. *LeST2a* überexprimierten, ebenfalls Veränderungen der Blütenmorphologie zeigen. Folgende Linien wurden untersucht:

35S::*AtST2a-sense* – A12-3, C18-1, C4-2, D20-1 und D54-1

35S::*LeST2a-sense* – G11-4, G13-5, G33-3 und G73-1.

Die Blütenzahl ist in den transgenen Pflanzen erhöht

Eine Veränderung der Blütenmorphologie wie beim Tabak konnte bei keiner der transgenen Tomaten-Pflanzen beobachtet werden. Die Morphologie aller Blütenorgane glich dem der Wildtyp-Blüten. Es trat jedoch eine auffällige Erhöhung der Anzahl der Blüten pro Infloreszenz auf. Deshalb wurde die Anzahl der Blüten der ersten, zweiten und dritten Infloreszenz bestimmt.

Die Infloreszenzen der Wildtyp-Pflanzen bestanden im Durchschnitt aus 9 Blüten. Nur ca. ein Fünftel der beobachteten Pflanzen besaßen an einer oder mehreren Infloreszenzen 10 bis 13 Blüten. 13 oder mehr Blüten pro Infloreszenz konnte nur an 0,8 % der untersuchten Pflanzen festgestellt werden, wobei die maximale Blütenzahl bei 14 lag (Abb. 3.32 und 3.33).

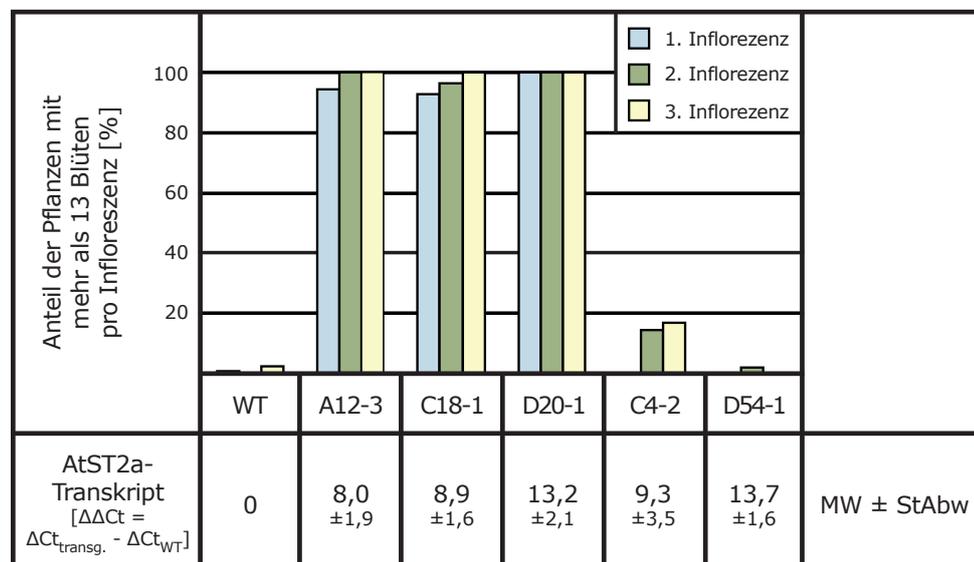


Abb. 3.32: Die erhöhte Blütenzahl verschiedener 35S::*AtST2a*-sense-Linien (Es wurde die Blütenzahl der 1., 2. und 3. Infloreszenz von Wildtyp Lukullus- und transgenen Pflanzen bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Pflanzen mit mehr als 13 Blüten pro Infloreszenz, sowie die durch One-Step-qPCR-Analysen bestimmte Transkript-Menge. Es handelt sich um Mittelwerte, sowie die Standardabweichung aus $\Delta\Delta Ct$ -Werten von mindestens 6 untersuchten Pflanzen.)

Bei 3 von 5 untersuchten transgenen Linien, die die *AtST2a* überexprimierten, besaßen annähernd 100 % der Pflanzen an allen Infloreszenzen 13 oder mehr Blüten (Abb. 3.32). Dabei zeigten ca. 70 % der Pflanzen der Linie A12-3 und C18-1 und 100 % der Pflanzen der Linie D20-1 sogar mehr als 20 Blüten pro Infloreszenz (Daten nicht gezeigt). Die höchste Blütenzahl zeigte eine Pflanze der Linie D20-1 mit 188 Blüten an der ersten Infloreszenz. Nur rund ein Fünftel der Pflanzen der Linie C4-2 hatten mehr als 13 Blüten pro Infloreszenz, wobei die Erhöhung der Blütenzahl erst an der zweiten und dritten

Infloreszenz zu beobachten war. Nur 2 % der Pflanzen der Linie D54-1 zeigten eine erhöhte Blütenzahl.

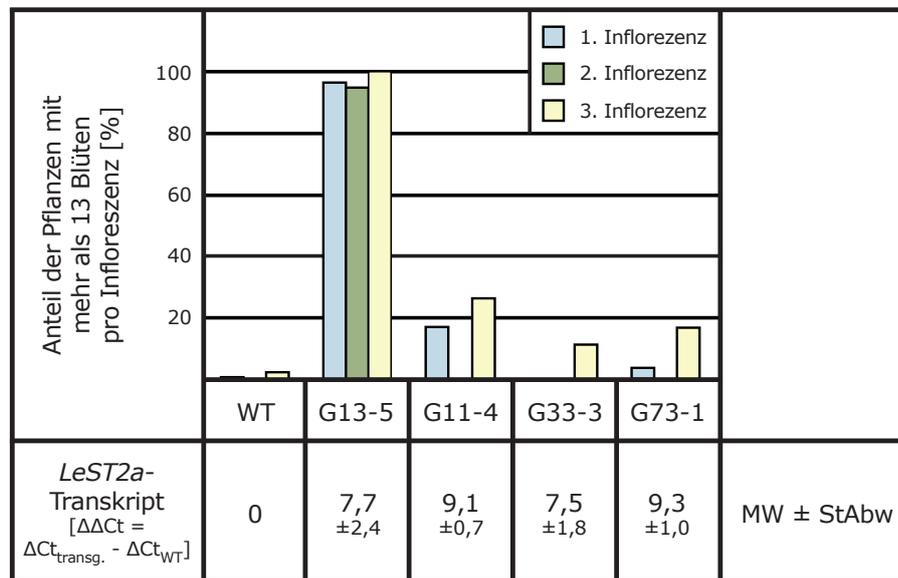


Abb. 3.33: Die erhöhte Blütenzahl verschiedener 35S::*LeST2a*-sense-Linien (Es wurde die Blütenzahl der 1., 2. und 3. Infloreszenz von Wildtyp Lukullus- und transgenen Pflanzen bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der Pflanzen mit mehr als 13 Blüten pro Infloreszenz, sowie die durch One-Step-qPCR-Analysen bestimmte Transkript-Menge. Es handelt sich um Mittelwerte, sowie die Standardabweichung aus $\Delta\Delta Ct$ -Werten von mindestens 6 untersuchten Pflanzen.

Unter den vier untersuchten transgenen Linien, die die *LeST2a* überexprimierten, besaßen annähernd 100 % der Pflanzen der Linie G13-5 13 oder mehr Blüten (Abb. 3.33). 70 % der Pflanzen dieser Linie besaßen dabei mehr als 20 Blüten pro Infloreszenz, und die maximale Blütenzahl betrug 43 (Daten nicht gezeigt). Nur etwa ein Fünftel oder weniger Pflanzen der anderen untersuchten Linien wiesen eine erhöhte Blütenzahl auf, wobei auch hier dies hauptsächlich erst bei den späteren Infloreszenzen auftrat.

Das unterschiedliche Auftreten dieses Phänotyps, die erhöhte Blütenzahl, korrelierte nicht mit der Transkript-Menge des Transgens (Abb. 3.32 und 3.34). Die Transkript-Menge wurde per qPCR bezogen auf den Wildtyp im unverwundeten Blatt bestimmt. Dargestellt sind hier Mittelwerte aus $\Delta\Delta Ct$ -Werten von mindestens 6 untersuchten Pflanzen. Die Linien D20-1 (erhöhte Blütenzahl) und D54-1 (unveränderte Blütenzahl) wiesen im Durchschnitt annähernd gleiche *AtST2a*-Transkript-Mengen auf. Auch bei den Linien, die die *LeST2a* überexprimierten, korrelierte die Transkript-Menge des Transgens nicht mit dem Auftreten des Phänotyps. Ganz im Gegenteil zeigte hier die Linie G13-5 einen Phänotyp, war aber die Linie mit der geringsten Transkript-Menge.

Die transgenen Pflanzen zeigen eine veränderte Infloreszenz-Architektur

Die Ursache für die erhöhte Blütenzahl der transgenen Pflanzen kann in der Architektur ihrer Infloreszenzen liegen. Wildtyp-Tomaten-Pflanzen besitzen determiniert, zymöse, monochasiale Infloreszenzen mit sieben bis neun Blüten (SAWHNEY & GREYSON 1972). In Wildtyp-Pflanzen schwillt das SAM beim Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum an und wandelt sich in ein Infloreszenzmeristem (IM) um. Das IM wiederum teilt sich in zwei Teile, wovon das eine zum Blütenmeristem (BM) umgewandelt wird und das andere als IM erhalten bleibt. Die Teilung des IM wiederholt sich zur Bildung jeder zusätzlichen Blüte, wodurch die Anordnung der Blüten einem Zick-Zack-Muster gleicht (Abb. 3.34).

In den transgenen Pflanzen mit erhöhter Blütenzahl waren die Infloreszenzen stark verzweigt (Abb. 3.34). Der terminierte Charakter der Infloreszenzen ging verloren, was sich in einer z.T. extrem erhöhten Blütenzahl äußerte. Da die transgenen Pflanzen Infloreszenzen ausbildeten, erfolgte die Initiierung des IM wahrscheinlich wie in Wildtyp-Pflanzen. Die Architektur der transgenen Infloreszenzen ließ vermuten, dass bei der Teilung des IM statt eines IM und einem BM zwei IM entstehen. Dies würde letztendlich in äußerst stark verzweigten Infloreszenzen resultieren (Abb. 3.34). Genauerer Aufschluss über die Identität der Meristeme könnten mikroskopische Untersuchungen liefern, die jedoch nicht mehr durchgeführt werden konnten. Die Blüten der transgenen Pflanzen waren fertil und es erfolgte die Frucht- und Samen-Bildung, wobei die Anzahl der Früchte pro Pflanze der des Wildtyps entsprach (Daten nicht gezeigt). Überzählige Blüten entwickelten keine Früchte und starben ab.

Neben der starken Verzweigung konnten bei rund 10 % der Pflanzen der Linie A12-3, C18-1, D20-1 und G13-5 auch andere auffällige morphologische Veränderungen der Infloreszenzen beobachtet werden. Es gab transgene Pflanzen, deren Infloreszenzen sowohl Blätter als auch Blüten enthielten (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren gab es Pflanzen deren verzweigte Infloreszenzen letztlich zu sympodialen Sprossen zurückgewandelt waren (Abb. 3.35). Vermutlich entstand im Laufe der Infloreszenzentwicklung ein axiales Meristem, das einen sympodialen Spross und dieser wiederum Infloreszenzen ausbildete. Außerdem konnten blumenkohlartige, gestauchte Infloreszenzen beobachtet werden (Abb. 3.35). Alle Blüten dieser Infloreszenzen schienen aus einem Ansatzpunkt heraus entstanden zu sein. Möglicherweise kam es zu einer unkontrollierten Proliferation von BM. Die Blüten dieser Infloreszenzen entwickelten sich nicht über das Knospen-Stadium hinaus.

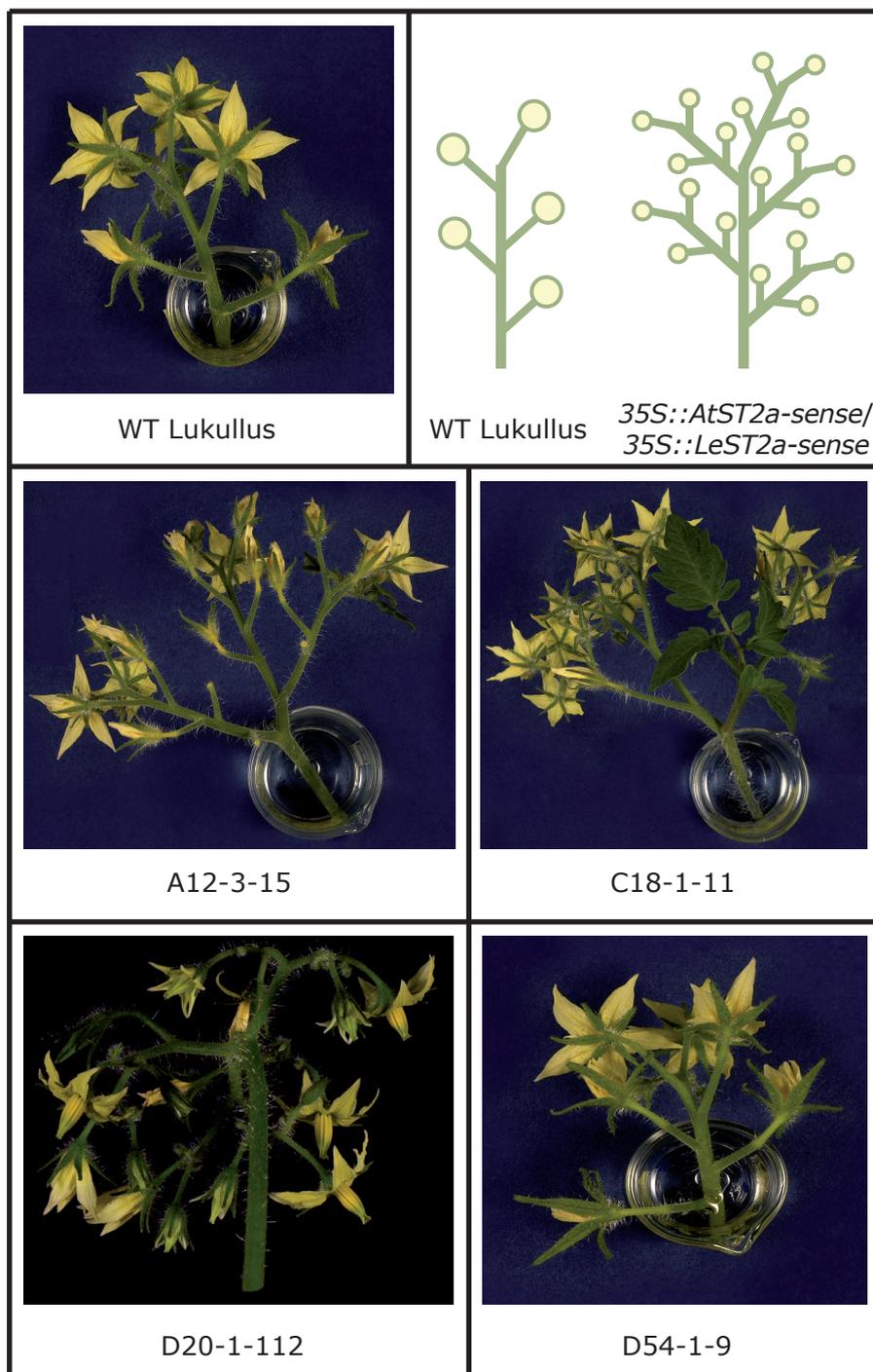


Abb. 3.34: Infloreszenzen von Wildtyp Lukullus und *35S::AtST2a-sense*-Pflanzen (Generation T1)

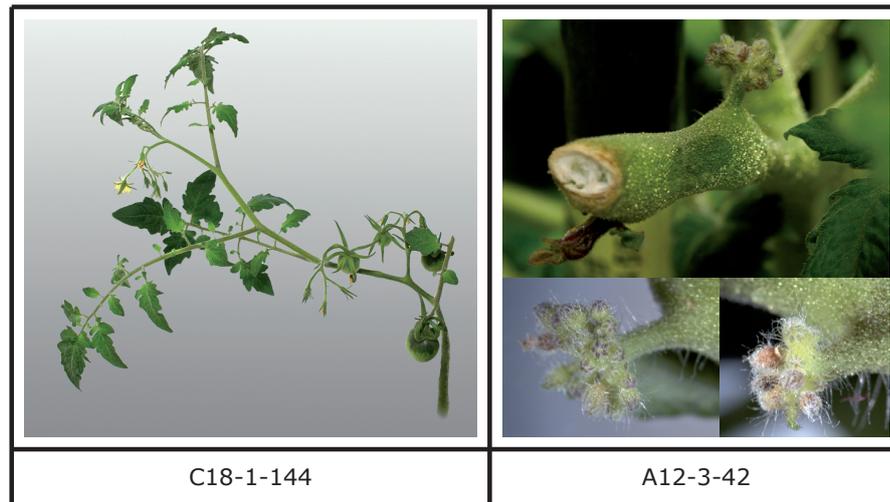


Abb. 3.35: Auffällige Infloreszenzen von *35S::AtST2a-sense*-Pflanzen (Generation T1)

Die transgenen Pflanzen blühen später

In Tomaten-Pflanzen gehen morphologische Veränderungen von Infloreszenzen oft einher mit Verschiebungen des Blühzeitpunktes (vgl. Tab. 1.3). Der primäre Spross von Wildtyp-Pflanzen wird durch die erste Infloreszenz nach 6-16 Blättern terminiert. Die Anzahl der Blätter ist ein Maß für den Blühzeitpunkt. Es wurde die Anzahl der Blätter (abzüglich Keimblätter) bis zur Ausbildung der ersten Infloreszenz sowohl des Wildtyps Lukullus als auch der Überexpressionspflanzen bestimmt.

Der Wildtyp bildet die erste Infloreszenz nach durchschnittlich 10 Blättern (Abb. 3.36 und 3.37). Für die die *AtST2a* überexprimierenden Linien A12-3, C18-1 und D20-1 konnte eine signifikante Erhöhung der Blattanzahl um zwei bis fünf Blätter nachgewiesen werden (Abb. 3.36). Der Blühzeitpunkt der Linien C4-2 und D54-1 war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Dabei gab es für die *AtST2a-sense*-Pflanzen einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten veränderter Infloreszenzen und dem verspäteten Blühzeitpunkt. Nur Pflanzen, die vermehrt Blüten bildeten, zeigten einen späteren Blühzeitpunkt als der Wildtyp.

Auch für Pflanzen, die die *LeST2a* überexprimierten, konnte eine Veränderung des Blühzeitpunktes nachgewiesen werden (Abb. 3.37). Die Linien G11-4, G13-5 und G73-1 zeigten eine signifikant erhöhte Blattanzahl um zwei bis vier Blätter. Der Blühzeitpunkt der Linie G33-3 war im Vergleich zum Wildtyp nicht verändert. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten veränderter Infloreszenzen und dem Blühzeitpunkt, konnte nur insofern beobachtet werden, als dass die Linie G13-5, die die meisten veränderten Infloreszenzen aufwies, auch die höchste Blattanzahl besaß.

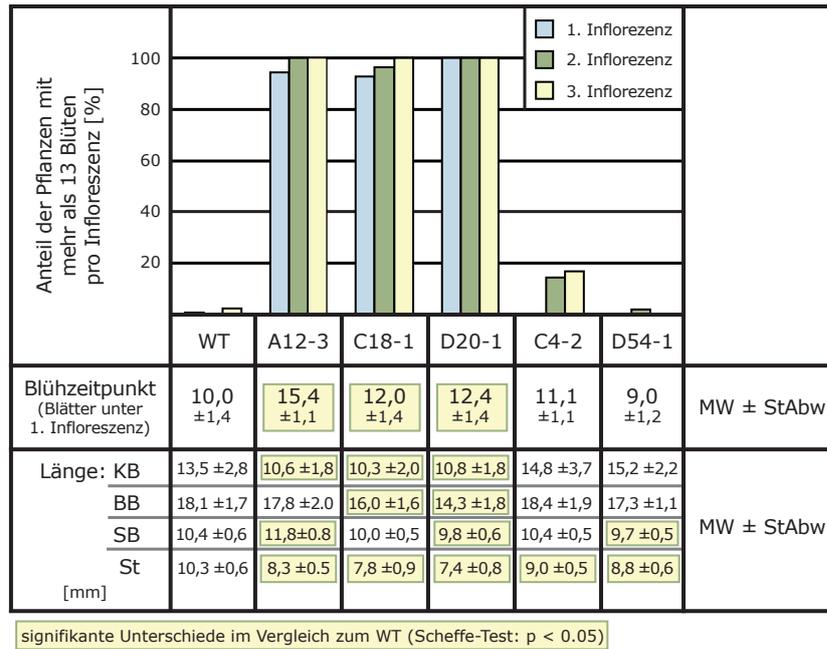


Abb. 3.36: Blütenzahl, Blüezeitpunkt und Größe der Blütenorgane von Wildtyp Lukullus- und 35S::AtST2a-sense-Pflanzen (T1)
 (Blüezeitpunkt: Anzahl der Blätter (abzüglich Keimblätter) bis zur Ausbildung der 1. Infloreszenz; Die Länge der Blütenorgane wurde von Blüten der 2. Infloreszenz während der Anthese bestimmt. KB - Kelchblätter; BB - Blütenblätter; SB - Staubblätter; St - Stempel)

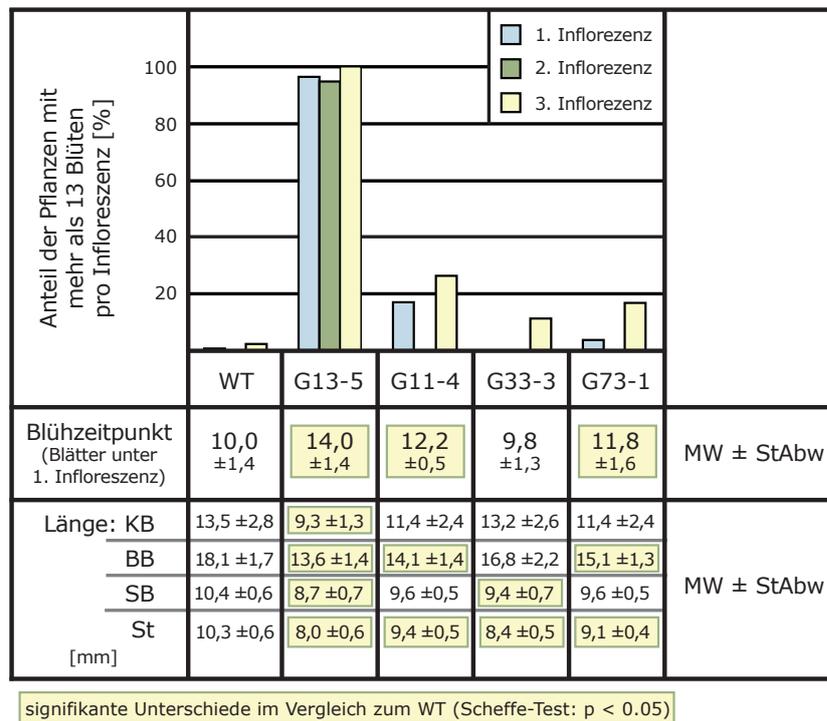


Abb. 3.37: Blütenzahl, Blüezeitpunkt und Größe der Blütenorgane von Wildtyp Lukullus- und 35S::LeST2a-sense-Pflanzen (T1)
 (Blüezeitpunkt: Anzahl der Blätter (abzüglich Keimblätter) bis zur Ausbildung der 1. Infloreszenz; Die Länge der Blütenorgane wurde von Blüten der 2. Infloreszenz während der Anthese bestimmt. KB - Kelchblätter; BB - Blütenblätter; SB - Staubblätter; St - Stempel)

Nicht nur die Anzahl der Blätter des primären Sprosses ist festgelegt, sondern auch die Anzahl der Blätter der folgenden sog. *sympodial units* (SUs), das heißt die Anzahl der Blätter zwischen den einzelnen Infloreszenzen (vgl. 1.3.1). Es konnte jedoch kein Unterschied zum Wildtyp nachgewiesen werden. Alle untersuchten transgenen Pflanzen besaßen ebenso wie der Wildtyp SUs mit jeweils drei Blättern.

Die Größe der Blütenorgane der transgenen Pflanzen ist verändert

Im Gegensatz zum *AtST2a-sense*-Tabak konnten in den Tomaten-Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. *LeST2a* überexprimierten, keine Umbildungen einzelner Blütenorgane beobachtet werden. Auffällig war jedoch, dass einzelne Organe der Blüten der transgenen Tomaten-Pflanzen viel kürzer erschienen. Es wurde die Länge der einzelnen Blütenorgane von Blüten der zweiten Infloreszenz während der Anthese bestimmt (Abb. 3.36 und 3.37).

Die Kelchblätter: Die durchschnittliche Länge der Kelchblätter von Wildtyp-Blüten betrug 13,5 mm. Die Kelchblätter der Linien A12-3, C18-1 und D20-1 (*AtST2a-sense*) und der Linie G13-5 (*LeST2a-sense*) waren signifikant kürzer als die des Wildtyps. Keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigten die Linien C4-2 und D54-1 (*AtST2a-sense*) und die Linien G11-4, G33-3 und G73-1 (*LeST2a-sense*).

Die Blütenblätter: Die Blütenblätter der Wildtyp-Pflanzen waren im Durchschnitt 18,1 mm lang. Die Kelchblätter der Linien C18-1 und D20-1 (*AtST2a-sense*) und die der Linien G13-5, G11-4 und G73-1 (*LeST2a-sense*) waren signifikant kürzer als die des Wildtyps. Bei den Linien A12-3, C4-2 und D54-1 (*AtST2a-sense*) und der Linie G33-3 (*LeST2a-sense*) glich die Länge der Blütenblätter der des Wildtyps.

Die Staubblätter: Die durchschnittliche Länge der Staubblätter von Wildtyp-Blüten betrug 10,4 mm. Die Linie A12-3 (*AtST2a-sense*) zeigte eine signifikante Zunahme der Länge der Staubblätter, wohingegen die Staubblätter der Linien D20-1 und D54-1 (*AtST2a-sense*) signifikant kürzer waren als die des Wildtyps. Bei den *LeST2a-sense*-Pflanzen zeigten nur die Linien G13-5 und G33-3 eine signifikante Veränderung der Länge der Staubblätter. Diese waren kürzer als die des Wildtyps. Keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp zeigten die Linien C4-2 und C18-1 (*AtST2a-sense*) und die Linien G11-4 und G73-1 (*LeST2a-sense*).

Das Fruchtblatt: Die durchschnittliche Länge des Stempels von Wildtyp-Blüten betrug 10,3 mm. Die Stempel aller untersuchten Linien waren signifikant kürzer als die des Wildtyps.

Die Größe aller Blütenorgane war in den transgenen Pflanzen signifikant verändert. Dabei variieren jedoch das Ausmaß der Veränderung und Umfang der betroffenen Linien. Mit Ausnahme der Länge des Fruchtblattes, das in allen Linien signifikant um ein bis zwei mm verkürzt war, traten Veränderungen der anderen Blütenorgane nicht in allen untersuchten Linien auf. Ein Zusammenhang mit einer erhöhten Blütenzahl ergab sich nur für die Verkürzung der Kelchblätter und des Stempels. Die Linien mit erhöhter Blütenzahl besaßen auch die kürzesten Kelchblätter und Stempel.

Zusammenfassung

Es konnte gezeigt werden, dass die transgenen Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. *LeST2a* überexprimierten, eine gegenüber dem Wildtyp veränderte Infloreszenz-Architektur aufwiesen. Die Infloreszenzen waren stark verzweigt und die Blütenanzahl dadurch erhöht. Des Weiteren blühten die transgenen Pflanzen später und die Größe der einzelnen Blütenorgane war im Vergleich zum Wildtyp reduziert. Die Pflanzen, die laut PCR-Test nicht transgen waren, dienten als Kontrollen. In keiner dieser Kontroll-Pflanzen trat ein Phänotyp in Form veränderter Infloreszenzen, Blühzeitpunkte oder veränderter Blütenorgan-Größen auf. Es kann ausgeschlossen werden, dass der Phänotyp durch Veränderungen des pflanzlichen Genoms als Begleiterscheinung der eigentlichen Transformation hervorgerufen wurde. Des Weiteren ist unwahrscheinlich, dass der Phänotyp durch den *knock-out* anderer Gene durch Insertion der T-DNA verursacht wurde, da der Phänotyp in 5 unabhängigen Linien auftrat. Auf Pflanzen die mit dem leeren Vektor transformiert wurden, wurde verzichtet, da mehrere unabhängige Linien zur Verfügung standen und die segregierten Wildtyp-Pflanzen ebenfalls analysiert wurden. In der folgenden Generation (T2) konnte ebenfalls eine erhöhte Blütenzahl in den transgenen Pflanzen beobachtet werden. Das bedeutet, dass der Phänotyp stabil vererbt wird. Eine Charakterisierung der Generation T2 konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

3.5.5 Veränderungen der Jasmonat-Gehalte in den transgenen Infloreszenzen

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob der beschriebene Phänotyp durch die Veränderung des 12-OH-JA-Gehaltes im Vergleich zum Wildtyp oder durch die Veränderung der Verhältnisse verschiedener Jasmonate hervorgerufen wurde, erfolgte die Bestimmung der Jasmonat-Gehalte in verschiedenen Pflanzenteilen. Es wurden die Gehalte von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Knospen, den einzelnen Blütenteilen, sowie den Infloreszenz-Stielen der zweiten Infloreszenz und dem Stengel

zwischen der 2. Infloreszenz und dem darunter liegenden Blatt bestimmt. Die Bestimmung erfolgte jedoch nur in Wildtyp-Pflanzen und in drei Linien, die die *AtST2a* überexprimierten. Dabei wurden die Linien A12-3 und C18-1 als Linien mit starken phänotypischen Veränderungen ausgewählt und die Linie D54-1 mit schwach ausgeprägtem Phänotyp.

Im Wildtyp waren in den Stengeln, sowie in Infloreszenz- und Blütenstielen JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA kaum nachweisbar (Abb. 3.38). OPDA akkumulierte in den Infloreszenz-Stielen, den Blütenstielen, den Kelchblättern und im Stempel zu 0,5 bis 1 nmol pro Gramm Frischgewicht. In den Infloreszenz- und Blütenstielen war es damit die am stärksten vertretene Verbindung der untersuchten Okta-dekanoide. JA war ausschließlich in den Knospen in größeren Mengen nachweisbar. Das meiste 12-OH-JA konnte in den Blütenblättern und Knospen nachgewiesen werden. Das in allen Blütenteilen und den Knospen am stärksten vertretene Jasmonat war 12-O-Gluc-JA. In den Knospen überstieg der 12-O-Gluc-JA-Gehalt den JA-Gehalt um rund das 10-fache, in den Blüten- und Staubblättern sogar um mehr als das 100-fache. Dabei ist die Frage offen, ob 12-O-Gluc-JA dabei im Laufe der Blütenentwicklung akkumuliert und gespeichert wird. 12-HSO₄-JA war kaum in einem der untersuchten Pflanzenteile nachweisbar. *LeST2a*-Transkript konnte im Gegensatz dazu in allen Blütenteilen bis auf die Staubblätter nachgewiesen werden (vgl. 3.3.6).

In allen untersuchten transgenen Linien lag in allen untersuchten Pflanzenteilen der 12-HSO₄-JA-Gehalt über dem des Wildtyps (Abb. 3.38). Die geringsten Mengen enthielten dabei die Stengel und Infloreszenz-Stiele. Eine dramatische Erhöhung des 12-HSO₄-JA-Gehaltes um das bis zu 2000-fache bezogen auf den Wildtyp konnte in den Blüten- und Staubblättern, sowie im Stempel und den Knospen gezeigt werden. Dies ging einher mit der Reduktion des 12-OH-JA- und des 12-O-Gluc-JA-Gehaltes. Der 12-OH-JA-Gehalt in den Blütenblättern, dem Stempel und den Knospen entsprach nur noch einem Drittel bis der Hälfte des Wildtyp-Gehaltes. Der 12-O-Gluc-JA-Gehalt war im Vergleich zum Wildtyp auf mindestens ein zehntel reduziert. Dies allein kann jedoch den hohen 12-HSO₄-JA-Gehalt nicht erklären. Möglicherweise erfolgt die Akkumulation von 12-HSO₄-JA im Laufe der Infloreszenz- und Blütenentwicklung.

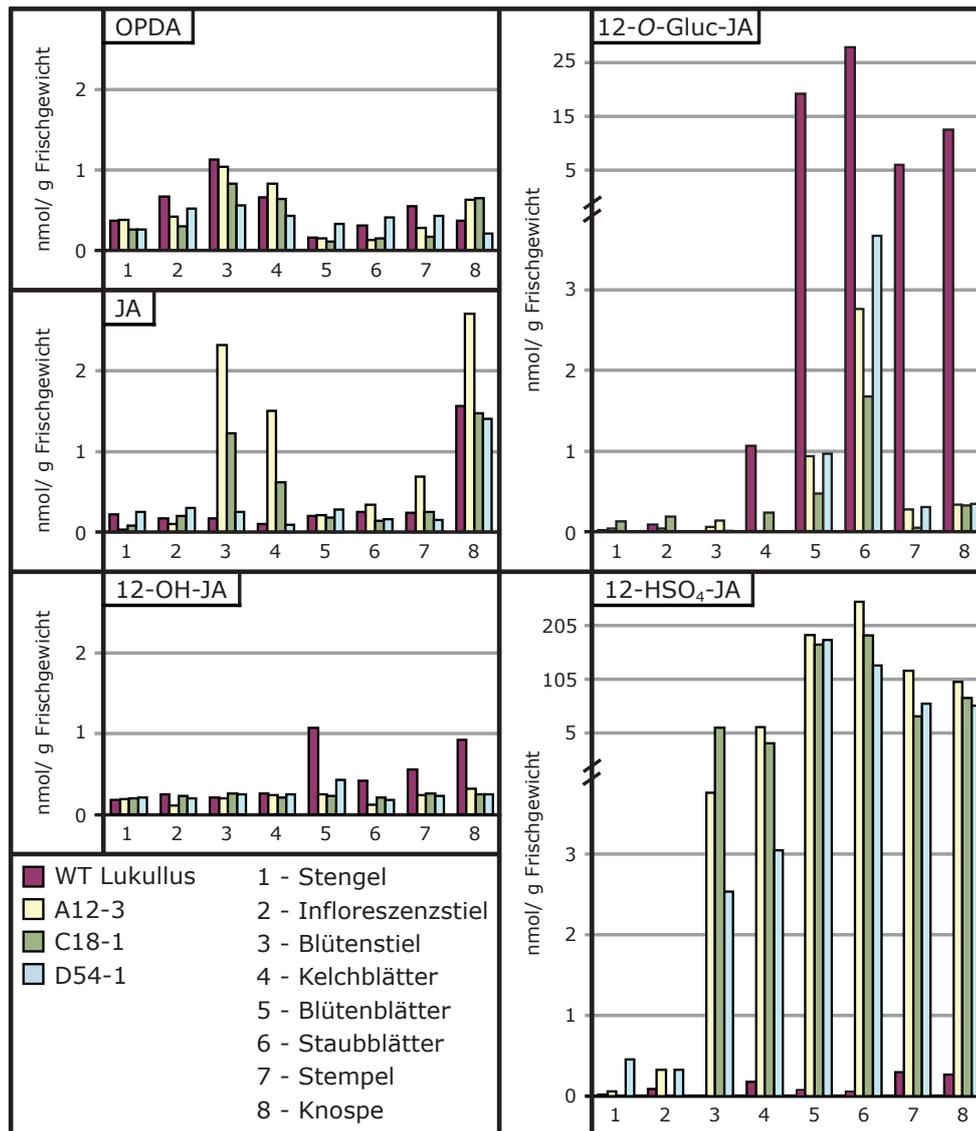


Abb. 3.38: Jasmonat-Gehalte in verschiedenen Organen von Wildtyp Lukullus- und *35S::AtST2a-sense*-Pflanzen (T1)
(Die einzelnen Organe mehrerer Pflanzen wurden geerntet und es erfolgte eine Einfachbestimmung der OPDA-, JA-, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA-Gehalte.)

Besonders interessant hinsichtlich einer Erklärung für das unterschiedliche Auftreten verzweigter Infloreszenzen in den einzelnen transgenen Linien waren Unterschiede in den Jasmonat-Gehalten der Linie A12-3 und C18-1 im Vergleich zum Wildtyp und D54-1. Ein solcher Unterschied konnte lediglich im JA-Gehalt der Blütenstiele und Kelchblätter festgestellt werden (Abb. 3.38). Der JA-Gehalt in den Linien A12-3 und C18-1 war rund 10mal höher als in der Linie D54-1, deren JA-Gehalt dem Wildtyp entsprach. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass Veränderungen des JA-Gehaltes im Blütenstiel oder den Kelchblättern die Infloreszenz-Architektur beeinflussen, da diese dann bereits ausgeprägt ist.

3.5.6 Die Expression verschiedener Meristemidentitätsgene in den transgenen Pflanzen

Die Infloreszenzen der transgenen Pflanzen ähneln den Infloreszenzen verschiedener Mutanten der Tomate (vgl. 1.3). Die Mutante *compound inflorescence* (*s*) zeigt ebenso stark verzweigte Infloreszenzen wie die Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. *LeST2a* überexprimierten (QUINET *et al.* 2006). Das betroffene Gen dieser Mutanten konnte allerdings noch nicht identifiziert werden. Die Infloreszenzen der Mutante *falsiflora* (*fa*) sind stark verzweigt und in ihrem Wachstum nicht terminiert (MOLINERO-ROSALES *et al.* 1999). Beide Mutanten sind gestört in der Kontrolle der Identität der BM.

Gen	Funktion	Arabidospis-Homolog	Molekulare Natur	Referenz (Bsp.)
<i>LATERAL SUPPRESSOR (LS)</i>	Regulation der LM-Bildung	<i>LAS</i>	VHIID-Protein	Schumacher <i>et al.</i> 1999
<i>SELF PRUNING (SP1)</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>TFL1</i>	CETS-Genfamilie	Pnueli <i>et al.</i> 1998
<i>SP2G</i>	unbekannt	unbekannt	SP-Familie	Carmel-Goren <i>et al.</i> 2003
<i>SP5G</i>	unbekannt	unbekannt	SP-Familie	Carmel-Goren <i>et al.</i> 2003
<i>SP6A</i>	unbekannt	unbekannt	SP-Familie	Carmel-Goren <i>et al.</i> 2003
<i>SP9G</i>	unbekannt	unbekannt	SP-Familie	Carmel-Goren <i>et al.</i> 2003
<i>SINGLE FLOWER TRUSS (SFT)</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>FT</i>	CETS-Genfamilie	Lifschitz <i>et al.</i> 2006
<i>JOINTLESS (J)</i>	Regulation der IM-Identität	unbekannt	MADS-box TF	Mao <i>et al.</i> 2000; Szymkowiak & Irish 2006
<i>FALSIFLORA (FA)</i>	Regulation vegetatives/reproduktives Wachstum	<i>LEAFY</i>	TF	Molinero-Rosales <i>et al.</i> 1999
<i>BLIND (BL)</i>	Regulation der LM-Bildung	<i>BLIND</i>	MYB-TF	Schmitz <i>et al.</i> 2002
<i>WUSCHEL (WUS)</i>	Regulation der Stammzell-Aktivität in Meristemen	<i>WUSCHEL</i>	<i>homeodomain protein</i>	Mayer <i>et al.</i> 1998; Reinhardt <i>et al.</i> 2003

Tab. 3.4: Meristem-Identitätsgene, deren Expression per qPCR untersucht wurde (TF = Transkriptionsfaktor; LM = Lateralmeristem; IM = Infloreszenzmeristem)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von Genen untersucht, die an der Kontrolle der Identität verschiedener Meristeme beteiligt sind. Die untersuchten Gene und deren postulierte Funktion sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst. Die Untersuchung der Transkript-Menge erfolgte mittels qPCR in den Infloreszenz-Stielen, dem Blütenstiel, den einzelnen Blütenorganen und Knospen der zweiten Infloreszenz, sowie im Stengel zwischen der zweiten Infloreszenz und dem darunter befindlichen Blatt. Folgende Linien wurden untersucht:

35S::*AtST2a-sense* – A12-3, C18-1 und D54-1

Dabei zeigten die Linien A12-3 und C18-1 einen stark und die Linie D54-1 einen schwach ausgeprägten Phänotyp. Die Überexpression der *AtST2a* konnte in allen untersuchten Pflanzenteilen aller untersuchten Linien nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der Gene *J*, *SFT*, *SP2G* und *FA* entsprach in den transgenen Pflanzen der im Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Ursächlich für die Ausprägung verzweigter Infloreszenzen sind wahrscheinlich nur Unterschiede in der Expression der Linien A12-3 und C18-1 im Vergleich zum Wildtyp und der Linie D54-1 auftreten. Für die untersuchten Gene *SP1*, *WUS*, *BL*, *LS*, *SP5G*, *SP6A* und *SP9G* konnten solche Unterschiede nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Eine Veränderung der Expression dieser Gene kann jedoch als Ursache für den Phänotyp nicht ausgeschlossen werden. Da Meristemidentitätsgene meist nur sehr schwach und lokal exprimiert werden, müsste die Expression direkt in den Meristemen per qPCR oder *in situ*-Hybridisierung untersucht werden. Dies konnte allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr erfolgen.

3.5.7 Die Keimung

JA inhibiert die Keimung (vgl. 3.2.2.1; CORBINEAU *et al.* 1988). Wie beschrieben sind exogen appliziertes 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA nicht aktiv bezogen auf die Hemmung der Keimung (vgl. 3.2.2.1). In den transgenen Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. die *LeST2a* überexprimierten, waren die endogenen Jasmonat-Gehalte nach Verwundung verändert (vgl. 3.5.3). Demzufolge stellte sich die Frage, ob sich dies auf die Keimung der transgenen Pflanzen auswirkt.

Es wurden Samen von folgenden transgenen Linien sowohl auf MS-Medium als auch auf Erde ausgesät:

35S::*AtST2a-sense* – A12-3 (nur auf Erde), C18-1, D20-1 und D54-1

35S::*LeST2a-sense* – G11-4, G13-5, G33-3 und G73-1.

Nach 14 Tagen wurde die Anzahl der gekeimten Samen ermittelt. Der Anteil gekeimter transgener Samen war im Vergleich zum Wildtyp für alle untersuchten Linien um mindestens ein Drittel reduziert (Abb. 3.39).

Eine Ursache für die verminderte Keimung könnte eine Veränderung der Jasmonat-Gehalte in den transgenen Samen aufgrund der Überexpression sein. Dies könnte zum einen durch die Bestimmung der Jasmonat-Gehalte überprüft werden und zum an-

deren durch Normalisierung durch exogene 12-OH-JA-Applikation, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht mehr erfolgen konnte.

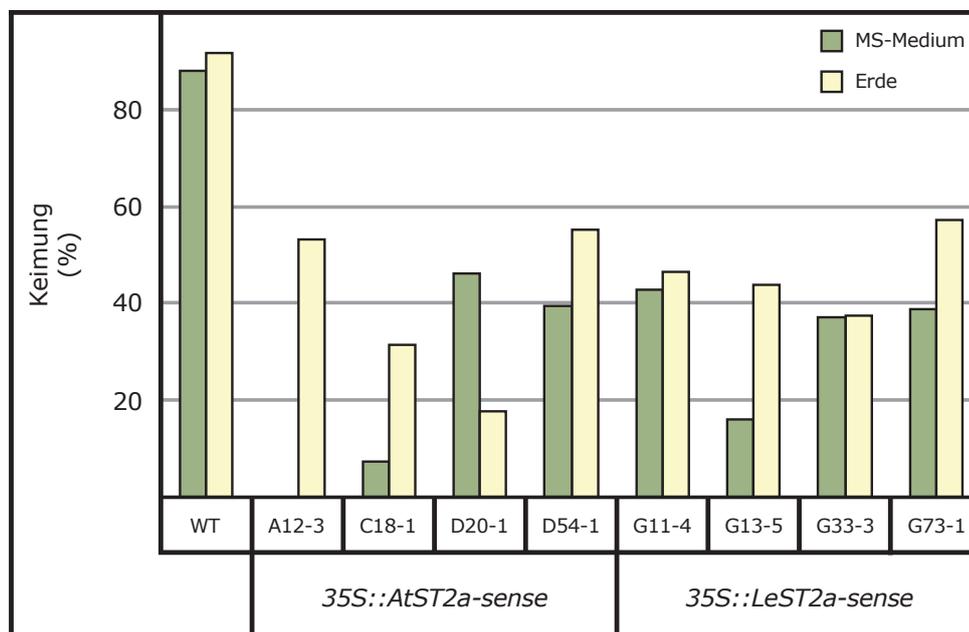


Abb. 3.39: Die Keimung von Wildtyp Lukullus- und transgenen Samen (T1) auf Erde und MS-Medium (Samen wurden auf Erde ausgesät bzw. sterilisiert und auf MS-Medium ausgelegt. Samen auf MS-Medium wurden anschließend 2 Tage im Dunkeln bei 4 °C, 3 Tage im Dunkeln bei 23 °C und weiter im Dauerlicht bei 23 °C inkubiert. Nach insgesamt 14 Tagen wurde der Anteil gekeimter Samen bestimmt. Nachkommen der Primärtransformante A12-3 konnte wegen des Mangels an Saatgut nicht auf MS-Medium ausgesät werden.)

3.5.8 Wurzelwachstum

JA inhibiert das Wurzelwachstum (vgl. 3.2.2.2; DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992). 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA haben exogen appliziert keinen Einfluss auf das Wurzelwachstum (vgl. 3.2.2.2). In der Wurzelspitze von Tomaten-Keimlingen (Wildtyp Lukullus) konnten ca. 2 ng pro Gramm Frischgewicht JA nachgewiesen werden (OKA, persönliche Mitteilung). Der JA-Gehalt in der Wurzelspitze ist somit etwa doppelt so hoch wie im verwundeten Wildtyp-Blatt. Der 12-HSO₄-JA-Level in der Wurzelspitze war in etwa genauso hoch wie der JA-Gehalt (OKA, persönliche Mitteilung). Die Überexpression der *AtST2a* bzw. *LeST2a* veränderte die Jasmonat-Gehalte. Es wurde untersucht, inwieweit sich dies in einer Veränderung des Wurzelwachstums äußert. Des Weiteren war interessant, ob die inhibierende Wirkung von exogen appliziertem JM in den transgenen Pflanzen schwächer ausfällt.

Das Wurzelwachstum unbehandelter Keimlinge sowie bei Applikation von 5 und 10 μM JM wurde bestimmt (vgl. 3.2.2.2). Die Nachkommen (T1) folgender Linien wurden untersucht:

35S::AtST2a-sense – D54-1;

35S::LeST2a-sense – G73-1.

Die Zunahme der Wurzellänge war in den transgenen Keimlingen signifikant erhöht (Abb. 3.40). Eine Erklärung dafür wäre eine Reduktion des JA-Gehaltes in der Wurzelspitze der transgenen Keimlinge. Bestimmungen der JA-Gehalte könnten dies bestätigen, konnten aber nicht mehr durchgeführt werden.

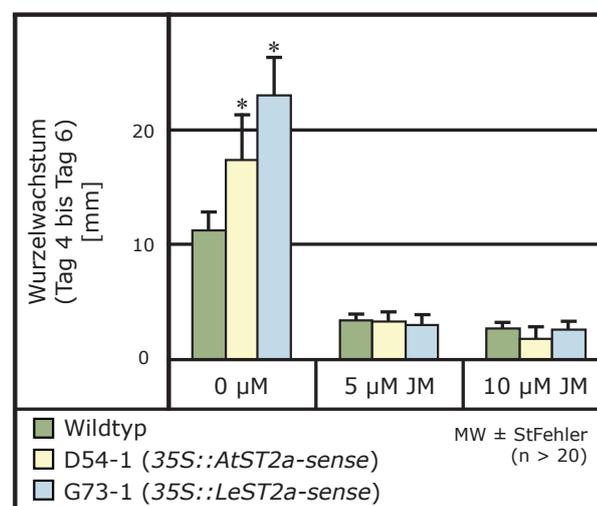


Abb. 3.40: Das Wurzelwachstum und der Einfluss von JM auf das Wurzelwachstum von Wildtyp Lukullus und transgenen Keimlingen (T1) (Dargestellt ist das Wurzelwachstum (Zunahme der Wurzellänge zw. Tag 4 und 6). Samen wurden auf MS-Medium ohne weitere Zusätze ausgesät. Bei beginnender Keimung (ca. 1 mm sichtbare Wurzel) wurden die Samen auf MS-Medium, das 0, 5 oder 10 μM JM enthielt, umgesetzt. Dieser Zeitpunkt entspricht Tag 0. Die Wurzellänge wurde jeweils nach 2, 4, 6 und 8 Tagen bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte, sowie die Standardfehler (n>20). Sternchen markieren signifikante Unterschiede - Scheffe-Test: $p < 0.05$)

Die exogene Applikation von JM hatte im verwendeten Konzentrationsbereich den gleichen inhibierenden Einfluss auf das Wurzelwachstum der transgenen Keimlinge wie auf den Wildtyp (Abb. 3.40). Die Untersuchungen müssten mit geringeren JM-Konzentrationen wiederholt werden.

3.5.9 Die lokale Wundantwort

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass exogen appliziertes 12-OH-JA die Expression einiger JA- und wund-induzierbarer Gene reprimiert (vgl. 3.2.1). Die Applikation von 12-HSO₄-JA hatte auf die Expression der untersuchten Gene keinen bzw. reprimierenden Einfluss (vgl. 3.2.1). Die sequentielle Umsetzung von JA zu 12-OH-JA und weiter zu 12-HSO₄-JA nach Verwundung (vgl. 3.1.1 und 3.1.2) könnte so ein Aufheben der Signalwirkung von JA in der Wundantwort bewirken. Deshalb wurde die Expression einiger wund-induzierbarer Gene nach Verwundung in den transgenen Pflanzen untersucht. Da sowohl der 12-OH-JA-Gehalt als auch der 12-HSO₄-JA-Gehalt in den transgenen Pflanzen verändert war (vgl. 3.5.3), sollte dies zeigen, ob dies die Expression wund-induzierbarer Gene beeinflusst.

Es wurde die Expression ausgewählter Gene wie *LeAOC*, *LePIN2*, *LeLAP* und *LeTD 2*, 6 und 24 Stunden nach Verwundung mittels qPCR untersucht. Die Nachkommen (T1) folgender Linien wurden verwendet:

35S::*AtST2a-sense* – A12-3 und D20-1;

35S::*LeST2a-sense* – G13-5 und G73-1.

Die Expression der *LeAOC*, einem JA-Biosynthese-Gen, verhielt sich nach Verwundung in den transgenen Pflanzen wie im Wildtyp (Abb. 3.41). Lediglich im Grundzustand ist in drei Linien die Expression leicht erniedrigt. Die Expression der Abwehrgene *LePIN2*, *LeLAP* und *LeTD* ist 2 Stunden nach Verwundung höher als im Wildtyp. 6 und 24 Stunden nach Verwundung entspricht die Expression dieser Gene der im Wildtyp, bis auf die Expression von *LeLAP* 24 Stunden nach Verwundung, die erhöht ist.

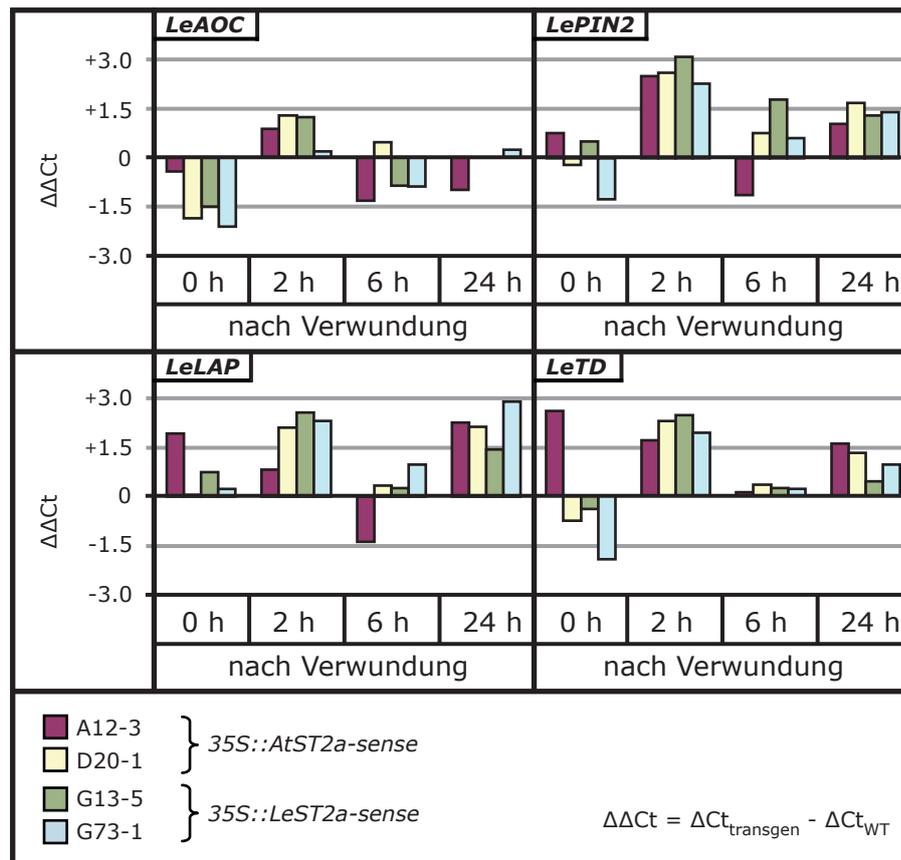


Abb. 3.41: qPCR-Analyse der Transkript-Akkumulation von *LeAOC*, *LePIN2*, *LeTD* und *LeLAP* nach Verwundung in transgenen Pflanzen (T1) (Blätter von 6 Wochen alten Tomaten-Pflanzen (transgene Pflanzen und WT Lukullus als Kontrolle) wurden verwundet. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Blätter geerntet und Gesamt-RNA isoliert. 5 μ g Gesamt-RNA wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt und die PCR erfolgte mit 20 ng cDNA als Template. Der Δ Ct-Wert einer Probe für ein bestimmtes Gen ergibt sich aus der Differenz des Ct-Wertes für dieses Gen und dem Ct-Wert des Referenz-Gens *LeEF1a*. Der dargestellte $\Delta\Delta$ Ct-Wert ist die Differenz aus dem Δ Ct-Wert der transgenen Pflanze und dem Δ Ct-Wert der entsprechenden Wildtyp-Pflanze. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen biologischen Proben und je 2 technischen Replikaten.)

3.6 Phänotypische Veränderungen durch Überexpression der *AtST2a* in Tabak

Tabak-Pflanzen, die die *AtST2a* heterolog unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, lagen zu Beginn dieser Arbeit vor (VARIN *et al.* 2003). Die Pflanzen wiesen eine veränderte Blütenmorphologie auf (Abb. 3.42). Ihre Staubblätter glichen oft Blütenblättern. Nicht zu Blütenblättern umgewandelte Staubblätter waren ebenfalls verändert. Sie waren kürzer als die des Wildtyps. Die Pflanzen waren trotz der morphologischen Veränderungen der Staubblätter fertil und bildeten Samen.

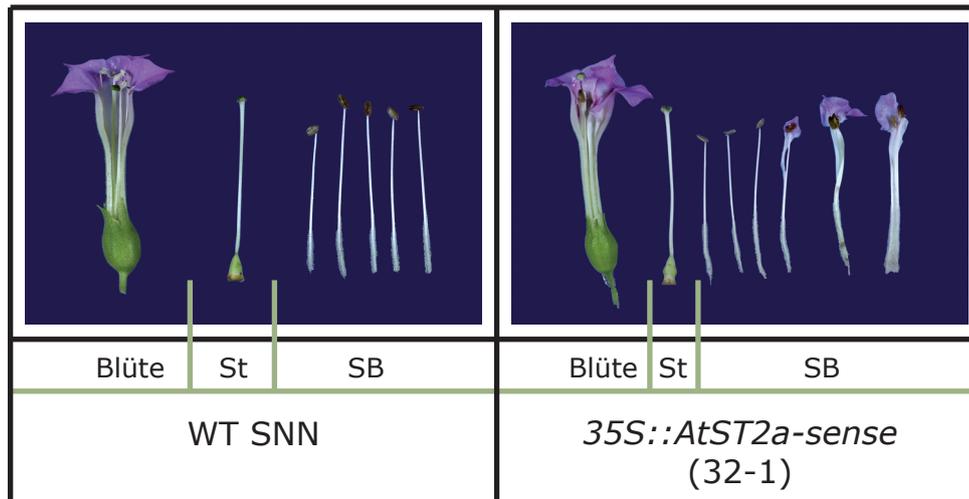


Abb. 3.42: Die veränderte Blüten-Morphologie der *35S::AtST2a-sense*-Tabak-Pflanzen (St - Stempel; SB - Staubblätter)

3.6.1 Die Jasmonat-Gehalte in den Blüten der *35S::AtST2a-sense*-Tabak-Pflanzen

Ob ein Zusammenhang zwischen Veränderungen der Jasmonat-Gehalte und dem Phänotyp besteht, sollte eine Bestimmung der Jasmonat-Gehalte in den Blüten der transgenen Tabak-Pflanzen zeigen. Es wurden die Gehalte von OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in den Linien 7-7-1 und 32-1 sowie im Wildtyp SNN bestimmt.

In den einzelnen Blüten-Teilen des Wildtyps waren die Mengen und das Vorkommen der einzelnen Jasmonate in den verschiedenen Organen wie schon in Tomate sehr unterschiedlich (Abb. 3.43; vgl. 3.5.5). Das in allen Blütenteilen am häufigsten vorkommende Jasmonat war wie in Tomate das 12-O-Gluc-JA. Der 12-O-Gluc-JA-Gehalt übertraf die Gehalte der anderen Jasmonate um ein Vielfaches, wobei die Staubblätter die größte Menge enthielten. Der höchste OPDA-Gehalt konnte im Gegensatz zu Tomate in den Staubblättern nachgewiesen werden und der höchste JA-Gehalt in den Blütenstielen. Der 12-OH-JA-Gehalt war am höchsten in den Staubblättern, er überstieg dabei den 12-OH-JA-Gehalt in Tomate um das rund 15-fache. Im Gegensatz zu Tomaten-Blüten konnte in Tabak in den Blüten- und Staubblättern, sowie im Stempel 12-HSO₄-JA in größeren Mengen nachgewiesen werden. Der 12-HSO₄-JA-Gehalt war dort rund 10mal höher als in Tomate.

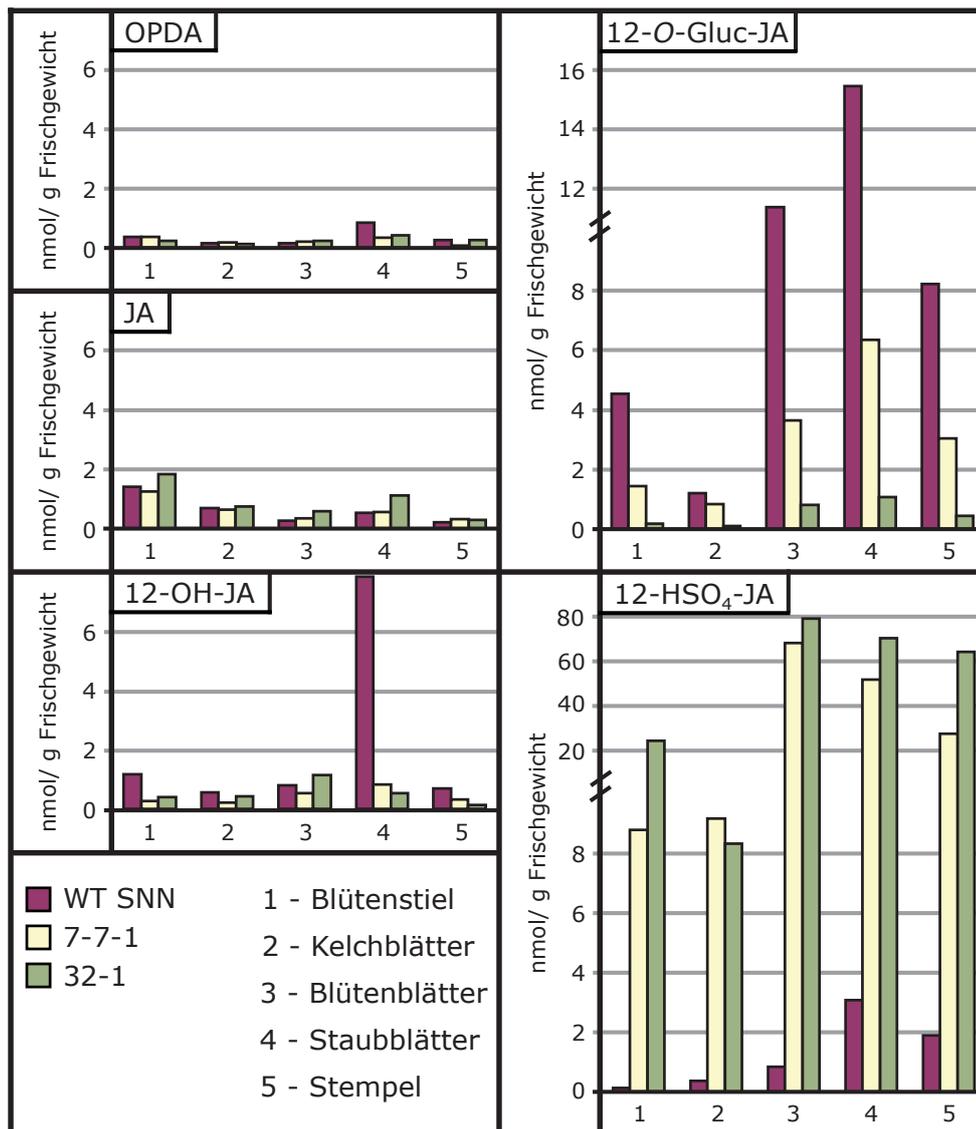


Abb. 3.43: Jasmonat-Gehalte in verschiedenen Blüten-Teilen von Wildtyp SNN- und 35S::AtST2a-sense-Tabak-Pflanzen (Die einzelnen Organe mehrerer Pflanzen wurden geerntet und es erfolgte eine Einfachbestimmung der OPDA-, JA-, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA-Gehalte.)

Eine Veränderung der Gehalte von OPDA und JA konnte in den transgenen Tabak-Pflanzen nicht beobachtet werden (Abb. 3.43). Der 12-HSO₄-JA-Gehalt war erwartungsgemäß in allen Blütenteilen beider transgener Linien erhöht, um das ca. 15 bis 40-fache in den Kelch- und Staubblättern sowie im Stempel und um das ca. 80 bis 180-fache im Blütenstiel und den Blütenblättern. Des Weiteren konnte eine Reduktion des 12-OH-JA-Gehaltes auf ca. ein Zwölftel des Wildtyp-Gehaltes in den Staubblättern nachgewiesen werden. Ebenso wie in den transgenen Tomaten-Pflanzen konnte auch im transgenen Tabak die Reduktion der 12-O-Gluc-JA-Gehalte nachgewiesen werden. Dabei war der 12-O-Gluc-JA-Gehalt in der Linie 7-7-1 auf die Hälfte bis ein Drittel reduziert und in der Linie 32-1 um das 10 bis 25fache. Ursächlich für die Reduktion der 12-OH-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte war vermutlich die vermehrte 12-HSO₄-JA-Bildung in den trans-

genen Tabak-Pflanzen. Der 12-HSO₄-JA-Gehalt übertraf auch in den transgenen Tabak-Blüten den Gehalt der anderen nachgewiesenen Jasmonate im Wildtyp. Es wäre vorstellbar, dass 12-HSO₄-JA im Laufe der Blütenentwicklung akkumulierte.

3.6.2 Die Expression einiger Blütenorgan-Identitätsgene in den transgenen Tabak-Blüten

Um zu überprüfen, ob die morphologischen Veränderungen der Staubblätter der transgenen Tabak-Pflanzen durch veränderte Expression der entsprechenden Organ-Identitätsgene der Blüten verursacht werden, wurde die Transkript-Menge einiger dieser Gene in den verschiedenen Blütenteilen per qPCR bestimmt. Entsprechend dem ABC-Modell (JACK 2004) der Blütenentwicklung wurden folgende Gene untersucht: *DEFICIENS* (*NtDEF*) und *GLOBOSA* (*NtGLO*) als Vertreter der Klasse B und *AGAMOUS1* (*NtNAG1*) und *PLENA36* (*NtPLE36*) als Vertreter der Klasse C (HANSEN *et al.* 1993; KEMPIN *et al.* 1993; DAVIES *et al.* 1996). Gene der Klasse A definieren die Identität von Kelch- und Blütenblättern in den Wirteln 1 bzw. 2 und reprimieren die Aktivität der Gene der Klasse C in diesen Wirteln. Die Gene der Klasse B definieren die Identität der Blütenblätter im Wirtel 2 und die der Staubblätter im Wirtel 3. Die C-Klasse-Gene sind notwendig für die Bildung der Staubblätter im dritten Wirtel und des Fruchtblattes im vierten Wirtel, sowie für die Repression der A-Klasse-Gene in diesen Wirteln. Alle Gene werden in den Organen exprimiert, deren Identität sie bestimmen.

Für alle untersuchten Gene konnte nachgewiesen werden, dass sie in den Organen exprimiert werden, deren Identität sie festlegen (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression der *AtST2a* in allen untersuchten Blütenteilen der beiden transgenen Linien 7-7-1 und 32-1 belegte den transgenen Zustand auch für die Blüten (Abb. 3.44). Da beide transgene Linien veränderte Staubblätter zeigten, sollten Veränderungen in der Expression der Blütenorgan-Identitätsgene auch in beiden Linien auftreten. Des Weiteren sollten diese Veränderungen in den betroffenen Organen, den Staubblättern, zu finden sein. Eine solche Veränderung konnte nicht nachgewiesen werden. Es konnte hingegen eine erhöhte *GLO*-Transkript-Menge in den Kelchblättern gezeigt werden. Dies würde allerdings laut ABC-Modell nicht zu veränderten Staubblättern, sondern eher zu Blütenblatt-ähnlichen Kelchblättern führen. Diese konnten jedoch in den transgenen Tabak-Pflanzen nicht beobachtet werden. Des Weiteren trat eine im Vergleich zum Wildtyp vermehrte *PLE36*-Expression im Fruchtblatt auf. Da aber entsprechend des ABC-Modells, das Fruchtblatt der Ort ist, an dem die Expression von *PLE36* stattfinden sollte, kann auch dies als Ursache für die veränderten Staubblätter ausgeschlossen werden. Die Untersuchung der Transkript-Mengen der Organ-Identitätsgene der Blüten ergab keine Hinweise für die

Ursache der morphologischen Veränderungen der Staubblätter der transgenen Tabak-Pflanzen.

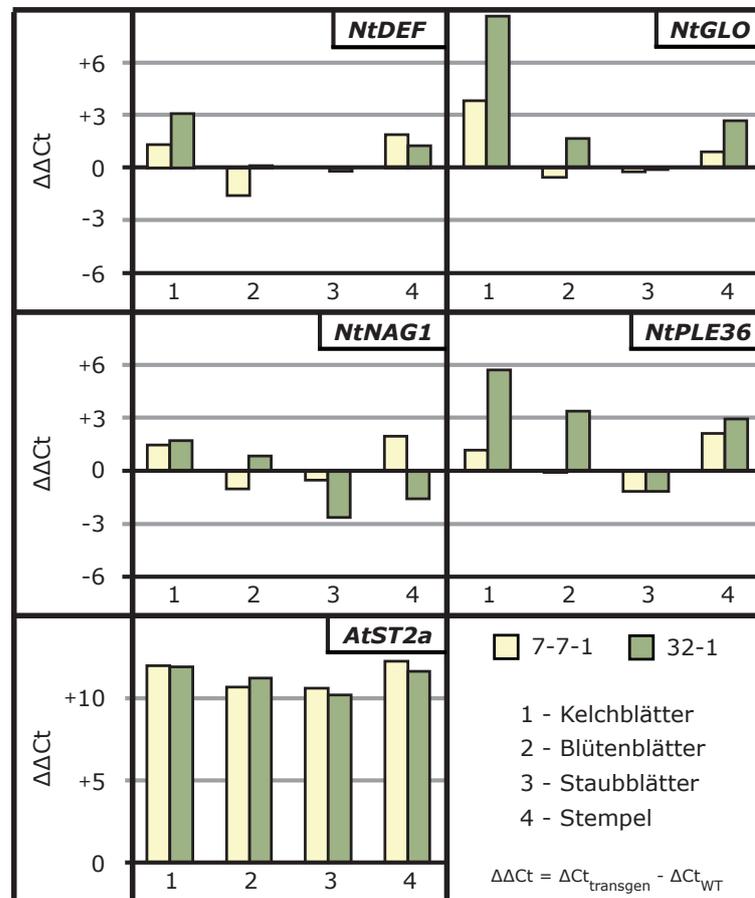
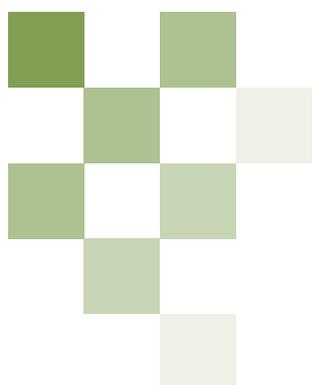


Abb. 3.44: qPCR-Analyse der Expression verschiedener Blütenorgan-Identitätsgene in den Blütenteilen von *35S::AtST2a-sense*-Tabak-Pflanzen (Die einzelnen Organe verschiedener Pflanzen wurden geerntet und Gesamt-RNA isoliert. 5 µg Gesamt-RNA wurden zur cDNA-Synthese eingesetzt und die PCR erfolgte mit 20 ng cDNA als Template. Der ΔCt-Wert einer Probe für ein bestimmtes Gen ergibt sich aus der Differenz des Ct-Wertes für dieses Gen und dem Ct-Wert des Referenz-Gens *NtRPS6*. Der dargestellte ΔΔCt-Wert ist die Differenz aus dem ΔCt-Wert der transgenen Pflanze und dem ΔCt-Wert der Wildtyp-Pflanze.)



4 Diskussion

Die Aufklärung der JA-Biosynthese gelang bereits vor mehr als 20 Jahren (VICK & ZIMMERMANN 1983; HAMBERG & HUGHES 1988). Mit Hilfe verschiedener transgener Pflanzen und Mutanten mit gestörter JA-Biosynthese bzw. JA-Signaltransduktion konnte die Bedeutung der Jasmonate als essentielle Regulatoren der pflanzlichen Entwicklung und während der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress mehrfach belegt werden (TURNER *et al.* 2002; HOWE 2004; HALITSCHKE & BALDWIN 2005). Die Wirkung von JA ist dabei verbunden mit umfangreichen Veränderungen der Genexpression, wobei bereits hunderte JA-regulierter und co-regulierter Gene identifiziert wurden (DEVOTO *et al.* 2005). Weit weniger ist jedoch bekannt über den Metabolismus von JA und die Funktion der entsprechenden Metabolite. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Funktion von 12-OH-JA untersucht, wobei verschiedene Strategien verfolgt wurden. Zum einen wurde die Generierung von 12-OH-JA und dessen Metaboliten 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA untersucht sowie die Abhängigkeit der Bildung dieser Verbindungen von der JA-Biosynthese. Zum anderen wurde die biologische Aktivität dieser Verbindungen während JA-vermittelter Prozesse mit Hilfe verschiedener Applikationsexperimente analysiert. Der Hauptteil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Modulation des endogenen 12-OH-JA-Gehaltes durch verschiedene transgene Ansätze. Dafür wurden putative 12-OH-JA-STs aus Tomate identifiziert und charakterisiert. Es erfolgte die heterologe Überexpression der *AtST2a* sowie die Expression einer 12-OH-JA-ST (*LeST2a*) in *sense*- und *antisense*-Orientierung in Tomate. Phänotypische Veränderungen sollten Aufschluss über Prozesse geben, an denen 12-OH-JA beteiligt ist.

4.1 Die Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA

12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA kommen in verschiedenen Organen unterschiedlicher Pflanzen vor (MIERSCH *et al.* im Druck). Die Mengen und Verhältnisse der einzelnen Metabolite variieren dabei äußerst stark und übersteigen den JA-Gehalt häufig um ein Vielfaches. Daraus ergab sich zum einen die Frage nach der biologischen Aktivität dieser Verbindungen und zum anderen, ob ihre Bildung während JA-vermittelter Prozesse, wie der Wundantwort, erfolgt. Eine wund-induzierte JA-Akkumulation ist seit langem sowohl in Tomate als auch in Tabak bekannt und gut untersucht (HOWE 2004; HALITSCHKE & BALDWIN 2005). Sie war der Ausgangspunkt für die hier erstmals beschriebene Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). Die JA-Metabolite akkumulierten dabei zu weit aus größeren Mengen als JA selbst. In Tomate überstieg der 12-O-Gluc-JA-Gehalt den 12-HSO₄-JA-Gehalt um das dreifache, während in Tabak beide Metabolite zu ähnlichen Mengen akkumulierten. Dies spricht dafür, dass JA, das während der Wundantwort gebildet wurde, zunächst zu 12-OH-JA dann in Tomate vorwiegend weiter zu 12-O-Gluc-JA, aber auch zu 12-HSO₄-JA und in Tabak zu 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-

JA gleichermaßen umgesetzt wurde. Die Veränderung der Jasmonat-Gehalte nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA deuten ebenfalls auf einen derartigen Umsatz hin. Nach Applikation von JM, konnten in Tomate und Tabak JA, 12-OH-JA und später auch 12-O-Gluc-JA in sehr großen Mengen detektiert werden (vgl. Abb. 3.3 und 3.4). Nach Applikation von 12-OH-JA erfolgte vorwiegend die Akkumulation von 12-O-Gluc-JA und der applizierten Substanz selbst, während nach 12-HSO₄-JA-Applikation nur 12-HSO₄-JA selbst in erhöhter Menge nachgewiesen wurde. Dies spricht dafür, dass es nicht gespalten wird.

Die Verwundungs- und Applikationsexperimente sprechen dafür, dass 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA aus JA gebildet werden. Es blieb jedoch die Frage offen, ob die Bildung von der JA-Biosynthese abhängig ist. Die fehlende Akkumulation dieser Verbindungen nach Verwundung verschiedener Mutanten und transgener Linien, die an verschiedenen Schritten der JA-Biosynthese gestört sind, deuten auf eine Abhängigkeit hin (vgl. 3.1.3; MIERSCH *et al.* im Druck). Die Mutante *spr2* besitzt aufgrund eines Defektes einer ω 3-Fettsäure-Desaturase reduzierte α -LeA-Gehalte, die Ausgangsverbindung der JA-Biosynthese (LI *et al.* 2003). Die transgenen *35S::AOC-antisense*-Pflanzen sind aufgrund der reduzierten AOC-Protein-Menge kaum in der Lage nach Verwundung OPDA und JA zu bilden (STENZEL *et al.* 2003a). In beiden Pflanzen war eine Akkumulation von 12-OH-JA nach Verwundung im Gegensatz zum entsprechenden Wildtyp nicht bzw. nur vermindert nachweisbar (MIERSCH *et al.* im Druck). Dies spricht für eine Abhängigkeit der 12-OH-JA-Bildung von der Verfügbarkeit von α -LeA und der Biosynthese von OPDA und JA. Die Mutante *acx1* ist in der Lage sowohl α -LeA als auch OPDA zu bilden, die weitere Umwandlung zu JA kann jedoch aufgrund eines Defektes des Enzyms ACX1 und somit gestörter Fettsäure- β -Oxidation nicht erfolgen (LI *et al.* 2005). Die Verkürzung der Carbonsäure-Seitenkette der reduzierten OPDA durch die Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation wurde mit Hilfe verschiedener Mutanten sowohl für Tomate als auch für Arabidopsis mehrfach belegt (CRUZ CASTILLO *et al.* 2004; AFITLHILE *et al.* 2005; LI *et al.* 2005; DELKER *et al.* 2007). Nach Verwundung erfolgte in den *acx1*-Mutanten ein Anstieg des OPDA-Gehaltes (vgl. Abb. 3.5). Dieser fiel jedoch vermutlich aufgrund des fehlenden positiven *feedbacks* durch JA geringer aus als im Wildtyp. Die positive *feedback*-Wirkung von JA auf die eigene Biosynthese ist ein oft diskutierter Regulationsmechanismus der JA-Biosynthese. So ist die Expression der JA-Biosynthesegene wie AOS und AOC durch JA induzierbar (WASTERNAK *et al.* 2006). Zudem werden die Promotoren von AOS und AOC durch JA-Applikation aktiviert (KUBIGSTELTIG *et al.* 1999; STENZEL persönliche Mitteilung) und die Arabidopsis-Mutante *cev1*, die konstitutiv erhöhte JA-Level besitzt, zeigt vermehrte AOC-Expression (ELLIS *et al.* 2002; STENZEL persönliche Mitteilung). Des Weiteren erfolgte nach Verwundung in den *acx1*-Pflanzen keine Akumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA (vgl. Abb. 3.5). Dies zeigt, dass die Bildung dieser Metabolite nicht nur abhängig von der Verfügbarkeit des

Substrates α -LeA und der Bildung von OPDA ist, sondern eine vollständige JA-Biosynthese notwendig ist. Das Enzym, das die Hydroxylierung katalysiert, ist bislang nicht identifiziert worden. Somit war unklar, wann diese Hydroxylierung erfolgt. Vorstellbar wäre, dass bereits α -LeA hydroxyliert wird und weiter über den JA-Biosynthese-Weg umgesetzt wird. Dagegen spricht allerdings, dass die AOC 13-Hydroperoxid-Derivate nicht umgesetzt (ZIEGLER *et al.* 1999). Somit wären weitere Enzyme für den Umsatz von hydroxylierter α -LeA notwendig. Dies kann anhand der vorliegenden Daten jedoch ausgeschlossen werden, da in den *35S::AOC-antisense*-Pflanzen, sowie der Mutante *acx1* keine 12-OH-JA-Akkumulation nach Verwundung erfolgte (vgl. Abb. 3.5; MIERSCH *et al.* im Druck).

Die Verwundungsexperimente zeigten außerdem, dass nach Verwundung eine *de novo*-Synthese von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA erfolgt. So waren diese Verbindungen vor Verwundung kaum nachweisbar (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). Erst nach wund-induzierter Bereitstellung von JA erfolgte die Akkumulation der JA-Metabolite. Eine wund-induzierte Freisetzung der drei JA-Metabolite aus einem JA-Speicher kann ausgeschlossen werden, da ihre Bildung in den *spr2-*, *acx1-* und *35S::AOC-antisense*-Pflanzen nur minimal erfolgte (vgl. Abb. 3.5; MIERSCH *et al.* im Druck). Für eine *de novo*-Synthese spricht ebenfalls, dass in den *AtST2a-sense*-Pflanzen, die vermehrt 12-HSO₄-JA bilden könnten, kaum 12-HSO₄-JA im unverwundeten Blatt nachweisbar war (vgl. Abb. 3.31).

Es blieb jedoch die Frage offen, was mit 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung geschieht. Nach Applikation von 12-HSO₄-JA konnte fast ausschließlich diese Verbindung detektiert werden, was dafür spricht, dass die Sulfatierung irreversibel ist (vgl. Abb. 3.3 und 3.4). Auch bei Einsatz von radioaktiv-markiertem 12-HSO₄-JA erfolgte kein Umsatz zu JA, 12-OH-JA oder 12-O-Gluc-JA (MIERSCH persönliche Mitteilung). Des Weiteren wurde bislang keine entsprechende Sulfatase identifiziert. Für Applikationsexperimente mit 12-O-Gluc-JA stand nicht ausreichend Substanz zur Verfügung, so dass für diese Verbindung die Frage nach einer eventuellen Deglukosylierung noch offen ist. Ein entsprechendes Enzym wurde bislang nicht identifiziert.

Ein weiterer interessanter Aspekt der vorliegenden Daten ist die unterschiedliche Akkumulation von 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA. Die 12-HSO₄-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte variieren in verschiedenen Organen unterschiedlicher Pflanzen sehr stark (MIERSCH *et al.* im Druck). Auch nach Verwundung akkumulierten beide Verbindungen in unterschiedlichen Mengen und Verhältnissen in Tomate und Tabak. (Abb. 4.1). Selbst in den beiden Tomaten-Wildtypen Lukullus und Castlemart war das Verhältnis der Akkumulation beider Verbindungen verschieden (vgl. Abb. 3.1 und 3.5). Geht man davon aus, dass sowohl 12-HSO₄-JA als auch 12-O-Gluc-JA durch Sulfatierung bzw.

Glykosylierung aus 12-OH-JA gebildet werden, muss die Entscheidung über die Art der Metabolisierung reguliert sein. Auf mögliche Regulationsmechanismen, sowie die Bedeutung der unterschiedlichen JA-Metabolit-Signaturen wird später noch ausführlicher eingegangen (vgl. 4.3.2 und 4.4).

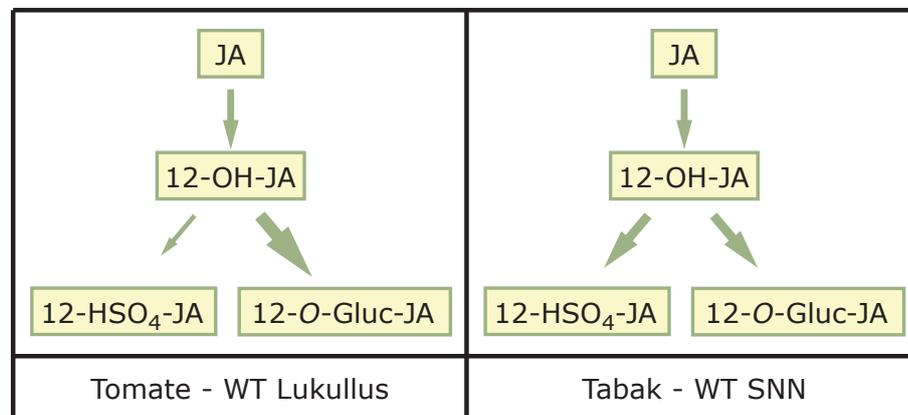


Abb. 4.1: Die Metabolisierung von JA zu 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Tomate und Tabak

4.2 Die Klonierung und Charakterisierung putativer 12-OH-JA-STs aus Tomate

Für Hinweise auf Funktionen und Wirkungen der JA-Metabolite 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA sollte der JA-Metabolismus mit Hilfe eines transgenen Ansatzes verändert werden. Dies geschah durch Expression einer 12-OH-JA-ST (*LeST2a*) in *sense*- und *antisense*-Orientierung in Tomate. Hierfür erfolgte zunächst die Identifizierung und Charakterisierung solcher STs aus Tomate. Da bisher keine ST aus Tomate bekannt ist, wurde die EST-Suche auf Basis der AtST2a-AS-Sequenz durchgeführt. Die Aktivität und Spezifität der AtST2a wurde bereits im Vorfeld dieser Arbeit gezeigt (GIDDA *et al.* 2003). Es wurden sechs verschiedene ESTs identifiziert, die für putative STs in Tomate kodierten (vgl. Tab. 3.1). Die vollständige cDNA-Sequenz von 3 dieser ESTs konnte isoliert werden. *LeST2a* und *LeST6* konnten kloniert, in *E.coli* überexprimiert und hinsichtlich ihrer enzymatischen Aktivität überprüft werden. Diese beiden Proteine zeigten mit 44 % die höchste Homologie zur AtST2a-Sequenz (vgl. Tab. 3.1 und 3.2).

Die Flavonol-3- und die Flavonol-4'-ST aus *Flaveria chloreaefolia* sind an einer klar definierten, sequentiellen Polysulfatierung beteiligt (VARIN *et al.* 1992). Mit Hilfe dieser beiden Enzyme wurden bislang die meisten bekannten, funktionalen Motive pflanzlicher STs identifiziert. So wurden zum einen essentielle AS-Reste für die Cosubstrat-Bindung und den Katalyse-Mechanismus und zum anderen die Regionen, die die Spezifität für

das Akzeptor-Substrat bestimmen, identifiziert (MARSOLAIS *et al.* 2000). Sowohl LeST2a als auch LeST6 enthielten alle charakteristischen AS-Reste für die PAPS-Bindung und den Katalyse-Mechanismus (vgl. Abb. 3.11), was für die Funktion als ST notwendig ist. Des Weiteren besaßen *LeST2a*- und *LeST6*-Sequenzen so wie die meisten putativen STs aus Arabidopsis (KLEIN & PAPENBROCK 2004) keine Introns. Ein Signal-Peptid konnte ebenfalls nicht vorhergesagt werden. Die LeST2a und LeST6 gehören somit höchstwahrscheinlich zur Gruppe der löslichen STs und sind im Cytosol lokalisiert. Genauere Aussagen über die intrazelluläre Lokalisation der LeST2a und LeST6 sind jedoch erst nach immunzytologischen Untersuchungen möglich. Die AtST2a und alle anderen charakterisierten und putativen STs in Arabidopsis zählen auch zu den löslichen STs (KLEIN & PAPENBROCK 2004). Die einzig bisher identifizierte membran-gebundene ST-Aktivität in Pflanzen ist eine Tyrosylprotein-ST-Aktivität (HANAI *et al.* 2000). In isolierten microsomalen Membranfraktionen von Reis, Spargel und Karotte konnte eine solche Aktivität nachgewiesen werden. Die Expression der *LeST2a* und *LeST6* war als einzige der 6 identifizierten ESTs ebenso wie die der *AtST2a* deutlich durch Verwundung, JM- oder 12-OH-JA-Applikation induzierbar (vgl. Abb. 3.18; GIDDA *et al.* 2003).

Endgültig belegt werden konnte eine Funktion als 12-OH-JA-ST jedoch nur durch den Nachweis der enzymatischen Aktivität. Nach Adaption eines Testsystems für tierische STs nach BURKHART & WONG (1999) gelang schließlich der Nachweis für den Umsatz von 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA durch die LeST2a und die LeST6 (vgl. Abb. 3.16). Da jedoch keine weiteren Substrate getestet werden konnten und die Bestimmung enzymatischer Parameter ebenfalls nicht mehr erfolgte, kann der Umsatz weiterer Verbindungen nicht ausgeschlossen werden. Bisher konnten neben 12-OH-JA, Flavonole, Brassionosteroide, Cholin, Gallussäure-Glukosid und Desulfo-Glucosinolate als Substrate für pflanzliche STs identifiziert werden (VARIN *et al.* 1992; ROULEAU *et al.* 1999; MARSOLAIS *et al.* 2007; PIOTROWSKI *et al.* 2004; RIVOAL & HANSEN 1994; VARIN *et al.* 1997; GIDDA *et al.* 2003). Dabei wurden in Pflanzen STs charakterisiert, die ein sehr breites Substratspektrum aufweisen, z.B. die beiden STs BNST3 und 4 aus *B. napus* (MARSOLAIS *et al.* 2004). Die AtST2a aus Arabidopsis sulfatiert hingegen spezifisch 11- und 12-OH-JA (GIDDA *et al.* 2003). Die Existenz weiterer 12-OH-JA-STs in Tomate kann nicht ausgeschlossen werden. In Arabidopsis wurde bislang nur eine 12-OH-JA-ST charakterisiert (AtST2a; GIDDA *et al.* 2003). Von den 18 im Genom vorhandenen STs wurden allerdings erst 7 hinsichtlich ihrer Substratspezifität untersucht (vgl. Tab. 1.1), so dass auch in Arabidopsis andere 12-OH-JA-STs vorstellbar wären.

4.2.1 Die Expression der *LeST2a* und *LeST6*

Die Expression der *LeST2a* und der *LeST6* war durch Verwundung, JM und 12-OH-JA induzierbar (vgl. Abb. 3.17 und 3.18). Auch Gene des JA-Biosyntheseweges wie z.B. *AOC*, *AOS* und *OPR3* und Gene des JA-Metabolismus, wie *JMT* sind durch Verwundung oder JM induzierbar (WASTERNAK *et al.* 2006; SEO *et al.* 2001). Auf der anderen Seite ist die Expression von *JAR1*, ein weiteres Gen des JA-Metabolismus in Arabidopsis nicht durch JM induzierbar (STASWICK & TIRYAKI 2004). Die Expression der *LeST2a* und *LeST6* nach Verwundung ermöglicht, unter der Voraussetzung, dass sie zur Bildung aktiver Enzyme führt, die Generierung von 12-HSO₄-JA aus 12-OH-JA. Dies kann in Anbetracht der Expressionsdaten JA- und wund-induzierbarer Gene nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA zu einem Abschalten der JA- und 12-OH-JA Wirkung nach Verwundung führen, worauf später noch ausführlicher eingegangen wird (vgl. 4.3.1).

Die Expression der *LeST2a* und *LeST6* ist von COI1 abhängig (vgl. Abb. 3.19). In der Tomaten-Mutante *jai1*, die einen Defekt im *JAI1*-Gen, dem Tomaten-Homologen zu *COI1* aus Arabidopsis, besitzt (LI *et al.* 2004a), konnte die Expression der *LeST2a* nicht durch Applikation von JM oder 12-OH-JA induziert werden (vgl. Abb. 3.19). In Arabidopsis werden rund 82 % der 212 JA-induzierbaren und 44 % der 153 wund-induzierbaren Gene COI1-abhängig exprimiert (DEVOTO *et al.* 2005), was die Bedeutung von COI1 für die JA-Signaltransduktion demonstriert. In Tomate wurden 37 JM-induzierbare Gene identifiziert, wobei die JM-induzierbare Expression aller Gene abhängig ist von JAI1 (LI *et al.* 2004a). Zu diesen Genen gehören u.a. Abwehrgene, wie *PIN2* oder *LAP*, sowie die JA-Biosynthese-Gene. Dies belegt die Abhängigkeit der JA-Biosynthese und -Signaltransduktion von COI1 auch in Tomate. Die Abhängigkeit der *LeST2a/6*-Expression weist außerdem auf die Bedeutung von COI1 für die Regulation des JA-Metabolismus hin.

Die Expression der *LeST2a* und *LeST6* erfolgt organspezifisch (vgl. Abb. 3.20). So konnte Transkript in der Wurzelspitze, im Keimling, den Knospen, offenen Blüten, im Blütenstil, Kelchblättern und dem Stempel per Northern Blot-Analyse nachgewiesen werden, wobei zwischen *LeST2a*- und *LeST6*-Transkript nicht unterschieden werden konnte (vgl. Abb. 3.20). Differenzierte Transkriptanalysen der einzelnen Blütenorgane per qPCR, wobei die Unterscheidung von *LeST2a*- und *LeST6*-Transkript möglich war, zeigten, dass *LeST2a* in allen Blütenorganen außer den Staubblättern stark und die *LeST6* in allen Blütenteilen nur sehr schwach exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Eine *LeST2a/6*-Expression im Stengel, in der gesamten Wurzel oder im unverwundeten Blatt war nicht nachweisbar. Während die nicht nachweisbare Expression der *LeST2a/6* im Blatt mit dem dort kaum nachweisbaren 12-HSO₄-JA-Gehalt korrelierte (vgl. Abb. 3.1

und 3.20), war interessanterweise trotz starker Expression der *LeST2a* in den Blüten dort kaum 12-HSO₄-JA nachweisbar (vgl. Abb. 3.20 und 3.38). Sowohl 12-OH-JA und vor allem 12-O-Gluc-JA konnten in den Blüten nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass der geringe 12-HSO₄-JA-Gehalt nicht aus einem Mangel an Substrat resultiert. Eine post-translationale Modifikation der Enzymaktivität der *LeST2a* wäre eine Erklärung und wird später ausführlich besprochen (vgl. 4.2.2). Unterschiedliche Regulationsmechanismen in Blatt und Blüte von Tomate konnten bereits für die JA-Biosynthese mit Hilfe von AOC-Überexpressionspflanzen gezeigt werden (MIERSCH *et al.* 2004). So konnten in diesen Pflanzen keine erhöhten JA-Level im unverwundeten Blatt nachgewiesen werden. Erst nach Verwundung wurde vermehrt JA generiert. Auf der anderen Seite zeigten die 35S::*AOC-sense*-Pflanzen konstitutiv erhöhte JA-, OPDA-, dinor-OPDA-, JM und OPDAME-Level in verschiedenen Blütenorganen.

In allen untersuchten Organen, in denen die Expression der *LeST2a/6* erfolgte, konnte auch die Expression der AOC bzw. eine Aktivität des AOC-Promotors nachgewiesen werden (HAUSE *et al.* 2000; STENZEL persönliche Mitteilung). So wird in der Wurzelspitze sowohl die AOC als auch die *LeST2a/6* exprimiert (vgl. Abb. 3.20; HAUSE *et al.* 2000). Auch AOC-Protein wurde in der Wurzel nachgewiesen (HAUSE *et al.* 2000). Dies korreliert mit dem Nachweis von JA und 12-HSO₄-JA in erheblichen Mengen von bis zu 2 nmol pro Gramm Frischgewicht in der Wurzel (OKA persönliche Mitteilung). Die inhibierende Wirkung von JA auf das Wurzelwachstum ist seit langem bekannt und wird durch das JA-Metabolit JA-Ile vermittelt (STASWICK *et al.* 1992; STASWICK & TIRYAKI 2004). Im Gegensatz dazu haben 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA keinen Einfluss auf das Wurzelwachstum (vgl. Abb. 3.9). Somit würde die Expression der *LeST2a/6* die Möglichkeit bieten der inhibierenden Wirkung von JA durch Metabolisierung zu 12-OH-JA und weiter zu 12-HSO₄-JA, anstelle von JA-Ile, entgegenzuwirken.

Jasmonate sind ebenfalls an der Blütenentwicklung beteiligt. Auch in den Blüten findet sowohl die Expression der AOC als auch der *LeST2a* statt (vgl. Abb. 3.20). In Arabidopsis werden Jasmonate für die Pollenentwicklung, die Filamentelongation und die Antherendehiszenz benötigt (STINTZI & BROWSE 2000; PARK *et al.* 2002; VON MALEK *et al.* 2002). Entsprechend sind Jasmonat-defiziente oder -insensitive Arabidopsis-Mutanten, wie *coil*, männlich steril (XIE *et al.* 1998). Die JA-insensitive Tomaten-Mutante *jai1* ist hingegen weiblich steril (LI *et al.* 2004a). Dies bestätigt zum einen die Bedeutung von JA für die Blütenentwicklung und zeigt zum anderen, dass homologe Komponenten des JA-Signalweges in verschiedenen Pflanzen erhebliche Unterschiede im Bereich ihrer biologischen Wirkung aufweisen können. Die einzelnen Blütenorgane von Tomate zeigen distinkte Oxylipin- und Jasmonat-Signaturen und mehrere JA-responsive Gene werden in den Blüten exprimiert (vgl. 3.6.6; HAUSE *et al.* 2000). In den Blütenorganen konnte kaum 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden, dafür auffällig hohe 12-O-Gluc-JA-

Gehalte (vgl. Abb. 3.38). Die Frage nach der Bedeutung der Expression der *LeST2a* in den einzelnen Blütenorganen bleibt bislang unbeantwortet. Auf die Bedeutung des JA-Metabolismus für die Infloreszenz- bzw. Blütenentwicklung wird später näher eingegangen (vgl. 4.3.2.2).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die organspezifische Metabolisierung von JA mittels organspezifischer Expression der *LeST2a* und *LeST6* eine Spezialisierung des JA-Signals bedeuten kann. Die unterschiedliche Expression der *LeST2a* und *LeST6* kann dabei ebenfalls zur Regulation beitragen.

4.2.2 Post-transkriptionale und post-translationale Regulation der *LeST2a* und *LeST6*

Post-transkriptionale und post-translationale Modifikationen sind wichtige regulatorische Elemente zur Kontrolle der Biosynthese und der Signaltransduktion von Phytohormonen. Dabei spielt die Regulation der Transkript-Menge durch miRNAs oder endogene siRNAs eine wichtige Rolle. Dies ist bereits für die Regulation der Biosynthese und der Signaltransduktion des Auxins belegt (GUO *et al.* 2005; MALLORY *et al.* 2005). Es kann angenommen werden, dass dieses Regulationsprinzip auch in Signalwegen anderer Phytohormone von Bedeutung ist. Bislang wurden jedoch keine niedermolekularen RNAs identifiziert, die an der Regulation der JA-Biosynthese oder der JA-Signaltransduktion beteiligt sind. Post-translationale Modifikationen wie Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind hingegen essentiell für die Induktion der JA-Biosynthese und –Signaltransduktion (ROJO *et al.* 1998; MENKE *et al.* 1999; SEO *et al.* 1999). Sowohl die *LeST2a* als auch die *LeST6* weisen putative Phosphorylierungsstellen auf (vgl. 3.3.3). Ob diese funktional sind, ist noch unklar. Eine weitere Möglichkeit zur post-translationalen Kontrolle der Enzymaktivität ist die Bildung von Oligomeren. Die Kristallstrukturen der OPR3 und AOC2 aus *Arabidopsis* legen nahe, dass diese Enzyme Dimere bzw. Trimere bilden (BREITHAUPT *et al.* 2006; HOFMANN *et al.* 2006). Die OPR3 wird durch Homodimerisierung vermutlich inaktiviert (BREITHAUPT *et al.* 2006). Die Bedeutung der Trimerisierung der AOC hinsichtlich der Aktivität ist noch unklar. Da in *Arabidopsis* vier AOCs identifiziert wurden, ist es möglich, dass die Aktivität auch durch Heterotrimerisierung beeinflusst werden kann. Die AS-Sequenzen der *LeST2a* und *LeST6* enthalten ein putatives Dimerisierungsmotiv (vgl. Abb. 3.11), das bis auf eine AS dem Dimerisierungsmotiv KTVE tierischer STs entspricht (PETROTCHENKO *et al.* 2001). Glutaminsäure ist gegen Asparaginsäure ausgetauscht. Da es sich dabei um einen konservierten AS-Austausch handelt, wäre eine Funktionalität des Dimerisierungsmotives vorstellbar. Die notwendige Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen und der ionischen Wechselwirkungen wären möglich. Die tatsächliche Funktional-

lität konnte jedoch nicht mehr überprüft werden. Bisher konnte in keiner publizierten pflanzlichen ST ein Dimerisierungsmotiv identifiziert werden (KLEIN & PAPENBROCK 2004). Alle bisher charakterisierten pflanzlichen STs sind als Monomere aktiv. Im Gegensatz dazu sind tierische STs als Monomere, Homodimere und Heterodimere aktiv (WEINSHILBOUM *et al.* 1997). Das Vorhandensein eines putativen Dimerisierungsmotives in der LeST2a- und LeST6-Sequenz könnte die Homo- oder Heterodimerisierung ermöglichen, was zur Regulation der enzymatischen Aktivität beitragen würde.

Für eine post-translationale Modifikation der Aktivität der LeST2a spricht die unterschiedliche Akkumulation von 12-HSO₄-JA trotz ähnlicher Expression der *LeST2a*. In Blüten erfolgte die Expression der *LeST2a*, 12-HSO₄-JA konnte jedoch kaum nachgewiesen werden (vgl. Abb. 3.20 und 3.38). Da die *LeST6* in den Blüten kaum exprimiert wird (Daten nicht gezeigt), wäre möglich, dass eine 12-OH-JA-ST-Aktivität erst durch Heterodimerisierung erreicht wird. Dagegen spricht, dass der Nachweis der Aktivität der LeST2a und LeST6 *in vitro* jeweils einzeln möglich war (vgl. Abb. 3.16). Ob dabei eine Homodimerisierung erfolgte ist nicht bekannt. Des Weiteren spricht für eine post-translationale Kontrolle der LeST2a-Aktivität die unterschiedlichen 12-HSO₄-JA-Gehalt in den transgenen Tomatenpflanzen, die die *LeST2a* bzw. *AtST2a* überexprimierten, worauf später näher eingegangen werden soll (vgl. 4.3.2.1). Eindeutige Aussagen über post-translationale Modifikationen und mögliche Dimerisierungen sind jedoch erst nach Nachweis des LeST2a-Proteins *in vivo* und nach Untersuchung der Funktionalität der putativen Dimerisierungsmotive und Phosphorylierungsstellen möglich.

4.3 Die Bedeutung des JA-Metabolismus

4.3.1 Die biologische Aktivität von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA

Nachdem das Vorkommen und die Akkumulation von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage nach der Bedeutung dieser JA-Metabolite. Dabei sind verschiedene Möglichkeiten vorstellbar: Es handelt sich um (i) Speicher- oder Transportformen von JA, (ii) inaktive Metabolite oder (iii) aktive Metabolite. Eine Kombination aller drei Möglichkeiten wäre ebenfalls vorstellbar. Ebenso wäre denkbar, dass die einzelnen Metabolite in unterschiedlichen Pflanzen verschiedene Funktionen besitzen. Sie konnten in erheblich unterschiedlichen Mengen in verschiedenen Pflanzen und Organen nachgewiesen werden (MIERSCH *et al.* im Druck). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass sie ebenso wie JA-Ile und *cis*-Jasmon innerhalb einer Pflanze nur bei bestimmten JA-vermittelten Prozessen wirksam sind (STASWICK *et al.* 2002; BIRKETT *et al.* 2000; HALITSCHKE & BALDWIN 2005). JAR1 kata-

lysiert die Konjugation von JA mit der AS Ile (STASWICK & TIRYAKI 2004). Die Mutante *jar1* zeigt reduzierte JA-Ile-Mengen und hinsichtlich des Wurzelwachstums und der Expression mehrerer JA-responsiver Gene einen JA-insensitiven Phänotyp (STASWICK *et al.* 1992; STASWICK & TIRYAKI 2004). Sie ist jedoch im Gegensatz zu JA-Biosynthese-Mutanten wie *opr3* oder der JA-insensitiven Mutante *coi1* nicht männlich steril. Außerdem ist vorstellbar, dass 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nur in bestimmten Organen biologisch aktiv sind, weil die entsprechenden Signalwege, inklusive möglicher, spezifischer Rezeptoren, nur dort vorhanden sind.

Erste Hinweise auf eine Wirkung von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA sollten Applikationsexperimente liefern. JA inhibiert die Keimung und das Wurzelwachstum (CORBINEAU *et al.* 1988; DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992). Interessanterweise hatten 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA exogen appliziert keinen Einfluss auf die Keimung oder das Wurzelwachstum (vgl. Abb. 3.8 und 3.9). Bezogen auf diese beiden Prozesse sind 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA biologisch inaktiv, so dass die Metabolisierung von JA eine Möglichkeit zur Inaktivierung des JA-Signals bieten könnte. Andererseits konnte die Induktion der Knollenbildung der Kartoffel durch 12-OH-JA belegt werden (YOSHIHARA *et al.* 1989). Deshalb kann nur aufgrund der fehlenden inhibierenden Wirkung auf Wurzelwachstum und Keimung nicht auf die vollkommene Inaktivität der JA-Metabolite geschlossen werden. In Tieren und Pflanzen dienen Sulfatierungen sowohl der Aktivierungen als auch der Inaktivierung bestimmter Verbindungen. Bestimmte Arzneistoffe werden durch Sulfatierung aktiviert, wohingegen die Sulfatierung von Östrogen zur Inaktivierung dieses Hormons führt (WEINSHILBOUM & OTTERNESS 1994). Den beiden Brassinosteroid-STs aus *Brassica napus* wird aufgrund des breiten Substratspektrums eine allgemeine detoxifizierende Wirkung, d. h. inaktivierende Funktion zugesprochen (MARSOLAIS *et al.* 2004). Bei den Glucosinolaten handelt es sich ebenfalls um sulfatierte Verbindungen, die hauptsächlich in Brassicaceen vorkommen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen und Herbivoren (HALKIER & GERSHENZON 2006). Nach Verwundung werden die Glucosinolate durch die Myrosinase zu instabilen Aglykonen hydrolysiert. Diese wiederum reagieren zu Thiocyanaten, Cyanaten, Nitrilen und anderen Verbindungen, die antimikrobiell, toxisch oder abschreckend auf Angreifer wirken (RASK *et al.* 2000). Die Sulfatierung ist in diesem Fall der letzte Schritt der Glucosinolat-Biosynthese und trägt letztendlich zur Generierung biologisch aktiver Verbindungen bei. Die Inaktivität sulfatierter Verbindungen wurde hauptsächlich in Analogie zum tierischen System postuliert, da die Sulfatierung die Löslichkeit und somit den Transport über das Blutkreislaufsystem zu den Nieren als abbauende Organe ermöglicht (WEINSHILBOUM *et al.* 1997).

Exogen appliziert zeigten weder 12-OH-JA noch 12-HSO₄-JA einen inhibierenden Effekt auf Keimung oder Wurzelwachstum. Phänotypische Veränderungen der transgenen

35S::*AtST2a-sense*- und 35S::*LeST2a-sense*-Pflanzen, deren JA-Metabolismus in Richtung 12-HSO₄-JA verstärkt war, wiesen jedoch auf die Bedeutung des JA-Metabolismus für Keimung und Wurzelwachstum hin, worauf später näher eingegangen werden soll (vgl. 4.3.2.3).

Für weitere Hinweise auf die biologische Aktivität von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA wurde die Expression einiger JA- und wund-induzierbarer Gene nach Applikation von JM, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA untersucht. Nach mechanischer Verwundung oder Verwundung durch Herbivoren wird JA gebildet. In Tomate erfolgt dabei zuerst die Aktivierung der *PROSYSTEMIN*-Expression im Leitgewebe, gefolgt von der Spaltung des Propeptids *PROSYSTEMIN* zum 18 AS großen Peptidhormons Systemin (NARVAEZ-VASQUEZ & RYAN 2004). Dieses Peptidhormon bindet an seinen Rezeptor SR160 in der Plasmamembran (SCHEER & RYAN 2002), was schließlich zur Freisetzung von α -LeA aus der Chloroplastenmembran durch eine Phospholipase A2 führt (NARVAEZ-VASQUEZ *et al.* 1999). Nach Freisetzung des Substrates α -LeA erfolgt die JA-Biosynthese und somit die JA-Akkumulation. Mit Hilfe transgener Linien, die die AOS bzw. AOC überexprimierten, konnte die Abhängigkeit der JA-Biosynthese von der Substratverfügbarkeit demonstriert werden (LAUDERT *et al.* 2000; STENZEL *et al.* 2003a). JA beeinflusst die Expression einer Vielzahl von Genen, wobei diese in frühe und späte Gene unterschieden werden können (RYAN 2000). Durch Micro-Array-Analysen konnten zudem JA- und wund-induzierbare Gene identifiziert werden (DEVOTO *et al.* 2005; LI *et al.* 2004a). TAKI *et al.* zeigten außerdem 2005, dass JM die gleiche Wirkung auf die Genexpression hat wie JA selbst. Zu den frühen wund-induzierbaren Genen zählen u.a. die Gene, die für JA-Biosynthese-Enzyme und *PROSYSTEMIN*, dem Systemin-Vorläufer, kodieren. Dieses positive *feedback* von JA auf die eigene Biosynthese und die *PROSYSTEMIN*-Expression, sowie die induzierende Wirkung von Systemin auf die AOC-Expression ermöglicht die Amplifikation des JA-Signals bzw. der Wundantwort (WASTERNAK *et al.* 2006). Zu den späten wund- bzw. JA-induzierbaren Genen zählen die sog. Abwehrgene, die für Enzyme des AS-, Sekundär- oder Polyamin-Stoffwechsels kodieren, wie z.B. PPOs, ARGs, LAPs und PINs (RYAN 2000; CHEN *et al.* 2004; CHEN *et al.* 2006; DUFFEY & FELTON 1991; CONSTABEL *et al.* 1995; CHEN *et al.* 2005; PATOUT *et al.* 1993; LISON *et al.* 2006). Der Einfluss von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf die Expression einiger JA- und wund-induzierbarer Gene wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Applikationsexperimente untersucht. Die Expression der wund- und JA-induzierbaren späten Gene *LeTD*, *LePIN2*, *LeLAP*, *LeODC*, *LeCDI*, *LeARG*, *LePPO* und *LeADC* war weniger stark bzw. gar nicht induzierbar durch 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA (vgl. Abb. 3.6 und 3.7; MIERSCH *et al.* im Druck). Diese Gene dienen der pflanzlichen Abwehr, indem die durch sie kodierten Proteine die Verdauung im Darmtrakt angreifender Insekten stören sollen. So wurde im Darmtrakt bzw. Kot von *Manduca sexta* nach Fraß von Tomatenblättern TD-, LAP- und ARG-Aktivität nachgewiesen. (CHEN *et al.* 2005; CHEN *et al.* 2007). Die Überex-

pression von *ARG* in Tomate führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem Befall durch *M. sexta*, sowie reduzierten Arg-Gehalten im Insekten-Darmtrakt (CHEN *et al.* 2005). Die fehlende Induzierbarkeit der Abwehrgene durch 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA deutet erneut die Möglichkeit der Inaktivierung des JA-Signals durch Metabolisierung an. Überraschenderweise kam es sogar zu einer Repression der Expression von *LeLAP*, *LeCDI*, *LeADC*, *LeODC* und der JA-Biosynthese-Gene *LeLOX*, *LeAOS1* und 2, *LeAOC* und *LeOPR3* durch 12-OH-JA und von *LeAOC* und *LeLAP* durch 12-HSO₄-JA (vgl. Abb. 3.6 und 3.7; MIERSCH *et al.* im Druck). Die Jasmonat-Gehalte nach Verwundung und Applikation (vgl. Abb. 3.1 und 3.3) sprechen dafür, dass nach Verwundung zuerst eine Akkumulation von JA erfolgt und danach eine Metabolisierung zu 12-OH-JA und weiter zu 12-HSO₄-JA oder 12-O-Gluc-JA. Zusammen mit den Expressionsdaten JA-induzierbarer Gene ergäbe sich folgendes Szenario für die JA-abhängige Wundantwort (Abb. 4.2): Nach Verwundung erfolgt die JA-Bildung, was wiederum zur Induktion der Expression von JA-Biosynthese-Genen und Abwehrgenen führt. Nach Metabolisierung von JA zu 12-OH-JA inhibiert dieses die Expression der JA-Biosynthese-Gene und die einiger Abwehrgene, was zu einem Abschalten des JA-Signals führt. Durch Sulfatierung von 12-OH-JA wird dessen reprimierender Effekt aufgehoben, da 12-HSO₄-JA nicht induzierend und kaum reprimierend wirkt. Der Metabolismus von JA kann so einer zu lange andauernden Amplifikation der Wundantwort zeitversetzt entgegenwirken.

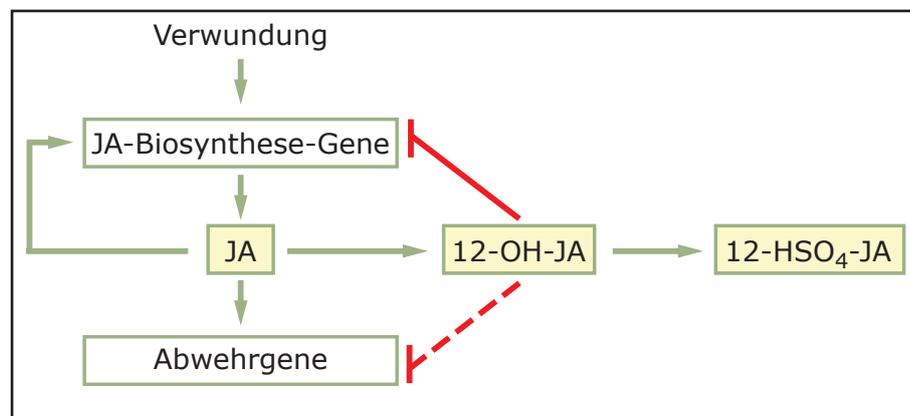


Abb. 4.2: Der Einfluss der Metabolisierung von JA auf die Expression wund-induzierbarer Gene

Neben der Inhibierung des Wurzelwachstums und der Keimung ist der Seneszenzfördernde Effekt von JA und JM schon lange bekannt (UEDA & KATO 1980). Eine direkte Verbindung von JA und Seneszenz zeigten Expressionsanalysen alternder Arabidopsisblätter (HE *et al.* 2002). In Blättern, die sich zu 25 bis 50 % gelb gefärbt hatten, erfolgte eine vermehrte Expression von JA-Biosynthese-Genen, wie *AOS* und *AOC*. Die Seneszenzfördernde Wirkung von JA ist dabei u.a. zurückzuführen auf die *down*-Regulation sog. *housekeeping*-Gene, z.B. das Gen, das für die kleine Untereinheit der

RuBisCo kodiert (WASTERNAK & HAUSE 2002). 12-HSO₄-JA hat keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten *housekeeping*-Gene (vgl. 3.2.1; MIERSCH *et al.* im Druck). Interessanterweise zeigt 12-OH-JA einen stärkeren Effekt bei der *down*-Regulation einiger *housekeeping*-Gene als JA (vgl. 3.2.1; MIERSCH *et al.* im Druck). Dies spricht dafür, dass die Hydroxylierung nicht nur dem Effekt von JA entgegenwirkt, sondern auch stärker wirken kann als JA selbst.

Die Frage nach dem Einfluss von 12-O-Gluc-JA auf Wurzelwachstum, Keimung und Genexpression bleibt bisher unbeantwortet. Die Glukosylierung erhöht jedoch wie die Sulfatierung die Löslichkeit. Beide 12-OH-JA-Metabolite könnten Transportformen von JA sein. In Kartoffel konnte die Induktion der Knollen-Bildung durch 12-O-Gluc-JA gezeigt werden (YOSHIHARA *et al.* 1989). Dieser Effekt wurde jedoch nicht 12-O-Gluc-JA sondern 12-OH-JA zugesprochen. Das Glukosid wurde als Transportform vorgeschlagen. Eine entsprechende Glukosyltransferase und Hydrolase sind allerdings bisher nicht identifiziert worden. 12-O-Gluc-JA kommt in großen Mengen in den einzelnen Blütenteilen von Tomate und Tabak vor, JA hingegen kaum (vgl. Abb. 3.38 und 3.43). Möglicherweise dient es der Speicherung von JA und würde so eine schnelle Mobilisierung großer JA-Mengen z.B. zum Schutz der reproduktiven Organe bei Herbivoren-Befall ermöglichen. Interessant wären ebenfalls Untersuchungen zur Wirkung von 12-O-Gluc-JA auf die Expression JA- und wund-responsiver Gene, da dieses nach Verwundung im Tomaten- und Tabakblatt zu erheblichen Mengen akkumulierte (vgl. Abb. 3.1 und 3.2).

Zusammenfassend können folgende Punkte hervorgehoben werden:

- (1) Die Hydroxylierung bietet die Möglichkeit zum Abschalten des JA-Signals.
- (2) Die Metabolisierung ermöglicht die Spezialisierung des JA-Signals hinsichtlich der Genexpression.
- (3) JA-Metabolite dienen möglicherweise als Transport- oder Speicherformen für JA.

Der unterschiedliche Einfluss von JA, 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf Keimung, Wurzelwachstum und Expression JA-responsiver Gene wird basierend auf neuen Erkenntnissen zu den molekularen Komponenten des Jasmonat-Signaltransduktionsweges verständlicher. Ein zentraler Regulator ist COI1 (XIE *et al.* 1998). Es handelt sich dabei um ein F-box-Protein, das als Teil des pflanzlichen SCF-Komplexes bestimmte Proteine, die die Expression JA-induzierbarer Gene reprimieren, zum Abbau durch das Proteasom markiert (TURNER *et al.* 2002). Transkriptionsfaktoren, die *downstream* von JA und COI-abhängig wirken, wurden ebenfalls identifiziert. Dazu zählen in Arabidopsis u.a. der ERF1 (*ethylene response factor 1*), AtMYC2, WRKY70 und die ORAs, sowie die beiden Staubblatt-spezifischen Transkriptionsfaktoren MYB21 und MYB24 (LORENZO *et*

al. 2004; MEMELINK *et al.* 2001; LI *et al.* 2004b; BOTER *et al.* 2004; MANDAOKAR *et al.* 2006; PRE 2006). Dabei ist ORA47 ein positiver Regulator der JA-Biosynthese und ORA59, ORA37, ERF1, WRKY70 und MYC2 beeinflussen die Expression verschiedener Gruppen JA-responsiver Gene sowohl positiv als auch negativ (Abb. 4.3). So könnte eine Beteiligung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren die Unterschiede in der Wirkung von JA und dessen Metaboliten erklären. Vor kurzem gelang die Identifizierung putativer Jasmonat-Rezeptoren in Arabidopsis und Tomate (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007; YAN *et al.* 2007). Diese gehören zur JAZ-Familie von Repressor-Proteinen, die in Arabidopsis 10 Mitglieder umfasst und während der JA-Signaltransduktion durch den SCF^{COI1}-Komplex zum Abbau ubiquitiniert werden. JAZ-Proteine binden an Transkriptionsfaktoren JA-induzierbarer Gene, wodurch ihre Expression inhibiert wird (CHINI *et al.* 2007). Im Falle von JAZ1 und JAZ3 führt deren Interaktion mit COI1, die nur nach JA-Ile-Bindung erfolgt, zum Abbau der beiden Repressoren durch das 26S-Proteasom nach Ubiquitinierung durch den SCF^{COI1}-Komplex (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007). Dies verdeutlicht erneut die Bedeutung des JA-Metabolismus in Richtung JA-Ile für die JA-Signaltransduktion. Es sollte nicht nur in COI1-abhängige und unabhängige Genexpression unterschieden werden, sondern auch in JAR1-ab- und unabhängige. In der Arabidopsis-Mutante *jar1* werden nicht mehr alle JA-responsiven Gene exprimiert (TIRYAKI & STASWICK 2004).

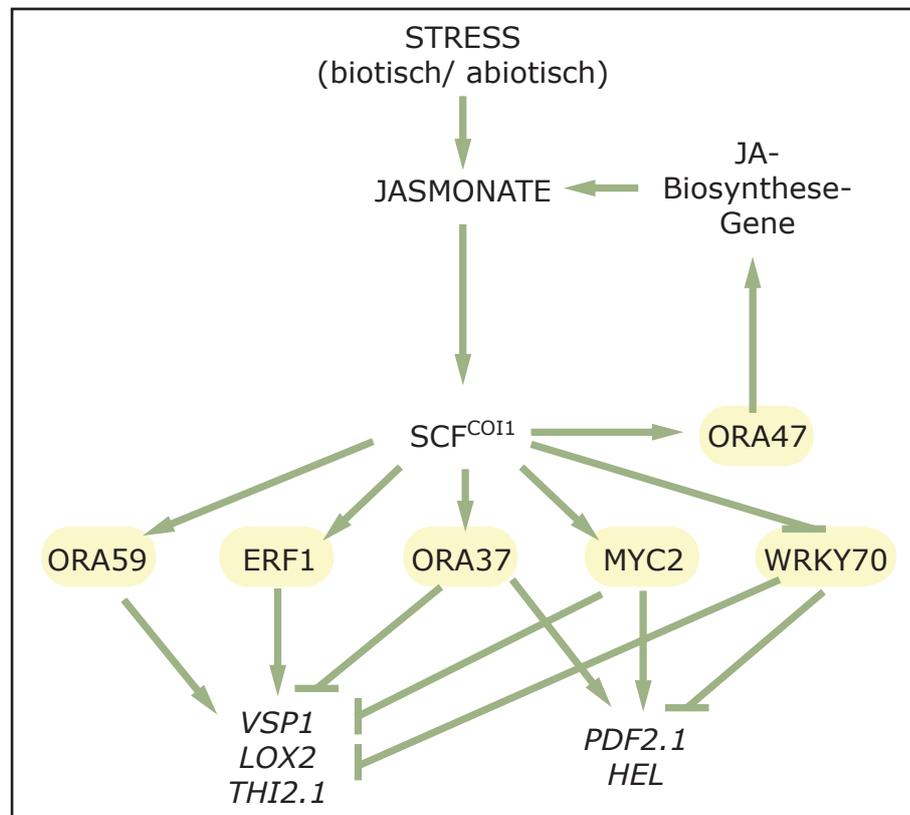


Abb. 4.3: Transkriptionsfaktoren (gelb unterlegt) und andere Komponenten im Signalweg JA-vermittelter Stressreaktionen in Arabidopsis (vereinfacht nach PRE 2006)

Im Gegensatz zur Mutante *coi1* sind *jar1*-Pflanzen jedoch nicht steril. Auch durch Applikation von JA-Ile können nur einige JA-responsive Gene induziert werden (KRAMELL *et al.* 1997). Dies deutet die Möglichkeit an, dass die verbleibenden JAZ-Proteinen andere Jasmonate, wie JA selbst JM oder auch 12-OH-JA oder dessen Derivate, erkennen bzw. binden. Verschiedene JA-Metabolite könnten so verschiedene Gruppen von Genen und damit verschiedene Prozesse innerhalb der Pflanze regulieren. Die Metabolisierung wäre eine Spezialisierung von JA-Signalen und das Gleichgewicht der einzelnen Metabolite könnte entscheidend die pflanzliche Entwicklung und die Reaktion auf biotische und abiotische Reize beeinflussen. Auch für andere Phytohormonen, wie die Auxine, wurde die Ausgewogenheit von Neusynthese, Metabolismus und Degradation als entscheidend für die biologische Funktion beschrieben (WOODWARD & BARTEL 2005). Die Regulation des Hormon-Metabolismus ist somit für die Pflanze von entscheidender Bedeutung.

4.3.2 Die Manipulation des JA-Metabolismus

Um den endogenen Gehalt von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA zu modifizieren und so weitere Hinweise auf eine Funktion dieser beiden Metabolite zu erlangen, wurde die *LeST2a* in *sense*- und *antisense*-Orientierung in Tomate konstitutiv exprimiert. Zusätzlich wurde die *AtST2a* in Tomate heterolog überexprimiert. Eine Überexpression der *ST2a* sollte in allen Fällen die 12-OH-JA-Menge in den Pflanzen verringern und die 12-HSO₄-JA-Menge steigern. In den *antisense*-Pflanzen war ein gegenteiliger Effekt zu erwarten. Durch Untersuchung phänotypischer Veränderungen sollten Prozesse identifiziert werden, an deren Regulation 12-OH-JA beteiligt ist. In Tabelle 4.1 sind alle festgestellten phänotypischen Veränderungen noch einmal zusammengefasst. Aufgrund der verminderten Keimungsfähigkeit der transgenen Pflanzen konnten nicht alle Untersuchungen an allen Linien durchgeführt werden. Alle Veränderungen, mit Ausnahme des Wurzelphänotyps, traten dabei in mindestens 2 unabhängigen Linien auf, von denen mindestens eine nur eine Kopie des Transgens trug (vgl. 3.5.2). Es kann somit fast vollkommen ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Veränderungen durch den *knock-out* anderer Gene oder anderer Veränderungen des Genoms als Begleiterscheinungen der Transformation hervorgerufen wurden.

	A12-3	C18-1	D20-1	C4-2	D54-1	G13-5	G11-4	G33-3	G73-1
ST2a-Transkript	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Verwundung: 12-OH-JA	↓↓↓		↓↓↓		↓↓↓	↓↓			↓↓
12-HSO ₄ -JA	↑↑↑		↑↑↑		↑↑↑	↓↓↓			↓↓↓
12-O-Gluc-JA	↓↓		↓↓		↓↓				
<i>LeAOC</i> -Transkript	↔		↔			↔			↔
<i>LePIN2</i> -Transkript	↑↑		↑↑			↑↑			↑↑
<i>LeLAP</i> -Transkript	↑↑		↑↑			↑↑			↑↑
<i>LeTD</i> -Transkript	↑↑		↑↑			↑↑			↑↑
Phänotyp: Blütenzahl	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↔	↑↑↑	↑	↔	↑
Blühzeitpunkt	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↔	↔	↑↑↑	↑↑↑	↔	↑↑↑
Größe der Blütenorgane verändert	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja
12-OH-JA in den Blüten/Infloreszenzen	↓↓	↓↓			↓↓				
12-HSO ₄ -JA in den Blüten/Infloreszenzen	↑↑↑	↑↑↑			↑↑↑				
12-O-Gluc-JA in den Blüten/Infloreszenzen	↓↓↓	↓↓↓			↓↓↓				
Keimung	↓↓	↓↓	↓↓		↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
Wurzelwachstum					↑↑				↑↑
	35S::AtST2a-sense					35S::LeST2a-sense			

Tab. 4.1: Phänotypische Veränderung der 35S::AtST2a-sense- und 35S::LeST2a-sense-Pflanzen

4.3.2.1 Die Veränderung der Jasmonat-Gehalte nach Verwundung

Das Ziel der transgenen Ansätze war es, die endogenen 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA-Gehalte zu modifizieren. Die Überexpression der *AtST2a* bzw. *LeST2a* sollte den 12-OH-JA-Gehalt verringern und den 12-HSO₄-JA-Gehalt erhöhen (Abb. 4.4). Um dies in den transgenen Pflanzen der Generation T1 zu überprüfen, wurde die wundinduzierte Akkumulation der einzelnen Jasmonate im Vergleich zum Wildtyp überprüft (vgl. Abb. 3.31). Die *AtST2a-sense*-Pflanzen zeigten erwartungsgemäß eine Reduktion der 12-OH-JA und 12-O-Gluc-JA-Gehalte sowie eine drastische Erhöhung der 12-HSO₄-JA-Gehalte nach Verwundung, während im Grundzustand kaum 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden konnte. Dies macht erneut deutlich, dass die Bildung von 12-HSO₄-JA von der Substrat-Bereitstellung durch die JA-Biosynthese abhängig ist. Die drastische Erhöhung der 12-HSO₄-JA-Gehalte stehen allerdings in keinem Verhältnis zur Reduktion der

12-OH-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte. Es ist wahrscheinlich, dass durch die Überexpression der *AtST2a* der gesamte Durchsatz durch den Jasmonat-Stoffwechsel verändert wurde. So dass zwar vermehrt JA generiert wurde, aber aufgrund des sofortigen Umsatzes zu 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA nicht akkumulierte.

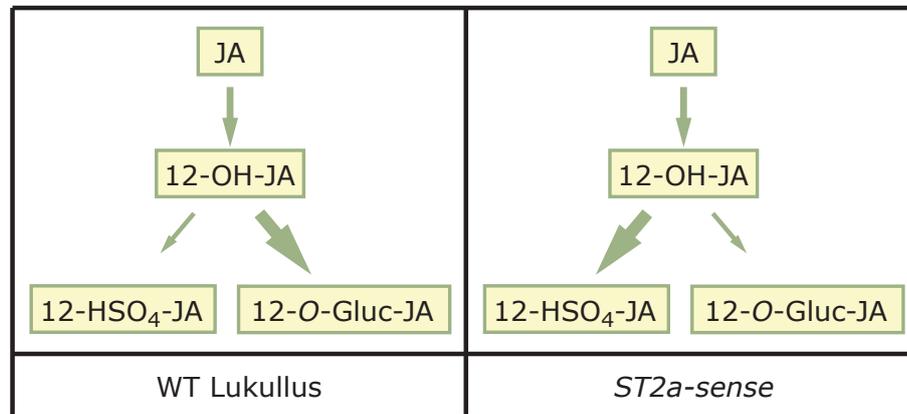


Abb. 4.4: Die Metabolisierung von JA zu 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in Wildtyp-Pflanzen und die erwarteten Veränderungen in *AtST2a*-/*LeST2a-sense*-Pflanzen

In den *LeST2a-sense*-Pflanzen konnte entgegen der Erwartung keine Zunahme der 12-HSO₄-JA-Menge im Vergleich zum Wildtyp nach Verwundung festgestellt werden (vgl. Abb. 3.31). Ganz im Gegenteil war der 12-HSO₄-JA-Gehalt reduziert. Da die Aktivität der *LeST2a* *in vitro* gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.16), wären post-translationale Modifikationen der Enzymaktivität eine Erklärung. Da die Sequenz der *LeST2a* ein Dimerisierungsmotiv enthält (vgl. Abb. 3.11), wäre vorstellbar, dass eine Homo- oder Heterodimerisierung die Enzymaktivität beeinflusst (vgl. 4.2.2). Für die Funktionalität der überexprimierten *LeST2a* sprach, dass in den entsprechenden Pflanzen phänotypische Veränderungen stattfanden, die denen der *AtST2a-sense*-Pflanzen entsprachen (vgl. Tab. 4.1). Die vermehrte 12-HSO₄-JA-Bildung in den Überexpressionspflanzen zeigte die Funktionalität der *AtST2a* (vgl. Abb. 3.31).

4.3.2.2 Der Einfluss des Jasmonat-Metabolismus auf die Infloreszenz- und Blütenmorphologie

Tomaten-Pflanzen, die die *AtST2a* bzw. *LeST2a* überexprimierten, zeigten einen sehr auffälligen Infloreszenz-Phänotyp. Es konnte eine starke Verzweigung der Infloreszenzen und damit eine Erhöhung der Blütenzahl pro Infloreszenz im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (vgl. Abb. 3.32, 3.33 und 3.34). Des Weiteren traten bei einigen Pflanzen vegetative oder blumenkohllartige Infloreszenzen auf (vgl. Abb. 3.35). Neben der veränderten Infloreszenz-Morphologie kam es zu einem verzögerten Blühzeitpunkt (vgl. Abb. 3.36 und 3.37). In Tomate setzt sich der scheinbar durchgängige Hauptspross

aus dem primären Spross und mehreren darauffolgenden sog. *sympodial units* (SUs), bestehend aus drei Blättern und einer terminalen Infloreszenz, zusammen (vgl. Abb. 1.3). Der primäre Spross wird je nach Varietät nach 6 bis 16 Blättern durch eine Infloreszenz terminiert. Das SAM bildet dabei ein Infloreszenzmeristem (IM) aus. Dieses wiederum teilt sich zur Bildung jeder Blüte in ein IM und Blütenmeristem (BM) bis die Infloreszenzentwicklung schließlich durch Ausbildung der terminalen Blüte nach durchschnittlich 8 Blüten abgeschlossen ist.

Die verzweigten Infloreszenzen der transgenen Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, resultieren möglicherweise aus dem teilweisen Verlust der BM-Identität. Bei der Teilung des IM entstanden vermutlich zwei IM anstelle eines IM und eines BM. Für die Mutante *compound inflorescence* (*s*), die ähnlich stark verzweigte Infloreszenzen wie die *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen zeigen, konnte durch mikroskopische Analysen eine solche Teilung des IM belegt werden (QUINET *et al.* 2006). Bei der Ausbildung der blumenkohlartigen Infloreszenzen ging scheinbar die IM-Identität verloren und es wurden vermehrt und unkontrolliert BM gebildet. Ob bei der Entstehung vegetativer Infloreszenzen die BM- oder IM-Identität beeinträchtigt war, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht bestimmen. Fest steht, dass es in allen veränderten Infloreszenzen zu einer Veränderung von Meristem-Identitäten kam. Die transgenen Pflanzen waren jedoch in der Lage, alle Arten von Meristemen, die zur Entwicklung von Infloreszenzen nötig sind, zu bilden.

Die Regulation von Meristem-Identitäten, somit auch die Termination des Sprosses und die Ausbildung von Infloreszenzen und Blüten ist ein sehr komplexer Prozess und in Tomate noch nicht vollständig aufgeklärt. So sind die Gene *SELF PRUNING* (*SP*) und *SINGLE FLOWER TRUSS* (*SFT*), die Tomaten-Homologen zu *TFL1* bzw. *FT* aus Arabidopsis, bereits charakterisiert worden (PNUELI *et al.* 1998; LIFSCHITZ *et al.* 2006; vgl. 1.3). Es wird angenommen, dass hauptsächlich diese beiden Gene den Übergang vom vegetativen zum reproduktiven Wachstum und damit die Termination des Sprosses regulieren. *sft*-Mutanten blühen später als ihr korrespondierender Wildtyp und das erste Organ der terminalen Infloreszenz ist eine Blüte (MOLINERO-ROSALES *et al.* 2004). Zudem ist die Infloreszenz nicht terminiert, bildet Blätter statt Blüten aus und bildet selbst den Hauptspross. Es kommt zu einer Verschiebung des vegetativen/reproduktiven Wachstums zu Gunsten des vegetativen Wachstums. Analog dazu führt die Überexpression von *SFT* zu einem extrem verfrühten Blühen (LIFSCHITZ *et al.* 2006). Kreuzungen von *35S::SFT*-Pflanzen mit Mutanten, die später blühen und eine veränderte Infloreszenz-Architektur aufweisen, wie z.B. *falsiflora* (*fa*), zeigten, dass die entsprechenden Pflanzen so früh blühten wie die *35S::SFT*-Pflanzen, die veränderte Infloreszenz-Architektur der jeweiligen Mutanten aber erhalten blieb (LIFSCHITZ & ESHED 2006). Somit bestimmt *SFT* hauptsächlich die Termination des Sprosses und die Ausbildung von Infloreszenzen,

nicht aber die Identität des terminierenden Organs. Die Überexpression von *SP* führte zu einem verzögerten Blühen, wobei teilweise indeterminierte Infloreszenzen auftraten, bei denen Blüten durch Blätter ersetzt waren (PNUELI *et al.* 1998). In *sp* Mutanten ist hingegen der Blühzeitpunkt unverändert (PNUELI *et al.* 1998). Die Anzahl der Blätter pro Spross verringert sich jedoch im Laufe der Entwicklung bis schließlich der Spross durch zwei aufeinander folgende Infloreszenzen endgültig terminiert wird. Folgendes Modell über die Wirkungen von *SP* und *SFT* während der Termination des Sprosses wird diskutiert (LIFSCHITZ & ESHED 2006): *SFT*-Transkript-Mengen steigen kontinuierlich im Vergleich zu *SP*-Transkript im primären Spross an, während *SP* nur in den sympodialen und lateralen Knospen verstärkt exprimiert wird. *SP* erhält so den indeterminierten Charakter des SAM bis die *SP*-Wirkung durch *SFT* aufgehoben wird, wodurch es zur Ausbildung von Infloreszenzen und des neuen sympodialen Sprosses kommt. Im neu gebildeten Spross wird dann durch einen noch unbekanntem Mechanismus das *SFT:SP*-Verhältnis wieder reduziert. Da Infloreszenzen ebenso wie der Spross im Wachstum terminiert sind, gehen Veränderungen des Blühzeitpunktes häufig einher mit Veränderungen der Infloreszenz-Morphologie (vgl. Tab.1.2). So blüht die Mutante *s*, die wie die *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen stark verzweigte Infloreszenzen ausbildet, später als der entsprechende Wildtyp (QUINET *et al.* 2006). Auch die Mutante *anantha* (*an*), die blumenkohlartige Infloreszenzen besitzt, blüht verzögert (ALLEN & SUSSEX 1996). Allerdings konnten die betroffenen Gene *AN* und *S* bisher nicht identifiziert werden. Andere spät blühende Mutanten mit einer veränderten Infloreszenz-Architektur sind z.B. *jointless* (*j*), *uniflora* (*uf*), *blind* (*bl*) und *fa* (DIELEN *et al.* 1998; MOLINERO-ROSALES *et al.* 1999; LOZANO *et al.* 2000; SCHMITZ *et al.* 2002; DIELEN *et al.* 2004; SZYMKOWIAK & IRISH 2006). Charakterisierungen der entsprechenden Mutanten legen nahe, dass *FA*, *S* und *AN* die BM-Identität regulieren (QUINET *et al.* 2006), wohingegen *J* an der Regulation der IM-Identität beteiligt ist (SZYMKOWIAK & IRISH 2006).

Da die transgenen *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden, ähnliche Phänotypen wie die beschriebenen Mutanten aufwiesen, wurden die entsprechenden Gene, soweit bekannt, per qPCR in verschiedenen Organen der *AtST2a-sense*-Pflanzen untersucht (vgl. Tab. 3.4). Da ebenfalls Veränderungen des Blühzeitpunktes auftraten, wurde die *SFT*- und *SP*-Expression untersucht. Des Weiteren wurden die Expression der Gene *LS* und *WUS* analysiert. *LS* ist an der Regulation des lateralen Wachstums beteiligt und *WUS* an der Regulation der Stammzellaktivität in den Meristemen (SCHUMACHER *et al.* 1999; MAYER *et al.* 1998). Es wurden zwei Linien mit stark ausgeprägtem Phänotyp (A12-3 und C18-1), sowie eine Linie, die keinen Infloreszenz-Phänotyp (D54-1) zeigte und der Wildtyp untersucht. Die Expression der Gene *J*, *SFT*, *SP2G* und *FA* entsprachen dabei in allen transgenen Linien der im Wildtyp (Daten nicht gezeigt). Für die Ausprägung des Infloreszenz-Phänotyps sind vermutlich nur Unterschiede in der Expression der Linien A12-3 und C18-1 im Vergleich zum Wildtyp

und der Linie D54-1 entscheidend. Solche Unterschiede konnten für die untersuchten Gene *SP*, *WUS*, *BL*, *LS*, *SP5G*, *SP6A* und *SP9G* nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Expressionsanalyse in jungen, sich entwickelnden Infloreszenzen zeigte ebenfalls keine Unterschiede zum Wildtyp (GÜTTNER 2007). Eine Veränderung der Expression dieser Gene kann jedoch als Ursache für den Infloreszenz-Phänotyp nicht ausgeschlossen werden. Da Meristem-Identitätsgene meist nur sehr schwach und lokal exprimiert werden, müsste die Untersuchung der Expression in den entsprechenden Meristemen per *in situ*-Hybridisierung analysiert werden.

Die Analyse der Jasmonat-Gehalte in den verschiedenen Infloreszenz- und Blütenteilen sowie den Knospen zeigte die unterschiedliche Verteilung der Jasmonate in den einzelnen Pflanzenteilen (vgl. Abb. 3.38). Die bereits beschriebene gewebsspezifische Oxylin-Signatur sollte mit den Jasmonat-Metaboliten 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA erweitert werden (HAUSE *et al.* 2000). So konnte z.B. 12-OH-JA in weit aus höheren Mengen als JA selbst in den Blütenblättern nachgewiesen werden. Des Weiteren ist das vorrangig vorkommende Jasmonat in den Blütenorganen und Knospen 12-O-Gluc-JA, das bis zu 200mal stärker akkumuliert als JA selbst. In den Infloreszenzen der *AtST2a-sense*-Pflanzen kommt es zu einer auffälligen Verschiebung der Jasmonat-Signatur (vgl. Abb. 3.38). Neben der erwarteten Zunahme der 12-HSO₄-JA-Gehalte kam es zu einer Reduktion der 12-OH-JA- und 12-O-Gluc-JA-Gehalte in den einzelnen Blütenteilen und den Knospen. Zudem erfolgte eine vermehrte Akkumulation von JA in den Blütenstielen der transgenen Linien, die einen Infloreszenz-Phänotyp zeigten. Die Veränderung der Infloreszenz-Architektur konnten jedoch nur schwer mit der Veränderung eines bestimmten Jasmonats in Verbindung gebracht werden, da die Jasmonat-Gehalte in den Linien mit und ohne Phänotyp ähnlich waren. Entscheidend sind vermutlich vielmehr die Veränderungen des gesamten Jasmonat-Metabolismus in den transgenen Pflanzen. Dafür spricht ebenfalls, dass der Infloreszenz-Phänotyp der *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen bisher für keine andere transgene Linie oder Mutante mit veränderter JA-Biosynthese oder -Signaltransduktion beschrieben wurde. Zudem bleibt unklar, zu welchem Zeitpunkt sich der veränderte Jasmonat-Metabolismus auf die Determination der Infloreszenzen auswirkt. Der erst bei späteren Infloreszenzen auftretende Phänotyp, sowie das Ausbleiben des Phänotyps in manchen transgenen Linien (vgl. Abb. 3.32 und 3.33), würde dabei dafür sprechen, dass erst eine Akkumulation bestimmter Signale zu einem gewissen Schwellenwert erfolgen muss. Weitere interessante Hinweise wären nach Kreuzungen der transgenen Pflanzen mit JA-Biosynthese-Mutanten zu erwarten, sowie einer Charakterisierung von *LeST2a-antisense*-Pflanzen.

In Tomate wurde bisher nur die Beteiligung von Auxinen an der Termination des Sprosses, d.h. am Ausbilden der Infloreszenzen diskutiert (PNUELI *et al.* 2001). So wird ange-

nommen, dass Auxine direkt oder indirekt die Funktion des Genes *SP* beeinflussen. Über eine Beteiligung von Jasmonaten an diesen Prozessen ist bislang nichts bekannt. Dass Jasmonate jedoch entscheidend für die Blütenentwicklung sind, konnte anhand von Untersuchungen verschiedener JA-Biosynthese- oder JA-Signaltransduktions-Mutanten wie der Arabidopsis-Mutanten *coi1* und *opr3* und der Tomaten-Mutante *jai1* mehrfach belegt werden (XIE *et al.* 1998; STINTZI & BROWSE 2000; LI *et al.* 2004a). Mit Hilfe der Arabidopsis-Mutanten *dad1* und *opr3* konnte gezeigt werden, dass die JA-Biosynthese essentiell ist für die Filament-Elongation und die Pollenfreisetzung (ISHIGURO *et al.* 2001; STINTZI & BROWSE 2000). Eine Verkürzung einzelner Blütenorgane konnte auch bei den transgenen Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit generiert und charakterisiert wurden, beobachtet werden. Des Weiteren ist die für die Filamentelongation notwendige JA-Biosynthese Auxin-abhängig. In *arf6/arf8*-Doppelmutanten waren die Jasmonat-Gehalte in den Blüten reduziert und die Filamentelongation beeinträchtigt (NAGPAL *et al.* 2005). Zudem wurden in Arabidopsis 2 Transkriptionsfaktoren, MYB21 und MYB24, identifiziert, die die Transkription Jasmonat-responsiver Gene, die an der Staubblatt-Entwicklung von Arabidopsis beteiligt sind, regulieren und *downstream* von ARF6 und ARF8 wirken (MANDAOKAR *et al.* 2006).

Weitere Hinweise auf eine Beteiligung der Jasmonate an der Blütenentwicklung und der Identität generativer Organe lieferten Untersuchungen transgener Tabak-Pflanzen, die die *AtST2a* aus Arabidopsis heterolog überexprimierten (vgl. 3.6). Die transgenen Tabak-Pflanzen zeigten zu Blütenblättern umgewandelte Staubblätter (vgl. Abb 3.42; VARIN *et al.* 2003). Des Weiteren waren die Staubblätter verkürzt. Die morphologischen Veränderungen der Staubblätter traten vermutlich aufgrund einer Störung der Organidentität auf. Laut des ABC-Modells der Blütenentwicklung werden Blütenorgan-Identitätsgene in die drei Klassen A, B und C eingeteilt (JACK 2004; Abb. 4.5). Die Gene der Klasse A definieren die Identität von Kelch- und Blütenblättern jeweils in den Wirtel 1 und 2 und reprimieren die Gene der Klasse C in diesen Wirteln. B-Klasse Gene definieren Blütenblätter und Staubblätter jeweils in den Wirteln 2 und 3. Die C-Klasse-Gene sind notwendig für die Staubblatt-Bildung im Wirtel 3 und die Fruchtblatt-Bildung im Wirtel 4. Des Weiteren reprimieren sie die Expression der A-Klasse-Gene im 3. und 4. Wirtel. Alle Gene werden in den Organen exprimiert, deren Identität sie regulieren. In den einzelnen Blütenorganen der transgenen Tabakpflanzen und des entsprechenden Wildtyps wurde die Expression folgender Gene untersucht: *NtDEF* und *NtGLO* als Vertreter der Klasse B und *NtNAG1* und *NtPLE36* als Vertreter der Klasse C (vgl. Abb. 3.44; HANSEN *et al.* 1993; DAVIES *et al.* 1996; KEMPIN *et al.* 1993). Es konnte eine vermehrte *NtGLO*-Expression in den Kelchblättern beider untersuchter transgener Linien im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden, allerdings sollte die vermehrte Expression dieses B-Klasse-Gens im 1. Wirtel die Identität der Staubblätter im 3. Wirtel laut ABC-Modell nicht beeinflussen. Des Weiteren erfolgte eine leicht erhöhte

NtPLE36-Expression im 4. Wirtel, dem Fruchtblatt. Auch dies sollte sich nicht auf die Entwicklung der Staubblätter auswirken, da *NtPLE36* als C-Klasse-Gen im 4. Wirtel exprimiert werden sollte. Die Expressionsanalysen lieferten keine Hinweise auf die Ursache der veränderten Staubblätter. Im Gegensatz dazu konnten in den transgenen Tabak-Pflanzen auffällige Veränderungen der Jasmonat-Gehalte beobachtet werden (vgl. Abb. 3.43). In Wildtyp-Blüten war ebenso wie in Tomate 12-*O*-Gluc-JA das am stärksten vertretene der untersuchten Jasmonate. In den Staubblättern konnten erhebliche Mengen von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden. Wie erwartet war in den transgenen Tabak-Blüten der 12-HSO₄-JA-Gehalt erhöht und der 12-OH-JA-, sowie der 12-*O*-Gluc-JA-Gehalt drastisch reduziert. Vorstellbar wäre, dass der reduzierte 12-OH-JA-Gehalt in den Staubblättern den Phänotyp bedingt. Dafür würde die Normalisierbarkeit des Blütenphänotyps durch 12-OH-JA-Applikation sprechen (VARIN *et al.* 2003). Die Veränderung der gesamten Jasmonat-Signatur kann jedoch als Ursache nicht ausgeschlossen werden. Die Beteiligung von Jasmonaten an der Staubblatt-Entwicklung in Arabidopsis konnte, wie bereits beschrieben, mehrfach demonstriert werden.

Wirtel	1	2	3	4
Organ	KB	BB	SB	St
Gene	A		C <i>NtNAG1</i> <i>NtPLE36</i>	
		B <i>NtDEF</i> <i>NtGLO</i>		

Abb. 4.5: Das ABC-Modell der Blütenentwicklung und einige beteiligte Gene in Tabak (KB-Kelchblätter, BB-Blütenblätter, SB-Staubblätter, St-Stempel)

4.3.2.3 Der Einfluss des Jasmonat-Metabolismus auf JA-vermittelte Prozesse

Des Weiteren war interessant, ob sich die veränderten Jasmonat-Gehalte durch die Überexpression der *ST2a* sich auf JA-vermittelte Prozesse auswirken. Es wurden die Inhibierung der Keimung und des Wurzelwachstums sowie die Wundantwort untersucht.

Keimung: Unabhängig vom Auftreten veränderter Infloreszenzen zeigten alle *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Linien eine um mindestens ein Drittel reduzierte Keimung (vgl. Abb. 3.39). Untersuchungen zur Embryonal-Entwicklung zeigten, dass Wildtyp-Samen

in der Samenschale bis zu 250 ng pro Gramm Frischgewicht 12-O-Gluc-JA akkumulieren (Görtz 2006). Dabei nimmt der 12-O-Gluc-JA-Gehalt zum Ende der Samenentwicklung ab. JA und 12-OH-JA konnten kaum im Samen nachgewiesen werden (Görtz 2006). Die Situation im reifen Samen wurde nicht untersucht, ebenso wenig stehen 12-HSO₄-JA-Daten zur Verfügung. In den transgenen Pflanzen konnte gezeigt werden, dass in den Infloreszenzen und Blüten sowie im Blatt nach Verwundung der 12-O-Gluc-JA-Gehalt durch Überexpression der *AtST2a* stark abnimmt (vgl. Abb. 3.38 und 3.31). Wenn die Situation im Samen ähnlich wäre, ist möglich dass das Fehlen von 12-O-Gluc-JA die Entwicklung des Samens behindert und somit letztendlich die Keimungsfähigkeit beeinflusst. Es müsste untersucht werden, ob die Embryonalentwicklung der transgenen Samen vollständig abgeschlossen ist. Die Jasmonat-Gehalte in den transgenen Samen sollten bestimmt werden. Bei reduzierten 12-OH-JA- oder 12-O-Gluc-JA-Gehalten in den Samen sollte überprüft werden, ob die verminderte Keimungsfähigkeit durch exogene Applikation von 12-OH-JA oder 12-O-Gluc-JA normalisiert werden kann.

Wurzelwachstum: Das Wurzelwachstum der transgenen Pflanzen wurde an zwei Linien näher untersucht, die *AtST2a-sense*-Linie D54-1 (kein Infloreszenzphänotyp) und die *LeST2a-sense*-Linie G73-1 (schwach ausgeprägter Infloreszenzphänotyp). Beide Linien zeigten eine signifikante Zunahme des Wurzelwachstums (vgl. Abb. 3.40). Wildtyp-Wurzelspitzen enthalten hauptsächlich JA und 12-HSO₄-JA und kaum 12-OH-JA und 12-O-Gluc-JA (OKA persönliche Mitteilung). In den transgenen Pflanzen besteht die Möglichkeit, dass durch die Überexpression der *AtST2a* oder *LeST2a* die 12-HSO₄-JA-Menge erhöht und gleichzeitig die JA- und JA-Ile Menge, die das Wurzelwachstum inhibieren (DATHE *et al.* 1981; STASWICK *et al.* 1992; STASWICK & TIRYAKI 2004), verringert wird. Da 12-HSO₄-JA, zumindest exogen appliziert, das Wurzelwachstum nicht beeinflusst, wäre eine verringerte JA- bzw. JA-Ile-Menge eine Erklärung für die längeren Wurzeln. Um dies zu belegen, müssten jedoch die Jasmonat-Gehalte in den transgenen Wurzeln bestimmt werden. Bei exogener JM-Applikation erfolgte auch in den transgenen Pflanzen eine Inhibierung des Wurzelwachstums (vgl. Abb. 3.40). In geringeren Dosen eingesetzt ist jedoch eine Kompensation des JA-Effektes durch erhöhte Metabolisierung in Richtung 12-HSO₄-JA anstelle von JA-Ile in den transgenen Wurzeln vorstellbar.

Wundantwort: Während der Wundantwort kam es sowohl in *AtST2a-sense*- als auch in *LeST2a-sense*-Pflanzen zu einer frühzeitig verstärkten Expression der JA-responsiven Gene *LePIN2*, *LeLAP* und *LeTD* (vgl. Abb. 3.41). 6 Stunden nach Verwundung entsprach die Expression der im Wildtyp und 24 Stunden nach Verwundung war sie ebenfalls leicht erhöht. Die Expression der AOC war nicht beeinflusst. Da eine Repression einiger JA-responsiver Gene durch 12-OH-JA gezeigt werden konnte (vgl. Abb. 3.7; MIERSCH *et al.* im Druck), wäre die Reduktion des 12-OH-JA-Gehaltes in den transgenen Pflanzen

(vgl. Abb. 3.31) eine Erklärung für die frühzeitige Expression von *LePIN2*, *LeLAP* und *LeTD*. *LeLAP* gehört zu den Genen, die durch 12-OH-JA reprimiert werden, *LePIN2* und *LeTD* jedoch nicht, weshalb die Reduktion des 12-OH-JA-Gehaltes keine hinreichende Erklärung bietet. Eine Veränderung des 12-HSO₄-JA-Gehaltes als Ursache kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da dieser in den *AtST2a-sense*-Pflanzen erhöht und in den *LeST2a-sense*-Pflanzen entgegen der Erwartung nach Verwundung reduziert war (vgl. Abb. 3.31; vgl. 4.2.2). Es ist sehr unwahrscheinlich, dass diese unterschiedlichen Veränderungen die gleichen Auswirkungen auf die Expression zeigen. In den transgenen Pflanzen kam es zu einer Veränderung der Jasmonat-Gehalte nach Verwundung. Es wäre vorstellbar, dass die endogene Manipulation des JA-Metabolismus komplexere Veränderungen des Expressionsmusters JA-responsiver Gene hervorrufen als nach exogener Applikation.

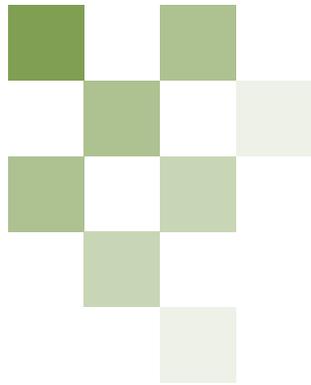
4.4 Die Regulation des JA-Metabolismus

Die Notwendigkeit einer Regulation des JA-Metabolismus kann durch diverse Beispiele belegt werden und wurde bereits mehrfach angedeutet. So werden den einzelnen Metaboliten, wie bereits beschrieben, unterschiedliche Funktionen zugesprochen, die die Regulation der Metabolisierung sinnvoll erscheinen lassen. Des Weiteren konnten putative Jasmonat-Rezeptoren identifiziert werden, die vermutlich spezifisch JA-Ile binden (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007; YAN *et al.* 2007). Auch wenn den Jasmonat-Metaboliten 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA, neben dem Einfluss von 12-OH-JA auf die Genexpression und der Knollen-induzierenden Wirkung in Kartoffel (YOSHIHARA *et al.* 1989), erst wenig bzw. keine spezifischen Funktionen zugeordnet werden können, ist ihr teilweise beträchtliches und variables Vorkommen in verschiedenen Pflanzen und Geweben auffällig. Zudem zeigen die auftretenden Phänotypen nach Veränderung des JA-Metabolismus in den transgenen Tomaten- und Tabak-Pflanzen, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, die Bedeutung des JA-Metabolismus und legen nahe, dass diese Metabolite spezifische Funktionen ausüben. Geht man von spezifischen Funktionen von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA bzw. einer Funktionalität der Jasmonat-Signaturen aus, ist eine Regulation des Metabolismus, sowie der Entscheidung über Sulfatierung oder Glukosylierung sehr wahrscheinlich.

Dabei kann die Regulation auf verschiedenen Ebenen erfolgen. So wird z.B. die Expression der *LeST2a/6* und der *AtST2a* durch JA und 12-OH-JA induziert und erfolgt COI1-abhängig (vgl. Abb. 3.17 und 3.19). Zu dem erfolgt eine organspezifische Expression der *LeST2a/6* (vgl. Abb. 3.20). Eine weitere Regulationsmöglichkeit bietet die post-translationale Modifikation der *LeST2a/6*-Aktivität (vgl. 4.2.2). Der Einfluss anderer Phytohormone auf die Sulfatierung kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. So konnte in

den Blättern der Gibberellin-insensitiven Mais-Mutante *d1 dwarf* ein erheblich höherer 12-HSO₄-JA-Gehalt als in den entsprechenden Wildtyp-Blättern nachgewiesen werden (MIERSCH *et al.* im Druck). Somit sollten Untersuchungen zum Einfluss anderer Phytohormone auf die *LeST2a*-Expression vorgenommen werden. Da die Enzyme, die die Hydroxylierung und Glukosylierung katalysieren, bislang nicht identifiziert werden konnten, sind Aussagen über die Regulation der Expression und Aktivität der entsprechenden Gene bzw. Proteine nicht möglich. Der Einfluss anderer Phytohormone auf die JA-Biosynthese und die JA-Signaltransduktion ist bereits mehrfach belegt worden. So haben ABA und Ethylen einen positiven Einfluss auf die JA Biosynthese, wohingegen SA die wund-induzierte JA-Bildung inhibiert (HERDE *et al.* 1996; O'DONNELL *et al.* 1996; DOARES *et al.* 1995b). Die Konjugation der Ethylen-Vorstufe ACC mit JA macht ebenfalls einen Zusammenhang zw. JA- und Ethylen-Signalwegen deutlich (STASWICK & TIRYAKI 2004). Auf molekularer Ebene stellt der Transkriptionsfaktor WRKY70 aus *Arabidopsis* einen Verknüpfungspunkt von JA- und SA-Signalen dar. So werden SA-induzierbare Gene durch WRKY70 positiv und JA-responsive Gene wie *VSP* oder *PDF2.1* negativ reguliert (LI *et al.* 2004b). Die Vernetzung von Auxin- und JA-Signalwegen zeigt sich u.a. bei der Blütenentwicklung von *Arabidopsis*, wobei die für die Filamentelongation notwendige JA-Biosynthese durch ARF6 und ARF8 reguliert wird (NAGPAL *et al.* 2005). Es mehren sich die Hinweise auf die Bedeutung des JA-Metabolismus sowie der einzelnen Metabolite, z.B. durch die Identifizierung der putativen Jasmonat-Rezeptoren (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007; Yan *et al.* 2007), und durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. Spannend wird eine zukünftige Betrachtungsweise zum cross-talk der Pflanzenhormone bezogen auf die JA-Metabolite und nicht nur wie bisher auf JA selbst.

Die umfangreichen Wirkungen von JA und einiger Metabolite sind mehrfach belegt und in ihren Anfängen verstanden (WASTERNAK 2007; WASTERNAK & HAUSE 2002; HOWE 2004; SCHALLER *et al.* 2005). Die vorliegenden Untersuchungen transgener Tomaten- und Tabak-Pflanzen mit verändertem JA-Metabolismus aufgrund der Überexpression der *ST2a* zeigten, dass der Metabolismus in Richtung 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA ebenfalls die pflanzliche Entwicklung und die Reaktion auf bestimmte Stressfaktoren beeinflussen können. Weitere Hinweise auf die Funktion dieser Metabolite und die Regulation des Metabolismus sind nach der Identifizierung der entsprechenden hydroxylierenden und glukosylierenden Enzyme, sowie der ausführlichen Charakterisierung der JAZ-Repressor-Familie zu erwarten.



5 Zusammenfassung

In den letzten Jahrzehnten wurde sowohl die Biosynthese der Jasmonsäure aufgeklärt, als auch die umfangreichen Wirkungen von JA während der Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress und während der pflanzliche Entwicklung vielfältig analysiert. Es mehren sich zudem die Erkenntnisse zu den molekularen Komponenten der JA-Signaltransduktion sowie zur Vernetzung mit anderen Hormonen. Nicht nur durch die kürzliche Identifizierung putativer Jasmonat-Rezeptoren, von denen die bisher untersuchten vermutlich spezifisch das Ile-Konjugat von JA binden, richtet sich das Augenmerk verstärkt auf den Metabolismus von JA und die Funktion ihrer Metabolite (THINES *et al.* 2007; CHINI *et al.* 2007; YAN *et al.* 2007). Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Funktionen bzw. Wirkungen der JA-Metabolite 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA insbesondere an Tomate untersucht werden. Erste Hinweise auf eine spezifische Funktion von 12-OH-JA ergaben sich nach Identifizierung einer 12-OH-JA-Sulfotransferase aus *Arabidopsis* (*AtST2a*; GIDDA *et al.* 2003). Die heterologe, konstitutive Überexpression der *AtST2a* in Tabak führte zu einer Veränderung der Blütenmorphologie, die durch 12-OH-JA-Applikation normalisiert werden konnte (VARIN *et al.* 2003). Die Tomate ist in den letzten 15 Jahren zu einem Modellobjekt für Untersuchungen zur JA-vermittelten Wundantwort geworden. Darüberhinaus gibt es eine Reihe transgener Tomaten-Linien und -Mutanten mit veränderter JA-Biosynthese und Signaltransduktion. Deshalb erfolgten die Untersuchungen hauptsächlich an dieser Pflanze.

Für die Aufklärung spezifischer Funktionen von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Nachdem das natürliche Vorkommen dieser drei JA-Metabolite in verschiedenen Pflanzen gezeigt werden konnte (MIERSCH *et al.* im Druck), wurde die Bildung dieser Verbindungen während der lokalen Wundantwort, sowie die Abhängigkeit ihrer Bildung von der JA-Biosynthese untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die sequentielle und transiente Akkumulation von JA, 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA nach Verwundung in Tomate und Tabak erstmals gezeigt werden. Auffällig war dabei die unterschiedliche Akkumulation von 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA in den beiden Pflanzen. In Tomate akkumulierte vorrangig 12-O-Gluc-JA, während in Tabak 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA zu ähnlichen Mengen akkumulierten. Die Abhängigkeit der Bildung von 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA von einer vollständigen JA-Biosynthese konnte mit Hilfe der Mutanten *acx1*, *spr2* und der transgenen *AOC-antisense*-Pflanzen, die alle in der JA-Biosynthese gestört sind, belegt werden (MIERSCH *et al.* im Druck; diese Arbeit). Applikationsexperimente legen zudem nahe, dass die Sulfatierung von 12-OH-JA ein irreversibler Prozess ist.

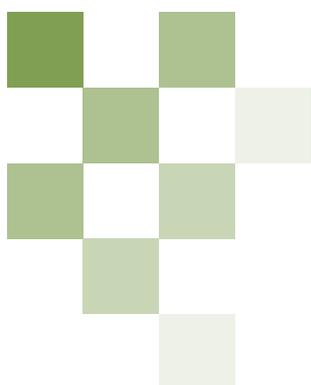
Für erste Hinweise auf biologische Wirkungen von 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA wurde ihr Einfluss auf Prozesse untersucht, die durch JA induzierbar bzw. reprimierbar sind. Dabei ergab die exogene Applikation, dass 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA im Gegensatz

zu JA die Keimung und das Wurzelwachstum nicht inhibieren. Auch hinsichtlich des Einflusses auf die Expression JA-responsiver Gene zeigten die beiden JA-Metabolite eine andere biologische Aktivität als JA. Während 12-HSO₄-JA kaum die Expression JA-induzierbarer Gene beeinflusste, wurde die Expression der JA-Biosynthese-Gene und einiger Abwehrgene durch 12-OH-JA reprimiert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Metabolisierung von JA zu 12-OH-JA und weiter zu 12-HSO₄-JA ein Abschalten des JA-Signals ermöglicht.

Da Applikationsexperimente die Situation in der Pflanze nur bedingt widerspiegeln, beschäftigte sich der Hauptteil der vorliegenden Arbeit mit der endogenen Manipulation des JA-Metabolismus mit Hilfe verschiedener transgener Ansätze. Die konstitutive Überexpression einer 12-OH-JA-ST aus Arabidopsis und Tomate in Tomate sollte den endogenen 12-OH-JA-Gehalt reduzieren und den 12-HSO₄-JA-Gehalt erhöhen. Phänotypische Veränderungen der transgenen Pflanzen sollten Rückschlüsse auf Prozesse erlauben, an denen 12-OH-JA und 12-HSO₄-JA beteiligt sind. Hierfür erfolgte zunächst die Identifizierung und Charakterisierung solcher STs aus Tomate. Zwei putative STs (*LeST2a* und *LeST6*) wurden kloniert, überexprimiert und nach Adaption eines Testsystems für tierische STs hinsichtlich ihrer Enzymaktivität untersucht. Beide zeigen mit ca. 44% eine hohe Homologie zur *AtST2a*, besitzen alle für die Katalyse notwendigen, bisher für pflanzliche STs identifizierte AS-Reste und setzen 12-OH-JA zu 12-HSO₄-JA um. Die Identifizierung eines putativen Dimerisierungsmotivs, sowie die Unterschiede in der Expression der *LeST2a/6* und der 12-HSO₄-JA-Akkumulation in verschiedenen Organen sprechen für eine post-translationale Modifikation des Enzyms. Die Expression der *LeST2a/6* war ebenso wie die der *AtST2a* induzierbar durch Verwundung, JM und 12-OH-JA und abhängig von COI1, einer Schlüsselkomponente innerhalb der JA-Signaltransduktion. Dies zeigt die Bedeutung von COI1 nicht nur für die JA-Signaltransduktion sondern auch für den JA-Metabolismus. Die beobachtete organspezifische Expression, z.B. in der Wurzel oder den Blüten, bietet die Möglichkeit der organspezifischen Metabolisierung von JA und so zu einer Spezialisierung des JA-Signals beitragen.

Sowohl die *AtST2a-sense*- als auch die *LeST2a-sense*-Pflanzen zeigten auffällige phänotypische Veränderungen. So führte die Überexpression zu einer Veränderung der Infloreszenz-Architektur und zu einer Verschiebung des Blühzeitpunktes. Die transgenen Pflanzen bildeten stark verzweigte Infloreszenzen, was sich in einer teilweise dramatischen Erhöhung der Blütenzahl pro Infloreszenz äußerte. Die veränderte Infloreszenz-Morphologie sprach für eine gestörte Blütenmeristem-Identität. Die Expressionsanalyse verschiedener bekannter Meristem-Identitäts-Gene ließ allerdings keine Rückschlüsse auf die Ursache des Phänotyps zu. Mit der Veränderung des Gehaltes eines bestimmten Jasmonats konnte der Phänotyp ebenfalls nicht in Verbindung gebracht werden.

Vielmehr war vermutlich die gesamte Veränderung des Jasmonat-Metabolismus ausschlaggebend für die Ausprägung des Phänotyps. Die verminderte Keimungsfähigkeit und die Zunahme des Wurzelwachstums der *AtST2a-sense*- und *LeST2a-sense*-Pflanzen sprechen ebenfalls dafür, da exogen am Wildtyp appliziert weder 12-OH-JA noch 12-HSO₄-JA das Wurzelwachstum oder Keimung beeinflussten. Nach Überexpression der *AtST2a* in Tabak traten wie in Tomate phänotypische Veränderungen der reproduktiven Organe auf. Allerdings war in Tabak keine veränderte Infloreszenz-Morphologie zu beobachten sondern eine Umbildung der Staubblätter zu Blütenblättern. Dies macht ebenso die Bedeutung des JA-Metabolismus für die pflanzliche Entwicklung deutlich und zeigt wie unterschiedlich sich die Veränderung eines Metabolisierungsweges in zwei nahe verwandten Pflanzen äußern kann. Die für die pflanzliche Entwicklung als bedeutsam vorgeschlagene Oxylin-Signatur sollte mit den JA-Metaboliten 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA erweitert werden. Auch wenn 12-OH-JA, 12-HSO₄-JA und 12-O-Gluc-JA, neben der Repression JA-responsiver Gene und der Induktion der Knollenbildung in Kartoffel durch 12-OH-JA, erst wenig spezifische Funktionen zugeordnet werden können, sprechen die vorliegenden Ergebnisse für die Notwendigkeit eines geregelten JA-Metabolismus. Dabei kann die zukünftige Identifizierung und Charakterisierung des JA-hydroxylierenden und -glukosylierenden Enzyms das Verständnis zum JA-Metabolismus maßgeblich erweitern.



6 Literaturverzeichnis

- AFITLHILE, M. M.; FUKUSHIGE, H.; NISHIMURA, M.; HILDEBRAND, D. F. (2005): A defect in glyoxysomal fatty acid β -oxidation reduces jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 603-609.
- AHN, J. A.; MILLER, D.; WINTER, V. J.; BANFIELD, M. J.; LEE, J. H.; YOO, S. Y.; HENZ, S. R.; BRADY, R. L.; WEIGEL, D. (2006): A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO Journal* **25**: 605-614.
- ALLEN, K. D.; SUSSEX, I. M. (1996): *Falsiflora* and *anantha* control early stages of floral meristem development in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Planta* **200**: 254-264.
- ANANVORANICH, S.; VARIN, L.; GULICK, P.; IBRAHIM, R. K. (1994) Cloning and regulation of flavonol 3-sulfo-transferase in cell suspension cultures of *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* **106**: 485-491.
- ANDERSSON, M. X.; HAMBERG, M.; KOURTCHENKO, O.; BRUNNSTROM, A.; MCPHAIL, K. L.; GERWICK, W. H.; GOBEL, C.; FEUSSNER, I.; ELLERSTROM, M. (2006): Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, Arabidopsis E. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 31528-31537.
- ATHERTON, J. G.; HARRIS, J. (1986): The tomato crop. London: Chapman and Hall.
- BARRON, D.; VARIN, L.; IBRAHIM, R. K.; HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. (1988): Sulphated flavonoids – an update. *Phytochemistry* **27**: 2375-2395.
- BÄURLE, I.; DEAN, C. (2006): The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**: 655-664.
- BELL, P. R. (1992): Green plants: their origin and diversity. Cambridge: Cambridge University Press.
- BERGEY, D. R.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. (1996): Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 12053-12058.
- BIRKETT, M. A.; CAMPBELL, C. A.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A. J.; MARTIN, J. L.; MATTHES, M.; NAPIER, J. A.; PETERSSON, J.; PICKETT, J. A.; POPPY, G. M.; POW, E. M.; PYE, B. J.; SMART, L. E.; WADHAMS, G. H.; WADHAMS, L. J.; WOODCOCK, C. M. (2000): New roles for *cis*-jasmonate as an insect semiochemical and in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 9329-9334.
- BLEE, E. (2002): Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends Plant Sci.* **7**: 315-322.
- BOSS, P. K.; BASTOW, R. M.; MYLNE, J. S.; DEAN, C. (2004): Multiple pathways in the decision to flowering: enabling promoting and resetting. *The Plant Cell* **16**: 18-31.
- 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 & Development* **18**: 1577-1591.
- BREITHAUPT, C.; KURZBAUER, R.; LILIE, H.; SCHALLER, A.; STRASSNER, J.; HUBER, R.; MACHEROUX, P.; CLAUSEN, T. (2006): Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 14337-14342.
- BURKART, M. D.; WONG, C. H. (1999): A continuous assay for the spectrophotometric analysis of sulfo-transferases using aryl sulfo-transferase IV. *Anal. Biochem.* **274** (1): 131-137.

- BUSEMAN, C. M.; TAMURA, P.; SPARKS, A. A.; BAUGHMAN, E. J.; MAATTA, S.; ZHAO, J.; ROTH, M. R.; ESCH, S. W.; SHAH, J.; WILLIAMS, T. D.; WELTI, R. (2006): Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **142**: 28-39.
- CARMEL-GOREN, L.; LIU, T. S.; LIFSCHITZ, E.; ZAMIR, D. (2003): The *SELF PRUNING* gene family in tomato. *Plant Molecular Biology* **52**: 1215-1222.
- CHAILAKHYAN, M. K. (1936): New facts in support of the hormonal theory of plant development. *Doklady Proceedings of the Academy of Sciences USSR* **13**: 79-83.
- CHEN, X.; YANG, Y.-S.; ZHENG, Y.; MARTIN, B.; DUFFEL, M.; JAKOBY, W.B. (1992): Tyrosine-Ester Sulfotransferase from Rat Liver: Bacterial Expression and Identification. *Protein Expression and Purification* **3**: 421-426.
- CHEN, H.; McCAIG, B. C.; MELOTTO, M.; HE, S. Y.; HOWE, G. A. (2004): Regulation of plant arginase by wounding, jasmonate, and the phytotoxin coronatine. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 45998-46007.
- CHEN, H.; WILKERSON, C. G.; KUCHAR, J. A.; PHINNEY, B. S.; HOWE, G. A. (2005): Jasmonate-inducible plant enzymes degrade essential amino acids in the herbivore midgut. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 19237-19242.
- CHEN, H.; JONES, A. D.; HOWE, G. A. (2006): Constitutive activation of the jasmonate signaling pathway enhances the production of secondary metabolites in tomato. *FEBS Letters* **580**: 2540-2546.
- CHEN, H.; GONZALES-VIGIL, E.; WILKERSON, C. G.; HOWE, G. A. (2007): Stability of Plant Defense Proteins in the Gut of Insect Herbivores. *Plant Physiology* **143**: 1954-1967.
- CHICO, J. M.; RAICES, M.; TELLEZ-INON, M. T.; ULLOA, R. M. (2002): A calciumdependent protein kinase is systemically induced upon wounding in tomato plants. *Plant Physiol.* **128**: 256-70.
- CHINI, A.; FONSECA, S.; FERNÁNDEZ, G.; ADIE, B.; CHICO, J. M.; LORENZO, O.; GARCÍA-CASADO, G.; LÓPEZ-VIDRIERO, I.; LOZANO, F. M.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L.; SOLANO, R. (2007): The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* **448** (7154): 666-671.
- CONCONI, A.; SMERDON, M. J.; HOWE, G. A.; RYAN, C. A. (1996) The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**: 826-9.
- CONSTABEL, P. C.; BERGEY, D. R.; RYAN, C. A. (1995): Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 407-411.
- CORBINEAU, F.; RUDNICKI, R. M.; COME, D. (1988): The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation* **7**: 157-169.
- CRABALONA, L. (1967) : Sur la presence de jasmonate de methyle levogyre [(pentene-2yl)-2-oxo-3-cyclopentylacetate de methyle, cis] dans l'hulie essentielle de rosmarin de Tunsine. *C. R. Acad. Sci.* **264** : 2074-2076.
- CRONQUIST, A. (1988): The evolution and classification of flowering plants. Lawrence, KS: Allen Press.

- CRUZ CASTILLO, M.; MARTINEZ, C.; BUCHALA, A.; METRAUX, J. P.; LEON, J. (2004): Gene specific involvement of β -oxidation in wound-activated response in Arabidopsis; *Plant Physiol.* **135**: 85-94.
- DATLA, R. S. S.; BEKKAOUI, F.; HAMMERLINDL, J. K.; PILATE, G.; DUNSTAN, D. I.; CROSBY, W. L. (1993): Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Science* **94**: 139-149.
- DATHE, W.; RONSCH, H.; PREISS, A.; SCHADE, W.; SEMBDNER, G.; SCHREIBER, K. (1981): Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535.
- DATHE, W.; SCHINDLER, C.; SCHNEIDER, G.; SCHMIDT, J.; PORZEL, A.; JENSEN, E.; YAMAGUCHI, I. (1991): Cucurbitic acid and its 6,7-stereoisomers. *Phytochemistry* **30** (6): 1909-1914.
- DAVIES, B.; DI ROSA, A.; ENEVA, T.; SAEDLER, H.; SOMMER, H. (1996): Alteration of tobacco floral organ identity by expression of combinations of Antirrhinum MADS-box genes. *Plant J.* **10** (4): 663-677.
- DELKER, C.; ZOLMAN, B. K.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C. (2007): Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* requires peroxisomal β -oxidation enzymes - Additional proof by properties of *pex6* and *aim1*. *Phytochemistry* **68**: 1642-1650.
- DEMOLE, E.; LEDERER, E.; MERCIER, D. (1962): Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **45** : 675-685.
- DEVOTO, A.; NIETO-ROSTRO, M.; XIE, D.; ELLIS, C.; HARMSTON, R.; PATRICK, E.; DAVIS, J.; SHERRATT, L.; COLEMAN, M.; TURNER, J. G. (2002): COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *The Plant Journal* **32**: 457-466.
- DEVOTO, A.; ELLIS, C.; MAGUSIN, A.; CHANG, H.-S.; CHILCOTT, C.; ZHU, T.; TURNER, J. G. (2005): Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**: 497-513.
- DIELEN, V.; MARC, D.; KINET, J.-M. (1998): Flowering in the uniflora mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.): description of the reproductive structure and manipulation of flowering time. *Plant Growth Regulation* **25**: 149-157
- DIELEN, V.; QUINET, M.; CHAO, J.; BATOKO, H.; HAVELANGE, A.; KINET, J.-M. (2004): Uniflora, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *The New Phytologist* **161**: 393-400.
- DOARES, S. H.; SYROVETS, T.; WEILER, E. W.; RYAN, C. A. (1995b): Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4095-4098.
- DOARES, S. H.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; CONCONI, A. ; RYAN, C. A. (1995a): Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**: 1741-1746.
- DUFFEY, S. S.; FELTON, G. W. (1991): Enzymatic antinutritive defenses of tomato plants against insects, pp. 176-197, in P. A. Hedin (ed.). Naturally Occurring Pest Bioregulators. American Chemical Society, Washington, DC.

- ELLIS, C.; KARAFYLLIDIS, I.; WASTERACK, C.; TURNER, J. G. (2002): The Arabidopsis mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**: 1557-1566.
- ENGELKE, D. R.; KRIKOS, A.; BRUCK, M. E.; GINSBURG, D. (1990): Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal. Biochem.* **191** (2): 396-400.
- EVANS, P. T.; MALMBERG, R. L. (1989): Do polyamines have a role in plant development?. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **40**: 235-269.
- FALKENSTEIN, E.; GROTH, B.; MITHÖFER, A.; WEILER, E. W. (1991): Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducer of tendril coiling. *Planta* **185**: 316-322.
- FARMER, E.; RYAN, C. (1990): Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 7713-7716.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. (1992): Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell* **4**: 129-134.
- FAULKNER, I. J.; RUBERY, P. H. (1992): Flavonoids and flavonoid sulphates as probes of auxin transport regulation in *Cucurbita pepo* hypocotyl segments and vesicles. *Planta* **186**: 618-625.
- FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. (2002): the lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 275-297.
- FEYS, B.; BENEDETTI, C. E.; PENFOLD, C. N.; TURNER, J. G. (1994): Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- GIDDA, S. K.; VARIN, L. (2006): Biochemical and molecular characterization of flavonoid 7-sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem.* **44** (11-12): 628-636.
- GIDDA, S. K. (2001): Molecular and biochemical characterization of hydroxyjasmonate and flavonoid sulfotransferases from arabidopsis thaliana. Dissertationsschrift. Concordia University Montreal
- GIDDA, S. K.; MIERSCH, O.; LEVITIN, A.; SCHMIDT, J.; WASTERACK, C.; VARIN, L. (2003): Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 17895-17900.
- GLENDENING, T. M.; POULTON, J. E. (1990): Partial Purification and Characterization of a 3'-phosphoadenosine 5' -Phosphosulfate: Desulfoglucosinolate Sulfotransferase from Cress (*Lepidium sativum*). *Plant Physiol.* **94** (2): 811-818.
- GÖTZ, S. (2006): Die Rolle von Jasmonaten in der Embryonalentwicklung der Tomate. Diplomarbeit: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- GREEN, T. R.; RYAN, C. A. (1972): Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777.
- GUO, H.-S.; XIE, Q.; FEI, J.-F.; CHUA, N.-H. (2005): MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* **17**: 1376-1386.

- GÜTTNER, D. (2007): Charakterisierung von transgenen Tomatenpflanzen, die die 12-Hydroxyjasmonat-Sulfotransferase aus *Arabidopsis thaliana* und *Solanum lycopersicum* überexprimieren. Bachelorarbeit: Hochschule Anhalt, Köthen.
- HABUCHI, O. (2000): Diversity and functions of glycosaminoglycan sulphotransferases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1474**: 115-127.
- HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I. T. (2005): Jasmonates and related compounds in plant–insect interactions. *J Plant Growth Reg* **23**: 238–245.
- HALKIER, B. A.; GERSHENZON, J. (2006): Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 303-333.
- HAMBERG, M.; FAHLSTADIUS, P. (1990): Allene oxide cyclase: A new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**: 518-526.
- HAMBERG, M.; HUGHES, M. (1988): Fatty acid allene oxides. III. Albumin-induced cyclization of 12,13(S)-epoxy-9(Z),11-octadecadienoic acid. *Lipids* **23**: 469-475.
- HANAI, H.; NAKAYAMA, D.; YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; HIROTA, Y.; SAKAGAMI, Y. (2000): Existence of a plant tyrosylprotein sulfotransferase: novel plant enzyme catalyzing tyrosine O-sulfation of preprophytosulfokine variants *in vitro*. *FEBS Lett.* **470** (2): 97-101.
- HANNOUFA, A.; VARIN, L.; IBRAHIM, R. K. (1991): Spatial Distribution of Flavonoid Conjugates in Relation to Glucosyltransferase and Sulfotransferase Activities in *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* **97** (1): 259-263.
- HANSEN, G.; ESTRUCH, J. J.; SOMMER, H.; SPENA, A. (1993): *NTGLO*: a tobacco homologue of the *GLOBOSA* floral homeotic gene of *Antirrhinum majus*: cDNA sequence and expression pattern. *Mol Gen Genet.* **239** (1-2): 310-312.
- HANZAWA, Y.; MONEY, T.; BRADLEY, D. (2005): A single amino acid converts a repressor to an activator of flowering. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 7748–7753.
- HAUSE, B.; STENZEL, I.; MIERSCH, O.; MAUCHER, H.; KRAMELL, R.; ZIEGLER, J.; WASTERNAK, C. (2000): Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* **24**: 113-126.
- HE, Y.; FUKUSHIGE, H.; HILDEBRAND, D. F.; GAN, S. (2002): Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**: 876-884.
- HERDE, O.; ATZORN, R.; FISAHN, J.; WASTERNAK, C.; WILLMITZER, L.; PENNA-CORTES, H. (1996): Localized wounding by heat initiates the accumulation of proteinase inhibitor II in abscisic acid-deficient plants by triggering jasmonic acid biosynthesis. *Plant Physiol* **112**: 853–860.
- HISAMATSU, Y.; GOTO, N.; SEKIGUCHI, M.; HASEGAWA, K.; SHIGEMORI, H. (2005): Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *J. Nat. Prod.* **68**: 600-603.
- HOFMANN, E.; ZERBE, P.; SCHALLER, F. (2006): The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction. *Plant Cell* **18**: 3201-3217.

- HOMMA, H.; OGAWA, K.; HIRONO, K.; MORIOKA, Y.; HIROTA, M.; TANAHASHI, I.; MATSUI, M. (1996): Site-directed mutagenesis of rat hepatic hydroxysteroid sulfotransferases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1296** (2): 159-166.
- HONKE, K.; TANIGUCHI, N. (2002): Sulphotransferases and sulphated oligosaccharides. *Medicinal Research Reviews* **22**: 637-654.
- HOWE, G. A.; SCHILMILLER, A. L. (2002): Oxylipin metabolism in response to stress. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 230-236.
- HOWE, G. A. (2004): Jasmonates as signals in the wound response. *J. Plant Growth Reg.* **23**: 223-237.
- ISHIGURO, S.; KAWAI-ODA, A.; UEDA, J.; NISHIDA, I.; OKADA, K. (2001): The *defective in anther 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**: 2191-2209.
- ISHIKAWA, A.; YOSHIHARA, T.; NAKAMURA, K. (1994): Jasmonate-inducible expression of a potato cathepsin D inhibitor-GUS gene fusion in tobacco cells. *Plant Mol. Biol.* **26**: 403-414.
- ITO, A.; HOWE, G. A. (2001): Molecular cloning of a divinyl ether synthase: identification as a CYP74 cytochrome P450. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 3620-3627.
- JACK, T. (2004): Molecular and genetic mechanisms of floral control. *The Plant Cell* **16**: 1-17.
- JACOBS, M.; RUBERY, P. H. (1988): Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* **241**: 346-349.
- JAIN, J. C.; GROOT-WASSINK, J. W.; REED, D. W.; UNDERHILL, E. W. (1990): Purification and properties of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate: desulphoglucosinolate sulphotransferase from *Brassica juncea* cell cultures. *J. Plant Physiol.* **136**: 356-361.
- KAKUTA, Y.; PEDERSEN, L. G.; CARTER, C. W.; NEGISHI, M.; PEDERSEN, L. C. (1997): Crystal structure of estrogen sulphotransferase. *Nat. Struct. Biol.* **4**: 904-908.
- KAKUTA, Y.; PETROTCHENKO, E. V.; PEDERSEN, L. C.; NEGISHI, M. (1998): The sulfonyl transfer mechanism. Crystal structure of a vanadate complex of estrogen sulfotransferase and mutational analysis. *J. Biol. Chem.* **273**: 27325-27330.
- KANG, J. H.; WANG, L.; GIRI, A.; BALDWIN, I. T. (2006): Silencing threonine desaminase and *JAR4* in *Nicotiana attenuata* impairs jasmonic acid-isoleucine-mediated defense against *Manduca sexta*. *The Plant Cell* **18**: 3303-3320.
- KEMPIN, S. A.; MANDEL, M. A.; YANOFSKY, M. F. (1993): Conversion of perianth into reproductive organs by ectopic expression of the tobacco floral homeotic gene *NAG1*. *Plant Physiol.* **103** (4): 1041-1046.
- KLAASSEN, C. D.; BOLES, J. W. (1997): The importance of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulphate (PAPS) in the regulation of sulphation. *FASEB Journal* **11**: 404-418.
- KLEIN, M.; PAPENBROCK, J. (2004): The multi-protein family of Arabidopsis sulphotransferases and their relatives in other plant species. *Journal of Experimental Botany* **55** (404): 1809-1820.

- KLEIN, M.; REICHELT, M.; GERSHENZON, J.; PAPANBROCK, J. (2006): The three desulfo-glucosinolate sulfo-transferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed. *FEBS J.* **273** (1): 122-36.
- KLIMYUK, V. I.; CARROLL, B. J.; THOMAS, C. M.; JONES J.D. (1993): Alkali treatment for rapid preparation of plant material for reliable PCR analysis. *Plant J.* **3** (3): 493-494.
- KOCH, T.; BANDEMER, K.; BOLAND, W. (1997): Biosynthesis of *cis*-jasmonone: A pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase?. *Helvetica Chimica Acta* **80**: 838-850.
- KRAMELL, R.; ATZORN, R.; SCHNEIDER, G.; MIERSCH, O.; BRÜCKNER, C.; SCHMIDT, J.; SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. (1995): Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino acid conjugates induced by osmotic stress in barley leaf tissue. *Journal of Plant Growth Regulation* **14**: 29-36.
- KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; HAUSE, B.; ORTEL, B.; PARTHIER, B.; WASTERNAK, C. (1997): Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett.* **414**: 197-202.
- KRAMELL, R.; MIERSCH, O.; ATZORN, R.; PARTHIER, B.; WASTERNAK, C. (2000): Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Physiol.* **123**: 177-188.
- KUBIGSTELTIG, I.; LAUDERT, D.; WEILER, E. W. (1999): Structure and regulation of the *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase gene. *Planta* **208**: 463-471.
- LAUDERT, D.; HENNIG, P.; STELMACH, B. A.; MÜLLER, A.; ANDERT, L.; WEILER E. W. (1997): Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Anal. Biochem.* **246**: 211-217.
- LAUDERT, D.; SCHALLER, F.; WEILER, E. W. (2000): Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**: 163-165.
- LEUSTEK, T. (2002): Sulphate metabolism. In: Somerville, C. R.; Meyerowitz, E. M., eds. *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists
- LI, C.; LIU, G.; XU, C.; LEE, G. I.; BAUER, P.; LING, H. Q.; GANAL, M. W.; HOWE, G. A. (2003): The tomato suppressor of *prosystemin-mediated responses2* gene encodes a fatty acid desaturase required for the biosynthesis of jasmonic acid and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant Cell.* **15** (7): 1646-1661.
- LI, L.; ZHAO, Y.; MCCAIG, B. C.; WINGERD, B. A.; WANG, J.; WHALON, M. E.; PICHESKY, E.; HOWE, G. A. (2004a): The tomato homolog of *CORONATINE-INSENSITIVE1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* **16**: 126-143.
- LI, J.; BRADER, G.; PALVA, E. T. (2004b): The *WRKY70* transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**: 319-331.
- LI, C.; SCHILLMILLER, A. L.; LIU, G.; LEE, G. I.; JAYANTY, S.; SAGEMAN, C.; VREBALOV, J.; GIOVANNONI, J. J.; YAGI, K.; KOBAYASHI, Y.; HOWE, G. A. (2005): Role of β -Oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* **17**: 971-986.

- LIFSCHITZ, E.; ESHED, Y. (2006): Universal florigenic signals triggered by *FT* homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* **57** (13): 3405-3414.
- LIFSCHITZ, E.; EVIATAR, T.; ROZMAN, A.; SHALIT, A.; GOLDSHMIDT, A.; AMSELLEM, Z.; ALVAREZ, J. P.; ESHED, Y. (2006): The tomato *FT* ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**: 6398–6403.
- LILLIG, C. H.; SCHIFFMANN, S.; BERNDT, C.; BERKEN, A.; TISCHKA, R.; SCHWENN, J. D. (2001): Molecular and catalytic properties of *Arabidopsis thaliana* adenylyl sulfate (APS)-kinase. *Arch. Biochem. Biophys.* **392** (2): 303-310.
- LISON, P.; RODRIGO, I.; CONEJERO, V. (2001): A novel function for the cathepsin D inhibitor in tomato. *Plant Physiol.* **142** (3): 1329-1339.
- LORENZO, O.; CHICO, J. M.; SANCHEZ-SERRANO, J. J.; SOLANO, R. (2004): *jasmonate-insensitive1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonateregulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938-1950.
- LOZANO, R.; ANGOSTO, T.; CAPEL, J.; GOMEZ, P.; MOLINERO-ROSALES, N.; ZURITA, S.; JAMILENA, M. (2000): Floral transition and flower development in tomato: functional homology with *Arabidopsis*. *FLOWERING NEWSLETTER* **30**: 26–33.
- MALLORY, A. C.; BARTEL, D. P.; BARTEL, B. (2005): MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**: 1360-1375.
- MANDAOKAR, A.; THINES, B.; SHIN, B.; MARKUS LANGE, B.; CHOI, G.; KOO, Y. J.; YOO, Y. J.; CHOI, Y. D.; CHOI, G.; BROWSE, J. (2006): Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal* **46**: 984-1008.
- MAO, L.; BEGUM, D.; CHUANG, H. W.; BUDIMAN, M. A.; SZYMKOWIAK, E. J.; IRISH, E. E.; WING, R. A. (2000): *JOINTLESS* is a MADS-box gene in tomato controlling flower abscission zone development. *Nature* **406**: 910–913.
- MARSOLAIS, F.; VARIN, L. (1995): Identification of amino acid residues critical for catalysis and cosubstrate binding in the flavonol 3-sulfotransferase. *J. Biol. Chem.* **270** (51): 30458-30463.
- MARSOLAIS, F.; VARIN, L. (1997): Mutational analysis of domain II of flavonol 3-sulfotransferase. *Eur. J. Biochem.* **247** (3): 1056-1062.
- MARSOLAIS, F.; LAVIOLETTE, M.; KAKUTA, Y.; NEGISHI, M.; PEDERSEN, L. C.; AUGER, M.; VARIN L. (1997): 3'-Phosphoadenosine 5'-phosphosulfate binding site of flavonol 3-sulfotransferase studied by affinity chromatography and ³¹P NMR. *Biochemistry* **38** (13): 4066-4071.
- MARSOLAIS, F.; GIDDA, S. K.; BOYD, J.; VARIN, L. (2000): Plant soluble sulphotransferases: structural and functional similarity with mammalian enzymes. *Recent Advances in Phytochemistry* **34**: 433-456.
- MARSOLAIS, F.; SEBASTIA, C. H.; ROUSSEAU, A.; VARIN, L. (2004): Molecular and biochemical characterization of BNST4, an ethanol-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*, and regulation of *BNST* genes by chemical stress and during development. *Plant Sci.* **166**: 1359-1370.

- MARSOLAIS, F.; BOYD, J.; PAREDES, Y.; SCHINAS, A. M.; GARCIA, M.; ELZEIN, S.; VARIN, L. (2007): Molecular and biochemical characterization of two brassinosteroid sulfotransferases from *Arabidopsis*, AtST4a (At2g14920) and AtST1 (At2g03760). *Planta* **225** (5): 1233-1244.
- MATSUI, K.; SHIBUTANI, M.; HASE, T.; KAJIWARA, T. (1996): Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). *FEBS Lett.* **394**: 21-24.
- MAUCHER, H.; STENZEL, I.; MIERSCH, O.; STEIN, N.; PRASAD, M.; ZIEROLD, U.; SCHWEIZER, P.; DORER, C.; HAUSE, B.; WASTERNAK, C. (2004): The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.) - cloning and organ-specific expression. *Phytochemistry* **65** (7): 801-811.
- MAYER, K. F.; SCHOOF, H.; HAECKER, A.; LENHARD, M.; JURGENS, G.; LAUX, T. (1998): Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell.* **95** (6): 805-815.
- MAYROSE, M.; BONSHTIEN, A.; SESSA, G. (2004): LeMPK3 is a mitogenactivated protein kinase with dual specificity induced during tomato defense and wounding responses. *J. Biol. Chem.* **279**: 14819-14827.
- MEMELINK, J.; VERPOORTE, R.; KIJNE, J. W. (2001): ORCANization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* **6**: 212-219.
- MENKE, F. L. H.; PARCHMANN, S.; MUELLER, M. J.; KIJNE, J. W.; MEMELINK, J. (1999): Involvement of the Octadecanoid Pathway and Protein Phosphorylation in Fungal Elicitor-Induced Expression of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthetic Genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* **119**: 1289-1296.
- MIERSCH, O.; WASTERNAK, C. (2000): Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: Endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biological Chemistry* **381**: 715-722.
- MIERSCH, O.; PORZEL, A.; WASTERNAK, C. (1999): Microbial conversion of jasmonates-hydroxylations by *Aspergillus niger*. *Phytochemistry* **50**: 1147-1152.
- MIERSCH, O.; WEICHERT, H.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; FEUSSNER I.; WASTERNAK, C. (2004): Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**: 847-856.
- MIERSCH, O.; NEUMERKEL, J.; DIPPE, M.; STENZEL, I.; WASTERNAK, C. (im Druck): Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02252.x
- MOLINERO-ROSALES, N.; JAMILINA, M.; ZURITA, S.; GOMEZ, P.; CAPEL, J.; LOZANO, R. (1999): FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J.* **20** (6): 685-693.
- MOLINERO-ROSALES, N.; LATORRE, A.; JAMILINA, M.; LOZANO, R. (2004): SINGLE FLOWER TRUSS regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* **218**: 427-434.
- MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. (2002): Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *The Plant Cell* **14**: 111-130.

- NAGPAL, P.; ELLIS, C. M.; WEBER, H.; PLOENSE, S. E.; BARKAWI, L. S.; GUILFOYLE, T. J.; HAGEN, G.; ALONSO, J. M.; COHEN, J. D.; FARMER, E. E.; ECKER, J. R.; REED, J. W. (2005): Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**: 4107-4118.
- NAKAMURA, Y.; MATSUBARA, A.; MIYATAKE, R.; OKADA, M.; UEDA, M. (2006): Bioactive substances to control nyctinasty of Albizzia plants and its biochemistry. *Regulation of Plant Growth & Development* **41**: 44.
- NARVAEZ-VASQUEZ, J. ; RYAN, C. A. (2004): The cellular localization of prosystemin: a functional role for phloem parenchyma in systemic wound signaling. *Planta* **218**: 360–369.
- NARVAEZ-VASQUEZ, J.; FLORIN-CHRISTENSEN, J.; RYAN, C. A. (1999): Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: 2249–2260.
- NEGISHI, M.; PEDERSEN, L. G.; PETROTCHENKO, E.; SHEVTSOV, S.; GOROKHOV, A.; KAKUTA, Y.; PEDERSEN, L. C. (2001): Structure and function of sulfotransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* **390** (2): 149-157.
- NIEHRS, C.; BEISSWANGER, R.; HUTTNER, W. B. (1994): Protein tyrosine sulphation, 1993 - an update. *Chemico-Biological Interactions* **92**: 257-271.
- O'DONNELL, P. J.; CALVERT, C.; ATZORN, R.; WASTERNACK, C.; LEYSER H. M. O.; BOWLES, D. J. (1996): Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914–1917.
- OROZCO-CARDENAS, M. L.; RYAN C. A. (2002): Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol* **130**: 487–493.
- OROZCO-CARDENAS, M. L.; NARVAEZ-VASQUEZ, J.; RYAN, C. A. (2001): Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**: 179–191.
- PARK, J. H.; HALITSCHKE, R.; KIM, H. B.; BALDWIN, I. T.; FELDMANN, K. A.; 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. *The Plant Journal* **31**: 1-12.
- PATOUT, V.; HOLZER, F.; REISCH, B.; WALLING, L. L. (1993): Leucine Aminopeptidase: An Inducible Component of the Defense Response in *Lycopersicon esculentum* (Tomato). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 9906-9910.
- PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C. A. (1991): A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-898.
- PENA-CORTES, H.; FISAHN, J.; WILLMITZER, L. (1995): Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4106-4113.
- PETROTCHENKO, E. V.; PEDERSEN, L. C.; BORCHERS, C. H.; TOMER, K. B.; NEGISHI, M. (2001): The dimerization motif of cytosolic sulfotransferases. *FEBS Lett.* **490** (1-2): 39-43.
- PIETERSE, C. M. J.; SCHALLER, A.; MAUCH-MANI, B.; CONRATH, U. (2006): Signaling in plant resistance responses: divergence and cross-talk of defense pathways. In: Tuzun, S.; Bent, E., eds. Mutligenic and induced systemic resistance in plants. New York: Springer, 166-196.

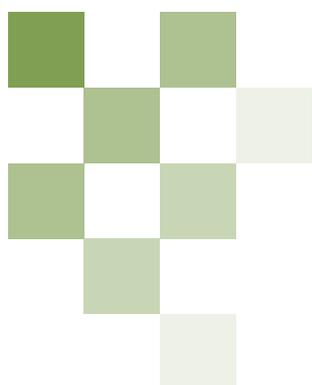
- PIOTROWSKI, M.; SCHEMENEWITZ, A.; LOPUKHINA, A.; MULLER, A.; JANOWITZ, T.; WEILER, E. W.; OECKING C. (2004): Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure. *J. Biol. Chem.* **279** (49): 50717-50725.
- PNUELI, L.; CARMEL-GOREN, L.; HAREVEN, D.; GUTFINGER, T.; ALVAREZ, J.; GANAL, M.; ZAMIR, D.; LIFSCHITZ, E. (1998): The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* **125**: 1979-1989.
- PNUELI, L.; GUTFINGER, T.; HAREVEN, D.; BEN-NAIM, O., RON, N.; ADIR, N.; LIFSCHITZ, E. (2001): Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *The Plant Cell* **13**: 2687-2702.
- PRE, M. (2006): ORA EST: Functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. Dissertationsschrift (ISBN 90-5335-088-8): Universität Leiden.
- QUINET, M.; DUBOIS, C.; GOFFIN, M.; CHAO, J.; DIELEN, V.; BATOKO, H.; BOUTRY, M.; KINET, J. M. (2006): Characterization of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) mutants affected in their flowering time and in the morphogenesis of their reproductive structure. *Journal Experimental Botany* **57**: 1381-1390.
- QUINKERT G.; ADAM, F.; DÜRNER, G. (1982): Asymmetrische Synthese von Methyljasmonat; *Angewandte Chemie* **94**: 866-867.
- RAO, M. V.; LEE, H.-I.; CREELMAN, R. A.; MULLET, J. E.; DAVIS, K. R. (2000): Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646.
- RASK, L.; ANDREASSON, E.; EKBOM, B.; ERIKSSON, S.; PONTOPPIDAN, B.; MEIJER, J. (2000): Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol.* **42** (1): 93-113.
- REINHARDT, D.; FRENZ, M.; MANDEL, T.; KUHLEMEIER, C. (2003): Microsurgical and laser ablation analysis of interactions between the zones and layers of the tomato shoot apical meristem. *Development.* **130** (17): 4073-4083.
- REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E. E. (2000): Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 707-719.
- RIVOAL, J.; HANSON, A. D. (1994): Choline-O-Sulfate Biosynthesis in Plants (Identification and Partial Characterization of a Salinity-Inducible Choline Sulfotransferase from Species of *Limonium* (Plumbaginaceae). *Plant Physiol.* **106** (3): 1187-1193.
- ROJO, E.; TITARENKO, E.; LEON, J.; BERGER, S.; VANCANNEYT, G.; SANCHEZ-SERRANO, J. J. (1998): Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid dependent and independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **13**: 153-165.
- ROTTE, C.; LEUSTEK, T. (2000): Differential subcellular localization and expression of ATP sulfurylase and 5'-adenylylsulfate reductase during ontogenesis of *Arabidopsis* leaves indicates that cytosolic and plastid forms of ATP sulfurylase may have specialized functions. *Plant Physiol.* **124** (2): 715-724.
- ROULEAU, M.; MARSOLAIS, F.; RICHARD, M.; NICOLLE, L.; VOIGT, B.; ADAM, G.; VARIN, L. (1999): Inactivation of brassinosteroid biological activity by a salicylate-inducible steroid sulfotransferase from *Brassica napus*. *J. Biol. Chem.* **274** (30): 20925-20930.

- RYAN, C. A. (2000): The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**: 112–121.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989): Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- SASAKI, Y.; ASAMIZU, E.; SHIBATA, D.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; AWAI, K.; AMAGAI, M.; KUWATA, C.; TSUGANE, T.; MASUDA, T.; SHIMADA, H.; TAKAMIYA, K.; OHTA, H.; TABATA, S. (2001): Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: Self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Research* **8**: 153-161.
- SAWHNEY, V.K.; GREYSON, R. I. (1972): On the initiation of the inflorescence and floral organs in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Can. J. Bot.* **50**: 1493–1495.
- SCHALLER, F.; SCHALLER, A.; STINTZI, A. (2005): Biosynthesis and Metabolism of Jasmonates. *J. Plant Growth Regul.* **23**: 179–199
- SCHEER, J. M.; RYAN, C. A. (2002): The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99** (14): 9585-9590.
- SCHILDKNECHT, H.; MEIER-AUGENSTEIN, W. (1990) Role of turgorins in leaf movement in the pulvinus: motor organ for leaf movement (Satter, R. L., Gorton, H. L., and Vogelman, T. C., eds) 101-129, American Society of Plant Physiologists, Rockville, Md.
- SCHILLMILLER, A. L.; HOWE, G. A. (2005): Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369-377.
- SCHMITZ, G.; TILLMANN, E.; CARRIERO, F.; FIORE, C.; CELLINI, F.; THERES, K. (2002): The tomato Blind gene encodes a MYB transcription factor that controls the formation of lateral meristems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 1064–1069.
- SCHUMACHER, K.; SCHMITT, T.; ROSSBERG, M.; SCHMITZ, G.; THERES, K. (1999): The *Lateral suppressor* (Ls) gene of tomato encodes a new member of the VHIID protein family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 290–295.
- SEMBDNER, G.; PARTHIER, B. (1993): The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 569-589.
- SEMBDNER, G.; ATZORN, R.; SCHNEIDER, G. (1994): Plant hormone conjugation. *Plant Molecular Biology* **26**: 1459-1481.
- SEO, S.; SANO, H.; OHASHI, Y. (1999): Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**: 289-298.
- SEO, H. S.; SONG, J. T.; CHEONG, J. J.; LEE, Y. H.; LEE, Y. W.; HWANG, I.; LEE, J. S.; CHOI, Y. D. (2001): Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 4788-4793.
- SONG, W.-C.; FUNK, C. D.; BRASH, A. R. (1993): Molecular cloning of an allene oxide synthase: a cytochrome P450 specialized for the metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 8519-8523.

- STANKOVIC, B.; DAVIES, E. (1996): Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Lett.* **390** (3): 275-279.
- STASWICK, P. E.; TIRYAKI, I. (2004): The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- STASWICK, P.; SU, W.; HOWELL, S. (1992): Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 6837-6840.
- STASWICK, P. E.; TIRYAKI, I.; ROWE, M. L. (2002): Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- STELMACH; B. A., MULLER; A., HENNIG, P.; GEBHARDT, S.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WEILER, E. W. (2001): A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-Oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 12832-12838.
- STENZEL, I.; HAUSE, B.; MAUCHER, H.; MIERSCH, O.; ZIEGLER, J.; RYAN, C. A.; WASTERNAK, C. (2003a): Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundlespecific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *The Plant Journal* **33**: 577-589.
- STENZEL, I.; HAUSE, B.; MIERSCH, O.; KURZ, T.; MAUCHER, H.; WEICHERT, H.; ZIEGLER, J.; FEUSSNER, I.; WASTERNAK, C. (2003b): Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**: 895-911.
- 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.* **97**: 10625-10630.
- STRATMANN, J. W.; RYAN, C. A. (1997): Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** (20): 11085-11089.
- STRATMANN, J. W.; SCHEER, J.; RYAN, C. A. (2000): Suramin inhibits initiation of defense signaling by systemin, chitosan, and a β -glucan elicitor in suspension-cultured *Lycopersicon peruvianum* cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97** (16): 8862-8867.
- STUHLFELDER, C.; MUELLER, M. J.; WARZECHA, H. (2004): Cloning and expression of a tomato cDNA encoding a methyl jasmonate cleaving esterase. *Eur. J. Biochem.* **271**: 2976-2983.
- SUPERTI-FURGA, A. (1994): A defect in the metabolic activation of sulfate in a patient with achondrogenesis type IB. *Am. J. Hum. Genet.* **55** (6): 1137-1145.
- SWIATEK, A.; DONGEN, W. V.; ESMANS, E. L.; ONCKELEN, H. V. (2004): Metabolic fate of jasmonates in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Physiology* **135**: 161-172.
- SZYMKOWIAK, E. J.; IRISH, E. E. (2006): *JOINTLESS* suppresses sympodial identity in inflorescence meristems of tomato. *Planta* **223**: 646-658.
- TAKI, N.; SASAKI-SEKIMOTO, Y.; OBAYASHI, T.; KIKUTA, A.; KOBAYASHI, K.; AINAI, T.; YAGI, K.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.-I.; SHIBATA, D.; KOBAYASHI, Y.; OHTA, H. (2005): 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139** (3): 1268-1283.

- THEODOULOU, F. L.; JOB, K.; SLOCOMBE, S. P.; FOOTITT, S.; HOLDSWORTH, M.; BAKER, A.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A. (2005): Jasmonic acid levels are reduced in comatose ATP-Binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiol.* **137**: 835-840.
- THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S. Y.; HOWE, G. A.; BROWSE, J. (2007): JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448** (7154): 661-665.
- TURLINGS, T. C. J.; OUGHRIN, J. H.; MCCALL, P. J.; RÖSE, U. S. R.; LEWIS, W. J.; TUMLINSON, J. H. (1995): How caterpillar-damaged plants protect themselves by attracting parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 4169-4174.
- TURNER, J. G.; ELLIS, C.; DEVOTO, A. (2002): The jasmonate signal pathway. *The Plant Cell* **14**: 153-164.
- UEDA, J.; KATO, J. (1980): Isolation and identification of a senescence-promoting substance from worm-wood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* **66**: 246-249.
- VARIN, L.; IBRAHIM, R. K. (1991): Partial Purification and Some Properties of Flavonol 7-sulfotransferase from *Flaveria bidentis*. *Plant Physiol.* **95** (4): 1254-1258.
- VARIN, L.; DELUCA, V.; IBRAHIM, R. K.; BRISSON, N. (1992): Molecular characterization of two plant flavonol sulfotransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 1286-1290.
- VARIN, L.; MARSOLAIS, F.; BRISSON, N. (1995): Chimeric flavonol sulfotransferases define a domain responsible for substrate and position specificities. *J. Biol. Chem.* **270** (21): 12498-12502.
- VARIN, L.; CHAMBERLAND, H.; LAFONTAINE, J. G.; RICHARD, M. (1997): The enzyme involved in sulfation of the turgorin, gallic acid 4-O-(beta-D-glucopyranosyl-6'-sulfate) is pulvini-localized in *Mimosa pudica*. *Plant J.* **12** (4): 831-837.
- VARIN, L.; MIERSCH, O.; MAUCHER, H.; WASTERNAK, C. (2003): Methods and genetic sequences for producing male sterile plants, and plants genetically modified to alter anther development. USA/Canada Patent Application No. N/R: 004807-0007
- VICK, B. A.; ZIMMERMAN, D. C. (1983): The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **111**: 470-477.
- 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.
- WANG, S.; ICHII, M.; TAKETA, S.; XU, L.; XIA, K. A. I.; ZHOU, X. I. E. (2002): Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): promotion effect of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 827-832.
- WASTERNAK, C.; HAUSE, B. (2002): Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and plant development. *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* **72**: 165-221.
- WASTERNAK, C. (2007): Jasmonates: An Update on Biosynthesis, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. *Annals of Botany* **100**: 681-697.

- WASTERACK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH, O. (2006): The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**: 297-306.
- Weber, H.; Vick, B. A.; Farmer, E. E. (1997): Dinor-oxo-phytodienoic acid: a new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**: 10473-10478.
- WEINSHILBOUM, R. M.; AND OTTERNESS, D. M. (1994): Sulfotransferase enzymes. In Handbook of Experimental Pharmacology (Kauffman, F. C., ed) Vol. 112, pp. 45-78, Springer-Verlag, Berlin
- WEINSHILBOUM, R. M.; OTTERNESS, D. M.; AKSOY, IA.; WOOD, T. C.; HER, C.; RAFTOGIANIS, R. B. (1997) Sulfotransferase molecular biology: cDNAs and genes. *FASEB J.* **11**: 3-14.
- WILDON, D. C.; THAIN, J. F.; MINCHIN, P. E. H.; GUBB, I. R.; REILLY, A. J.; SKIPPER, Y. D.; DOHERTY, H. M.; O'DONNELL, P. J.; BOWLES, D. J. (1992): Electrical signalling and systemic proteinase inhibitor induction in the wounded plant. *Nature* **360**: 62-65.
- WOODWARD, A. W.; BARTEL, B. (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot. (Lond.)* **95** (5): 707-735.
- XIE, D.-X.; FEYS, B. F.; JAMES, S.; NIETO-ROSTRO, M.; TURNER, J. G. (1998): *COI1*: An Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094.
- XU, L.; LIU, F.; LECHNER, E.; GENSCHIK, P.; CROSBY, W. L.; MA, H.; PENG, W.; HUANG, D.; XIE, D. (2002): The SCFCOII ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**: 1919-1935.
- YAN, Y.; STOLZ, S.; CHETELAT, A.; REYMOND, P.; PAGNI, M.; DUBUGNON, L.; FARMER, E. E. (2007): A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell* **19** (8): 2470-2483.
- YANG, H.; MATSUBAYASHI, Y.; NAKAMURA, K.; SAKAGAMI, Y. (1999): *Oryza sativa* PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96** (23): 13560-13565.
- YOSHIHARA, T.; OMER, E. A.; KOSHINO, H.; SAKAMURA, S.; KIKUTA, Y.; KODA, Y. (1989): Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2835-2837.
- ZEEVAART, J. A. D. (1976): Physiology of flower formation. *Annual Review of Plant Physiology* **27**: 321-348.
- ZIEGLER, J.; WASTERACK, C.; HAMBERG, M. (1999): On the specificity of allene oxide cyclase. *Lipids* **34**: 1005-1015.
- ZIMMERMANN, P.; HIRSCH-HOFFMANN, M.; HENNIG, L.; GRUISSEM, W. (2004): GENEVESTIGATOR: Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol.* **136** (1): 2621-2632.



7 Anhang

LeST2a (TC117818)

ATGACAAAATCTCAAACCTCTTCACCAACTCCTCATAAATATTTACAAGAAGATGATGTA 60
 AGTGAAGATTGTAAGAAAATGCTTTCTACCCTACCAAAAAGAAAGAGGATGGGTTGGATCT 120
 TATGTGTATAAATATCAAGGCTTTTGGGCATTACCAAGACTTATCCAAGGGGTGATTGCA 180
 TGTCAACGCAATATCAAGCTCAAGATAATGATATCATTCTCGTTACGGCTCCAAAATCA 240
 GGAACCACTTGGTTAAAAGCACTTTTATTTTCTTTAGTGAATCGAAAAAATATCCTGTT 300
 TTTGAAAAAATCATCCGTTACTTGTCAAGAACCCTCATGATCTTGTTCATTATTAGAA 360
 CAAGATCTATATGTTGATGGTCAAGTTCCTGATTTTTCTTGTTCACTTCACCTACACTC 420
 ATAGCAACTCATGTTCCCTTTGCTTCATTGCCAAAATCAGTTCAAAACCTCAAGAACCAAA 480
 CTTGTTTACTTATGTAGAAAATCCAAGGGACACTTTTATTTCTATGTGGCAGTTTACAAAT 540
 AACTTAAGACTTGATAGTCATAGAGATACCAATTCTATTGAAGAAAATGTTTGATCATTTT 600
 TGTAAGGGCGTGGGTCTTTATGGACCATTTGGGATCATGTGTGGGTATTGGAAAGAA 660
 AGTATAGAAAATCTGATAAAGTACTTTTCTTGTATGATGAAGAAATTAAGCAACCT 720
 AAAATTCAACTTAAACGCTTGGCTGAATCTTGGACTGTCCATTTCCATAGAGGAAGAA 780
 GATTGTAGGGTGTGGATGAAATATTAAGAAATGTGTAGCTTTGGAAAATTTGAGGAATTTG 840
 GAGGTGAATGAAAATGGGAACATGTCGGCTGGAATGGCAAATAAAAATTTCTTTCGTCGA 900
 GGAGAAGTTGGAGATTGGAAGAATTATTTTACTGTTGAGATGAATGATCGACTCAATCAT 960
 ATCATTGAACAAAATTTTCATGGATCTGGATTGAAGTTTGTGTATATTGA 1011

MTKSQTSSTPHKYLQEDDVEDCKKLLSTLPKERGWVGSYVYNYQGFVALPRLIQGVIA 60
 CQRQYQAQDNDIILVTAPKSGTTLWKALLFSLVNRKKYPVFEKNHPLLKPNHDLVPLLE 120
 QDLYVDGQVPDFSLFTSPTLIATHVPFASLPKSVQNSRKLVLNCRNPRDTFISMWQFTN 180
 NLRLDShrdTNSIEEMFDHFCKGVGLYGPFWHDVHLYWKESIENSDKVLFLMYEEIKKQP 240
 KIQKRLAEFLDCPFSIEEEDCRVDEILRMCSFGNLRNLEVNNGNMSAGMANKNFFRR 300
 GEVGDWKNYFTVEMNDRLNHIIEQKFHGSGLKFVYI 339

LeST6 (U163368)

ATGACAACCTCTCTTCCCGAATATTTAGAAGAGGATAACCTAAGTGAAGAGTGTAAGAAA 60
 TTGATTTCCATCCTACCAAAAAGAAAAGGATGGGTAGATCAGTCTATAATTATCAAGGT 120
 TTTTGGACATCAACAAAATTTCTTCAAGGTGTGATTGCATGTCAACAACAATTTCAAGCT 180
 CGGGATAGTGATATCATTCTTGTACAAGTCCAAAATCAGGAAGTACTTGGTTAAAATCA 240
 CTTCTATTCGCTCTAGTGAATAGGGTGAACATCCTATTTTTGTACCTAATCACCCTTTA 300
 CTTGTCGAGAACCCTCATGTTCTTGTTCATTCTTAGAGCATAACTCTATGTTGATGGT 360
 CAAGTCATTGATTTTTCAACCAACACTTCACCTAGACTTTTGGCAACTCATGTGCCCTTT 420
 GCTTCATTGCCAGAATCAGTCCACGATTCAAAAACCAAACTTATTTACTTATGTAGGAAT 480
 CCTAGGGACACTTTTATTTCTATGTGGCATTTTGCAACAATTTATTTACTTCATCATAAA 540
 GATACTAATTCATTGAAGAAAATGTTTGTATCTTTTTGTAAAGGGGTGAGCCTTTATGGT 600
 CCATTTTGGAAATCACGTGTTGGATTATTGGAAACAAAGCATAAAAATCCTAACAAAATA 660
 CTTTTCTTAATGTATGAAGAAAATCAAAAAGAAACCAAAAATTCAACTTAAACGCTTGGCT 720
 AAATTCCTTGGAAATGCCATTTTCCATAGAGGAAGAAAATTCAGAGTGGTGGATGAGATA 780
 TAAAAATGTGTAGCTTTGAGAATTTGAGAAAATTTGGAGGTGAATACAAATGGAAAAGTTT 840
 TCAACTGGAGAGCCATATAAAGTGTCTTTCTGATAGAGGAGAAAATCGGAGATTGGAAGAAT 900
 TATTTTACTGTAGAGATGATCGATAAACTCAATCATATCATTGAAGAAAAGTTTCAAGGG 960
 GCTGGATTAAGTTTTTGTATGTTGA 987

MTTSLPEYLEEDNLSEECKKLISILPKEKGVRSVYNYQGFWTSTKFLQGVIAACQQQFQA 60
 RDSDIILVTSPKSGSTWLKSLFALVNRVKHPIFVFNHPLLVENPHVLPVPLEHTLYVDG 120
 QVIDFSTNTSPRLLATHVPFASLPESVHDSKTKLIYLCRNPRDTFISMWHFANNLLHHK 180
 DTNSIEEMFDLFCCKGVSLYGPFWNHVLDYWKQSIQNPKNILFLMYEEIKKKPKIQKRLA 240
 KFLECPFSIEEENSRVDEILKMCSEFNLRNLEVNNTNGKFSTGEPYKVFRRGEIGDWKN 300
 YFTVEMIDKLNHIIEEFQAGLKFVYI 328

Templates zur Herstellung von DNA-Sonden (Northern Blot-Analysen)

Gen	genebank-ID	Vektor	Restriktion mit:	Referenz
<i>AtST2a</i>	At5g07010	pQE30	<i>Bam</i> HI	diese Arbeit
<i>LeAOC</i>	AJ272026	pBSK-	<i>Eco</i> RI+ <i>Kpn</i> I	I. Stenzel
<i>LeEF1a</i>	X14449	pDrive	<i>Eco</i> RI	I. Stenzel
<i>LeLAP</i>	U50151.1	pDrive	<i>Eco</i> RI	I. Stenzel
<i>LeODC</i>	AF029349.2	pDrive	<i>Eco</i> RI	diese Arbeit
<i>LePIN2</i>	AY007240.1	pBluescriptII	<i>Xba</i> I	I. Stenzel
<i>LeRBCS1</i>	M13542.1	pBluescriptII	<i>Eco</i> RI	I. Stenzel
<i>LeST2a</i>		pDrive	<i>Bam</i> HI	diese Arbeit
<i>LeTD</i>	M61915	pBluescriptII	<i>Bam</i> HI+ <i>Kpn</i> I	I. Stenzel

qPCR-Primer (Tabak und Arabidopsis)

Gen	genebank-ID		T _m
<i>NtDEF</i>	X96428	5'-TGATGCAAGACAAGAGGATCCA-3'	60 °C
		5'-AGGCGTAAGGCTAATATGCGC-3'	60 °C
<i>NtGLO</i>	X67959	5'-GATGTTGGAAGATGCCCTTGA-3'	60 °C
		5'-TTGGTCTTGCTCCTCCTCCAT-3'	60 °C
<i>NtNAG1</i>	L23925	5'-CAATTTCCGAGGCCAATGC-3'	60 °C
		5'-GCCAGTGATTCACCCAACATG-3'	60 °C
<i>NtPLE36</i>	U63163.1	5'-CCATTGGTAGAGTCCGTTCCA-3'	60 °C
		5'-GCTCGTAGACACATGTTGGCA-3'	60 °C
<i>NtRPS6</i>	X68050	5'-GACAATGCATCCACGGACAGAC-3'	60 °C
		5'-TTTAACTCCAGGCCGTGTTTCG-3'	60 °C
<i>AtST2a</i>	At5g07010	5'-GTTCCCTAAAGGAAACGATCGAG-3'	60 °C
		5'-TGTTGTTGGTGTAAATGCCACG-3'	60 °C

qPCR-Primer (Tomate)

Gen	genebank-ID		Tm
<i>LeAOC</i>	AJ272026	5'-CTTGTCCCCTTTAGCAACAAGCT3'	60 °C
		5'-CGTGCTTGATCAGAATGCAGAGT-3'	60 °C
<i>LeARG</i>	AY656838.1	5'-GCTGCCAAGATGTCCAAGTGA-3'	60 °C
		5'-GGAAACTGAGCATCTGCCAGAC-3'	60 °C
<i>LeEF1a</i>	X14449	5'-GGTGGCGAGCATGATTTTGA-3'	60 °C
		5'-CGAGCCACCATGGAAAACAA-3'	60 °C
<i>LeLAP</i>	U50151.1	5'-CCTGGTAATGGCGGTGCTATAA-3'	60 °C
		5'-TCGAGATGCAACCACTGAACC-3'	60 °C
<i>LeODC</i>	AF029349.2	5'-ACTTTACGACCATGCGACGGT-3'	60 °C
		5'-CCCGAATACAGTCGACGGAAA-3'	60 °C
<i>LePIN2</i>	AY007240.1	5'-AGGAGAGAGTGATGAACCCAAGG-3'	60 °C
		5'-GCAATCCAGAAGATGGACAAGTCT-3'	60 °C
<i>LeRBCS1</i>	M13542.1	5'-ACGCAATGGCTTCCTCAATT-3'	60 °C
		5'-AGAAGCGGCGGATTTGAGT-3'	60 °C
<i>LeST1</i>		5'-TTATGTTCGATGGTGTGCTGCCCT-3'	60 °C
		5'-GAATCTTGGACAGATTTTCGGCA-3'	60 °C
<i>LeST2a</i>		5'-CGCTTGGCTGAATTCTTGGA-3'	60 °C
		5'-CAGCCGACATGTTCCCATTTA-3'	60 °C
<i>LeST3</i>		5'-GGCTTATGCATTTAACCACCCA-3'	60 °C
		5'-AACACATCTTTCGGATCGCG-3'	60 °C
<i>LeST4</i>		5'-CCATGGTCTTCAAGGCAACCT-3'	60 °C
		5'-GCATGATGGATACACATATGGCC-3'	60 °C
<i>LeST5</i>		5'-ACCCTGATCTGCCACATAGCAT-3'	60 °C
		5'-CACCCCCTATTCTCGTCAAGTTT-3'	60 °C
<i>LeST6</i>		5'-CACCCCTTACTTGTCGAGACCCC-3'	60 °C
		5'-CGTGGACTGATTCTGGCAATG-3'	60 °C
<i>LeTD</i>	M61915	5'-CTTTATGCCGTTACCGTAATCAGG-3'	60 °C
		5'-GGAACCTTGGAAATCCCATCAACA-3'	60 °C
<i>LeBL</i>	AF426174	5'-AGAGGTCCATGGTCTCCAGAAG-3'	60 °C
		5'-TCCACATCTCCTTAGTCCTGCTT-3'	60 °C
<i>LeFA</i>	AF197936	5'-TTCTGAAAGAAGCAACGCAGCT-3'	60 °C
		5'-TGCAGTCATCCTCAGAAGCACA-3'	60 °C
<i>LeJ</i>	AF275345	5'-AGTTCTTCTCCCCTCATTTGCC-3'	60 °C
		5'-CTTGAGAGGCGTGATTTGCATT-3'	60 °C
<i>LeLS</i>	AJ303345	5'-TTTTCTACCTCCACCGCCTTTT-3'	60 °C
		5'-GCTTCCTTCTCCGCGATTGTA-3'	60 °C
<i>LeSP1</i>	U84140	5'-TGCACCAGTGTCCAGAGATCAA-3'	60 °C
		5'-CGGCAGTTTCCCTCTGACAAT-3'	60 °C
<i>LeSP2G</i>	AY186734	5'-TCCAGATGCTCCTAGTCCAAGTG-3'	60 °C
		5'-ATTCCACCATCTCCCTCCCTT-3'	60 °C
<i>LeSFT</i>	AY186735	5'-CCCTTTCACAAGAACTATTGGCC-3'	60 °C
		5'-CCCTTGGCTGGTTAATAACTTGG-3'	60 °C
<i>LeSP5G</i>	AY186736	5'-AATGGATGTTCCCTTGAGGCCTT-3'	60 °C
		5'-GGAGCATCAGGATCCACCATAA-3'	60 °C
<i>LeSP6A</i>	AY186737	5'-AGCCCAAGCAATCCTAACTTGAG-3'	60 °C
		5'-GGCGTTGGATTCTCGTAGCATA-3'	60 °C
<i>LeSP9G</i>	AY186738	5'-CTATGAGACCCCAAGGCCAAA-3'	60 °C
		5'-CCGCAGTAACAGTTGTTCAAGA-3'	60 °C
<i>LeWUSCHEL</i>	AJ538329	5'-AGGCAAAGTAGTAGCCGTTGGA-3'	60 °C
		5'-AATCTGTTTCAGCAGTTGGAGACC-3'	60 °C

PCR-Primer (Klonierung)

Gen		Tm
<i>LeST2a</i>	5'-CGGGATCCATGACAAAATCTCAAACCTC-3'	65 °C
	5'-GTCGACCCTAATCAAATATACACAACTTCAAT-3'	63 °C
<i>LeST3</i>	5'-CAGGATCCATGGCAAGTTTATCCTCTATCC-3'	67 °C
	5'-CTCAAACCCAATTTTTTCTTTGTGATTC-3'	60 °C
<i>LeST6</i>	5'-CAGGATCCATGACAACCTTCTCTCCCGAATATTATTTAG-3'	68 °C
	5'-CTCAAACATACAAAACTTTAATCCAGC-3'	59 °C
<i>RnAST-IV</i> (X52883)	5'-CAGGATCCATGGAGTTCTCCCGTCCACC-3'	71 °C
	5'-TCATAGTTCACAACGAACTTGAAGTC-3'	60 °C

PCR-Primer (PCR-Test transgener Pflanzen)

		Tm
AMV-Enhancer	5'-TCTTTCAAATACTTCCACCATGG-3'	57 °C
<i>AtST2a-sense</i>	5'-TGTTGTTGGTGTAAATGCCACG-3'	59 °C
<i>LeST2a-sense</i>	5'-CCTAATCAAATATACACAACTTCAAT-3'	58 °C
<i>LeST2a-antisense</i>	5'-ATGACAAAATCTCAAACCTCTTCA-3'	58 °C

PCR-Primer (Genome Walking)

		Tm
GW_AP1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	58 °C
GW_AP2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'	58 °C
<i>LeST1</i> -5'-Ende	5'-GACATGCAATCACACCTTCAATTGTTTCAGGGCGATG-3'	71 °C
	5'-CTTCAATTGTTTCAGGGCGATG-3'	58 °C
<i>LeST1</i> -3'-Ende	5'-GTCTTTATGTCGATGGTTCGTGTCCCTAATTTTGCATCC-3'	71 °C
	5'-GTCGTGTCCCTAATTTTGCATCC-3'	61 °C
<i>LeST2a</i> -5'-Ende	5'-GGAGCCGTAACGAGAATGATATCATTATCTTGAGC-3'	68 °C
	5'-CTTGAGCTTGATATTGTCGTTGAC-3'	59 °C
<i>LeST3</i> -5'-Ende	5'-GCTGTTCAAGTGCTAGCAGACCTTGAACAACCTTGTG-3'	71 °C
	5'-GCAGACCTTGAACAACCTTGTG-3'	58 °C
<i>LeST3</i> -3'-Ende	5'-CAGAGTTGGCTGACTGCAAGATAGTATACGTCTTCGC-3'	72 °C
	5'-GCAAGATAGTATACGTCTTCGC-3'	59 °C
<i>LeST4</i> -5'-Ende	5'-GACCAAACCTTCCCCTGATAAAGTTGAGAG-3'	68 °C
	5'-CTTCCCCTGATAAAGTTGAGAG-3'	59 °C
<i>LeST4</i> -3'-Ende	5'-CCACTCTTATCATTTTTAAAGGCAGCCATGGTCTTCAAG-3'	70 °C
	5'-GCAGCCATGGTCTTCAAGG-3'	59 °C
<i>LeST5</i> -5'-Ende	5'-GTGGATAGACATAGAAGACAAGAGTGATCCACTCTTA-3'	68 °C
	5'-GAAGACAAGAGTGATCCACAC-3'	58 °C
<i>LeST5</i> -3'-Ende	5'-GGATTGTTGGGGATTGGAGAATTACATGAAACCTG-3'	68 °C
	5'-GGAAGAATTACATGAAACCTGAAATG-3'	59 °C
<i>LeST6</i> -5'-Ende	5'-CTAGAGCGAATAGAAGTGATTTTAACCAAGTACTTCCTG-3'	68 °C
	5'-CCAAGTACTTCCTGATTTTGGAC-3'	59 °C
<i>LeST6</i> -3'-Ende	5'-GGTGAAACATCCTATTTTTGTACCTAATCACCTTTAC-3'	67 °C
	5'-GTACCTAATCACCTTTACTTGTC-3'	59 °C

Besonderer Dank geht an ...

... Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit an einem so spannenden Thema arbeiten zu dürfen. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen, die rege Diskussionsbereitschaft und die Erfahrungen, die ich sammeln durfte.

... Dr. Otto Miersch und Birgit Ortel, sowie Dr. Jürgen Schmidt und Christine Kuhnt für die Durchführung der vielen, vielen Jasmonatbestimmungen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

... Dr. Irene Stenzel dafür, dass sie mir den Einstieg in das Thema erleichtert und mir in der Anfangszeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

... Dr. Peter Robert Lange für die unzähligen, fruchtbaren Diskussionen und das Einbringen neuer Ideen und Techniken. Außerdem danke ich dir, dass du so oft das Licht am Ende eines langen, dunklen Tunnel warst und so viel Geduld beim Korrekturlesen bewiesen hast.

... Stefanie Thumm, Verona Wilde und Domenika Arndt für die praktische Unterstützung. Ohne euch wären viele Experimente gar nicht erst möglich gewesen. Ich bedanke mich bei Verona, dass sie so geduldig Wurzeln gemessen und PCR-Platten pipettiert hat, bei Domenika für die liebevolle Pflege meiner transgenen Pflanzen und bei Stefanie für die unheimlich tolle Organisation unserer Labore und dafür, dass sie mir so oft den Rücken freigehalten hat. Vor allem danke ich euch für das tolle Arbeitsklima.

... Miriam Widder und alle anderen Studenten und Praktikanten, die im Laufe der Zeit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

... Katinka, Carolin, Stef, Silke und Silke. Danke, dass ihr immer für mich da seid und immer ein wenig Sonne in den oft stressigen Alltag bringt.

... Anja Hellwege für das fleißige und gründliche Korrekturlesen.

... die geduldigen Mitarbeiter der Gärtnerei für die Pflege meiner Pflanzen und an Annette Kohlberg für die vielen schönen Fotos meiner Pflanzen.

... alle Mitarbeiter des IPB und besonders an alle Mitglieder der Abteilung NBT. Danke für die tollen Arbeitsbedingungen.

... alle, mit denen ich mir je das Labor teilen durfte. Ihr habt mir das Arbeiten oft viel leichter gemacht.

... meine Familie, ohne die ich das alles nicht geschafft hätte. Ich danke meiner Mutter Elisabeth, dass sie mir dies alles ermöglichte und ich danke meinem Bruder Peter und seiner Familie für den wunderschönen Sommer.

... Hannelore und Bernd Günther für die Suche nach Rechtschreib- und Grammatikfehlern. Außerdem danke ich euch, dass ihr mich so herzlich in euerm zu Hause willkommen heißt.

... Christian Günther. Ich danke dir, dass du immer an mich geglaubt hast, immer für mich da warst und alle meine Launen ertragen hast. Ich danke dir, dass du mir die Angst vor Computern genommen hast und dass du das tolle Layout dieser Arbeit möglich gemacht hast.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 29.10.2007

Persönliche Informationen:

Name: Jana Neumerkel
Geb.: 03.06.1979 in Suhl
Familienstand: ledig

Werdegang:

09/1986 - 07/1998 Schulausbildung (Grundschule und Gymnasium)
07/1998 Abitur am Prof-Carl-Fiedler-Gymnasium in Suhl
10/1998 - 11/2003 Biochemie-Studium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
01/2003 - 09/2003 Diplomarbeit in der AG Jasmonatwirkungsweise am
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie

Thema: *Gewebsspezifische Analyse der Jasmonat-Wirkungsweise
in der lokalen Wundantwort der Tomate*

seit 12/2003 Promotion in der AG Jasmonatwirkungsweise am
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (Prof. Dr. C. Wasternack).

Publikationen:

WASTERACK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH, O. (2006): The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**: 297-306.

MIERSCH, O.; NEUMERKEL, J.; DIPPE, M.; STENZEL, I.; WASTERACK, C. (im Druck): Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* (im Druck; doi: 10.1111/j.1469-8137.2007.02252.x)

Halle, den 29.10.2007