

**Die sekretorische RibonukleaseLE in *Lycopersicon esculentum* –
Charakterisierung von Regulation und Funktion**

Dissertation

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie / Biotechnologie

von Nadine Groß
geb. am 07. 10. 1975 in Cottbus

Gutachter: 1. Prof. Waternack
2. Prof. Roitsch
3. Prof. Humbeck

Halle / Saale, den 16.03.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008213

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008213>]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die den angegebenen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen wurden entsprechend gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle / Saale, im September 2004

Nadine Groß

Lebenslauf

Name: Nadine Groß
geboren: am 07.10.75 in Cottbus
Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/82 - 07/90 Besuch der Grundschule

09/90 - 07/95 Besuch des Niedersorbischen Gymnasiums in Cottbus

Studium:

09/95 – 12/00 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg im Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

Abschluss: Diplom-Biochemikerin

04/00 – 12/00 Diplomarbeit, erstellt am Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH in Halle im Fachbereich Hydrogeologie in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des unterirdischen Wassers unter der Leitung von Frau Dr. G. Krauss

Thema: Untersuchungen zu Wachstum und physiologisch-biochemischer Leistung des aquatischen *Hyphomyceten Heliscus lugdunensis* Sacc. & Therry

01/01-02/01 Praktikum für Mikroskopie an der Universität Halle-Wittenberg im Fachbereich Biologie unter der Leitung von Dr. B. Hause und Dr. G. Hause

03/01 – xx/04 Anfertigung der Dissertation am Biozentrum GmbH Halle, in der Abteilung Angewandte biowissenschaftliche Forschung / Isotopenlabor in der Arbeitsgruppe Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie unter der Leitung von Frau Dr. M. Köck

Thema: Die sekretorische RibonukleaseLE in *Lycopersicon esculentum* - Charakterisierung von Regulation und Funktion

Publikationen:

M. Köck, N. Groß, I. Stenzel and G. Hause (2004). Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta* 219: 233-242.

N. Groß, C. Wasternack and M. Köck (2004). Wound-induced *RNaseLE* expression is jasmonate and systemin independent and occurs only locally in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Phytochemistry* 65: 1343-1350.

Vorwort

Mit der Fertigstellung dieser Arbeit möchte ich die Gelegenheit nutzen, mich bei allen, die bei der Vorbereitung, dem Entstehen und der Vollendung dieser Arbeit mitgewirkt haben, herzlich zu bedanken.

Frau Dr. M. Köck (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Angewandte biowissenschaftliche Forschung/Isotopenlabor, Arbeitsgruppe Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie) danke ich für die Überlassung des interessanten Themas. Durch die fachliche Unterstützung, ständige Diskussionsbereitschaft und die Zusammenarbeit von Frau Dr. M. Köck und ihrer Arbeitsgruppe war es mir möglich, das Thema umfassend zu bearbeiten.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. C. Wasternack (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Arbeitsgruppe Jasmonat-Wirkungsweise). Mit der Planung der Experimente zur Wundantwort, der Überlassung von Substanzen bzw. der transgenen 35S::*AOCsense/antisense*-Pflanzen und den cDNA's der Kontrollgene, *PIN2* bzw. *AOC* sowie mit der kritischen Diskussion der Ergebnisse dieser Arbeit hat er einen wesentlichen Beitrag zur Erstellung dieser Arbeit geleistet.

Durch die Nutzung von OGAs, die mir freundlicherweise von Prof. C. Ryan (Washington State University, Institute of Biological Chemistry) zur Verfügung gestellt wurden, sowie von *spr1*-Pflanzen, die mir Prof. G. Howe (Michigan State University, Department of Plant Biology) überlassen hatte, war es mir möglich wesentliche Untersuchungen durchzuführen.

Ich danke Dr. G. Hause und Frau R. Franke (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Arbeitsgruppe Bildgebende Verfahren) für die gute Zusammenarbeit und die technische Unterstützung. Die Nutzung der 18S rRNA-Einzelstrangsonden bei der Etablierung der *in situ*-Hybridisierung hat mir sehr geholfen.

Bedanken möchte ich mich herzlich bei Frau Dr. A. Peterson (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Gentechnik) für ihre Sequenzierungen und Unterstützung bei Datenbankrecherchen sowie ihre kritischen Anregungen und hilfreichen Diskussionen, die mir sehr bei der Vollendung dieser Arbeit geholfen haben.

Für die kritische Diskussion der histologischen Schnitte bedanke ich mich bei Frau Dr. B. Rahfeld (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmazeutische Biologie). Ebenso danke ich Frau Dr. S. Oberle (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachbereich Pharmazie, Institut für Pharmakologie und Toxikologie) für die konstruktiven Hinweise zur Durchführung der Band-shift-Analysen. Dadurch war es mir möglich, diese Methode innerhalb kürzester Zeit zu etablieren.

Ich möchte mich bei Frau K. Klar (Arbeitsgruppe Dr. M. Köck) für die freundliche Zusammenarbeit in angenehmer Arbeitsatmosphäre bedanken. Gern habe ich ihre Unterstützung und ihre Erfahrungen im Umgang mit Software in Anspruch genommen.

Weiterhin möchte ich allen danken, die kritisch meine Entwürfe gelesen, Inhalte diskutiert und mir zahlreiche wertvolle Anregungen gegeben haben.

Ganz herzlich danke ich auch all denen, die mich mit Engagement über das Fachliche hinaus nach Kräften unterstützt haben, die an die Fertigstellung dieser Arbeit geglaubt und mich somit immer wieder motiviert haben.

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1.	RNasen und RNA-Metabolismus	1
1.1.1.	Die Familie der T2-Typ RNasen in Pflanzen	2
1.1.2.	Die RNaseLE in <i>Lycopersicon esculentum</i>	3
1.2.	Die Wundantwort in der Pflanze	4
1.3.	Die Phosphatmangelantwort in der Pflanze.....	7
1.4.	Zielstellung	10
2.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	11
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	14
3.1.	Pflanzenmaterial und -anzucht	14
3.2.	Untersuchungen zu Pathogen-Pflanze-Interaktionen und Elicitorwirkung	14
3.3.	Untersuchungen mit Verwundung und Applikation.....	15
3.4.	Untersuchungen mit Applikation bei Phosphatmangel	16
3.5.	Erzeugung transgener PromLE1:: <i>uidA</i> -Linien	16
3.5.1.	Transformation in <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	17
3.5.2.	Transformation in Tomate	18
3.5.3.	Nachweis der Kopienzahl mittels Southernblot-Hybridisierung.....	18
3.5.3.1.	Isolierung und Restriktion genomischer DNA	18
3.5.3.2.	Elektrophoretische DNA-Auftrennung und Southernblot-Hybridisierung	18
3.6.	Quantitativer und histochemischer Nachweis der Promotoraktivität	19
3.6.1.	Fluorometrische Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität	19
3.6.2.	Histochemische Lokalisation der β -Glucuronidase-Aktivität	19
3.7.	Molekulabiologischer und mikroskopischer Transkriptnachweis	20
3.7.1.	Nachweis von mRNA mittels Northernblot-Hybridisierung.....	20
3.7.1.1.	RNA-Isolierung	20
3.7.1.2.	Elektrophoretische RNA-Auftrennung und Kapillarblot.....	20
3.7.1.3.	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	21
3.7.2.	Mikroskopischer mRNA Nachweis über <i>in situ</i> -Hybridisierung	22
3.7.2.1.	Fixierung und Einbettung in Paraffin	22
3.7.2.2.	Acridin-Orange Färbung.....	23

3.7.2.3.	<i>In situ</i> -Hybridisierung mit Digoxigenin markierten RNA-Einzelstrangsonden	23
3.8.	Quantitativer und qualitativer Proteinnachweis	24
3.8.1.	Nachweis von RNase-Aktivität	24
3.8.1.1.	Nichtdenaturierende Proteinisolierung	24
3.8.1.2.	In-Gel-Assay zum Nachweis der RNase-Aktivität.....	25
3.8.1.3.	Enzymatische Bestimmung der RNase-Aktivität	25
3.8.2.	Immunologischer Proteinnachweis mittels Westernblot-Hybridisierung.....	26
3.8.2.1.	Denaturierende Proteinextraktion.....	26
3.8.2.2.	SDS-Page und Proteintransfer	26
3.8.2.3.	Antikörperreinigung	26
3.8.2.4.	Immunologischer Proteinnachweis.....	27
3.8.3.	Immuncytochemischer Proteinnachweis	27
3.8.3.1.	Fixierung und Einbettung in Polyethylenglycol	27
3.8.3.2.	Kryofixierung	28
3.8.3.3.	Immunmarkierung	28
3.9.	Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen	29
3.9.1.	Band-shift-Analyse.....	29
3.9.1.1	Isolierung der Kernproteine.....	29
3.9.1.2.	Herstellung von radioaktiv markierten Promotorfragmenten.....	29
3.9.1.3.	Bindungsreaktion und elektrophoretische Auftrennung.....	30
3.10.	Pufferlösungen und Nährmedien	31
3.10.1.	Bakterienstämme	33
3.10.2.	Vektoren	33
3.10.3.	Plasmide.....	34
4.	ERGEBNISSE.....	35
4.1.	Vorkommen der RNaseLE in <i>L. esculentum</i>	35
4.1.1.	Organspezifisches Vorkommen der RNaseLE	35
4.1.2.	Gewebespezifisches Vorkommen der RNaseLE	39
4.1.2.1.	Lokalisation der RNaseLE im Stengel	39
4.1.2.2.	Lokalisation der RNaseLE in der Blüte	42
4.1.2.3.	Lokalisation der RNaseLE im Keimling	44

4.2.	Vorkommen und Regulation der <i>RNaseLE</i> Genexpression in verschiedenen Stressantworten von <i>L. esculentum</i>	46
4.2.1.	Wirkung von Pathogen-Pflanze-Interaktionen sowie Elicitoren auf die <i>RNaseLE</i> Expression	46
4.2.1.1.	Keine Expression der <i>RNaseLE</i> infolge Pathogeninfektion	46
4.2.1.2.	Keine Expression der <i>RNaseLE</i> nach Elicitorwirkung.....	49
4.2.2.	Regulation der <i>RNaseLE</i> Expression nach Verwundung	50
4.2.2.1.	„Späte“ Expression der <i>RNaseLE</i> nach Verwundung	51
4.2.2.2.	Lokale Expression der <i>RNaseLE</i> nach Verwundung.....	52
4.2.2.3.	Systemin-unabhängige wundinduzierte Expression der <i>RNaseLE</i>	54
4.2.2.4.	JA-unabhängige wundinduzierte <i>RNaseLE</i> Expression	57
4.2.2.5.	Aktivierung des <i>RNaseLE</i> Promotors nach Verwundung	60
4.2.2.6.	Geringe Ethylen-Abhängigkeit der <i>RNaseLE</i> Expression.....	61
4.2.2.7.	ROS-unabhängige wundinduzierte Expression der <i>RNaseLE</i>	62
4.2.2.8.	SA-unabhängige wundinduzierte <i>RNaseLE</i> Expression.....	64
4.2.2.9.	Auxin-, Cytokinin- und Polyamin-unabhängige wundinduzierte <i>RNaseLE</i> Expression	66
4.2.3.	Lokalisation der <i>RNaseLE</i> nach Verwundung	67
4.2.3.1.	Vorkommen der <i>RNaseLE</i> in verwundeten Blattnerven.....	67
4.2.3.2.	Akkumulation der <i>RNaseLE</i> mRNA im Phloem an der Verwundungsstelle ...	70
4.2.3.3.	Vorkommen des <i>RNaseLE</i> Proteins in den Siebzellen an der Verwundungsstelle	72
4.2.4.	Regulation der <i>RNaseLE</i> Expression bei Phosphatmangel	74
4.2.4.1.	<i>RNaseLE</i> Expression wird abhängig vom Phosphatmangel reguliert	74
4.2.4.2.	Phosphatmangelinduzierte <i>RNaseLE</i> Expression wird durch Cytokinine reprimiert	76
4.2.4.3.	<i>RNaseLE</i> Promotorregionen interagieren mit Kernproteinen bei Phosphatmangel.....	79
4.2.4.4.	<i>RNaseLE</i> Promotorelemente interagieren spezifisch mit Kernproteinen	79
4.2.4.5.	Die Interaktionen umfassen Bereiche mit potentiellen <i>cis</i> -Elementen des <i>RNaseLE</i> Promotors	82
4.2.5.	Lokalisation der <i>RNaseLE</i> bei Phosphatmangel	83

5.	DISKUSSION.....	87
5.1.	Rolle der RNaseLE in frühen Entwicklungsstadien von <i>L. esculentum</i>	87
5.2.	Verwundung und Beteiligung der RNaseLE an der Wundheilung	90
5.2.1.	Systemin- und JA-unabhängige Regulation der <i>RNaseLE</i> Expression in der Wundantwort	93
5.3.	Phosphatmangel und Rolle der RNaseLE in der Seitenwurzeldifferenzierung.....	96
5.3.1.	Positive Regulation der <i>RNaseLE</i> bei Phosphatmangel	98
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7.	LITERATURVERZEICHNIS	104

1.	Akkumulation der <i>RNaseLE</i> mRNA (a, b) und Vorkommen der RNaseLE Aktivität (c) in Blüten, Stengeln und in Keimlingen von <i>L. esculentum</i>	36
2.	Akkumulation der <i>RNaseLE</i> mRNA in späten Blütenstadien (a, b) und in Staubblättern (c, d) von <i>L. esculentum</i>	38
3.	Lokalisation der <i>RNaseLE</i> Promotoraktivität (A, B), <i>RNaseLE</i> mRNA (C, C', D) und Vorkommen von RNaseLE Protein (E, F) im Phloem von Stengel aus <i>L. esculentum</i>	41
4.	Lokalisation der <i>RNaseLE</i> Promotoraktivität (A, C-H) im Staubblatt der Blüte von PromLE1:: <i>uidA</i> -Pflanzen.	43
5.	Lokalisation von <i>RNaseLE</i> Promotoraktivität (B, C), <i>RNaseLE</i> mRNA (D, E, G, H) und Vorkommen von RNaseLE Protein (J, L) im reifenden Phloem und im Endosperm von <i>L. esculentum</i> -Keimlinge.	45
6.	Einfluss von Pathogeninfektionen auf die Expression von <i>RNaseLE</i> im Vergleich zu <i>PRI</i>	48
7.	Elicitorwirkung auf die Expressionen von <i>RNaseLE</i> und <i>PIN2</i>	50
8.	Zeitabhängige Akkumulationen der <i>RNaseLE</i> , <i>PIN2</i> und <i>AOC</i> mRNA nach Verwundung.	51
9.	Lokale Akkumulation der <i>RNaseLE</i> mRNA (a, b) im Vergleich zur Akkumulation der <i>PIN2</i> mRNA sowie lokales Vorkommen von RNase LE Aktivität (c, d) nach Verwundung.	53
10.	Einfluss von Systemin auf die Expression der <i>RNaseLE</i> im Vergleich zu <i>PIN2</i>	56
11.	Einfluss von JA auf die Expression der <i>RNaseLE</i> im Vergleich zu <i>PIN2</i>	59
12.	<i>RNaseLE</i> Promotoraktivität nach Verwundung und Systemin- bzw. JAME-Applikation.	60
13.	Akkumulation der <i>RNaseLE</i> mRNA nach Ethylenwirkung im Vergleich zu <i>PIN2</i> und <i>ACO</i>	62
14.	Einfluss von endogen gebildeten ROS (a, b) bzw. Wasserstoffperoxid (c, d) auf die Expression der <i>RNaseLE</i> im Vergleich zu <i>PIN2</i>	63
15.	Einfluss von SA auf die <i>RNaseLE</i> und <i>PIN2</i> Expression.	65
16.	Phytohormon-unabhängige wundinduzierte Akkumulationen der <i>RNaseLE</i> und <i>PIN2</i> mRNA.	66
17.	Lokalisation von <i>RNaseLE</i> mRNA (a, b), Protein (c), RNase-Aktivität (d) und Promotoraktivität (e) nach Verwundung.	69

18.	Lokalisation von <i>RNaseLE</i> mRNA im Stengel von <i>L. esculentum</i> nach Verwundung.	71
19.	Vorkommen von RNaseLE Protein in den Siebzellen des verwundeten Stengels von <i>L. esculentum</i>	73
20.	Akkumulationen der <i>RNaseLE</i> und <i>LePT2</i> mRNA in Abhängigkeit von der Phosphatversorgung.	75
21.	Einfluss von Auxinen (a , b), Cytokinin (c) und Ethylen (d , e) auf Expressionen von <i>RNaseLE</i> , <i>LePT2</i> , <i>ACO</i> und <i>RSI</i> mRNA bei Phosphatmangel bzw. -versorgung.	78
22.	Interaktionen von <i>RNaseLE</i> Promotorfragmenten mit Kernproteinen bei Phosphatmangel.....	81
23.	Lokalisation von <i>RNaseLE</i> im Vergleich zur <i>LePT2</i> mRNA (a), RNaseLE Aktivität (b) und Promotoraktivität (c) in Keimlingsorganen bei Phosphatmangel/versorgung.....	84
24.	Histochemische GUS-Färbung der <i>RNaseLE</i> Promotoraktivität von PromLE1:: <i>uidA</i> -Keimlingen bei Phosphatmangel (P-) in Kotyledonen (A) bzw. Wurzeln (B-E) sowie bei Phosphatversorgung (P+) in Kotyledonen (F) bzw. Wurzeln (G).....	86

1. Einleitung

Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse von Zellen bzw. Geweben können durch verschiedene Mechanismen reguliert werden. Eine Möglichkeit der Regulation stellt der nukleolytische Abbau durch Ribonukleasen (RNasen) dar. RNasen kommen ubiquitär in allen Organismen vor. Pflanzliche RNasen erhielten in jüngster Vergangenheit großes Interesse, da gezeigt wurde, dass bestimmte RNasen für die Aufrechterhaltung der Selbstinkompatibilität von Pflanzen notwendig sind. Seitdem wurde auf Grundlage von Expressionsanalysen die Beteiligung von RNasen an weiteren physiologischen Prozessen der Pflanze postuliert.

Die RNaseLE ist eine sekretorische RNase in *Lycopersicon esculentum* (Tomate), deren physiologische Funktion in der Pflanze bisher weitgehend unbekannt ist. In dieser Arbeit wurde die Rolle der RNaseLE in *L. esculentum* untersucht. Die Durchführung der Untersuchungen erfolgte in der am Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angesiedelten Arbeitsgruppe „Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie“ unter der Leitung von Frau Dr. M. Köck. In früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurden bereits die cDNA der RNaseLE isoliert und deren abgeleitete Proteinstruktur aufgeklärt. Weiterhin wurden die genomische Sequenz der RNaseLE erforscht und die enzymatischen Eigenschaften des Enzyms charakterisiert. Aus Transkriptomanalysen ist bekannt, dass die Expression der RNaseLE bei Phosphatmangel und nach Verwundung induziert wird. Welche Funktion das Enzym unter diesen Stressbedingungen in der Pflanze hat, ist unbekannt.

1.1. RNasen und RNA-Metabolismus

RNasen sind Enzyme, welche die Phosphodiesterbrücken von Ribonukleinsäuren spalten. Die katalytische Einheit von RNasen ist ein Protein. Eine Ausnahme sind RNasen, wie die RNase P, deren ribonukleolytische Einheit ein RNA-Molekül ist (Aravind und Koonin 2001). RNasen kommen in Prokaryoten und in Eukaryoten vor und sind in den RNA-Metabolismus involviert. RNasen können am unspezifischen RNA-Abbau oder an posttranskriptionellen Prozessen beteiligt sein. Zu diesen posttranskriptionellen Prozessen zählen Turnover und Splicing von mRNA's sowie Processing von tRNA's, snRNA's und rRNA's. Oft sind verschiedene RNasen in Komplexen (z.B. Exosom, Degradosom) mit RNA-Bindeproteinen und anderen Enzymen (z.B. Helikasen) organisiert (Aravind und Koonin 2001).

RNasen werden nach unterschiedlichen Kriterien klassifiziert. Die neuere evolutionäre Klassifikation basiert auf Aminosäuresequenz und Proteinstruktur der RNasen. Demnach

werden RNasen in α -, β -, α/β - und $\alpha+\beta$ -Strukturtypen eingeteilt. Weiterhin werden RNasen nach biochemischen und katalytischen Eigenschaften gruppiert, da RNasen abhängig vom pH-Optimum und der Basenspezifität Einzelstrang-RNA's, Doppelstrang-RNA's sowie RNA-DNA-Hybride abbauen können (Aravind und Koonin 2001). Dieser Zuordnung zufolge gibt es drei Gruppen von RNasen, die alkalischen T1-Typ RNasen, die schwach sauren RNaseA-Typ RNasen und die sauren T2-Typ RNasen (Irie 1999).

1.1.1. Die Familie der T2-Typ RNasen in Pflanzen

Die am besten erforschten pflanzlichen RNasen gehören zum T2-Typ sekretorischer RNasen. Weitere Vertreter dieser Gruppe wurden in Viren, Bakterien, Pilzen und Tieren identifiziert (Irie 1999). Die namensgebende RNaseT2 wurde aus *Aspergillus oryzae* isoliert (Kawata et al. 1988).

Die T2-Typ RNasen gehören zum $\alpha+\beta$ -Strukturtyp und werden in Bezug auf ihre enzymatische Aktivität den Transferase-Typ RNasen, die Einzelstrang-RNA via 2':3'-zyklische Nukleotid-Monophosphate (NMP's) zu 3'-Mononukleotiden hydrolysieren, zugeordnet. Die T2-Typ RNasen sind basenunspezifische RNasen mit einem katalytischen pH-Optimum von 4 bis 5. Ihre Proteinstruktur weist bestimmte konservierte Bereiche auf. Solche sind die Aminosäuresequenzen CAS I und CAS II im aktiven Zentrum der T2-Typ RNasen, die für die katalytische Funktion wichtig sind. Die T2-Typ RNasen werden nach Anzahl der Disulfidbrücken in zwei Gruppen eingeteilt. Pilzliche RNasen, wie z.B. die RNase Rh, haben fünf Disulfidbrücken, pflanzliche dagegen vier (Irie 1999).

Die T2-Typ RNasen, die an der Aufrechterhaltung der Selbstinkompatibilität der Pflanze beteiligt sind, werden als S-RNasen (self-incompatibility factors with RNase activity) bezeichnet. Diese kommen im Stigma selbstinkompatibler Pflanzen vor und wirken als Allelspezifische Cytotoxine. Nach einer Selbstbefruchtung hydrolysieren S-RNasen die Pollen-rRNA, wodurch das Wachstum der Pollenschläuche verhindert wird (Golz et al. 1995). Verwandte RNasen mit gleichen Eigenschaften, die nicht nur in selbstinkompatiblen Pflanzen sondern in allen Pflanzenfamilien vorkommen, wurden identifiziert und als S-like RNasen bezeichnet (Tayler et al. 1993). Die T2/S-like RNasen sind in viele Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse von Pflanzen, wie z.B. der Seneszenz oder der Xylognese, involviert (Green 1994). RNasen, die in Seneszenzprozessen eine Funktion haben, sind z.B. die RNase RNS2 aus *Arabidopsis thaliana* (Bariola et al. 1994) und die im endoplasmatischen Reticulum lokalisierte RNaseLX aus *L. esculentum* (Kaletta et al. 1998; Lers et al. 1998;

Lehmann et al. 2001). An der Xylemdifferenzierung sind die RNaseLX und die ZRNaseI aus *Zinnia elegans* beteiligt (Ye und Droste 1996; Lehmann et al. 2001). Diese beiden RNasen sind bislang die einzigen bekannten RNasen, die in dem Differenzierungsprozess der Xylognese eine Funktion haben.

Weiterhin wird die Expression von T2-Typ RNase Genen durch exogene Umweltfaktoren, wie Phosphatmangel, Pathogeninfektion oder Verwundung induziert. Durch eine Verwundung wird z.B. die Expression der *RNaseNW* in *Nicotiana glutinosa* (Kariu et al. 1998) bzw. der RNase *RNSI* in *A. thaliana* (LeBrasseur et al. 2002) und durch eine Pathogeninfektion wird die Expression der *RNaseNE* in *Nicotiana alata* induziert (Galiana et al. 1997).

1.1.2. Die RNaseLE in *Lycopersicon esculentum*

Die RNaseLE gehört zur Gruppe der T2-Typ RNasen. Die T2-RNase Familie in *L. esculentum* besteht aus drei Genen. Die RNaseLE und die RNaseLX sind zwei Genprodukte dieser Genfamilie, deren posttranskriptionale Reifungsprodukte die RNasenLV3 und LV2/1 sind (Köck et al. 1995).

Die RNaseLE wurde enzymatisch charakterisiert und gehört danach zum RNase Typ I (EC 3.1.27.1; Wilson 1982). Es ist eine EDTA-insensitive Endonuklease, welche einzelsträngige RNA am Purinring oder am Pyrimidinring (G>U=A>C) hydrolysiert (Abel und Glund 1987; Abel et al. 1989; Nürnberger et al. 1990; Löffler et al. 1992). Die Präferenz für Guanidin kann durch Substitution von Asn44 gegen Asp zu einer Präferenz für Adenin verschoben werden (Ohgi et al. 1997). Für die Erkennung und Bindung der Nukleotidbasen sind zwei hydrophobe Bereiche des Enzyms verantwortlich, die sich neben dem katalytischen Zentrum befinden. Im aktiven Zentrum der RNaseLE sind die Aminosäuren His39, Trp42, His92, Glu93, Lys96 und His97 angeordnet. Die dreidimensionale Proteinstruktur der RNaseLE besteht aus 7 α -Helices und 7 β -Faltblättern (Tanaka et al. 2000). Die Primärstruktur des reifen Proteins weist 205 Aminosäuren auf (Jost et al. 1991; Löffler et al. 1993). Die RNaseLE wurde in Vakuolen kultivierter *L. esculentum*-Zellen nachgewiesen (Löffler et al. 1992). Bei Phosphatmangel wird das Enzym *de novo* in der Zellkultur von *L. esculentum* synthetisiert und in das Medium sekretiert (Nürnberger et al. 1990). Aufgrund des extrazellulären Vorkommens wurde die RNase mit der Abkürzung LE benannt. In Übereinstimmung mit der extrazellulären und vakuolären Lokalisation der RNaseLE enthält die cDNA eine N-terminale sekretorische Signalsequenz von 25 Aminosäuren (Köck et al. 1995). Neben der cDNA wurde auch die

genomische Sequenz der *RNaseLE* isoliert, sequenziert und ist unter der Acc. Nr. Y17445 in der EMBL-Datenbank zugänglich (Stenzel 1998; Köck et al. 2004). Die kodierende Sequenz des *RNaseLE* Gens wird durch zwei Introns an den Nukleotidpositionen +111 und +267 unterbrochen. Die 5'upstream des Translationsstartpunktes (+1) gelegene potentielle Promotorsequenz der *RNaseLE* umfasst 2668 bp und enthält zwei putative Transkriptionsstartpunkte an Nukleotidposition -47 und -150. Mit Hilfe von Datenbankvergleichen wurde die Promotorsequenz der *RNaseLE* auf Homologien zu potentiellen *cis*-Elementen pflanzlicher Promotoren untersucht. Sie enthält G-Box-ähnliche Sequenzen und Homologien zu *cis*-Elementen, die für eine leitgewebespezifische und phosphatmangelinduzierbare Expression bekannt sind (Stenzel 1998). Die Transkripte der *RNaseLE* akkumulieren in kultivierten Zellen von *L. esculentum* bei extra- und intrazellulärem Phosphatmangel (Köck et al. 1995; Köck et al. 1998). Bei Phosphatmangel könnte die RNaseLE extrazelluläre RNA-Substrate gemeinsam mit akzessorischen nukleolytischen Enzymen hydrolysieren (Nürnberg et al. 1990; Abel et al. 2000). Einerseits können die dabei entstehenden Nukleoside bzw. Nukleobasen in den Salvage-pathway der Pflanze eingehen und andererseits kann entstehendes Phosphat der Phosphatbereitstellung dienen (Nürnberg et al. 1990; Abel et al. 2000). In weiteren Expressionsanalysen konnte gezeigt werden, dass das Transkript der *RNaseLE* auch nach einer Verwundung von Blättern akkumuliert (Lers et al. 1998; Stenzel 1998).

1.2. Die Wundantwort in der Pflanze

Pflanzen können durch fressende Insekten oder mechanische Beanspruchung verwundet werden, wobei meistens die Blätter von einer Verwundung betroffen sind. Die Verwundung stellt Stress für die Pflanze dar. Nach Verwundung werden der Nährstofftransport und Transpirationsstrom unterbrochen. Pathogene können die Pflanze ungehindert passieren und infizieren. Auf diese Stresssituation reagieren Pflanzen mit sofortiger Umstellung ihres Stoffwechsels. Verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren und koordinieren die Abwehrantwort der Pflanze. Das sind (a) bei Insektenfraß und mechanischer Verwundung die systemische Wundantwort, (b) bei Pathogenbefall die systemisch erworbene Resistenz sowie (c) bei Nematodenbefall die induzierte systemische Resistenz. Zwischen diesen Signalwegen gibt es einen „cross-talk“. In Abhängigkeit von der jeweiligen Stresssituation werden (a) Wundantwort-Proteine, (b) „pathogenesis-related“-Proteine sowie (c) allgemeine Stressproteine synthetisiert (Hammond-Kossack und Jones 2000). Wundantwort-Proteine haben Funktionen in der Abwehr, der Wundheilung und der Signaltransduktion. Die Proteine

für die Signaltransduktion, wie z.B. das Prosystemin und die Enzyme der JA-Biosynthese, sind an der Aufrechterhaltung der Wundantwort beteiligt. Zu den Wundheilungsproteinen zählen Peroxidasen oder die Phenylalaninammoniumlyasen, welche an der Reparatur bzw. am Wundverschluss der Zellwand durch Neusynthese und Einlagerung von Suberin, Callose und/oder Lignin beteiligt sind. Abwehrproteine sind Proteinaseinhibitoren (z.B. PIN2), Peptidasen und Polyphenoloxidasen (PPO). Proteinaseinhibitoren inaktivieren die Proteinase von fressenden Insekten. Durch die Polyphenoloxidasen werden pflanzliche Proteine, die eine potentielle Nahrung für ein fressendes Insekt sind, vernetzt. Beide Prozesse erschweren dem Insekt den Zugriff auf die Nahrung. Die meisten Wundantwort-Proteine werden wenige Minuten nach einer Verwundung lokal an der Wundstelle und in den apikal gelegenen, unverwundeten (systemischen) Organen der Pflanze gebildet (Ryan 2000).

Die lokale und systemische Wundantwort wird in *L. esculentum* über den Octadecanoid-Signalweg reguliert, dessen zentrale Signale Systemin und Jasmonsäure (JA) sind (Ryan 2000; Leon et al. 2001; Wasternack und Hause 2002).

Systemin, das primäre Signal nach einer Verwundung, ist ein Peptid, welches aus 18 Aminosäuren besteht (Pearce et al. 1991). Neben dem Systemin, das auch für die Untersuchungen dieser Arbeit eingesetzt wurde, sind in *Lycopersicon* inzwischen drei weitere Systemin-ähnliche Glycopeptide identifiziert worden (Pearce und Ryan 2003). Nach der Verwundung wird Systemin aus seinem Präkursor Prosystemin, einem aus 200 Aminosäuren bestehenden Peptid, gebildet (McGurl und Ryan 1992). Das Prosystemin Gen (*proSys*) wird im Leitgewebe exprimiert (Jacinto et al. 1997) und Prosystemin wird biosynthetisiert, dann in den Apoplast entlassen und dort durch eine noch unbekannt Protease unter Systeminbildung gespalten (Ryan 2000). Anschließend bindet Systemin an einen membrangebundenen Rezeptor von 168 kD (Scheer und Ryan 1999; Scheer und Ryan 2002). Ein Aminosäureaustausch von Threonin gegen Alanin an Position 17 in der Aminosäuresequenz von Systemin (Systemin-17) führt zur Inaktivierung von Systemin (Pearce et al. 1993). Die Rezeptorbindung von Systemin aktiviert, im Gegensatz zur Bindung von Systemin-17, eine Signalkette, die letztendlich zur Synthese von JA führt (Ryan 2000).

Die Signalkaskade beinhaltet folgende Ereignisse: Depolarisierung der Plasmamembran (Moyen und Johannes 1996), Öffnung von Ionenkanälen (Moyen und Johannes 1996; Meindl et al. 1998; Moyen et al. 1998), intrazellulärer Kalziumanstieg (Moyen et al. 1998), Inaktivierung der Plasmamembran-Protonen ATPase (Schaller und Oecking 1999) und die Aktivierung einer MAPK-Kinase (mitogen activated protein kinase) (Stratmann und Ryan 1997). Linolensäure wird aus der Chloroplastenmembran entlassen. Sie ist die Ausgangsverbindung der JA-Biosynthese (Vick und Zimmermann 1983). Die im Chloroplast

lokalisierten Reaktionen der JA-Biosynthese werden durch die Enzyme 13-Lipoxygenase (13-LOX bzw. LOXD), Allenoxidsynthase (AOS) und Allenoxidcyclase (AOC) katalysiert. Die entstehende 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) wird durch die OPDA-Reduktase3 (OPR3) im Peroxisom reduziert und anschließend β -oxidiert, wodurch JA entsteht (Feussner und Wasternack 2002).

Das Phytohormon JA ist eine Cyclopentanonverbindung, die nativ in der (+)-7-iso-JA (3R, 7S) Konfiguration vorkommt. Natürlich vorkommende JA-Derivate sind Jasmonat-Methylester (JAME) sowie Aminosäurekonjugate (Wasternack und Hause 2002). Ein synthetisches Aminosäurekonjugat ist das Ethylindanoylisoleucin-Konjugat (Eth-In) (Koch et al. 1999), welches ein hochaktives JA-Analogon ist (Schüler et al. 2001; Stenzel et al. 2003; Schüler et al. 2004).

Die transiente Bildung von JA erfolgt eine Stunde nach Verwundung oder nach exogener Systemin-Behandlung (Howe et al. 1996; Stenzel et al. 2003). JA, Ethylen (O'Donnell et al. 1996), Abscisinsäure (Herde et al. 1996) und Wasserstoffperoxid (Orozco-Cardenas et al. 2001) führen gemeinsam zur *PIN2* Expression, einem Markergen für die induzierte Wundantwort. Die Wundantwort kann durch eine JA-abhängige *proSys* Expression und eine Systemin-abhängige Aktivierung der AOC im Leitgewebe amplifiziert werden und JA kommt bevorzugt im Leitgewebe vor (Hause et al. 2000; Stenzel et al. 2003). Elicitoren, wie das pilzliche Chitosan, und pflanzliche oder pilzliche Zellwandbestandteile, sogenannte Oligogalakturonide (OGAs) induzieren auch die *PIN2* Expression über den Octadecanoid-Signalweg (Walker-Simmons et al. 1983; Bishop et al. 1984; Doares et al. 1995a). Aufgrund der geringen Mobilität der OGAs und dem Vorkommen einer wundinduzierbaren Polygalakturonidase wurde vermutet, dass diese Komponenten eine *PIN2* Expression direkt an der Wundstelle induzieren (Aldington und Fry 1996; Bergey et al. 1999).

Die *PIN2* Expression kommt lokal und systemisch nach einer Verwundung vor. Bislang konnte das systemische Signal nicht eindeutig identifiziert werden. Die Rolle von Systemin als systemisches Wundsignal wurde anhand von ^{14}C -markiertem Systemin (Pearce et al. 1991; Narvaez-Vasquez et al. 1995) und anhand von Pfropfungsexperimenten mit transgenen *35S::prosystemin sense/antisense*-Pflanzen und Wildtyppflanzen (McGurl et al. 1992; McGurl et al. 1994; Dombrowski et al. 1999) aufgezeigt. Neuere Pfropfungsexperimente von Wildtyppflanzen mit verschiedenen Systemin- und JA-Mutanten, *spr1*, *spr2*, *def1* und *jai-1*, haben demgegenüber belegt, dass auch JA oder andere Oxylipine als systemisches Signal agieren könnten. Die *spr1*-Mutante ist beeinträchtigt in der Systemin-Erkennung und in der Bildung des systemischen Wundsignals (Lee und Howe 2003). Die Mutanten *spr2* und *jai-1* sind in der JA-Biosynthese (Li et al. 2003) und in der JA-Erkennung (Li et al. 2002)

eingeschränkt. Eine weitere Mutante ist *def1*, in der nach einer Verwundung weniger als 30 % JA im Vergleich zum WT akkumuliert (Howe et al. 2000).

Zwischen dem Octadecanoid-Signalweg und dem Pathogen-Signalweg gibt es einen „cross-talk“. Ein „cross-talk“-Regulator ist das Phytohormon Salicylsäure (SA). Die Salicylsäure ist im Pathogen-Signalweg an der Induktion der Expression von *PR* Genen („pathogenesis related“), wie z.B. *PR1*, beteiligt, inhibiert aber in der Wundantwort die Synthese von PIN2 (Doares et al. 1995b).

1.3. Die Phosphatmangelantwort in der Pflanze

Phosphat, die oxidierte Form des Phosphors, spielt eine zentrale Rolle im Metabolismus von Organismen. Das Orthophosphatanion (P_i) ist Bestandteil vieler Biomoleküle wie Nukleinsäuren, Phospholipide, Zuckerphosphate und ist Co-Faktor von Enzymen des Primär- und Sekundärstoffwechsels. Orthophosphat spielt eine wichtige Rolle bei der Energieübertragung durch Bildung energiereicher Ester (z.B. ATP) und es hat eine regulatorische Funktion in Signaltransduktionsketten durch reversible Proteinphosphorylierungen. Phosphat ist essentiell für ein optimales Pflanzenwachstum und wird aktiv über die Wurzel aus dem umgebenden Medium aufgenommen. Phosphat kommt in der Rhizosphäre mit Salzen oder organischen Verbindungen gebunden vor und ist schwer löslich (Marschner 1995). Die Phosphatkonzentration in der Rhizosphäre beträgt zwischen 0,5 und 2 $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-3}$, dagegen beträgt die normale Phosphatkonzentration für lebende Pflanzenzellen zwischen 5 und 20 $\text{mmol} \cdot \text{m}^{-3}$ (Bielecki und Ferguson 1983). Der Phosphatmangel in terrestrischen Ökosystemen ist ein häufiges Problem. Für das Wachstum von Pflanzen ist die Phosphatverfügbarkeit ein limitierender Faktor. Deshalb haben Pflanzen verschiedene Strategien entwickelt, um Phosphat aufzunehmen, zu remobilisieren und das intrazelluläre Phosphatgleichgewicht aufrecht zu erhalten (Raghothama 1999; Abel et al. 2002).

Zu diesen Strategien zählen Änderungen in der Wurzelmorphologie. Das Wurzelwachstum wird verstärkt und es werden mehr Seitenwurzeln und Wurzelhaare gebildet (Lynch 1995; Ma et al. 2001; Williamson et al. 2001; Ma et al. 2003). Die daraus resultierende Vergrößerung der Wurzeloberfläche und die räumliche Ausbreitung der Wurzel in der Rhizosphäre erhöht die Phosphataufnahme der Pflanze. Die meisten Pflanzen können auch über eine symbiotische Beziehung zwischen Wurzel und Pilzen, der Mykorrhiza, Phosphat erwerben. Die Phosphatanreicherung über diese Symbiose wird erleichtert, da die Pilzhyphen eine große Oberfläche haben und Phosphat speichern können (Harrison 1999).

Biochemische Antworten von Pflanzen auf Phosphatmangel dienen der Aufrechterhaltung des cytosolischen Phosphatpools. Die Expressionen von Phosphohydrolasen und Phosphattransportern werden induziert (Raghothama 1999). Das kombinierte Vorkommen von extrazellulären Aktivitäten verschiedener Phosphatasen, Phosphodiesterasen und Ribonukleasen ermöglicht der Pflanze eine effektive Phosphatremobilisierung (Abel et al. 2000). Saure Phosphatasen werden sekretiert, um Phosphat aus organischen Verbindungen freizusetzen (Goldstein et al. 1988a; Goldstein et al. 1988b; Duff et al. 1994). Ribonukleasen und Phosphodiesterasen, wie die 2':3'-zyklische Nukleotidphosphodiesterase (Abel et al. 2000) werden bei Phosphatmangel sekretiert. Die *de novo*-Synthese, Sekretion und Aktivität dieser Enzyme sind Bestandteile eines bei Phosphatmangel aktivierten „rescue system“ in Pflanzen, welches von Goldstein (1988a, b) postuliert wurde. Zu diesem „rescue system“ gehören auch Phosphattransporter, die bei Phosphatmangel aktiviert werden. Die Phosphataufnahme aus der Rhizosphäre ins Cytoplasma der Pflanze erfolgt durch „high-affinity“ Transporter (Raghothama 2000a; Raghothama 2000b), wie z.B. LePT2 aus *L. esculentum* (Liu et al. 1998; Karthikeyan et al. 2002). Der Phosphattransport zu den reproduktiven Organen der Pflanze erfolgt mittels „low-affinity“ Phosphattransporter (Daram et al. 1998).

Obwohl die Expression von phosphatmangelinduzierten Genen intensiv untersucht wird, ist über die regulatorischen Faktoren der Genexpression wenig bekannt. Vermutlich sind Phytohormone an der Regulation der Phosphatmangelantwort beteiligt (Raghothama 1999), da die morphologischen Antworten von Pflanzen auf einen Phosphatmangel teilweise mit den Änderungen der Pflanze übereinstimmen, die nach exogener Hormonbehandlung auftreten (Lynch und Brown 1997). Eine exogene Behandlung mit Auxin und Ethylen bewirkt die gleichen morphologischen Veränderungen in der Wurzelarchitektur, wie ein Phosphatmangel (Bates und Lynch 1996; Lynch und Brown 1997; Schiefelbein 2000; Ma et al. 2001). Auxin ist als Initiator der Seitenwurzelbildung bekannt und induziert die Expression von Genen, z. B. *RSI* (root system inducible-1), die in der frühen Phase der Seitenwurzelbildung in *L. esculentum* exprimiert werden (Tayler und Scheuring 1994). Ethylen bzw. der Ethylen-Präkursor 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) kann eine Verlangsamung des Hauptwurzelwachstums von *A. thaliana* bewirken. Das Gleiche resultiert auch aus einem Phosphatmangel (Ma et al. 2003). Dagegen stimuliert der Ethylen-Biosyntheseinhibitor α -2-Aminoethoxyvinyl-Glycin (AVG) das Wachstum der Hauptwurzel unter Phosphatmangel (Ma et al. 2003). Über die Signaltransduktionen bei Phosphatmangel gibt es bislang nur wenige Erkenntnisse. Cytokinine werden als negative Regulatoren der systemischen

Phosphatmangelantwort vermutet, da Cytokinine die Expression phosphatmangelinduzierter Gene reprimieren können (Martin et al. 2000).

Die Regulation phosphatmangelinduzierter Genexpression erfolgt oft transkriptionell durch Interaktionen von nuklearen Transkriptionsfaktoren (*trans*-Faktor) mit *cis*-Elementen des Promotors. In verschiedenen Bakterien und Hefen ist die transkriptionelle Regulation phosphatmangelinduzierter Genexpression weitgehend aufgeklärt. So wurde in *Saccharomyces cerevisiae* die Regulation bei Phosphatmangel durch Analyse des PHO-Regulons charakterisiert (Lenburg und O'Shea 1996). Die positiv wirkenden *trans*-Faktoren des PHO-Regulons sind PHO4 und PHO2, die an upstream gelegenen *cis*-Elementen in den Promotoren von phosphatmangelinduzierten Genen in *S. cerevisiae* binden und die Genexpression aktivieren. In Abhängigkeit vom exogenen Phosphatgehalt wird die Aktivität von PHO4 durch Phosphorylierung über einen Cyclin-CDK-Komplex (PHO80-PHO85) reguliert. Bei hohen Phosphatkonzentrationen ist PHO4 phosphoryliert und inaktiv. Bei Phosphatmangel wird der PHO80-PHO85-Komplex durch einen CDK-Inhibitor (PHO81) inhibiert und die Phosphorylierung von PHO4 verhindert. Das dephosphorylierte PHO4 ist aktiv (Lenburg und O'Shea 1996). Dieses PHO-Regulon stellt ein Modell für die eukaryontische Regulation phosphatmangelinduzierter Genexpression dar. In Pflanzen gibt es nur wenige Erkenntnisse über die transkriptionelle Regulation phosphatmangelinduzierter Genexpressionen. Die PHO-Bindestelle wurde in Promotoren von pflanzlichen phosphatmangelinduzierbaren Genen, wie auch in der Promotorsequenz der *RNaseLE*, gefunden.

1.4. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit war, Erkenntnisse zur biologischen Funktion der RNaseLE in der Pflanze sowie nach Verwundung und bei Phosphatmangel zu erhalten. Dazu wurde Pflanzenmaterial von *L. esculentum* als Modell genutzt. Die Untersuchungen wurden auf Promotor-, Transkript- und Proteinebene mittels molekularbiologischer und mikroskopischer Methoden durchgeführt. Folgende Aspekte standen im Mittelpunkt der Arbeit:

- organ- und gewebeabhängige Lokalisation der RNaseLE **(i)** in der Pflanze und **(ii)** bei Verwundung und Phosphatmangel

Hierbei wurden mikroskopische Methoden (*in situ*-Hybridisierung und Immuncytochemie) angewandt. Weiterhin wurde eine transgene Linie, die das Reportergen β -Glucuronidase unter Kontrolle des vollständigen RNaseLE Promotors exprimiert, hergestellt und die Promotoraktivität histochemisch bestimmt.

- Regulation der RNaseLE Expression in der Wundantwort und Untersuchungen zur Pathogeninduzierbarkeit

Antworten gaben die Analyse der RNaseLE Expression bzw. die Bestimmung der Promotor- und Enzymaktivität **(i)** nach Verwundung bzw. Pathogeninfektion der Pflanze, **(ii)** in Applikationsversuchen mit verschiedenen Signalwegkomponenten und **(iii)** in verschiedenen transgenen Pflanzen/Mutanten (*spr1*, 35S::*AOCsense/antisense*).

- Suche nach regulatorischen Faktoren der phosphatmangelinduzierten RNaseLE Expression

Dazu wurde **(i)** die RNaseLE Promotorsequenz auf DNA-Protein-Interaktionen bei Phosphatmangel und **(ii)** die Hormonabhängigkeit der RNaseLE Expression untersucht.

2. Abkürzungsverzeichnis

ABA	Abscisinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
ACO	ACC-Oxidase
A	Adenin
AG	Arbeitsgruppe
Amp ^R	Ampicillinresistenz
AOC	Allenoxidcyclase
AOCas	35S::AOC <i>antisense</i> -Pflanzen
AOCs	35S::AOC <i>sense</i> -Pflanzen
AOS	Allenoxidsynthase
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
<i>AtIPS1</i>	Gen aus <i>A. thaliana</i> , Familie putativer Riboregulatoren
ATP	Adenosintriphosphat
AtPT2	Phosphattransporter aus <i>A. thaliana</i>
AVG	α -2-Aminoethoxyvinyl-Glycin
BAP	6-Benzylaminopurin
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	(bovine serum albumine) Rinderserumalbumin
C	Cytosin
CaM	Calmodulin
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
CAS	(conserved active-site segment)
CDI	CathepsinD-Inhibitor
CDK	Cyclin abhängige Kinasen
cDNA	komplementäre DNA
cfu	Kolonie bildende Einheit
Ci	Curie
CPI	Metallocoarboxypeptidaseinhibitor
CTP	Cytosintriphosphat
cv.	cultivar
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DAPI	4'6-Diamidino-2-Phenylindol
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
<i>def1</i>	(<i>defenseless</i>) beeinträchtigt in der Abwehrgen Expression
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Reticulum
Eth-In	Ethylindanoylisooleucinkonjugat
FAD7	ω -Fettsäure-Desaturase aus <i>A. thaliana</i>
G	Guanin
Glc	Glukose

Glco	Glukonat
Glu	Glutaminsäure
GOD	Glukoseoxidase
GRP1.8	Glycin-reiches Protein 1.8 aus <i>Phaseolus sativa</i>
GUS	β-Glucuronidase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
HR	hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
<i>jail</i>	JA insensitive Mutante
JAME	Jasmonsäure-Methylester
LePT1	Phosphattransporter 1 aus <i>L. esculentum</i>
LePT2	Phosphattransporter 2 aus <i>L. esculentum</i>
LOXD	Lipoxygenase
Lys	Lysin
MAPK-Kinase	(mitogen activated protein kinase)
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure
mRNA	Boten RNA
MUG	4-Methylumbelliferylglucuronid
NAA	Naphthalenessigsäure
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NMP	Nukleotidmonophosphat
NTES	NaCl-Tris-EDTA-SDS-Puffer
OD	optische Dichte
OGAs	Oligogalakturonide
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure
P-/P+	Phosphatmangel/versorgung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase aus <i>Phaseolus sativa</i>
PBS	(phosphate buffered saline) Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PHO-Regulon	Phosphatase-Regulon in <i>S. cerevisiae</i>
PHO2/4	Transkriptionsfaktoren von PHO5
PHO5	saure Phosphatase
PHO80	Cyclin-Inhibitor
PHO81	CDK-Inhibitor
PHO85	Cyclin abhängige Kinase
Pi	Orthophosphatanion
PIN (1 bzw. 2)	Proteinaseinhibitor (1 bzw. 2)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase aus <i>Oryza sativa</i>
PPO	Polyphenoloxidase
<i>PR1</i>	(pathogenese related) Pathogenese-induziertes Gen
<i>ProSys</i>	Prosystemin
PSL	photostimulierte Lumineszenz
PVY	Kartoffelvirus Y
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNaseLE	RNase <i>Lycopersicon</i> extrazellulär

RnaseLV (1/2 bzw. 3)	RNase <i>Lycopersicon</i> vakuolär (1/2 bzw. 3)
RNaseLX	RNase <i>Lycopersicon</i> ER-lokalisiert
RNaseNE	RNase aus <i>Nicotiana glauca</i>
RNaseNW	RNase aus <i>Nicotiana glutinosa</i>
RnaseRh	RNase aus <i>Rhizopus niveus</i>
RNaseT2	RNase aus <i>Aspergillus oryzae</i>
RNS1	RNase aus <i>A. thaliana</i> , strukturell zur RNaseLE homolog
RNS2	RNase aus <i>A. thaliana</i> , strukturell zur RNaseLX homolog
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
<i>RSI</i>	(root system inducible-1) Markergen für Seitenwurzelbildung
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SaPIN2a	Proteinaseinhibitor aus <i>Solanum americanum</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
S-RNasen	(self-incompatibility factors with RNase activity)
snRNA	(small nuclear RNA)
<i>spr</i>	(suppressor of prosystemin-mediated response)
<i>spr1</i>	Systemin insensitive Mutante
<i>spr2</i>	JA-Biosynthese Mutante
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T _m	Schmelztemperatur
TMV	Tabakmosaikvirus
TpoxN1	Peroxidase aus <i>Nicotiana tabacum</i>
<i>TPSII</i>	phosphatmangelinduzierbares Gen aus <i>L. esculentum</i>
Tris	2-Amino-2-Hydroxymethylpropan-1,3-diol
tRNA	Transfer RNA
Trp	Tryptophan
<i>Tw1</i>	Gen aus <i>L. esculentum</i> , homolog zu einer Glucosyltransferase
UBI	Ubiquitin
V	Volumenteile
v/v	Volumen/Volumen
WIPK	wundinduzierte Proteinkinase
Wo.	Woche
WT	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Glucuronid
ZeHB3	Homeoboxprotein aus <i>Zinnia elegans</i>

3. Material und Methoden

3.1. Pflanzenmaterial und -anzucht

Die Tomatenpflanzen (Wildtyp) *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus, cv. Castlemart sowie die Mutante *spr1* (cv. Castlemart; Prof. G. Howe, Michigan State University, Department of Plant Biology), die transgene PromLE1::*uidA*-Linie cv. Lukullus sowie die transgenen 35S::*AOCsense/antisense*-Linien cv. Lukullus (Prof. C. Wasternack, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Arbeitsgruppe Jasmonat-Wirkungsweise), welche die cDNA (full length) der Tomaten-AOC in *sense* und *antisense* Orientierung unter Kontrolle des 35S-Promotors enthalten (Stenzel et al. 2003), wurden im Gewächshaus bei einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h bei 23 °C und 12 h bei 18 °C unter Langtagbelichtung 16 h mit 500 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (Philips SON, 400 W) und 55 % Luftfeuchtigkeit angezogen. Für alle Versuche wurden 4 Wo. alte Pflanzen verwendet, wenn es nicht anders vermerkt worden ist.

Für die Versuche mit Keimlingen wurden die Samen von *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus und PromLE1::*uidA*-Pflanzen cv. Lukullus in 4 % Natriumhypochlorid-Lösung sterilisiert (10 min in Natriumhypochlorid-Lösung, danach 3 x 10 min in ddH₂O) und anschließend 72 h bei 28 °C, im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier inkubiert. 3 d alte Keimlinge wurden für die mikroskopischen Analysen (Kap. 4.1.2.3) verwendet. Für alle weiteren Untersuchungen (Kap. 4.2.4./5.) wurden diese Keimlinge in Hoagland-Minerallösung bei 22 °C, 16 h Licht und 8 h Dunkelheit 14 d weiter kultiviert.

3.2. Untersuchungen zu Pathogen-Pflanze-Interaktionen und Elicitorwirkung

Die *Xanthomonas*-Stämme wurden auf NYG-Agar mit 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rifampicin angezogen und bei einer OD₆₀₀ von 0,4 ($5 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) in 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Die Infektion der Tomatenblätter (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) erfolgte mittels Vakuuminfiltration 10 min bei 100 mbar, 100 mL Bakteriensuspension pro Blatt. Zur Kontrolle wurden 10 mM MgCl₂ infiltriert. Die Blätter wurden 24 h in ddH₂O bei 26 °C und 80 % relativer Luftfeuchte im Dunkeln inkubiert. Die Anzucht und Infiltration der Bakterienstämme und anschließende Isolation der Gesamt-RNA wurde freundlicherweise von Jörg Schurath (AG Dr. M. Köck Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie, Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Frau Dr. S. Rosahl (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr) hat dankenswerterweise die Tomatenblätter mit dem Oomycet *Phytophthora infestans* infiziert. Die Inokulation erfolgte durch Auftropfen (10 x 10 µL Tropfen) einer Sporensuspension (Sporendichte/ddH₂O: 1,25 x 10⁵ * mL⁻¹) auf die Blattunterseiten (*Lycopersicon esculentum* cv. Moneymaker). Die Blätter wurden danach auf feuchtem Filterpapier in verschlossenen Petrischalen bei 18 °C und 16 h Licht (200 µE * m⁻² * s⁻¹) bzw. 8 h Dunkelheit inkubiert und es wurden bis zu 10 d Proben für die Northernblot-Hybridisierungen genommen. Die Isolation der Gesamt-RNA wurde freundlicherweise von Jörg Schurath (AG Dr. M. Köck) durchgeführt.

Für die Infiltration von Chitosan (Mauch et al. 1988) wurden 0,1 % (w/v) Chitosan in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0 bzw. 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0 als Kontrolle verwendet. Jeweils 1 mL Chitosan-Lösung pro Blatt wurde mit einer Einmalspritze (B/Braun, Omnifix®-F) in Blätter von 4 Wo. alten *L. esculentum*-Pflanzen cv. Lukullus infiltriert. Die Oligogalakturonide (OGAs; Prof. C. Ryan, Washington State University, Institute of Biological Chemistry) wurden in ddH₂O gelöst (250 und 500 µg * mL⁻¹). Auf diese Lösungen wurden frisch abgeschnittene Blätter (50 mL pro Blatt) in Petrischalen flotiert, so dass die Flüssigkeit über die Petiole und Blattoberfläche aufgenommen werden konnte. Die Petrischalen wurden unter Dauerlicht von 200 µE * m⁻² * s⁻¹ (Leuchtstofflampen, L58W/031) bei 22 °C gelagert. Anschließend wurden Proben für die Northernblot-Hybridisierungen zu den angegebenen Zeiten genommen, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. In gleicher Art und Weise wurden auch alle anderen Proben behandelt.

3.3. Untersuchungen mit Verwundung und Applikation

Um eine Verwundung der Pflanze zu erzeugen, wurden Blätter an intakten Tomatenpflanzen mit der gerippten Oberfläche einer Pinzette im Abstand von 2 mm gequetscht. Die verwundeten (lokal) und unverwundeten, distalen (systemisch) Blätter wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten abgeschnitten. Für alle Applikationsversuche wurden frisch abgeschnittene Blätter auf die jeweiligen Lösungen (50 mL pro Blatt) in Petrischalen flotiert, so dass die Flüssigkeit über die Petiole und Blattoberfläche aufgenommen werden konnte. Folgende Lösungen wurden verwendet:

- 5 pM Systemin bzw. 5 pM Systemin-17 (Prof. C. Wasternack, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Arbeitsgruppe Jasmonat-Wirkungsweise)
- 50 µM JAME; 100 µM ABA und 50 µM Eth-In (Prof. C. Wasternack)
- 50 µM ACC (Sigma); 10 µM AVG (Sigma)
- 40 mM Pyridin (Roth); 20 mM Imidazol (Roth)
- 50 µM Glc (Merk) bzw. 50 µM Glco (Sigma) in 10 mM Phosphatpuffer pH 6,0 sowie 2,5 U * mL⁻¹ GOD (Sigma) bzw. 2,5 U * mL⁻¹ GOD + 50 µM Glc
- 1, 10 und 100 µM SA (Roth)
- 1 µM Kinetin (Merck); 0,5 µM NAA (Sigma); 100 µM Spermin (Merck) bzw. 100 µM Spermidin (Merck)

Die Petrischalen wurden unter Dauerlicht 200 µE * m⁻² * s⁻¹ (Leuchtstofflampen, L58W/031) bei 22 °C gelagert. Die Behandlung mit 20 mM Ethepon (Chlorethylphosphonsäure (Sigma)) erfolgte durch Besprühen von 3 Wo. alten Gewächshauspflanzen im Abstand von 30 cm.

3.4. Untersuchungen mit Applikation bei Phosphatmangel

Für alle Versuche zu diesem Komplex wurden 14 d alte *L. esculentum*-Keimlinge cv. Lukullus verwendet, die wie unter Kap. 3.1. beschrieben, kultiviert wurden. Die Wurzeln, Hypokotyle bzw. Kotyledonen wurden mittels Rasierklinge separiert, unverzüglich in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80 °C gelagert.

Der Einfluss von Phytohormonen auf die *RNaseLE* Expression (Kap. 4.2.4.2.) wurde durch Zugabe der jeweiligen Hormonlösungen in die (P-/P+)-Minerallösung, welche 7 d nach der Kultivierung erfolgte, untersucht. Folgende Hormonlösungen wurden appliziert:

- 0,5 µM 2,4 D (Serva); 0,5 µM NAA (Sigma)
- 0,1 bzw. 1 und 10 µM Kinetin (Merck); 1 µM BAP (Sigma)
- 50 µM ACC (Sigma); 10 µM AVG (Sigma)

Von den so behandelten 14 d alten Keimlingen wurden die Wurzeln für Northernblot-Hybridisierungen (Kap. 3.7.1.) verwendet.

3.5. Erzeugung transgener PromLE1::*uidA*-Linien

Die putativ vollständige *RNaseLE* Promotorsequenz von 2,6 kbp wurde über PCR in den pCR2.1-TOPO-Vektor kloniert. Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 100 ng Template-DNA

(pgLE05'), 1 x PCR-Puffer (Eurogentech), 1,5 mM MgCl₂ (Eurogentech), 200 μM dNTP (Fermentas) und je 25 pmol der beiden sequenzspezifischen Primer:

LE/PI- H: 5'-CGAAGCTTCTCACTGCAAATGTGTGGTAT-3'

LE/P- S: 5'-GGCTGAATTAGAAGCCCGGGTTTTCTTG-3'

Die PCR-Reaktion erfolgte im Thrio-Thermoblock (Biometra) über 5 min bei 95 °C. Die anschließende Reaktion wurde durch Zugabe von 1 U Taq-Polymerase (Eurogentech) gestartet. Folgende Amplifizierungszyklen wurden gewählt:

5 Zyklen: 30 sec bei 95 °C (Denaturierung), 1 min bei 55 °C (Primerannealing), 1 min bei 72 °C (Primerextension) und 25 Zyklen: 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 60 °C, 1 min bei 72 °C und 15 sec bei 72 °C.

Die Annealingtemperaturen für alle PCR-Reaktionen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_m[^\circ\text{C}] = 4 * GC + 2 * AT$$

Nach Auftrennung der Fragmente in 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer und 0,5 μg * mL⁻¹ Ethidiumbromid 1 h bei 50 mA erfolgte die Reinigung mittels Gelextraktion (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche). Die anschließende Klonierung erfolgte in den pCR2.1-TOPO-Vektor (TOPO-Cloning[®]-Kit; Invitrogen) mit nachfolgender Selektion rekombinanter Klone durch α-Komplementation (Sambrook et al. 1989). Die weißen Kolonien wurden in 3 mL LB-Medium und 100 μg * mL⁻¹ Ampicillin 16 h bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels QIAGEN-Plasmid-Midi-Kit nach den Angaben des Herstellers isoliert. Aus diesem Plasmid wurde die *RNaseLE* Promotorsequenz mit *HindIII* / *SmaI* restringiert und mittels Gelextraktion (Qiaex-Agarosegel-Extraktions-Kit; QIAGEN) gereinigt. Das gereinigte Insert wurde mit *HindIII* / *SmaI* in den pBI101-Vektor vor das *GUS* Gen kloniert und in DH5α (*E. coli*) transformiert (Sambrook et al. 1989). Die *RNaseLE* Promotorsequenz wurde für die stabile Transformation von Tomate in *Agrobacterium tumefaciens* transformiert.

3.5.1. Transformation in *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation in *A. tumefaciens* (Stamm LBA 4404) erfolgte mittels der Gefriertau-Tau-Methode nach Höfgen und Willmitzer (1988).

3.5.2. Transformation in Tomate

Die stabile Agrobakterium vermittelte Transformation in die Tomatenpflanzen erfolgte nach Ling et al. (1998). Kotyledonen 12 d alter *L. esculentum*-Keimlinge cv. Lukullus wurden in 3 mm x 3 mm große Stückchen geschnitten und auf Zwischenmedium, das mit einer Tabak-Feeder-Kultur beschichtet worden ist, 3 d bei 22 °C und 16 h Licht / 8 h Dunkelheit in einer Klimakammer kultiviert. Anschließend wurden die Kotyledonenstückchen in der *Agrobacterium*-Suspensionskultur ($OD_{600} \approx 0,3$ in MS-OH mit 3 % (w/v) Saccharose) für 30 min bei RT geschüttelt und für weitere 3 d auf Zwischenmedium inkubiert. Die weitere Kultivierung der Kotyledonen erfolgte auf Selektionsmedium, das alle 3 Wo. erneuert wurde. Die sich bildenden Kalli wurden in Wurzelinduktionsmedium kultiviert. Nur die transformierten, kanamycinresistenten Pflanzen bildeten Wurzeln.

3.5.3. Nachweis der Kopienzahl mittels Southernblot-Hybridisierung

3.5.3.1. Isolierung und Restriktion genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA wurde nach Dellaporta et al. (1983) durchgeführt. Für die Isolation wurden Blätter der verschiedenen PromLE1::*uidA*-Tomatenlinien verwendet. Die Konzentration an genomischer DNA wurde spektrophotometrisch (Ultrospec 3300; Pharmacia) bei 260 nm bestimmt.

Die Restriktion genomischer DNA erfolgte mit einem hochkonzentrierten Restriktionsenzym (*Xba*I für *GUS*-Kopienzahlbestimmung) unter Verwendung von $2 \text{ U} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ DNA in 200 μL für 16 h bei 37 °C. Die DNA wurde mit 0,7 V Isopropanol gefällt und in ddH₂O aufgenommen.

3.5.3.2. Elektrophoretische DNA-Auftrennung und Southernblot-Hybridisierung

Die Southernblot-Hybridisierung erfolgte nach dem Standardprotokoll von Sambrook et al. (1989). Jeweils 60 μg restringierte genomische DNA wurden in DNA-Probenpuffer (1:10 (v/v)) aufgenommen und in einem 0,8 % (w/v) Agarose-TBE-Gel, mit 1 x TBE-Puffer, elektrophoretisch bei $1 \text{ Volt} \cdot \text{cm}^{-1}$ Elektrodenabstand, 16 h aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in 0,25 M HCl, für 30 min in DNA-

Denaturierungslösung und für 30 min in DNA-Neutralisierungslösung inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne[®]B, 0,45 µm; PALL Gelman Laboratory) über einen Kapillarblot (Sambrook et al. 1989) transferiert und anschließend durch zweimaliges crosslinking (Stratalinker[®] UV Crosslinker; Stratagene) fixiert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer radioaktiv markierten cDNA des *GUS* Gens. Die autoradiografische Auswertung wurde, wie unter Kap. 3.7.1.3. beschrieben, durchgeführt.

3.6. Quantitativer und histochemischer Nachweis der Promotoraktivität

3.6.1. Fluorometrische Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität

Für die Analyse wurden PromLE1::*uidA*-Pflanzen verwendet (Kap. 3.5.). Die Reaktionsgeschwindigkeit der β -Glucuronidase, welche die Reaktion von 4-Methylumbelliferylglucuronid (MUG) zu Methylumbelliferon (7-hydroxy-4-methylcoumarin) katalysiert, kann durch Fluoreszenzmessung des Produktes ermittelt werden (Jefferson et al. 1987).

Das gemörserte Pflanzenmaterial wurde in GUS-Extraktionspuffer im Verhältnis 1:1,5 (w/v) für 1 min mit dem Vortexer gemischt und danach 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Testansatz enthielt 4 µL Probe ad 200 µL GUS-Extraktionspuffer. Durch Zugabe des Substrats, 1 mM MUG (Duchefa), wurde die Reaktion bei 37 °C gestartet und alle 5 min mit 800 µL 0,2 M Na₂CO₃ abgestoppt. Die anschließende photometrische Messung (Lumineszenz-Spektrophotometer; LS 50 Perkin Elmer) erfolgte bei 365 nm Anregungswellenlänge und 455 nm Emissionswellenlänge in 1 cm Küvetten. Aus der Kinetik über 60 min wurden die Umsatzgeschwindigkeiten $\text{dA} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt und mit Hilfe einer Kalibrierungskurve im Bereich von 0,1 – 5 µM Methylumbelliferon bestimmt.

3.6.2. Histochemische Lokalisation der β -Glucuronidase-Aktivität

Die histochemische Lokalisation der β -Glucuronidase-Aktivität in den jeweiligen Pflanzenteilen wurde nach Blume und Grierson (1997) durchgeführt. Pflanzenteile von PromLE1::*uidA*-Tomatenpflanzen wurden entsprechend portioniert und 5 min in 50 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von 0,3 % (v/v) Formaldehyd, 1 mM EDTA unter Vakuum infiltriert und anschließend 30 min darin inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Pflanzenmaterial dreimal mit dem gleichen Puffer ohne Zusatz von Formaldehyd

gewaschen. Die Färbung erfolgte in Abhängigkeit vom Pflanzenorgan mit unterschiedlichen Puffern. Der Basispuffer enthielt 100 mM Natrium-Phosphatpuffer pH 7,0 unter Zusatz von 0,5 mM X-Gluc (Duchefa), 1 mM EDTA und je 0,5 mM $K_3[Fe(CN)_6]$ und $K_4[Fe(CN)_6]$. Für das Färben der jeweiligen Pflanzenteile wurden folgende Bestandteile dem Basispuffer hinzugefügt: Stengel, Blüten 0,05 % (v/v) Triton X-100; Blätter, Wurzeln 0,5 % (v/v) Triton X-100, 50 mM NaCl und Keimlinge 0,2 % (v/v) Triton X-100, 50 mM NaCl. Die Pflanzenteile wurden mit den spezifischen Färbelösungen 5 min infiltriert und 16 h bei 37 °C inkubiert. Die Färbung wurde 2-10 h bei 4 °C in 45 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Formaldehyd und 5 % (v/v) Essigsäure fixiert. Das darauf folgende Entfärben erfolgte mit 96 % Ethanol.

3.7. Molekulabiologischer und mikroskopischer Transkriptnachweis

3.7.1. Nachweis von mRNA mittels Northernblot-Hybridisierung

3.7.1.1. RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde eine modifizierte Form des von Reinbothe et al. (1992) beschriebenen Protokolls genutzt. Der Zellaufschluss erfolgte durch Mörsern des Pflanzenmaterials mittels flüssigem Stickstoff und Zugabe von 1:2 (w/v) NTES-Puffer. Die Proteine wurden in drei aufeinander folgenden Extraktionsschritten mit Phenol/Chloroform (1:1 (v/v)) von den Nukleinsäuren getrennt. Die jeweiligen Oberphasen wurden mit einem Phenol-Chloroformgemisch im Verhältnis 1:1 (v/v) mit dem Vortexer 5 min gemischt und 10 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Die Nukleinsäuren der Oberphase wurden mit 0,3 M Natriumacetat-Puffer pH 5,2 und 3 Vol 96 %igem EtOH 30 min gefällt. Anschließend wurden mRNA und rRNA mit 2 M LiCl über 16 h bei 4 °C gefällt.

3.7.1.2. Elektrophoretische RNA-Auftrennung und Kapillarblot

Die elektrophoretische Auftrennung der Ribonukleinsäuren erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mittels 1,5 % (w/v) Agarose und 3 % (v/v) Formaldehyd in MOPS-Puffer. Zur Proben-denaturierung wurden 20 µg Gesamt-RNA in 10 % (v/v) MOPS-Puffer, 50 % (v/v) Formamid und 16 % (v/v) Formaldehyd in einem Gesamtvolumen von 25 µL 15 min bei 65 °C denaturiert. Die Proben wurden mit 12 % (v/v) RNA-Probenpuffer und 1,5 µg * µL⁻¹ Ethidiumbromid versetzt (Sambrook et al. 1989). In allen Northernblot-Hybridisierungen dieser Arbeit wurden 20 µg Gesamt-RNA pro Spur aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte

bei $4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ Elektrodenabstand in $1 \times$ MOPS-Puffer. Anschließend wurde das Gel in $10 \times$ SSC-Puffer präequilibriert. Die Nukleinsäuren wurden auf eine positiv geladene Nylonmembran (Biodyne[®]B, $0,45 \mu\text{m}$; PALL Gelman Laboratory) über einen Kapillarblot (Sambrook et al. 1989) transferiert und anschließend durch zweimaliges crosslinking (Stratalinker[®] UV Crosslinker; Stratagene) fixiert.

3.7.1.3. Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Als Hybridisierungssonden wurden radioaktiv markierte Vollängen- bzw. cDNA-Fragmente der *RNaseLE*, *PIN2*, *AOC*, *LePT2*, *RSI*, *ACO*, *PR1*, *UBI* und 18S rRNA verwendet. Die *RNaseLE* wurde aus dem pRLE-Plasmid (QIAGEN-Plasmid-Midi-Kit; QIAGEN) durch *EcoRI* / *XhoI* heraus gespalten und über Gelextraktion (Qiaex-Agarosegel-Extraktions-Kit; QIAGEN) gereinigt. Die Plasmidisolation und Gelextraktion wurde genauso für alle anderen Sonden angewandt. Die DNA-Fragmente von *PIN2* und *AOC* wurden durch Restriktionsspaltung mit *XbaI* und *EcoRI* aus den jeweiligen Bluescript-Vektoren (vgl. Kap. 3.10.3.) gewonnen. Die *LePT2* Sequenz wurde über PCR aus dem pCR2.1-Vektor (pLePT2) amplifiziert. Es wurden die PCR-Bedingungen, wie unter Kap. 3.5. beschrieben, eingehalten. Folgende sequenzspezifische Primer wurden eingesetzt:

LePT2a 5'-GGCATTATGGCTGTGGGGGATAATG-3'

LePT2b 5'-CTCATGCTTCTCCAGTTATAGTTTC-3'

Die Überprüfung der *LePT2* Sequenz erfolgte über Sequenzierung (Cycle Sequencing Big Dye Terminator; Technic Applied Biosystems) nach dem Standardprotokoll des Herstellers durch Dr. A. Peterson (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Gentechnik). Zur Erzeugung der *RSI*-cDNA wurde Gesamt-RNA aus Wurzeln 14 d alter Keimlinge (Anzucht, siehe Kap. 3.1.), die mit $5 \mu\text{M}$ NAA 24 h inkubiert wurden, isoliert (Kap. 3.7.1.1.). Anschließend wurde die mRNA mittels PolyATtract mRNA[®] Isolation Systems (Promega) isoliert und davon die cDNA mittels RevertAid[™]H Minus First Strand cDNA SynthesisKit (MBI Fermentas) synthetisiert. Diese cDNA wurde als Template für die darauf folgende PCR (Bedingungen, wie unter 3.5. beschrieben) eingesetzt. Folgende sequenzspezifische Primer wurden verwendet:

RSIA 5'-ATGGCAAAGAGTGGTTACAATGC-3'

RSIB 5'-GGGCATTTAGGTTTTAGGTTTTCTTCTTG-3'

Die Fragmente wurden in $1,5 \%$ (w/v) Agarose in TAE-Puffer und $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid für 1 h bei 50 mA elektrophoretisch getrennt, danach mittels Gelextraktion

(High Pure PCR Product Purification Kit; Roche) gereinigt und anschließend in den pCR2.1-TOPO-Vektor (TOPO-Cloning[®]-Kit; Invitrogen) kloniert. Darauf erfolgte die Selektion rekombinanter Klone durch α -Komplementation (Sambrook et al. 1989). Die Vollständigkeit der Sequenz wurde mittels Sequenzierung (Dr. A. Peterson; Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Gentechnik) überprüft. Für die weitere Verwendung wurde das *RSI*-Insert mit *EcoRI* heraus gespalten. Um das *ACO*-Insert zu erhalten, wurde der Vektor gGTOM13 (vgl. Kap. 3.10.3.) mit *HindIII* / *BamHI* restringiert. Die *PR1*-Sonde (Schaller et al. 2000) wurde freundlicherweise als radioaktiv markierte cDNA von Frau Dr. M. Köck (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Angewandte biowissenschaftliche Forschung/Isotopenlabor, AG Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie) zur Verfügung gestellt. Für die Kontrollhybridisierungen bzw. Beladungskontrollen mit der 18S rRNA bzw. *UBI* wurden die Vektoren pBD18 bzw. pUBI3 mit *EcoRI* bzw. *EcoRI* / *XhoI* restringiert. Alle DNA-Sonden wurden mittels Nick-Translation (Nick Translation Kit; Roche) radioaktiv mit α -³²P dCTP markiert und über Sephadex-Säulen (Nick[™] Columns; Amersham) gereinigt.

Für die Prähybridisierung wurde die Nylonmembran in 5 x Denhardt, 0,1 % (v/v) SDS und 10 mg * mL⁻¹ DNA von Salmon Testes (Sigma) in 5 x SSC-Puffer bei 65 °C für 2 h inkubiert. Die darauf folgende Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden erfolgte bei 65 °C für 16 h. Anschließend wurde die Membran 2 x 15 min bei 65 °C mit 2 x SSC-Puffer und 0,1 % (v/v) SDS bzw. mit 1 x SSC-Puffer und 0,1 % (v/v) SDS gewaschen (Sambrook et al. 1989). Die Membran wurde auf Imagerplatten (Typ BAS 2040 S) ca. 4 h exponiert und am Phosphorimager 1500 (Fuji/Raytest; Schraubenhardt) autoradiografisch ausgewertet. Die quantitative Analyse erfolgte mit dem Auswertungsprogramm TINA 2,0 (Raytest). Zur Korrektur von Variationen beim Probenauftrag wurden die gemessenen Intensitätswerte (PSL) jeweils durch das Signal der Kontrollhybridisierung mit den DNA-Sonden 18S rRNA bzw. *UBI* dividiert.

3.7.2. Mikroskopischer mRNA Nachweis über *in situ*-Hybridisierung

3.7.2.1. Fixierung und Einbettung in Paraffin

Für die Paraffineinbettung wurde das Pflanzenmaterial portioniert und in 3 % (v/v) PFA (Serva) in PBS-Puffer 2 h fixiert. Nach dem Waschen (2 x 15 min) in PBS-Puffer erfolgte die Dehydratisierung des Gewebes je 30 min mit aufsteigender Ethanolreihe. Danach wurde das

Gewebe 3 x 45 min in Ethanol:Rotihistol im Verhältnis (v/v) 3:1, 1:1 und 1:3 gewaschen und anschließend 2 x 45 min in Rotihistol inkubiert. Die Infiltration des Gewebes erfolgte sukzessiv mit N + 1 Tropfen Paraplast je 15 min bei 60 °C unter 3 x Wechsel der Lösung. Danach wurde das Pflanzengewebe 2 x 8 h in reinem Paraffin inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung des Pflanzengewebes in Paraffin.

3.7.2.2. Acridin-Orange Färbung

Paraffinschnitte wurden für die Acridin-Orange Färbung verwendet und mit 0,2 M HCl-Acetat Puffer pH 2,1 präequilibriert. Nach 30 min Färbung mit 0,05 % Acridin-Orange in 0,2 M HCl-Acetat Puffer pH 2,1 erfolgte ein Waschen über 15 min in Veronal-Acetat Puffer pH 7,8. Im Anschluss daran wurden die Schnitte mittels Glycerol:PBS (1:4) konserviert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit dem Zeiss „Axioplan“ Epifluoreszenzmikroskop, Filterkombination BP 450-490 // FT 510 // LP 515 und einer CCD3 Video Kamera.

3.7.2.3. *In situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin markierten RNA-Einzelstrangsonden

Die *in situ*-Hybridisierung wurde nach Leitsch et al. (1999) modifiziert durch Weglassen des Dextransulfates im Hybridisierungspuffer und durch Änderungen der Stringenz beim Waschen. Es wurden 10 µm dicke Paraffinschnitte (Microm Rotationsmikrotom; Micram Laborgeräte GmbH) auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger fixiert und das Paraffin durch je 5 min Waschen mit Roticlear (Roth), Roticlear:Propanol 1:1 (v/v), Propanol und Propanol:Ethanol 1:1 (v/v) entfernt. Mittels absteigender Ethanolreihe erfolgte dann die Entwässerung des Gewebes. Nach 2 x 5 min Waschen in ddH₂O erfolgte die Inaktivierung von Nucleasen über 30 min mit 0,12 U * mL⁻¹ ProteinaseK (Roche Diagnostics) in Pronase-Puffer bei 37 °C. Anschließend wurden die Schnitte 5 min in ddH₂O gewaschen, dann 10 min in 10 mM Tris/HCl pH 8,0 und 30 min in Tris/HCl mit 1 % (w/v) BSA (Roth) inkubiert. Nach 2 x 5 min Waschen in ddH₂O erfolgte die Acetylierung 3 min in 0,1 M Triethanolamin pH 8,0 und 10 min in Triethanolamin (Roth) mit 0,25 % (v/v) Essigsäureanhydrid (Merck). Die Schnitte wurden danach 5 min in ddH₂O gewaschen und mit aufsteigender Ethanolreihe rehydratisiert. Anschließend wurden die luftgetrockneten Schnitte in Hybridisierungspuffer (50 % Formamid, 4 x SSC-Puffer, 150 µg * mL⁻¹ tRNA (Merck), 0,5 % Blocking reagent

(Roche Diagnostics), $40 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNase Inhibitor (Promega) für 1 h bei 45°C prähybridisiert.

Die Herstellung der *RNaseLE* Einzelstrangsonden erfolgte über *in vitro* Transkription mittels DIG-RNA-Labeling-Kit (Roche Diagnostics) nach den Angaben des Herstellers. Das Plasmid pRLE (Köck et al. 1995), welches die *RNaseLE* cDNA enthält, wurde mit den Restriktionsenzymen (Fermentas) *XhoI* (sense) und *XbaI* (antisense) linearisiert. Die Hybridisierung erfolgte mit 10 ng denaturierter *RNaseLEantisense* RNA-Einzelstrangsonde im Hybridisierungspuffer 16 h bei 45°C in einer Feuchtkammer. Die gewählte Sondenkonzentration erwies sich als optimal für eine spezifische Signalgebung. Die Kontrollhybridisierung wurde mit der *RNaseLEsense* RNA-Einzelstrangsonde durchgeführt. Anschließend wurde 3 x 10 min bei 45°C mit folgender Stringenz: 50 % (v/v) Formamid in 4 x SSC-Puffer, 4 x SSC-Puffer und 0,1 x SSC-Puffer gewaschen. Vor dem letzten Waschschrift erfolgte die Behandlung mit $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ RNaseA (Roche Diagnostics) bei 37°C für 30 min in NTE-Puffer. Die RNA-Detektion erfolgte über einen Alkalische-Phosphatase gekoppelten Immunoassay. Die Schnitte wurden 5 min in TBS-Puffer inkubiert und die Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte 1 h in Blockierungslösung (0,5 % Blocking reagent in TBS-Puffer). Anschließend wurden die Schnitte 90 min mit dem Anti-DIG-Konjugat (Roche Diagnostics), welches 1: 2000 (v/v) in Blockierungslösung mit 1 % BSA gelöst wurde, behandelt. Danach wurden die Schnitte 3 x 5 min in TBS-Puffer gewaschen. Die Reaktion der Alkalischen-Phosphatase erfolgte durch Zugabe von Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP) bei 37°C bis zu 4 h, wobei ein violett-gefärbtes Produkt entsteht. Die Reaktion wurde durch Zugabe von TE-Puffer pH 8,0 abgestoppt. Die Schnitte wurden anschließend in Glycerol/PBS (1:4) konserviert und mit dem Zeiss „Axioplan“ Lichtmikroskop, welches mit einer CCD3 Video Kamera gekoppelt wurde, ausgewertet.

3.8. Quantitativer und qualitativer Proteinnachweis

3.8.1. Nachweis von RNase-Aktivität

3.8.1.1. Nichtdenaturierende Proteinisolierung

Mit flüssigem Stickstoff gemörsertes Pflanzenmaterial wurde mit 1:1 (w/v) Extraktionspuffer 1 min mit dem Vortexer gemischt und 10 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der

Überstand wurde sofort für die qualitativen und quantitativen Aktivitätsbestimmungen verwendet. Der Proteingehalt wurde nach Lowry et al. (1951) bestimmt.

3.8.1.2. In-Gel-Assay zum Nachweis der RNase-Aktivität

Der In-Gel-Assay wurde nach Abel und Köck (2001) durchgeführt. Die RNase-Aktivität wird dabei über Negativfärbung des Substrats angezeigt. Dazu wurden nicht denaturierte Proteinproben (Kap. 3.8.1.1.) in einem 15 % nativem Gel bei 20 mA in Elektrophoresepuffer getrennt. Anschließend wurde das Gel für 15 min in Natriumacetat-Puffer pH 5,6 equilibriert und in Substratlösung (0,4 % Hefe-RNA, 2,5 mM EDTA, 150 mM Natriumacetat, pH 5,6) für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach 20 min Waschen in Equilibrierungspuffer erfolgte für 10 min die Substratfärbung mit 0,2 % (w/v) Toluidinblau in 0,5 % (v/v) Essigsäure. Um die transparenten Aktivitätsbanden zu identifizieren, wurde das Gel mit 0,5 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

Als Marker für die elektrophoretische Mobilität wurde ein Zellextrakt kultivierter *L. esculentum*-Zellen cv. Lukullus verwendet, welche 24 h in phosphatfreiem Medium kultiviert worden waren. Die Kultivierung dieser heterotroph wachsenden Tomatenzellkultur erfolgte nach Tewes et al (1984). Dieser Zellextrakt enthält die Aktivitäten der RNasen LE, LX, LV1 und LV2. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurde die Aktivität der RNaseLE genutzt.

3.8.1.3. Enzymatische Bestimmung der RNase-Aktivität

Die quantitative Bestimmung der RNase-Aktivität wurde nach (Ambellan und Hollander 1966) modifiziert (Abel und Köck 2001). Dem enzymatischen Test liegt folgendes Prinzip zugrunde: Die Ribonukleasen nativer Proteinproben spalten hochmolekulare Hefe-RNA in Oligonukleotide, deren Konzentration bei 260 nm photometrisch bestimmt wird.

Der Reaktionsansatz von 150 µL enthält zu gleichen Teilen 150 mM Natriumacetat pH 5,6, hochmolekulare Hefe-RNA 0,5 % (w/v) und Proteinextrakt (Kap. 3.8.1.1.). Nach Zugabe der Probe wurde die enzymatische Reaktion bei 37 °C verfolgt. Es wurde eine Kinetik von 0, 5, 10, 20, 30 und 40 min aufgenommen und die Reaktion durch Zugabe des Präzipitationsreagenzes im Verhältnis 1:9 (v/v) zu den jeweiligen Zeitpunkten gestoppt. Nach einstündiger Fällung bei -20 °C wurden die Oligonukleotide im Überstand photometrisch

(Ultrospec 3300; Pharmacia) quantifiziert. Aus den Messpunkten wurden über lineare Regression die Extinktionsänderungen pro min ermittelt und die daraus resultierende spezifische Enzymaktivität [$U \cdot mg^{-1}$ Protein] errechnet.

3.8.2. Immunologischer Proteinnachweis mittels Westernblot-Hybridisierung

3.8.2.1. Denaturierende Proteinextraktion

In flüssigem Stickstoff gemörstertes Pflanzenmaterial wurde mit NTES-Puffer im Verhältnis 1:1 (w/v) und Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) 5 min im Vortexer gemischt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm und 4 °C wurde die Proteininterphase mit 4 V 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol versetzt und 4 h bei -20 °C gefällt. Die Pellets wurden mehrmals mit 0,1 M Ammoniumacetat/Methanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 100 mM Tris/HCl pH 6,8 mit 2 % (v/v) SDS für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der in ddH₂O gelösten Pellets erfolgte nach Lowry et al. (1951).

3.8.2.2. SDS-Page und Proteintransfer

Es wurden 300 µg Gesamt-Protein (Kap. 3.8.2.1.) mit 4 V Aceton bei -20 °C gefällt, in 25 µL denaturierendem Protein-Probenpuffer aufgenommen, denaturiert und anschließend in einem 12 % Polyacrylamidgel (Sambrook et al. 1989) bei 15 – 20 mA in Elektrophoresepuffer mit 1 % (w/v) SDS aufgetrennt. Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran (Amersham) erfolgte über einen Elektrobplot (Semi-Dry-Apparatur; Pharmacia) für 1 h bei 0,8 A * cm⁻² in Blottingpuffer.

3.8.2.3. Antikörperreinigung

Zur Erstellung des polyklonalen RNaseLE Antikörpers wurde von Oghi et al. (1997) die *RNaseLE* in *S. cerevisiae* überexpressiert und das Protein chromatografisch gereinigt. Das gereinigte Protein ist dann nach einem Standardprotokoll 3 mal in Kaninchen injiziert worden (Reu-Kanin, Osmarsleben). Um die Spezifität der Antikörperbindung für die Immunmarkierungen (Kap. 3.8.2.4. und Kap. 3.8.3.3.) zu verbessern, wurde der Antikörper folgendermaßen gereinigt:

Das Antigen (Proteinprobe aus Tomatenzellkultur (24 h, P-) wurde mittels präparativer SDS-Page elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, wie in Kap. 3.8.2.2. beschrieben. Die Membran wurde in TBS mit 0,4 % Tween20 bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach 5 min Waschen mit TBS bei RT wurde die Membran mit dem Antikörperserum 1:2 (v/v) in PBS verdünnt für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 4 x 5 min in TBS mit 0,1 % Tween20 gewaschen. Danach wurde der Antikörper von der Membran mit 0,1 M Glycin von der Membran für 5 min bei RT gewaschen und mit gesättigtem Na₃PO₄ neutralisiert. Die Dialyse (Dialyseschlauch, 20 kDa Größenausschluss; Roth) der Antikörperlösung erfolgte gegen 1000 x (v/v) PBS für 16 h bei 4 °C. Die gereinigte Antikörperlösung wurde danach aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.8.2.4. Immunologischer Proteinnachweis

Für die Westernblot-Analyse erfolgte der immunologische Proteinnachweis nach Lehmann et al. (2001). Zur Markierung der Markerbanden wurde die Nitrocellulosemembran mit PonceauS-Lösung gefärbt und mit 1 x TBS mit 0,1 % Tween20 entfärbt. Vor dem Proteinnachweis mit spezifischen Antikörpern wurde die Membran 1 h in Blockierungslösung (6 % (w/v) Magermilchpulver [Lidl UK GmbH], 20 % (w/v) NaN₃ in TBS-Puffer] zur Absättigung unspezifischer Bindungen bei RT inkubiert. Nach darauf folgendem 5 x 5 min Waschen mit TBS mit 0,1 % Tween20 erfolgte die Inkubation mit dem gereinigten primären Antikörper (RNaseLE-IgG aus Kaninchen) 1:1000 in Blockierungslösung für 1 h bei RT. Anschließend wurde die Membran mehrmals gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat) 1:2000 in der Blockierungslösung für 1 h inkubiert und nochmals 3 x 10 min gewaschen. Die Chemilumineszenz-Detektion wurde mit dem ECL-System von Amersham durchgeführt und nach 3 h Exposition auf einem Röntgenfilm (X ray RETINA XBD; Orwo) detektiert.

3.8.3. Immuncytochemischer Proteinnachweis

3.8.3.1. Fixierung und Einbettung in Polyethylenglycol

Das Pflanzenmaterial wurde in kleine 4 mm x 4 mm große Stücke geschnitten und 2 h bei RT in PBS-Puffer mit 3 % Paraformaldehyd fixiert. Dann wurde das Material 2 x 15 min gewaschen und in aufsteigender Ethanolreihe jeweils 30 min dehydriert. Es erfolgte eine

erneute Inkubation von 30 min in 96 % Ethanol. Alle nachfolgenden Schritte wurden im Wärmeschrank bei 55 °C durchgeführt. Die Gewebe wurden 3 x 1 h in Ethanol:PEG [PEG1500:PEG4000, 2:1 (Serva)] im Verhältnis (v/v) 3:1, 1:1 und 1:3 und danach für 2 h in PEG inkubiert. Anschließend erfolgte die Einbettung der Pflanzenteile in PEG.

3.8.3.2. Kryofixierung

Petiole von 4 mm Länge wurden 3 h in 3 % PFA mit 0,05 % Triton in PBS-Puffer fixiert und 2 x 15 min in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Infiltration in Saccharoselösung mit aufsteigender Konzentration: 0,1 M für 4 h; 1,1 M für 12 h und 2,5 M für 6 h. Die Kryofixierung erfolgte mittels Immersion in flüssigem Propan.

3.8.3.3. Immunmarkierung

Der immuncytochemische Proteinnachweis erfolgte nach dem Protokoll von Hause et al. (1996). Die 2 µm dicken Schnitte (Microm Rotationsmikrotom; Micram Laborgeräte GmbH bzw. Reichert Ultracut S; Leica, Österreich) wurden auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger fixiert. Die Blockierung der Aldehydgruppen erfolgte für 5 min mit 0,1 M NH₄Cl. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Schnitte 30 min in PBS mit 5 % BSA inkubiert. Die Bindung an den gereinigten (Kap. 3.8.2.3.) primären Antikörper, RNaseLE-IgG aus Kaninchen 1:100 (v/v) in 5 % BSA/PBS verdünnt, erfolgte über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer. Nach einmaligem Waschen mit 1 % BSA/PBS für 10 min und zweimaligem Waschen mit 0,1 % BSA/PBS je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper Anti-Kaninchen IgG-Alexa 488 (Molecular Probes) für 60 min bei 37 °C in einer lichtgeschützten feuchten Kammer. Anschließend wurden die Schnitte 4 x 10 min mit PBS gewaschen. Das Präparat wurde dann 15 min mit 1 µg * mL⁻¹ (DAPI) in 0,1 % PBS gefärbt und nochmals 2 x 10 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden mit Citifluor-Glycerol konserviert und mit dem Zeiss „Axioplan“ Epifluoreszenzmikroskop, Filterkombination BP 450-490 // FT 510 // LP 515, ausgewertet.

3.9. Nachweis von Protein-DNA-Interaktionen

3.9.1. Band-shift-Analyse

3.9.1.1. Isolierung der Kernproteine

Die Kernproteine wurden nach dem Protokoll von Miskimins et al. (1985) aus kultivierten *L. esculentum*-Zellen Mill. cv. Lukullus nach 24 h Phosphatversorgung bzw. Phosphatmangel isoliert. Die Tomatenzellen entstammen einer heterotroph wachsenden Zellsuspension, die nach Tewes et al. (1984) kultiviert wurde. Die Dialyse des Zellkernextraktes (Dialyseschlauch, 20 kDa Größenausschluss; Roth) erfolgte gegen 1000 x (v/v) Kernprotein-Dialyse-Puffer bei 4 °C für 8 h und weitere 8 h nach Pufferwechsel. Die Kernproteinextrakte wurden danach aliquotiert, Schock gefroren und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford (1977).

3.9.1.2. Herstellung von radioaktiv markierten Promotorfragmenten

Aus der potentiellen 2,6 kbp langen *RNaseLE* Promotorsequenz (pgLE5') wurden mittels PCR (Kap. 3.5.) und Nutzung sequenzspezifischer Primer 100 bis 300 bp lange DNA-Fragmente erzeugt:

- (A) 5'-CGAAGCTTCAAGCTCCTCAATTTACACAC-3'
5'-GGCTGAATTAGAAGCCCGGGTTTTCTTG-3'
- (B) 5'-AATCTGAGCGTGTTTTAGTG-3'
5'-AGTGTGAAATTGAGGAGCTT-3'
- (C) 5'-TGACCAACTTAGAAAAACCA-3'
5'-TAAGCATATTACACACTAAAAC-3'
- (D) 5'-AACATCACACATGTTGCATT-3'
5'-TAAACATGATTGGTTTTTCTAA-3'
- (E) 5'-TCTACTCTTCCTTGTGTTCA-3'
5'-ATAAAACGGTTCATATGAATG-3'
- (F) 5'-TTTACAATCTAGTGTAATGATT-3'
5'-ATTAGACAATTTAAGGGATTG-3'
- (G) 5'-CTATAGTACCGGAAATAAAG-3'
5'-TGTAACAAACTAAATTACATTAA-3'

-
- (H) 5`-GTAATGTCAAAAATTGAAAATC-`3
5`-GTTATCATAATTACAAATAATTAT-`3
- (I) 5`-GAGCTCACTGCAAATGTGTG-`3
5`-ATGAACATAGAGATGAATGA

Nach Auftrennung der Fragmente in 1,5 % (w/v) Agarose in TAE-Puffer und $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Ethidiumbromid für 1 h bei 50 mA erfolgte die Reinigung mittels Gelextraktion (High Pure PCR Product Purification Kit; Roche). Die Fragmente wurden nach dem Standardprotokoll von Sambrook et al. (1989) dephosphoryliert und anschließend 5'-endmarkiert. Für die Markierungsreaktion (50 μL Gesamtvolumen) wurden 10 pmol DNA-Fragment, $10 \text{ mCi} \cdot \text{mL}^{-1}$ [γ - ^{32}P] ATP und $10 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ T4-Polynukleotid-Kinase in Kinase-Puffer (Fermentas) bei 37°C für 10 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 0,5 M EDTA abgestoppt und die Fragmente über Sephadex-Säulen (NickTM Columns; Amersham) gereinigt.

3.9.1.3. Bindungsreaktion und elektrophoretische Auftrennung

Die Bindungsreaktion und die elektrophoretische Auftrennung wurden an das Protokoll von Mukatira et al. (2001) angepasst. Für die Bindungsreaktion (20 μL Gesamtvolumen) wurden 1 μg Poly [d(I-C)], 0,1 μg Poly-L-Lysin, 30 fmol radioaktiv 5'-endmarkiertes Fragment und 2,5 μg Kernprotein in Bindungspuffer für 15 min bei 20°C inkubiert und anschließend wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt. Die gewählte Konzentration des radioaktiv markierten Fragments und die eingesetzte Kernproteinmenge ermöglichten eine optimale Detektion von Protein-DNA-Interaktionen. Der Nachweis der Interaktionen erfolgte mit 4 % (w/v) nativen Polyacrylamidgel in 0,5 M TBE-Puffer bei $8 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nach Beendigung des Laufes wurde das Gel getrocknet und auf Imagerplatten (Typ BAS 2040 S) bis zu 16 h exponiert und am Phosphorimager 1500 (Fuji/Raytest; Schraubenhardt) autoradiografisch ausgewertet. Die Spezifität der Protein-DNA-Komplexe wurde über Konkurrenzexperimente nachgewiesen. Für eine homologe Konkurrenz wurde zusätzlich zu dem jeweiligen markierten Fragment wieder das gleiche Fragment unmarkiert in 1- und 20-fachem Überschuss zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die heterologe Konkurrenz erfolgte durch Zugabe von restringiertem pBluescript-Fragment in 100-fachem molaren Überschuss. Für die Behandlung mit ProteinaseK wurden die Zellkernextrakte für 30 min mit $0,12 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ ProteinaseK (Roche Diagnostics) in Pronase-Puffer bei 37°C inkubiert.

3.10. Pufferlösungen und Nährmedien

Bindungspuffer:

20 mM HEPES, pH 7,6; 1 mM EDTA; 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1 mM DTT; 0,2 % (v/v) Tween20; 30 mM KCl

Methode: 3.9.1.3.

Denaturierender Protein-Probenpuffer:

0,4 M Tris/HCl, pH 6,8; 4 % (w/v) SDS; 40 % (v/v) Glycerin; 0,01 % (v/v) Bromphenolblau; 1 % (w/v) DTT

Methode: 3.8.2.2.

Denhardt:

jeweils 0,02 % (w/v) Ficoll, Polyvinylpyrrolidon, BSA

Methode: 3.7.1.3.

DNA-Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl

Methode: 3.5.3.2.

DNA-Neutralisierungslösung:

0,5 M Tris/HCl, pH 7,4; 1,5 M NaCl

Methode: 3.5.3.2.

DNA-Probenpuffer:

0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylenxyanol; 15 % (w/v) Ficoll

Methode: 3.5.3.2.

GUS-Extraktionspuffer:

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, pH 7,5; 10 mM Na_2EDTA ; 10 mM 2-Mercaptoethanol; 0,1 % (v/v) Na-laurylsarcosyl; 0,1 % (v/v) TritonX-100

Methode: 3.6.1.

Hoagland-Minerallösung:

0,018 mM $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 1,08 mM $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 0,016 mM $\text{EDTA} \times \text{Na}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 3 mM KNO_3 ; 46 μM H_3BO_3 ; 14 μM $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 0,3 μM $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 0,5 μM $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$; 0,8 μM $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ und 0,4 mM $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ (+Pi) bzw. 0,4 mM NH_4NO_3 (-Pi)

Methode: 3.1.

Kernprotein-Dialyse-Puffer:

20 mM HEPES, pH 7,9; 20 % (v/v) Glycerol; 100 mM KCl; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT; 0,5 mM PMSF

Methode: 3.9.1.1.

LB-Medium bzw.-Agar:

1 % Trypton; 0,5 % Hefeextrakt; 1 % NaCl bzw. 1,5 % Agar

Methode: 3.5.

MOPS:

200 mM 3-(N-Morpholino)-Propan-Sulfonsäure, pH 7,0; 50 mM Natriumacetat x 3 H₂O;
10 mM EDTA

Methode: 3.7.1.2.

MS-OH:

4,4 g * L⁻¹ Murashige and SKOOG-Medium (Duchefa)

Methode: 3.5.

Nativer Proteinextraktionspuffer:

150 mM Natriumacetat; 1 mM PMSF; 2 mM EDTA; pH 6,5

Methode: 3.8.1.1.

NTE:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 M NaCl; 1 mM EDTA

Methode: 3.7.2.3.

NTES:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS

Methode: 3.7.1.1.; 3.8.2.1.

PBS:

8 mM Na₂HPO₄, pH 7,2; 1,5 mM KH₂PO₄; 135 mM NaCl; 3 mM KCl

Methode: 3.7.2.1.; 3.8.3.1.; 3.8.3.2.; 3.8.3.3.

PonceauS-Lösung:

0,2 % (w/v) PonceauS (Sigma); 3 % (w/v) TCA; 3 % (w/v) Sulfosalicylsäure

Methode: 3.8.3.2.

Präzipitationsreagenz:

Mischung aus (A) und (B) im Verhältnis 11 : 10

(A) 0,07 % (w/v) Lanthannitrat in 96 % (v/v) Ethanol

(B) 100 mM Na-Acetat; 26 mM Mg-Acetat; pH 5,6

Methode: 3.8.1.3.

Pronase-Puffer:

0,05 M Tris/HCl, pH 7,5; 5 mM EDTA

Methode: 3.7.2.3.

Protein-Blottingpuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin; 1 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) Methanol

Methode: 3.8.2.2.

Protein-Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,3; 192 mM Glycin

Methode: 3.8.1.2.; 3.8.2.2.

RNA-Probenpuffer:

50 % (v/v) Glycerol; 1 mM EDTA; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 0,25 % (w/v) Xylencyanol/FF

Methode: 3.7.1.2.

Selektionsmedium:

MS-OH; 3 % (w/v) Saccharose; 0,8 % (w/v) Pflanzen-Agar (Duchefa); 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Zeatin; 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kanamycin; 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Betabactyl; pH 6,1
Methode: 3.5.2.

SSC-Puffer:

0,15 M NaCl; 15 mM Natriumcitrat
Methode: 3.7.1.2.; 3.7.1.3.; 3.7.2.3.

TAE-Puffer:

0,4 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,01 M EDTA
Methode: 3.5.; 3.7.1.3.; 3.9.1.2.

TBE-Puffer:

90 mM Tris; 90 mM Borsäure; 5 mM EDTA
Methode: 3.5.3.2.; 3.9.1.3.

TBS-Puffer:

0,1 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,15 M NaCl
Methode: 3.9.2.3.

TE-Puffer:

10 mM Tris/HCl, pH 7,5 bzw. pH 8,0; 1 mM EDTA
Methode: 3.7.2.3.

Wurzelinduktionsmedium:

MS-OH; 3 % (w/v) Saccharose; 0,8 % (w/v) Pflanzen-Agar (Duchefa); 0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Indolelessigsäure; 30 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kanamycin; 160 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Betabactyl; pH 6,1
Methode: 3.5.2.

Zwischenmedium:

MS-OH; 3 % (w/v) Saccharose; 0,8 % (w/v) Pflanzen-Agar (Duchefa); 1,15 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6-Benzylaminopurin; 0,1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Naphthylelessigsäure; pH 6,1
Methode: 3.5.2.

3.10.1. Bakterienstämme

DH5 α (*E. coli*) supE44, lac, U169 λ -(Φ 80lacZ Δ M15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1 (Sambrook et al. 1989)

LBA 4404 (Hoekema et al. 1983)
(*A. tumefaciens*)

3.10.2. Vektoren

pBI101 (CLONTECH) Kan^R, Vektor zur stabilen Pflanzentransformation via Agrobakterium, enthält das *GUS* Gen ohne einen Promotor

PCR[®]2.1 (Invitrogen) Amp^R, Kan^R, Vektor zum direkten Klonieren von PCR-Produkten über A/T-Übergänge

3.10.3. Plasmide

pAOC Amp^R, p Bluescript, enthält ein 1,0 kb Fragment der Allenoxidcyclase *AOC* (*EcoRI*) aus *L. esculentum*, Dr. I. Stenzel, unveröffentlicht (Leibnitz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Arbeitsgruppe Jasmonat-Wirkungsweise)

pBD18 Amp^R, pBR329-Plasmid, enthält ein 1,7 kb Fragment der 18S rRNA der Tomate (*EcoRI*), (Köck et al. 1995)

pgLE5' Cam^R, pCRScript SK+, enthält einen genomischen Subklon der *RNaseLE* (Stenzel 1998)

pLePT2 Amp^R, pCR2.1, enthält ein 1590 bp Fragment der cDNA des Phosphattransporters aus *L. esculentum* (EMBL Acc. Nr. AF o22874; Dr. M. Köck, unveröffentlicht (Biozentrum der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Abteilung Angewandte biowissenschaftliche Forschung/Isotopenlabor, AG Pflanzliche Zell- und Molekularbiologie)

pPIN2 Amp^R, pBluescript, enthält ein 0,6 kb Fragment des Proteinaseinhibitors II (*XbaI*) aus *L. esculentum*, (Stenzel et al. 2003)

pRLE Amp^R, pBluescript II SK-Phagemid, enthält die vollständige cDNA der *RNaseLE* (*EcoRI* / *XhoI*), EMBL Acc. Nr. X79337 (Köck et al. 1995)

pUBI3 Amp^R, pBluescript II SK-Phagemid, enthält die vollständige cDNA des Ubiquitin-Gens *ubi3* (*EcoRI* / *XhoI*) aus *L. esculentum*, (Köck et al. 1995)

gGTOM13 Amp^R, pT7/T3 α -18 (BRL), enthält die vollständige cDNA des ACC-Oxidase Gens *ACO* (*HindIII* / *BamHI*) (Köck et al. 1991)

4. Ergebnisse

4.1. Vorkommen der RNaseLE in *L. esculentum*

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die *RNaseLE* in den Blüten (Lers et al. 1998; Stenzel 1998) und im Keimling (Altmann 1999) exprimiert wird. Weitere zusammenhängende Untersuchungen zur organabhängigen Expression der *RNaseLE* gibt es bisher nicht. Um Erkenntnisse über die biologische Funktion der RNaseLE in *L. esculentum* zu gewinnen, wurde das Vorkommen der RNaseLE in den Organen der Pflanze untersucht.

4.1.1. Organspezifisches Vorkommen der RNaseLE

Zunächst wurde untersucht, in welchen Organen von *L. esculentum* die *RNaseLE* exprimiert wird. Außerdem wurde die Expression in einem frühen Entwicklungsstadium der Pflanze, im Keimling, untersucht. Vorversuche zeigten, dass *RNaseLE* Transkripte in Pflanzen, die älter als 3 Wo. alt waren, nicht detektiert werden konnten. Deshalb wurde Gesamt-RNA aus Wurzeln, Stengeln und Blättern 3 Wo. alter *L. esculentum*-Pflanzen cv. Lukullus, aus Blüten 10 Wo. alter Pflanzen bzw. aus 3 d alten Keimlingen isoliert. Die Akkumulation der *RNaseLE* mRNA wurde mittels Northernblot-Analysen (Kap. 3.7.1.), bei Auftragung von jeweils 20 µg Gesamt-RNA, detektiert. Aus Abb. 1a ist ersichtlich, dass die *RNaseLE* mRNA in Stengeln, in den Blüten und in Keimlingen akkumuliert. Die maximale relative Transkriptmenge liegt in Keimlingen vor (Abb. 1b).

In den Pflanzenorganen ist das Protein der RNaseLE mit Immundetektion nur schwer bestimmbar. Das spricht für die geringe Abundanz des Vorkommens der RNaseLE in *L. esculentum*. Um das Vorkommen des Proteins nachweisen zu können, wurde die Enzym-Aktivität der RNaseLE in den Organen von *L. esculentum* mittels eines sensitiven In-Gel-Assays (Kap. 3.8.1.2.) qualitativ untersucht. Damit wurde nachgewiesen, dass die RNaseLE verstärkt in Keimlingen aktiv ist. In Übereinstimmung mit dem Transkriptnachweis konnte die ribonukleolytische Aktivität der RNaseLE auch in Stengeln und in den Blüten detektiert werden (Abb. 1c).

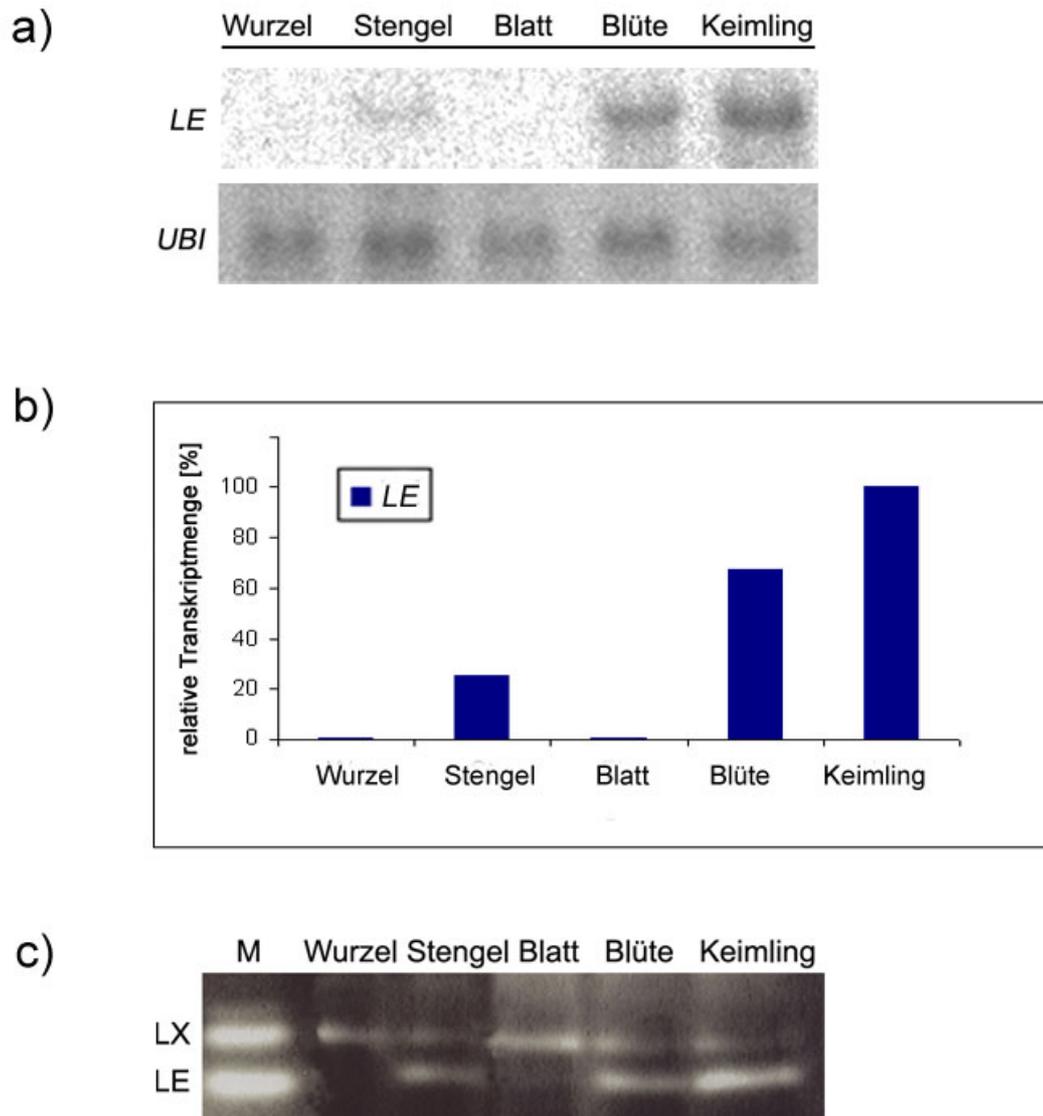


Abb. 1 Akkumulation der *RNaseLE* mRNA (**a**, **b**) und Vorkommen der RNaseLE Aktivität (**c**) in Blüten, Stengeln und in Keimlingen von *L. esculentum*.

a): Northernblot-Hybridisierung von Wurzeln, Stengeln, Blättern, Blüten und Keimlingen. Nachweis des *UBI* Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* mRNA aus **a**.

c): RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay mit 60 µg Gesamt-Protein von Wurzeln, Stengeln, Blättern, Blüten und Keimlingen. Darstellung der Aktivitäten von RNaseLX und RNaseLE im Gesamtzellextrakt (M = Marker) kultivierter Zellen (24 h, P-) von *L. esculentum* cv. Lukullus.

Um die entwicklungsabhängige Expression in der Blüte zu untersuchen, wurden die Blüten in 9 Entwicklungsstadien unterteilt und wie folgt unterschieden:

- 1 Knospe < 4 mm
- 2 Knospe 4 – 6 mm
- 3 Knospe 6 – 9 mm
- 4 Knospe > 9 mm
- 5 Kelchblätter offen, Blüte geschlossen
- 6 Blüte offen
- 7 Blüte weit offen
- 8 Blüte welkend
- 9 Blüte verwelkt

Das Transkript der *RNaseLE* akkumuliert in den Blüten vom 5. bis zum 9. Stadium (Abb. 2a). Das Maximum an relativer *RNaseLE* Transkriptmenge liegt im Blütenstadium 8 vor (Abb. 2b).

Es ist bekannt, dass besonders T2-Typ RNasen im Pollen oder im Stigma der Blüte vorkommen. Eine organabhängige Expression der *RNaseLE* in der Blüte ist demnach denkbar und wurde mit Northernblot-Hybridisierungen untersucht. Hierzu wurde die Gesamt-RNA von Kelchblättern, Kronblättern, Staubblättern und Griffel von Blüten aus dem Stadium 8 isoliert. Das *RNaseLE* Transkript akkumuliert in den Staubblättern, dagegen konnte in den übrigen Blütenorganen keine *RNaseLE* Expression detektiert werden (Abb. 2c und 2d).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die *RNaseLE* während der Pflanzenentwicklung organspezifisch exprimiert wird. Im Keimling ist das Maximum an Transkript und Protein der *RNaseLE* vorhanden. Das Transkript der *RNaseLE* konnte jedoch auch in den Staubblättern von bereits welkenden Blüten nachgewiesen werden.

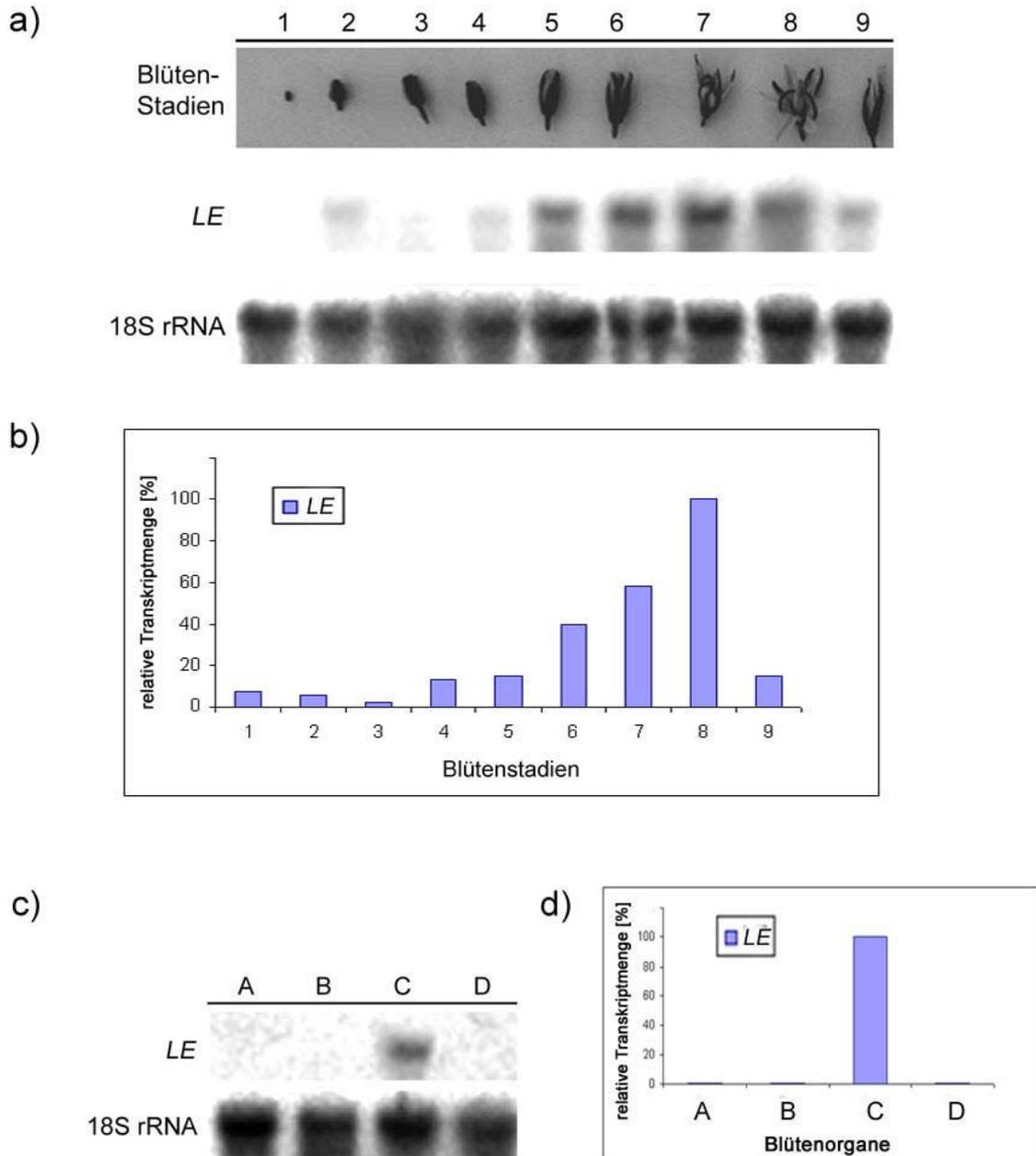


Abb. 2 Akkumulation der *RNaseLE* mRNA in späten Blütenstadien (**a, b**) und in Staubblättern (**c, d**) von *L. esculentum*.

a): Northernblot-Hybridisierung von den Blütenstadien 1 bis 9. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, der Blütenorgane (Blütenstadium 8): (A) Kelchblätter, (B) Blütenblätter, (C) Staubblätter und (D) Griffel.

d): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* mRNA aus **c**.

4.1.2. Gewebespezifisches Vorkommen der RNaseLE

Die Expression von T2-Typ RNase Genen wurde bislang nur auf Organebene untersucht. In welchen Geweben RNasen vorkommen, wurde demgegenüber kaum erforscht. Um erste Hinweise zur Funktion der RNaseLE in *L. esculentum* zu erhalten, wurde die gewebeabhängige Expression der RNaseLE mittels mikroskopischer Techniken analysiert. Dabei wurde Promotoraktivität sowie Transkriptakkumulation und Proteinvorkommen mit jeweils unabhängigen Methoden detektiert.

Zur Untersuchung des gewebespezifischen Vorkommens der RNaseLE Promotoraktivität wurden transgene Pflanzen erzeugt. Diese sollten das β -Glucuronidase Gen unter der Kontrolle des vollständigen RNaseLE Promotors exprimieren. Dazu wurde die gesamte 5'-upstream Sequenz des RNaseLE Promotors (2,668 kbp) in den binären Vektor pBI101 vor das *uidA* Gen kloniert (Kap. 3.5.). Durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wurden 21 unabhängige transgene Tomaten erzeugt. Aus diesen Primärtransformanten wurde nach Kanamycinselektion, β -Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung (Kap. 3.6.1.) und Southernblot-Analyse (Kap. 3.5.3.) eine transgene Linie selektiert. Diese Linie ist kanamycinresistent, hat eine 10-fach höhere spezifische β -Glucuronidase-Aktivität als der WT und zwei Kopien des *GUS* Gens bzw. Promotor-GUS-Konstruktes. Die selektierte transgene Linie PromLE1::*uidA* (Nummer 116) war Grundlage für alle weiteren Untersuchungen. Neben der Lokalisation der Promotoraktivität in den Geweben wurde die Akkumulation der RNaseLE mRNA mittels *in situ*-Hybridisierung analysiert. Dafür wurden DIG markierte RNaseLEantisense-Einzelstrang RNA-Sonden verwendet (Kap. 3.7.2.3.). Die Analysen zum Vorkommen des RNaseLE Proteins erfolgten immuncytochemisch unter Verwendung eines RNaseLE-Antikörpers (Kap. 3.8.3.). Die Auswertung dieser mikroskopischen Untersuchungen erfolgt in den folgenden drei Abschnitten. Die jeweiligen Ergebnisse zur Lokalisation von Promotoraktivität, mRNA und vom Protein der RNaseLE wurden zusammenhängend dargestellt, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erzielen.

4.1.2.1. Lokalisation der RNaseLE im Stengel

Im Stengel von *L. esculentum* cv. Lukullus konnten mRNA und Aktivität der RNaseLE bereits nachgewiesen werden (vgl. Abb. 1a-c). Deshalb wurden Gewebeschnitte von Stengel und Petiole 3 Wo. alter Pflanzen mikroskopisch untersucht. In Stengel-Querschnitten von PromLE1::*uidA*-Pflanzen, die weniger als 4 Wo. alt waren, konnte die RNaseLE

Promotoraktivität detektiert werden, in älteren Pflanzen dagegen nicht. Der *RNaseLE* Promotor ist im Leitgewebe vom Stengel aktiv, wie in Abb. 3A anhand der GUS-Färbung ersichtlich ist. Das Leitbündel von *L. esculentum* ist bikolateral-offen. Es besteht aus inneren Phloem, Xylem, Kambium und äußeren Phloem (vgl. Abb. 3C). Im vergrößerten Stengel-Querschnitt in Abb. 3B ist erkennbar, dass der *RNaseLE* Promotor im Phloem aktiv ist.

Die *RNaseLE* mRNA konnte in den Siebelementen des äußeren und inneren Phloems, in Übereinstimmung mit der Promotoraktivität, detektiert werden (Abb. 3C'), wobei relativ wenig *RNaseLE* Transkript im Stengel akkumuliert (Abb. 3C). Weiterhin wurde etwas Transkript in den Parenchymzellen von Phloem und Xylem detektiert. Das Kambium ist demgegenüber nur leicht bis gar nicht markiert (Abb. 3C und 3C'). Die Tracheen und Tracheiden des Xylems sind unspezifisch gefärbt, da die Intensität der Formazanfärbung in den Tracheen bzw. Tracheiden von *antisense*-Hybridisierung (Abb. 3C) und von *sense*-Hybridisierung (Abb. 3D) nahezu ähnlich ist. In Abb. 3D zeigt die Kontrollhybridisierung mit der *RNaseLEsense*-Sonde keine spezifische Markierung der *RNaseLE* mRNA.

Das RNaseLE Protein, dessen Vorkommen durch eine grüne Fluoreszenz angezeigt wird, ist in den Siebelementen des inneren und äußeren Phloems von Petiolen lokalisiert (Abb. 3E). In Längsschnitten (vgl. Abb. 19D), konnte das Vorkommen in den Siebelementen belegt werden. Diese Phloemspezifität bestätigt die vorherigen Analysen. Die Tracheen bzw. Tracheiden des Xylems sind durch eine gelbe Autofluoreszenz gekennzeichnet, dagegen erscheinen die Plastiden in roter Färbung (Abb. 3E und 3F). Keine spezifische Markierung zeigt die Behandlung mit dem korrespondierenden Präimmunserum (Abb. 3F).

Mit diesen unabhängigen Versuchsansätzen wurde nachgewiesen, dass sowohl Promotoraktivität als auch mRNA und Protein der RNaseLE im inneren und äußeren Phloem junger Stengel bzw. Petiolen lokalisiert sind. Das Protein konnte in den Siebelementen des Phloems detektiert werden. Analoge Analysen an Blättern und Wurzeln konnten weder Promotoraktivität noch Transkript und Protein der RNaseLE nachweisen.

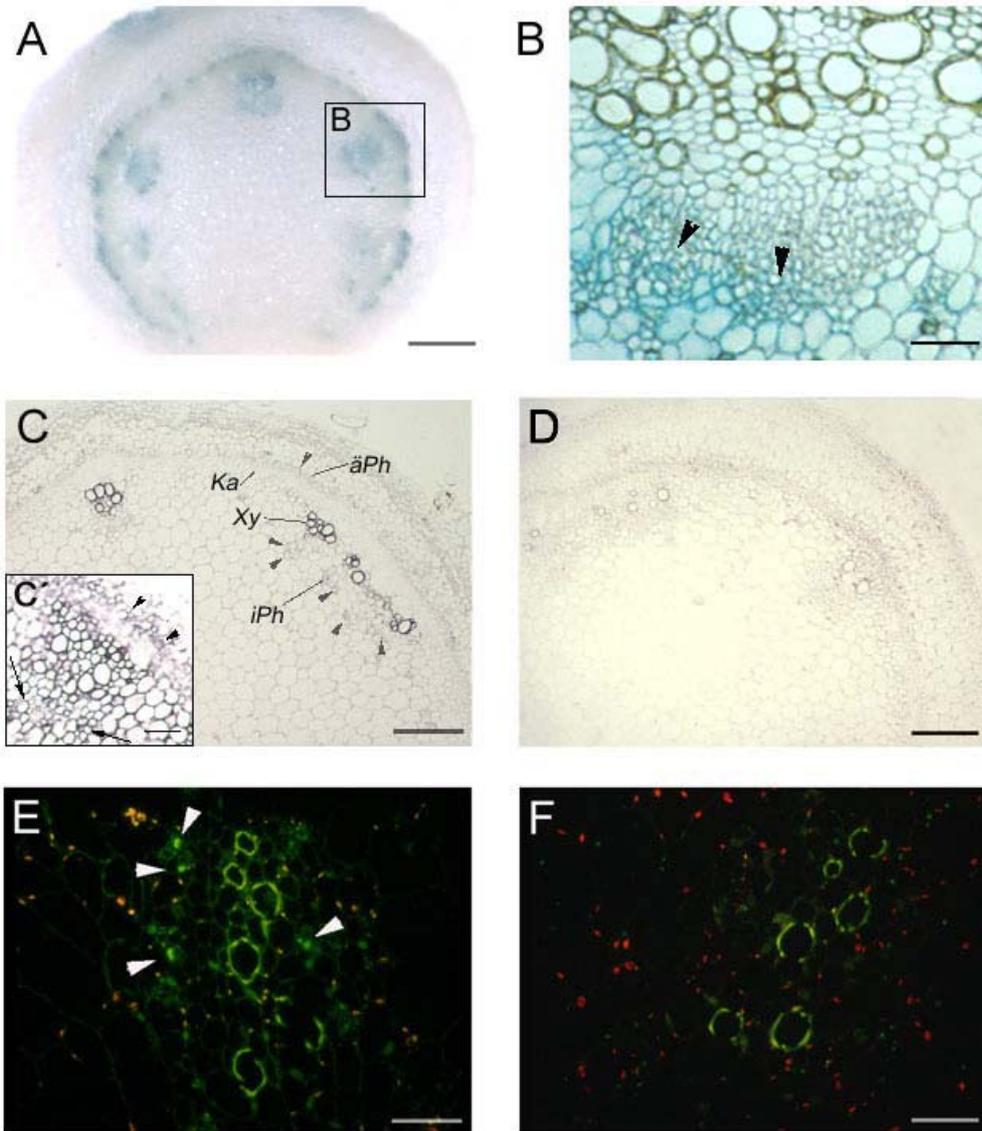


Abb. 3 Lokalisation der *RNaseLE* Promotoraktivität (**A**, **B**), *RNaseLE* mRNA (**C**, **C'**, **D**) und Vorkommen von RNaseLE Protein (**E**, **F**) im Phloem von Stengeln aus *L. esculentum*.

A-B: Histochemische GUS-Färbung der *RNaseLE* Promotoraktivität im Stengel (Querschnitte (**A**) 1 mm bzw. (**B**) 10 µm dick) von PromLE1::*uida*-Pflanzen.

C, C', D: *in situ*-Hybridisierung im Stengel (Querschnitte 10 µm dick) mit DIG markierter *RNaseLEantisense* RNA-Sonde (**C**, **C'**) bzw. als Kontrolle mit der *sense* RNA-Sonde (**D**). Akkumulation der *RNaseLE* mRNA im Stengel (**C**, **C'**) in Zellen des äußeren (*äPh*) und inneren Phloems (*iPh*, schwarze Pfeile). Keine spezifische Markierung in der Kontrollhybridisierung (**D**). [Ka = Kambium, Xy = Xylems]

E, F: Immuncytochemischer Proteinnachweis in Petiole (Kryo-Querschnitte 2 µm dick) mit RNaseLE-Antikörper (**E**) und dem korrespondierenden Präimmunserum (**F**). Die grüne Fluoreszenz (**E**, weiße Pfeile) zeigt RNaseLE in Siebelementen des Phloems von Petiole an. Gelbe Autofluoreszenz (**E**, **F**) kennzeichnet das Xylem.

[eine Einheit = 0,5 mm (**A**), 50 µm (**C**, **D**), 10 µm (**B**, **C'**, **E**, **F**)]

4.1.2.2. Lokalisation der *RNaseLE* in der Blüte

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass die *RNaseLE* in Staubblättern des späten Blütenstadiums exprimiert wird (vgl. Abb. 2a-d). In welchem Gewebe des Staubblattes die *RNaseLE* Expression erfolgt, wurde über das Reportergen β -*Glucuronidase* in Blüten der PromLE1::*uidA*-Linie (Blütenstadium 8) histochemisch untersucht (Abb. 4A und 4C-H). Die *RNaseLE* Promotoraktivität wurde im Androeceum (vgl. *Solanaceae*-Blütendiagramm in Abb. 4B) der Blüte detektiert (Abb. 4A). Das Androeceum besteht in *L. esculentum* aus zwei miteinander verwachsenen Fruchtblättern und Staubblättern. In isolierten Staubblättern ist der *RNaseLE* Promotor in der Antherenwand des Staubblattes (Abb. 4F und 4H) und dort im Phloem aktiv (Abb. 4G). Das Xylem ist unspezifisch gefärbt. Im Blütenstengel ist der *RNaseLE* Promotor apikal im Phloem aktiv (Abb. 4E). Diese Resultate zeigen eine Phloemspezifität der *RNaseLE*, die sowohl in der Blüte als auch im Stengel (vgl. Kap. 4.1.2.1.) vorkommt.

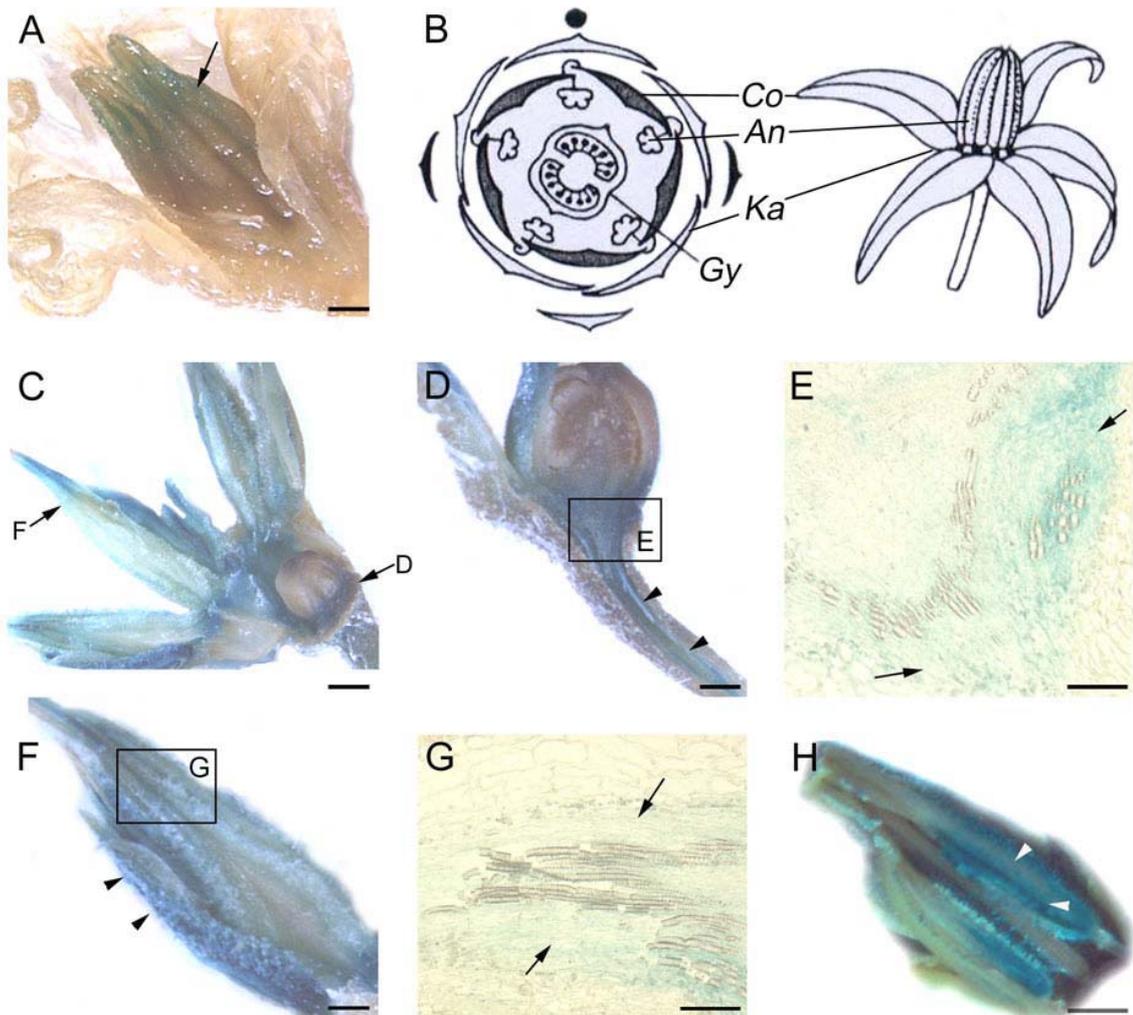


Abb. 4 Lokalisation der *RNaseLE* Promotoraktivität (**A, C-H**) im Staubblatt der Blüte von *PromLE1::uidA*-Pflanzen.

B: Blütendiagramm von *Lycopersicon* nach Jäger (1994): (Ka) Kalyx [Σ Kelchblätter], (Co) Corolla [Σ Blütenblätter], (An) Androeceum [Σ Staubblätter] und (Gy) Gymnoeceum [Griffel].

A, C-H: Histochemische GUS-Färbung der *RNaseLE* Promotoraktivität in der Blüte.

A: GUS-Aktivität im Androeceum einer vollständigen Blüte.

C: Blüte mit Fruchtknoten und Staubblätter.

D: Querschnitt durch den Fruchtknoten und Blütenstengel.

E: Querschnitt (5 μm dick), vergrößerter Ausschnitt aus **D**. Aktivität des *RNaseLE* Promotors apikal im Phloem des Blütenstengels (schwarze Pfeile in **D, E**).

F, H: Staubblatt (**F**) bzw. Staubblätter (**H**). Aktivität des *RNaseLE* Promotors in der Antherenwand (schwarze Pfeile (**F**), weiße Pfeile (**H**)).

G: Längsschnitt (5 μm dick), vergrößerter Ausschnitt aus **F**. Der *RNaseLE* Promotor ist im Phloem aktiv (schwarze Pfeile).

[eine Einheit = 0,8 mm (A, C, D, F, H), 50 µm (E, G)]

4.1.2.3. Lokalisation der RNaseLE im Keimling

RNaseLE Transkript und RNase-Aktivität konnten auch in Keimlingen detektiert werden (vgl. Abb. 1a-c). Die Gewebeabhängigkeit dieses Vorkommens ist jedoch unbekannt und wurde deshalb mit verschiedenen Methoden untersucht. Im 3 d alten PromLE1::*uidA*-Keimling wurde die *RNaseLE* Promotoraktivität histochemisch analysiert. Daraus ist ersichtlich, dass der *RNaseLE* Promotor im Leitgewebe des Embryos (Abb. 5B) und im Endosperm (Abb. 5C) aktiv ist.

Mittels *in situ*-Hybridisierung konnte die Akkumulation der *RNaseLE* mRNA im Endosperm bzw. Endothelsaum sowie im Leitgewebe der Kotyledonen nachgewiesen werden (Abb. 5D). Demgegenüber zeigt die Kontrollhybridisierung keine spezifische Färbung (Abb. 5E). Dieses Resultat bestätigt das histochemisch detektierte Vorkommen der *RNaseLE* Promotoraktivität. In einem vergrößerten Kotyledonen-Querschnitt, ein Ausschnitt aus Abb. 5D, wird deutlich, dass sich die Akkumulation des *RNaseLE* Transkripts auf reife Phloemzellen konzentriert (Abb. 5G). Damit wird für die *RNaseLE* eine Lokalisation im reifenden bzw. sich entwickelnden Phloem aufgezeigt und die Phloemspezifität bestätigt. In der Kontrollhybridisierung ist keine Markierung zu erkennen (Abb. 5H).

Bei der immunocytochemischen Analyse des RNaseLE Proteins mit dem entsprechenden Antikörper konnte das Protein im Endosperm des Keimlings detektiert werden (Abb. 5J). Keine Markierung zeigt die Behandlung mit dem korrespondierenden Präimmunsereum (Abb. 5L). Im reifenden Leitgewebe des Keimlings konnte kein Protein detektiert werden. Vermutlich liegt die Abundanz des RNaseLE Proteins unter der Nachweisgrenze.

Die Auswertung dieser mikroskopischen Analysen zeigt, dass die *RNaseLE* mRNA im reifenden bzw. sich differenzierenden Phloem von *L. esculentum* akkumuliert. Weiterhin konnte die RNaseLE im Endosperm nachgewiesen werden.

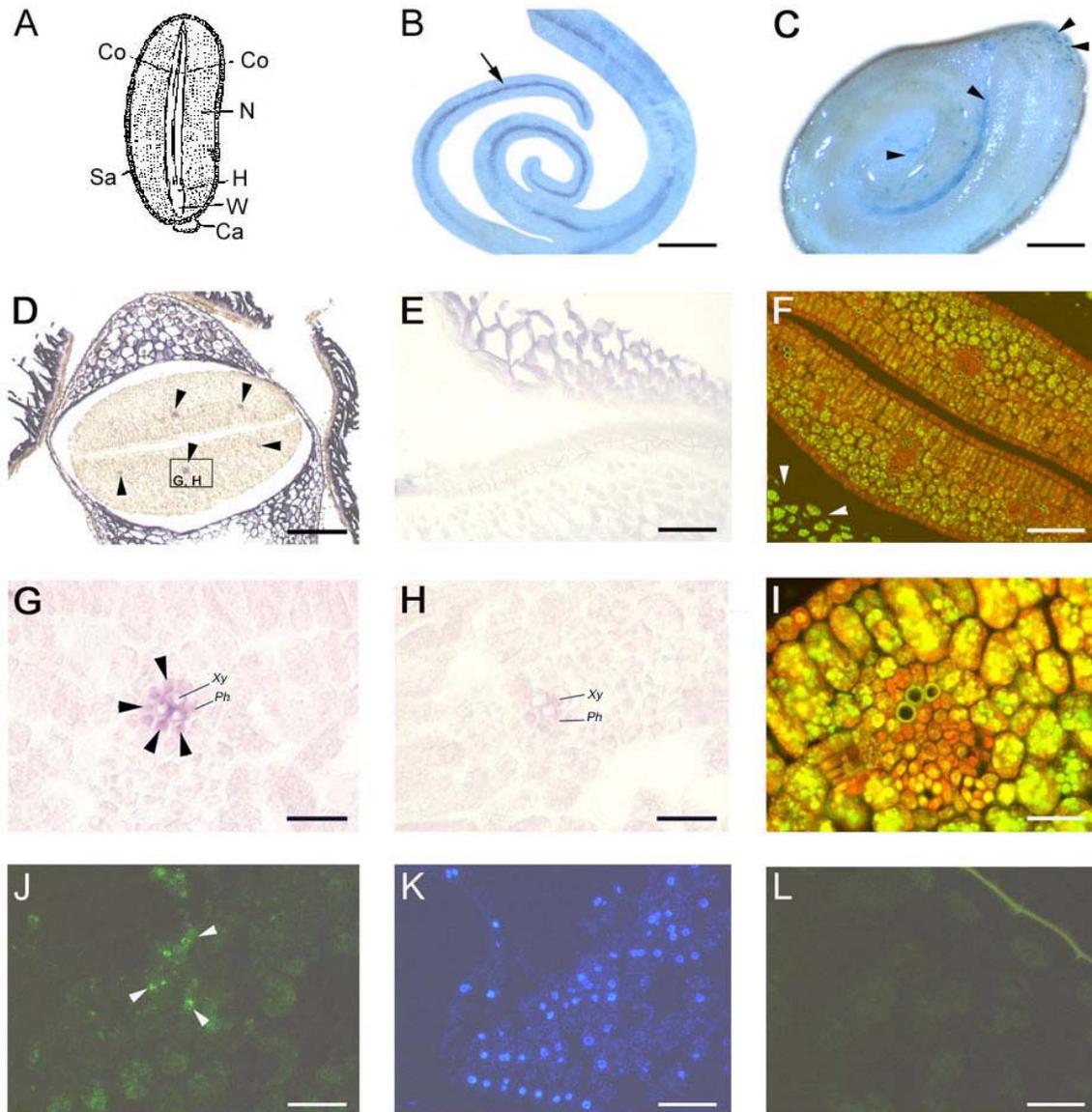


Abb. 5 Lokalisation von *RNaseLE* Promotoraktivität (**B**, **C**), *RNaseLE* mRNA (**D**, **E**, **G**, **H**) und Vorkommen von *RNaseLE* Protein (**J**, **L**) im reifenden Phloem und im Endosperm von *L. esculentum*-Keimlinge.

A: Dicotyledonenkeimling (*Ricinus communis*) schematische Darstellung nach Ehrendorfer (1991): (Co) Kotyledonen, (N) Endosperm, (Sa) Testa, (H) Hypokotyl, (W) Radicula, (Ca) Karuncula.

B, **C:** Histochemische GUS-Färbung der *RNaseLE* Promotoraktivität im Leitgewebe des Embryos (**B**) und im Endosperm (**C**, schwarze Pfeile) von PromLE1::*uidA*-Pflanzen.

D, **E**, **G**, **H:** *in situ*-Hybridisierung im Keimling (Querschnitte 10 μm dick) mit DIG markierter *RNaseLEantisense* RNA-Sonde (**D**, **G**) bzw. als Kontrolle mit DIG markierter *RNaseLEsense* RNA-Sonde (**E**, **H**).

D, **G:** Akkumulation der *RNaseLE* mRNA im Endosperm und im reifenden Phloem der Kotyledonen (schwarze Pfeile). [*Xy* = Xylem]

G: vergrößerter Ausschnitt der Kotyledonen aus **D**. Lokalisation der *RNaseLE* mRNA im Phloem (*Ph*, schwarze Pfeile).

E, **H:** Keine Markierungen in den Kontrollhybridisierungen im Endosperm (**E**) und im reifenden Phloem der Kotyledonen (**H**).

F, I: Acridine-Orange Färbung von RNA (grün) und DNA (rot) eines Kotyledonen (Querschnitte 10 µm dick). RNA im Endosperm (**F**, siehe weiße Pfeile) bzw. DNA im Leitgewebe in **I** (vergrößerter Ausschnitt aus **F**).

J, L: Immunocytochemischer Proteinnachweis im Endosperm (Querschnitte 2 µm dick) mit RNaseLE-Antikörper (**J**) bzw. dem korrespondierenden Präimmunserum (**L**). Lokalisation des RNaseLE Proteins (**J**, weiße Pfeile).

K: DAPI-Färbung der Zellkerne.

[eine Einheit = 0,5 mm (**B, C**), 100 µm (**D**), 15 µm (**E, F**), 10 µm (**K**), 5 µm (**G, H, I, J, L**)]

4.2. Vorkommen und Regulation der *RNaseLE* Genexpression in verschiedenen Stressantworten von *L. esculentum*

Im letzten Kapitel wurden das organ- und gewebespezifische Vorkommen der RNaseLE in der Pflanze untersucht. Dieses Kapitel behandelt die Induktoren und regulatorischen Faktoren der *RNaseLE* Expression in *L. esculentum*. Zunächst wurde der Einfluss von Pathogenen und Elicitoren analysiert (Kap. 4.2.1.). In weiteren Abschnitten werden dann die Regulation und Lokalisation der RNaseLE in der Wundantwort (Kap. 4.2.2. und 4.2.3.) und in der Phosphatmangelantwort (Kap. 4.2.4. und 4.2.5.) untersucht.

4.2.1. Wirkung von Pathogen-Pflanze-Interaktionen sowie Elicitoren auf die *RNaseLE* Expression

Bisher ist nicht geklärt, ob neben einer Verwundung auch Pathogene und Elicitoren die *RNaseLE* Expression induzieren können. Das gab Anlass, die Induzierbarkeit durch diese Faktoren zu untersuchen.

4.2.1.1. Keine Expression der *RNaseLE* infolge Pathogeninfektion

Es wird vermutet, dass T2-Typ RNasen, die in Blüten und im Samen vorkommen, an der Pathogenabwehr beteiligt sind (Galiana et al. 1997). Ob auch auf die RNaseLE eine solche Funktion zutrifft, wurde untersucht, indem ihre Expression nach einer Pathogeninfektion analysiert wurde. Als Marker für eine Pathogeninduzierbarkeit wurde das *PRI* Gen benutzt. Zunächst wurde der Oomycet *Phytophthora infestans*, der in *Solanaceae* die „Braunfäule“ verursacht, getestet. Dazu wurden WT-Blätter (*L. esculentum* cv. Moneymaker) mit

P. infestans infiltriert (Kap. 3.2.). Die Northernblot-Hybridisierungen zeigen, dass keine *RNaseLE* Expression nach *Phytophthora*-Infektion erfolgt (Abb. 6a und 6b). Das *PR1* Transkript akkumuliert erwartungsgemäß nach *Phytophthora*-Infektion (Abb. 6a und 6b).

Weiterhin wurde das Gram-negative Bakterium *Xanthomonas campestris*, das bei Tomaten und Paprika die „bakterielle Fleckenkrankheit“ auslöst, als Pathogen eingesetzt. Für die Infektion mit *Xanthomonas campestris* wurden der virulente WT-Stamm 75-3 (Minsavage et al. 1990), der avirulente, eine hypersensitive Reaktion (HR) auslösende, Stamm pDΔ27 (Bonas et al. 1993) und der Stamm 75X mit einer Insertionsmutation (Brown et al. 1995; Wengelnik und Bonas 1996) verwendet (vgl. Kap. 3.2.). Die Akkumulationen der *RNaseLE* und *PR1* Transkripte wurden 24 h nach Infektion mittels Northernblot-Hybridisierung analysiert. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert sowohl nach *X. campestris*-Infektion als auch nach der Kontrollinfiltration mit MgCl₂ (Abb. 6c). Es liegt jeweils eine relative Transkriptmenge von 15 % vor, bezogen auf das Maximum an akkumulierter Transkriptmenge (Abb. 6d). Durch die Infiltrationsmethode wird vermutlich eine Verwundung der Blätter verursacht, die während der Kontrollinfiltration zur *RNaseLE* Expression führt. Das *PR1* Transkript akkumuliert nur nach der Infektion mit den *X. campestris*-Stämmen (Abb. 6c). Das Maximum an relativer *PR1* Transkriptmenge wurde nach Infektion mit dem virulenten WT-Stamm 75-3 gefunden (Abb. 6d). Die Expressionsanalysen sprechen dafür, dass die *RNaseLE* nicht spezifisch durch eine Pathogeninfektion induziert wird.

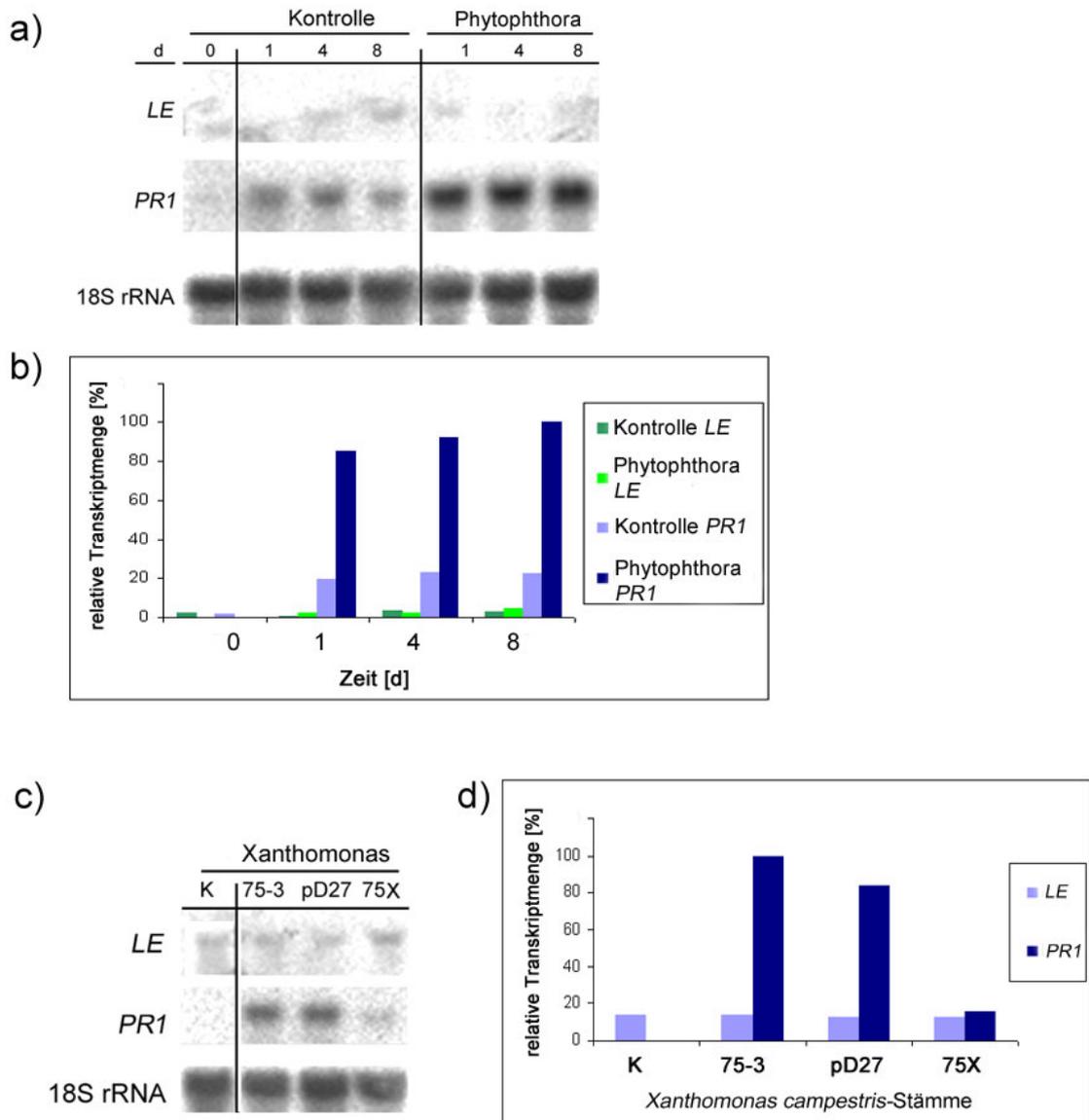


Abb. 6 Einfluss von Pathogeninfektionen auf die Expression von *RNaseLE* im Vergleich zu *PR1*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach Infektion mit *P. infestans* bzw. ddH₂O als Kontrolle. Transkriptnachweis der 18S rRNA als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen von *RNaseLE* und *PR1* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von *L. esculentum*-Blättern nach *X. campestris*-Infektion mit dem virulenten WT-Stamm 75-3, dem avirulenten pD Δ 27-Stamm (pD27) und der 75X-Insertionsmutante bzw. MgCl₂ als Kontrolle (K).

d): Darstellung der relativen Transkriptmengen von *RNaseLE* und *PR1* mRNA aus **c**.

4.2.1.2. Keine Expression der *RNaseLE* nach Elicitorwirkung

Wundinduzierbare Gene, wie *PIN2*, werden auch nach exogener Applikation von Elicitoren exprimiert (Doares et al. 1995a). Eine solche Möglichkeit wurde auch für die *RNaseLE* geprüft. Dazu wurden die, eine *PIN2* Expression induzierenden, Elicitoren OGAs und Chitosan in Northernblot-Analysen getestet. WT-Blätter (*L. esculentum* cv. Lukullus) wurden mit OGAs, wie unter Kap. 3.2. beschrieben, behandelt. Keine *RNaseLE* mRNA akkumuliert nach 8 h und 24 h OGA-Applikation (Abb. 7a). Erwartungsgemäß ist die *PIN2* mRNA nach OGA-Behandlung nachweisbar (Abb. 7b).

WT-Blätter wurden auch mit einer Chitosan-Lösung und zur Kontrolle mit Phosphatpuffer infiltriert. Das Transkript der *RNaseLE* konnte 8 h und 24 h nach Chitosan-Infiltration in geringen Mengen, 3,5 % bzw. 10 % relative Transkriptmenge, bezogen auf das Maximum an akkumulierter Transkriptmenge, detektiert werden (Abb. 7c und 7d). Bei der Kontroll-Infiltration wurden ähnliche *RNaseLE* Transkriptmengen nachgewiesen (Abb. 7c). Da durch die Infiltrationsmethode eine Verwundung der Blätter nicht zu vermeiden ist, könnte die detektierte *RNaseLE* Expression wundinduziert sein. Die *PIN2* mRNA akkumuliert erwartungsgemäß nach Chitosan-Infiltration (Abb. 7c).

Die Ergebnisse zeigen, dass die *RNaseLE* Expression nicht durch die getesteten Elicitoren (OGAs und Chitosan) induziert wird. Da OGAs jedoch an der lokalen Wundantwort beteiligt sind, stellt sich die Frage, welche Stellung die ebenfalls wundinduzierbare *RNaseLE* in der lokalen und systemischen Wundantwort einnimmt und welche Signale die *RNaseLE* Expression nach einer Verwundung regulieren.

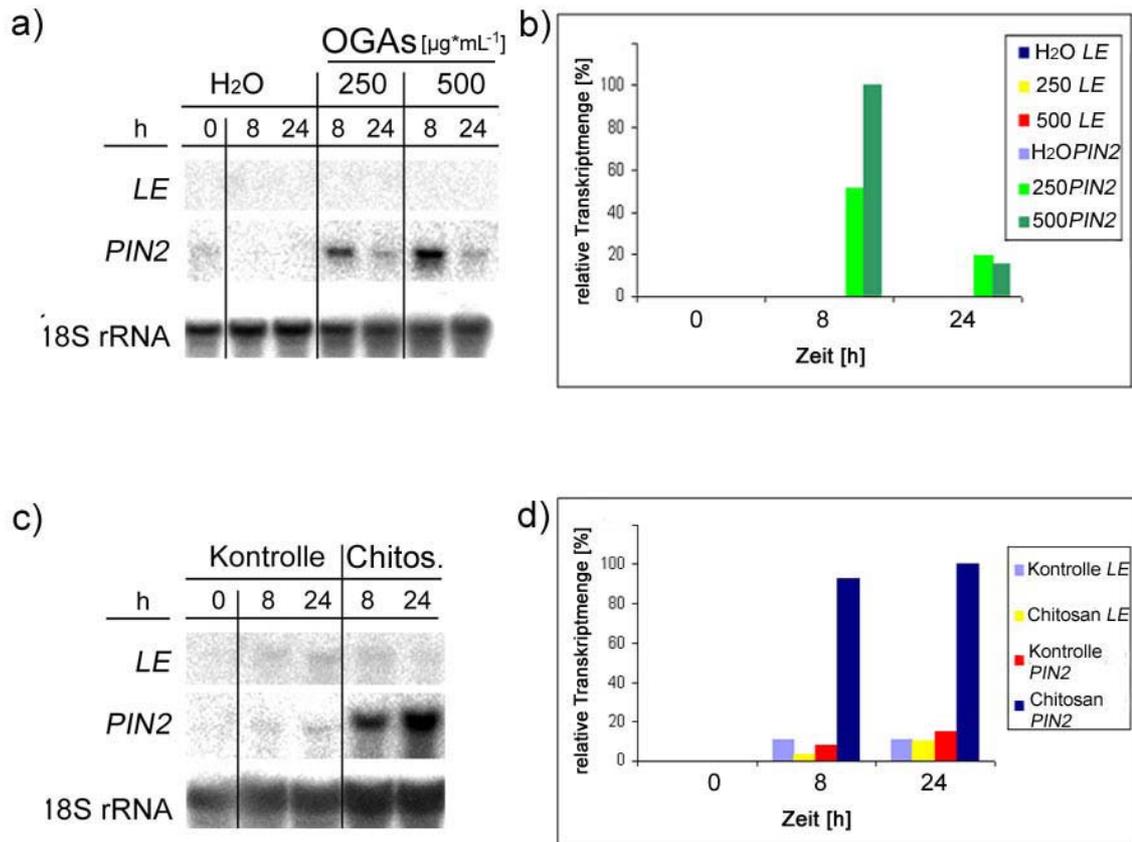


Abb. 7 Elicitorwirkung auf die Expressionen von *RNaseLE* und *PIN2*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach Applikation mit ddH₂O, 250 und 500 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ OGAs. Transkriptnachweis der 18S rRNA als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen von *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von *L. esculentum*-Blättern nach Infiltration mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0 als Kontrolle bzw. 0,1 % (w/v) Chitosan (Chitos.).

d): Darstellung der relativen Transkriptmengen von *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **c**.

4.2.2. Regulation der *RNaseLE* Expression nach Verwundung

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die *RNaseLE* mRNA in verwundeten Blättern akkumuliert (Lers et al. 1998; Stenzel 1998). In den folgenden Kapiteln wird die Ergebnisse zur Regulation und Lokalisation der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort von *L. esculentum* beschrieben.

Die meisten wundinduzierten Gene werden lokal und systemisch exprimiert. Die Expression vieler wundinduzierter Gene wird in *Lycopersicon* über den Octadecanoid-Signalweg reguliert. Systemin und JA sind in diesem Signalweg wichtige Regulatoren, wobei bislang

nicht eindeutig geklärt ist, welches Signal für die systemische Expression verantwortlich ist. Für die *RNaseLE* Expression wurde die Abhängigkeit von den verschiedenen regulatorischen Komponenten des Signalwegs, einschließlich Systemin und JA, untersucht. Als Markergen für die Wundinduktion wurde das *PIN2* Gen eingesetzt, da die Regulation der *PIN2* Expression und die Abhängigkeit von Signalelementen in der Wundantwort bekannt ist.

4.2.2.1. „Späte“ Expression der *RNaseLE* nach Verwundung

Wundinduzierte Gene können bezüglich ihres Expressionszeitpunktes in „frühe“ oder „späte“ Gene eingeteilt werden. Um eine Einordnung der wundinduzierten *RNaseLE* Expression vornehmen zu können, wurde die Kinetik (über 120 min) ihrer Transkriptakkumulation nach der Verwundung (Kap. 3.3.) untersucht. In der Northernblot-Analyse wurden Kontrollhybridisierungen mit cDNA's der wundinduzierten Gene *PIN2* („spätes“ Gen) und *AOC* („frühes“ Gen) durchgeführt. *RNaseLE* Transkripte sind erstmalig 2 h nach der Verwundung nachweisbar (Abb. 8) und können noch 72 h nach der Verwundung detektiert werden (hier nicht dargestellt). 2 h nach Verwundung akkumuliert auch die *PIN2* mRNA, während die *AOC* mRNA schon 30 min nach der Verwundung akkumuliert (Abb. 8). Gemäß dem relativ späten Expressionszeitpunkt kann die *RNaseLE* den „späten“ wundinduzierten Genen zugeordnet werden.

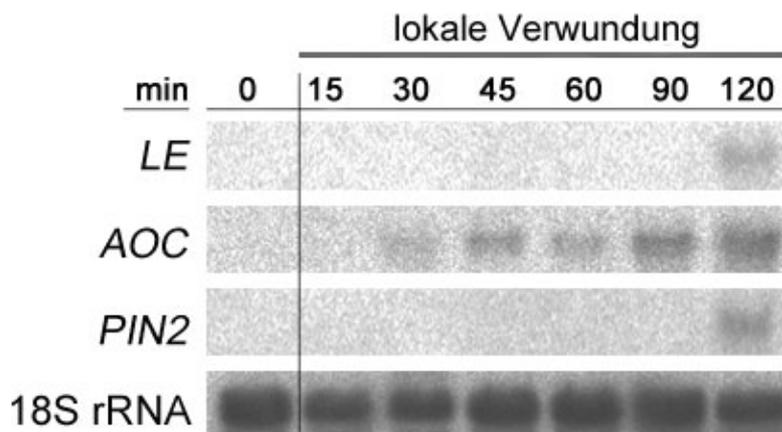


Abb. 8 Zeitabhängige Akkumulationen der *RNaseLE*, *PIN2* und *AOC* mRNA nach Verwundung.

Northernblot-Hybridisierung von verwundeten *L. esculentum*-Blättern. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

4.2.2.2. Lokale Expression der *RNaseLE* nach Verwundung

Wundinduzierte Gene, wie *PIN2*, werden lokal und systemisch exprimiert. Um zu erkennen, ob die *RNaseLE* lokal und/oder systemisch nach der Verwundung exprimiert wird, wurde die Akkumulation der *RNaseLE* mRNA in verwundeten (lokal) und unverwundeten (systemischen) Blättern an der Pflanze zeitabhängig untersucht. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert nach Verwundung ausschließlich lokal in den verwundeten Blättern (Abb. 9a und 9b). Kein *RNaseLE* Transkript akkumuliert demgegenüber im unverwundeten (systemischen) Blatt. Das *Pin2* Gen wird erwartungsgemäß lokal und systemisch nach Verwundung exprimiert (Abb. 9a und 9b).

Weiterhin wurde das Vorkommen von RNaseLE Aktivität nach Verwundung mittels RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay analysiert (Abb. 9c). Zur Identifizierung der verschiedenen RNase-Aktivitäten wurde ein Zellextrakt von bei Phosphatmangel kultivierten Zellen eingesetzt, der sowohl die RNaseLE als auch die RNaseLX enthält (Kap. 3.8.1.2.). Nach Verwundung ist ausschließlich die RNaseLE aktiv, wobei diese Aktivität auf das lokal verwundete Blatt begrenzt ist (Abb. 9c). In der spektrophotometrischen Quantifizierung in Abb. 9d wird deutlich, dass die spezifische enzymatische Aktivität der RNaseLE im Zeitraum von 2 h bis 8 h nach der Verwundung stark ansteigt. Nach 8 h erreicht der Wert das 17-fache, bezogen auf den Wert von 2 h an. Das Maximum an gemessener spezifischer ribonukleolytischer Aktivität von $19 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ Gesamt-Protein wird 24 h nach der Verwundung erreicht (Abb. 9d).

Diese Untersuchungen zeigen, dass die *RNaseLE* ausschließlich lokal nach der Verwundung exprimiert wird bzw. die RNaseLE Enzymaktivität nur lokal nach Verwundung ansteigt.

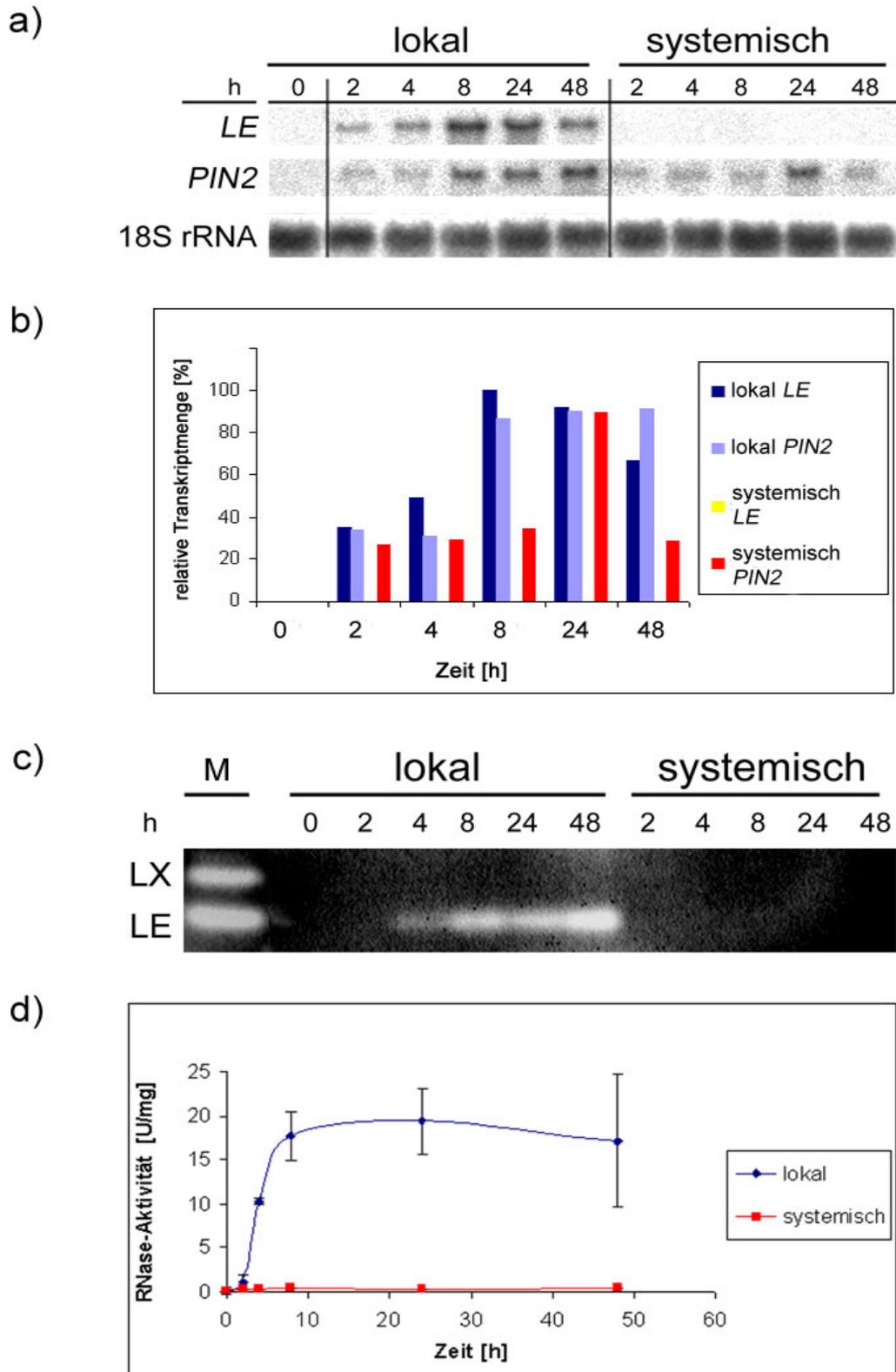


Abb. 9 Lokale Akkumulation der *RNaseLE* mRNA (a, b) im Vergleich zur Akkumulation der *PIN2* mRNA sowie lokales Vorkommen von RNaseLE Aktivität (c, d) nach Verwundung.

a): Northernblot-Hybridisierung von lokalen und systemischen *L. esculentum*-Blättern. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

-
- b):** Darstellung der relativen Transkriptmengen von *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **a**.
- c):** RNase In-Gel-Assay mit 10 µg Gesamt-Protein von lokalen und systemischen Blättern. Darstellung der Aktivitäten von RNaseLX und RNaseLE im Gesamtzellextrakt (M = Marker).
- d):** Spektrophotometrische Bestimmung der RNaseLE Aktivität aus **c**. Die Balken zeigen die Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten.

4.2.2.3. Systemin-unabhängige wundinduzierte Expression der *RNaseLE*

Um die regulatorischen Faktoren und Signalelemente der wundinduzierten Expression der *RNaseLE* zu identifizieren, wurden bekannte Elemente des Wundsignalweges einzeln untersucht. Hierzu gehört das Systemin als zentrales Signal des Wundsignalweges.

Zunächst wurde die Induzierbarkeit der *RNaseLE* Expression durch exogen appliziertes Systemin bzw. ihr Ausbleiben durch das inaktive Analogon Systemin-17 mittels Northernblot-Hybridisierung untersucht (vgl. Kap. 3.3.). Die Kontrollhybridisierung wurde mit der cDNA des *PIN2* Gens, dessen wundinduzierte Expression Systemin-abhängig reguliert wird, durchgeführt. Die Expression von *PIN2* wird erwartungsgemäß durch Systemin, nicht aber durch Systemin-17, induziert (Abb. 10a). Demgegenüber konnte nach Systemin-Applikation keine bzw. nach 2 h und 4 h eine geringe Menge an *RNaseLE* Transkript detektiert werden. Nach Systemin-17-Behandlung wird das *RNaseLE* Gen nicht exprimiert (Abb. 10a). Obwohl temporär nur wenig *RNaseLE* mRNA nach Systemin-Behandlung akkumuliert, kann diese Expression eine geringe Systemin-Abhängigkeit der *RNaseLE* andeuten. Um diesen Zusammenhang genauer zu analysieren, wurde die Systemin-Abhängigkeit der wundinduzierten Genexpression der *RNaseLE* untersucht. WT-Blätter (*L. esculentum* cv. Lukullus) wurden mit dem inaktiven Systemin-17 vorbehandelt und 2 h später verwundet. Erwartungsgemäß wird das *PIN2* Gen nach Verwundung exprimiert. Das Ausbleiben der *PIN2* Transkriptakkumulation nach Vorbehandlung mit Systemin-17 (Abb. 10b und 10c) spricht für eine Rezeptorblockierung durch das inaktive Systemin. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert demgegenüber sowohl nach Verwundung als auch nach Vorbehandlung mit Systemin-17 und anschließender Verwundung (Abb. 10b und 10c). Das deutet auf eine wundinduzierte Expression der *RNaseLE* hin, die nicht über einen Systemin-Rezeptor vermittelt wird.

Um die Systemin-Unabhängigkeit der wundinduzierten *RNaseLE* Expression mit einem anderen Versuchsansatz zu belegen, wurde die Mutante *spr1* (*L. esculentum* cv. Castlemart) verwendet. Diese Mutante ist in der Systemin-Erkennung blockiert, wodurch die lokale und systemische *PIN2* Expression beeinträchtigt ist (Lee und Howe 2003). Die *spr1*-Pflanzen und

der korrespondierende WT (cv. Castlemart) wurden verwundet und Proben der verwundeten und systemischen Blätter analysiert. Die systemische Akkumulation der *PIN2* mRNA ist erwartungsgemäß in der *spr1*-Mutante wesentlich geringer als im WT (Abb. 10d). Allerdings wird die lokale *PIN2* Expression in der *spr1*-Mutante erst 8 h nach Verwundung reprimiert. Dagegen akkumuliert die *RNaseLE* mRNA lokal nach Verwundung sowohl in der *spr1*-Mutante als auch im WT (Abb. 10d). Die vorliegenden relativen *RNaseLE* Transkriptmengen sind in *spr1* und im WT nahezu identisch, obwohl die *spr1*-Mutante in der Systemin-Perzeption blockiert ist (Abb. 10d). Weiterhin ist zu bemerken, dass die wundinduzierte Expression der *RNaseLE* in der *spr1*-Mutante und im korrespondierenden WT, cv. Castlemart, stärker als im WT, cv. Lukullus, (vgl. Abb. 19a) induziert wird. Mit den zwei unabhängigen Versuchsansätzen konnte eine Systemin-unabhängige Regulation der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort bestätigt werden.

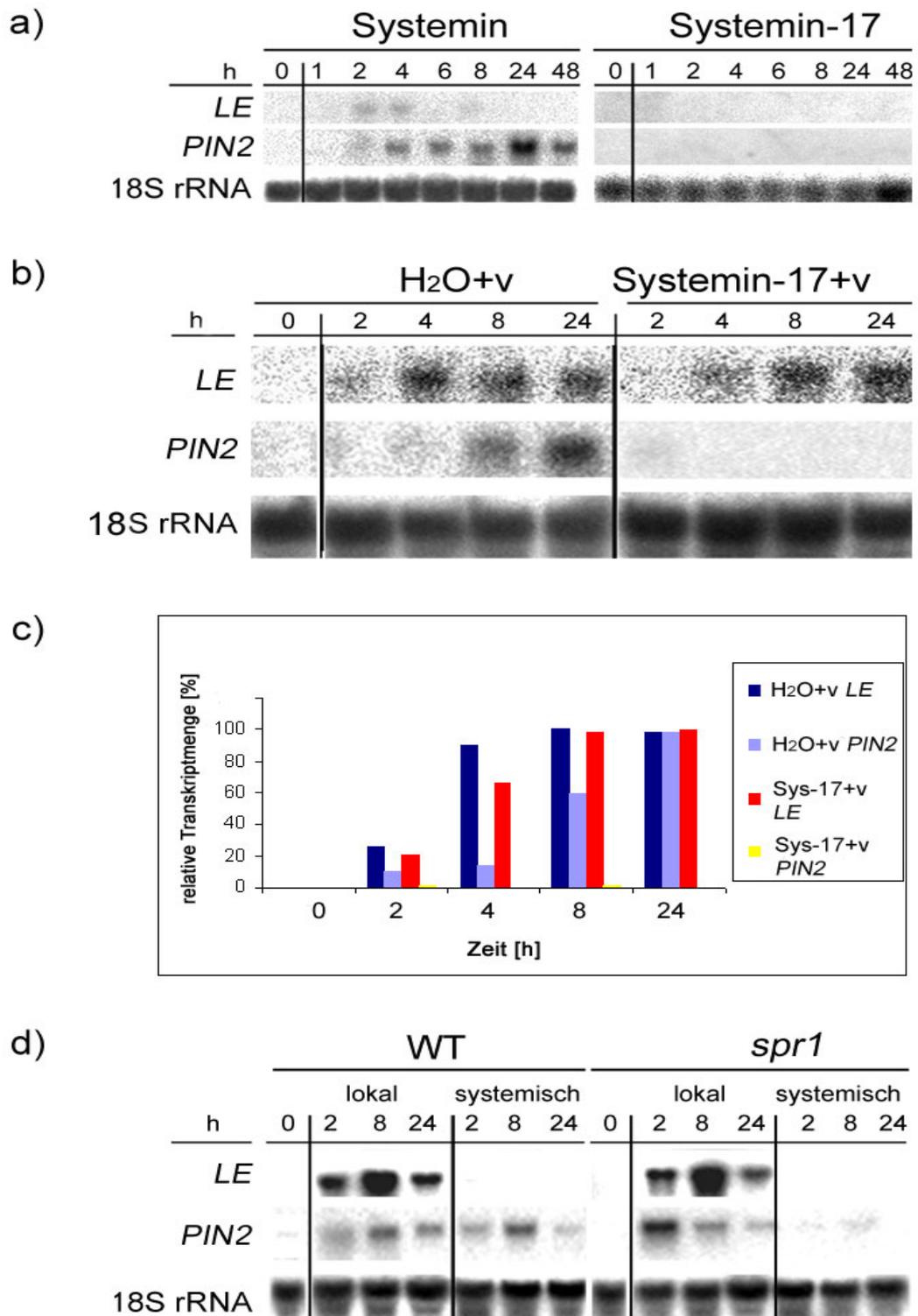


Abb. 10 Einfluss von Systemin auf die Expression der *RNaseLE* im Vergleich zu *PIN2*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern (cv. Lukullus) nach exogener Applikation mit 5 pM Systemin bzw. 5 pM Systemin-17. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von *L. esculentum*-Blättern nach 2 h Vorinkubation mit 5 pM Systemin-17 bzw. ddH₂O und anschließender Verwundung.

d): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **c**.

e): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von lokal und systemischen *spr1*- und WT-Blättern (cv. Castlemart).

f): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **e**.

4.2.2.4. JA-unabhängige wundinduzierte *RNaseLE* Expression

Ein weiteres Signal in der Wundantwort ist JA. Dabei können JA und Abscisinsäure (ABA) synergistisch die Genexpression in der Wundantwort regulieren. Da die Expression wundinduzierter Gene, wie *PIN2*, zum größten Teil JA-abhängig reguliert wird, wurde die *RNaseLE* Expression auf eine mögliche JA-Abhängigkeit untersucht.

Die Induzierbarkeit der *RNaseLE* Expression durch ABA, Jasmonatmethylester (JAME) und das hochaktive JA-Analogon, Indanoylthylisoleucin (Eth-In), wurde zunächst untersucht (Kap. 3.3.). Das *RNaseLE* Transkript ist weder nach exogener Applikation mit ABA und JAME, noch nach exogener Applikation mit Eth-In nachweisbar (Abb. 11a), was auf eine JA-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression hindeutet. Die *PIN2* mRNA akkumuliert erwartungsgemäß nach JAME- bzw. Eth-In-Applikation.

Da keine *RNaseLE* mRNA nach exogener JA-Applikation akkumuliert, wurde weiterhin untersucht, welche regulatorische Wirkung die Modulation endogener JA-Gehalte auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression hat. Für diese Versuche wurden transgene AOC-Tomatenlinien (cv. Lukullus) verwendet, die das *AOC* Gen in *sense* bzw. *antisense* Orientierung unter Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors enthalten (Stenzel et al. 2003). Die 35S::*AOCsense*-Linie weist im Vergleich zum WT einen konstitutiv hohen *AOC* mRNA und Proteingehalt auf. Nach Verwundung ist in der transgenen Tomatenlinie der JA-Gehalt 2,5-fach höher als im WT (Stenzel et al. 2003). Dagegen ist in der 35S::*AOCantisense*-Linie das *AOC* Transkript und das entsprechende Protein nicht detektierbar und der JA-Gehalt liegt im Vergleich zum WT unter 10 % (Stenzel et al. 2003). Diese transgenen Pflanzen wurden verwundet, wie unter Kap. 3.3. beschrieben. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben der verwundeten und unverwundeten (systemischen) Blätter genommen, Gesamt-RNA isoliert und die Akkumulationen der *RNaseLE*, *PIN2* und *AOC* mRNA's mittels Northernblot-Hybridisierungen untersucht. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert lokal nach Verwundung sowohl in den überexprimierenden 35S::*AOCsense*-Pflanzen als auch in den

35S::AOC*antisense*-Pflanzen (Abb. 11b). Das zeigt eine JA-unabhängige wundinduzierte Regulation der *RNaseLE* Expression. Das JA-abhängige *PIN2* Gen wird erwartungsgemäß in den 35S::AOC*sense* Pflanzen im Vergleich zum WT lokal und systemisch stärker exprimiert. Dagegen ist die *PIN2* Expression in den 35S::AOC*antisense* Pflanzen lokal und systemisch reprimiert (Abb. 11b). Die Kontroll-Hybridisierung mit der *AOC* cDNA-Sonde bestätigt das konstitutive Auftreten in der *sense*- bzw. das Ausbleiben der *AOC* Transkripte in der *antisense*-Linie (Abb. 11b).

Weiterhin wurde die RNaseLE Aktivität 8 h nach Verwundung von WT-Pflanzen (*L. esculentum* cv. Lukullus) und den transgenen AOC-Pflanzen in verwundeten und systemischen Blättern mittels RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay gemäß 3.9.1.2. analysiert. Als Kontrolle diente der Gesamtzellextrakt aus Phosphatmangelzellen von *L. esculentum*, in dem die Aktivitäten der RNasen LV1, LV2, LX und LE nachweisbar sind. Ausschließlich die Aktivität der RNaseLE war lokal in verwundeten Blättern von WT-, 35S::AOC*sense*- und 35S::AOC*antisense*-Pflanzen nachweisbar (Abb. 11c). Die Quantifizierung dieser spezifischen ribonukleolytischen Aktivität ergab nahezu identische Werte in den transgenen AOC-Pflanzen und in den WT-Pflanzen von durchschnittlich $8 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ Gesamt-Protein (Abb. 11d).

Die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsansätze belegen, dass die Expression der *RNaseLE* in der Wundantwort JA-unabhängig reguliert wird.

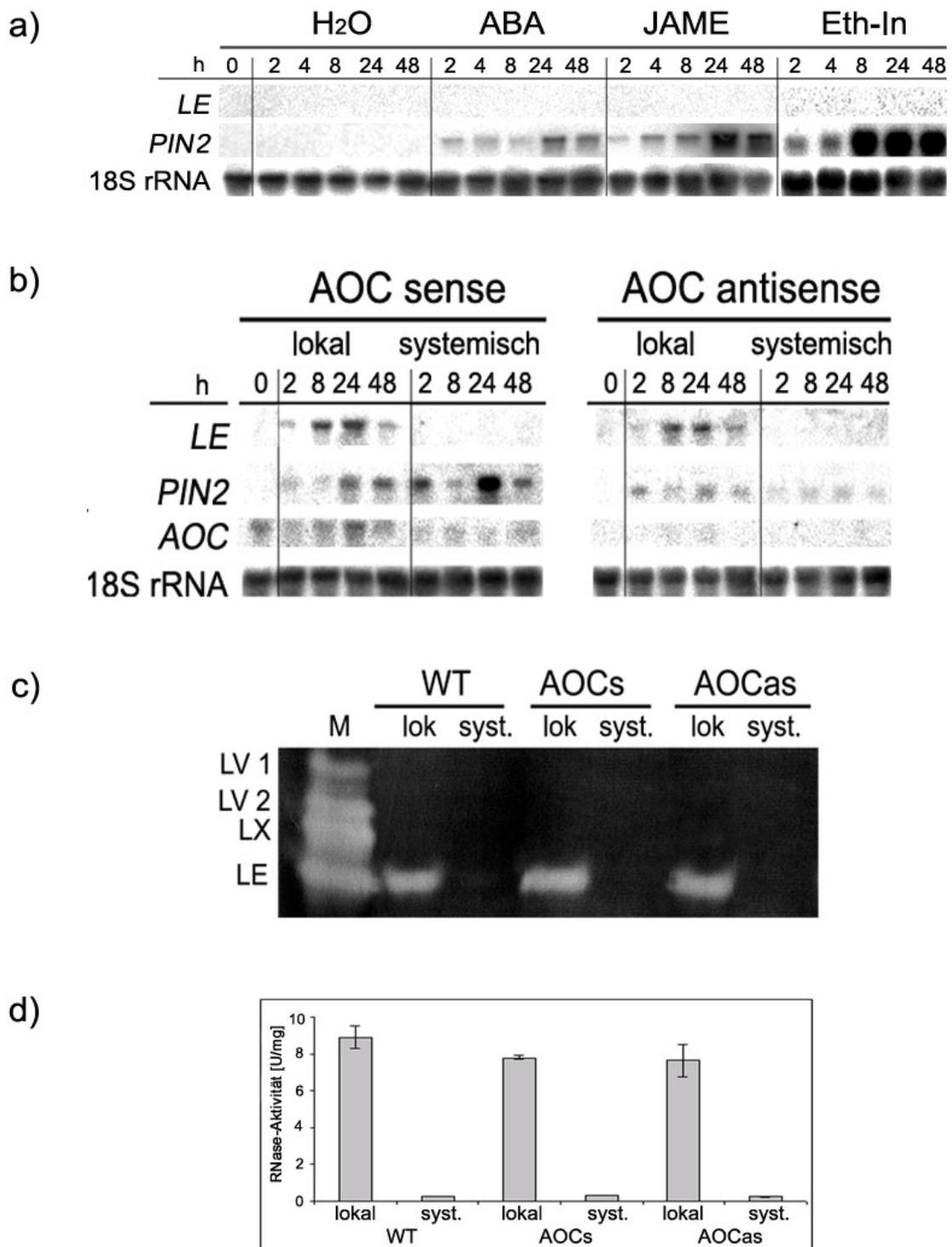


Abb. 11 Einfluss von JA auf die Expression der *RNaseLE* im Vergleich zu *PIN2*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach exogener Applikation mit ddH₂O, 100 μ M ABA, 50 μ M JAME und 50 μ M Eth-In. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von lokalen und systemischen 35S::*AOCsense* (AOCs)- und 35S::*AOCantisense* (AOCas)-Blättern. Nachweis der Akkumulation bzw. dem Ausbleiben der *AOC* mRNA in AOCs- bzw. AOCas-Pflanzen.

c): RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay mit 10 µg Gesamt-Protein von lokalen (lok) und systemischen (syst.) WT-, AOCs- und AOCas-Blättern 8 h nach Verwundung. Darstellung der Aktivitäten von RNaseLV1, RNaseLV2, RNaseLX und RNaseLE im Gesamtzellextrakt (M = Marker).

d): Spektrophotometrische Bestimmung der RNaseLE Aktivität aus **c**. Die Balken zeigen die Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten.

4.2.2.5. Aktivierung des *RNaseLE* Promotors nach Verwundung

Die bisherigen Untersuchungen haben die Systemin- und JA-Unabhängigkeit der lokal wundinduzierten *RNaseLE* Expression gezeigt. Um die transkriptionelle Aktivierung des *RNaseLE* Gens zu untersuchen, wurde in den transgenen PromLE1::*uidA*-Tomatenpflanzen die Aktivität des *RNaseLE* Promotors nach Verwundung, Systemin bzw. JAME-Behandlung analysiert. Die *RNaseLE* Promotoraktivität wird durch Verwundung aktiviert, wobei das Maximum von 34 U * mg⁻¹ Gesamt-Protein an gemessener spezifischer β-Glucuronidase-Aktivität 48 h nach Verwundung erreicht wurde (Abb. 12). Demgegenüber ist keine *RNaseLE* Promotoraktivität nach JAME-Behandlung detektierbar (Abb. 12). Nach Systemin-Behandlung ist kein Anstieg der β-Glucuronidase-Aktivität zu erkennen und die durchschnittliche Promotoraktivität liegt noch unter 7 U * mg⁻¹ Gesamt-Protein.

Diese Analysen zur *RNaseLE* Promotoraktivität bestätigen eine Systemin- bzw. JA-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression und eine starke transkriptionelle Aktivierung nach Verwundung.

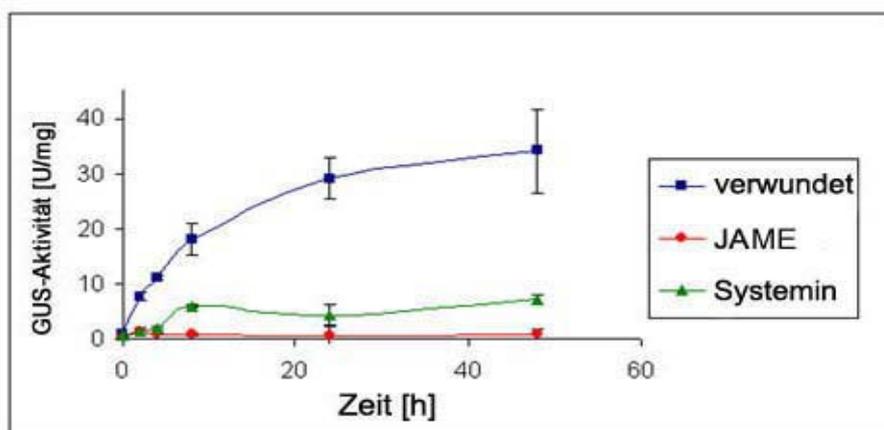


Abb. 12 *RNaseLE* Promotoraktivität nach Verwundung und Systemin- bzw. JAME-Applikation.

Spektrophotometrische Bestimmung der β-Glucuronidase-Aktivität von verwundeten bzw. mit 5 pM Systemin und 50 µM JAME behandelten PromLE1::*uidA*-Blättern. Die Balken zeigen die Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten.

4.2.2.6. Geringe Ethylen-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression

JA und Ethylen können synergistisch die *PIN2* Expression in der Wundantwort regulieren (O'Donnell et al. 1996). Da nach Verwundung die *RNaseLE* JA-unabhängig reguliert wird, wurde untersucht, ob andere Faktoren, wie Ethylen die wundinduzierte Expression der *RNaseLE* beeinflussen.

Dazu wurde die Induzierbarkeit der *RNaseLE* Expression durch Ethefon, einem synthetischen Analogon von Ethylen, und 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC), dem Präkursor des Ethylens, nach 8 h exogener Applikation untersucht. ACC ist das Substrat der ACC-Oxidase (ACO) und wird häufig zur Untersuchung von Ethylenstress eingesetzt. Die Akkumulationen der *RNaseLE*, *PIN2* und *ACO* mRNA's wurden mittels Northernblot-Hybridisierungen analysiert. Die *RNaseLE* Transkripte akkumulieren nach Ethefon- und ACC-Behandlung nur in geringen Mengen. Die relative *RNaseLE* Transkriptmenge erreicht Werte von durchschnittlich 15 % bezogen auf das Maximum an akkumulierter Transkriptmenge (Abb. 13a und 13b). Dagegen wird die Expression des JA induzierbaren *PIN2* Gens stark durch Ethefon erhöht (Abb. 13b). Das Kontrollgen *ACO* akkumuliert sowohl nach Ethefon als auch nach ACC-Behandlung (Abb. 13a). Der Versuch gibt Hinweise auf eine geringfügige Ethylen-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression.

Um die Ethylenwirkung auf die *RNaseLE* Expression nach Verwundung zu untersuchen, wurden WT-Blätter 2 h mit ACC, AVG, einem Inhibitor der Ethylenbiosynthese, bzw. ddH₂O vorinkubiert, anschließend verwundet und nach 8 h Northernblot-Analysen durchgeführt. Die wundinduzierte Expression der *RNaseLE* wird durch ACC um 10 % im Vergleich zu ddH₂O stimuliert (Abb. 13a und 13b), was auf die *PIN2* Expression nicht zutrifft. Dagegen hat AVG keinen Einfluss auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression (H₂O+v). Die Expression der *ACO* ist unabhängig von der Verwundung und wird durch AVG um 47 %, im Vergleich zu ACC+v reprimiert (Abb. 13b). Das bestätigt die AVG- bzw. ACC-Wirkung.

Die Ergebnisse deuten an, dass Ethylen an der wundinduzierten Expression der *RNaseLE* beteiligt sein könnte, wobei weitere Expressionsanalysen mit Mutanten, die z.B. in der Ethylenbiosynthese beeinträchtigt sind, eine eindeutige Aussage geben würden.

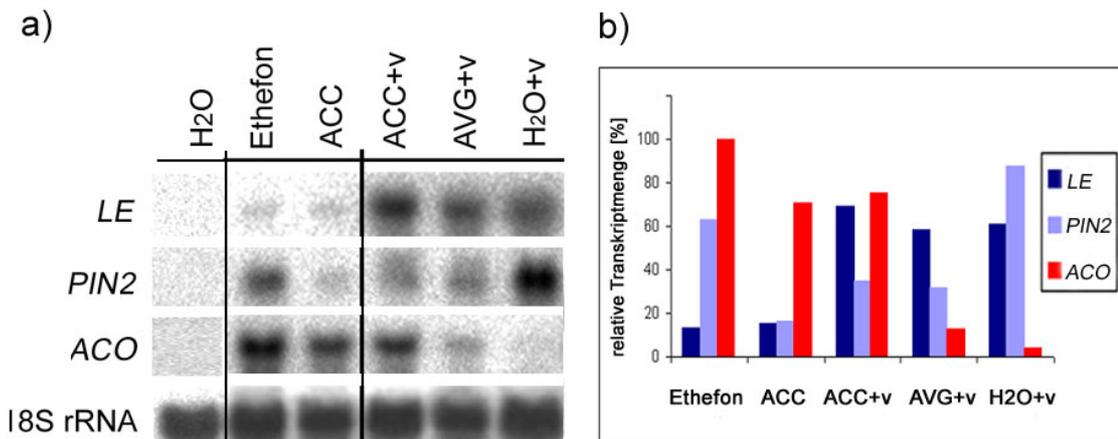


Abb. 13 Akkumulation der *RNaseLE* mRNA nach Ethylenwirkung im Vergleich zu *PIN2* und *ACO*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach exogener Applikation mit 20 mM Ethefon und mit 50 μ M ACC sowie nach 2 h Vorinkubation mit 50 μ M ACC, 10 μ M AVG bzw. ddH₂O und anschließender Verwundung. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE*, *PIN2* und *ACO* mRNA aus **a**.

4.2.2.7. ROS-unabhängige wundinduzierte Expression der *RNaseLE*

Bei Verwundung entstehen reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS), wie z.B. Wasserstoffperoxid. Die Bildung dieser Verbindungen erfolgt während der Wundantwort durch eine NADPH-Oxidase. Chemische Inhibitoren dieser NADPH-Oxidase, wie Imidazol und Pyridin, verhindern u. a. die Erzeugung von Wasserstoffperoxid und beeinträchtigen damit die Expression von wundinduzierten Genen, wie z. B. *PIN2* (Orozco-Cardenas et al. 2001). Um den Einfluss solcher Inhibitoren auf die Expression der *RNaseLE* nach Verwundung zu untersuchen, wurden WT-Blätter 30 min in Imidazol, Pyridin bzw. als Kontrolle in ddH₂O vorinkubiert, anschließend verwundet und nach 8 h Northernblot-Analysen durchgeführt. Diese zeigten, dass die wundinduzierte *RNaseLE* Expression weder durch Pyridin noch durch Imidazol beeinflusst wird (Abb. 14a und 14b). Die Expression von *PIN2* wird erwartungsgemäß nach Verwundung durch beide NADPH-Oxidase Inhibitoren um das 5-fache, im Vergleich zu ddH₂O, reprimiert (Abb. 14b).

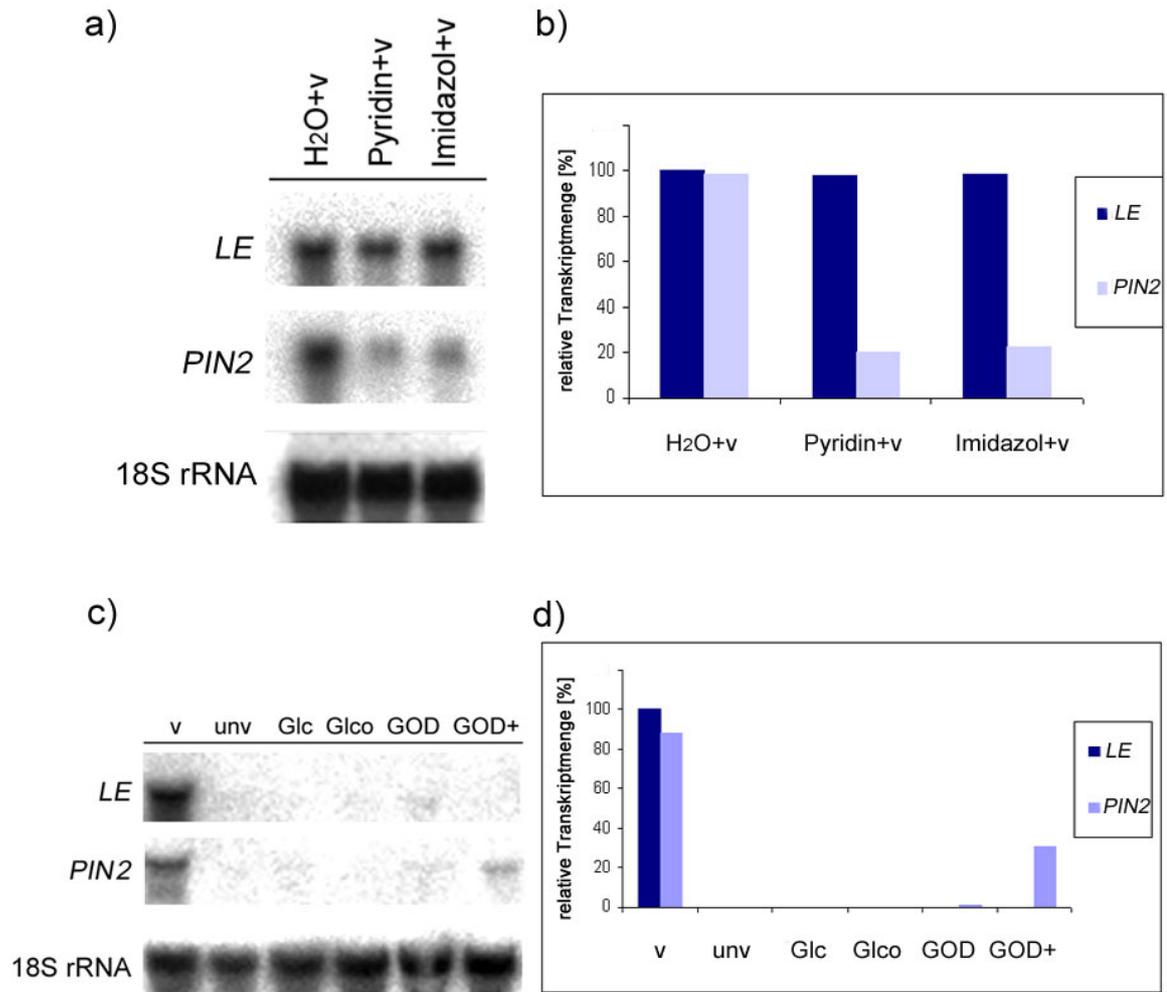


Abb. 14 Einfluss von endogen gebildeten ROS (**a**, **b**) bzw. Wasserstoffperoxid (**c**, **d**) auf die Expression der *RNaseLE* im Vergleich zu *PIN2*.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach 30 min Vorinkubation mit ddH₂O, 40 mM Pyridin, 20 mM Imidazol und anschließender Verwundung. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

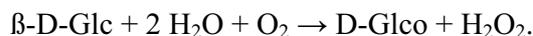
b): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von *L. esculentum*-Blättern nach Inkubation mit 10 mM Phosphatpuffer, pH 6,0 sowie in Phosphatpuffer mit 50 μM Glc, 50 μM Glco, 2,5 U * mL⁻¹ GOD und 2,5 U * mL⁻¹ GOD mit 50 μM Glc (GOD+) und als Kontrolle von verwundeten (v) bzw. unverwundeten (unv) Blättern.

d): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **c**.

Weiterhin wurde der Einfluss von intrazellulär erzeugtem Wasserstoffperoxid auf die *RNaseLE* Expression, analysiert. Bei Verwundung kann Wasserstoffperoxid als “second messenger“ die Expression von Abwehrgenen wie *PIN2* induzieren (Orozco-Cardenas et al. 2001). Um die Induzierbarkeit der *RNaseLE* Expression durch intrazellulären

Wasserstoffperoxid zu analysieren, wurde Wasserstoffperoxid endogen mittels Glukose-Oxidase (GOD) in der Pflanze erzeugt. Die Glukose-Oxidase katalysiert die Reaktion von β -D-Glukose zu D-Glukono-1,5-Lakton und Wasserstoffperoxid:



WT-Pflanzen wurden mit Glc und GOD für die Dauer von 8 h inkubiert. Keine *RNaseLE* mRNA war nach endogener H_2O_2 -Bildung bzw. in den Kontrollen mit Glc, Glco und GOD detektierbar (Abb. 14c und 14d). Die demgegenüber induzierte *PIN2* Expression bestätigt allerdings, dass Wasserstoffperoxid endogen gebildet wurde (Abb. 14c und 14d). Keine *PIN2* mRNA konnte nach Applikationen mit GOD bzw. Glc und Glco nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass Wasserstoffperoxid bzw. ROS keinen nachweisbaren Einfluss auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression haben.

4.2.2.8. SA-unabhängige wundinduzierte *RNaseLE* Expression

SA kann die Biosynthese von *PIN2* in der Wundantwort von *L. esculentum* inhibieren (Doares et al. 1995b). Welchen Einfluss SA auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression hat, wurde mit Expressionsanalysen untersucht.

WT-Blätter wurden mit unterschiedlich konzentrierter SA-Lösung behandelt. Die Northernblot-Hybridisierungen zeigen, dass SA die *RNaseLE* Expression nicht induziert (Abb. 15a). Demgegenüber akkumulieren *PIN2* Transkripte nach Behandlung mit 1 und 10 μM SA. Das Maximum relativer *PIN2* Transkriptmenge wird nach 12 h mit 10 μM SA erreicht (Abb. 15a; quantitative Auswertung nicht dargestellt).

Um weiterhin den Einfluss von SA auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression zu untersuchen, wurden WT-Blätter 3 h in SA bzw. in ddH₂O vorinkubiert, anschließend verwundet und in ddH₂O inkubiert. Die wundinduzierte *RNaseLE* Expression wird nicht durch SA beeinflusst (Abb. 15b und 15c). Dagegen wird die *PIN2* Expression durch SA bereits nach 2 h Verwundung um 64 %, im Vergleich mit ddH₂O reprimiert (Abb. 15b und 15c).

Die Ergebnisse liefern keine Hinweise auf eine SA-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort.

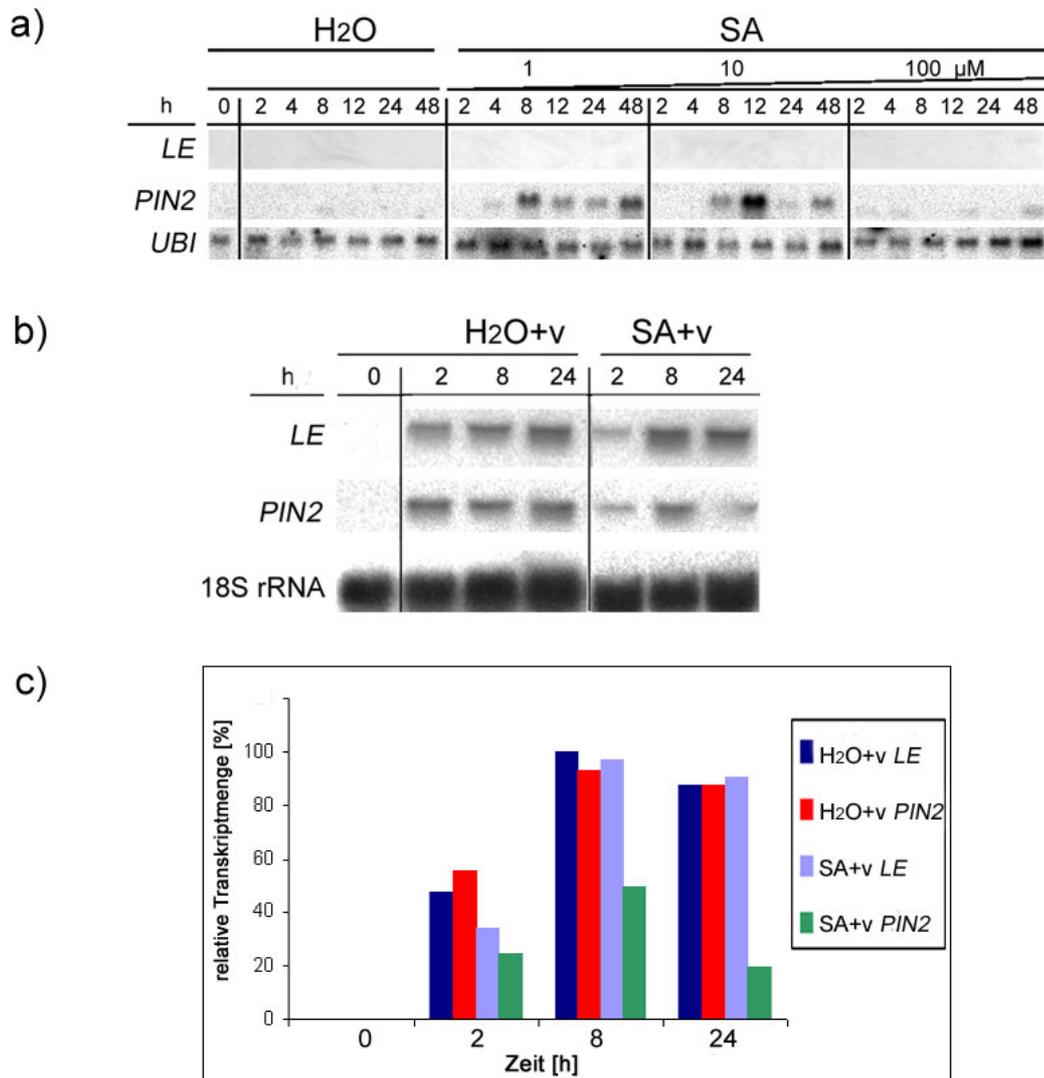


Abb. 15 Einfluss von SA auf die *RNaseLE* und *PIN2* Expression.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach exogener Applikation mit 1, 10 und 100 μ M SA bzw. ddH₂O. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung **a**.

b): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, von *L. esculentum*-Blättern nach 3 h Vorinkubation mit 10 μ M SA bzw. ddH₂O und anschließender Verwundung.

c): Darstellung der relativen Transkriptmenge der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA aus **b**.

4.2.2.9. Auxin-, Cytokinin- und Polyamin-unabhängige wundinduzierte *RNaseLE* Expression

Die *RNaseLE* Expression wird unabhängig von Systemin, JA, ROS und SA in der Wundantwort von *L. esculentum* reguliert, wie es die Ergebnisse der letzten Abschnitte belegten. Um die Wirkung anderer regulatorischer Substanzen wie Phytohormone und Polyamine auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression zu untersuchen, wurden WT-Blätter für 2 h in den jeweiligen Hormonlösungen vorinkubiert und danach verwundet. Keinen Einfluss auf die wundinduzierte Expression der *RNaseLE* haben die Polyamine, Spermin und Spermidin, sowie die Phytohormone Naphthalennessigsäure (NAA) und Kinetin (Abb. 16). Nach exogener Behandlung von WT-Blättern mit diesen Polyaminen bzw. Phytohormonen konnte ebenfalls keine *RNaseLE* Expression detektiert werden. Auf die wundinduzierte *PIN2* Expression ist auch kein Einfluss dieser Phytohormone erkennbar (Abb. 16). Eine Auxin-, Cytokinin- bzw. Polyamin-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort ist aufgrund dieser Untersuchungen nicht nachweisbar.

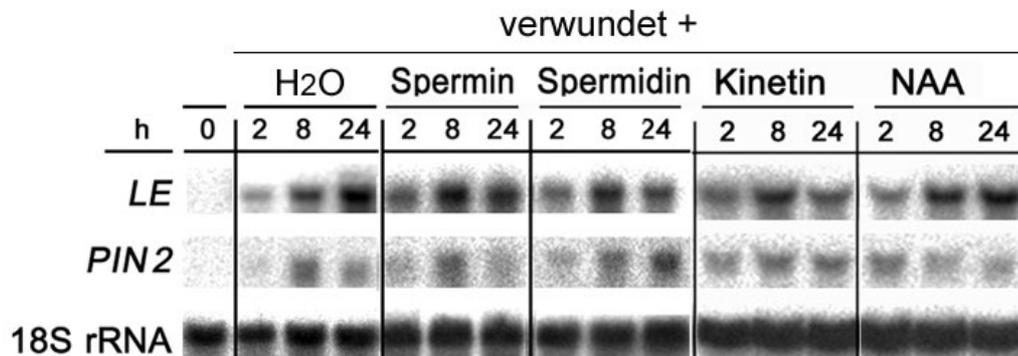


Abb. 16 Phytohormon-unabhängige wundinduzierte Akkumulationen der *RNaseLE* und *PIN2* mRNA.

Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Blättern nach 2 h Vorinkubation mit 100 μ M Spermin bzw. Spermidin, 1 μ M Kinetin, 0,5 μ M NAA bzw. ddH₂O und anschließender Verwundung. Nachweis des 18S rRNA Transkripts als Kontrollhybridisierung.

4.2.3. Lokalisation der RNaseLE nach Verwundung

Wundinduzierbare Gene werden in Abhängigkeit von ihrer Funktion in der Wundantwort gewebespezifisch exprimiert. Die Untersuchungen zum organ- und gewebeabhängigen Vorkommen der RNaseLE in *L. esculentum* haben gezeigt (vgl. Kap. 4.1.), dass die RNaseLE, phloemspezifisch, im Keimling und mit einer geringen Abundanz im Stengel und in Blüten der Pflanze vorkommt. In Blättern konnten keine mRNA, Promotoraktivität und kein Protein der RNaseLE detektiert werden. Demgegenüber erfolgt eine starke Aktivierung der RNaseLE nach einer Verwundung der Blätter (vgl. Abb. 10a-d und Abb. 12). Um Hinweise auf die Funktion der RNaseLE in der Wundantwort zu erhalten, wurde ihre gewebeabhängige Expression nach Verwundung untersucht.

4.2.3.1. Vorkommen der RNaseLE in verwundeten Blattnerven

Zunächst wurde die *RNaseLE* Expression in verwundeten Blatthauptnerven und verwundeten Blattlamina von *L. esculentum* cv. Lukullus verglichen. Dazu wurden Blatthauptnerven und Blätter verwundet und auf ddH₂O floriert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die verwundeten Blatthauptnerven isoliert bzw. von den verwundeten Blättern Probe genommen und Gesamt-RNA isoliert. Daneben wurden unverwundete WT-Blätter als Kontrollen in gleicher Art und Weise behandelt. Die Northernblot-Hybridisierungen ergaben, dass in den verwundeten Blatthauptnerven mehr *RNaseLE* Transkript, 59 % relative Transkriptmenge bei 8 h (Abb. 17b), als in verwundeten Blättern akkumuliert (Abb. 17a). Das Transkript der *RNaseLE* ist in unverwundeten Blättern bzw. Blatthauptnerven nicht detektierbar (Abb. 17b). Weiterhin wurde mit Westernblot-Analyse gemäß Kap. 3.8.2. untersucht, ob auch das Protein bevorzugt in den verwundeten Blatthauptnerven vorkommt. Das RNaseLE Protein ist 8 h nach Verwundung detektierbar, wobei es in den verwundeten Blatthauptnerven stärker als im verwundeten Blatt vorkommt (Abb. 17c). Die spezifische RNaseLE-Aktivität ist zu den jeweiligen Zeitpunkten in den verwundeten Blatthauptnerven durchschnittlich 3-fach höher als in den verwundeten Blättern (Abb. 17d).

Die Untersuchungen zeigen, dass die *RNaseLE* Expression nach Verwundung bevorzugt in den Blatthauptnerven induziert wird. Das Vorkommen von Protein und RNaseLE-Aktivität konzentriert sich ebenfalls auf die Blatthauptnerven. Um die *RNaseLE* Expression direkt in den verwundeten Blatthauptnerven des Blattes zu zeigen, wurde die Aktivität des *GUS* Reportergens in verwundeten Blättern der transgenen PromLE1::*uidA*-Pflanzen histochemisch

8 h nach Verwundung lokalisiert. Der *RNaseLE* Promotor ist nach Verwundung nicht nur im Blatthauptnerv, sondern auch in allen Venen höherer Ordnung aktiv (Abb. 17e/B). Im Mesophyll ist der *RNaseLE* Promotor demgegenüber nicht aktiv. Keine *RNaseLE* Promotoraktivität ist im unverwundeten Blatt detektierbar (Abb. 17e/A) und bestätigt die bisherigen Analysen.

Die Resultate, die aus diesen verschiedenen Methoden erhalten wurden, sprechen für eine leitgewebespezifische Expression bzw. ein leitgewebespezifisches Vorkommen der *RNaseLE* in der Wundantwort, jedoch erfordert dies eine genauere cytologische Analyse (siehe Kap. 4.2.3.2. und 4.2.3.3.).

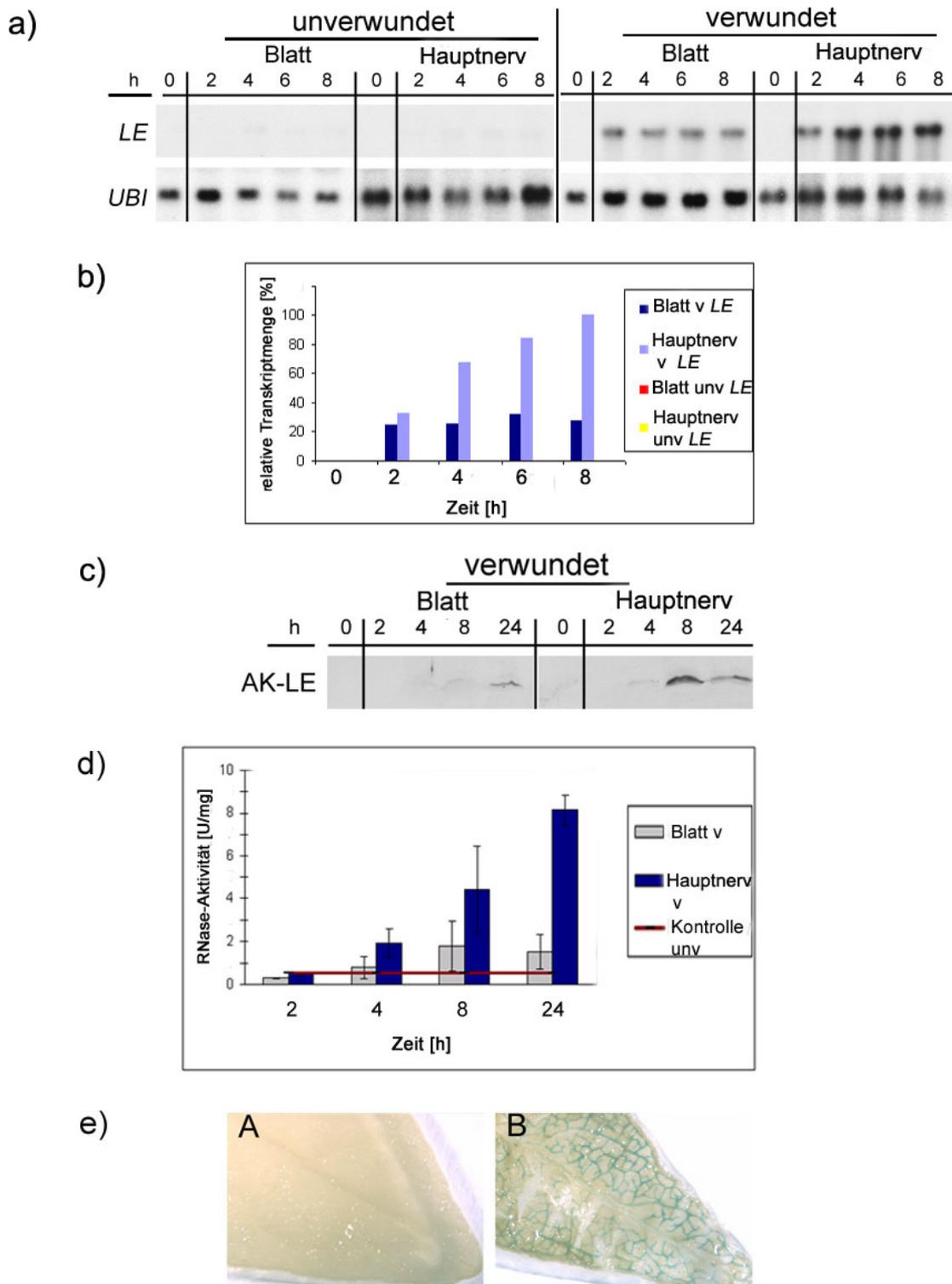


Abb. 17 Lokalisation von *RNaseLE* mRNA (**a**, **b**), Protein (**c**), RNase-Aktivität (**d**) und Promotoraktivität (**e**) nach Verwundung.

a): Northernblot-Hybridisierung von unverwundeten und verwundeten *L. esculentum*-Blättern bzw. -Blatthauptnerven. Nachweis des *UBI* Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE* mRNA aus **a**.

c): Westernblot-Hybridisierung mit 300 µg Gesamt-Protein von verwundeten Blättern bzw. Blatthauptnerven.

d): Spektrophotometrische Bestimmung der RNaseLE-Aktivität von unverwundeten und verwundeten Blättern bzw. Blatthauptnerven. Die Balken zeigen die natürliche Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten.

e): Histochemische GUS-Färbung der *RNaseLE* Promotoraktivität im unverwundeten (A) und im Leitgewebe vom verwundeten (B) PromLE1::*uidA*-Blatt.

4.2.3.2. Akkumulation der *RNaseLE* mRNA im Phloem an der Verwundungsstelle

In welchen Zellen des Leitgewebes die *RNaseLE* nach Verwundung exprimiert wird, wurde im folgenden Versuch mittels *in situ*-Hybridisierung untersucht. Dazu wurden Stengel von WT-Pflanzen oberhalb des ersten Internodiums mit einer Rasierklinge keilförmig verwundet. Das verwundete Stengelstück wurde nach 24 h in Paraffin gemäß Kap. 3.7.2.1. eingebettet und Längsschnitte (10 µm dicke) vom Verwundungsbereich mit DIG markierter *RNaseLEantisense* RNA-Einzelstrangsonde (Abb. 18A und 18C) bzw. als Kontrolle mit der *RNaseLEsense* Sonde (Abb. 18B) hybridisiert. Aus diesen Längsschnitten ist ersichtlich, dass die *RNaseLE* mRNA in den Siebröhren des Phloems und in den Leitgewebeparenchymzellen akkumuliert (Abb. 18A und 18C). Um die Leitgewebezelltypen besser zu identifizieren, wurden weiterhin Querschnitte verwendet. Die starke Induktion der *RNaseLE* Expression nach Verwundung wird beim Vergleich von verwundeten (Abb. 18J) und unverwundeten (Abb. 18F) Stengel-Querschnitten nochmals deutlich. Weiterhin ist aus den seriellen Querschnitten in Abb. 18G-L die Abnahme der Transkriptakkumulation bei zunehmender Entfernung von der Wundstelle ersichtlich. An der Wundstelle akkumuliert die *RNaseLE* mRNA in den verwundeten Epidermis- und Rindenparenchym-Zellen (Abb. 18J, schwarze Pfeilspitzen) und in den Zellen des inneren und äußeren Phloems (Abb. 18J, 18H schwarze Pfeilspitzen). Neben den Phloemzellen akkumuliert das *RNaseLE* Transkript auch in den Parenchymzellen von Phloem und Xylem (Abb. 18K, Zellen zwischen Siebzellen und Tracheen). In den Kambiumzellen ist kaum eine Markierung sichtbar (Abb. 18K). Die Kontrollhybridisierung in Abb. 18E zeigt keine spezifische Markierung.

Die *in situ*-Hybridisierungen zeigen, dass die *RNaseLE* mRNA nach Verwundung in allen Zellen direkt an der Wundstelle und besonders in den Siebzellen des inneren und äußeren Phloems akkumuliert.

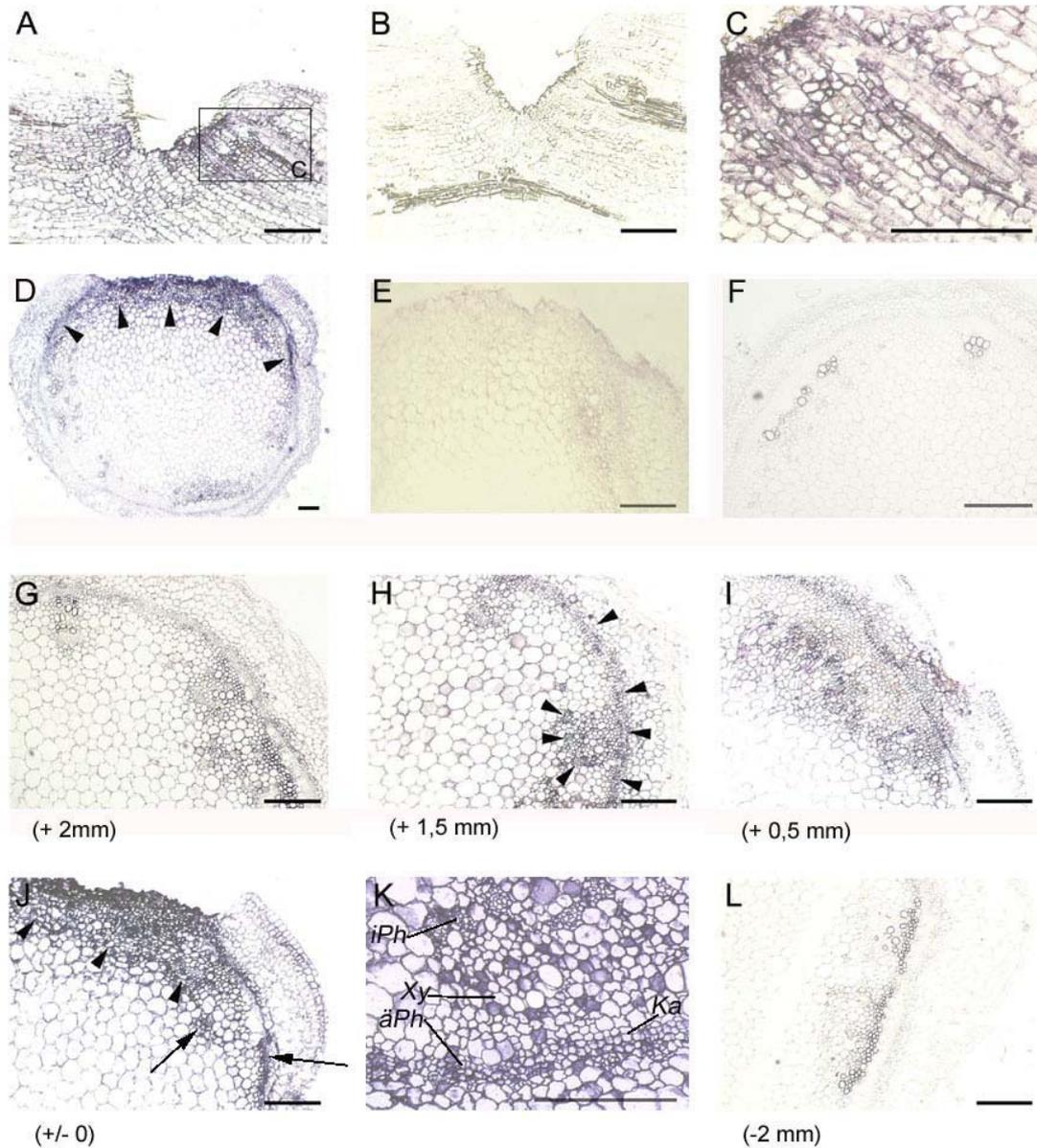


Abb. 18 Lokalisation von *RNaseLE* mRNA im Stengel von *L. esculentum* nach Verwundung.

A-L: *in situ*-Hybridisierung vom unverwundeten (**F**) und verwundeten Stengel (**A-E**, **G-L**) mit DIG markierter *RNaseLE* antisense RNA-Sonde (**A**, **C**, **D**, **F-L**) bzw. als Kontrolle mit der sense RNA-Sonde (**B**, **E**).

A-C: Längsschnitte von der Wundstelle des Stengels.

C: vergrößerter Ausschnitt aus **A**. Akkumulation der *RNaseLE* mRNA im Phloem und in Parenchymzellen. Keine spezifische Markierung in der Kontrollhybridisierung (**B**).

D, E: Querschnitte von der Wundstelle des Stengels. Akkumulation der *RNaseLE* mRNA in allen Zellen an der Wundstelle (**D**, schwarze Pfeile).

F: Querschnitt vom unverwundeten Stengel

G-L: Serie von Stengelquerschnitten durch die Wundstelle (+/- 0).

K: vergrößerter Ausschnitt aus **H**. Akkumulation der *RNaseLE* mRNA in Zellen des äußeren (*äPh*) und inneren Phloems (*iPh*, schwarze Pfeile in **H**) sowie in Parenchymzellen des Phloems bzw. Xylems (*Xy*).

[eine Einheit = 50 μ m (**A-J**, **L**), 10 μ m (**K**)]

4.2.3.3. Vorkommen des RNaseLE Proteins in den Siebzellen an der Verwundungsstelle

Das gewebespezifische Vorkommen des RNaseLE Proteins wurde nach Verwundung immunocytochemisch untersucht (Kap. 3.8.3.). Stengel von WT-Pflanzen wurden oberhalb des ersten Internodiums keilförmig verwundet und nach 24 h in PEG eingebettet. In Abb. 19A und 19C sind Längsschnitte von Siebzellen des verwundeten Stengels dargestellt. Die RNaseLE, deren Vorkommen durch eine grüne Fluoreszenz angezeigt wird, ist in den Siebzellen des Phloems lokalisiert (Abb. 19A und 19C). Kein RNaseLE Protein wurde direkt an der Wundstelle detektiert. In den Siebelementen des unverwundeten Stengels kommt weniger RNaseLE Protein (Abb. 19D) als im verwundeten Stengel (Abb. 19C) vor. Der Kontrollversuch mit dem Präimmunserum in Abb. 19F ergibt keine spezifische Markierung. Aus den Analysen ist ersichtlich, dass das Protein der RNaseLE nach Verwundung in den Siebzellen des Phloems vorkommt. An der Wundstelle konnte die RNaseLE im Gegensatz zum Transkript nicht detektiert werden, wobei ein Herauswaschen des Proteins aus der Verwundungsstelle infolge der Fixiermethodik nicht ausgeschlossen werden kann.

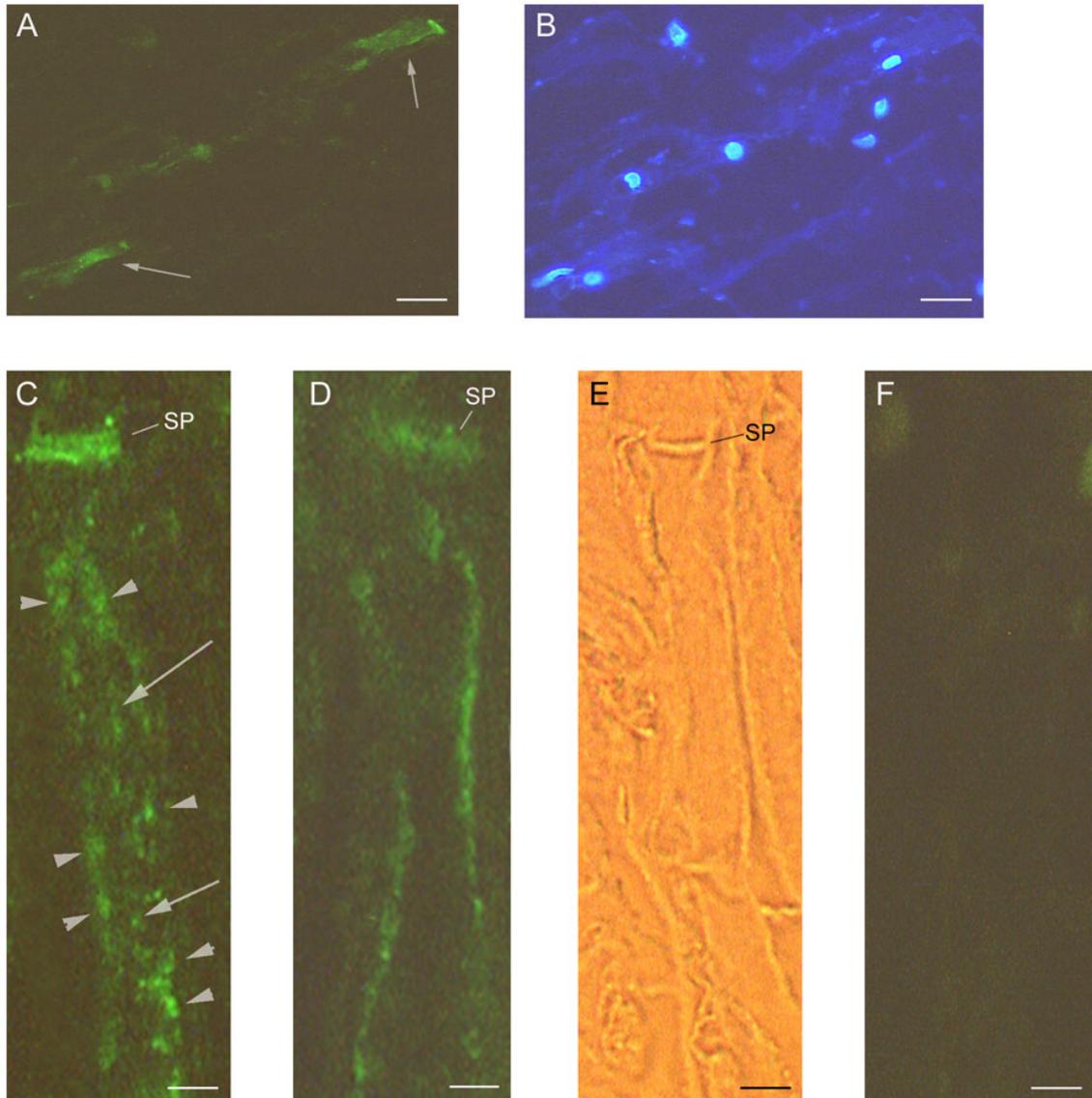


Abb. 19 Vorkommen von RNaseLE Protein in den Siebzellen des verwundeten Stengels von *L. esculentum*.

A-F: Immuncytochemischer Proteinnachweis (Längsschnitte 2 μm dick) vom verwundeten (**A**, **C**, **F**) bzw. unverwundeten (**D**) Stengel mit RNaseLE-Antikörper (**A**, **C**, **D**) und dem korrespondierenden Präimmunserum (**F**). Die grüne Fluoreszenz (**A**, **C**, **D**, weiße Pfeile) zeigt RNaseLE in Siebzellen des Phloems an. Gelbe Autofluoreszenz (**A**, **C**, **D**) kennzeichnet die Siebplatten (SP).

B: DAPI-Färbung der Zellkerne

E: Hellfeldaufnahme einer Siebzelle

[eine Einheit = 10 μm (**A**, **B**), 5 μm (**C-F**)]

4.2.4. Regulation der *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel

Aus früheren Analysen von kultivierten Tomatenzellen ist die Phosphatmangelinduzierbarkeit der *RNaseLE* Expression (Köck et al. 1995; Köck et al. 1998) und die Sekretion des Enzyms bei Phosphatmangel bekannt (Nürnberger et al. 1990). Untersuchungen zur Phosphatmangelantwort der *RNaseLE* in der Pflanze wurden bislang nicht durchgeführt. In den folgenden Kapiteln werden regulatorische Faktoren der phosphatmangelinduzierten *RNaseLE* Expression und ihre Lokalisation in der Pflanze untersucht.

Auf Phosphatmangel antworten Pflanzen mit Änderungen in der Genexpression. Diese differentielle Expression, wobei zahlreiche phosphatmangelinduzierbare Gene aktiviert werden, ist von der Phosphatkonzentration, der Dauer des Phosphatmangels und dem Zusammenspiel von Phytohormonen abhängig. Die Phytohormone Auxin, Cytokinin und Ethylen sind vermutlich Teil der Signaltransduktion in der Phosphatmangelantwort. Die meisten Phosphatmangel-vermittelten Änderungen in der Genexpression sind das Ergebnis von spezifischen Interaktionen von *trans*-Faktoren mit konservierten *cis*-Elementen von Promotoren phosphatmangelinduzierter Gene. Die transkriptionelle Aktivierung von phosphatmangelinduzierbaren Genen in *S. cerevisiae* basiert auf derartige Interaktionen (PHO-Regulon). In der Promotorsequenz der *RNaseLE* konnten *cis*-Elemente mittels Datenbank-Analyse identifiziert werden, die denen der PHO-Bindestelle von *S. cerevisiae* gleichen (Stenzel 1998). Für die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression wurde die Abhängigkeit von den genannten regulatorischen Faktoren in den folgenden Abschnitten untersucht.

4.2.4.1. *RNaseLE* Expression wird abhängig vom Phosphatmangel reguliert

Bei welcher Phosphatkonzentration die *RNaseLE* Expression induziert wird, wurde in 14 d alten WT-Keimlingen, die in Minerallösung mit unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen hydroponisch kultiviert wurden, analysiert. Mittels Northernblot-Hybridisierungen wurden die Transkriptakkumulationen der *RNaseLE* und zum Vergleich, die von *LePT2*, einem phosphatmangelinduzierbaren Transporter aus *L. esculentum*, untersucht. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert nur, wenn kein Phosphat in der Minerallösung enthalten ist (Abb. 20a). Das Transkript von *LePT2* akkumuliert bereits bei Phosphatversorgung (400 μ M), wobei die

maximale *LePT2* Transkriptmenge in den Keimlingen detektiert wurde, die ohne Phosphat angezogen worden sind (Abb. 20a und 20c).

Da nur die Anzucht von Keimlingen in phosphatfreier Minerallösung (P-) zur Induktion der *RNaseLE* Expression führt, wurde die Konzentration von +/- 400 μM Phosphat für alle folgenden Versuche zur Lokalisation und Regulation benutzt. Zur Untersuchung des Einflusses der Zeitdauer von Phosphatmangel auf die *RNaseLE* Expression wurden Keimlinge 14 d lang kultiviert und während dieser Kultivierungszeit von (P+) auf (P-) an den entsprechenden Tagen umgesetzt. Die Northernblot-Hybridisierungen zeigen, dass die *RNaseLE* mRNA nur in den Keimlingen akkumuliert, die 14 d lang einem Phosphatmangel ausgesetzt waren (Abb. 20b). Die relative Transkriptmenge für *LePT2* steigt im Gegensatz dazu stetig mit zunehmender Zeit des Phosphatmangels in den Keimlingen an (Abb. 20b).

Die Resultate zeigen eine starke *RNaseLE* Expression in 14 d alten Keimlingen, die ohne Phosphatversorgung hydroponisch kultiviert wurden.

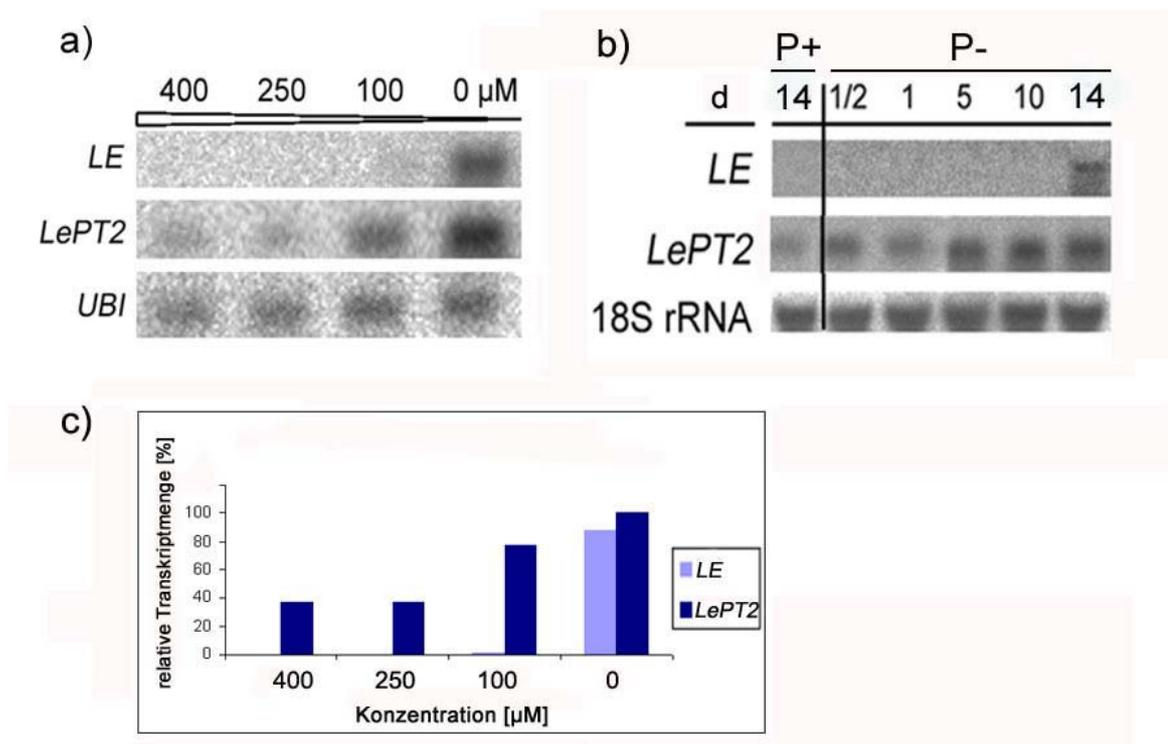


Abb. 20 Akkumulationen der *RNaseLE* und *LePT2* mRNA in Abhängigkeit von der Phosphatversorgung.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Keimlingen, kultiviert 14 d mit 400 μM , 250 μM , 100 μM bzw. ohne Phosphat (P-). Nachweis des *UBI* Transkripts als Kontrollhybridisierung.

b): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Keimlingen, kultiviert 14 d bzw. 1/2, 5, 10 d ohne Phosphat (P-) bzw. mit Phosphat (P+). Nachweis des 18S rRNA Transkripts zur Ladungskontrolle.

c): Darstellung der relativen Transkriptmenge von *RNaseLE* und *LePT2* mRNA aus **a**.

4.2.4.2. Phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression wird durch Cytokinine reprimiert

Viele morphologische Änderungen der Pflanze, die als Antwort auf Phytohormonbehandlungen auftreten, gleichen denen eines Phosphatmangels. Da die regulatorischen Signale der *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel bisher unbekannt sind, wurde der Einfluss von Auxin, Cytokinin und Ethylen auf die *RNaseLE* Expression untersucht. Die Versuche zur Hormonabhängigkeit der *RNaseLE* Expression wurden an Wurzeln von Keimlingen durchgeführt, die unter (P+)- und (P-) –Bedingungen wie in Kap. 3.4. beschrieben, kultiviert worden sind. Die Transkriptakkumulationen der *RNaseLE*, *LePT2*, des Auxin-induzierbaren *RSI* Gens und des Ethylen-abhängigen *ACO* Gens wurden mittels Northernblot-Hybridisierungen untersucht.

Das Auxin Naphthalenessigsäure (NAA) hat keinen Einfluss auf die phosphatmangelinduzierten Expressionen der *RNaseLE*, von *LePT2* und von *RSI* (Abb. 21a). Dagegen konnte eine geringfügige *RNaseLE* Repression durch das synthetische Auxin 2,4-Dichlorphenoxyssäure (2,4-D) bei Phosphatmangel detektiert werden. Unter (P+)-Bedingungen akkumuliert nach NAA- und 2,4-D-Applikation nur das *RSI* Transkript, wodurch die aus Tayler und Scheuring (1994) bekannte Auxin-Wirkung bestätigt wird (Abb. 21b). Diese Ergebnisse sprechen für die Auxin-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression.

Durch die Cytokinine, Kinetin und 6-Benzylaminopurin (BAP), wird die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* und *LePT2* Expression inhibiert (Abb. 21c). Keine Repression der phosphatmangelinduzierten *LePT2* Expression konnte nach einer 0,1 μ M Kinetin-Behandlung detektiert werden (Abb. 21c). Die Ergebnisse zeigen eine Repression der phosphatmangelinduzierten *RNaseLE* Expression durch Cytokinin.

Die Expressionen von *RNaseLE* und *LePT2* werden bei Phosphatmangel weder durch den Ethylen-Präkursor 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) noch durch den Inhibitor der Ethylenbiosynthese α -2-Aminoethoxyvinyl-Glycin (AVG) beeinflusst (Abb. 21d). Die *RNaseLE* Expression wird demgegenüber durch ACC unter (P+)-Bedingungen induziert (Abb. 21d). Das *ACO* (ACC-Oxidase) Transkript akkumuliert nach Behandlung mit ACC unabhängig von der Phosphatverfügbarkeit. Das spricht für eine Stimulierung der ACC-Oxidase durch das Substrat. Eine *ACO* Rexpression erfolgt nach Behandlung mit dem Ethylenbiosynthese-Inhibitor AVG in Übereinstimmung mit der Stimulation durch ACC (Abb. 21e).

Die Versuche zeigen eine geringfügige Ethylen-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression von exogen appliziertem ACC bei Phosphatanwesenheit. Demgegenüber wird die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression nicht durch Ethylen beeinflusst.

Aus den Resultaten wird die Komplexität von Hormoninteraktionen deutlich. Die Ergebnisse zur *RNaseLE* Expression nach Hormonapplikationen sind in Tab. 1 zusammengefasst dargestellt. Es gibt eine Cytokinin-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel. Welche Signaltransduktion für diese hormonelle Regulation verantwortlich ist, sollte Anreiz für weitere Untersuchungen sein. Neben den hier durchgeführten exogenen Hormonapplikationen würden Mutanten, die in der Biosynthese von Phytohormonen beeinträchtigt sind, einen weitaus besseren Einblick in die Regulation von Hormonen auf die phosphatmangelinduzierte Genexpression geben.

Tab. 1 Zusammenfassung zur Hormon(un)abhängigkeit der *RNaseLE* Expression unter (P+)- und (P-)–Bedingungen.

Hormongruppe	Hormon	Wirkung	
		P+	P-
Auxin	NAA / 2,4-D	keine	keine / wenig reprimierend
Cytokinin	Kinetin / BAP	keine	reprimierend
Ethylen	ACC	induzierend	keine

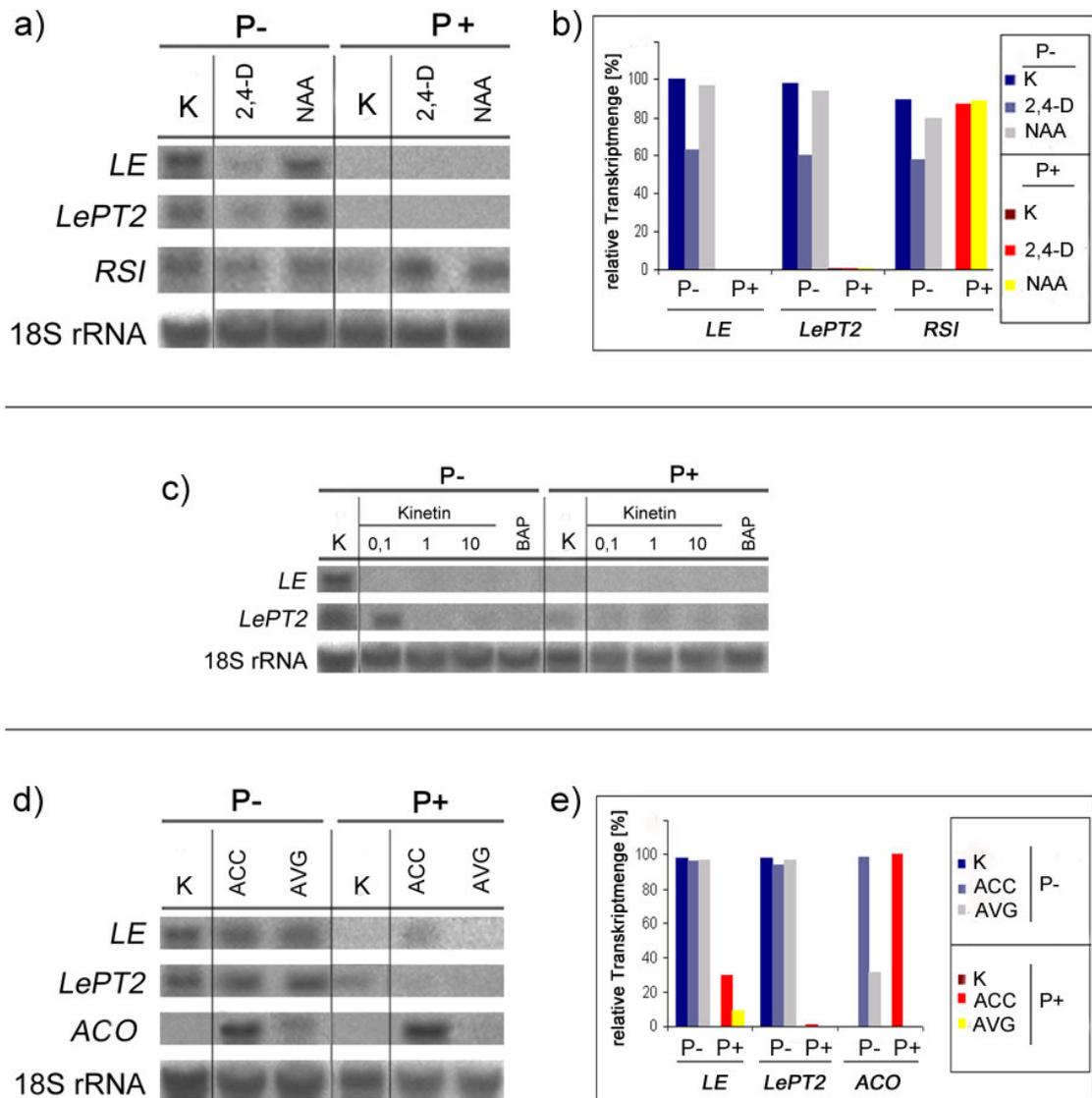


Abb. 21 Einfluss von Auxinen (**a**, **b**), Cytokinin (c) und Ethylen (**d**, **e**) auf Expressionen von *RNaseLE*, *LePT2*, *ACO* und *RSI* mRNA bei Phosphatmangel bzw. -versorgung.

a): Northernblot-Hybridisierung von *L. esculentum*-Wurzeln, Keimlinge kultiviert in (P-/P+)-Hoagland-Lösung (K), nach exogener Applikation mit 0,5 μ M 2,4-D bzw. 0,5 μ M NAA. Nachweis des 18S rRNA Transkripts zur Ladungskontrolle.

b): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE*, *LePT2* und *RSI* mRNA aus **a**.

c): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, nach exogener Applikation mit 0,1, 1 und 10 μ M Kinetin bzw. 1 μ M BAP.

d): Northernblot-Hybridisierung, wie in **a**, nach exogener Applikation mit 50 μ M ACC bzw. 10 μ M AVG.

e): Darstellung der relativen Transkriptmengen der *RNaseLE*, *LePT2* und *ACO* mRNA aus **d**.

4.2.4.3. *RNaseLE* Promotorregionen interagieren mit Kernproteinen bei Phosphatmangel

Die eukaryotische Genexpression wird durch Interaktionen von regulatorischen *cis*-Elementen des Promotors mit *trans*-Faktoren reguliert. Die Bindung eines *trans*-Faktors kann die Synthese eines Genproduktes induzieren oder reprimieren. Es wurden Promotorbereiche des *RNaseLE* Promotors auf Interaktionen mit Kernproteinen mittels Band-shift-Analysen untersucht, um Hinweise auf die Lage potentieller regulatorischer *cis*-Elemente, die an der Phosphatmangelantwort beteiligt sind, zu erhalten.

Für den Versuch wurden 100 – 300 bp lange DNA-Fragmente der 2,6 kbp umfassenden vollständigen 5'-upstream *RNaseLE* Promotorsequenz 5'-radioaktiv endmarkiert und für die Interaktionen mit den Kernproteinen, die aus kultivierten (P+) bzw. (P-)-Tomatenzellen isoliert wurden (Kap. 3.9.1.1.), eingesetzt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde zu allen Bindungsreaktionen 1 µg Poly(dI-dC) hinzugefügt. Die Band-shift-Analysen zeigen 6 Protein-DNA-Komplexe bei Phosphatmangel in den Fragmenten A, B, C, D, E und G (Abb. 22a). Der Einsatz von 2,5 µg Kernproteinextrakt erwies sich als optimal für die Bildung der Protein-DNA-Komplexe und wurde für die weiteren Experimente eingesetzt. In den Band-shift-Analysen mit Kernproteinen aus phosphatversorgten Zellen konnten dagegen keine Interaktionen detektiert werden (Abb. 22a). Für diese Untersuchungen wurden mehrere unabhängige Kernproteinextraktionen aus (P+/P-)-Zellen durchgeführt und jeweils für Band-shift-Analysen eingesetzt. Alle Wiederholungen erbrachten die gleichen Ergebnisse.

Die Daten zeigen, dass nur Proteinfaktoren aus Phosphatmangelzellen mit dem *RNaseLE* Promotor interagieren. Vermutlich sind DNA bindende Faktoren bei Phosphatversorgung nicht anwesend bzw. bindungsunfähig.

4.2.4.4. *RNaseLE* Promotorelemente interagieren spezifisch mit Kernproteinen

Um die Spezifität der 6 gefundenen Interaktionen nachzuweisen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Zu den jeweiligen markierten Fragmenten wurden nichtmarkierte Fragmente in 1- bzw. 20-fachem molarem Überschuss zu den Bindungsreaktionen gegeben. Ein 20-facher molarer Überschuss ist ausreichend, um die 6 Protein-DNA-Interaktionen zu kompetitieren (Abb. 22b). Weiterhin ist zu erkennen, dass bei einfachem molarem Kompetitorüberschuss die Intensitäten der Interaktionen bereits abnehmen. Die proportionale Abnahme der Bindungsintensität bei zunehmender

KompetitorKonzentration zeigt die Spezifität der Protein-DNA-Interaktionen. Als heterologer Kompetitor wurde restringiertes Bluescriptplasmid eingesetzt. Selbst ein 100-facher Überschuss an heterologen Kompetitoren hatte keinen Einfluss auf die Protein-DNA-Interaktionen der Fragmente A, B, C, D und E (Abb. 22b). Nur bei Fragment G führte dieser Überschuss zur Abschwächung der Protein-DNA-Interaktionen. Das bestätigt zusätzlich die Bindungsspezifität der nuklearen Faktoren mit den jeweiligen Promotorsequenzen. Nachdem die Spezifität der Protein-DNA-Interaktionen belegt worden ist, wurde weiterhin der proteinogene Charakter der Transkriptionsfaktoren überprüft. Dazu wurde der Zellkernextrakt 30 min mit ProteinaseK behandelt und anschließend für die Bindungsreaktionen mit den Promotorsequenzen eingesetzt. Die ProteinaseK-Behandlung führte zur vollständigen Denaturierung der Kernfaktoren, da keine der 6 gefundenen Protein-DNA-Interaktionen detektiert werden konnte (Abb. 22c). Das Resultat zeigt, dass die Bindungsfaktoren proteinogen sind und als Transkriptionsfaktoren angesehen werden können.

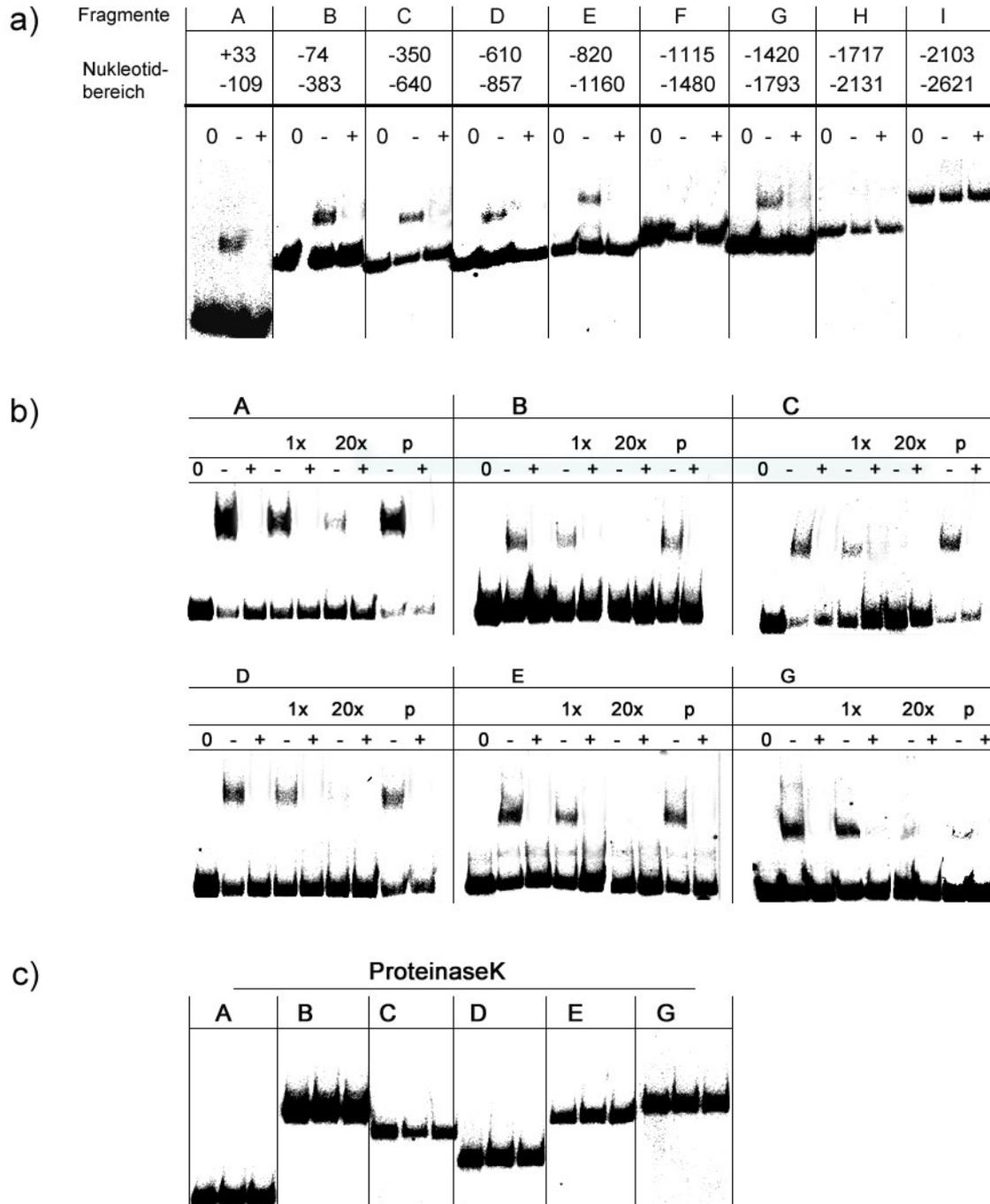


Abb. 22 Interaktionen von *RNaseLE* Promotorfragmenten mit Kernproteinen bei Phosphatmangel.

a): Band-shift-Analyse von 100 – 300 bp langen Promotorfragmenten der 2,6 kbp langen *RNaseLE* Promotorsequenz (siehe Nukleotidbereich) mit Zellkernproteinen aus phosphatversorgten (+) bzw. phosphatfreien (-) kultivierten *L. esculentum*-Zellen. Zur Kontrolle wurde ungebundenes Fragment (0) aufgetragen.

b): Band-shift-Analyse der Fragmente A, B, C, D, E und G, wie in **a**, in Gegenwart homologer, unmarkiertes Fragment in 1- bzw. 20-fach molarem Überschuss (1x; 20x), und heterologer, restringiertes pBluescript in 100-fachen molarem Überschuss (p), Kompetitoren.

c): Band-shift-Analyse, wie in **a**, nach Vorbehandlung der Zellkernproteinextrakte mit ProteinaseK und anschließender Bindungsreaktion mit den Fragmenten A, B, C, D, E und G.

4.2.4.5. Die Interaktionen umfassen Bereiche mit potentiellen *cis*-Elementen des *RNaseLE* Promotors

Das *RNaseLE* Gen wurde über eine genomische Bibliothek kloniert (Stenzel 1998). Die 2,6 kbp lange potentielle *RNaseLE* Promotorsequenz wurde subkloniert (pgLE5') und sequenziert. Die vollständige Sequenz ist in der EMBL-Genbank (Acc. Nr. Y17445) zugänglich. Mittels 5'-Race-Technik wurden der Transkriptionsstartpunkt, an der Nukleotidposition -47, 5'-upstream vom Translationsstartpunkt (+1) gelegen, und ein weiterer Transkriptionsstartpunkt an Nukleotidposition -150 identifiziert (Stenzel 1998; Köck et al. 2004). Der Haupttranskriptionsstartpunkt (-47) wird nach Stenzel (1998) als Position (+1) definiert. Alle Angaben zu Nukleotidpositionen beziehen sich in dieser Arbeit auf denselben Startpunkt.

Mittels einer Transkriptionsfaktor-Datenbank-Analyse [TRANSFAC, Heinemeyer et al. 1998) wurde die *RNaseLE* Promotorsequenz auf *cis*-Elemente, die in Promotorsequenzen phosphatmangelinduzierbarer Gene vorkommen, untersucht. Die konservierten *cis*-Elemente sind in Tab. 2 zusammengefasst. Die *RNaseLE* Promotorsequenz enthält an den Nukleotidpositionen -846 und -733 relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt zwei Sequenzbereiche, die der PHO4-Bindesequenz [CACGTG] entsprechen (Tab. 2). Der PHO4-Faktor ist ein positiver Regulator des PHO-Regulons in *S. cerevisiae* (Oshima 1997). Weiterhin kommen in den Promotorsequenzen bei -1560, -832 und bei -645 relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt drei PHO-Box-like Domänen (Helix-loop-helix) vor. Eine weitere Domäne, die NIT2-Sequenz [(TATCA(/T)A(/T)], konnte viermal an den Nukleotidpositionen -1355, -1198, +44 und +2, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, im *RNaseLE* Promotor identifiziert werden (Tab. 2). NIT2 ist ein positiver Regulationsfaktor im Nitratmetabolismus von *Neurospora crassa* (Fu und Marzluf 1990; Tao und Marzluf 1999). Neben diesen Elementen wurden fünf Promotorsequenzen bei -1488, -1177, -976, -735 und -192, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, identifiziert, die der Bindesequenz von PHR1 ähnlich sind. Der Transkriptionsfaktor PHR1 ist Bestandteil des Myb-basierenden Regulationssystems in *Chlamydomonas reinhardtii*, dessen Bindesequenz auch in *A. thaliana* identifiziert wurde (Rubio et al. 2001). Die verschiedenen *cis*-Elemente kommen in den Promotor Fragmenten A, B, D, E und G vor, in welchen Protein-DNA-Interaktionen bei Phosphatmangel detektiert werden konnten (Tab. 2).

Tab. 2 Regulatorische konservierte *cis*-Elemente des *RNaseLE* Promotors kommen in bestimmten Interaktionsregionen vor.

<i>cis</i> -Element	Sequenz	Position	Fragment (mit Interaktionen)
PHO-Element	CACGTG	-733	D
Helix-loop-helix-Element	CATATG	-832	D und E
NIT2-Element	TATCTA	-1355	E
	CATCAA	+2	A
Myb-like-Sequenz	GAATATAC	-192	B

4.2.5. Lokalisation der RNaseLE bei Phosphatmangel

Phosphatmangelinduzierbare Gene werden organ- und gewebeabhängig exprimiert, wobei häufig nur die Wurzel untersucht wurde. Die RNaseLE ist bei normaler Phosphatversorgung der Pflanze nicht in der Wurzel nachweisbar (vgl. Kap. 4.1.). Dagegen wurde aber eine starke Genexpression der *RNaseLE* bei Phosphatmangel nachgewiesen (vgl. Abb. 20a). Um Hinweise auf die Funktion der RNaseLE in der Phosphatmangelantwort zu erhalten, wurde analysiert, in welchem Organ des Keimlings *RNaseLE* Transkripte unter Phosphatmangelbedingungen bevorzugt akkumulieren. WT-Keimlinge, die in (P⁺)- und (P⁻)-Minerallösung 14 d lang angezogen worden sind, wurden in Wurzeln, Hypokotyle und Kotyledonen separiert. Die *RNaseLE* mRNA konnte in den Wurzeln und in den Kotyledonen nachgewiesen werden (Abb. 23a). Das *LePT2* Transkript akkumuliert demgegenüber in allen Keimlingsorganen (Abb. 23a).

Auf gleiche Art und Weise wurde die RNaseLE Aktivität in den Keimlingsteilen untersucht. Für diese Untersuchung wurden WT-Keimlinge genauso wie für die oben genannten Expressionsanalysen kultiviert. Der sensitive RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay weist RNaseLE Aktivität unter Phosphatmangel in Wurzeln und auch in Kotyledonen nach (Abb. 23b) und bestätigt die Transkriptionsuntersuchungen. Weiterhin konnte auch bei Phosphatverfügbarkeit eine geringe Aktivität detektiert werden.

Zur Bestimmung der *RNaseLE* Promotoraktivität in den jeweiligen Keimlingsorganen wurde die β -Glucuronidase-Aktivität spektrophotometrisch gemäß Kap. 3.6.1. von PromLE1::*uidA*-Keimlingsorganen gemessen. Das Maximum an *RNaseLE* Promotoraktivität wurde unter Phosphatmangel in den Keimlingswurzeln detektiert (Abb. 23c). Diese Promotoraktivität ist das 21-fache gegenüber der GUS-Aktivität in den phosphatversorgten Wurzeln (Abb. 23c). Der *RNaseLE* Promotor wird in den Kotyledonen unter (P⁻)-Bedingungen nur 6-fach induziert, im Vergleich zu (P⁺)-Bedingungen (Abb. 23c). Kein Anstieg von *RNaseLE* Promotoraktivität konnte dagegen im Hypokotyl detektiert werden.

Die Resultate zeigen, dass der *RNaseLE* Promotor im Keimling unter Phosphatmangel verstärkt in den Wurzeln aber auch in den Kotyledonen aktiv ist.

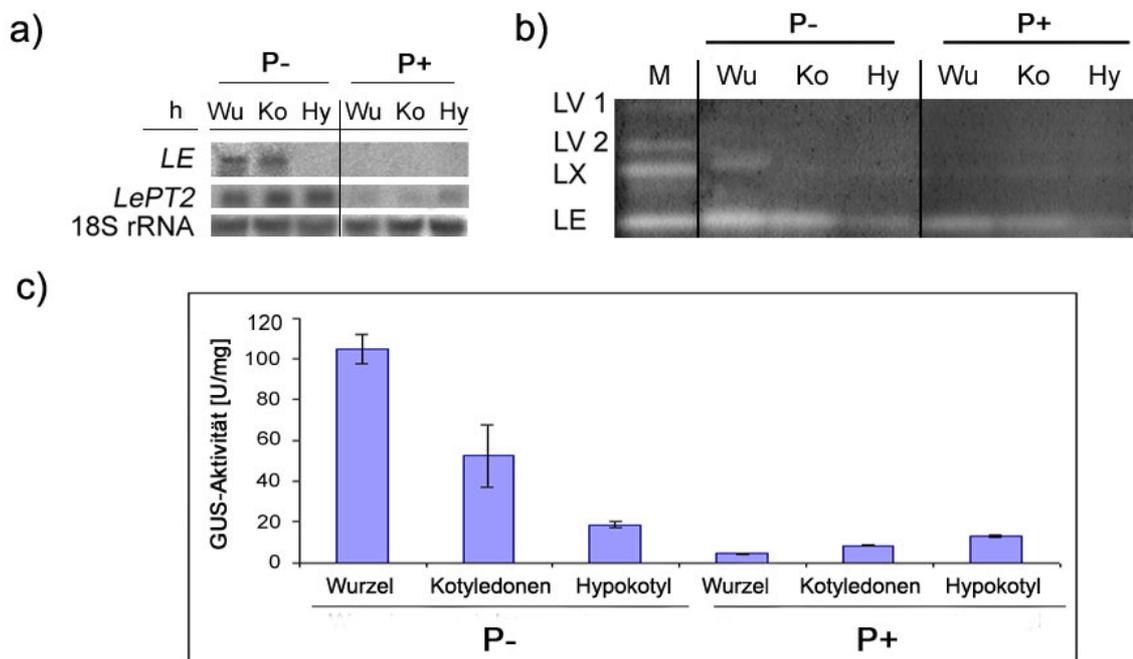


Abb. 23 Lokalisation von *RNaseLE* im Vergleich zur *LePT2* mRNA (a), *RNaseLE* Aktivität (b) und Promotoraktivität (c) in Keimlingsorganen bei Phosphatmangel/versorgung.

a): Northernblot-Hybridisierung von Wurzeln (Wu), Kotyledonen (Ko) und Hypokotylen (Hy) aus *L. esculentum*-Keimlingen. Nachweis des 18S rRNA Transkripts zur Ladungskontrolle.

b): RNase-Aktivitäts In-Gel-Assay mit 10 μ g Gesamt-Protein von den Keimlingsorganen. Darstellung der Aktivitäten von RNaseLV1, RNaseLV2, RNaseLX und RNaseLE im Gesamtzellextrakt (M = Marker).

c): Spektrophotometrische Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität von PromLE1::*uidA*-Keimlingsorganen. Die Balken zeigen die Standardabweichung von 6 unabhängigen Experimenten.

Es ergab sich die Frage, in welchen Geweben von Wurzeln und Kotyledonen der *RNaseLE* Promotor unter Phosphatmangel aktiv ist. Dazu wurde die *RNaseLE* Promotoraktivität histochemisch nachgewiesen (Kap. 3.6.2.). Die bei Phosphatmangel in der Wurzel detektierte *RNaseLE* Promotoraktivität konnte in den Seitenwurzeln (Abb. 24B und 24C) und in den Seitenwurzelinitialen (Abb. 24B und 24D) lokalisiert werden. In den Seitenwurzeln ist der *RNaseLE* Promotor mit hoher Evidenz in den Zellen des Phloems aktiv (Abb. 24C). GUS-Färbung in den Tracheen/Tracheiden und den Zellen des Zentralzylinders konnte nicht detektiert werden. Ein Längsschnitt durch eine Seitenwurzelanlage ist in Abb. 24E dargestellt. In der Seitenwurzelanlage ist der *RNaseLE* Promotor nur in den äußeren Zellen des Perizykels, unterhalb der Endodermis, aktiv (Abb. 24E). Weiterhin wurde *RNaseLE* Promotoraktivität im Leitgewebe der Kotyledonen bei Phosphatmangel (Abb. 24A) und mit geringerer Intensität bei Phosphatversorgung (Abb. 24F) lokalisiert.

Die Untersuchungen zur Lokalisation zeigen, dass der *RNaseLE* Promotor bei Phosphatmangel in den Perizykelzellen der Seitenwurzelanlagen und weiterhin im Phloem der neu entstandenen Seitenwurzeln aktiv ist. Dagegen konnte keine Promotoraktivität in den Wurzeln bei Phosphatversorgung histochemisch detektiert werden.

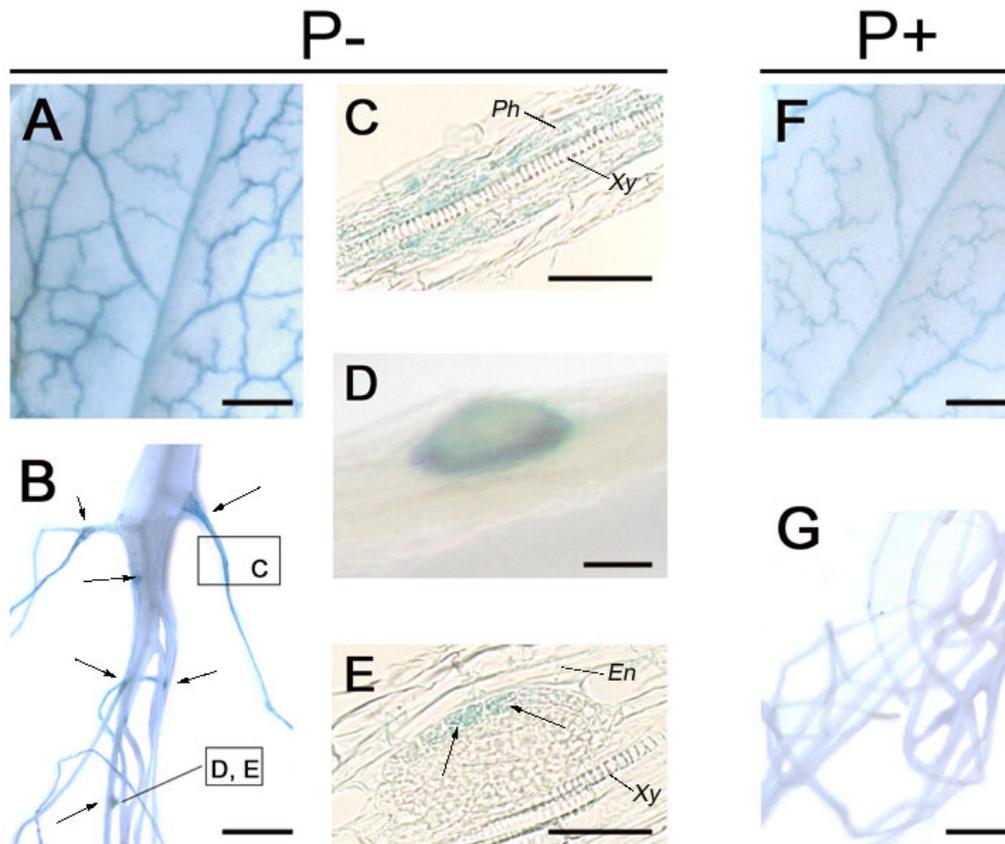


Abb. 24 Histochemische GUS-Färbung der *RNaseLE* Promotoraktivität von *PromLE1::uidA*-Keimlingen bei Phosphatmangel (P-) in Kotyledonen (A) bzw. Wurzeln (B-E) sowie bei Phosphatversorgung (P+) in Kotyledonen (F) bzw. Wurzeln (G).

B-E: Der *RNaseLE* Promotor ist im Phloem (*Ph*) der Seitenwurzeln (B schwarze Pfeile, C) und im Perizykel der Seitenwurzelninitialen (D, E schwarze Pfeile) aktiv. [*En* = Endodermis; *Xy* = Xylem)

[eine Einheit = 5 mm (B, G), 2,5 mm (A, F), 0,5 mm (D), 100 μ m (C, E)]

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle der RNaseLE in *L. esculentum* untersucht. Die Wundinduzierbarkeit (Lers et al. 1998; Stenzel 1998) und die Phosphatmangelinduzierbarkeit der *RNaseLE* Expression wurden durch frühere Untersuchungen belegt (Nürnberger et al. 1990; Köck et al. 1995; Köck et al. 1998). Um Erkenntnisse zur biologischen Funktion der RNaseLE zu erlangen, wurden die Regulation und die gewebeabhängige Lokalisation der *RNaseLE* Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien von *L. esculentum* und in der Wundantwort und Phosphatmangelantwort charakterisiert.

5.1. Rolle der RNaseLE in frühen Entwicklungsstadien von *L. esculentum*

Ein gewebespezifisches Vorkommen von T2-Typ RNasen ist bislang kaum untersucht worden. In dieser Arbeit wurde neben dem Nachweis des organspezifischen Vorkommens eine Analyse des gewebespezifischen Vorkommens der RNaseLE in *L. esculentum* mittels zellbiologischer Methoden durchgeführt. Bemerkenswert ist, dass die RNaseLE im Phloem detektiert werden konnte. Die *RNaseLE* mRNA akkumuliert in reifenden Phloemzellen von Kotyledonen (Abb.5G) und von jungen Stengeln (Abb. 3C'). Weiterhin wurde das Protein in den Siebzellen des Phloems nachgewiesen (Abb.3A und 3E). Mit dem phloemspezifischen Nachweis wird die Vermutung von Stenzel (1998) bestätigt, dass das *RNaseLE* Gen im Phloem exprimiert werden könnte. Diese Annahme wurde von Stenzel (1998) getroffen, da die *RNaseLE* Promotorsequenz verschiedene leitgewebespezifische- und phloemspezifische *cis*-Elemente, die den Elementen des RTBV- (Yin et al. 1997) und PAL2-Promotors (Hatton et al. 1995) ähnlich sind, enthält. Insbesondere das GATA-Motiv (TAACTGATA) von -569 bis -561 bp und -309 bis -301 bp, bezogen auf den Haupttranskriptionsstartpunkt, und die ASL-Box (GCATC-N₁₅-ACATC) von -169 bis -144 bp, die mittels Datenbankvergleich (TRANSFAC, Quandt et al. 1995; PLACE, Higo et al. 1999) in der *RNaseLE* Promotorsequenz gefunden wurden, könnten für eine phloemspezifische Genexpression verantwortlich sein (Stenzel 1998). Von Köck et al. (2004) wurde weiterhin belegt, dass die putative *RNaseLE* Promotorsequenz von 885 bp für eine phloemspezifische GUS-Aktivität ausreichend ist.

Das Vorkommen des Proteins der RNaseLE wurde nur in jungen bzw. reifenden Siebzellen des Phloems nachgewiesen (Abb. 3E). Im ausdifferenzierten Phloem von älteren Pflanzen konnten weder Promotoraktivität, Transkript noch Protein der RNaseLE detektiert werden.

Für die RNaseLX, die in reifenden Xylemelementen vorkommt, wird eine Beteiligung an der Xylemdifferenzierung angenommen (Lehmann et al. 2001). Die *ZRNaseI* mRNA aus *Zinnia elegans* wurde auch in reifenden Xylemzellen des Stengels und in der späten Phase von *in vitro* erzeugten reifenden Xylemzellen, die durch Transdifferenzierung aus Mesophyllzellen entstanden sind, nachgewiesen (Ye und Droste 1996). Daraus resultierend wurde für die *ZRNaseI* aus *Z. elegans* eine Beteiligung an der späten Phase der Xylogenese vermutet (Ye und Droste 1996). In dieser Phase erfolgen das kontrollierte Absterben des Protoplasten und der apoptotische Abbau der Querwände (Fukuda 1996). Während der Phloemdifferenzierung erfolgt ein apoptotischer Prozess, der dem der Xylogenese analog ist (Jones 2001). Ein wichtiges Ereignis in diesem Prozess ist das Beladen der Vakuole mit abbauenden Enzymen, wie z.B. Ribonukleasen, DNasen und Proteasen, und das Auflösen des Tonoplasten zur Freisetzung dieser Enzyme (Oparka und Turgeon 1999). Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die RNaseLE an der Entwicklung des Phloems bzw. der Siebzeldifferenzierung beteiligt sein könnte, da die RNaseLE nicht in den Siebzellen älterer Pflanzengewebe detektiert wurde. Die *in vitro* Untersuchungen mit dem gereinigten RNaseLE Protein haben gezeigt, dass das Enzym effektiv, basenunspezifisch Einzelstrang-RNA-Moleküle zu 2':3'-zyklischen Mononukleotiden abbaut (Abel et al. 1989; Ohgi et al. 1997). Für die RNaseLE könnte jede zum Abbau bestimmte, einzelsträngige RNA ein Substrat sein. Aufgrund der Lokalisation der RNase in der Vakuole und im Apoplast ist der Kontakt zu RNA-Molekülen verwehrt. Das Zerreißen des Tonoplasten und die Freisetzung abbauender Enzyme, wie es bei der Siebzeldifferenzierung der Fall ist, würde der RNaseLE den Zugang zum Substrat und den Abbau von RNA-Molekülen ermöglichen. Obwohl der kontrollierte Abbau der Siebzellbestandteile ein finaler Schritt in der Phloemdifferenzierung ist, wurden bisher keine Ribonukleasen oder andere abbauende Enzyme, die an diesem Abbauprozess beteiligt sind, beschrieben. Für die vollständige RNA-Hydrolyse der RNaseLE wurde die akzessorische Ribonukleaseaktivität einer Phosphodiesterase aus Untersuchungen mit kultivierten *L. esculentum*-Zellen bei Phosphatmangel HPLC-analytisch nachgewiesen (Abel et al. 2000). Es ist vorstellbar, dass eine Phosphodiesterase auch an dem autolytischen Prozess der Phloemdifferenzierung beteiligt sein kann, was ihr Vorkommen im Phloem voraussetzt. Aber bislang gibt es keine Untersuchungen zur gewebeabhängigen Expression von Phosphodiesterasen.

Es existieren nur wenige Studien zur Regulation der Phloem- bzw. Leitgewebedifferenzierung, in denen das Phytohormon Auxin als Initiator der frühen Phase der Siebzeldifferenzierung diskutiert wird (Berleth und Mattsson 2000). Ob die späte Abbauphase der Siebzeldifferenzierung durch Auxin reguliert wird, konnte bislang nicht

aufgeklärt werden. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass keine Induktion der *RNaseLE* Expression durch exogen zugeführtes Auxin erfolgt.

Mit dem phloemspezifischen Vorkommen einer T2-Typ RNase gelang es erstmalig eine Phloem-assoziierte Rolle einer solchen RNase zu beschreiben. Proteine, die am Prozess der Siebzellendifferenzierung beteiligt sind, wurden bislang selten beschrieben. Dazu zählt das Homeobox Protein ZeHB3 (Nishitani et al. 2001). ZeHB3 ist ein putativer Transkriptionsfaktor von *Z. elegans*, der ausschließlich in reifenden Phloemzellen nachgewiesen wurde und als molekularer Marker der frühen Phase der Phloemdifferentiation diskutiert wird (Nishitani et al. 2001).

Der zweite, gewebeabhängige Expressionsort der *RNaseLE* ist das Endosperm. Sowohl *RNaseLE* Transkript und Promotoraktivität als auch das Protein wurden im Endosperm des Keimlings lokalisiert (Abb. 5C, 5D und 5J). Damit wurden die von Altmann (2000) begonnenen Untersuchungen weitergeführt, welche mit Northernblot-Hybridisierung eine Expression der *RNaseLE* im isolierten Keimling und im Endosperm zeigten. Die in diesem Zusammenhang gefundene Transkriptakkumulation der *RNaseLE* im Keimling kann auf die in dieser Arbeit nachgewiesene Expression im Phloem zurückgeführt werden.

In der Keimlingsentwicklung steigt der Phosphatverbrauch für Zellteilung und Zellwachstum stark an. Der kontrollierte Abbau des Endosperms dient der Nährstoffmobilisierung und u. a. der Phosphatbereitstellung. Untersuchungen zur Keimlingsentwicklung in *L. esculentum* zeigten, dass sich die spezifischen Aktivitäten von phosphatremobilisierenden Enzymen, wie Ribonukleasen, Phosphatasen und Phytasen, in den ersten zehn Tagen der Keimlingsentwicklung verdoppeln (Bosse und Köck 1998). Die *RNaseLE* könnte am Endospermabbau beteiligt sein, um Phosphat für die Keimlingsentwicklung zu remobilisieren. Das Vorkommen der *RNaseLE* wurde bereits am dritten Tag der Keimlingsentwicklung detektiert. Von diesem Zeitpunkt an und bis zum fünften Tag der Keimlingsentwicklung ist der zelluläre Phosphatgehalt von Keimlingen konstant, während der Phosphatgehalt nach dem fünften Tag, aufgrund des hohen Phosphatverbrauchs der Keimlinge, abnimmt (Bosse und Köck 1998). Das spricht für eine entwicklungsabhängige Expression der *RNaseLE* im Keimling, die vom Phosphatverbrauch des Keimlings relativ unabhängig ist. Möglicherweise ist die Phosphatfreisetzung im Endosperm nicht die Hauptfunktion der *RNaseLE*. Da der Gehalt von RNA/ DNA während der Keimlingsentwicklung stark ansteigt (vgl. auch Abb. 5F bzw. 5I) und für das Wachstum und die Zellteilung des Keimlings notwendig ist, könnten NMP's, die Primärprodukte der *RNaseLE*, in den Salvage-pathway zur Synthese von Ribonukleinsäuren eingehen.

Neben der RNaseLE wurde auch das Vorkommen der xylemlokalisierten RNaseLX aus *L. esculentum* ab dem vierten Tag der Keimlingsentwicklung im Endosperm nachgewiesen und eine Beteiligung am kontrollierten Endospermabbau vermutet (Lehmann et al. 2001). Die RNaseLX und die RNaseLE aus *L. esculentum* gehören zu dergleichen Genfamilie (Köck et al. 1995). Das gewebespezifische Vorkommen beider RNasen weist bestimmte Analogien auf, die auf eine gewebeabhängige Spezialisierung ihrer Funktionen in der Pflanze hindeuten. Während die RNaseLE an der Phloemdifferenzierung beteiligt sein kann, scheint die RNaseLX eine Funktion in der Xylemdifferenzierung zu haben. Demgegenüber sind beide RNasen in dem Endospermabbau involviert.

5.2. Verwundung und Beteiligung der RNaseLE an der Wundheilung

Eine Verwundung, durch Insektenfraß oder mechanische Beanspruchung verursacht, stellt für die Pflanze einen Stress dar. Pflanzen reagieren darauf mit sofortiger Stoffwechselumstellung. Unmittelbar nach einer Verwundung werden verschiedene Gene exprimiert oder reprimiert. Diese Genprodukte haben unterschiedliche Funktionen. Dazu zählen Funktionen in der Aufrechterhaltung der Signaltransduktion, der direkten Abwehr und der Wundheilung. Welche Funktion RNasen in der Wundantwort haben, wurde bisher nicht untersucht. Deshalb war ein Ziel in dieser Arbeit, Hinweise zur Rolle der RNaseLE zu erhalten.

Die *RNaseLE* kann aufgrund ihres Expressionszeitpunktes, der zwei Stunden nach einer Verwundung nachweisbar war (Abb. 8), den „späten“ wundinduzierten Genen zugeordnet werden. Abwehrgene wie *PINI*, *PIN2*, *CPI* (Metalloprotease-Inhibitor) und *CDI* (CathepsinD-Inhibitor) werden im Zeitraum von zwei bis 24 Stunden nach Verwundung exprimiert und gehören ebenfalls zu den „späten“ wundinduzierten Genen (Graham et al. 1985; Bergey et al. 1996; Ryan 2000). Demgegenüber wurden die Transkripte der Signaltransduktionsgene *ProSys*, *LOX*, *CaM* (Calmodulin), *AOC* und *AOS* bereits 30 Minuten nach Verwundung detektiert (McGurl et al. 1992; Heitz et al. 1997; Bergey und Ryan 1999; Ryan 2000).

Nach einer Verwundung wird die *RNaseLE* ausschließlich lokal in verwundeten Blättern exprimiert und auch das Protein ist nur lokal aktiv (Abb. 9a-d). Demgegenüber wurde die Expression von *RNSI*, der strukturell verwandten RNase aus *A. thaliana*, lokal und in unverwundeten systemischen Blättern nach Verwundung nachgewiesen (LeBrasseur et al. 2002). Weitere wundinduzierbare RNasen, für die eine lokale bzw. systemische Expression untersucht wurde, sind bislang nicht beschrieben worden. Ansonsten werden alle bekannten wundinduzierten Gene aus *L. esculentum* lokal und systemisch exprimiert, wie es in den

Microarrayanalysen von Strassner et al. (2002) zusammenhängend gezeigt wurde. Eine Ausnahme bildet das *Threonin Desaminase* Gen, welches nur lokal exprimiert wird.

Die RNaseLE kommt nicht nur lokal nach einer Verwundung vor, sondern auch gewebespezifisch. Der *RNaseLE* Promotor ist in den Blattnerven des verwundeten Blattes aktiv, wogegen im Mesophyll keine Promotoraktivität detektiert wurde (Abb. 17e). Die Transkriptakkumulation und das Vorkommen von RNaseLE konnten ebenfalls in verwundeten Blatthauptnerven detektiert werden (Abb. 17a-d). Durch *in situ*-Hybridisierung wurde gezeigt, dass das *RNaseLE* Transkript in den Zellen direkt an der Wundstelle des Stengels, in den Leitgewebeparenchymzellen und insbesondere in den Siebzellen des Phloems akkumuliert (Abb. 18J und 18K). Das Protein konnte nach Verwundung in den Siebröhren detektiert werden (Abb. 19C). Nur geringe Mengen von Transkript und Protein, die mit den Mengen im unverwundeten Stengel vergleichbar sind, wurden im Abstand von mehr als zwei Millimeter von der Wundstelle entfernt, nachgewiesen. Diese Resultate sprechen für eine lokale, auf den Bereich des verwundeten Leitgewebes begrenzte, Wundantwort der RNaseLE. Die Kontinuität des Leitgewebes ist essentiell für dessen Funktion. Verwundetes bzw. unterbrochenes Leitgewebe regeneriert sich, so dass die Funktion wiederhergestellt wird. Dieser Wundheilungsprozess umfasst eine Kallusbildung an der Wundstelle, die Redifferenzierung von Parenchymzellen in Leitgewebezellen und die anschließende Neuverbindung von alten und neuen Leitgewebezellen (Schulz 1990). Unter dem Aspekt, dass die *RNaseLE* in Phloemzellen und in Parenchymzellen an der Wundstelle vorkommt (Abb. 18K), könnte das Enzym analog einer potentiellen Funktion in der Siebzeldifferenzierung (vgl. Kap. 5.1.) auch an diesem Redifferenzierungsprozess des Phloems beteiligt sein. Neben der gewebespezifischen Expression spricht das zeitliche Expressionsmuster für eine Funktion der RNase in der späten Phase der Wundantwort, zu der die Wundheilung zählt.

Es existieren bisher nur wenige Veröffentlichungen über die Regeneration verwundeten Leitgewebes. Entsprechend wenig ist über Proteine bekannt, die an diesem Prozess beteiligt sind. Das *ZeHB3* Homeoboxprotein aus *Z. elegans* wird als ein früher Marker für die Regeneration verwundeten Phloems diskutiert (Nishitani et al. 2002). Das *ZeHB3* Gen wird ausschließlich in undifferenzierten Siebzellen nach der Verwundung und in den Parenchymzellen der verwundeten Leitgewebestränge exprimiert. Bereits nach 24 Stunden nimmt die *ZeHB3* Transkriptmenge im verwundeten Gewebe wieder ab (Nishitani et al. 2002). *SaPIN2a*, ein Proteinaseinhibitor aus *Solanum americanum*, wird nach Verwundung exprimiert (Xu et al. 2001). Für *SaPIN2a* wird eine regulatorische Funktion bei der Siebzeldifferenzierung vermutet, da Transkript und Protein in Siebelementen und Geleitzellen von Stengeln nachgewiesen wurden (Xu et al. 2001). Während des kontrollierten

Abbaus der Siebzellbestandteile werden neben Ribonukleasen auch Proteinasen aus der Vakuole nach Auflösen des Tonoplasten entlassen. Vermutlich hat SaPIN2a eine regulatorische Funktion, die diesen selektiven Abbauprozess ermöglicht (Xu et al. 2001).

Abwehrproteine, die im Leitgewebe vorkommen, wurden bislang nicht beschrieben. Der Proteinaseinhibitor 2 aus *L. esculentum*, wurde in den Mesophyllzellen nachgewiesen (Narvasquez et al. 1993). Proteine mit einer Wundheilungsfunktion kommen demgegenüber bevorzugt im Leitgewebe und in den Zellen an der Wundstelle vor. Die Peroxidase TpoXN1 aus *Nicotiana tabacum* ist ein Beispiel für ein Wundheilungsprotein. Die *TpoXN1* Expression wurde nach einer Verwundung detektiert und die Promotoraktivität wurde ausschließlich im Leitgewebe und in Epidermiszellen verwundeter Stengel und Petiole lokalisiert (Sasaki et al. 2002). Für TpoXN1 wurde eine Beteiligung an der Wundheilung des Leitgewebes durch Suberinisierung vermutet (Sasaki et al. 2002). Weitere Beispiele für Wundheilungsgene sind die im Xylemparenchym lokalisierten Gene *POX* (Peroxidase) in *Oryza sativa* (Ito et al. 2000) und *PAL* (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) in *Phaseolus sativa* (Bevan et al. 1989) sowie das im Leitgewebe lokalisierte Gen *FAD7* (ω -Fettsäure-Desaturase) in *A. thaliana* (Nishiuchi et al. 1997; Nishiuchi et al. 1999). In welchem Umfang eine Wundheilung durch Suberinisierung und/ oder durch Redifferenzierung stattfindet, ist verschieden. Nach einer sehr starken Verwundung können Zelltodprozesse einsetzen. Dabei werden verschiedene abbauende Enzyme aktiviert, wodurch oft die aus den Abbauprozessen entstehenden Verbindungen für die Pflanze wiederverwertet werden. Das Pflanzenhormon Ethylen ist ein Regulator dieser Zelltodprozesse (Jones 2001). Es ist denkbar, dass auch die RNaseLE in einen solchen Recyclingmechanismus im Zuge von Wundheilung involviert ist. Hierfür sprechen das lokale Vorkommen der RNaseLE Promotoraktivität und des Proteins an der Verwundungsstelle. Ob daran Ethylen beteiligt ist, kann aus der geringfügigen Ethylen-Abhängigkeit der RNaseLE Expression (Abb. 13a und 13b) noch nicht eindeutig geschlossen werden. Hier sollten weitere Untersuchungen zur Ethylenabhängigkeit und der Wundantwort der RNaseLE in Mutanten mit Defekten in der Ethylenbiosynthese eine eindeutige Antwort geben.

Ein Anstieg von RNase-Aktivitäten nach einer Verwundung wurde bereits von Farkas (1982) beschrieben. Farkas vermutete, dass dieser Anstieg ein Sekundäreffekt auf eine Pathogeninfektion ist. Seitdem wurden verschiedene pflanzliche T2-Typ RNase Gene, deren Expression entweder durch eine Verwundung oder durch eine Pathogeninfektion induziert wird, identifiziert. Da die RNaseLE im Phloem, dem Ort bevorzugter Pathogeninfektion vorkommt, wurde eine RNaseLE Expression nach Pathogeninfektion vermutet.

Die Analysen in dieser Arbeit zeigen jedoch, dass keine Expression der *RNaseLE* nach Infektion mit dem pathogenen Bakterium *Xanthomonas campestris* und mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* erfolgt (Abb. 6a-d). Weiterhin haben Infektionsversuche von 35S::RNaseLE-*sense*-Pflanzen (*L. esculentum*) mit den pflanzlichen Viren, TMV (Tabakmosaikvirus) bzw. PVY (potato virus Y), gezeigt, dass die Überexpression der *RNaseLE* in den *sense*-Pflanzen keine hemmende Wirkung auf das Wachstum der Viren hatte (persönliche Mitteilung Dr. Schubert, Bundesanstalt für Züchtungsforschung Aschersleben). Analoge Untersuchungen mit Viroiden erbrachten das gleiche Ergebnis (persönliche Mitteilung Prof. H.-P. Mühlbach, Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Abteilung Molekulare Phytopathologie und Genetik). Nach diesen Ergebnissen scheint die RNaseLE keine Funktion in der Pathogenabwehr zu haben. Für die RNaseNE aus *N. alata* wurde dagegen eine Funktion in der Pathogenantwort belegt. Es konnte gezeigt werden, dass diese RNase das Hyphenwachstum von *P. parasitica*, vermutlich durch Abbau mikrobieller RNA's, inhibiert (Hugot et al. 2002). Ob die RNaseLE eine indirekte Pathogenabwehrfunktion durch Wundheilung hat, bleibt offen. Da die *RNaseLE* Expression stark nach einer Verwundung der Pflanze, im Gegensatz zu einer Pathogeninfektion, induziert wird, ist diese Expression folglich kein Sekundäreffekt einer Pathogeninfektion, sondern resultiert deutlich aus der Verwundung. Weiterhin ist zu bemerken, dass SA, ein bekannter „cross-talk“-Regulator zwischen dem Wundsignalweg und dem Pathogensignalweg, die wundinduzierte *RNaseLE* Expression nicht reprimiert (Abb. 15b). Demgegenüber kann die PIN2-Biosynthese in der Wundantwort durch SA inhibiert werden (Doares et al. 1995b). In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte eine Repression der wundinduzierten *PIN2* Expression durch SA bestätigt werden (Abb. 15b). Die SA-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression kann als weiteres Indiz gewertet werden, dass die RNaseLE keine aktive Abwehrfunktion ausübt.

5.2.1. Systemin- und JA-unabhängige Regulation der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort

Die Regulation wundinduzierter Gene in *Lycopersicon* erfolgt hauptsächlich über den Octadecanoid-Signalweg (Ryan 2000; Leon et al. 2001; Wasternack und Hause 2002). Systemin und JA sind dabei zentrale Signale. ABA, Ethylen, OGAs und ROS sind ebenfalls an der Wundantwort beteiligt. Die Signalkaskade nach Verwundung führt zur lokalen und systemischen Expression von Abwehrgenen, wie *PIN2*, *PPO*, und Signaltransduktionsgenen,

wie *AOC*, *AOS* und *proSys*. Das verantwortliche Signal für die systemische Expression konnte bislang nicht eindeutig identifiziert werden. Für die *RNaseLE* konnte keine systemische Expression detektiert werden. Sie wird lokal im verwundeten Leitgewebe/Phloem exprimiert (Abb. 9a und Abb. 18). Im Phloem werden Systemin und JA gebildet (Jacinto et al. 1997; Stenzel et al. 2003) und können durch gegenseitige Amplifikation zu einer effizienten JA-Bildung beitragen (Jacinto et al. 1997; Stenzel et al. 2003). Aufgrund des gemeinsamen Vorkommens von Systemin, JA und der RNaseLE im Phloem wurde eine Regulation der *RNaseLE* Expression durch diese beiden Signale in der Wundantwort von *L. esculentum* vermutet. Zunächst wurde die Systemin-Abhängigkeit der *RNaseLE* Expression in der Wundantwort untersucht. Die sehr geringe Akkumulation von *RNaseLE* mRNA und das Vorkommen einer geringen *RNaseLE* Promotoraktivität nach exogener Systeminapplikation sprechen aber für eine Systemin-unabhängige Expression der *RNaseLE* (Abb. 10a und 12). In den weiteren Experimenten konnte die Systemin-Unabhängigkeit der wundinduzierten *RNaseLE* Expression bestätigt werden. Die Transkriptakkumulation der *RNaseLE* wurde in verwundeten Blättern detektiert, obwohl die Systeminperzeption durch das inaktive Systemin-17 blockiert wurde (Abb. 10b, c). Weiterhin konnte eine lokale *RNaseLE* Expression in der *spr1*-Mutante, die in der Systeminerkennung beeinträchtigt ist, nachgewiesen werden. Diese ist mit der Transkriptakkumulation im WT nahezu identisch (Abb. 10d). Lee und Howe (2003) haben gezeigt, dass die *PIN2* Expression in der *spr1*-Mutante lokal und systemisch reprimiert wird. Weiterhin konnte nach exogener Applikation mit Systemin keine Akkumulation der *PIN2* mRNA in der *spr1*-Mutante detektiert werden. Dagegen akkumulieren die *PIN2* Transkripte in *spr1* und WT nach exogener Applikation mit Linolensäure und JA (Lee und Howe 2003). Das zeigt, dass JA und/oder andere Oxylipine eine *PIN2*-Expression ohne eine Systeminperzeption ermöglichen. Diese gezeigte Systemin-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression nach Verwundung konnte auch von Lee und Howe (2003) für die Signaltransduktionsgene *LOXD*, *AOS1* und *WIPK* mittels *spr1* nachgewiesen werden. Dabei akkumulieren die *LOXD*-, *AOS1*-, *WIPK*-Transkripte sowohl lokal als auch systemisch in der Wundantwort von *spr1*. Die wundinduzierten Expressionen der *RNaseLE*, der *AOS* und der *LOXD* in der JA-Mangelmutante *def1* deuten an (Howe et al. 2000), dass eine Systemin-unabhängige Regulation mit einer JA-unabhängigen Regulation gekoppelt ist. Obwohl die JA-Akkumulation nach Verwundung beeinträchtigt ist, wird die Expression der JA-Biosynthesegene *AOC* und *AOS* nicht inhibiert (Howe et al. 1996; Stenzel et al. 2003). Da ein JA-Mangel in der *def1*-Mutante nur teilweise ausgeprägt ist, wurde hier die potentielle JA-Unabhängigkeit der wundinduzierten *RNaseLE* Expression mit Hilfe transgener *AOC*-Linien (*L. esculentum*, cv. Lukullus) untersucht. Obwohl sich der endogene JA-Gehalt der

35S::*AOCsense*- und der 35S::*AOCantisense*-Pflanzen stark unterscheidet (Stenzel et al. 2003), akkumulieren *RNaseLE* Transkripte lokal nach Verwundung in den transgenen *AOC*-Linien wie im WT (Abb. 11b und 10a). Sowohl die *RNaseLE* Transkriptmenge als auch *RNaseLE* Aktivität sind in *AOCsense*-, *AOCantisense*- und WT-Pflanzen nahezu identisch (Abb. 11b-d), womit die JA-Unabhängigkeit bestätigt wurde. Weiterhin konnte keine *RNaseLE* Expression nach exogener Applikation von JAME und von Eth-In, einem bezüglich der Genexpression von *PIN2* hoch aktiven JA-Analogen (Schüler et al. 2001; Stenzel et al. 2003; Schüler et al. 2004), nachgewiesen werden sowie keine *RNaseLE* Promotoraktivität nach JAME-Applikation detektiert werden. Pfropfungsexperimente mit den Mutanten *spr1*, *spr2*, *jail* und dem WT sprechen für JA als systemisches Signal (Li et al. 2002; Lee und Howe 2003). Das Ausbleiben der systemischen *RNaseLE* Expression und ihre JA-Unabhängigkeit können indirekt ein Indiz für die systemische Signalwirkung von JA sein. Demgegenüber werden die Signaltransduktionsgene *LOXD*, *AOS* und *WIPK* lokal und systemisch nach Verwundung exprimiert, obwohl diese neben einer Systemin- auch eine JA-unabhängige Genexpression zeigen (Lee und Howe 2003). Eine ähnliche Expression wurde für das *Tw1* Gen aus *L. esculentum*, welches einer Glucosyltransferase homolog ist, gezeigt (O'Donnell et al. 1998).

In *A. thaliana* gibt es kein Systemin-ähnliches Peptid aber einen JA-abhängigen und JA-unabhängigen Wundsignalweg, wobei JA ein wichtiges Signal für die systemische Genexpression ist (Titarenko et al. 1997). Für die RNase *RNSI* aus *A. thaliana*, die der *RNaseLE* strukturell homolog ist, konnte eine JA-unabhängige lokale und systemische Expression nach Verwundung nachgewiesen werden (LeBrasseur et al. 2002). Nach Microarrayanalysen ist OPDA ein Induktor für die *RNSI* Expression (Stintzi et al. 2001). Deshalb könnte OPDA das Signal für die systemische *RNSI* Expression sein. Die wundinduzierte *RNSI* Expression ist unabhängig von OGAs und ABA (LeBrasseur et al. 2002). Aufgrund der geringen Mobilität der OGAs wurde angenommen, dass ihre Aktivität nur lokal auf die Verwundungsstelle beschränkt ist (Baydoun und Fry 1985). OGAs erzeugen intrazellulär während der Wundantwort von *L. esculentum* Wasserstoffperoxid, wodurch letztendlich die *PIN2* Expression induziert wird (Orozco-Cardenas et al. 2001). Obwohl die *RNaseLE* lokal exprimiert wird, sind OGAs und Wasserstoffperoxid keine Induktoren ihrer Expression (Abb. 7a und 14c). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ABA keine *RNaseLE* Expression induziert. Von Lers et al. (1998) wurde dagegen für die *RNaseLE* eine von ABA-abhängige Expression in *L. esculentum* gefunden. Die in dieser Arbeit belegte JA-Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression korreliert mit der Nichtinduzierbarkeit durch ABA und entspricht damit den Daten von Herde et al. (1996), die zeigten, dass JA und ABA

synergistisch die Expression von *PIN2* in der Wundantwort regulieren können. JA und Ethylen sind an der Regulation der *PIN2* Expression synergistisch beteiligt, wie für *Nicotiana* (Xu et al. 1994) und *Lycopersicon* (O'Donnell et al. 1996) gezeigt wurde. Da für die *RNaseLE* Expression eine geringfügige Ethylen-Abhängigkeit gezeigt wurde (Abb. 13a, b), kann eine unabhängige Wirkungsweise von JA und Ethylen vermutet werden.

Die gezeigte Regulation der *RNaseLE* Expression nach Verwundung ähnelt der von *TpoxNI* in *N. tabacum*. Die wundinduzierte Expression von *TpoxNI* ist auch unabhängig von JA und ABA sowie von Auxin, Cytokinin und Polyaminen (Sasaki et al. 2002). Eine Regulation der wundinduzierten *RNaseLE* Expression durch Auxine, Cytokinine und Polyamine konnte in den Untersuchungen dieser Arbeit ebenfalls nicht festgestellt werden (Abb.16). Für die Peroxidase *TpoxNI* in *N. tabacum* wurde eine Wundheilungsfunktion vermutet (Sasaki et al. 2002). Über die Regulation weiterer Wundheilungsgene in der Wundantwort ist wenig bekannt. Die hier vorgelegten Daten zur *RNaseLE* Expression könnten demnach die in Kap. 5.2. diskutierte Wundheilungsfunktion stützen.

5.3. Phosphatmangel und Rolle der RNaseLE in der Seitenwurzeldifferenzierung

Pflanzen reagieren auf Phosphatmangel mit unterschiedlichen Strategien, um die Aufrechterhaltung des intrazellulären Phosphatpools sicherzustellen. Neben Änderungen in der Wurzelmorphologie konnte die Aktivierung von Phosphohydrolasen und Phosphattransportern gezeigt werden (Raghothama 1999). Zu den Phosphohydrolasen gehören auch T2-Typ RNasen. Nachdem für die *RNaseLE* erstmals eine Induktion durch Phosphatmangel gezeigt worden war (Nürnberger et al. 1990), konnte ein Anstieg von Aktivitäten pflanzlicher T2-Typ RNasen bei Phosphatmangel mehrfach nachgewiesen werden. Für die *RNaseLE* konnte eine Expression bei einem extra- oder intrazellulären Phosphatmangel in kultivierten *L. esculentum*-Zellen gezeigt werden (Köck et al. 1995), wobei deutlich wurde, dass die *RNaseLE* spezifisch bei Phosphatmangel exprimiert bzw. aktiviert wird. In welchen Organen bzw. Geweben von *L. esculentum* die *RNaseLE* bei Phosphatmangel exprimiert wird, wurde bislang nicht erforscht. Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass die *RNaseLE* bei Phosphatmangel primär in den Wurzeln von *L. esculentum* vorkommt. Der *RNaseLE* Promotor ist in allen Seitenwurzeln initialen aktiv (Abb. 24E). Diese Promotoraktivität konnte in den äußeren Perizykelzellen unterhalb der Endodermis detektiert werden. Außerdem wurde die *RNaseLE* Promotoraktivität im Phloem der Seitenwurzeln unter Phosphatmangelbedingungen nachgewiesen (Abb. 24C). Die verstärkte Seitenwurzelnbildung bei Phosphatmangel fördert eine vermehrte Stoffaufnahme.

Das Vorkommen der *RNaseLE* Promotoraktivität in den Seitenwurzelinitialen spricht für eine Funktion der RNase in der Seitenwurzelbildung. Neue Seitenwurzeln werden ausgehend von den Perizykelzellen (Pericambium) durch peri- und antikline Zellteilung gebildet. Entweder werden alle Perizykelzellen reembryonalisiert und können eine neue Seitenwurzel bilden (Torrey 1986) oder nur wenige Zellen im Perizykel können eine neue Seitenwurzel ausbilden (Barlow und Adam 1988). An der Austrittsstelle der Seitenwurzeln werden Endodermis- und Rhizodermis apoptotisch abgebaut. Die *RNaseLE* könnte einerseits an diesen apoptotischen Prozessen beteiligt sein, da die Promotoraktivität nur in den äußeren Zellen des Perizykels, unterhalb der Endodermis detektiert werden konnte. Andererseits könnte die *RNaseLE* an der Bildung neuen Leitgewebes, speziell der Siebzeldifferenzierung (vgl. Kap. 5.1.), beteiligt sein. Dafür spricht die Lokalisation der *RNaseLE* Promotoraktivität in den Phloemzellen der neu gebildeten Seitenwurzeln.

Auxin akkumuliert in sich entwickelnden Seitenwurzelinitialen und wird als Signal für die Induktion von Seitenwurzeln diskutiert (Tayler und EL-Kheir 1993). Gene, die in der frühen Phase der Seitenwurzelbildung involviert sind, können nach einer exogenen Auxin-Applikation exprimiert werden. Ein Beispiel dafür ist das *RSI* Gen, welches als Marker für die frühe Phase der Seitenwurzelbildung in *L. esculentum* beschrieben wird (Tayler und Scheuring 1994). Das *RSI* Gen wird Auxin- und Gibberellin-abhängig exprimiert und wird nur in der frühen Phase bei Anlage der Seitenwurzelinitialen, noch vor Austritt der Seitenwurzeln, aktiviert (Tayler und Scheuring 1994). Bereits 48 Stunden nach exogener Auxingabe (NAA) konnte die *RSI* Promotoraktivität in den neu entstehenden Seitenwurzelinitialen nachgewiesen werden (Tayler und Scheuring 1994). Die *RNaseLE* Expression wird dagegen nicht durch exogene Auxin-Applikation induziert (Abb. 21a), wie es die bisherigen Untersuchungen gezeigt haben. Möglicherweise ist die Auxin-Unabhängigkeit der *RNaseLE* ein weiteres Indiz für eine potentielle Funktion der RNaseLE in der späten Phase der Seitenwurzelbildung.

Über die gewebespezifische Expression von phosphatmangelinduzierten Genen gibt es nur wenige Berichte. In diesen wurden keine Gene beschrieben, die in den Seitenwurzelinitialen exprimiert werden. Für den Phosphattransporter *AtPT2* aus *A. thaliana* wurde eine starke Promotoraktivität in den Seitenwurzeln und in den undifferenzierten Geweben von Wurzelspitze und Elongationszone unter Phosphatmangelbedingungen nachgewiesen (Karthikeyan et al. 2002). Die Transkriptakkumulationen der Phosphattransporter *LePT1* und *LePT2* aus *L. esculentum* wurden bei Phosphatmangel verstärkt in den Epidermiszellen der Wurzeln detektiert (Liu et al. 1998).

Bei Phosphatmangel akkumulieren die *RNaseLE* Transkripte in den Wurzeln, aber auch in den Kotyledonen (Abb. 23a und Abb. 23c). Die Aktivierung der *RNaseLE* Promotoraktivität in der Wurzel korrespondiert mit putativen *cis*-Elementen des *RNaseLE* Promotors, die Ähnlichkeiten zu wurzelspezifischen *cis*-Elementen anderer pflanzlicher Promotoren haben. Die *RNaseLE* Promotorsequenz hat an der Nukleotidposition -328 bis -311 ein *cis*-Element, das einem RSE-Element (root specific element) aus dem Promotor des *GRPI.8*-Gens (Glycin-reichen Proteins 1.8) aus Bohne ähnlich ist (Stenzel 1998). Dieses Element ist für eine wurzelspezifische *GRPI.8*-Gen-Expression notwendig (Keller und Baumgartner 1991). Von Köck et al. (2004) konnte in Übereinstimmung mit dem wurzelspezifischen *cis*-Element eine geringe *RNaseLE* Promotoraktivität in den Seitenwurzeln phosphatversorgter *L. esculentum*-Keimlinge histochemisch nachgewiesen werden.

5.3.1. Positive Regulation der *RNaseLE* bei Phosphatmangel

Bei Phosphatmangel werden verschiedene Gene exprimiert (Raghothama 1999). Die *RNaseLE* Expression wird in *L. esculentum*-Keimlingen, die ohne Phosphat kultiviert wurden, induziert. Bereits bei geringer Phosphatversorgung der Keimlinge konnten die *RNaseLE* Transkripte nicht mehr detektiert werden (Abb. 20a). Demgegenüber akkumulieren Transkripte von *LePT2* noch bei Konzentrationen von 100 μ M Phosphat in der Lösung (Abb. 20a), wie es analog von Liu et al. (1998) gezeigt wurde. Diese Induktion spricht für eine schnelle und koordinierte Antwort der Pflanze auf einen Phosphatmangel. Die Regulation der phosphatmangelinduzierten Genexpression erfolgt oft auf transkriptioneller Ebene. Eine solche Regulation vermutete Nürnberger (1991) für die phosphatmangelinduzierte Expression der *RNaseLE*, da nach Zugabe eines Transkriptionshemmers (Actinomycin) zur *L. esculentum*-Zellkultur die *RNaseLE* Aktivität inhibiert wurde. Die transkriptionelle Regulation bei Phosphatmangel ist sehr genau für *S. cerevisiae* durch Analyse des PHO-Regulons untersucht worden (Lenburg und O'Shea 1996). Es gibt Hinweise, dass pflanzliche phosphatmangelinduzierbare Gene ähnliche regulatorische Promotorsequenzen wie phosphatmangelinduzierbare Gene von Mikroorganismen haben (Oshima 1997). Tatsächlich wurden in der Promotorsequenz der *RNaseLE* dem PHO-Element ähnliche, regulatorische Sequenzmotive mittels Datenbankanalyse gefunden (Stenzel 1998). In dieser Arbeit wurden die Regulation der *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel und die Interaktionen des Promotors mit Transkriptionsfaktoren des Kerns mittels Band-shift-Analyse untersucht. Kernproteinfaktoren

aus kultivierten Tomatenzellen, die über 24 Stunden phosphatverarmt wurden, interagieren mit 6 Fragmenten im Bereich der Nukleotidposition -102 bis -1941 bp, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, der 2,6 kbp langen *RNaseLE* Promotorsequenz (Abb. 22a). Diese Interaktionen von *trans*-Faktoren mit den Promotorbereichen -102 bis -241, -541 bis -1041 und -1641 bis -1941 bp, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, sind spezifisch, da trotz 100-facher nicht-homologer Kompetetierung eine Interaktion nachweisbar war (Abb. 22b). Weiterhin konnte durch ProteinaseK-Behandlung belegt werden, dass die potentiellen *trans*-Faktoren auch proteinogen sind (Abb. 22c). Die detektierten Interaktionen erfolgen nur bei Phosphatmangel und nicht bei Phosphatanwesenheit, was auf eine positive Regulation der *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel hindeutet. Eine positive Regulation ist für phosphatmangelinduzierte Gene höherer Pflanzen bislang nicht beschrieben worden. Demgegenüber konnten negative Regulationen für die Expression von phosphatmangelinduzierten pflanzlichen Genen gezeigt werden. Für die *TPSII* Expression, einem phosphatmangelinduzierbaren Gen aus *L. esculentum*, wurde eine negative Regulation mittels Band-shift-Analysen nachgewiesen (Mukatira et al. 2001). Der Promotor von *AtPT2*, einem Phosphattransporter aus *A. thaliana*, interagiert mit Kernproteinfaktoren aus phosphatversorgten Keimlingen, wie es mittels Band-shift-Analysen gezeigt wurde (Mukatira et al. 2001). Die Promotorsequenz des phosphatmangelinduzierbaren *TPSII* Gens enthält im Interaktionsbereich -772 bp die Bindestelle von PHO4 (Mukatira et al. 2001), einem positiv wirkenden Transkriptionsfaktor aus *S. cerevisiae* (Vogel et al. 1989; Ogawa et al. 1995). G-Box ähnliche Sequenzen wie [CACGT(G/C)] konnten auch im *RNaseLE* Promotor an den Nukleotidpositionen -733 und -846, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt (+1), mittels Datenbankanalyse gefunden werden (vgl. Tab. 2). Die Band-shift-Analysen zeigen Interaktionen im Promotorbereich -610 bis -857, der die G-Box ähnliche Sequenz [CACGTC] enthält (Abb. 22b). Im Interaktionsbereich -610 bis -857 bp und im Interaktionsbereich -820 bis -1160 bp, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, gibt es auch ein Helix-loop-helix-Element [CAT(/G)A(/C)TG] an Nukleotidposition -832. Da sich die hier benutzten *RNaseLE* Promotorfragmente in diesem Bereich überschneiden, könnte dieses Helix-loop-helix-Element für die jeweiligen Interaktionen in den beiden Fragmenten verantwortlich sein. Die G-Box und das Helix-loop-helix-Element wurden auch in anderen Promotoren von phosphatmangelinduzierbaren Genen aus höheren Pflanzen identifiziert. Der Promotor des *TPSII* Gens beispielsweise enthält neben dem PHO-Element auch das Helix-loop-helix-Element (-889 und -1143 bp) (Mukatira et al. 2001). Möglicherweise sind diese putativen regulatorischen Sequenzen konserviert und haben eine wichtige Rolle für die Regulation der *RNaseLE* Expression und der Expressionen anderer Gene bei Phosphatmangel.

Ein weiteres regulatorisches *cis*-Element ist die NIT2-Bindedomäne [TATCT(/A/G/T)]. Die NIT2-Domäne wurde in der *RNaseLE* Promotorsequenz an den Nukleotidpositionen +2, +44, -1198 und -1355, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, mittels Datenbankanalyse gefunden (vgl. Tab. 2). In den zwei Fragmenten A und E der sechs gewählten *RNaseLE* Promotorfragmente, in denen Interaktionen bei Phosphatmangel detektiert wurden (Abb. 22b), befinden sich die NIT2-Domänen. Die NIT2-Domäne ist eine positive Regulatorsequenz von Genen des Nitratmetabolismus aus *Neurospora crassa* (Fu und Marzluf 1990). Durch Bindung von *trans*-Faktoren an die NIT2-Domäne werden Gene des Nitratmetabolismus aus *N. crassa* aktiviert, wogegen keine Bindung mit der Aktivierung von phosphatmangelinduzierten Genen verbunden ist (Fu und Marzluf 1990). Das *TPSI* Gen aus *L. esculentum* enthält diese *trans*-Faktor-Bindedomäne [TATCAA] in den Sequenzen, mit denen Protein-DNA-Interaktionen detektiert werden konnten (Mukatira et al. 2001). Die Expression von *AtPT2*, wird durch Phosphatmangel induziert (Muchhal et al. 1996). In der *AtPT2*-Promotorsequenz konnte die NIT2-Bindedomäne [TATCTA] auch in den Interaktionsbereichen von Kernfaktoren gefunden werden (Mukatira et al. 2001).

Die Interaktionen des *RNaseLE* Promotors konnten unter Phosphatmangelbedingungen im Bereich der Nukleotidposition +30 bis -1941, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, innerhalb der 2,6 kbp langen *RNaseLE* Promotorsequenz nachgewiesen werden. Stenzel (1998) zeigte mittels transienter Assays mit dem *GUS* Reporter gen, dass die Sequenz bis zur Nukleotidposition -836, relativ zum Haupttranskriptionsstartpunkt, für die Aktivierung des *RNaseLE* Promotors unter Phosphatmangel ausreichend ist. Innerhalb dieses Promotorbereiches konnten auch mittels Band-shift-Analysen die meisten Interaktionen detektiert werden (Abb. 22b) und viele der Phosphatmangel-relevanten, *cis*-Elemente (PHO, NIT2, Helix-loop-helix) mittels Datenbankanalyse gefunden werden. Lediglich im Fragment G (-1793 bis -1420 bp) gab es noch Interaktionen mit Kerntranskriptionsfaktoren (vgl. Tab. 2). Die Untersuchungen zeigen, dass der 850 bp lange *RNaseLE* Promotorbereich für die Phosphatmangelinduzierbarkeit ausreichend sein kann. Aber auch der Promotorbereich von -1793 bis -1420 bp ist für die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression relevant. Welche regulatorische Funktionen dieser Promotorbereich und auch die anderen Promotorbereiche für die *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel haben, könnte über stabile Transformation von Promotorverkürzungen in *A. thaliana* und anschließender funktionaler Analyse der transgenen Pflanzen erforscht werden.

Die Änderungen in der Genexpression bei Phosphatmangel zeigen, dass Pflanzen schnell und spezifisch auf die Phosphatverfügbarkeit reagieren. Bislang gibt es nur wenige Erkenntnisse zur Signaltransduktion und hormonellen Regulation von Genexpressionen bei

Phosphatmangel. In dieser Arbeit wurde die regulatorische Rolle dieser Phytohormone auf die *RNaseLE* Expression in der Phosphatmangelantwort von *L. esculentum* untersucht, wobei Auxin keinen Einfluss hatte (vgl. Kap. 5.3.). Dagegen konnte ein Cytokinin-Einfluss auf die *RNaseLE* Expression nachgewiesen werden. Bei Phosphatmangel reprimieren Cytokinine die Expression der *RNaseLE* (Abb. 21c). Cytokinine haben keinen Einfluss auf die Wurzelmorphologie in *A. thaliana* unter Phosphatmangelbedingungen (Martin et al. 2000). Da diese morphologischen Änderungen der Wurzel eine Antwort auf lokalen Phosphatmangel sind, vermutete Martin et al. (2000), dass Cytokinine die systemische Genexpression bei Phosphatmangel negativ regulieren. Kupier et al. (1988) zeigte, dass die Cytokininkonzentrationen in der Pflanze unter Phosphatmangelbedingungen abnehmen. Exogene Cytokinin-Behandlung reprimiert die Expression anderer phosphatmangelinduzierter Gene. Das *AtIPSI* Gen aus *A. thaliana*, das spezifisch durch einen Phosphatmangel induziert wird, kann durch exogene Cytokinin-Applikation reprimiert werden (Martin et al. 2000). Das *AtIPSI* Gen gehört zur Familie der TPSI/Mt4-Familie von putativen Riboregulatoren. Für die phosphatmangelinduzierte Expression von *AtPT1*, einem Phosphattransporter aus *A. thaliana*, wurde eine Repression durch Auxine und Cytokinine in Keimlingen nachgewiesen (Karthikeyan et al. 2002). Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass auch die Expression von *LePT2* bei Phosphatmangel durch Cytokinine konzentrationsabhängig reprimiert wird (Abb. 21c). Die Transkripte von *AtPT2*, einem anderen Phosphattransporter aus *A. thaliana*, akkumulieren unter Phosphatmangelbedingungen in Keimlingen unabhängig von Cytokinin, ACC und Auxin (Karthikeyan et al. 2002). Das zeigt, dass es neben der hormon-abhängigen auch eine hormon-unabhängige Expression bei Phosphatmangel gibt.

Aus den durchgeführten Untersuchungen wird die Komplexität von Hormoninteraktionen in der Phosphatmangelantwort deutlich. Für die *RNaseLE* könnten weitere Analysen zur Signaltransduktion in der Phosphatmangelantwort unter Einsatz verschiedener Mutanten gemacht werden, da eine exogene Hormonapplikation nicht den endogenen Hormongehalt der Pflanze reflektiert.

6. Zusammenfassung

RNasen sind an der Regulation verschiedener zellulärer Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse beteiligt. Die biologische Funktion der RNaseLE in *L. esculentum* war bislang unbekannt. Die Zielstellung dieser Arbeit war, die Rolle der RNaseLE in der Pflanze sowie nach Verwundung und bei Phosphatmangel zu untersuchen.

Die Untersuchungen zur gewebeabhängigen Expression, wie sie für pflanzliche RNasen bislang kaum durchgeführt wurden, zeigten die Phloemspezifität des Vorkommens der RNaseLE in *L. esculentum*. Die Lokalisation einer RNase im Phloem ist bisher für keine andere RNase beschrieben worden. Sie gibt einen wichtigen Hinweis auf die physiologische Funktion der RNaseLE in der Pflanze. Aufgrund des spezifischen Vorkommens von Transkript und Protein in jungen bzw. reifenden Phloemzellen kann eine potentielle Funktion der RNaseLE in der Entwicklung sowie Differenzierung des Phloems, speziell im kontrollierten Abbau der Siebzellbestandteile, vermutet werden. Abbauprozesse, wie in der Phloemdifferenzierung, erfolgen auch während der Keimlingsentwicklung im Endosperm, dem zweiten gefundenen Expressionsort der *RNaseLE*, welcher für eine Beteiligung des Enzyms am kontrollierten Endospermabbau Hinweise gibt.

In der Wundantwort von *L. esculentum* wird die *RNaseLE* nur lokal exprimiert. Das steht im Gegensatz zu den meisten anderen wundinduzierten Genen, die lokal und systemisch exprimiert werden. Die RNaseLE kommt nicht nur lokal, sondern auch gewebespezifisch an der Wundstelle in den Siebzellen und Parenchymzellen des Phloems vor. Parenchymzellen können sich durch Redifferenzierung zu neuen Siebzellen entwickeln und damit die Kontinuität des verwundeten Leitgewebes wieder herstellen. In diesem Differenzierungs- bzw. Wundheilungsprozess könnte die RNaseLE aufgrund ihrer spezifischen Lokalisation nach Verwundung involviert sein.

Die *RNaseLE* Expression wird nach Verwundung unabhängig von Systemin und JA reguliert, obwohl diese Signale auch im Phloem vorkommen. Andere bekannte Signale des Octadecanoid-Signalwegs haben ebenfalls keinen regulatorischen Einfluss auf die wundinduzierte *RNaseLE* Expression. Die Systemin-Unabhängigkeit wurde dadurch belegt, dass die wundinduzierte *RNaseLE* Expression trotz Inaktivierung des Systeminrezeptors mit dem Systemin-17 und in der Mutante *spr1*, die in der Systemin-Perzeption gestört ist,

ausgelöst wurde. Die Unabhängigkeit der *RNaseLE* Expression vom exogenen und endogenen JA-Gehalt der Pflanze wurde nach exogener Applikation mit JAME und Eth-In, einem hochaktiven JA-Analogen, sowie in verwundeten transgenen *35S::AOCsense/antisense*-Pflanzen, die einen geringen bzw. hohen JA-Gehalt nach Verwundung haben, nachgewiesen. Eine Systemin-, JA-unabhängige und ausschließlich lokale Expression nach Verwundung ist für andere wundinduzierte Gene nicht bekannt und deutet auf einen neuen Signalweg hin. Weiterhin konnte keine Induzierbarkeit der *RNaseLE* Expression nach Pathogeninfektion der Pflanze detektiert werden, womit eine aktive Abwehrfunktion ausgeschlossen werden kann.

In der Phosphatmangelantwort von *L. esculentum* wird die *RNaseLE* verstärkt in den Wurzeln und dort im Phloem der Seitenwurzeln und in den Seitenwurzelinitialen exprimiert. Aufgrund dieser Lokalisation könnte die RNaseLE an der Bildung bzw. Differenzierung neuer Seitenwurzeln beteiligt sein. Noch ist ungeklärt, ob die RNaseLE an apoptotischen Prozessen während der Seitenwurzelbildung oder/und am Prozess der Phloemdifferenzierung beteiligt sein kann. Einen Hinweis, dass die RNaseLE in der späten Phase der Seitenwurzelbildung involviert ist, könnte ihre Auxin-unabhängige Expression bei Phosphatmangel geben, da Auxin ein Regulator der frühen Phase der Seitenwurzelbildung ist. Demgegenüber sind Cytokinine, die keinen Einfluss auf die Wurzelmorphologie haben, als negative Regulatoren der systemischen Phosphatmangelantwort bekannt. Sie reprimieren die *RNaseLE* Expression bei Phosphatmangel.

Die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression wird auf transkriptioneller Ebene positiv reguliert. Die Interaktionen zwischen *RNaseLE* Promotor und Kernfaktoren wurden nur bei Phosphatmangel detektiert und waren spezifisch. Bemerkenswert ist, dass die Interaktionen in den Bereichen des Promotors auftreten, die bekannte *cis*-Elemente phosphatmangelinduzierbarer Gene enthalten. Welche regulatorische Funktion die einzelnen *cis*-Elemente (PHO-, Helix-loop-helix- und NIT2-Domäne), die mit *trans*-Faktoren binden, auf die phosphatmangelinduzierte *RNaseLE* Expression haben, könnte mittels transgener Pflanzen, die spezielle Promotorverkürzungen enthalten, untersucht werden.

Die Vermutung, die im Zusammenhang mit der Bearbeitung des Themas entwickelt wurde, dass die RNaseLE an der Entwicklung des Phloems beteiligt sein kann, könnte mit transgenen RNaseLE-GFP-Pflanzen sowie mit einem *in vitro*-Testsystem untersucht werden.

7. Literaturverzeichnis

- Abel, S. and K. Glund (1987). Ribonuclease in plant vacuoles: purification and molecular properties of the enzyme from cultured tomato cells. *Planta* 172: 71-78.
- Abel, S. and M. Köck (2001). Secretory acid ribonucleases from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Ribonucleases, Methods in Enzymology. A. W. Nicholson. New York, Academic Press. 341: 351-368.
- Abel, S., G. J. Krauss and K. Glund (1989). Ribonuclease in tomato vacuoles: high-performance liquid chromatographic analysis of ribonucleolytic activities and base specificity. *Biochem Biophys Acta* 998(145-150).
- Abel, S., T. Nürnberger, V. Ahnert, G. J. Krauss and K. Glund (2000). Induction of an extracellular Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase as an Accessory Ribonucleolytic Activity during Phosphate Starvation of Cultured Tomato Cells. *Plant Physiol* 122: 543-552.
- Abel, S., C. A. Ticconi and C. A. Delatorre (2002). Phosphate sensing in higher plants. *Physiologia Plantarum* 115: 1-8.
- Aldington, S. and S. C. Fry (1996). Oligosaccharins. *Adv. Bot. Res.* 19: 1-101.
- Altmann, D. (1999). Untersuchungen zur differentiellen Expression von Ribonukleasen während der Keimlingsentwicklung von Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Diplomarbeit.
- Ambellan, V. and V. P. Hollander (1966). A simplified assay for RNase activity in crude tissue extracts. *Anal. Biochem.* 17: 474-484.
- Aravind, L. and E. V. Koonin (2001). A Natural Classification of Ribonucleases. Ribonucleases, Method in Enzymology. A. W. Nicholson. New York, Academic Press. 341: 3-28.
- Bariola, P. A., C. J. Howard, C. B. Taylor, M. T. Verburg, V. D. Jaglan and P. J. Green (1994). The Arabidopsis ribonuclease gene *RNS1* is tightly controlled in response to phosphate limitation. *Plant J* 6(5): 673-85.
- Barlow, P. W. and J. S. Adam (1988). The position and growth of lateral roots on cultured root axes of tomato, *Lycopersicon esculentum* (*Solanaceae*). *Plant Syst Evol* 158: 141-154.
- Bates, T. R. and J. P. Lynch (1996). Stimulation of root hair elongation in *Arabidopsis thaliana* by low phosphorus availability. *Plant Cell Environ.* 19: 529-538.
- Baydoun, E. A. H. and S. C. Fry (1985). The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* 165: 269-276.

-
- Bergey, D. R., G. A. Howe and C. A. Ryan (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(22): 12053-8.
- Bergey, D. R., M. Orozco-Cardenas, D. S. de Moura and C. A. Ryan (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1756-60.
- Bergey, D. R. and C. A. Ryan (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol Biol* 40(5): 815-23.
- Berleth, T. and J. Mattsson (2000). Vascular development: tracing signals along veins. *Curr Opin Plant Biol* 3(5): 406-411.
- Bevan, M., D. Shufflebottom, K. Edwards, R. Jefferson and W. Schuch (1989). Tissue- and cell-specific activity of a phenylalanine ammonia-lyase promoter in transgenic plants. *Embo J* 8: 1899-1906.
- Bieleski, R. L. and J. B. Ferguson (1983). The physiology and metabolism of phosphate and its compounds. *Inorganic plant nutrition encyclopedia of plant physiology*. A. Laeuchli and R. L. Bieleski. berlin, Springer Verlag: 422-449.
- Bishop, P. D., G. Pearce, J. E. Bryant and C. A. Ryan (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. Identity and activity of poly- and oligogalacturonide fragments. *J Biol Chem* 259(21): 13172-7.
- Blume B. and D. Grierson (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.* 12(4) 731-746.
- Bonas, U., J. Conrads-Strauch and I. Balbor (1993). Resistance in tomato to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* is determined by alleles of the pepper-specific avirulence gene *avrBs3*. *Mol. Gen. Genet.* 238: 261-269.
- Bosse, D. and M. Köck (1998). Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development of tomato seedlings. *Plant Cell Environ.* 21(325-332).
- Bradford, M. M. (1977). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brown, I., J. Mansfield and U. Bonas (1995). *hrp* genes in *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* determine ability to suppress papilla deposition in pepper mesophyll cells. *MPMI* 8: 825-836.
- Daram, P., S. Brunner, B. L. Persson, N. Amrhein and M. Bucher (1998). Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* 206: 225-233.
- Dellaporta, S. L., J. Wood and J. B. Hicks (1983). A plant DNA miniprep: Version II. *Plant Mol Biol* 1: 19-21.

- Doares, S. H., T. Syrovets, E. W. Weiler and C. A. Ryan (1995a). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(10): 4095-8.
- Doares, S. H., J. Narvaez-Vasquez, A. Conconi and C. A. Ryan (1995b). Salicylic Acid Inhibits Synthesis of Proteinase Inhibitors in Tomato Leaves Induced by Systemin and Jasmonic Acid. *Plant Physiol* 108(4): 1741-1746.
- Dombrowski, J. E., G. Pearce and C. A. Ryan (1999). Proteinase inhibitor-inducing activity of the prohormone prosystemin resides exclusively in the C-terminal systemin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12947-52.
- Duff, S. M. G., G. Sarath and W. C. Plaxton (1994). The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism. *Plant Physiol* 90: 791-800.
- Ehrendorfer, F. (1991) *Allgemeine Grundlagen der Evolution und Systematik*. Strasburger Lehrbuch der Botanik. P. Sitte, H. Ziegler, F. Ehrendorfer und A. Bresinsky. Jena, Gustav Fischer Verlag. 33. Auflage: 752-754.
- Farkas, G. L. (1982). Ribonucleases and ribonucleic acid breakdown. *Encyclopedia of Plant Physiology*. B. Parthier and D. Boulter. Berlin, Springer Verlag: 224-262.
- Feussner, I. and C. Wasternack (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* 53: 275-297.
- Fu, Y. H. and G. A. Marzluf (1990). NIT-2, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5331-5335.
- Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47: 299-325.
- Galiana, E., P. Bonnet, S. Conrod, H. Keller, F. Panabieres, M. Ponchet, A. Poupet and P. Ricci (1997). RNase activity prevents the growth of a fungal pathogen in tobacco leaves and increases upon induction of systemic acquired resistance with elicitor. *Plant Physiol* 115: 1557-1567.
- Goldstein, A. H., D. A. Beartlein and R. G. McDaniel (1988a). Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*. I. Excretion of acid phosphatase by tomato plants and suspension cultured cells. *Plant Physiol* 87: 711-715.
- Goldstein, A. H., A. Danon, D. A. Beartlein and R. G. McDaniel (1988b). Phosphate starvation inducible metabolism in *Lycopersicon esculentum*: II. Characterization of the phosphate starvation-inducible-excreted acid phosphatase. *Plant Physiol* 87: 716-720.
- Golz, J. F., A. E. Clarke and E. Newbigin (1995). Self-incompatibility in flowering plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 640-645.

-
- Graham, J. S., G. Pearce, J. Merryweather, K. Titani, L. Ericsson and C. A. Ryan (1985). Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves. I. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor I and its post-translational processing. *J Biol Chem* 260(11): 6555-60.
- Green, P. J. (1994). The ribonucleases of higher plants. *Annu Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 421-445.
- Hammond-Kossack K., J. D. G. Jones (2000). Responses to plant pathogens. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Buchanan, B. B., W. Grussem and R. L. Jones. American Society of Plant Physiologists/USA. Kap. 21: 1142-1147.
- Harrison, M. J. (1999). Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 219-243.
- Hatton, D., R. Sablowski, M.-H. Yung, C. Smith, W. Schuch and M. Bevan (1995). Two classes of *cis* sequences contribute to tissue-specific expression of a *PAL2* promoter in transgenic tobacco. *Plant J* 7: 859-876.
- Hause, B., U. Demus, C. Teichmann, B. Parthier and C. Wasternack (1996). Developmental and Tissue-Specific Expression of JIP-23, a Jasmonate-Inducible Protein of Barley. *Plant Cell Physiol.* 37(5): 641-649.
- Hause, B., I. Stenzel, O. Miersch, H. Maucher, R. Kramell, J. Ziegler and C. Wasternack (2000). Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant J* 24(1): 113-26.
- Heinemeyer, T., E. Wingender, I. Reuter, H. Hermjakob, A. E. Kel, O. V. Kel, E. V. Ignatieva, E. A. Ananko, O. Podkolodnaya, F. A. Kolpakov, N. L. Podkolodny and N. A. Kolchanov (1998). Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucl. Acids Res.* 26: 362-367.
- Heitz, T., D. R. Bergey and C. A. Ryan (1997). A gene encoding a chloroplast-targeted lipoxygenase in tomato leaves is transiently induced by wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiol* 114(3): 1085-93.
- Herde, O., R. Atzorn, J. Fisahn, C. Wasternack, L. Willmitzer and H. Pena Cortes (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.
- Higo, K., Y. Ugawa, M. Iwamoto and T. Korenaga (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 297-300.
- Hoekema, A., P. R. Hirsch, P. J. J. Hooykaas and R. A. Schilperot (1983). A binary plant vector strategy based on separation of *vir* and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303: 179-180.
- Höfgen, R. and L. Willmitzer (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucl. Acids Res.* 16: 9877.

- Howe, G. A., G. I. Lee, A. Itoh, L. Li and A. E. DeRocher (2000). Cytochrome P450-dependent metabolism of oxylipins in tomato. Cloning and expression of allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant Physiol* 123: 711.
- Howe, G. A., J. Lightner, J. Browse and C. A. Ryan (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* 8(11): 2067-77.
- Hugot, K., M. Ponchet, A. Marias, P. Ricci and E. Galiana (2002). A tobacco S-like RNase inhibits hyphal elongation of plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* 15(3): 243-250.
- Irie, M. (1999). Structure-Function Relationships of Acid Ribonucleases: Lysosomal, Vacuolar, and Periplasmic Enzymes. *Pharmacol Ther* 81: 77-89.
- Ito, H., S. Hiraga, H. Tsugawa, H. Matsui, M. Honma, Y. Otsuki, T. Murakami and Y. Ohashi (2000). Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plant. *Plant Sci* 155: 85-100.
- Jacinto, T., B. McGurl, V. Franceschi, J. Delano-Freier and C. A. Ryan (1997). Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible vascular bundle-specific expression of the β -glucuronidase gene in transgenic tomato plants. *Planta* 203: 406-412.
- Jäger, E. J. (1994) Systematik und Evolution. Botanik. F. Jacob, E. J. Jäger und E. Ohmann. Jena, Gustav Fischer Verlag. 4. Auflage: 328-329.
- Jefferson, R. A., T. A. Kavanagh and M. W. Bevan (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *Embo J* 6: 3901-3907.
- Jones, A. M. (2001). Programmed cell death in development and defense. *Plant Physiol* 125: 94-97.
- Jost, W., H. Bak, K. Glund, P. Terpstra and J. J. Beintema (1991). Amino acid sequence of an extracellular, phosphate-starvation induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur J Biochem* 198: 1-6.
- Kaletta, K., I. Kunze, G. Kunze and M. Köck (1998). The peptide HDEF as a new retention signal is necessary and sufficient to direct proteins to the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 434: 377-381.
- Kariu, T., K. Sano, H. Shimokawa, R. Itoh, N. Yamasaki and M. Kimura (1998). Isolation and characterisation of a wound-inducible ribonuclease from *Nicotiana glutinosa* leaves. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62: 1144-1151.
- Karthikeyan, A. S., D. K. Varadarajan, U. T. Mukatira, M. P. d'Urzo, B. Damsz and K. G. Raghothama (2002). Regulated Expression of Arabidopsis Phosphate Transporters. *Plant Physiol* 130: 221-233.
- Kawata, Y., F. Sakiyama and H. Tamaoki (1988). Amino acid sequence of ribonuclease T2 from *Aspergillus oryzae*. *Eur J Biochem* 176: 683-697.

-
- Keller, B. and C. Baumgartner (1991). Vascular-specific expression of the bean Grp-1.8 gene is negatively regulated. *Plant Cell* 3: 1051-1061.
- Koch, T., T. Krumm, V. Jung, J. Engelberth and W. Boland (1999). Differential induction of plant volatile biosynthesis in the lima bean by early and late intermediates of the octadecanoid-signalling pathway. *Plant Physiol* 121: 153-162.
- Köck, M., N. Groß, I. Stenzel and G. Hause (2004). Phloem-specific expression of the wound-inducible ribonuclease LE from tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus). *Planta*.
- Köck, M., A. Hamilton and D. Grierson (1991). *eth1*, a gene involved in ethylene synthesis in tomato. *Plant Mol Biol* 17: 141-142.
- Köck, M., A. Löffler, S. Abel and K. Glund (1995). cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato. *Plant Mol Biol* 27: 477-485.
- Köck, M., K. Theierl, I. Stenzel and K. Glund (1998). Extracellular administration of phosphate-sequestering metabolites induces ribonucleases in cultured tomato cells. *Planta* 204: 404-407.
- Kupier, D., J. Schuit and P. J. C. Kupier (1988). Effect of internal and external cytokinin concentrations on root growth and shoot to root ratio of *Plantago major* ssp. *pleiosperma* at different nutrient concentrations. *Plant Soil* 111: 231-236.
- LeBrasseur, N. D., G. C. MacIntosh, M. A. Perez-Amador, M. Saitoh and P. J. Green (2002). Local and systemic wound-induction of RNase and nuclease activities in *Arabidopsis*: RNS1 as a marker for a JA-independent systemic signaling pathway. *Plant J* 29(4): 393-403.
- Lee, G. I. and G. A. Howe (2003). The tomato mutant *spr1* is defective in systemin perception and the production of a systemic wound signal for defense gene expression. *Plant J* 33(3): 567-76.
- Lehmann, K., B. Hause, D. Altmann and M. Köck (2001). Tomato Ribonuclease LX with the Functional Endoplasmic Reticulum Retention Motif HDEF Is Expressed during Programmed Cell Death Processes, Including Xylem Differentiation, Germination, and Senescence. *Plant Physiol* 127: 436-449.
- Leitsch, A. R., T. Schwarzbacher, D. Jackson and I. J. Leitsch (1999). RNA-RNA-Hybridisierung. In-situ-Hybridisierung. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag: 111-123.
- Lenburg, M. E. and E. K. O'Shea (1996). Signaling phosphate starvation. *TIBS* 21: 383-387.
- Leon, J., E. Rojo and J. J. Sanchez-Serrano (2001). Wound signalling in plants. *J Exp Bot* 52(354): 1-9.
- Lers, A., A. Khalchitski, E. Lomaniec, S. Burd and P. J. Green (1998). Senescence-induced RNases in tomato. *Plant Mol Biol* 36: 439-449.

-
- Li, C., G. Liu, C. Xu, G. I. Lee, P. Bauer, H. Q. Ling, M. W. Ganal and G. A. Howe (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): 1646-61.
- Li, L., C. Li, G. I. Lee and G. A. Howe (2002). Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic wound response of tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6416-21.
- Ling, H. Q., D. Krieseleit and M. W. Ganal (1998). Effect of ticarcillin/potassium clavulanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Rep* 17: 843-847.
- Liu, C. M., U. S. Muchhal, M. Uthappa, A. K. Kononowicz and K. G. Raghothama (1998). Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiol* 116: 91-99.
- Löffler, A., S. Abel, W. Jost, J. J. Beintema and K. Glund (1992). Phosphate-regulated induction of intracellular ribonucleases in cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Plant Physiol* 98: 1472-1478.
- Löffler, A., K. Glund and M. Irie (1993). Amino acid sequence of an intracellular, phosphate-starvation-induced ribonuclease from cultured tomato (*Lycopersicon esculentum*) cells. *Eur J Biochem* 214: 627-633.
- Lowry, H. O., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lynch, J. (1995). Root architecture and plant productivity. *Plant Physiol* 109: 7-13.
- Lynch, J. and K. M. Brown (1997). Ethylene and plant responses to nutritional stress. *Plant Physiol* 100: 613-619.
- Ma, Z., T. I. Baskin, K. M. Brown and J. P. Lynch (2003). Regulation of Root Elongation under Phosphorus Stress Involves Changes in Ethylene Responsiveness. *Plant Physiol* 131: 1381-1390.
- Ma, Z., D. G. Bielenberg, K. M. Brown and J. P. Lynch (2001). Regulation of root hair density by phosphorus availability in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 24: 459-467.
- Marschner, H. (1995). Mineral nutrition in higher plants. Academic Press London.
- Martin, A. C., J. C. del Pozo, J. Iglesias, V. Rubio, R. Solana, A. de la Pena, A. Leyva and J. Paz-Ares (2000). Influence of cytokinins on the expression of phosphate starvation responsive genes in *Arabidopsis*. *Plant J* 24: 559-567.
- Mauch, F., L. A. Hadwiger and T. Boller (1988). Antifungal Hydrolases in Pea Tissue. Purification and characterization of two chitinases and two β -1,3-Glucanases differentially regulated during development and in response to fungal infection. *Plant Physiol* 87: 325-333.

- McGurl, B., G. Pearce, M. Orozco-Cardenas and C. A. Ryan (1992). Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* 255(5051): 1570-3.
- McGurl, B., G. Pearce and C. A. Ryan (1994). Polypeptide signalling for plant defence genes. *Biochem Soc Symp* 60: 149-54.
- McGurl, B. and C. A. Ryan (1992). The organization of the prosystemin gene. *Plant Mol Biol* 20(3): 405-9.
- Meindl, T., T. Boller and G. Felix (1998). The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 10(9): 1561-70.
- Miskimins, K., M. D. Roberts, A. McClelland and F. H. Ruddle (1985). Use of protein-blotting procedure and a specific DNA probe to identify nuclear proteins that recognize the promotor region of the transferrin receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 6741-6744.
- Moyen, C., K. E. Hammond-Kosack, J. J. Jones, M. R. Knight and E. Johannes (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.* 21: 110.
- Moyen, C. and E. Johannes (1996). Systemin transiently depolarizes the tomato mesophyll cell membrane and antagonizes fusicoccin-induced extracellular acidification of mesophyll tissue. *Plant Cell Environ.* 19: 464.
- Muchhal, U. S., J. M. Pardo and K. G. Raghothama (1996). Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10519-10523.
- Mukatira, U. T., C. Liu, D. K. Varadarajan and K. G. Raghothama (2001). Negative regulation of phosphate starvation-induced genes. *Plant Physiol* 127: 1854-1862.
- Narvaez-Vasquez, J., V. R. Franceschi and C. A. Ryan (1993). Proteinase-inhibitor synthesis in tomato plants: evidence for extracellular deposition in roots through the secretory pathway. *Planta* 189: 257-266.
- Narvaez-Vasquez, J., G. Pearce, M. Orozco-Cardenas, V. R. Franceschi and C. A. Ryan (1995). Autoradiographic and biochemical evidence for the systemic translocation of systemin in tomato plants. *Planta* 195: 593-600.
- Nishitani, C., T. Demura and H. Fukuda (2001). Primary phloem-specific expression of a *Zinnia elegans* homeobox gene. *Plant Cell Physiol* 42: 1210-1218.
- Nishitani, C., T. Demura and H. Fukuda (2002). Analysis of early processes in wound-induced vascular regeneration using TED3 and ZeHB3 as molecular markers. *Plant Cell Physiol* 43: 79-90.
- Nishiuchi, T., T. Hamada, H. Kodama and K. Iba (1997). Wounding changes the spatial expression pattern of the arabidopsis plastid w-fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. *Plant Cell* 9: 1701-1712.

- Nishiuchi, T., H. Kodama, S. Yanagisawa and K. Iba (1999). Wound-induced expression of the *FAD7* gene is mediated by different regulatory of its promoter in leaves/stems and roots. *Plant Physiol* 121: 1239-1246.
- Nürnberg, T. (1991). Phosphatregulierte Induktion einer extrazellulären Ribonuklease in kultivierten Tomatenzellen (*Lycopersicon esculentum*). Dissertation.
- Nürnberg, T., S. Abel, W. Jost and K. Glund (1990). Induction of an extracellular ribonuclease in cultured tomato cells upon phosphate starvation. *Plant Physiol* 92: 970-976.
- O'Donnell, P. J., C. Calvert, R. Atzorn, C. Wasternack, H. M. O. Leyser and D. J. Bowles (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* 274: 1914-1917.
- O'Donnell, P. J., M. R. Truesdale, C. M. Calvert, A. M. Dorans, M. R. Roberts and D. J. Bowles (1998). A novel tomato gene that rapidly response to wound- and pathogen-related signals. *Plant J* 14: 137-142.
- Ogawa, N., H. Sitoh, K. Miura, J. Paolo, V. Magbanua, M. Bun-ya, S. Harashima and Y. Oshima (1995). Structure and distribution of specific *cis*-elements of transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 406-416.
- Ohgi, K., Y. Shiratori, A. Nakajima, M. Iwama, H. Kobayashi, N. Inokuchi, T. Koyama, M. Köck, A. Löffler, K. Glund and M. Irie (1997). The base specificities of tomato ribonuclease (RNase LE) and its Asp44 mutant enzyme expressed from yeast cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61: 432-438.
- Oparka, K. J. and R. Turgeon (1999). Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11: 739-750.
- Orozco-Cardenas, M. L., J. Narvaez-Vasquez and C. A. Ryan (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(1): 179-91.
- Oshima, Y. (1997). The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet Syst* 72: 323-334.
- Pearce, G., S. Johnson and C. A. Ryan (1993). Structure-activity of deleted and substituted systemin, an 18-amino acid polypeptide inducer of plant defensive genes. *J Biol Chem* 268(1): 212-6.
- Pearce, G. and C. A. Ryan (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J Biol Chem* 278(32): 30044-50.
- Pearce, G., D. Strydom, S. Johnson and C. A. Ryan (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.

-
- Quandt, K., K. Frech, H. Karas, E. Wingender and T. Werner (1995). MatInd and MatInspector-new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 23: 4878-4884.
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 665-693.
- Raghothama, K. G. (2000a). Phosphate transport and signaling. *Curr Opin Plant Biol* 3: 182-187.
- Raghothama, K. G. (2000b). Phosphorus acquisition: plant in the driver's seat! *Trends Plant Sci* 5: 412-413.
- Reinbothe, C., A. Tewes, M. Luckner and S. Reinbothe (1992). Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Digitalis lanata* analyzed by *in vivo* and *in vitro* protein synthesis. *Plant J* 2: 917-926.
- Rubio, V., F. Linhares, R. Solano, A. C. Martin, J. Iglesias, A. Leyva and J. Paz-Ares (2001). A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling both in vascular plants and unicellular algae. *Genes and Development* 15: 2122-2133.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2): 112-21.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual*. New York, Cold Spring Laboratory Press.
- Sasaki, K., S. Hiraga, H. Ito, S. Seo, H. Matsui and Y. Ohashi (2002). A Wound-Inducible Tobacco Peroxidase Gene Express Preferentially in the Vascular System. *Plant Cell Physiol* 43(1): 108-117.
- Schaller, A. and C. Oecking (1999). Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* 11(2): 263-72.
- Schaller, A., P. Roy and N. Amrhein (2000). Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related gene expression by fusicoccin. *Planta* 210: 599-606.
- Scheer, J. M. and C. A. Ryan (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* 11(8): 1525-36.
- Scheer, J. M. and C. A. Ryan, Jr. (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(14): 9585-90.
- Schiefelbein, J. W. (2000). Constructing a plant cell. The genetic control of root hair development. *Plant Physiol* 124: 1525-1531.
- Schüler, G., H. Görls and W. Boland (2001). 6-Substituted indanoyl isoleucine conjugates mimic the biological activity of coronatine. *Eur J Org Chem* 546: 1663-1668.

- Schüler, G., A. Mithöfer, I. T. Baldwin, S. Berger, J. Ebel, J. G. Santos, G. Herrmann, D. Hölscher, R. Kramell, T. M. Kutchan, H. Maucher, B. Schneider, I. Stenzel, C. Wasternack and W. Boland (2004). Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology. *FEBS Lett* 563: 17-22.
- Schulz, A. (1990). Wound-sieve elements. Sieve elements. Comparative structure induction and development. H.-D. Behnke and R. D. Sjölund. Berlin Heidelberg New York, Springer: 199-217.
- Stenzel, I. (1998). Isolierung und Charaktersistierung genomischer Sequenzen Phosphatmangel induzierbarer Gene aus Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Lukullus). Dissertation.
- Stenzel, I., B. Hause, H. Maucher, A. Pitzschke, O. Miersch, J. Ziegler, C. A. Ryan and C. Wasternack (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *Plant J* 33(3): 577-89.
- Stintzi A., H. Weber, P. Reymond, J. Browse and E. E. Farmer (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *PNAS* 98(22): 12837-12842.
- Strassner, J., F. Schaller, U. B. Frick, G. A. Howe, E. W. Weiler, N. Amrhein, P. Macheroux and A. Schaller (2002). Characterisation and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *Plant J* 32: 585-601.
- Stratmann, J. W. and C. A. Ryan (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 U S A* 94(20): 11085-9.
- Tanaka, N., J. Arai, N. Inokuchi, T. Koyama, K. Ohgi, M. Irie and K. T. Nakamura (2000). Crystal Structure of a Plant Ribonuclease, RNase LE. *Mol. Biol.* 298: 859-873.
- Tao, Y. and G. A. Marzluf (1999). The NIT-2 nitrogen regulatory protein of *Neurospora*: expression and stability of *NIT-2* mRNA and protein. *Curr Genet* 36: 153-158.
- Tayler, B. H. and R. A. EL-Kheir (1993). Induction of lateral root initiation by auxin in tomato seedling roots. *Tomato Genet Coop Rep* 43: 46-48.
- Tayler, B. H. and C. F. Scheuring (1994). A molecular marker for lateral root initiation: The *RSI-1* gene of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) is activated in early lateral root primordia. *Mol Gen Genet* 243: 148-157.
- Tayler, C. B., P. A. Bariola, S. B. DelCardayre, R. T. Raines and P. J. Green (1993). RNS2: a senescence-associated RNase of *Arabidopsis* that diverged from the S-RNases before speciation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 5118-5122.
- Tewes, A., K. Glund, R. Walter and H. Reinbothe (1984). High yield isolation and recovery of protoplasts from suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Z. Pflanzenphysiol.* 113: 141-150

- Titarenko, E., E. Rojo, J. Leon and J. J. Sanchez-Serrano (1997). JA-dependent and -independent signalling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 115: 817-826.
- Torrey, J. G. (1986). Endogenous and exogenous influences on the regulation of lateral root formation. *New root formation in plants and cutting*. M. B. Jackson. Dordrecht, Martinus Nijhoff: 31-66.
- Vick, B. A. and D. C. Zimmermann (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biophys. Res. Comm.* 111: 470-477.
- Vogel, K., W. Horz and A. Hinnen (1989). The two positively acting regulatory proteins PHO2 and PHO4 physically interact with PHO5 upstream activation regions. *Mol. Cell. Biol.* 9: 2050-2057.
- Walker-Simmons, M., L. Hadwiger and C. A. Ryan (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem Biophys Res Commun* 110(1): 194-9.
- Wasternack, C. and B. Hause (2002). Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and plant development. *Pogr Nucleic Acid Res Mol Biol* 72: 165-221.
- Wengelnik, K. and U. Bonas (1996). HrpXv, an AraC-type regulator, activates expression of five of the six loci in the *hrp* cluster of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *J. Bacteriol.* 178: 3462-3469.
- Williamson, L. C., S. P. C. P. Ribrioux, A. H. Fitter and H. M. O. Leyser (2001). Phosphate availability regulates root system architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 875-882.
- Wilson, C. M. (1982). Plant nucleases: biochemistry and development of multiple molecular forms. *Isozymes Curr Top Biol Med Res* 6: 33-54.
- Xu, Y., P.-F. L. Chang, D. Liu, M. L. Narasimhan, K. G. Raghothama, P. M. Hasegawa and R. A. Bressan (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* 6: 1077.
- Xu, Z.-F., W.-Q. Qi, X.-Z. Ouyang, E. Yeung and M.-L. Chye (2001). A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. *Plant Mol Biol* 47: 727-738.
- Ye, Z.-H. and D. L. Droste (1996). Isolation and characterisation of cDNAs encoding xylogenesis-associated and wounding-induced ribonucleases in *Zinnia elegans*. *Plant Mol Biol* 30: 697-709.
- Yin, Y., L. Chen and R. Beachy (1997). Promotor elements required for phloem-specific gene expression from RTBV promotor in rice. *Plant J* 12: 1179-1188.