

**Jasmonatbiosynthese in *Arabidopsis thaliana* -
Charakterisierung der Allenoxidcyclase-Genfamilie
und von Mutanten der Fettsäure- β -Oxidation**

Dissertation

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

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

von
Diplom-Biologin Carolin Delker
geboren am 15. Mai 1975 in Lemgo

Gutachter:

1. Prof. Dr. Claus Wasternack
2. Prof. Dr. Werner Roos
3. Prof. Dr. Ivo Feußner

verteidigt in Halle (Saale) am 2. Mai 2007

urn:nbn:de:gbv:3-000011917

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000011917>]

Für meine Familie – ganz besonders für Lotte!

„Und jedem Anfang wohnt ein Zauber inne...“

Hermann Hesse

1	EINLEITUNG	1
1.1	Pflanzliche Signalstoffe als Regulatoren von Wachstum, Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse.....	1
1.2	Bedeutung und Vorkommen von Jasmonaten.....	1
1.2.1	Die Rolle der Jasmonate bei Stress- und Abwehrreaktionen	2
1.2.2	Entwicklungsphysiologische Effekte der Jasmonate.....	2
1.3	Jasmonatbiosynthese.....	3
1.3.1	Biosynthese von Oxylipinen und Jasmonaten.....	3
1.3.2	Die AOC als ein Schlüsselenzym der JA-Biosynthese	6
1.3.3	JA-Metabolismus und Oxylipin-Signatur	7
1.4	Regulation der JA-Biosynthese und der jasmonatvermittelten Prozesse	10
1.4.1	Regulation der Expression JA-responsiver Gene	11
1.4.2	Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen	13
1.4.3	Die Rolle von Genfamilien bei der differentiellen JA-Generierung	14
1.5	Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Verwendete Materialien	17
2.1.1	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	17
2.1.2	Pflanzenmaterial.....	17
2.1.2.1	<i>aoc3 KO</i> (UWBC):.....	17
2.1.3	Bakterienstämme	17
2.1.4	Vektoren.....	18
2.2	Angewandte Methoden	18
2.2.1	Anzucht, Transformation und Kreuzung von Arabidopsis.....	18
2.2.2	Allgemeine Kultivierungsbedingungen von Arabidopsis	18
2.2.2.1	Sterile Kultivierung von Arabidopsis.....	18
2.2.2.2	Stabile Transformation von Arabidopsis.....	18
2.2.2.3	Kreuzung von Arabidopsis-Linien	19
2.2.3	Kultivierung und Transformation von <i>E. coli</i>	19
2.2.4	Kultivierung und Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	19
2.3	DNA-Analytik.....	20
2.3.1	Isolation pflanzlicher genomischer DNA.....	20
2.3.2	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	20
2.3.3	Plasmidpräparation aus <i>A. tumefaciens</i>	20
2.3.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	20
2.3.5	Agarosegelelektrophorese	21
2.3.6	Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien (<i>knockouts</i>)	21
2.3.7	Bestimmung der Anzahl und Lokalisation von T-DNA-Insertionen	22
2.3.8	DNA-Sequenzierung	22
2.4	Klonierungsstrategien.....	23
2.4.1	Herstellung von DNA-Sonden	23
2.4.2	Herstellung eines binären 35S: <i>AOC3</i> -Vektors zur Komplementierung des <i>aoc3 KO</i> s....	23
2.4.3	Herstellung von 35S: <i>AOC</i> (RNAi)-Pflanzen	24

2.5	RNA-Analytik	25
2.5.1	RNA-Isolation aus <i>Arabidopsis</i>	25
2.5.2	Agarosegelelektrophorese und Northern Blot.....	25
2.5.3	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden und Hybridisierung	26
2.5.4	Reverse Transkription	26
2.5.5	Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)	26
2.5.5.1	DNase-Behandlung	26
2.5.5.2	cDNA-Synthese.....	27
2.5.5.3	Real-Time PCR	27
2.6	Protein-Analytik	27
2.6.1	Protein-Isolation aus <i>Arabidopsis</i>	27
2.6.2	SDS-PAGE und Western Blot.....	28
2.6.3	Immunodetektion	28
2.7	Gehaltsbestimmung von OPDA und Jasmonaten	28
2.8	Bestimmung von IAA-Gehalten	28
2.9	Luciferase-Nachweis	29
2.10	Histochemischer Nachweis der β-Glucuronidase-Aktivität	29
2.11	Mikroskopische Analysen	29
2.11.1	PEG-Einbettung	29
2.11.2	Immunodetektion und Fluoreszenzmikroskopie	30
2.11.3	Whole-Mount-Präparation, Propidium-Iodid-Färbung und CLSM-Auswertung.....	30
2.12	Applikationsexperimente	30
2.12.1	Applikation von JAME an Blättern und Blüten	30
2.12.2	Applikation von Phytohormonen mittels Anzucht auf 1/2-MS-Platten	31
2.12.3	Applikation von [³ H ₅]-OPDA an Blättern.....	31
2.13	Verwundungskinetik	31
2.14	Phänotypische Charakterisierung	31
2.14.1	Bestimmung der Primärwurzellänge	31
2.14.2	Chlorophyllbestimmung	32
2.15	Datenbankanalysen	32
2.15.1	Sequenzvergleiche und Arabidopsis-Genom-Informationen	32
2.15.2	Genexpressionsanalyse-Tools	32
2.15.3	Promotor-Motiv-Analyse	33
2.16	Statistische Auswertung	33
2.16.1	Deskriptive Statistik	34
2.16.2	Parametrische Verfahren	34
2.16.3	Nicht-parametrische Verfahren	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	Promotoranalysen	36
3.1.1	Motivanalyse	36
3.1.2	Redundante und differentielle Aktivität der AOC-Promotoren.....	41
3.1.3	Einfluss applizierter Phytohormone auf die AOC-Promotoraktivität.....	44

3.2	Expressionsanalysen (Datenbankrecherchen)	47
3.2.1	Expression der AOCs in verschiedenen Entwicklungsstadien	47
3.2.2	Expression der AOCs in verschiedenen Geweben.....	48
3.2.3	Co-Expressionsanalysen.....	49
3.3	RNAi vermittelte <i>loss of function</i> aller Allenoxidcyclasen	51
3.3.1	Isolation unabhängiger transgener Linien	51
3.3.2	Molekulare Charakterisierung.....	51
3.3.2.1	Expression der AOCs	51
3.3.2.2	Qualitativer AOC-Nachweis (Western Blot)	52
3.3.2.3	Immunhistochemischer AOC-Nachweis	52
3.3.3	Analyse jasmonatabhängiger Phänotypen.....	53
3.3.3.1	Wundantwort.....	53
3.3.3.2	Einfluss der JAME-Applikation auf das Wurzelwachstum.....	54
3.4	Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien	55
3.4.1	GABI-Kat <i>AOC1</i> T-DNA-Insertionslinie (<i>aoc1 KO</i>).....	55
3.4.2	UWBC <i>AOC3</i> -T-DNA-Insertionslinie (<i>aoc3 KO</i>).....	56
3.4.3	Salk <i>AOC4</i> T-DNA-Insertionslinie (<i>aoc4 KO</i>)	56
3.5	Charakterisierung der UWBC <i>AOC3</i> T-DNA-Insertionslinie (<i>aoc3 KO</i>)	57
3.5.1	Molekulare Charakterisierung.....	57
3.5.1.1	Expression der AOC-Gene	57
3.5.2	Analyse jasmonatabhängiger Phänotypen.....	58
3.5.2.1	Wundantwort.....	59
3.5.2.2	Seneszenz	60
3.5.2.3	Wurzelwachstum.....	61
3.5.2.4	Wurzelzellgröße	62
3.5.2.5	Qualitativer AOC-Nachweis in Wurzeln	62
3.5.2.6	OPDA-, dnOPDA- und Jasmonatgehalte in Keimlingen	63
3.5.2.7	Digitale <i>in situ</i> -Analysen – Datenbank Expressionsanalysen	65
3.5.2.8	IAA-Gehalte in Keimlingen	68
3.5.2.9	Phytohormonapplikationen	69
3.5.2.10	Kreuzungsanalysen.....	71
3.5.2.11	Komplementierung der <i>aoc3 KO</i> -Mutante.....	72
3.5.2.12	Identifizierung weiterer T-DNA-Insertionen im <i>aoc3 KO</i> per GenomeWalk.....	73
3.6	Analyse der β-Oxidation als terminaler Schritt der JA-Biosynthese	75
3.6.1	Auswahl geeigneter Mutanten.....	75
3.6.2	Jasmonatgenerierung nach Verwundung.....	76
3.6.3	Wundinduzierte Bildung von OPCs und JA nach Applikation von [D ₅]-OPDA	77
3.6.4	Expressionsanalyse JA-responsiver Gene	79
4	DISKUSSION	81
4.1	Enzyme der Fettsäure-β-Oxidation sind an der JA-Biosynthese beteiligt	82
4.2	Die Bedeutung der Arabidopsis AOCs	86
4.3	Die Rolle der AOC3	88
4.4	Potentielle Ursachen der Wurzelreduktion im <i>aoc3 KO</i>	89
4.5	Redundante und nicht-redundante Expression der AOCs	91
4.5.1	Einfluss abiotischer Faktoren	91
4.5.2	Einfluss biotischer Faktoren.....	92

4.5.3	Gewebsspezifität	94
4.5.4	Vernetzung mit Signalwegen anderer Phytohormone.....	98
4.5.5	Partielle Redundanz.....	101
5	ZUSAMMENFASSUNG	103
6	LITERATUR.....	105
7	ANHANG.....	116

Abkürzungen (allgemein)

Abb.	Abbildung
AGI	Arabidopsis Genome Initiative
ANOVA	Analysis of Variance
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CaMV	Cauliflower Mosaik Virus
cDNA	copy DNA
CDS	Kodierende Sequenz
CLSM	<i>Confocal Laser Scanning Microscope</i>
d	Tag(e)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
F _(x)	x. Filialgeneration
g	Gravitationskonstante
G	Guanin-Nukleotid
h	Stunden
JERE	jasmonate responsive element
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KO	<i>knockout</i> , T-DNA-Insertionslinie
LB	Luria Bertani
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige und Skoog
n	Stichprobengröße
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PIS	Präimmunsrum
<i>post hoc</i>	<i>a posteriori</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Prom	Promotor
qRT-PCR	quantitative RT-PCR (Real-Time RT-PCR)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA <i>interference</i>
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkription
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
T _(x)	Generation nach Transformation
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UWBC	University of Wisconsin Biotechnology Center
UTR	<i>untranslated region</i>

v/v	Volumen je Volumen
w/w	Masse je Volumen
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
35S	Promoter des <i>CaMV</i>
35Se	<i>35S enhancer</i>

Abkürzungen Proteine, Gene und Mutanten

ACX	Acyl-CoA-Oxidase
<i>aim1</i>	<i>abnormal inflorescence meristem1</i>
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
AP	Alkalische Phosphatase
AP2/ERF	<i>Apetala2/ethylene response factor</i>
<i>axr1</i>	<i>auxin resistant protein1</i>
<i>cevl</i>	<i>constitutive expression of VSP1</i>
4-CL	4-Coumarat:CoA-Ligase
<i>coi1</i>	<i>coronatine insensitive 1</i>
<i>cts</i>	<i>comatose</i>
<i>def1</i>	<i>defenseless 1</i>
DNase	Desoxyribonuklease
ERF1	<i>ethylene response factor1</i>
GUS	β-Glucoronidase
HEL	<i>hevein-like protein (PR4)</i>
<i>jar1</i>	<i>jasmonate resistant 1</i>
JMT	Jasmonsäure-carboxyl-methyltransferase
KAT	3-Ketoacyl-CoA-thiolase
LacZ	α-Untereinheit der β-Galactosidase
LOX	Lipoxygenase
LUC	Luciferase
MFP	<i>multifunctional protein</i>
MPK4	At MAP-Kinase4
NPTII	Neomycin-Phosphotransferase II
OPCL1	OPC-8:0-CoA Ligase1
OPR	12-Oxophytodiensäure-Reduktase
ORCA	<i>octadecanoid-derivative responsive Catharanthus AP2-domain protein</i>
ORA	<i>octadecanoid rsponsive Arabidopsis AP2 domain</i>
<i>ped1</i>	<i>peroxisome defective1</i>
PDF1.2	<i>plant defensin 1.2</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
<i>pxa1</i>	<i>peroxisomal ABC transporter 1</i>
RNase	Ribonuklease
ST2a	At Sulfotransferase2a
THI2.1	Thionin 2.1
<i>uidA</i>	β-Glucoronidase-Gen
VSP	<i>vegetative storage protein</i>

Abkürzungen Chemikalien und Verbindungen

ABA	Abscisinsäure
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
α -LeA	α -Linolensäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat- <i>p</i> -Toluidinsalz
BSA	Rinderserumalbumin
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4-DB	4-(2,4-Dichlorphenoxy)buttersäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dnOPDA	dinorOPDA; (7 <i>S</i> ,11 <i>S</i>)-10-Oxophytodiensäure; (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-3-Oxo-2-(2 <i>Z</i> -pentenyl)cyclopent-4-en-1-hexancarbonsäure
EBL	24-Epibrassinolid
ECS	24-Epicasteron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Na-Salz
EMS	Ethylmethansulfonat
12,13-EOT	12,13(<i>S</i>)-Epoxy-9(<i>Z</i>),11,15(<i>Z</i>)-octadecatriensäure
ET	Ethylen
GA	Gibberellinsäure
Glc	Glukose
13-HPOT	(9 <i>Z</i> ,11 <i>E</i> ,15 <i>Z</i> ,13 <i>S</i>)-13-Hydroperoxy-9,11,15-octadecatriensäure
12-HSO ₄ -JA	12-Hydroxysulfonyloxyjasmonsäure
IAA	Indolessigsäure
IBA	Indolbuttersäure
Ile	Isoleucin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalaktosid
7- <i>iso</i> -JA	(3 <i>R</i> ,7 <i>S</i>)-(+)-Jasmonsäure
(-)-JA	(3 <i>R</i> ,7 <i>R</i>)-(-)-Jasmonsäure
JAME	Jasmonsäuremethylester
NAA	Naphtylessigsäure
NBT	<i>p</i> -Nitrotetrazoliumblauchlorid
12- <i>O</i> -Gluc-JA	12- <i>O</i> - β -D-glucopyranosyljasmonsäure
12-OH-JA	12-Hydroxyjasmonsäure
11-OH-JA	11-Hydroxyjasmonsäure
OPC-4	3-Oxo-2-(2 <i>Z</i> -pentenyl)cyclopentan-1-butancarbonsäure
OPC-6	3-Oxo-2-(2 <i>Z</i> -pentenyl)cyclopentan-1-hexancarbonsäure
OPC-8	3-Oxo-2-(2 <i>Z</i> -pentenyl)cyclopentan-1-octancarbonsäure
<i>cis</i> -(+)-OPDA	(9 <i>S</i> ,13 <i>S</i>)-12-Oxo-10,15(<i>Z</i>)-phytodiensäure; (1 <i>S</i> ,2 <i>S</i>)-3-Oxo-2-(2 <i>Z</i> -pentenyl)cyclopent-4-en-1-octancarbonsäure
PCIB	<i>p</i> -Chlorphenoxyisobuttersäure
PEG	Polyethylenglykol
SA	Salicylsäure
TIBA	2,4,5-Trijodbenzoesäure
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
X-Gluc	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure-Cyclohexylammoniumsalz

1 Einleitung

1.1 Pflanzliche Signalstoffe als Regulatoren von Wachstum, Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse

Wachstum und Entwicklung in vielzelligen Organismen erfordern die Koordination und Transduktion einer Vielzahl von endogenen und umweltbedingten Reizen. Diese resultieren in Veränderungen von Genexpressionsmustern und posttranskriptionellen Modifikationen und ermöglichen somit Adaptationsprozesse. Für Pflanzen ist dies in besonderem Maße notwendig, da sie aufgrund ihrer sessilen Lebensweise über ein differenziertes System von Schutzmechanismen gegenüber ständig wechselnden und unter Umständen ungünstigen Umweltbedingungen verfügen müssen. Dabei ist die Erzeugung von mobilen Signalen notwendig, um eine effektive lokale und systemische Adaptation zu ermöglichen.

Bereits im 19. Jahrhundert wurde die Idee von regulatorischen Signalstoffen in Pflanzen von Julius Sachs postuliert. Erste Experimente von Charles und Francis Darwin zum Phototropismus bestätigten diese Theorie (Darwin 1880). Fritz Went demonstrierte schließlich 1926 das Vorkommen eines mobilen, wachstumsfördernden Signalmoleküls in Haferkoleoptilen, das später als Auxin bezeichnet wurde (Went 1926). Als weitere Signalstoffe wurden frühzeitig Ethylen (ET), Gibberellinsäure (GA), Abscisinsäure (ABA) und Cytokinine identifiziert. Diese Signalstoffe werden auch als klassische Phytohormone bezeichnet. Sie üben eine Vielzahl von pleiotropen Effekten in der Pflanze aus, die sowohl für die Entwicklung als auch für die Reaktion auf abiotische und biotische Umweltfaktoren von Bedeutung sind. Dabei besteht ein komplexes Netzwerk der gegenseitigen Regulation, in dem sich die einzelnen Phytohormone in unterschiedlichen Prozessen sowohl synergistisch als auch antagonistisch beeinflussen können (Kunkel und Brooks 2002; Gazzarini und McCourt 2003). Erst in jüngerer Vergangenheit entdeckte man weitere Substanzen, die ebenfalls charakteristische Wirkungsspektren von Phytohormonen aufweisen. Hierzu gehören u.a. die Salicylsäure (SA), die Brassinosteroide und auch die Oxylipine, deren bekannteste Vertreter die Jasmonate sind.

Als eines der ersten Jasmonate wurde der Jasmonsäuremethylester (JAME) aus dem ätherischen Öl des Jasmins isoliert (Demole *et al.* 1962). Doch erst in den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Vielfalt der biologischen Funktionen der Oxylipine, insbesondere der Jasmonate erkannt und teilweise aufgeklärt.

1.2 Bedeutung und Vorkommen von Jasmonaten

Als Jasmonate werden die Jasmonsäure (JA) und ihre Derivate zusammengefasst. Sie gehen aus der Oxophytodiensäure (OPDA) hervor, die ein physiologisch aktives Intermediat der JA-Biosynthese ist (Stintzi *et al.* 2001). Unter dem Begriff Oxylipine wird die Gesamtheit der Lipidperoxydationsprodukte zusammengefasst, aus denen sich u.a. die Jasmonate ableiten.

Jasmonate sind im Pflanzenreich ubiquitär verbreitet und wurden auch aus einigen Pilzen isoliert (Meyer *et al.* 1984; Vick und Zimmerman 1984; Miersch *et al.* 1989). Bereits frühzeitig wurden die wachstumshemmenden und seneszenzfördernden Eigenschaften einiger Jasmonate beschrieben (Ueda und Kato 1980; Dathe *et al.* 1981). Erst später erkannte man ihre zentrale Funktion in der Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren (Farmer und Ryan 1990; Wasternack und Parthier 1997; Feussner und Wasternack 2002; Schilmiller und Howe 2005). Die Generierung von Jasmonaten führt lokal und/oder systemisch zu Veränderung in Genexpressionsmustern. Dabei erfolgt u.a. die Induktion der Expression stressrelevanter Gene, die z.B. für Proteinase-Inhibitoren (Farmer und Ryan 1990), Thionine (Epple *et al.* 1995), Defensine (Thomma *et al.* 1998) und vegetative Speicherproteine (Berger *et al.* 1995) kodieren.

1.2.1 Die Rolle der Jasmonate bei Stress- und Abwehrreaktionen

Jasmonate sind von essentieller Bedeutung in der Vermittlung von Abwehrreaktionen gegenüber Pathogenen und Verwundung durch herbivore Insekten (Penninckx *et al.* 1996; Howe 2004). Die Jasmonate sind zusammen mit Ethylen beispielsweise für die Reaktion auf Infektion mit nekrotrophen Pathogenen verantwortlich (Glazebrook 2005a). Dabei sind sowohl die Jasmonate als auch das Biosynthese-Intermediat OPDA in der Lage, Abwehrreaktionen hervorzurufen (Stintzi *et al.* 2001).

Die Rolle der Jasmonate bei der Vermittlung der Wundantwort z.B. gegenüber Herbivoren wurde ausführlich in Solanaceen wie Tomate (*Lycopersicon esculentum*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*) untersucht (Wasternack *et al.* 2006). Die Verwundung führt sowohl lokal als auch systemisch zu einem transienten Anstieg der OPDA- und Jasmonat-Gehalte, was sowohl direkte als auch indirekte Abwehrmechanismen auslöst. Diese können u.a. die Produktion von Abwehrstoffen wie Nikotin und die Verstärkung von Zellwänden umfassen. Weiterhin wird die Expression von Genen induziert, die z.B. für Abwehrproteine wie Proteinaseinhibitoren kodieren, die sich hemmend auf die Nährstoffaufnahme und damit das Wachstum der Herbivoren auswirken (Ryan 2000). So konnte beispielsweise in der OPDA- und JA-defizienten Tomaten-Mutante *defl* eine verminderte Resistenz gegenüber *Manduca sexta* Befall beobachtet werden (Howe *et al.* 1996). Weiterhin sind Jasmonate auch für die Auslösung von Schutzreaktionen gegenüber Ozon- und UV-Schäden (Rao *et al.* 2000) und in Reaktion auf osmotischen Stress verantwortlich (Kramell *et al.* 1995).

1.2.2 Entwicklungsphysiologische Effekte der Jasmonate

Neben der Funktion der Jasmonate in der Vermittlung von Stressantworten sind sie essentielle Signale in unterschiedlichsten entwicklungsphysiologischen Prozessen.

In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) werden Jasmonate z.B. für die Pollenentwicklung, Filamentelongation und Antherendehisens und damit für eine erfolgreiche Reproduktion benötigt (Stintzi und Browse 2000; Park *et al.* 2002; von Malek *et al.* 2002). Diese Prozesse sind strikt

jasmonatabhängig und können nicht durch OPDA kompensiert werden. Ein wesentliches Merkmal von *Arabidopsis* JA-Biosynthese- und vieler JA-Signaltransduktions-Mutanten ist daher die männliche Sterilität der Blüten.

Neben dem fördernden Einfluss der Jasmonate auf die Blattseneszenz (Ueda und Kato 1980; Dathe *et al.* 1981) wird beispielsweise auch die Knollenbildung in Kartoffel-Pflanzen durch Jasmonate induziert (Yoshihara *et al.* 1989). OPDA ist hingegen in der Zaunrübe (*Bryonia dioica*) an der Auslösung der Rankenkrümmung beteiligt (Weiler *et al.* 1993).

Bereits frühzeitig wurde erkannt, dass sich die Applikation von Jasmonaten in höheren Konzentrationen hemmend auf die Keimung sowie das Wurzelwachstum auswirkt (Yamane *et al.* 1980; Corbineau *et al.* 1988; Staswick *et al.* 1992). Mutanten mit konstitutiv erhöhten endogenen JA-Gehalten (z.B. *cevl*) zeigen dementsprechend auch stark verkürzte Primärwurzeln (Ellis und Turner 2001). Während Jasmonate das Wachstum der Primärwurzel hemmen, wird jedoch die Bildung von Lateralwurzeln gefördert (Wang *et al.* 2002).

1.3 Jasmonatbiosynthese

1.3.1 Biosynthese von Oxylipinen und Jasmonaten

Die Aufklärung der Jasmonatbiosynthese erfolgte durch Vick und Zimmerman (1983) sowie durch Hamberg und Hughes (1988). Die Ausgangssubstanz für die Biosynthese der Oxylipine ist die mehrfach ungesättigte (18:3)-Fettsäure α -Linolensäure (α -LeA), die durch die Phospholipase A1 aus der Chloroplastenmembran freigesetzt wird (Ishiguro *et al.* 2001). Lipoxygenasen (LOXs) katalysieren die regio- und stereospezifische Insertion von molekularem Sauerstoff an Position C-9 durch eine 9-LOX bzw. an Position C-13 durch eine 13-LOX, wodurch 9S- bzw. 13S-Hydroperoxyoctadecatriensäure (9-HPOT bzw. 13-HPOT) entsteht (Brash 1999; Porta und Rocha-Sosa 2002). Jedoch ist nur 13-HPOT Substrat der JA-Biosynthese (Vick und Zimmerman 1979).

13-HPOT ist ein zentrales Intermediat des LOX-Weges. Ihre weitere Metabolisierung erfolgt durch verschiedene Enzymreaktionen. Bislang sind sieben Enzymfamilien bekannt, die an der Umsetzung der Fettsäurehydroperoxide beteiligt sind (Feussner und Wasternack 2002). Dazu zählen die Peroxygenase (POX), die Divinylether-Synthase (DES), die Hydroperoxid-Reduktase, die Hydroperoxid-Lyase (HPL), die LOX und die Epoxyalkohol-Synthase (EAS). Ihre Reaktionsprodukte sind teilweise in der Pathogen- und Wundantwort von Bedeutung (Feussner und Wasternack 2002). Während über die molekularen Mechanismen und die biologische Relevanz dieser Enzymfamilien jedoch teilweise nur wenig bekannt ist, ist die Metabolisierung von 13-HPOT durch ein weiteres Enzym, die Allenoxidsynthase (AOS), relativ gut charakterisiert (Abb. 1.1). Die AOS ist ebenso wie die HPL und die DES ein Cytochrom-P450-Enzym der Familie CYP74. Diese Unterfamilie reagiert ausschließlich mit Fettsäurehydroperoxiden und benötigt weder molekularen Sauerstoff noch eine NAD(P)H-abhängige Cytochrom P450-Reduktase (Blee 2002; Feussner und Wasternack 2002). Aus dem 13-LOX-Produkt 13-HPOT wird über den AOS-

Weg OPDA und JA gebildet. Dabei katalysiert die AOS die Bildung des instabilen Allenoxids 12,13-Epoxylinolensäure (12,13-EOT). Dieses wird von der Allenoxidcyclase (AOC) zu *cis*-(+)-OPDA (OPDA) umgesetzt. In diesem wichtigen Schritt der JA-Biosynthese wird damit die enantiomere Grundstruktur der natürlich vorkommenden Jasmonate gebildet.

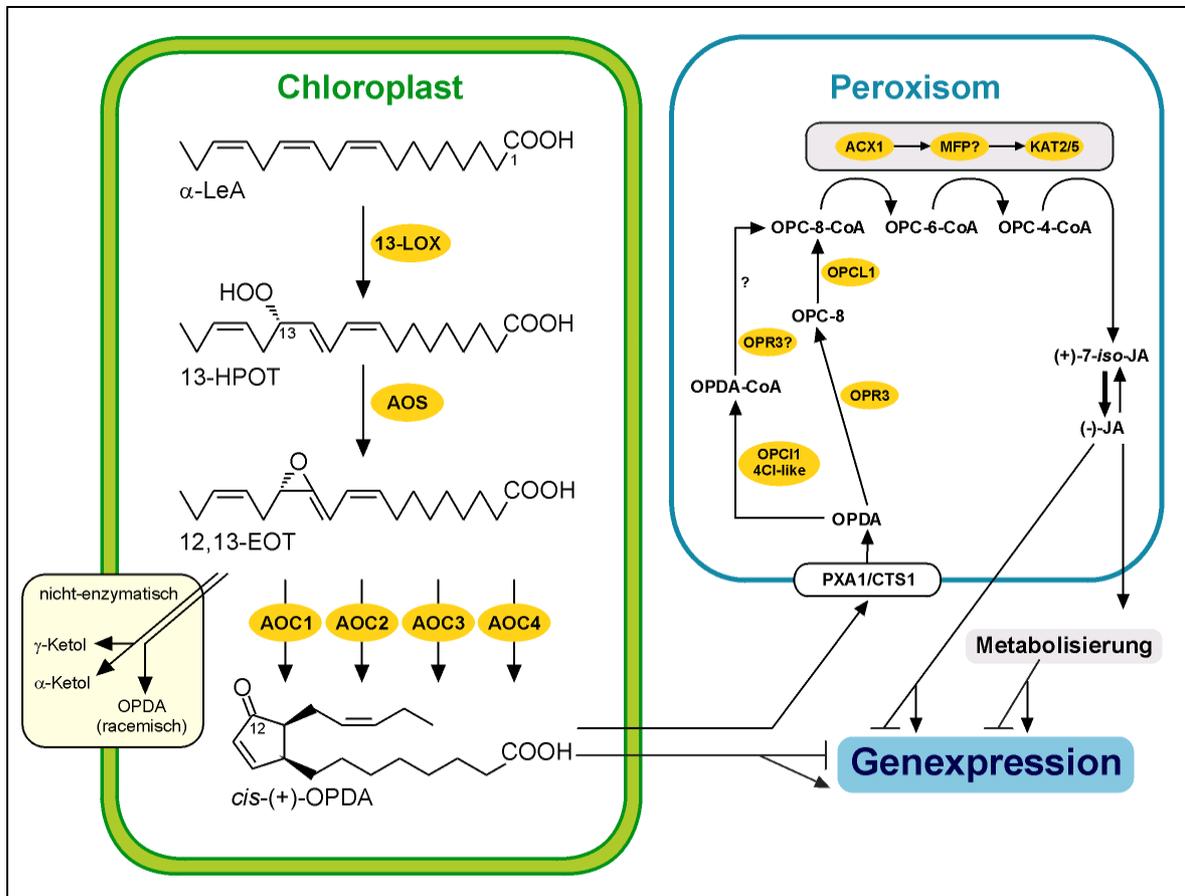


Abb. 1.1: Schematischer Ablauf der Jasmonatbiosynthese in Arabidopsis

Die Jasmonat-Biosynthese erfolgt in verschiedenen Kompartimenten. α -Linolensäure (α -LeA) wird in Chloroplasten zu *cis*-(+)-OPDA umgewandelt. Die Reduktion der OPDA und die weitere Umwandlung zu (-)-JA erfolgt in den Peroxisomen. JA kann im Cytoplasma weiter metabolisiert werden (s. 1.3.3). Sowohl OPDA als auch Jasmonate können Veränderungen in Genexpressionsmustern hervorrufen. Enzyme, die (potentiell) an der Biosynthese von Jasmonaten beteiligt sind, sind gelb unterlegt. Für Abkürzungen s. Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

In vitro wird das instabile Allenoxid in Abwesenheit der AOC nicht-enzymatisch zu α - und γ -Ketolen hydrolysiert sowie spontan zu racemischer *cis*-OPDA zyklisiert (Hamberg und Fahlstadius 1990). Obwohl die Ketole in Pflanzenextrakten nachgewiesen werden konnten (Theodoulou *et al.* 2005), wurde die Bildung racemischer *cis*-OPDA *in planta* bislang nicht belegt (Laudert *et al.* 1997). Parallel zur Umwandlung von α -LeA zu OPDA erfolgt die Umwandlung einer plastidären Hexadecatriensäure zu dinor-OPDA (Weber *et al.* 1997).

Der Hauptanteil an OPDA und dnOPDA liegt *in vivo* als ein Bestandteil plastidärer Mono- und Digalactosyldiacylglyceride (MGDG bzw. DGDG) vor (Stelmach *et al.* 2001), deren Mengen durch Verwundung bzw. Pathogeninfektion stark ansteigen. Dazu gehören die Arabidopside A, B, C und D (Hisamatsu *et al.* 2005), Arabidopsid E (Andersson *et al.* 2006) sowie 13 weitere OPDA-

bzw. dnOPDA-haltige Verbindungen (Buseman *et al.* 2006). Die veresterten Cyclopentenone können bei Bedarf vermutlich durch Acylhydrolasen zur freien OPDA hydrolysiert werden. Dies ermöglicht die schnelle Bereitstellung von OPDA und dnOPDA, ohne eine *de novo* Synthese zu erfordern (Stelmach *et al.* 2001).

Während die Bildung von OPDA und dnOPDA in den Chloroplasten erfolgt, findet die weitere Umwandlung zu JA in den Peroxisomen statt. Einzelheiten zum Ablauf der Translokation von OPDA und dnOPDA von den Chloroplasten in die Peroxisomen sind jedoch bisher nicht bekannt. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass der peroxisomale ABC-Transporter PXA1 (auch: CTS1 bzw. PED3 genannt) zumindest teilweise am Import von OPDA in die Peroxisomen beteiligt ist. Ein weiterer Teil der OPDA könnte als freie Säure nach dem Ionenfallenprinzip vom Cytosol in die Peroxisomen gelangen (Theodoulou *et al.* 2005).

In den Peroxisomen wird OPDA durch die OPDA-Reduktase3 (OPR3) zur 12-Oxophytoensäure (OPC-8) reduziert. Anschließend wird die Carboxyl-Seitenkette durch drei Zyklen der β -Oxidation zu (+)-7-*iso*-Jasmonsäure verkürzt, die wiederum zur thermodynamisch stabileren (-)-JA isomerisiert. Für beide Verbindungen wird ein thermodynamisch stabiles molares Verhältnis von etwa 1:9 angenommen (Qunkert *et al.* 1982).

Applikationsexperimente mit geradzahligen und ungeradzahligen OPC-Derivaten legten nahe, dass eine β -Oxidation an der JA-Biosynthese beteiligt ist, die vergleichbar mit der des Fettsäureabbaus ist (Miersch und Wasternack 2000). In Pflanzen erfolgt die Fettsäure- β -Oxidation in Peroxisomen (Gerhard 1992) und tatsächlich konnte auch die OPR3 in den Peroxisomen lokalisiert werden (Strassner *et al.* 2002). Zu Beginn der hier vorgestellten Arbeiten war jedoch noch kein experimenteller Beleg für die Beteiligung von Enzymen der Fettsäure- β -Oxidation an der Jasmonat-Biosynthese erbracht worden. Erst jüngst konnte dies durch verschiedene experimentelle Ansätze belegt werden.

Jeder Zyklus der peroxysomalen β -Oxidation von Fettsäuren besteht aus den aufeinanderfolgenden Aktivitäten der drei Enzyme Acyl-CoA-Oxidase (ACX), *multifunctional protein* (MFP) und Ketoacyl-CoA-Thiolase (KAT). In Arabidopsis werden diese Enzyme jeweils durch kleine Genfamilien kodiert. Sechs Gene kodieren für ACXs, zwei für MFPs und drei für KATs (Castillo *et al.* 2004). Die Beteiligung einzelner Vertreter der ACX- sowie KAT-Genfamilien an der Biosynthese von Jasmonaten konnte kürzlich sowohl für Arabidopsis als auch für Tomate nachgewiesen werden. In Arabidopsis ist die Expression von *ACX1* und *KAT2* durch lokale und systemische Verwundung induzierbar. Darüber hinaus zeigen *ACX1*- und *KAT2*-*antisense* Arabidopsis-Pflanzen verminderte JA-Gehalte nach Verwundung, und auch in Tomate konnte eine ACX (*ACX1A*) identifiziert werden, die essentiell für die JA-Generierung nach Herbivorenbefall ist (Li *et al.* 2005). Die Beteiligung der beiden MFPs aus Arabidopsis (*AIM1* und *MFP2*) an der JA-Biosynthese wurde bisher nicht nachgewiesen.

Neben den Enzymen der β -Oxidation werden auch Enzyme zur Substrat-Aktivierung durch die Übertragung von CoA benötigt. Dies wird durch Acyl-CoA-Synthetasen, 4-Coumarat:CoA-Ligasen (4CL) und 4CL-like-Proteine katalysiert. Die individuellen Vertreter dieser Genfamilien weisen dabei teilweise unterschiedliche Kettenlängenspezifitäten auf.

In Arabidopsis konnte die Aktivierung von OPDA und OPC-8 durch zwei 4CL-like-Proteine (kodiert durch *At4g05160* und *At5g63380*) *in vitro* gezeigt werden (Schneider *et al.* 2005). T-DNA-Insertionsmutanten dieser beiden Gene zeigten jedoch keine Beeinträchtigung in der wundinduzierten JA-Generierung im Blatt (Koo *et al.* 2006). Allerdings konnte mit *OPCL1* (*At1g20510*) ein weiteres Arabidopsis-Gen identifiziert werden, das eine starke Co-Expression mit dem *OPR3*-Gen aufweist und für ein 4CL-like-Protein kodiert. Für *OPCL1* konnte durch die Charakterisierung einer T-DNA-Insertionsmutante auch *in vivo* eine Beteiligung an der wundinduzierten JA-Biosynthese belegt werden (Koo *et al.* 2006). *In vitro* wurden sowohl OPDA als auch OPC-8 durch *OPCL1* aktiviert. Bislang ist jedoch unklar, ob die aktivierten Verbindungen beide auch *in vivo* innerhalb der Jasmonatbiosynthese auftreten und ob die *OPR3* die aktivierte OPDA als Substrat erkennt und reduziert.

1.3.2 Die AOC als ein Schlüsselenzym der JA-Biosynthese

Die AOC wird als ein Schlüsselenzym der JA-Biosynthese angesehen, da sie die Bildung jener enantiomeren Form katalysiert, die in der natürlich auftretenden OPDA und somit der Jasmonate vorkommt. Zudem wird mit der Generierung von *cis*-(+)-OPDA auch eine erste physiologisch aktive Verbindung bereitgestellt, die z.B. in der Wundantwort und in der Pathogenantwort eine überlappende biologische Funktion mit den Jasmonaten aufweist (Stintzi *et al.* 2001).

Die AOC wurde erstmals aus Maissamen isoliert und als Dimer charakterisiert (Ziegler *et al.* 1997). Nachdem bereits verschiedene *LOX*-, *AOS*- und *OPR*-cDNAs aus unterschiedlichen Pflanzenspezies kloniert worden waren, gelang schließlich aus Tomate die erste Klonierung einer *AOC*-cDNA (Ziegler *et al.* 2000). Seitdem sind über 30 cDNA- bzw. EST-Sequenzen für *AOCs* aus über 20 verschiedenen Spezies unterschiedlicher Taxa bekannt (Stenzel *et al.* 2003b). Die Anzahl der detektierten *AOC*-Sequenzen variiert dabei von einer in Tomate bis hin zu fünf in Soja (*Glycine max*). In Arabidopsis konnten vier Gene identifiziert werden, die für *AOCs* kodieren. Dabei liegen *AOC1* (*At3g25760*), *AOC2* (*At3g25770*) und *AOC3* (*At3g25780*) als *tandem repeat* auf Chromosom 3 des Arabidopsis-Genoms, wohingegen *AOC4* (*At1g13280*) auf Chromosom 1 lokalisiert ist. Die kürzlich erfolgte Aufklärung der *AOC2*-Kristallstruktur zeigte, dass für das *AOC2*-Monomer eine β -barrel-Struktur aus acht antiparallelen β -Faltblättern und einer C-terminalen, teilweise helikalen Extension vorliegt. (Hofmann *et al.* 2006). Zudem scheint die Arabidopsis *AOC2* als Trimer vorzuliegen. Da jedoch *in vitro* Aktivität für die Monomere nachgewiesen werden konnte, bleibt unklar, welche der beiden Formen *in vivo* aktiv ist.

Sowohl die Tomaten-AOC als auch die *AOCs* aus Arabidopsis tragen putative plastidäre Transitpeptide. Die Lokalisation der *AOCs* in Chloroplasten konnte durch immunozytologische

Nachweise belegt werden und wurde durch Importstudien verifiziert (Ziegler *et al.* 2000; Stenzel *et al.* 2003b).

Die vier AOCs aus *Arabidopsis* verfügen über ähnliche molekulare Eigenschaften und weisen mit 74 – 94% untereinander eine hohe Identität der Aminosäuresequenzen auf (Stenzel *et al.* 2003b).

In einem gekoppelten Enzymassay konnte unter Verwendung rekombinanter AOCs die Funktionalität aller vier Enzyme bestätigt werden. Die höchste spezifische Aktivität wurde dabei für die AOC2 detektiert (Stenzel *et al.* 2003b; Dorer 2004).

Die Analyse der Expression der AOCs in Reaktion der Pflanze auf Verwundung zeigte sowohl lokal als auch systemisch für die AOC2 eine deutlich stärkere Expression als für die anderen drei AOCs (Stenzel *et al.* 2003b). Die Expression der AOCs wird u.a. durch Applikation von Oktadecanoiden und Jasmonaten induziert (Stenzel *et al.* 2003b). Dieses positive *feedback* der Jasmonate auf die Expression der JA-Biosynthesegene konnte wiederholt demonstriert werden (Hause *et al.* 2000). Mutanten mit verminderten JA-Gehalten (z.B. *opr3*) oder mit beeinträchtigtem JA-Signalweg (z.B. *coi1*) zeigen dementsprechend auch eine verminderte AOC-Expression und ein vermindertes AOC-Vorkommen im Blatt (Stenzel *et al.* 2003b; Devoto *et al.* 2005). Damit kann ein Anstieg der AOC-Expression in der Regel auch als indirekter Indikator für die Generierung von OPDA und JA dienen.

Das AOC-Proteinvorkommen korreliert in der Verwundungskinetik allerdings nicht mit der AOC-Transkriptakkumulation. So liegt AOC-Protein bereits im unverwundeten Blatt vor, während in der AOC-mRNA-Menge nach Verwundung ein deutlicher transienter Anstieg zu verzeichnen ist (Stenzel *et al.* 2003b). Dies spiegelt sich auch im immunologischen Nachweis wider. Das einmal gebildete AOC-Protein liegt in voll entwickelten Blättern von *Arabidopsis* stabil vor (Hause *et al.* 2003). In Blattquerschnitten von *Arabidopsis* konnte AOC-Protein ebenso wie die AOS und LOX in allen Geweben nachgewiesen werden, wohingegen in Tomate AOC-Protein nur in den Leitgeweben detektiert wurde. In *Arabidopsis* kommt AOC-Protein vermehrt in Blättern vor, lässt sich aber auch u.a. in den Wurzeln und den reproduktiven Organen nachweisen (Hause *et al.* 2003). Speziell in den Blüten korreliert hier das Vorkommen von AOC mit einer nachgewiesenen Funktion von Jasmonaten im Bereich der Filamentelongation (Hause *et al.* 2003).

In *Arabidopsis* war ein differenzieller Nachweis der individuellen AOC-Proteine aufgrund der Kreuzreaktivität des Antikörpers nicht möglich. Daher stehen bisher keine Daten über das Vorkommen einzelner AOCs zur Verfügung, die als Indikation für spezifische oder redundante Funktionen der vier *Arabidopsis*-AOCs dienen könnten.

1.3.3 JA-Metabolismus und Oxylipin-Signatur

Neben OPDA und JA sind auch einige ihrer Metabolite an der Regulation der Genexpression beteiligt, und die einzelnen Verbindungen weisen sowohl redundante als auch spezifische biologische Aktivität auf. Hinzu kommen weitere Oxylipine, die ebenfalls an jasmonatinduzierten Prozessen wie der Wund- und Pathogenantwort beteiligt sind. Im Vorkommen und in der

Zusammensetzung dieser Signalmoleküle bestehen jedoch teilweise erhebliche temporäre und gewebsspezifische Unterschiede (Hause *et al.* 2000; Miersch *et al.* 2004). Sowohl das Spektrum und die jeweilige Menge der auftretenden Substanzen als auch das Verhältnis ihrer Mengen zueinander können stark variieren und scheinen von regulatorischer Bedeutung zu sein (Hause *et al.* 2000). Es wird daher auch als Oxilipin-Signatur bezeichnet (Weber *et al.* 1997).

Bisher sind nur wenige Details zu den molekularen Mechanismen des JA-Metabolismus sowie zur Regulation der JA-Homöostase bekannt. JA kann jedoch über mindestens acht verschiedene Wege metabolisiert werden (Abb. 1.2).

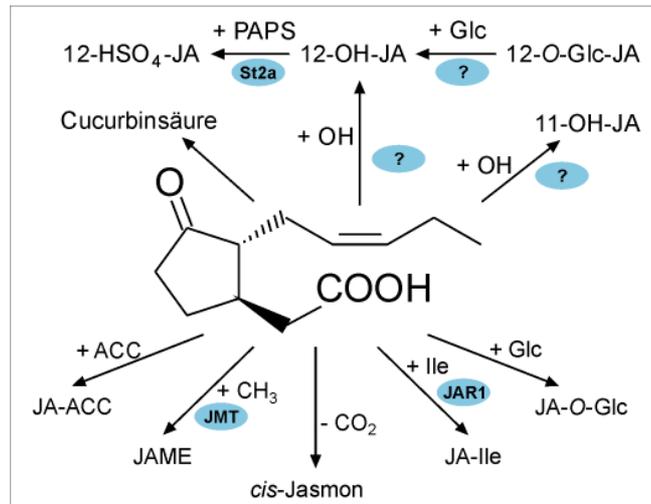


Abb. 1.2: JA-Metabolismus (nach Wasternack 2006)

Vereinfachtes Schema möglicher JA-Metabolisierungsreaktionen. Blau unterlegt sind enzymatisch katalysierte Schritte mit identifizierten bzw. nicht-identifizierten (?) Enzymen. Für Abkürzungen s. Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Die Umwandlung der JA zum Jasmonsäuremethylester (JAME) erfolgt durch eine JA-spezifische Methyltransferase (Seo *et al.* 2001), wohingegen durch Decarboxylierung der JA das flüchtige *cis*-Jasmon entsteht (Koch *et al.* 1997). Die Konjugation mit Aminosäuren erfolgt über zwei Reaktionsschritte. Zunächst wird durch Adenylierung der Carboxylgruppe ein Enzym-gebundenes JA-AMP-Intermediat gebildet (Staswick *et al.* 2002), gefolgt von der Konjugation der JA mit einer Aminosäure (Staswick und Tiryaki 2004). Die Reaktion wird durch das Enzym JAR1 katalysiert, das zur Gruppe der GH3-Familie der Adenylat-bildenden Enzyme der *firefly luciferase*-Superfamilie gehört. Andere Proteine der GH3-Familie vermitteln beispielsweise die Konjugation von Aminosäuren mit Auxin oder SA (Staswick *et al.* 2002; Staswick *et al.* 2005). JAR1 zeigte *in vitro* bevorzugt Aktivität gegenüber Isoleucin als Substrat. Dies spiegelt sich auch in den *in planta* akkumulierenden Mengen von JA-Aminosäurekonjugaten wider. In unterschiedlichen Pflanzenspezies wurde hauptsächlich das JA-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile) detektiert (Kramell *et al.* 1997). Weitere Metabolisierungen der JA umfassen die Konjugation mit der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (Staswick und Tiryaki 2004) sowie die Bildung von Glucoseestern (Swiatek *et al.* 2004). Für keine der beiden Reaktionen sind jedoch bisher die

katalysierenden Enzyme identifiziert worden. Weiterhin können Hydroxy-Jasmonsäuren (11-OH-JA bzw. 12-OH-JA) durch Hydroxylierung der Pentenyl-Seitenkette an Position C-11 bzw. C-12 gebildet werden. Diese wiederum können *O*-glukosyliert (Sembdner und Parthier 1993; Swiatek *et al.* 2004) oder zu 12-HSO₄-JA (Gidda *et al.* 2003) metabolisiert werden (Abb. 1.2).

JA wurde lange als das primäre Signalmolekül der Jasmonate angesehen. Die funktionale Analyse von Metaboliten durch Applikationsexperimente erlaubte nur eingeschränkt Aussagen. Aufgrund der Aufrechterhaltung der JA-Homöostase kann JA möglicherweise durch Hydrolyse ihrer Ester oder Konjugate freigesetzt oder durch weitere Metabolisierung umgewandelt werden. Erst die Charakterisierung von transgenen Überexpressionslinien und Mutanten mit Defekten in der JA-Biosynthese und im JA-Metabolismus hat wesentlich zur Aufklärung der biologischen Funktion individueller Jasmonate und Octadecanoide beigetragen.

Die Überexpression der JMT in Arabidopsis führte zu erhöhten endogenen JAME-Werten, wohingegen die JA-Werte unverändert blieben. Die Pflanzen zeigten eine erhöhte Pathogenresistenz und konstitutive Expression der jasmonatresponsiven Gene *VSP* und *PDF1.2* (Seo *et al.* 2001).

Die biologische Funktion des JA-Aminosäurekonjugats JA-Ile wurde durch die Charakterisierung der *jar1*-Mutante erkannt. Die Mutante ist teilweise resistent gegenüber dem hemmenden Effekt der JA auf das Wurzelwachstum (Staswick *et al.* 1992). Dies deutet die Notwendigkeit der Aktivierung der JA durch Konjugation mit der Aminosäure Isoleucin an. Diese Aktivierung ist jedoch scheinbar nur für einen Teil der JA-vermittelten Prozesse essentiell, da *jar1* Pflanzen fertil sind und weder in der Pollenreifung noch in der Antherendehizens Defekte aufweisen (Staswick und Tiryaki 2004). Auch die wund- bzw. JA-induzierte Bildung von Blatt-Trichomen erfolgt unabhängig von JAR1 (Traw und Bergelson 2003).

12-OH-JA wurde ursprünglich auch als Tuberonsäure bezeichnet, da sie in Kartoffel die Knollenbildung induziert (Yoshihara *et al.* 1989). Auch in Arabidopsis konnte 12-OH-JA sowie das biologisch inaktive 12-HSO₄-JA nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu anderen Jasmonaten führt die Applikation von 12-OH-JA in Arabidopsis nicht zur Inhibierung des Wurzelwachstums und induziert nicht die Expression des JAME-sensitiven Gens *THI2.1* (Gidda *et al.* 2003).

Die biologischen Funktionen der 12-OH-JA ist noch nicht aufgeklärt. Die Hydroxylierung und anschließende Sulfatierung könnte aber einen effektiven Mechanismus zur Inaktivierung überschüssiger JA darstellen (Wasternack 2006).

Neben den Jasmonaten ist auch OPDA physiologisch aktiv und ist damit auch Teil der Oxylipinsignatur. Die Analyse der *opr3*-Mutante hatte erstmals redundante und nicht-redundante Funktionen von OPDA und Jasmonaten erbracht. So sind die *opr*-Pflanzen aufgrund des Mangels an Jasmonaten männlich steril. Hingegen ist die Resistenz gegenüber einem Befall mit *Bradysia impatiens* sowie einer Infektion mit *Alternaria brassicicola* den korrespondierenden Wildtyp (WT)-Pflanzen ähnlich und wird vermutlich durch OPDA gewährleistet (Stintzi *et al.* 2001).

Demzufolge kommt der OPDA ebenso wie den Jasmonaten eine wichtige Signalfunktion in der Wund- und Pathogenantwort in *Arabidopsis* zu. Dies spiegelt sich auch in der weitgehenden Redundanz von OPDA, JA und JAME bei der Regulation der Expression vieler Gene wider. Nur eine geringe Anzahl von Genen wird jeweils spezifisch durch OPDA oder JA induziert (Stintzi *et al.* 2001; Taki *et al.* 2005).

1.4 Regulation der JA-Biosynthese und der jasmonatvermittelten Prozesse

Obwohl viele Faktoren bekannt sind, die zur Synthese von Jasmonaten führen, sind Details zum molekularen Ablauf dieses Prozesses kaum aufgeklärt. Prinzipiell besteht die Möglichkeit, dass die verschiedenen endogenen und exogenen Reize, die eine JA-Bildung induzieren, über einen gemeinsamen Rezeptor wahrgenommen werden. Als wahrscheinlicher gilt jedoch, dass verschiedene Reize über individuelle Rezeptoren perzipiert werden, die dann in gemeinsame Signaltransduktionskaskaden münden und nachfolgend die Biosynthese von Jasmonaten induzieren (Devoto und Turner 2003).

Bezüglich der molekularer Komponenten der Regulation der Jasmonat-Bildung stehen nur wenige experimentelle Daten zur Verfügung. Es wird aber angenommen, dass die Biosynthese wesentlich durch die drei Faktoren Substratverfügbarkeit, positives *feedback* und Gewebsspezifität kontrolliert wird.

Die Rolle der Substratverfügbarkeit für die Regulation der JA-Bildung konnte durch transgene *gain of function*-Ansätze belegt werden. Die Überexpression von Genen, die für die JA-Biosyntheseenzyme AOS und AOC kodieren, führte nicht zu konstitutiv erhöhten JA-Werten. Erst durch die stressinduzierte Bereitstellung von Substrat wurde nach Verwundung schneller und vermehrt JA generiert (Laudert *et al.* 2000; Stenzel *et al.* 2003a). Eine Ausnahme dazu wurde in transgenen Ansätzen in Kartoffel erreicht. Hier führte die heterologe konsitutive Expression einer AOC aus Lein auch in unverwundeten Blättern zu erhöhten OPDA- und JA-Gehalten (Harms *et al.* 1995).

Durch Applikationsexperimente konnte gezeigt werden, dass sowohl OPDA als auch Jasmonate die Expression der JA-Biosynthesegene induzieren können (positives *feedback*). Dies ermöglicht vermutlich eine schnelle Amplifikation der Stressantwort *in vivo* (Laudert und Weiler 1998; Sasaki *et al.* 2001; Stenzel *et al.* 2003a; Maucher *et al.* 2004). Mit der Charakterisierung von jasmonatresponsiven Transkriptionsfaktoren der AP2/ERF-Familie (z.B. ORAs) konnte zudem eine molekulare Komponente dieses positiven *feedbacks* identifiziert werden. So führt die Überexpression des ORA47-kodierenden Gens u.a. zur Induktion von JA-Biosynthesegenen wie *LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3* und *ACX1* (Pré 2006).

Für die Regulation der Jasmonatbiosynthese ist zudem teilweise auch das gewebsspezifische Vorkommen der Jasmonatbiosyntheseenzyme von Bedeutung. So sind in Tomatenblättern die Enzyme für LOX und AOS konstitutiv in allen Blattgeweben nachweisbar, wohingegen das AOC-

Protein vorrangig in den Leitgeweben lokalisiert ist (Hause *et al.* 2000). Dementsprechend kommt es nach Verwundung auch präferentiell in den Leitgeweben zur Bildung von Jasmonaten (Stenzel *et al.* 2003a). In Arabidopsis hingegen lassen sich sowohl LOX als auch AOS und AOC in allen Geweben des Blattes nachweisen (Stenzel *et al.* 2003b). Da die AOC hier jedoch durch eine kleine Genfamilie kodiert wird, besteht eine erweiterte Möglichkeit der zeitlich und räumlich differentiellen Regulation der einzelnen Gene und Genprodukte.

Die Charakterisierung der Arabidopsis-Mutante *cev1* ergab eine potentielle Beteiligung von Zellwandbestandteilen an der Regulation der JA-Synthese. *cev1*-Pflanzen sind in dem Cellulose Synthase-Gen *CeSA3* defekt. Dies resultiert in einer konstitutiven Generierung von JA und Ethylen, sowie in einer konstitutiven Expression von Abwehrgenen (Ellis und Turner 2001; Ellis *et al.* 2002). Für Tabak wurde eine Mitogen-aktivierte-Protein-(MAP)-Kinase (WIPK) identifiziert, die an der Induktion der Jasmonat-Bildung in der Wundantwort beteiligt ist (Seo *et al.* 1999).

Die Regulation der durch Jasmonate vermittelten Prozesse umfasst verschiedene Ebenen (Abb. 1.3). Im Gegensatz zu tierischen Signaltransduktionskaskaden wird jedoch in Pflanzen selten zwischen der Signaltransduktion im eigentlichen Sinn und dem Auslösen einer Sekundärantwort unterschieden (Pauw und Memelink 2004).

Über die molekularen Komponenten der Signaltransduktion der Jasmonate ist nur wenig bekannt. Während beispielsweise für GA, Ethylen, BR, ABA und Auxin bereits spezifische Rezeptoren charakterisiert wurden (Schaller und Bleecker 1995; Dharmasiri *et al.* 2005; Kepinski und Leyser 2005; Kinoshita *et al.* 2005; Ueguchi-Tanaka *et al.* 2005; Razem *et al.* 2006), verliefen Versuche zur Identifizierung eines JA-Rezeptors bisher ergebnislos. Über die weitere Transduktion des JA-Signals ist bisher sehr wenig bekannt. Die Charakterisierung der *mpk4*-Mutante in Arabidopsis hat allerdings gezeigt, dass an der JA-vermittelten Induktion von Abwehrgenen die MAP-Kinase MPK4 beteiligt ist, wobei gleichzeitig die SA-Bildung inhibiert wird (Brodersen *et al.* 2006).

1.4.1 Regulation der Expression JA-responsiver Gene

Adaptationsprozesse erfordern u.a. die Reprogrammierung von Genexpressionsmustern. Dabei haben Transkriptionsfaktoren einen wesentlichen Anteil an der Regulation der transkriptionellen Aktivität. Sowohl die Applikation als auch die endogene Bildung von Jasmonaten führt zu Veränderungen in der Expression einer Vielzahl von Genen. Für Vertreter verschiedener Transkriptionsfaktorfamilien konnte eine Beteiligung an der Kontrolle jasmonatregulierter Genexpression nachgewiesen werden (Abb. 1.3). Dazu gehören u.a. WRKY-, MYB-, bHLH-(MYC-) und insbesondere AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise WRKY70 (Li *et al.* 2004), AtMYC2 (Boter *et al.* 2004) sowie zwei ORA-Transkriptionsfaktoren, der AP2/ERF-Familie (Memelink *et al.* 2001; Atallah 2005). Dabei treten sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte zwischen den stressinduzierten Signalwegen der Jasmonate sowie des Ethylens (ET) und der Salicylsäure (SA) auf (Abb. 1.3). So wird beispielsweise die Expression der

Gene, die für die AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren *ORA59* und *ERF1* kodieren, sowohl durch den Jasmonat- als auch den Ethylen-Signalweg induziert (Pré 2006). Im Gegensatz dazu wird die Expression des SA-induzierbaren Gens *WRKY70* durch Jasmonate reprimiert. Auch auf der Ebene der Zielgene der Transkriptionsfaktoren bestehen regulatorische Vernetzungen. Während *ERF1* die Abwehrgene *PDF1.2* und *HEL* positiv reguliert, wird die Expression der wundresponsiven Gene *VSP*, *LOX2* und *THI2.1* reprimiert. Im Gegensatz dazu werden die Abwehrgene durch *ORA37* und *AtMYC2* negativ reguliert, wohingegen die Expression der wundresponsiven Gene induziert wird (Abb. 1.3).

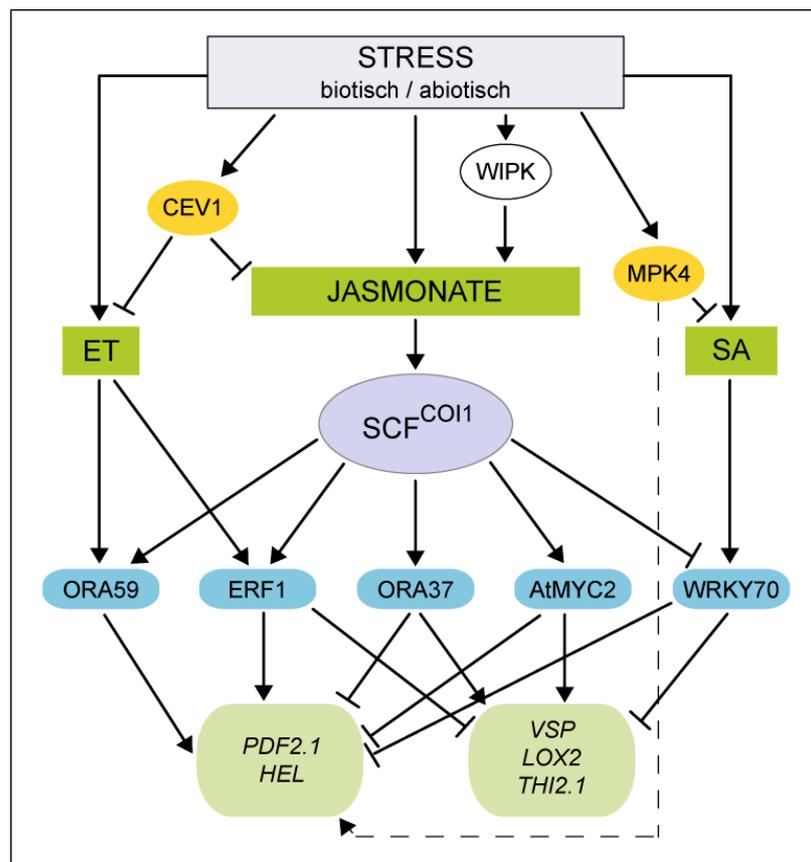


Abb. 1.3: Netzwerk stressinduzierter Signalwege (verändert nach Lorenzo und Solano 2005; Pré 2006)
 Vereinfachte Darstellung einiger Komponenten im Signalweg jasmonatvermittelter Stressreaktionen und die Interaktion mit den Signalwegen von ET und SA. Für Abkürzungen s. Text bzw. Abkürzungsverzeichnis.

Auch die ubiquitinvermittelte Proteolyse ist an den durch Phytohormone induzierten Anpassungsprozessen beteiligt. Funktionale SCF-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexe erkennen und ubiquitinieren dabei Proteine, die anschließend durch das 26S-Proteasom abgebaut werden können. Da auch transkriptionelle Repressoren durch diesen Mechanismus abgebaut werden, ist dieser Prozess an der Veränderung von Genexpressionsmustern beteiligt. Dies gilt auch für die Expression vieler phytohormoninduzierbarer Gene.

Das F-Box-Protein *COI1* ist beispielsweise als essentiell für viele Jasmonat-regulierte Prozesse charakterisiert worden (Feys *et al.* 1994; Xie *et al.* 1998). So werden 84 % von 212 JA-

induzierbaren Genen COI1-abhängig exprimiert (Devoto *et al.* 2005). COI1 interagiert *in vivo* mit SKP1 und Cullin1 und bildet so einen funktionalen SCF^{COI1}-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex (Devoto *et al.* 2002; Xu *et al.* 2002). Dieser Komplex vermittelt vermutlich den Abbau von Proteinen, die an der Repression jasmonatresponsiver Gene beteiligt sind, und ermöglicht so ihre Expression (Abb. 1.3). Wie in der Mutante *coil* führte das Fehlen der Funktion anderer Komponenten von SCF-Komplexen ebenfalls zum Verlust der JA-Signaltransduktion. Dies wurde beispielsweise für Cullin1 (Ren *et al.* 2005) und AXR1 (Leyser *et al.* 1993) demonstriert. Teilweise liegen hier auch Vernetzungen mit Signaltransduktionswegen anderer Phytohormone vor. So ist eine *axr1*-Mutante (*axr1-24*) u.a. in Auxin-, Ethylen- und JA-vermittelten Prozessen beeinträchtigt (Tiryaki und Staswick 2002), und für die seneszenzfördernde Wirkung von JAME, ABA und Ethylen ist eine Beteiligung des F-Box-Proteins ORE9 notwendig (Woo *et al.* 2001). Damit kommt der ubiquitinvermittelten Proteolyse auch eine bedeutende Funktion in der Integration von Signalen verschiedener Phytohormone zu.

1.4.2 Posttranskriptionelle Kontrollmechanismen

Posttranskriptionelle Modifikationen dienen bei der Kontrolle der Biosynthese und der Signaltransduktion von Phytohormonen als wichtige regulatorische Elemente.

Dabei spielt beispielsweise die Regulation der Transkriptabundanz durch miRNAs oder endogene siRNAs eine wesentliche Rolle. Dies ist bereits für die Regulation der Biosynthese und der Signaltransduktion des Auxins belegt (Guo *et al.* 2005; Mallory *et al.* 2005). Es kann angenommen werden, dass dieses ubiquitär verbreitete Regulationsprinzip auch in Signalwegen anderer Phytohormone von Bedeutung ist. Bislang wurden jedoch keine niedermolekularen RNAs identifiziert, die an der Regulation der JA-Biosynthese oder der JA-Signaltransduktion beteiligt sind.

Durch pharmakologische Experimente mit Kinase- und Phosphatase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass reversible Phosphorylierungen essentiell für die Induktion der Jasmonatbiosynthese sind und auch an der Jasmonat-Signaltransduktion beteiligt sind (Rojo *et al.* 1998; Menke *et al.* 1999b; Seo *et al.* 1999). Inwieweit die Enzyme der Jasmonatbiosynthese *in vivo* durch Phosphorylierungen oder andere Reaktionen posttranskriptionell modifiziert werden, ist bisher unbekannt. Die vier AOC-Sequenzen aus *Arabidopsis* weisen zwar putative Phosphorylierungs-, Glycosilierungs- und Myristylierungsstellen auf (Stenzel *et al.* 2003b), ihre funktionelle Bedeutung und biologische Relevanz ist aber bisher nicht experimentell untersucht worden.

Die kürzlich erfolgte Aufklärung der Kristallstruktur der OPR3 legt nahe, dass dieses Biosyntheseenzym durch Homodimerisierung inaktiviert wird und dieser Prozess vermutlich durch reversible Phosphorylierung kontrolliert wird (Breithaupt *et al.* 2006a). Ob auch die AOC, die aus Tomate als Homodimer und aus *Arabidopsis* als Trimer isoliert wurde, durch die Oligomerisierung aktiviert oder inaktiviert wird, ist bisher ungeklärt. Hinweise diesbezüglich sind u.a. durch weitere strukturelle und biochemische Analysen zu erwarten.

1.4.3 Die Rolle von Genfamilien bei der differentiellen JA-Generierung

Viele der Jasmonat-Biosyntheseenzyme werden durch kleine Genfamilien kodiert (Tab. 1.1). Die zeitlich und gewebsspezifisch differenzierte Expression individueller Vertreter dieser Genfamilien könnte an der Regulation der JA-Bildung in unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt sein. In *Arabidopsis* ist die Anzahl der Gene innerhalb der jeweiligen Genfamilien bekannt und für einige dieser Vertreter konnte bereits eine Beteiligung an der Jasmonatbiosynthese nachgewiesen werden (Tab. 1.1). In anderen Spezies sind aufgrund mangelnder Sequenzdaten oft nur eingeschränkte Aussagen über die Größe der einzelnen Genfamilien möglich. Generell scheint jedoch die Anzahl der einzelnen Gene, die für JA-Biosyntheseenzyme kodieren zwischen verschiedenen Pflanzenspezies erheblich zu variieren. So kodiert in Tomate lediglich ein Gen für eine AOC, wohingegen fünf ESTs in Soja identifiziert wurden (Stenzel *et al.* 2003b).

Enzym	Anzahl kodierender Gene	Vertreter, die (potentiell) an der JA-Biosynthese beteiligt sind	Referenz
13-LOX	4	LOX2, LOX3, LOX4, LOX6	Bell und Mullet 1993
AOS	1	AOS	Park <i>et al.</i> 2002
AOC	4	AOC1-4	Stenzel <i>et al.</i> 2003b
OPR	5	OPR3	Schaller <i>et al.</i> 2000
ACS / 4CL / 4CL-like	44	OPCL1, At4g05160, At5g63380	Koo <i>et al.</i> 2006 Schneider <i>et al.</i> 2005
ACX	6	ACX1a	Castillo <i>et al.</i> 2004
MFP	2	?	-
KAT	3	KAT2, KAT5	Castillo <i>et al.</i> 2004

Tab. 1.1: Anzahl der kodierenden Gene für Enzyme der JA-Biosynthese in *Arabidopsis*

Indikationen für eine spezifische Rolle einzelner Vertreter einer Genfamilie an der JA-Bildung in unterschiedlichen Prozessen konnten u.a. in Erbse (*Pisum sativum*) und Mais (*Zea mays*) gewonnen werden. So wird beispielsweise die Expression der acht identifizierten OPR-Gene in Mais sehr unterschiedlich induziert. Während die Expression von *ZmOPR1* und *ZmOPR2* u.a. durch Pathogeninfektion und SA, nicht aber durch Verwundung oder JA induziert wird, liegt der gegensätzliche Fall für *ZmOPR6*, *ZmOPR7* und *ZmOPR8* vor (Zhang *et al.* 2005).

In Erbse konnte wiederum in unterschiedlichen Pflanzenorganen eine heterogene Verteilung verschiedener LOX-Proteine durch Immunoblot-Nachweise belegt werden (Domoney *et al.* 1990). Beide experimentellen Ansätze legen nahe, dass individuelle Vertreter der OPR bzw. LOX-Familien teilweise in spezifische Prozesse eingebunden sein könnten. Allerdings stehen bisher keine experimentellen Daten zu einer funktionalen Charakterisierung dieser Genfamilien zur Verfügung. In *Arabidopsis* konnte für die OPR-Familie jedoch gezeigt werden, dass OPR3, nicht aber OPR1 und OPR2 an der JA-Biosynthese beteiligt ist (Schaller *et al.* 2000). Hinweise auf die

Ursachen dieser Spezifität wurden auch durch die Kristallstrukturuntersuchung der OPR3 und OPR1 erhalten (Breithaupt *et al.* 2006a; Breithaupt *et al.* 2006b).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die AOC ist ein Schlüsselenzym der JA-Biosynthese, da sie für die ausschließliche Bildung von *cis*-(+)-OPDA, dem physiologisch aktiven Intermediat der JA-Biosynthese und Vorläufer der natürlich auftretenden Jasmonate, verantwortlich ist.

In Arabidopsis wird die AOC durch eine kleine Genfamilie von vier Genen kodiert, während sowohl die AOS als auch die in der JA-Biosynthese aktive OPR (OPR3) jeweils nur durch ein einzelnes Gen kodiert werden. Die differentielle Regulation individueller AOCs könnte damit die Möglichkeiten zur differentiellen Regulation der Jasmonat-Bildung in spezifischen Prozessen erheblich erweitern.

In vitro konnte bereits für alle vier rekombinanten AOC-Proteine eine spezifische Aktivität nachgewiesen werden (Dorer 2004). Ungeklärt ist jedoch, ob alle vier Enzyme auch *in vivo* an der Bildung von Jasmonaten beteiligt sind, und ob sie dabei redundante oder spezifische Funktionen übernehmen. Aufgrund der Schlüsselfunktion der AOC innerhalb der JA-Biosynthese ist daher die Charakterisierung der AOC-Genfamilie aus Arabidopsis von besonderem Interesse und sollte Gegenstand dieser Arbeit sein. Dabei sollte neben der physiologischen Bedeutung der Arabidopsis AOCs insgesamt auch die Regulation und biologische Funktion der individuellen AOC untersucht werden.

Um eine umfassende Charakterisierung zu gewährleisten, wurden hierzu verschiedene transgene experimentelle Ansätze verfolgt:

1. Charakterisierung transgener Linien mit RNAi-vermittelter Reduktion (*knockdown*) aller AOCs
2. Analyse der Promotoraktivität einzelner AOCs nach Applikation verschiedener Phytohormone an AOC_{Prom:}*uidA*-Linien
3. Charakterisierung von T-DNA-Insertionslinien (*knockouts*) individueller AOCs

Um weitere Hinweise auf eine mögliche Redundanz oder Nicht-Redundanz der AOCs zu erhalten, wurden neben diesen experimentellen Ansätzen auch allgemein zugängliche *data mining tools* genutzt. Zum einen wurden die Promotorsequenzen der AOCs hinsichtlich des Vorkommens und der Verteilung putativer regulatorischer *cis*-Elemente untersucht. Zum anderen wurden bestehende Expressionsdaten aus Microarray-Experimenten analysiert.

Weiterhin sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung des β -Oxidationsschrittes der JA-Biosynthese erbracht werden. Viele Einzelheiten der JA-Biosynthese sind bereits lange

aufgeklärt und die beteiligten Enzyme wurden aus vielen Pflanzenspezies isoliert, kloniert und charakterisiert. Zu Beginn dieser Arbeiten lagen jedoch keine experimentellen Daten zu den Enzymen vor, die an der β -Oxidation von OPC-8 zu JA beteiligt sind.

Erste Anhaltspunkte für eine potentielle Beteiligung der Enzyme der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation lieferten Fütterungsexperimente (Miersch und Wasternack 2000) sowie die Tatsache, dass die OPR3 in den Peroxisomen lokalisiert werden konnte (Strassner *et al.* 2002).

Ein Nachweis über eine Funktion der β -Oxidationsenzyme in anderen Prozessen als dem Fettsäureabbau wurde bereits durch die Charakterisierung von Mutanten der Auxinbiosynthese gewonnen. Innerhalb der Auxin-Biosynthese bzw. Auxin-Homöostase kommt es teilweise zur Umwandlung von IBA zu IAA (Bartel *et al.* 2001). Parallel dazu wird auch das synthetische Auxin 2,4-DB zum wachstumshemmenden 2,4-D umgewandelt. Für beide Reaktionen wurde ein β -Oxidationsschritt vergleichbar mit dem des Fettsäureabbaus postuliert.

Durch die Isolation und Charakterisierung von Mutanten, die eine Resistenz gegenüber dem wachstumshemmenden Effekt von 2,4-DB bzw. IBA aufwiesen, konnte gezeigt werden, dass in der Tat die Enzyme der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation an der Umwandlung von IBA zu IAA bzw. 2,4-DB zu 2,4-D beteiligt sind (Zolman *et al.* 2000). Unter den isolierten Mutanten waren u.a. Linien mit Störungen der Peroxisom-Biogenese (Zolman und Bartel 2004), sowie Linien mit Defekten in Enzymen der Fettsäure- β -Oxidationskaskade (Richmond und Bleecker 1999).

Da die Biosynthese von JA drei Zyklen der β -Oxidation erfordert und eine Lokalisation dieser Schritte in den Peroxisomen vermutet werden konnte, sollten einige dieser Mutanten auf ihre Fähigkeit zur wundinduzierten Bildung von JA geprüft werden. Anhand eines Fütterungsexperiments sollte außerdem die Umsetzung von OPDA zu JA untersucht werden. Schließlich sollte die Expression JA-responsiver Gene überprüft werden, um die potentielle Beteiligung von Enzymen der peroxisomalen β -Oxidation an der JA-Biosynthese zu verifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien von den folgenden Firmen bezogen:

Farbstoffe: Roth, Serva

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

Marker: MBI Fermentas

Nährmedien, Antibiotika und Phytohormone: Duchefa, Sigma-Aldrich

Oligonukleotide: MWG-Biotech

Radiochemikalien (α -[³²P]-ATP): ICN

Restriktionsenzyme: MBI Fermentas

Weitere Enzyme (DNA-Polymerasen, Reverse Transkriptasen, T4-Ligase und RNase A): MBI Fermentas, Invitrogen, Sigma-Aldrich, TaKaRa

2.1.2 Pflanzenmaterial

Alle Untersuchungen wurden an verschiedenen WTs und Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (Arabidopsis) durchgeführt. Die Mutanten und transgenen Linien wurden z.T. in der Arbeitsgruppe hergestellt, teilweise von anderen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt oder kommerziell erworben (Anhang Tab. 7.1).

2.1.2.1 *aoc3 KO* (UWBC):

Die Isolierung der *aoc3 KO* Pflanzen aus der BASTA-Population der UWBC (<http://www.biotech.wisc.edu/>) erfolgte zuvor durch Tobias Kurz in der Arbeitsgruppe. Beim Screen der BASTA-Population wurde eine T-DNA-Insertion im Exon2 (nt 47028) der *AOC3* (*At3g25780*) identifiziert. In einem zweiten Screen konnte dies bestätigt und auf einen 10er-Pool eingegrenzt werden, von dem Saatgut erworben wurde. Durch Genotypisierung einzelner Pflanzen per PCR wurden *aoc3 KO* Pflanzen identifiziert. Saatgut dieser *aoc3 KO*-Pflanzen lag zu Beginn der Arbeiten vor.

2.1.3 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmiden in *Escherichia coli* wurde der Stamm DH5 α verwendet. Für die Transformation von Arabidopsis-Pflanzen wurde der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 genutzt.

2.1.4 Vektoren

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten zur Vermehrung in *E. coli* wurde in der Regel der Vektor pDrive (Qiagen™ PCR Cloning Kit, Qiagen) verwendet. Teilweise wurden DNA-Fragmente auch in den pCRII-Topo-Vektor (Invitrogen) kloniert.

Für die stabile Transformation von *Arabidopsis* kamen die binären Vektoren pBI101-526 (Datla *et al.* 1993) sowie pBKTX zur Anwendung.

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Anzucht, Transformation und Kreuzung von Arabidopsis

2.2.2 Allgemeine Kultivierungsbedingungen von Arabidopsis

Arabidopsis Pflanzen wurden auf Erde (GS90-Vermikulit-Gemisch) bzw. in steriler Kultur (2.2.2.1) unter verschiedenen Lichtbedingungen angezogen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte in der Regel in Klimaschränken (Percival, CLF) bei 70 % rel. Luftfeuchte, 22 °C Tagestemperatur und 20 °C Nachttemperatur. Die Belichtungsdauer betrug unter Kurztagbedingungen 8 h (16 h Dunkelheit) und unter Langtagbedingungen 16 h (8 h Dunkelheit) bei einer Lichtintensität von 210 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Versuche im Dauerlicht wurden im Klimaschrank MLR-350 (Sanyo) bei 23 °C durchgeführt. Das Abreifen der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei 22 °C und Tageslicht mit Zusatzbeleuchtung.

2.2.2.1 Sterile Kultivierung von Arabidopsis

Zur standardisierten Anzucht sowie zur Nutzung von Selektionsmarkern wurden oberflächensterilisierte Samen auf einem ½-Murashige-Skoog-Medium (Murashige und Skoog 1962) ausgelegt. Die Anzucht der β -Oxidationsmutanten *pex6-1* und *aim1* erforderte eine erhöhte Saccharosekonzentration (1,5 % (w/v)) im Medium. Zur Selektion Kanamycin-resistenter Pflanzen wurde dem Medium 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin zugesetzt.

½-MS-Medium (fest)

MS-Salze (Duchefa)	0,23 %	(w/v)
Saccharose	0,015 %	(w/v)
Plant Agar (Duchefa)	0,8 %	(w/v)

2.2.2.2 Stabile Transformation von Arabidopsis

Die Transformation von *Arabidopsis* erfolgte durch eine *floral dip* Methode (Clough und Bent 1998). Die Pflanzen wurden zunächst vier Wochen unter Kurztagbedingungen und dann zur Blühinduktion weiter unter Langtagbedingungen kultiviert. Nach Entfernung der primären Infloreszenz wurden die sekundären Infloreszenzen zur Transformation eingesetzt. Transgene *A. tumefaciens*-Kulturen wurden in 500 ml YEB-Selektionsmedium kultiviert, abzentrifugiert und bis

zu einer OD₆₀₀ von 0,8 in Infiltrationsmedium (5 % Saccharose; 0,05 % Silwet L-77) resuspendiert. Anschließend wurden die Infloreszenzen in die Infiltrationslösung getaucht, 5 min vacuumfiltriert und anschließend in einer feuchten Kammer liegend ü.N. im Dunkeln inkubiert. Darauf folgte eine Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus bis zur Samenreife. Samen wurden gepoolt geerntet und nach Oberflächensterilisation und Kältebehandlung auf Selektionsplatten ausgelegt. Potentiell transgene Pflanzen wurden auf Erde umgesetzt und per PCR genotypisiert (s. 2.3.4.1).

2.2.2.3 Kreuzung von Arabidopsis-Linien

Zur Kreuzung einzelner *Arabidopsis*-Linien wurde zunächst eine ungeöffnete Knospe des weiblichen Kreuzungspartners präpariert, indem Kelchblätter, Blütenblätter und Staubgefäße mit einer Pinzette vollständig entfernt wurden. Dann konnte Pollen vom männlichen Kreuzungspartner auf den Stempel der präparierten „weiblichen“ Blüte übertragen werden. Zum Ausbilden von Schoten und Abreifen der Samen wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen kultiviert.

2.2.3 Kultivierung und Transformation von *E. coli*

Die Kultivierung von Bakterienstämmen von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssig-Medium bzw. auf LB-Agar-Platten (Sambrook *et al.* 1989). Die Plasmidselektion erfolgte unter Zusatz der Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml) und Carbenicillin (100 µg/ml) im Medium. Zur Nutzung des lacZ-Systems wurden die Selektionsplatten aufeinanderfolgend mit 75 µl X-Gal (2 % (w/v) in Dimethylformamid) und 40 µl IPTG (100 mM in H₂O) bestrichen. Die Transformation erfolgte per Hitzeschock, wobei 5 µl des Ligationsansatzes mit 200 µl kompetenten DH5α-Zellen vermischt wurden. Anschließend wurde 25 min auf Eis, 30 sec bei 42 °C und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl SOC-Medium (Sambrook *et al.* 1989) wurden die Zellen 30 – 90 min bei 37 °C geschüttelt und dann auf Selektionsplatten ausgestrichen.

2.2.4 Kultivierung und Transformation von *A. tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* Kulturen (Stamm GV3101) erfolgte in YEB Medium (0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 0,5 % (w/v) Fleischextrakt; 0,5 % (w/v) Bacto-Trypton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 2 mM MgSO₄; 100 µg/ml Rifampicin). Zur Selektion wurde 50 µg/ml Kanamycin verwendet. Die Transformation erfolgte per Hitzeschock wobei 5 µl Plasmid-DNA mit 100 µl kompetenten *A. tumefaciens* Zellen vermischt wurden. Anschließend wurde jeweils 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium wurden die Zellen für 3 h bei 28 °C geschüttelt und anschließend auf YEB-Selektionsplatten (YEB-Medium; 1,5 % (w/v) Micro Agar; 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen. Die Platten wurden 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien zur DNA-Isolation in Flüssigkultur vermehrt bzw. für die Transformation von Arabidopsis verwendet.

2.3 DNA-Analytik

2.3.1 Isolation pflanzlicher genomischer DNA

Für die Isolation pflanzlicher DNA zum Einsatz in der PCR wurde ca. 0,1 g gemörstertes Pflanzenmaterial in 100 µl DNA-Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl; 10 mM β-Mercaptoethanol) resuspendiert. Nach Zusatz von 6 µl 20 % SDS (w/v) wurden die Proben 15 min bei 65 °C inkubiert und anschließend mit 30 µl 5 M Kaliumacetat vermischt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Proben bei 4 °C und 1200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit 0,7 Vol Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 12000 x g wurde das Nukleinsäurepellet einmal mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurden die Pellets getrocknet und anschließend in MilliQ H₂O gelöst.

Die Isolation hochmolekularer genomischer DNA erfolgte laut Herstellerprotokoll mit dem Plant DNAzol Reagent (Invitrogen).

2.3.2 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Plasmidisolation aus *E. coli* erfolgte durch alkalische Lyse (Sambrook *et al.* 1989). Für die Aufreinigung von Plasmiden zwecks anschließender Sequenzierung wurden 2 ml Übernachtskultur mit dem Quantum Prep[®] Plasmid Miniprep Kit (BIO-RAD) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.3.3 Plasmidpräparation aus *A. tumefaciens*

Die Isolation von Plasmiden aus *A. tumefaciens* erfolgte wie auch bei der Plasmidpräparation aus *E. coli* durch alkalische Lyse (s. 2.3.2). Zur weiteren Analyse (Restriktion, Sequenzierung, etc.) wurde die gereinigte Plasmid-DNA aus in *E.coli* re-transformiert, vermehrt und isoliert.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte, soweit nicht anders angegeben, unter Verwendung rekombinanter Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) nach nebenstehendem Protokoll (Primersequenzen s. Anhang Tab. 7.5).

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung und Sequenzierung erfolgten unter Verwendung der x-Taq-Polymerase (TaKaRa) laut Herstellerprotokoll.

Reaktionsansatz		
2 µl	DNA-Extrakt	
2,5 µl	10 x PCR-Puffer	
1,5 µl	MgCl ₂ [25 mM]	
1 µl	dNTPs [10mM]	
1 µl	<i>forward</i> Primer [20 µM]	
1 µl	<i>reverse</i> Primer [20 µM]	
1 µl	Taq DNA Polymerase [1U/µl]	
ad 25 µl dH ₂ O		
Reaktionsbedingungen		
2 min	95°C initiale Denaturierung	40 Zyklen
2 min	95 °C Denaturierung	
30 sec	60 °C Annealing	
1-2 min	72 °C Elongation	
10 min	72°C finale Elongation	

2.3.5 Agarosegelelektrophorese

Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden im Anschluss an die PCR im Agarosegel (1 % Agarose; 0,5 g/l Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion und Dokumentation erfolgte unter UV-Licht.

2.3.6 Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien (*knockouts*)

Die Genotypisierung der *knockout*-Linien per PCR diente der Überprüfung der T-DNA-Insertion an einem bestimmten Genlocus. Dabei wurde festgestellt, ob in einem oder in beiden Allelen des jeweiligen Gens eine T-DNA-Insertion vorlag.

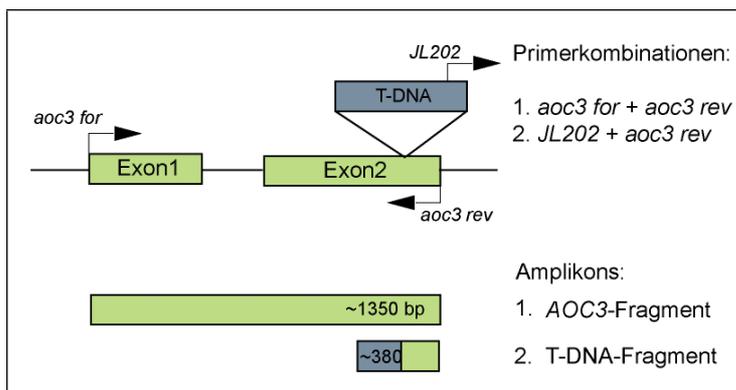


Abb. 2.1: Genotypisierung einer T-DNA-Insertionslinie am Beispiel des *aoc3* KOs

Im Fall eines homozygoten *knockout*-Zustands am *AOC3*-Locus wurde nur Amplikon 1 (AOC3-Fragment) generiert wohingegen im Fall eines heterozygoten Zustands Amplikon 1 und 2 entstanden (Abb. 2.1). Wurde nur Amplikon 2 generiert, war in keinem der beiden *AOC3*-Allele eine T-DNA-Insertion vorhanden, und es lag der Wildtyp-Zustand am *AOC3*-Locus vor. Für die verwendeten *knockout*-Linien kamen jeweils die nachfolgenden spezifische Primerkombinationen in der PCR zur Anwendung (Primersequenzen s. Anhang Tab. 7.5).

Insertionslinie	Primerkombination	Fragment	Fragmentgröße
<i>aoc1 KO</i>	<i>aoc1 for</i> + <i>aoc1 rev</i> <i>aoc1 rev</i> + <i>GABI-L</i>	<i>AOC1</i>	~ 1550 bp
		T-DNA	~ 1200 bp
<i>aoc3 KO</i>	<i>aoc3 for</i> + <i>aoc3 rev</i> <i>aoc3 rev</i> + <i>JL202</i>	<i>AOC3</i>	~ 1350 bp
		T-DNA	~ 380 bp
<i>aoc3 KO (2)</i>	<i>aoc3 for</i> + <i>aoc3 rev</i> <i>aoc3 for</i> + <i>Lba1</i> <i>aoc3 rev</i> + <i>Lba1</i>	<i>AOC3</i>	~ 1350 bp
		T-DNA T-	~ 1500 bp
		DNA	~ 600 bp
<i>aoc4 KO</i>	<i>aoc4 for</i> + <i>aoc4 rev</i> <i>aoc4 for</i> + <i>Lba1</i> <i>aoc4 rev</i> + <i>Lba1</i>	<i>AOC4</i>	~ 1250 bp
		T-DNA	~ 500 bp
		T-DNA	~ 900 bp
<i>aim1</i>	<i>aim1 5UTR for</i> + <i>g_aim1_600_rev</i> <i>g_aim1_600_rev</i> + <i>pBR322-2</i>	<i>AIM1</i>	~ 850 bp
		T-DNA	~ 1100 bp

Zur Bestimmung des exakten Integrationsortes der T-DNA wurden die PCR-Produkte anschließend kloniert und sequenziert.

2.3.7 Bestimmung der Anzahl und Lokalisation von T-DNA-Insertionen

Die Durchführung erfolgte mit kleinen Modifikationen wie im BD GenomeWalker Universal Kit User Manual (BD Biosciences Clontech) beschrieben. Es wurden Restriktionsenzyme, T4-Ligase und der Long-PCR-Mix von Fermentas verwendet und laut Herstellerprotokoll eingesetzt. Adapter und Primer wurden von MWG-Biotech bezogen.

Hochmolekulare genomische DNA des *aoc3 KO*s wurde mit *EcoRV* bzw. *SmaI* geschnitten. Nach Kontrolle der Restriktion im Agarosegel, erfolgte die Ligation von Adaptern an die DNA-Fragmente. Der Ligationsansatz wurde verdünnt 1:5 mit dH₂O als *template* in der ersten PCR eingesetzt. Die amplifizierte DNA der ersten PCR wurde wiederum 1:20 mit dH₂O verdünnt und in der zweiten PCR als *template* verwendet.

Reaktionsansatz (PCR1 bzw. PCR2)	Reaktionsbedingungen
2 µl DNA (Ligation 1:5 bzw. PCR1 1:20)	2 min 94 °C
5 µl 10 x PCR-Puffer	25 sec 94 °C
1 µl dNTPs [10mM]	3 min 72 °C 7 Zyklen
2,5 µl AP1 bzw. AP2 [10 µM]	25 sec 94 °C 32 Zyklen
1 µl <i>left border</i> Primer [10 µM]	3 min (+ 1sec/Zyklus) 67 °C
0,4 µl Taq-Mix [5U/µl]	10 min 67 °C
ad 50 µl dH ₂ O	

In den PCR-Reaktionen wurden unterschiedliche Primer-Kombinationen verwendet. Dabei wurde jeweils der Adapterprimer AP1 (1. PCR) bzw. AP2 (2. PCR) mit T-DNA-spezifischen Primern kombiniert, die an unterschiedlichen Stellen nahe der *left border* (LB) hybridisieren (Primersequenzen s. Anhang Tab. 7.3). So wurden 7 verschiedene Fragmente erhalten, die in den Sequenziervektor pDrive kloniert wurden. Je 4 unabhängige Klone pro Fragment wurden anschließend sequenziert. Von den 28 Klonen waren 5 Sequenzen nicht auswertbar und 7 Sequenzen zeigten keine Homologie zur Arabidopsis-Genomsequenz.

2.3.8 DNA-Sequenzierung

Die generierten Fragmente wurden zunächst nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel extrahiert (QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), laut Herstellerprotokoll) und anschließend in den Vektor pDrive (Qiagen) kloniert. Nach Transformation in *E. coli* und anschließender Vermehrung (ü.N.-Kultur) erfolgte die Plasmidisolierung. Dabei wurden für jedes der 7 verschiedenen Fragmente 4 Klone verwendet. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde photometrisch quantifiziert und anschließend sequenziert.

Die Sequenzierung von langen DNA-Fragmenten (> 400 bp) erfolgte durch die zentrale Sequenzierereinrichtung des Instituts durch Nutzung der fluoreszenzmarkierter Primer *M13 uni* (-21) und *M13 rev* (-29) und einem LI-COR IR2 Gelsequenzierer. Die Sequenzen kürzerer DNA-Fragmente wurden unter Verwendung fluoreszenzmarkierter Nukleotide (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) und einem ABI 3100 Avant Genetic Analyzer Kapillarsequenzierer bestimmt. Dazu wurden *M13 for* (-20) und *M13 rev* Primer verwendet (Primersequenzen s. Anhang

Tab. 7.4). Für die Auswertung der gewonnenen Sequenzinformationen wurden die Software Chromas und die Informationen der Datenbanken von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und TAIR (<http://www.arabidopsis.org/>) genutzt.

2.4 Klonierungsstrategien

2.4.1 Herstellung von DNA-Sonden

Für die Herstellung von DNA-Sonden wurden DNA-Fragmente per PCR generiert (Primer siehe Anhang Tab. 7.5) und in einen Klonierungsvektor ligiert. Nach Transformation und Vermehrung in *E.coli* wurde die isolierte Plasmid-DNA sequenziert. DNA-Fragmente von positiven Klonen (korrekte Sequenz) wurde durch Inkubation mit den unten aufgeführten Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und per Gelelution (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) gereinigt.

Sonde	ID	Vektor	Fragmentgröße	Fragmentisolierung durch:
3'UTR <i>AOC1</i>	<i>At3g25760</i>	pCRII-TOPO	150 bp	<i>EcoRI</i>
3'UTR <i>AOC2</i>	<i>At3g25770</i>	pDrive	150 bp	<i>EcoRI</i>
3'UTR <i>AOC3</i>	<i>At3g25780</i>	pCRII-TOPO	150 bp	<i>EcoRI</i>
3'UTR <i>AOC4</i>	<i>At1g13280</i>	pDrive	150 bp	<i>EcoRI</i>
<i>AOC2</i> cDNA	<i>At3g25770</i>	pCRII-TOPO	845 bp	<i>EcoRI</i>
<i>OPR3</i>	<i>AF132212</i>	pDrive	~1200 bp	<i>EcoRI</i>
<i>AtVSP2</i>	<i>At5g24770</i>	pDrive	850 bp	<i>EcoRI</i>
<i>AtPDF1.2</i>	<i>At5g44420</i>	pZL1	~ 200 bp	<i>NotI / SalI</i>
<i>AtThi2.1</i>	<i>At1g72260</i>	pGEM-T	438 bp	<i>SphI / SpeI</i>
<i>AtARF1</i>	<i>M95166</i>	pCRII-TOPO	590 bp	<i>EcoRI</i>

2.4.2 Herstellung eines binären 35S:*AOC3*-Vektors zur Komplementierung des *aoc3* *KOs*

Zur Komplementierung des *aoc3* *KOs* wurden Vektoren zur konstitutiven Überexpression der *AOC3* (35S:*AOC3*-Konstrukte) hergestellt und in *aoc3* *KO*-Pflanzen transformiert. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen (ATG bis STOP-Codon) inklusive Intron unter die Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors gestellt, der eine konstitutive Expression des Gens ermöglicht. Es wurde sowohl die kodierende *AOC3* Sequenz des WT's Col-0 als auch die des WT's Ws kloniert. Sie unterscheiden sich durch Basenpaarsubstitutionen, die zum Austausch von zwei Aminosäuren (L32S; L33F) führen. Die Komplementierung der Mutante sollte sowohl mit der *AOC3* des korrespondierenden WT's (Ws) als auch mit der *AOC3* des WT's Col-0 erfolgen, um die funktionelle Homologie der beiden *AOCs* zu überprüfen. Die *AOC3*-DNA-Fragmente wurden per PCR aus genomischer DNA des entsprechenden WT's generiert und dabei mit *BamHI*-Schnittstellen versehen (unter Verwendung der Primer *BamHI_gAOC3* und *gAOC3_BamHI*). Nach Klonierung in den Vektor pDrive und anschließender Sequenzierung wurden die jeweiligen DNA-Fragmente mit *BamHI* aus dem pDrive-Vektor (Qiagen) geschnitten und in den binären Vektor

pBI-101-526 ligiert. Die resultierenden Vektoren pBI-AOC3-Ws bzw. pBI-AOC3-Col-0 wurden in den *A. tumefaciens* Stamm GV3101 kloniert.

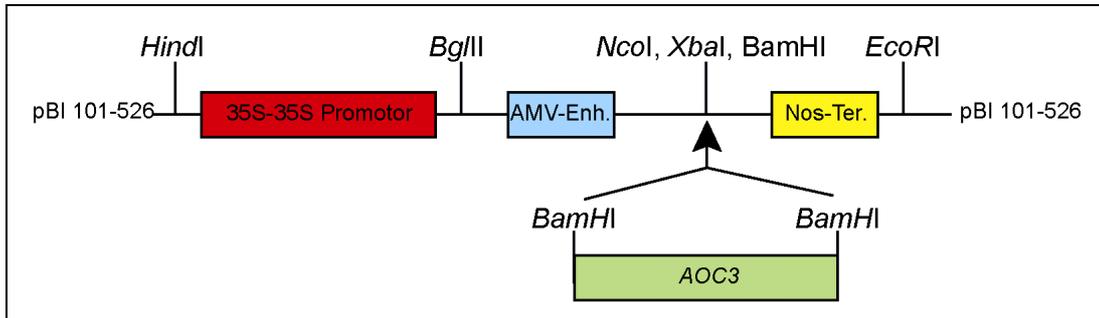


Abb. 2.2: Herstellung des 35S:AOC3-Konstrukts

Positive Klone (überprüft durch Re-Transformation in *E. coli* und erneute Sequenzierung) wurden zur stabilen Transformation von *aoc3 KO* Pflanzen verwendet. Die vollständige T-DNA Kasette (Abb. 2.3) beinhaltet zudem das *NPTII*-Gen, das die Selektion transformierter Pflanzen auf Kanamycin-haltigen MS-Platten ermöglichte.

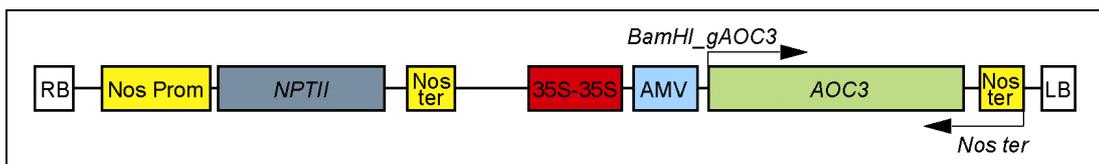


Abb. 2.3: pBI -AOC3 Kasette

Das resultierende T₁-Saatgut wurde auf Kanamycin-haltigen ½-MS-Platten ausgelegt und resistente Pflanzen wurden auf Erde bis zur Samenreife kultiviert.

Da die Selektion durch Kanamycin auch in resistenten Pflanzen eine wachstumshemmende Wirkung auf das Wurzelwachstum hatte, wurde das T₂-Saatgut auf vertikalen ½-MS-Platten ohne Kanamycin ausgelegt. Nach 14 Tagen wurde zunächst die Wurzellänge individueller Keimlinge bestimmt. Anschließend erfolgte die Genotypisierung per PCR. Dabei wurde die Präsenz der T-DNA des Komplementierungs-Konstrukts mit den Primern *BamHI_gAOC3* und *Nos ter* per PCR nachgewiesen (Abb. 2.3).

2.4.3 Herstellung von 35S:AOC(RNAi)-Pflanzen

Die 35S:AOC(RNAi)-Pflanzen lagen zu Beginn der Arbeiten als T₀-Generation vor. Die Herstellung und Transformation des Konstrukts erfolgte zuvor durch Tobias Kurz in der Arbeitsgruppe. Ausgehend von der Homologie der AOC-Gene wurde das Exon2 der AOC3 in *sense* und *antisense* Orientierung mit einem Intron als Abstandhalter als RNAi-Konstrukt ausgewählt. Hierzu wurden die zwei DNA-Fragmente Intron + Exon2 (845 bp) und Exon2 (505 bp) per PCR generiert und jeweils in pBlueskript subkloniert (*PstI/SbaI* bzw. *XhoI/PstI* für Exon2). Das

XhoI/PstI Fragment (designiertes *antisense* Exon2) wurde über die *PstI*-Schnittstelle in das pBlueskript/Intron-Exon2-Plasmid eingefügt. Der Vektor enthielt so die fertige AOC(RNAi)-Kassette (Abb. 2.4), die anschließend mit *KpnI* und *XbaI* aus pBlueskript herausgeschnitten wurde und in den binären Transformationsvektor pBKTIX eingesetzt wurde.

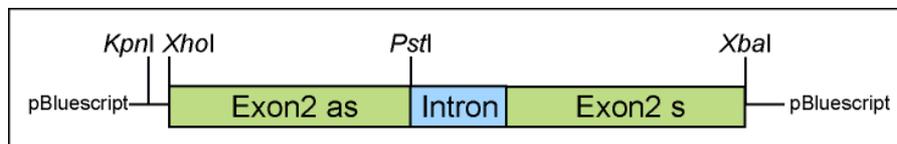


Abb. 2.4: Herstellung der AOC-RNAi-Kassette in pBlueskript

Nach Transformation in *A. tumefaciens* (GV3101) erfolgte die stabile Transformation von *Arabidopsis* durch die *floral dip* Methode.

2.5 RNA-Analytik

2.5.1 RNA-Isolation aus *Arabidopsis*

Die Isolation von RNA zur Northern Blot-Analyse erfolgte nach einer Trizol-Methode, wobei größere Mengen (1-5 g) gemörsertes Pflanzenmaterial in 10 ml Extraktionspuffer (4 M Guanidinthiocyanat; 50 mM Na-citrat pH 4,0; 0,5 % N-Lauroyl-Sarcosyl; 0,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol), 10 ml Phenol und 4 ml Chloroform resuspendiert wurden. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur (schüttelnd) wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 4000 x g zentrifugiert. Die RNA wurde mit Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation pelletiert, gewaschen, getrocknet und anschließend in DEPC-behandeltem H₂O gelöst. In einigen Fällen wurden aus der phenolische Phase Proteine extrahiert.

Für eine Reverse Transkription bzw. qRT-PCR wurde die RNA mit Hilfe des TRIZOL Reagent (Invitrogen) laut Herstellerprotokoll extrahiert. Hierbei wurden in der Regel geringe Mengen an gemörsertem Pflanzenmaterial eingesetzt (0,1 – 0,5 g). Das Pflanzenmaterial wurde unabhängig von der weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gemörsert und bei – 80 °C gelagert.

2.5.2 Agarosegelelektrophorese und Northern Blot

Die extrahierte Gesamt-RNA wurde photometrisch quantifiziert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden 10 - 20 μ g Gesamt-RNA mit 20 μ l Denaturierungspuffer (10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,5; 50 % (v/v) Formamid; 2,2 M Formaldehyd; 10 mM EDTA pH 8,0) versetzt, 15 min bei 65 °C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 5 μ l Ladebuffer (0,5 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) Glycerin; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau; 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 g/ml Ethidiumbromid)

wurden die RNA-Proben im Agarosegel (1,5 % Agarose in RNA-Laufpuffer (10 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6,5; 3,7 % (v/v) Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt.

Danach erfolgte der Transfer der RNA auf eine Nylonmembran und die anschließende Fixierung durch UV-*cross-linking*.

2.5.3 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden und Hybridisierung

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte mit dem Megaprime™ DNA labelling Kit (Amersham Pharmacia) laut Herstellerangaben unter Verwendung von [α -³²P]-dATP.

Die Prähybridisierung erfolgte für mind. 2 h bei 60 °C in ExpressHyb™ (Clontech) Hybridisierungslösung. Nach Zugabe der markierten DNA-Sonde wurde für mind. 4 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend wurde bei 55 °C je einmal für 30 min mit folgenden Lösungen gewaschen (2 x SSC/0,1 % (w/v) SDS; 1 x SSC/0,1 % (w/v) SDS; 0,5 x SSC/0,1 % (w/v) SDS).

Die Detektion und Quantifizierung der radioaktiven Markierung erfolgte durch ein Phosphoimaging-System (Molecular Dynamics) am Storm 860 Scanner (Molecular Dynamics).

2.5.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA-*Templates* zur Sondenherstellung per PCR erfolgte mit der Reversen Transkriptase M-MuLV (MBI Fermentas) laut Herstellerprotokoll.

2.5.5 Quantitative Real-Time RT-PCR (qRT-PCR)

Die Real-time RT-PCR-Analysen wurden mit dem Gerät Stratagene Mx3005P™ (Stratagene) durchgeführt. Die extrahierte RNA wurde zunächst 1:200 mit 10 mM Tris-HCL (pH 7,5) verdünnt und photometrisch quantifiziert. Anschließend erfolgte eine DNase-Behandlung um potentielle kontaminierende genomische DNA zu entfernen. Vor der cDNA-Synthese wurde die Qualität der RNA durch elektrophoretische Auftrennung von 1 µg RNA im nativen Agarosegel überprüft. Die cDNA diente als *template* in der anschließenden Real-Time PCR-Reaktion, in der MilliQ-H₂O und die DNase-behandelte RNA als Kontrollen eingesetzt wurden.

2.5.5.1 DNase-Behandlung

Die DNase Behandlung erfolgte unter Verwendung der Deoxyribonuclease I (Sigma) und des RNase Inhibitors RNaseOut™ (Invitrogen). Von den 11 µl Gesamtvolumen wurden 9,5 µl in der cDNA-Synthese eingesetzt und 1,5 µl wurde mit DEPC-H₂O verdünnt (1:5 bis 1:10) und dienten als Kontrolle in der Real-Time PCR.

DNase-Behandlung

7,5 µl RNA-Extrakt (ca. 0,3 µg RNA)
 1 µl 10 x Reaktionspuffer
 0,5 µl RNaseOut [40 U/ml]
 1 µl DNase [1 U/µl]
 15 min Inkubation bei RT
 + 1 µl Stop Lösung [50 mM EDTA]
 10 min Inkubation bei 70 °C

2.5.5.2 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit der SuperScript™III Reversen Transcriptase (Invitrogen). Die im Herstellerprotokoll angegebenen Mengen wurden dabei der geringeren RNA-*template* Menge angepasst. Der cDNA-Ansatz wurde vor der Verwendung als *template* in der Real-Time PCR mit DEPC-H₂O verdünnt (1:5) und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

cDNA-Synthese	
9,5 µl	RNA-Extrakt (DNase behandelt)
0,5 µl	dNTPs [10 mM]
0,5 µl	Oligo-(dT) ₁₈ -Primer [100µM]
1 µl	DNase [1 U/µl]
5 µl	DEPC-H ₂ O
	5 min Denaturierung bei 65 °C
	Inkubation auf Eis
0,3 µl	SuperScript III RT [200 U/µl]
3,6 µl	5 x Reaktionspuffer
0,3 µl	DTT [0,1 M]
	60 min Inkubation bei 50 °C
	15 min Inkubation bei 70 °C

2.5.5.3 Real-Time PCR

Die Real-Time PCR erfolgte mit dem Stratagene Mx3005P™ (Stratagene) unter Verwendung des Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Die Auswertung erfolgte mit der MxPro Software. Als *threshold fluorescence* wurde die Einstellung *background based* gewählt, die Daten exportiert und anschließend der *comparative expression level* ($CEL = 2^{Ct_{GenX} - Ct_{GenY}}$) errechnet.

Der Ct Wert gibt an, in welchem Zyklus der PCR die DNA-Menge für das jeweilige Gen oberhalb des *thresholds* detektierbar war. GenX stellt das konstitutiv exprimierte Kontrollgen (*PP2A*) dar, wohingegen GenY das zu untersuchende Gen (*VSP1* bzw. *VSP2*) bezeichnet (Primersequenzen s. Anhang Tab.7.2).

Reaktionsansatz		
3 µl	Template [ca. 0,5 ng cDNA]	
1 µl	Primer for [1 µM]	
1 µl	Primer rev [1 µM]	
5 µl	2 x Mastermix (Brilliant SYBR Green QPCR Master MIX)	
Reaktionsbedingungen		
10 min	95°C initiale Denaturierung	40 Zyklen
30 sec	95 °C Denaturierung	
1 min	60 °C Annealing	
30 sec	72 °C Elongation	

2.6 Protein-Analytik

2.6.1 Protein-Isolation aus *Arabidopsis*

Die Isolation von Proteinen erfolgte aus relativ geringen Mengen Pflanzenmaterial bzw. aus der bei der RNA-Extraktion anfallenden Phenolphase (2.5.1).

Etwa 0,1 – 0,5 g gemörserteres Pflanzenmaterial wurden mit 0,5 ml Phenol (H₂O-gesättigt) und 0,5 ml H₂O (phenolgesättigt) versetzt und ca. 30 min schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nachfolgend wurde die phenolische Phase mit 4 Vol 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol versetzt und für mind. 4 h bei -20 °C inkubiert. Die Proteine wurden bei 4000 x g und 4 °C pelletiert und mehrmals mit 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol gewaschen. Das entstandene Pellet wurde getrocknet, in 1 x

Proteinprobenpuffer (68 mM Tris-HCl pH 7,8; 2,3 % SDS (w/v); 10 % Glycerin (w/v); 0,715 M β -Mercaptoethanol) resuspendiert und 5 min bei 90 °C denaturiert.

2.6.2 SDS-PAGE und Western Blot

Die Quantifizierung der extrahierten Proteine erfolgte mit Hilfe des ESEN-Tests (Esen 1978). Die elektrophoretische Auftrennung von 5 – 20 μ g Gesamtprotein erfolgte im 15 %igem SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE), mit anschließender Übertragung auf eine verstärkte Nitrocellulosemembran (OPTITRAN BA-S83 REINFORCED NC, Schleicher und Schuell) mittels einer *semi-dry-blotting*-Apparatur.

2.6.3 Immunodetektion

Zunächst erfolgte eine Ponceau-Färbung (0,1 % (w/v) Ponceau, 5 % (v/v) Eisessig) zur Überprüfung des Proteintransfers und der Beladung. Anschließend wurde die Membran in TBST (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween 20) entfärbt und dann 3 h in 5 % BSA in TBST (w/v) inkubiert. Die Behandlung mit dem primären Antikörper anti-AtAOC2 (1:5000 in 5% BSA/TBST) erfolgte für 2 h. Der anti-AtAOC2-Antikörper wurde mit rekombinanter AOC2 in Kaninchen generiert und ist immunreaktiv gegen alle 4 AOCs von *Arabidopsis*, mit höchster Reaktivität gegen AOC2 (Stenzel *et al.* 2003b). Nach mehrmaligem Waschen der Membran mit TBST (3 x 10 min) erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-rabbit-IgG-AP, Boehringer Mannheim), 1:2000 in 5 % BSA/TBST) für 1 h. Nach kurzem Äquilibrieren der Membran im Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$) wurde die Membran in der Färbelösung (NBT (338 μ g/ml)/ BCIP (175 μ g/ml) in Reaktionspuffer) geschwenkt. Nach dem Auftreten erster Banden wurde die Reaktion durch Inkubation in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 M EDTA) gestoppt.

2.7 Gehaltsbestimmung von OPDA und Jasmonaten

Für die Bestimmung der Gehalte an dnOPDA, OPDA, JA, 12-OH-JA, 12-OH-JA-SO₄ wurde das Pflanzenmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert und gefroren abgewogen (0,5 – 1 g Blattmaterial und 0,1 – 0,5 g Wurzelmaterial). Nach Zusatz von 10 ml Methanol und den internen Standards (je 100 ng [²H₆]JA, 11-[²H₃]OAc-JA, 12-[²H₃]OAc-JA und [²H₅]OPDA) erfolgte die Reinigung, Auftrennung durch HPLC und Quantifizierung per GC-MS bzw. LC-MS (Gidra *et al.* 2003; Stenzel *et al.* 2003b). Die Bestimmung der Gehalte an OPC-8, OPC-6 und OPC-4 erfolgte per GC-MS (Miersch und Wasternack 2000; Delker *et al.* in Vorbereitung).

2.8 Bestimmung von IAA-Gehalten

Die Bestimmung der Gehalte an freiem und konjugiertem IAA erfolgte von Blättern und Wurzeln 9 d alter Keimlinge des *aoc3* KOs und des WTs (Ws). Die Pflanzen wurden 9 d auf vertikalen ½-MS-Platten im Dauerlicht bei 23 °C kultiviert. Zur Analyse wurde Pflanzenmaterial aus mehreren

Anzuchten gepoolt (für jeweils drei unabhängige biologische Proben), in flüssigem Stickstoff gemörsert und abgewogen. Jeweils 150 – 340 mg gefrorenes und gemörsertes Material wurde zur Analyse eingesetzt. Die Extraktion und Quantifizierung erfolgte wie bereits beschrieben (Ludwig-Müller *et al.* 1999; Meixner *et al.* 2005) im Labor von Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller (TU Dresden).

2.9 Luciferase-Nachweis

Die Detektion der Luciferaseaktivität erfolgte *in vivo* mit einem Kamerasystem der Firma Hamamatsu Photonic Deutschland GmbH unter Verwendung der Argus 50-Software des Kameraherstellers. Die Pflanzen wurden mindestens 10 min vor Beginn der Messung mit 1,3 mM Luciferin-Natriumsalz-Lösung (Molecular Probes) besprüht. Bei der Messung wurden die emittierten Photonen mit einer CCD-Kamera erfasst und die Photonendichte in Form eines Falschfarbenbildes dargestellt. Die Sensitivität der Kamera wurde auf einer Skala von 0 bis 10 bei allen Messungen auf den Wert 7 eingestellt. Für die Aufspreizung der Farbskala (*Bit Range*) wurde für alle Darstellungen die empfindlichste Einstellung (0-3) gewählt.

2.10 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität

Zum histochemischen Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität (GUS) wurden die zu untersuchenden Pflanzenteile nach kurzer Vakuuminfiltration 20 h bei 37 °C in Reaktionspuffer (100 mM NaH₂PO₄, pH 7,0; 10 mM EDTA, pH 7,0; 0,5 mM Ferricyanid; 0,5 mM Ferrocyanid; 2 mM X-Gluc; 0,1 % Triton X-100) inkubiert. Anschließend wurden die Proben zum Entfärben mehrmals mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Präparate wurden unter einem Stereomikroskop Stemi 2000-C (Zeiss) analysiert und durch eine FUJIX Digital Camera HC-300Z dokumentiert.

2.11 Mikroskopische Analysen

2.11.1 PEG-Einbettung

Kleine Stücke Pflanzenmaterial wurden nach kurzer Vakuuminfiltration 2 h bei Raumtemperatur in Fixierlösung (4 % (w/v) Paraformaldehyd; 0,1 % (v/v) Triton-X-100 in PBS) inkubiert und anschließend zweimal mit PBS (135 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,5 mM KH₂PO₄; 8 mM Na₂HPO₄; pH 7,2) gewaschen. Die Dehydrierung des Gewebes erfolgte durch eine aufsteigende Ethanolreihe von 10 %, 30 %, 50 %, 70 % (ü. N; 4 °C), 90 %, 100%, 100%/0,1 mg/ml Eosin (55 °C), soweit nicht anders angegeben, für jeweils 30 min bei Raumtemperatur. Die Substitution des Ethanols mit PEG (für Wurzeln: PEG 1500; für Blätter: PEG 1500/PEG 4000 = 1:3) erfolgte bei 55 °C. Die Proben wurden in Einbettungsformen transferiert und langsam abgekühlt. Die fertig eingebetteten Proben wurden luftdicht bei 4 °C gelagert.

2.11.2 Immunodetektion und Fluoreszenzmikroskopie

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms wurden 2 μm Schnitte des Materials hergestellt und auf Poly-L-Lysin-beschichtete Objektträger transferiert. Die Objektträger wurden anschließend zweimal für 10 min mit PBS gewaschen, für 5 min in 0,1 M Ammoniumchlorid in PBS inkubiert und nochmals in PBS gewaschen. Nach 30 min Inkubation in 5 % BSA in PBS (w/v) erfolgte die Behandlung mit dem primären Antikörper anti-AtAOC2 bzw. mit Präimmenserum (PIS) (jeweils 1:2000 in 5 % BSA/PBS) über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurden die Objektträger viermal mit 1 % BSA in PBS (w/v) gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (AlexaFluorR 488 *goat anti-rabbit* IgG (Molecular Probes); 1:500 in 5 % BSA/PBS) erfolgte für 2 h bei 37 °C. Nach viermaligem Waschen mit PBS (je 10 min) wurden die Proben mit Citifluor/Glycerol eingeschlossen und bis zur weiteren Analyse am Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Zeiss) im Dunkeln gelagert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer CCD-Kamera (Sony) und der Software Axiovision (Zeiss).

2.11.3 Whole-Mount-Präparation, Propidium-Iodid-Färbung und CLSM-Auswertung

Wurzelspitzen (ca. 2 cm) von neun Tage alten Pflanzen wurden kurz in PBS vakuumfiltriert und anschließend in Propidiumiodidlösung (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) ü.N. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Proben zunächst 15 min in 25 % (v/v) Glycerin/PBS inkubiert und anschließend in 50 % (v/v) Glycerin/PBS überführt. Bis zur weiteren Analyse lagerten die Proben im Dunkeln bei 4 °C. Die Bestimmung der Wurzelzellgrößen erfolgte an einem Confocalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 510 Meta, Zeiss) unter Verwendung der Zeiss LSM Image Examiner Software.

2.12 Applikationsexperimente

2.12.1 Applikation von JAME an Blättern und Blüten

Die Applikation von JAME an Rosetten 6 Wochen alter Pflanzen diente zur Gewinnung von Kontrollproben, die in Northern Blot-Hybridisierungen zum Einsatz kamen. Hierzu wurden ganze Rosetten oberirdisch abgeschnitten und 1,5 h auf 50 μM JM floriert. Nach kurzem Abtrocknen des Materials auf Filterpapier erfolgte die RNA- und Proteinextraktion.

Die Applikation von JAME an Blüten erfolgte an Jamonatbiosynthese-Mutanten wie *opr3* und *dde2-2* um die Fertilität der Linien wiederherzustellen und die Gewinnung von Samenmaterial zu ermöglichen. Hierzu wurden die Pflanzen nach Ausbildung der Infloreszenzen über einen Zeitraum von 2 – 3 Wochen alle zwei Tage mit einer 450 μM JAME-Lösung besprüht. Anschließend wurden die Pflanzen zum Abreifen im Gewächshaus kultiviert.

2.12.2 Applikation von Phytohormonen mittels Anzucht auf ½-MS-Platten

Die applizierten Phytohormone wurden in Ethanol gelöst und in den angegebenen Konzentrationen direkt dem autoklavierten (abgekühlten) Medium zugesetzt, mit einer Endkonzentration des Ethanols im Medium von 0,1 %. Die oberflächensterilisierten Samen wurden nach 2-tägiger Kältebehandlung auf den Platten ausgelegt, vertikal gelagert und im Dauerlicht inkubiert. Die Messung des Wurzelwachstums erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten nach Aussaat.

2.12.3 Applikation von [²H₅]-OPDA an Blättern

Die Anzucht der Pflanzen erfolgte für 10 Tage unter Langtagbedingungen auf ½-MS-Platten mit erhöhter Saccharosekonzentration (1,5 % (w/v)). Anschließend wurden die Keimlinge auf Erde umgesetzt und weitere 11 Tage unter Langtagbedingungen kultiviert. Da die Mutanten z.T. starke Wachstumsdefizite gegenüber den WT's aufwiesen, wurde zunächst anhand von jeweils 9 Pflanzen pro Linie das Durchschnittsgewicht der oberirdischen Pflanzenteile im Alter von 3 Wochen ermittelt. Für die Applikation wurde 1 mM [²H₅]-OPDA (in 1% Aceton und 0,5 % Tween20), bzw. eine Kontrolllösung (1% Aceton und 0,5 % Tween20 in dH₂O) verwendet, wobei jeweils 150 µl pro 0,5 g Frischgewicht gleichmäßig mit einem Pinsel auf der Blattoberfläche verteilt wurden. 30 min nach Applikation wurden jeweils 9 Pflanzen pro Linie als unverwundete (0 h) Proben geerntet. Jeweils 9 Pflanzen wurden 30 min nach Applikation mechanisch verwundet, die nach weiteren 1,5 h als verwundete Probe geerntet wurden. Das geerntete Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gefroren und gemörsert. Anschließend wurde das Gefriergewicht der Proben und die OPC- und JA-Gehalte bestimmt.

2.13 Verwundungskinetik

Die Analyse der Genexpression sowie die Mengenbestimmung von Jasmonaten in der Wundantwort erfolgte an Blattmaterial. Die verwendeten Pflanzen wuchsen soweit nicht anders angegeben 6 – 8 Wochen unter Kurztagbedingungen. Die Verwundung erfolgte mechanisch durch das Quetschen aller Rosettenblätter mit einer Pinzette einmal quer über die Blattspreite. Die Blätter der verwundeten Pflanzen wurden 1,5 h bzw. 24 h später geerntet. Als Kontrolle wurden unverwundete Pflanzen geerntet (0 h Probe). Nach Mörsern des Pflanzenmaterials in flüssigem Stickstoff erfolgte die RNA- und Proteinextraktion sowie die Bestimmung der Jasmonatgehalte.

2.14 Phänotypische Charakterisierung

2.14.1 Bestimmung der Primärwurzellänge

Die Bestimmung der Primärwurzellängen erfolgte an sterilkultivierten Keimlingen. Oberflächensterilisierte Samen wurden auf ½-MS-Platten ausgelegt, die anschließend vertikal gestellt wurden. Die Anzucht erfolgte, soweit nicht anders angegeben, unter

Dauerlichtbedingungen für den jeweils angegebenen Zeitraum. Die Messung der Wurzellänge erfolgte auf Millimeterpapier unter einem Stereomikroskop (Stemi 2000-C, Zeiss).

2.14.2 Chlorophyllbestimmung

Für die Chlorophyllbestimmung wurden jeweils das dritte und fünfte Blatt (von der Wirtelmitte gezählt) einer Rosette verwendet. Die Probennahme erfolgte von jeweils sechs unabhängigen Rosetten zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (35, 42 und 49 Tage nach Aussaat und Kultivierung im Langtag). Das Chlorophyll wurde durch 30 min. Inkubation in 95 % (v/v) Ethanol bei 80 °C aus Blättern extrahiert und anschließend photometrisch quantifiziert (Woo *et al.* 2001).

2.15 Datenbankanalysen

Zur Gewinnung und Auswertung von Daten aus Datenbanken wurden die nachfolgend aufgeführten Quellen benutzt. Details zur Verwendung und zu den Analyseparametern finden sich in den nachfolgenden Abschnitten.

Datenbank	URL
agris	http://arabidopsis.med.ohio-state.edu/
Arabidopsis Coexpression Tool (ACT)	http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/coexpanalyser.php
AREX	http://www.arexdb.org/database.jsp
Athena	http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena
CLUSTALW	http://www.ebi.ac.uk/clustalw/
Genevestigator	https://www.genevestigator.ethz.ch/
NCBI	http://www.ncbi.nih.gov/
PLACE	http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/
RARGE	http://rarge.gsc.riken.jp/cdna/promoter/
TAIR	http://www.arabidopsis.org/

2.15.1 Sequenzvergleiche und Arabidopsis-Genom-Informationen

Für allgemeine Informationen zu Genen und Sequenzen wurden die TAIR-Datenbank und die NCBI-Hompage genutzt. Sequenzvergleiche erfolgten mittels CLUSTALW und den NCBI-Blast-Funktionen.

2.15.2 Genexpressionsanalyse-Tools

Die Analyse der AOC-Expression anhand frei verfügbarer Microarray-Daten erfolgte mit dem Genevestigator und dem Arabidopsis Coexpression Tool (ACT). Die AREX-Datenbank wurde für die digitalen *in situ* Analysen benutzt.

2.15.3 Promotor-Motiv-Analyse

Die Analyse der AOC-Promotorbereiche erfolgte mit Hilfe der PLACE-Datenbank und der Athena-Datenbank. In beiden Fällen wurden jeweils 1500 bp oberhalb des ATGs zur Analyse verwendet. Informationen zu den detektierten *cis*-Elementen entstammen einerseits den Datenbanken selbst, ergänzt durch Informationen von agris und RARGE.

2.16 Statistische Auswertung

In komplexen biologischen Systemen weisen erhobene Daten in der Regel ein relativ hohes Maß an Variabilität auf. Aus den erhobenen Messwerten lässt sich direkt aber nur die Gesamtvariabilität einer Stichprobenmenge ermitteln, wohingegen z.B. die Varianzanalyse (ANOVA) eine Zerlegung der Variabilität in einzelne Komponenten erlaubt, wobei jede Komponente eine bestimmte Variabilitätsursache hat (Köhler *et al.* 2002). Durch das experimentelle Vorgehen (Genotypen, Anzuchtbedingungen, etc.) können eine oder mehrere Komponenten kontrolliert und der jeweilige Anteil dieser Faktoren an der Gesamtvariabilität bestimmt werden. Je nach Zusammensetzung der erhobenen Daten bezüglich der Verteilung, Varianzhomogenität, balancierter (gleicher) und unbalancierter (ungleicher) Stichprobenmengen stehen unterschiedliche statistische Tests zur Verfügung. Die in der Arbeit erhobenen Messwerte wurden zunächst grundlegender deskriptiver Statistik unterzogen, um die Stichprobenmengen zu charakterisieren und die Voraussetzungen für weiterführende Analysen zu überprüfen (Abb. 2.5). Alle Daten entstammten unabhängigen Stichproben. Zeigten die Daten sowohl eine Normalverteilung als auch eine Homogenität der Varianzen, kamen parametrische Analyseverfahren zum Einsatz. Lag keine Normalverteilung und/oder keine Homogenität der Varianzen vor, so erfolgte die weitere Auswertung der Daten über nicht-parametrische Verfahren.

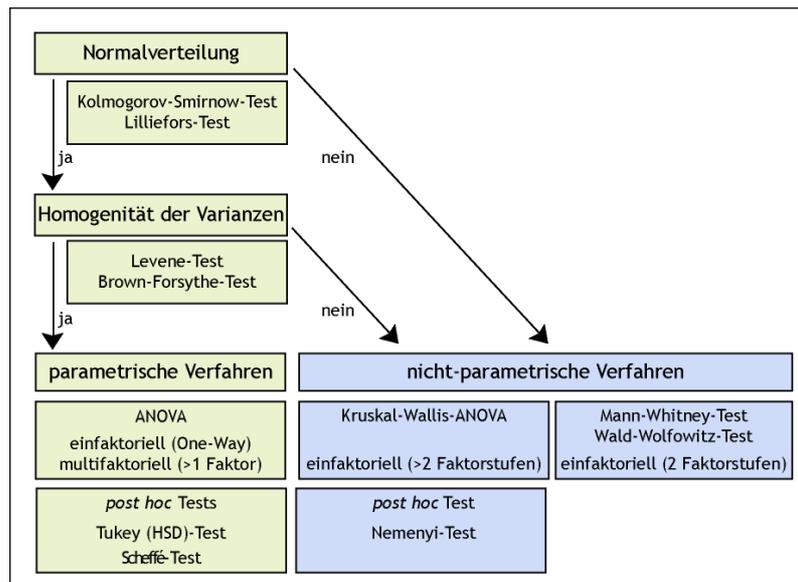


Abb. 2.5: Vorgehensweise bei der statistischen Auswertung von Daten

2.16.1 Deskriptive Statistik

Das arithmetische Mittel (Mittelwert) sowie die Standardabweichung und der Standardfehler wurden in Microsoft Excel berechnet und graphisch dargestellt.

$b = \frac{V}{5 \cdot \lg n}$	Anzahl der Klassen /Intervalle =	$\frac{V}{b}$
wobei: V die Variationsbreite (Maximum - Minimum) n der Stichprobenumfang b die Klassenbreite		

Abb. 2.6: Bestimmung der Klassenbreite und der Klassenanzahl (Köhler *et al.* 2002)

Für die weitergehende statistische Auswertung von Daten musste zunächst überprüft werden, ob die erhobenen Daten einer Normalverteilung entsprachen. Dafür erfolgte erst die Bestimmung der Varianzbreite, der Klassenbreite und der Klassenanzahl (Intervallanzahl) der Datensätze (Abb. 2.6). Anschließend wurden die Daten unter Verwendung der ermittelten Klassen- bzw. Intervallanzahl einem Kolmogorov-Smirnow-Test und einem Lilliefors-Test (Statistica 6.0) unterzogen.

Lag eine Normalverteilung der Daten vor, wurde weiterhin die Homogenität der Varianzen durch einen Levene-Test und einen Brown-Forsythe-Test (Statistica 6.0) überprüft. Lag sowohl eine Normalverteilung als auch eine Homogenität der Varianzen vor, erfolgten die weiteren Analysen mit parametrischen Verfahren, andernfalls kamen nicht-parametrische Analysen zur Anwendung. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Programme Statistica 6.0 und Statgraphics Plus 4.1 (Statistical Graphics Corp.). Andere Rechenwege finden sich in Köhler *et al.* (2002).

2.16.2 Parametrische Verfahren

Abhängig von der Anzahl der experimentell bestimmten Faktoren (Genotyp, Applikation, Gewebe, etc.) wurden einfaktorische (One-Way-ANOVA) und zweifaktorielle ANOVAs (mehrfaktorielle ANOVA) zur Datenanalyse verwendet. Dabei konnten pro Faktor (z.B. Genotyp) jeweils zwei (z.B. WT und Mutante) oder mehrere Faktorstufen (z.B. WT, Mutante 1 und Mutante 2) vorliegen. Mit der Varianzanalyse wurde überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwerten von mindestens zwei Proben bestanden. War dies der Fall, wurde bei gleichen Stichprobenmengen (balancierte Daten) der Tukey-Test als *post hoc* Test verwendet, um zu ermitteln welche Mittelwerte signifikante Unterschiede zueinander aufwiesen. Bei ungleichen Stichprobenmengen (unbalancierte Daten) wurde der Scheffé-Test eingesetzt (Abb. 2.5). Mit Hilfe der multifaktoriellen ANOVA konnte überprüft werden, ob es innerhalb der einzelnen Faktoren signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Faktorstufen gab. Außerdem wurde überprüft, ob signifikante Wechselwirkungen (Interaktionen) zwischen den Faktoren bestanden. Während bei der One-Way-ANOVA sowohl balancierte als auch unbalancierte Daten analysiert werden konnten, kamen bei der multifaktoriellen ANOVA nur balancierte Daten zum Einsatz. Die Analysen wurden mit Hilfe der Software Statgraphics Plus 4.1 (Statistical Graphics Corp.) durchgeführt. Graphische

Darstellungen zeigen Plots der Mittelwerte (One-Way-ANOVA) bzw. Boxplots mit Mittelwerten, Standardfehlern und Standardabweichungen. Die Interaktionsplots (multifaktorielle ANOVA) zeigen Mittelwerte, die Fehlerbalken geben jeweils die 95 % Tukey HSD Intervalle an.

2.16.3 Nicht-parametrische Verfahren

Bei den parameterfreien Verfahren kamen einfaktorielle Analysen zum Einsatz, die auf der Analyse der Rangfolge der Daten beruhten. Bestand der Faktor nur aus zwei Faktorstufen (z.B. WT und Mutante1 für den Faktor Genotyp), wurde mit dem Mann-Whitney-Test und dem Wald-Wolfowitz-Test (Statistika 6.0) auf signifikante Unterschiede geprüft. Lagen mehr als zwei Faktorstufen vor wurde eine Kruskal-Wallis-ANOVA (Statistika 6.0) durchgeführt. Bei diesem Test wird analog zur One-Way-ANOVA getestet, ob signifikante Unterschiede zwischen mindestens zwei Medianen bestehen. Als *post hoc* Test zur Überprüfung welche Mediane sich signifikant voneinander unterschieden, wurde der Nemenyi-Test verwendet. Die graphischen Darstellungen zeigen Box-Whisker-Plots oder Box-Plots mit Medianen, Interquartilabständen (Bereich in dem 50 % der Messwerte um den Median liegen) sowie Variationsbreiten (Abstand zwischen Minimum und Maximum).

3 Ergebnisse

3.1 Promotoranalysen

Die sessile Lebensweise der Pflanzen erfordert ein hohes Maß an Adaptationsfähigkeit an sich verändernde Umweltbedingungen. Diese wird durch ein komplexes Netzwerk an Signalstoffen und Signaltransduktionsketten gewährleistet, die letztlich Einfluss auf die Regulation der Genexpression nehmen. Innerhalb der Promotorsequenzen liegen Sequenzabschnitte (*cis*-Elemente), die für die Bindung der RNA-Polymerase II sowie für die Bindung von aktivierenden oder hemmenden Transkriptionsfaktoren benötigt werden (Guilfoyle 1997; Venter und Botha 2004). Eine Vielzahl von *cis*-Elementen und ihre spezifische Funktion in der Regulation der Genexpression sind mittlerweile in verschiedenen Pflanzenarten charakterisiert worden (Guilfoyle 1997). Diese Informationen wurden zur Identifizierung bekannter putativer *cis*-Elemente in den Promotoren der *AOCs* genutzt. Einerseits sollten so potentielle Faktoren identifiziert werden, die Einfluss auf die Regulation der *AOC*-Expression haben könnten. Andererseits sollten Hinweise auf die spezifische bzw. redundante Regulation der Expression der *AOCs* gewonnen werden (siehe 3.1.1). Die funktionale Charakterisierung einzelner Promotorbereiche durch Deletionsanalyse war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

Weiterhin wurde die *AOC*-Promotoraktivität nach Applikation von Phytohormonen *in vivo* durch die Nutzung von stabil transformierten *AOC*-Promotor:*uidA*-Pflanzen untersucht (siehe 3.1.3). Zur vergleichenden Übersicht sind unter Abschnitt 3.1.2 einige Daten zur allgemeinen Charakterisierung der *AOC*-Promotor:*uidA*-Pflanzen dargestellt, die innerhalb der Arbeitsgruppe von Dr. Irene Stenzel gewonnen wurden (Stenzel *et al.* in Vorbereitung).

3.1.1 Motivanalyse

AOC1, *AOC2* und *AOC3* liegen auf Chromosom 3 als *tandem repeat* vor. Dabei umfasst die nicht-kodierende Sequenz, die zwischen den jeweiligen Genen liegt etwa 1500 - 1800 bp. Das *AOC4*-Gen hingegen trennen nur ca. 400 bp nicht-kodierende Sequenz von dem voranliegenden Gen (*Atlg13270*). Da Promotorbereiche aber auch innerhalb kodierender Sequenzen liegen können, wurden von allen *AOC*-Promotoren jeweils 1500 bp der Sequenz oberhalb der ATGs für die Motivanalyse herangezogen. Unter Nutzung der PLACE-Datenbank (Higo *et al.* 1999) und der Athena-Datenbank (O'Connor *et al.* 2005) wurden die Sequenzabschnitte auf die Präsenz bzw. die Lokalisation bekannter pflanzlicher *cis*-Elementsequenzen untersucht. Da Signalsequenzen sowohl auf dem *sense* als auch auf dem *antisense*-Strang von regulatorischer Bedeutung sein können (Timko *et al.* 1985), wurden beide Stränge bei der Analyse berücksichtigt. Dabei wurde unterschieden zwischen Elementen, die in allen vier Promotoren (Tab. 3.1) auftraten, und solchen, die spezifisch in einem der vier *AOC*-Promotorbereiche zu finden waren (Tab. 3.3). Der weitaus größte Teil der identifizierten Elemente konnte jedoch in zwei oder drei der vier *AOC*-Promotoren

detektiert werden (Tab. 3.2). Die angegebene funktionale Klassifizierung der Elemente (Licht, Gewebsspezifität, etc.) ist dabei nur als grobe Einteilung zu sehen, da Elemente regulatorische Funktionen in verschiedenen Prozessen haben können. Dies trifft beispielsweise auf das G-Box-Element zu, das einerseits in Kombination mit anderen *cis*-Elementen für die Lichtregulation von Bedeutung ist (Guilfoyle 1997), andererseits aber auch in einigen Promotoren als essentiell für die JA-Responsivität charakterisiert wurde (Pauw und Memelink 2004).

Viele der Elemente, die in allen vier Promotoren identifiziert werden konnten, waren relativ häufig innerhalb der einzelnen Promotoren vertreten (Tab. 3.1), wohingegen *cis*-Elemente, die spezifisch in einzelnen oder mehreren AOC-Promotoren auftraten, jeweils nur in geringer Anzahl vorlagen (Tab. 3.2 u. Tab. 3.3). Dies ergab sich teilweise auch aus einer Redundanz zwischen Kern- oder Consensussequenzen, die mehrere spezifische Elemente zusammenfassen (z.B. *W-Box-core* (TGAC) und *W-Box* (TGACY bzw. TTGAC)). Generell war jedoch keines der detektierten *cis*-Elemente in einer der Promotoren statistisch signifikant überrepräsentiert.

	Signalsequenz	AOC1	AOC2	AOC3	AOC4	Name / Funktion/ Spezifität
		(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	
Licht	CAANNNNATC	0 / 1	1 / 2	1 / 1	1 / 1	<i>CIACADIANLELHC</i>
	GRWAAW	9 / 10	5 / 6	9 / 1	5 / 5	<i>GT1CONSENSUS</i>
	GATAA	2 / 5	2 / 2	2 / 1	1 / 1	<i>IBOXCORE</i>
	YTCANTYY	1 / 2	3 / 2	2 / 1	3 / 1	<i>INRNTPSADB</i>
	ACTTTG	0 / 2	1 / 0	1 / 0	1 / 0	<i>TBOXATGAPB</i>
Gewebs- / Organspezifität	TGHAAARK	0 / 1	1 / 3	2 / 0	1 / 0	Samen
	RTTTTTTR	4 / 5	3 / 2	1 / 4	0 / 3	Samen
	CAAT	4 / 2	8 / 5	8 / 12	10 / 3	Samen
	GATA	7 / 6	10 / 9	9 / 9	2 / 3	Chloroplast, <i>GATA-Box</i>
	YACT	5 / 5	10 / 10	9 / 14	12 / 8	Mesophyll
	GTGA	4 / 5	3 / 7	3 / 4	3 / 10	Pollen
	AGAAA	5 / 9	8 / 2	4 / 0	3 / 5	Pollen
	TAAAG	1 / 2	4 / 3	3 / 0	2 / 1	Schließzellen
	ATATT	5 / 6	3 / 7	1 / 6	1 / 1	Wurzel
CWWWWWWWWG	4 / 4	4 / 4	1 / 1	3 / 3	Embryo (<i>AGL15-site</i>)	
CAACA	1 / 3	3 / 2	3 / 2	4 / 4	<i>RAV1-site</i> / Blatt, Wurzel	
Stress- / Abwehr- / Hormon-relevant	ACGT	2 / 2	2 / 2	3 / 3	3 / 3	Trockenstress, Etiolierung
	CNGTTR	2 / 3	0 / 1	0 / 2	2 / 4	Trockenstress
	CANNTG	5 / 5	2 / 2	5 / 5	9 / 9	<i>MYC-site</i> / Trockenstress, ABA
	AAAGAT	1 / 1	3 / 2	2 / 3	0 / 2	infizierte Wurzelzellen (<i>OSE</i>)
	CTCTT	2 / 1	3 / 3	3 / 5	4 / 0	infizierte Wurzelzellen (<i>OSE</i>)
	NGATT	9 / 13	11 / 13	12 / 9	8 / 6	<i>ARR1-site</i> / Cytokinin
	TGAC	3 / 1	2 / 0	11 / 7	2 / 3	<i>W-Box-core</i> / <i>WRKY71-site</i>
	CCAAT	2 / 0	3 / 1	2 / 0	1 / 1	Hitzeschockelement (<i>HSE</i>)
	GTAC	2 / 2	2 / 2	3 / 3	2 / 2	Hypoxia
GANTTNC	1 / 3	2 / 2	1 / 2	1 / 2	<i>Myb-site</i> / CO ₂	
etc.	GGATA	2 / 3	2 / 3	1 / 0	0 / 1	<i>MYBST1</i>
	TTATTT	4 / 5	4 / 6	0 / 6	3 / 0	<i>TATABOX5</i>

Tab. 3.1: putative *cis*-Elemente mit Vorkommen in allen AOC-Promotoren

Die 1500 bp-Region vor dem ATG wurde auf die Präsenz putativer *cis*-Elemente untersucht. Angegeben sind die Signalsequenzen (N = A/C/G/T; R = A/G; W = A/T; Y = C/T), die Anzahl der Elemente auf dem (+)- bzw. (-)-Strang sowie die Funktion und die allgemeine Klassifizierung, der die jeweiligen Elemente zugeordnet werden können. Daten wurden der PLACE-Datenbank (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) entnommen.

	Signalsequenz	AOC1 (+/-)	AOC2 (+/-)	AOC3 (+/-)	AOC4 (+/-)	Name / Funktion / Spezifität
Licht	AAMAATCT		0 / 1	0 / 1	1 / 0	<i>CCA1ATLHCB1</i>
	GATAAG		1 / 1	0 / 1		<i>IBOX</i>
	CGGTCC	1 / 0		1 / 0		<i>PALBOXAPC</i>
	AACCAA	1 / 0	2 / 0	1 / 0		<i>REALPHALGLHCB21</i>
	CGGATA		1 / 2			<i>REBETALGLHCB21</i>
	GGTTAA	1 / 1	1 / 0			<i>GT1CORE</i>
	GCCAC	0 / 1			0 / 1	<i>SORLIP1AT</i>
Gewebs-/ Organellspezifität	TAACARA	2 / 0	0 / 1			Samen
	TATCCAT	1 / 0			1 / 0	Samen
	CNAACAC		1 / 0		0 / 2	Samen
	TACACAT	2 / 0			0 / 1	Samen
	TGCAAAG		1 / 0		1 / 0	Samen
	ATATTTAWW	1 / 0		0 / 1		Samen
	CATGCA	1 / 0		1 / 2		Samen
	CATGCAY	1 / 0		1 / 2		Samen
	CCWACC	0 / 1	2 / 0			Blüte, Samen
	TATTCT	0 / 2	0 / 1			Chloroplast
	ATAGAA	0 / 2	0 / 1	2 / 0		Plastid
	ATGGTA			0 / 1	0 / 2	Plastid
	TTAATGG			0 / 1	0 / 1	Ruhezentrum (QC)
Stress- / Abwehr- / Hormon-relevant	CACATG	2 / 0			2 / 0	Trockenstress, ABA
	CATGTG	0 / 2			0 / 2	Trockenstress, ABA
	ACGTG	0 / 1	1 / 2	1 / 1		Etiolierung, ABA (<i>ABRE</i>)
	ACACNNG	1 / 1	1 / 0	0 / 1		ABA-induziert
	ACCGAC			1 / 0	1 / 0	<i>DRE2</i> , ABA-induziert
	CCGAC		1 / 0	1 / 0	0 / 1	Kälte-responsiv (<i>CRT/DRE-element</i>)
	WAACCA	1 / 0	2 / 0	1 / 0		Trockenstress, ABA
	YAACKG	1 / 0		1 / 0	2 / 0	Trockenstress, ABA
	AGCAGC		1 / 0		0 / 1	anaerob induziert
	TCATCAC		1 / 0		1 / 0	anaerob induziert
	ACTCAT	0 / 1	2 / 0	4 / 1		Hypoosmose-responsiv
	GAAAAA	4 / 3	2 / 0	3 / 0		Pathogen-induziert (<i>GT1GMSCAM4</i>)
	GTTAGTT	1 / 0	1 / 0		0 / 1	Abwehr (<i>MYB1</i>)
	YTGTCWC	1 / 0	1 / 0			Abwehr (<i>SEBF</i>)
	TTGAC	0 / 1		4 / 2	1 / 0	W-Box, SA-responsiv
	TGACY	2 / 0	2 / 0	6 / 4		W-Box, wundresponsiv
	CACGTG		1 / 1	1 / 1		JA-responsiv (<i>G-Box</i>)
	AACGTG	0 / 1	0 / 1			JA-responsiv (<i>G-Box-like</i>)
	TGACG	1 / 0		1 / 0	1 / 0	SA / Auxin / JA (<i>ASF1MOTIF</i>)
	AWTTCAAA	3 / 2		1 / 1		Ethylen-responsiv
	ACTTTA	1 / 0	0 / 3		0 / 1	Auxin-responsiv
	CATATG	1 / 1			2 / 2	Auxin-responsiv
	TGTCTC	1 / 0	0 / 1	0 / 1		Auxin-responsiv (<i>ARFAT</i>)
	TATTAG	0 / 1	2 / 1		1 / 1	Cytokinin-responsiv
	TAACAAA	1 / 0	0 / 1			GA-responsiv (<i>GARE</i>)
	CAACTC	1 / 1		0 / 1		GA-responsiv (<i>GARE</i>)
	TATCCA	1 / 0	0 / 1		1 / 0	GA- / Zucker-responsiv
CGACG	0 / 1			0 / 2	Zuckermangel	
CCTTTT	1 / 0	0 / 2	1 / 1		GA- / Zucker-responsiv	
AATCCAA		3 / 0	1 / 0	1 / 0	<i>RBCSENSUS</i>	
TTATCC	3 / 1	1 / 1			<i>SRE (sugar repressive element)</i>	
etc.	WTTSSCSS	0 / 1	0 / 1			Zellzyklus-Kontrolle
	TATAAAT		1 / 0	1 / 0	1 / 0	<i>TATABOX2</i>
	TATATAA	2 / 0		1 / 1	1 / 1	<i>TATABOX4</i>
	TATTTAA	1 / 1	0 / 1	2 / 2		<i>TATABOXOSPAL</i>

Tab. 3.2: putative cis-Elemente mit Vorkommen in zwei oder drei der AOC-Promotoren

Die 1500 bp-Region vor dem ATG wurde auf die Präsenz putativer cis-Elemente untersucht. Angegeben sind die Signalsequenzen (M = A/C; N = A/C/G/T; R = A/G; W = A/T; Y = C/T), die Anzahl der Elemente auf dem (+)- bzw. (-)-Strang sowie die Funktion und allgemeine Klassifizierung, der die jeweiligen Elemente zugeordnet werden können. Daten wurden der PLACE-Datenbank (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) entnommen.

In allen *AOC*-Promotoren konnten *cis*-Elemente der Lichtregulation identifiziert werden (z.B. I-Box und GT-1-Element), wobei die Kern- oder Consensus-Sequenzen jeweils in allen vier Promotoren vorhanden waren. Nur jeweils ein lichtregulatorisches *cis*-Element konnte spezifisch in den Promotoren von *AOC1* und *AOC2* detektiert werden (Tab. 3.3).

Weiterhin fanden sich in allen vier *AOC*-Promotoren gewebs- bzw. organspezifische Signalsequenzen (z.B. die chloroplastenspezifische und lichtregulierte GATA-Box) sowie stressrelevante *cis*-Elemente (z.B. MYC-site, CANNTG). Auch die Kern-W-Box (TGAC) konnte in allen *AOC*-Promotoren identifiziert werden (Tab. 3.1). W-Box-Elemente dienen als Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren, deren Beteiligung an der Regulation von Abwehrreaktionen nachgewiesen wurde (Singh *et al.* 2002; Li *et al.* 2004).

	Signalsequenz	<i>AOC1</i> (+/-)	<i>AOC2</i> (+/-)	<i>AOC3</i> (+/-)	<i>AOC4</i> (+/-)	Name / Funktion / Spezifität
Licht	TGTATATAT	0 / 1				<i>SORLREP3AT</i>
	CTCCAC		1 / 0			<i>BOXCPSAS1</i>
Gewebs- / Organspezifität	AACAAC				1 / 1	Samen
	TGAGTCA			0 / 1		Samen
	CATGCAT			1 / 2		Samen
	AACCCA		3 / 1			Samen
	CATGCATG			1 / 2		Samen, GA-responsiv
	CCATACATT		1 / 0			Blatt (Plastid)
	TGGTCCCAC			0 / 1		Meristem
	TAAATGYA		0 / 1			L1-Schicht
	AGGTCA		0 / 1			Pollen
	TGTCACA			1 / 0		Frucht
CCWWWWWWWWGG	1 / 1				Embryo (<i>AGL15-site</i>)	
Stress- / Abwehr- / Hormon- relevant	CCAATGT		1 / 0			Blühinduktion
	ACCGACA				0 / 1	Kälte (<i>LTRE</i>)
	CCWWWWWWWWGG	1 / 1				Vernalisation (<i>FLC-site</i>)
	TATTTGCTTAA	1 / 0				Auxin-responsiv
	TAAAATAT	0 / 1				Elicitor-responsiv
	TTTGACT			1 / 0		WB-Box, Elicitor-responsiv
	TAACTG				1 / 0	Wasserstress (<i>MYB2-site</i>)
	GATGAYRTGG			1 / 0		GA-responsiv
	TATCCAC		0 / 1			GA-responsiv
	TAACAGA	1 / 0				GA-responsiv
GNATATNC				1 / 1	Phosphatmangel	
CGAACTT				0 / 1	Ammonium-responsiv	
etc.	TACTATT				1 / 0	<i>SP8b</i>
	TTTATATA	0 / 1				<i>TATAPVTRNALEU</i>
	AACGTT				1 / 1	<i>ACGTTBOX</i>

Tab. 3.3: putative *cis*-Elemente mit Vorkommen in einem der *AOC*-Promotoren

Die 1500 bp-Region vor dem ATG wurde auf die Präsenz putativer *cis*-Elemente untersucht. Angegeben sind die Signalsequenzen (N = A/C/G/T; R = A/G; W = A/T; Y = C/T), die Anzahl der Elemente auf dem (+)- bzw. (-)-Strang sowie die Funktion und allgemeine Klassifizierung, der die jeweiligen Elemente zugeordnet werden können. Daten wurden der PLACE-Datenbank (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) entnommen.

Unter den Signalsequenzen, die in mehreren *AOC*-Promotoren detektiert werden konnten, waren neben einigen lichtregulatorischen und gewebs- bzw. organspezifischen Elementen in erster Linie stress- und phytohormonresponsive Elemente (Tab. 3.2). Dazu gehörten z.B. ein

auxinresponsives ARF-Element (TGTCTC) sowie ABA- und GA-responsive Elemente. Weiterhin wurden JA-responsive Elemente wie das G-Box-Element (CACGTG), die G-Box-like Sequenz (AACGTG) und das ASF1-MOTIF (TGACG) identifiziert.

Andere JA-responsive Elemente, die in JA-induzierbaren Promotoren z.T. als essentiell für die JA-Antwort charakterisiert wurden, finden sich allerdings in keinem der AOC-Promotoren. Dazu gehören z.B. das GCC-Box-Element (AGCCGCC) sowie das in *Catharanthus roseus* charakterisierte JERE (Menke *et al.* 1999a) und andere GCC-like Elemente (Kirsch *et al.* 2000), die von AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren als Bindestellen genutzt werden (van der Fits und Memelink 2001). Auch die im *Arabidopsis OPRI*-Promotor identifizierten Elemente JASE1 und JASE2, das JAME-responsive H-Box-Motiv und das BoxL-Element (Takeda *et al.* 1999) waren nicht innerhalb der jeweiligen 1500 bp Promotorregionen detektierbar.

Bei den Elementen, die spezifisch in den Promotoren einzelner AOCs auftraten, waren vorrangig samenspezifische und GA-responsive Elemente vertreten (Tab. 3.3). Im Promotor der AOC1 fanden sich außer den embryo- und vernalisationspezifischen Elementen auch auxin- und elicitorresponsive Signalsequenzen, wohingegen im AOC2-Promotor ein blatt- bzw. plastid-spezifisches Element, sowie neben einem pollenspezifischen auch ein L1-spezifisches Element identifiziert werden konnten.

Im AOC3-Promotor konnten einige gewebsspezifische Signalsequenzen nachgewiesen werden, während die Elemente, die spezifisch im AOC4-Promotor vorliegen, primär in Zusammenhang mit abiotischem Stress stehen.

Die Analyse der AOC-Promotoren mit der Athena-Datenbank ergab zudem deutliche Unterschiede in der Lage der Elemente mit putativ regulatorischer Funktion. Außerdem konnten für die AOC2 und AOC3 die potentiellen TATA-Boxen lokalisiert werden, wohingegen in den Promotorbereichen der AOC1 und AOC4 keine TATA-Boxen im Bereich -20 bis -35 vor der Transkriptionsinitiationsstelle detektiert wurden. Weiterhin konnten für alle AOCs CpG-Inseln identifiziert werden. CpG-Inseln sind unmethylierte GC-reiche Sequenzabschnitte, die in relativer Nähe zu häufig exprimierten Genen liegen (Ashikawa 2002).

Während in den Promotoren der AOC1 und AOC2 jeweils zwei CpG-Inseln in relativ kurzer Distanz zum ATG detektiert wurden, fand sich im AOC3 Promotor nur eine CpG-Insel. Im Promotor der AOC4 konnten ebenfalls zwei CpG-Inseln ausgemacht werden, allerdings liegen sie im Vergleich zu AOC1 und AOC2 weiter entfernt vom ATG im Bereich des Gens *At1g13270* (Abb. 3.1). Es wird deutlich, dass wesentlich mehr *cis*-Elemente in den Promotoren von AOC1 und AOC2 nachgewiesen werden konnten als in den Promotoren von AOC3 und AOC4, wobei unklar ist, welche der identifizierten putativen *cis*-Elemente wirklich von funktionaler Bedeutung für die Regulation der AOC-Expression sind. Für die funktionale Charakterisierung wären weiterführende Untersuchungen wie z.B. Deletionsanalysen notwendig.

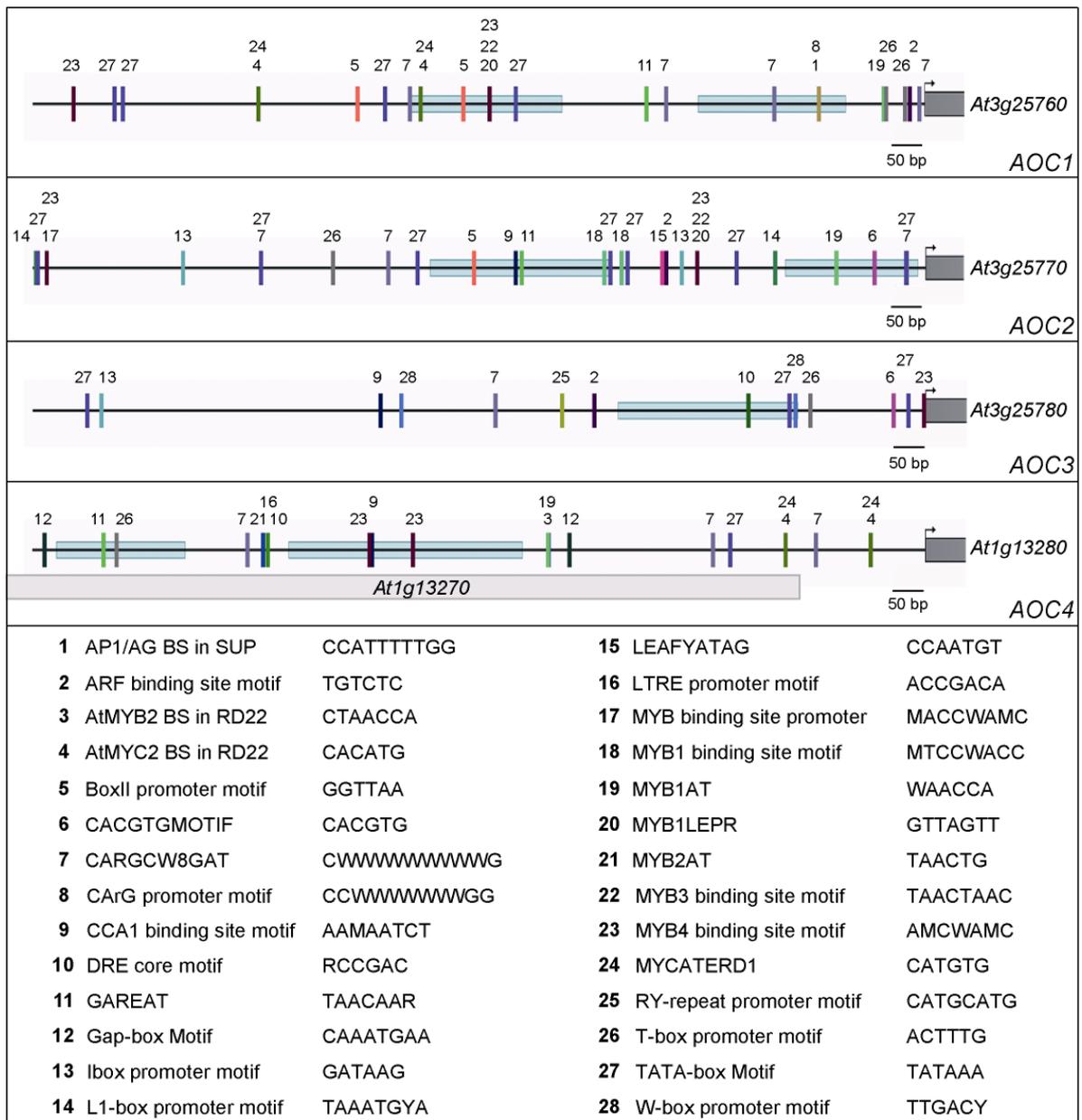


Abb. 3.1: Kartierung putativer Bindestellen bekannter Transkriptionsfaktoren (TF)

Angegeben ist die Lage einiger *cis*-Elemente in den vier *AOC*-Promotorregionen (1500 bp vor dem ATG). Ein Großteil der 1500 bp *upstream*-Region der *AOC4* liegt im Genbereich von *At1g13270* (hellgrauer Balken). Hellblaue Balken umgrenzen CpG-Inseln (unmethylierte CG-reiche Bereiche). Die Daten und die Nomenklatur sowie Teile der Graphiken wurden der *Visualization* Funktion der *Athena*-Datenbank entnommen (<http://www.bioinformatics2.wsu.edu/cgi-bin/Athena/cgi/home.pl>).

3.1.2 Redundante und differentielle Aktivität der *AOC*-Promotoren

AOC-Protein kommt in Arabidopsis in verschiedenen Pflanzenorganen in unterschiedlichen relativen Mengen vor (Hause *et al.* 2003). Erste Expressionsanalysen per Northernblot legten auch Unterschiede in den Transkriptmengen einzelner *AOCs* in verschiedenen Pflanzenorganen nahe (Stenzel *et al.* in Vorbereitung). Weitere Hinweise auf eine redundante oder spezifische Regulation der *AOC*-Expression sollte ein Nachweis der jeweiligen Promotoraktivität liefern. Dazu wurden transgene Pflanzen generiert, in denen das für die β -Glucuronidase kodierende *uidA*-Gen unter

Kontrolle der jeweiligen *AOC*-Promotoren gestellt wurde. Dabei wurden jeweils 1500 - 2000 bp der Sequenz oberhalb des ATGs sowie jeweils das Exon1 der *AOC*-Gene verwendet (Schmidt 2001). Für jede der *AOCs* wurden die Promotoraktivitäten in zwei bis drei unabhängigen Linien analysiert und dokumentiert. Aufgrund der positiven *feedback*-Regulation der JA auf die Transkription der *AOCs* gibt die *AOC*-Expression bzw. die *AOC*-Promotoraktivität auch Hinweise auf potentielle Orte der Jasmonat-Generierung.

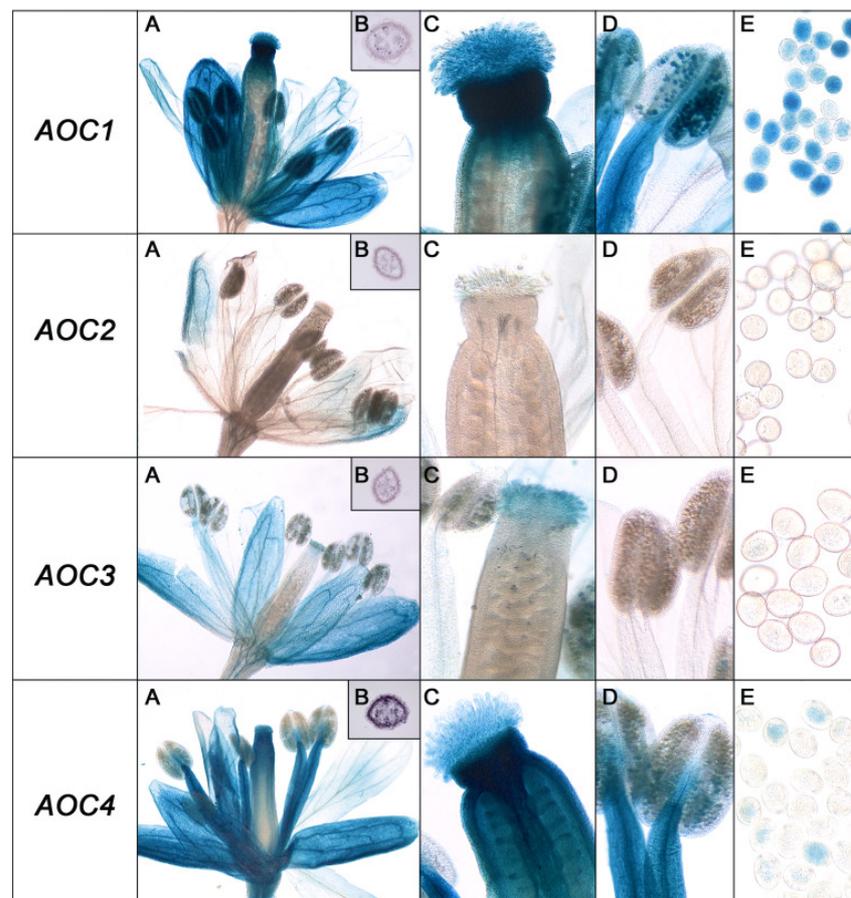


Abb. 3.2: *AOC*-Promotoraktivität in Blütenorganen (Stenzel *et al.* in Vorbereitung)

Übersichtsaufnahme der Blüte (A) sowie Nahaufnahmen von Stigma (C), Antheren und Filamenten (D) sowie isoliertem Pollen (E). Für *in situ*-Hybridisierung an Querschnitten von Blütenstielen wurden spezifische *antisense*-Sonden für einzelne *AOCs* verwendet (B). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte 6 Wochen unter Kurz- und weitere 6 Wochen unter Langtagbedingungen auf Erde. Der histochemische β -Glucuronidase-Assay der Blüten erfolgte für 18 h bei 37 °C.

In der Mehrzahl der untersuchten Pflanzenorgane war eine partielle Redundanz in der Promotoraktivität der *AOCs* nachweisbar. So zeigten beispielsweise die Promotoren von *AOC1* und *AOC4* eine starke Aktivität in nahezu sämtlichen Blütenorganen, während der *AOC3*-Promotor lediglich in Kelchblättern und geringfügig auch im Stigma aktiv war und der *AOC2*-Promotor nur schwache Aktivität in Kelchblättern aufwies (Abb. 3.2). In Blütenstielen konnte das *AOC*-Promotoraktivitätsmuster auch durch *in situ*-Hybridisierungen bestätigt werden. Dabei wurden die einzelnen *AOC*-Transkripte mit spezifischen *antisense*-Sonden nachgewiesen. In den Blütenstielen

konnte nur *AOC4*-Transkript detektiert werden, was mit der Promotoraktivität der vier *AOCs* in diesem Bereich übereinstimmt (Abb. 3.2 B).

In Blättern von 14 Tage alten Keimlingen wurde eine starke Aktivität für die Promotoren von *AOC1* und *AOC2* nachgewiesen (Abb. 3.3). Auch der Promotor der *AOC3* wies hier eine relativ starke Aktivität auf, wohingegen der *AOC4* Promotor nur in Leitgeweben aktiv war.

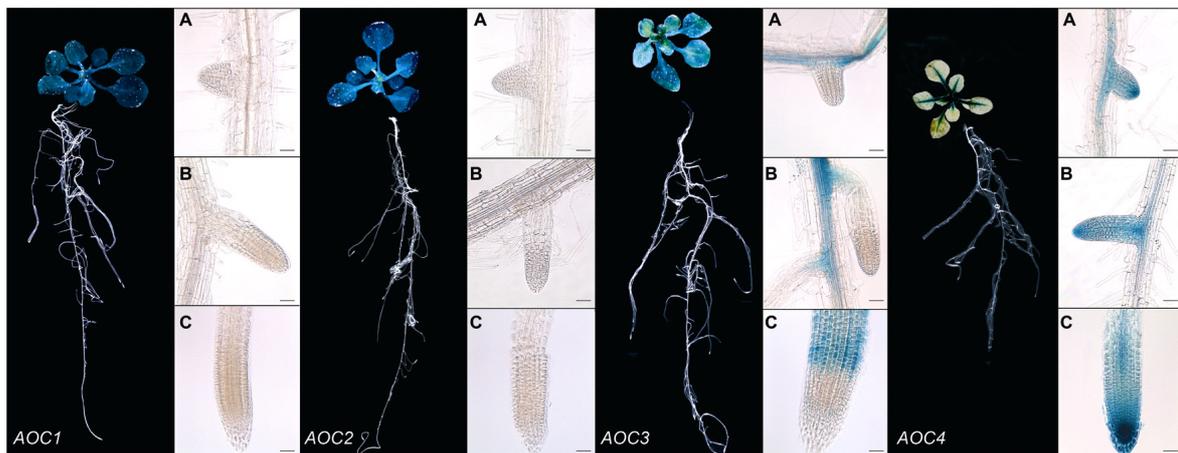


Abb. 3.3: *AOC*-Promotoraktivität in 14 Tage alten Keimlingen (Stenzel *et al.* in Vorbereitung)

Übersichtsaufnahme ganzer Keimlinge, Nahaufnahmen der Lateralwurzeln (A u. B) und der Primärwurzelspitze (C). Die Anzucht der Keimlinge erfolgte unter Langtagbedingungen für 14 Tage auf vertikal orientierten ½-MS-Platten. Der histochemische β -Glucuronidase-Assay von Rosetten und Wurzeln erfolgte getrennt für 18 h bei 37 °C.

Ein spezifisches Promotoraktivitätsmuster trat in Wurzeln der Keimlinge auf. Hier war keinerlei Aktivität der Promotoren von *AOC1* und *AOC2* vorhanden, wohingegen sowohl der *AOC3*- als auch der *AOC4*-Promotor Aktivität zeigte. Im Bereich der Lateralwurzeln waren dabei teilweise Überlappungen in den Promotoraktivitäten zu beobachten, wohingegen in der Primärwurzel distinkte Aktivitätsmuster auftraten. Der Promotor der *AOC3* war in erster Linie in der Elongationszone aktiv. Teilweise trat aber auch Aktivität bis in die meristematische Zone hinein auf. Die Promotoraktivität der *AOC4* hingegen dominierte im Bereich der Wurzelhaube und des Wurzelmeristems, sowie im sich entwickelnden Leitgewebe. Die in der Primärwurzel detektierten Promotoraktivitäten von *AOC3* und *AOC4* waren auch in älteren Lateralwurzeln zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Anhand von Northern Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass die *AOC*-Expression im Blatt u.a. durch Verwundung oder durch Applikation von Jasmonaten induziert werden kann (Stenzel *et al.* 2003b). Um zu überprüfen, inwieweit dies auch der Fall für die vermutlich spezifisch exprimierten *AOCs* in der Wurzel ist, wurden die *AOC*_{Prom}:*uidA*-Linien auf ½-MS-Platten kultiviert, die 10 μ M JAME enthielten.

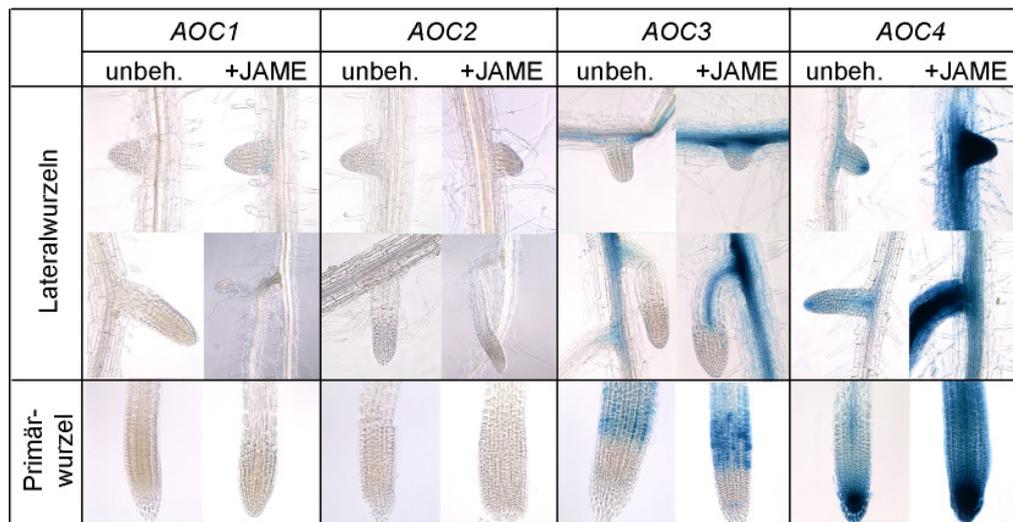


Abb. 3.4: Einfluss von JAME-Applikation auf die AOC-Promotoraktivitäten in Wurzeln (Stenzel *et al.* in Vorbereitung)

Die Keimlinge wurden im Dauerlicht für 9 Tage auf vertikal orientierten ½-MS-Platten mit und ohne 10 µM JAME kultiviert. Der histochemische β-Glucuronidase-Assay erfolgte für 18 h bei 37 °C.

In 14 Tage alten Keimlingen wurde die Aktivität der Promotoren von *AOC3* und *AOC4* durch die JAME-Behandlung deutlich verstärkt. Die im unbehandelten Gewebe auftretende Gewebsspezifität blieb dabei jedoch grundsätzlich erhalten. Promotoraktivität der *AOC1* oder *AOC2* konnten weder in unbehandelten noch in JAME-behandelten Keimlingen nachgewiesen werden (Abb. 3.4).

3.1.3 Einfluss applizierter Phytohormone auf die AOC-Promotoraktivität

Die Promotoraktivitäten der *AOCs* zeigten lediglich in der Wurzel relativ hohe Spezifität. Die Wurzelentwicklung ist stark vom Einfluss verschiedener Phytohormone wie z.B. Auxin, Cytokinin und Ethylen abhängig. Dabei üben die beteiligten Signalstoffe sowohl synergistische als auch antagonistische Effekte auf die Merkmalsausprägung aus (Aloni *et al.* 2004). Für die Jasmonsäure wurde bislang in erster Linie ein inhibitorischer Effekt auf das Primärwurzelswachstum nachgewiesen (Corbineau *et al.* 1988). Gleichzeitig wird dabei aber auch die Lateralwurzelsbildung gefördert (Wang *et al.* 2002). Um den möglichen Einfluss anderer Signalstoffe auf die gewebsspezifische *AOC*-Promotoraktivität und damit auf die JA-Biosynthese zu analysieren, wurden die *AOC*-Promotor:*uidA*-Linien mit verschiedenen Phytohormonen behandelt. Dabei wurden Konzentrationen gewählt, für die ein fördernder bzw. hemmender Einfluss auf die Wurzellänge in Untersuchungen mit brassinosteroiddefizienten Mutanten gezeigt wurde (Müssig *et al.* 2003).

Die applizierten Substanzen hatten in den verwendeten Konzentrationen alle einen inhibitorischen Effekt auf das Primärwurzelswachstum. (Abb. 3.5). Für die verwendeten GA- und Brassinosteroidkonzentrationen wäre aber ein fördernder Einfluss zu erwarten gewesen (Müssig *et al.* 2003).

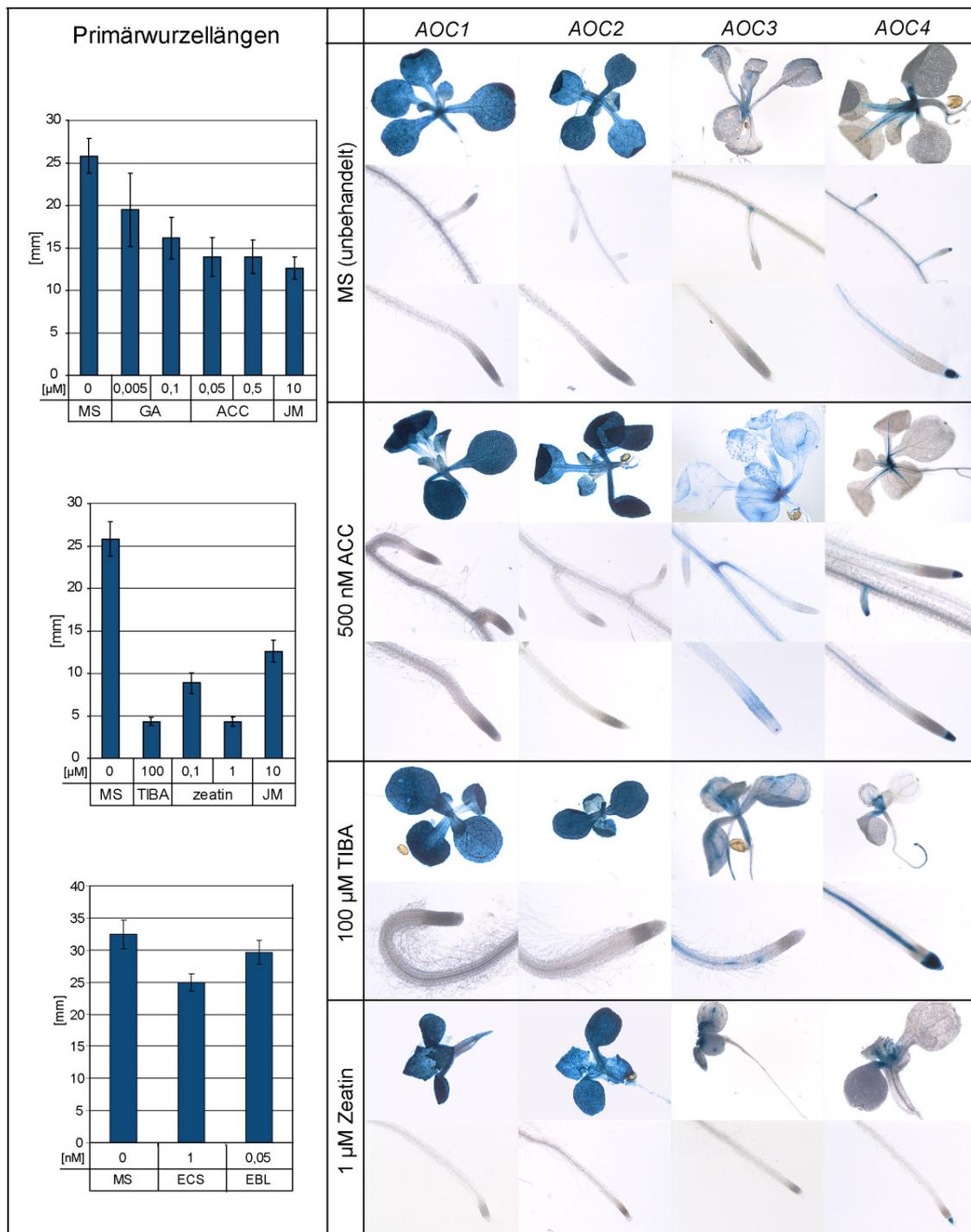


Abb. 3.5: Promotoraktivität der AOCs nach Applikation von ACC, TIBA und Zeatin

Die Keimlinge erfolgte im Dauerlicht für 9 Tage auf vertikal orientierten ½-MS-Platten mit und ohne Zusatz der angegebenen Substanzen. Der histochemische β-Glucuronidase-Assay wurde für 20 h bei 37 °C durchgeführt.

Die Applikation von Brassinosteroiden und GA verursachte keine Veränderungen im Promotoraktivitätsmuster der AOCs (Daten nicht gezeigt). Bei der Behandlung der Pflanzen mit ACC wurde bei einer Konzentration von 500 nM nur für die AOC3 ein Anstieg der Promotoraktivität im Spross und in der Wurzel beobachtet (Abb. 3.5). Die Applikation von 100 µM

TIBA, einem Inhibitor des polaren Auxintransportes, hatte in allen Linien einen Verlust von gravitropem Wurzelwachstum und der Lateralwurzelbildung zur Folge. Die Aktivität des *AOC3*-Promotors wurde dabei sowohl im Spross als auch in der Wurzel geringfügig verstärkt, wohingegen ein deutlicher Anstieg der *AOC4*-Promotoraktivität in Wurzeln zu verzeichnen war.

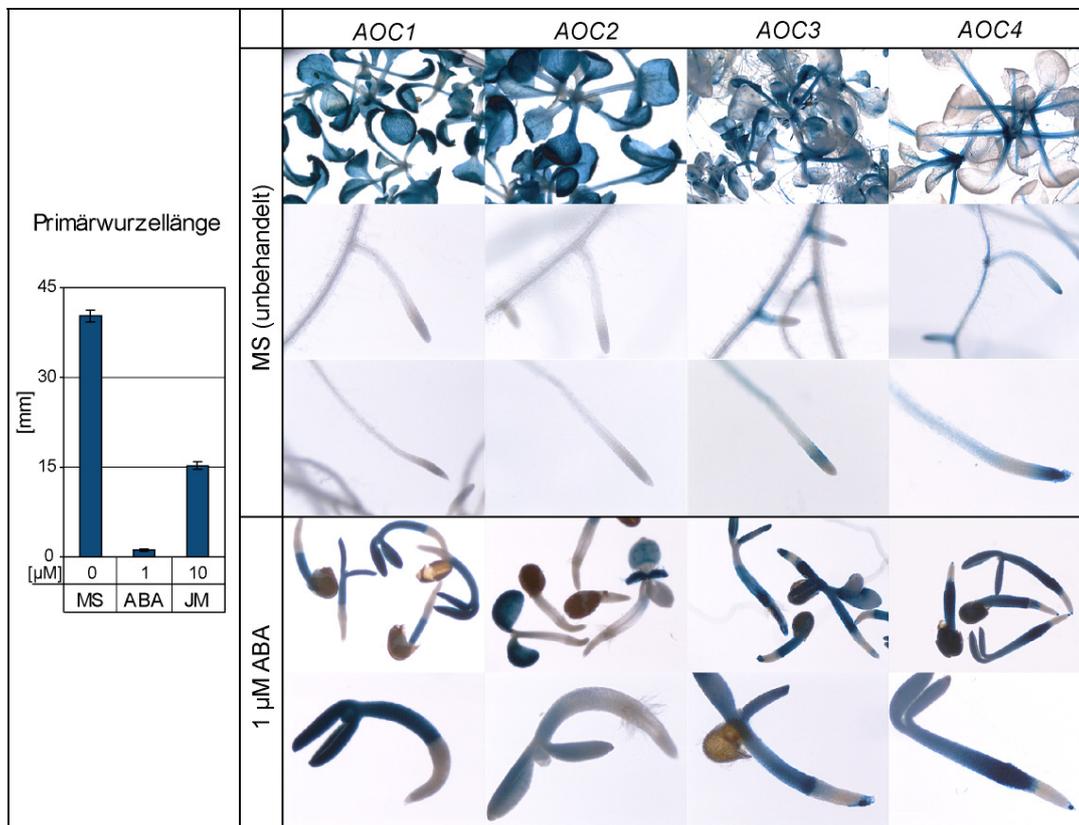


Abb. 3.6: Promotoraktivität der AOCs nach Applikation von ABA

Die Keimlinge wurden im Dauerlicht für 9 Tage auf vertikal orientierten ½-MS-Platten mit und ohne 1 μM ABA kultiviert. Der histochemische β-Glucuronidase-Assay erfolgte für 20 h bei 37 °C.

Durch die Anzucht der Keimlinge auf zeatinhaltigem Medium wurde das Keimlingswachstum und die Lateralwurzelbildung ebenfalls inhibiert. Weiterhin kam es in der Wurzel nahezu zum völligen Erliegen der Promotoraktivität von *AOC3* und *AOC4* (Abb. 3.5).

Auch die Anzucht der Pflanzen auf 1μM ABA-haltigem Medium führte zu einer starken Hemmung der Keimlingsentwicklung. Weiterhin traten deutliche Unterschiede in den Promotoraktivitäten der einzelnen *AOCs* auf (Abb. 3.6). Während der *AOC1*-Promotor in Hypokotylen und in Kotyledonen starke Aktivität zeigte, konnte für den *AOC2*-Promotor in diesen Bereichen keine (Hypokotyl) bzw. nur schwankende (Kotyledonen) Aktivität nachgewiesen werden. Für die Promotoren von *AOC3* und *AOC4* trat in den oberirdischen Pflanzenteilen ebenfalls relativ starke Promotoraktivität auf, die aber im Vergleich zum *AOC1*-Promotor geringer ausfiel.

Insgesamt legen die Promotoranalysen eine partielle Redundanz in der Regulation der AOC-Expression nahe.

3.2 Expressionsanalysen (Datenbankrecherchen)

Mit der zunehmenden Nutzung von Microarrays steht eine Vielzahl von allgemein verfügbaren Informationen zur Expressionsanalyse in verschiedenen Datenbanken zur Verfügung. Für die Analyse der Expression der *AOCs* wurden nur WT-Experimente berücksichtigt, in denen der Affymetrix ATH1-GeneChip verwendet wurde. Leider erlaubt der ATH1-Chip keine eindeutige Unterscheidung der Transkripte von *AOC1* und *AOC2*, da die Array-Oligonukleotidsonde zum Nachweis des *AOC1*-Transkriptes auch Homologie zum Transkript von *AOC2* aufweist und keine weitere Sonde zum Nachweis der *AOC2* vorhanden ist. Daher wurden die Ergebnisse zur *AOC1*-Expression als *AOC1*⁺ gekennzeichnet und beziehen sich (vermutlich) auf die Expression beider Gene.

3.2.1 Expression der *AOCs* in verschiedenen Entwicklungsstadien

Die Expressionsstärke der einzelnen *AOCs* unterschied sich während der Entwicklung teilweise recht deutlich (Abb. 3.7).

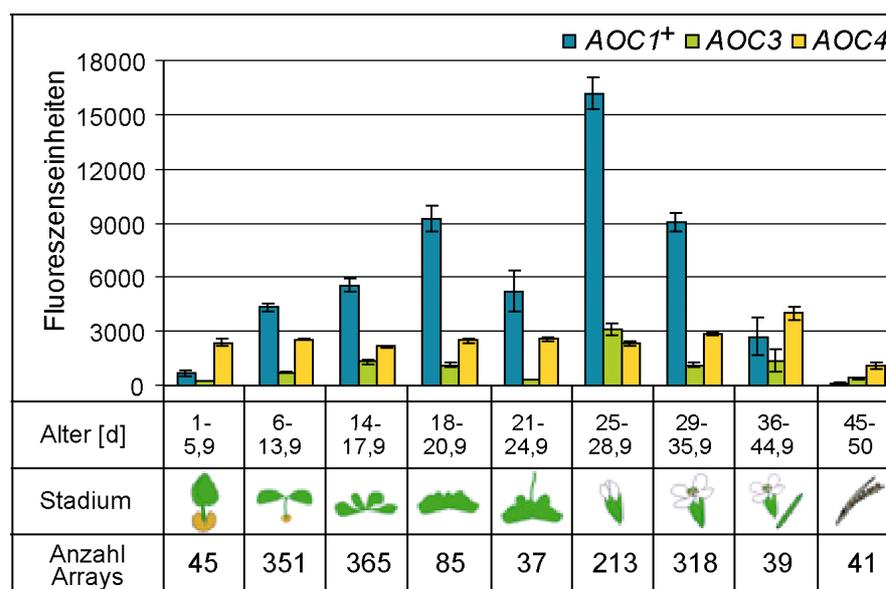


Abb. 3.7: Microarray-Daten zur entwicklungsabhängigen Expression der *AOCs*

Die Mittelwerte und Standardfehler wurden dem *Gene Chronologer* der *Genevestigator*-Datenbank (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) entnommen. Die angegebenen Stadien beziehen sich nicht auf bestimmte Pflanzenorgane, sondern stellen symbolisch den Entwicklungsstand der Pflanze dar (⁺Array-Oligonukleotidsonde zeigt auch Homologie zu *AOC2*).

Während die Expression der *AOC4* in der frühen Keimlingsentwicklung (1 –5,9 d) dominierte, wurde *AOC1*⁺-Transkript bevorzugt in voll ausgebildeten Pflanzen nachgewiesen. Die Transkriptmengen von *AOC3* blieben hingegen während der gesamten Zeit relativ niedrig. Der höchste Wert wurde hier im Alter von 25 – 28,9 Tagen gemessen. Auch die Expression der *AOC4* blieb relativ konstant auf dem Niveau der frühen Keimlingsentwicklung. In seneszenten Pflanzen war die Expression aller *AOCs* reduziert.

3.2.2 Expression der AOCs in verschiedenen Geweben

Die hohe Menge an *AOC1*⁺-Transkript, die im Verlauf der *Arabidopsis*-Entwicklung detektiert wurde, spiegelte sich auch in der Analyse der gewebspezifischen Expression wider. So wurden hohe Mengen an *AOC1*⁺-Transkript in allen grünen Blattgeweben nachgewiesen (Abb. 3.8 B).

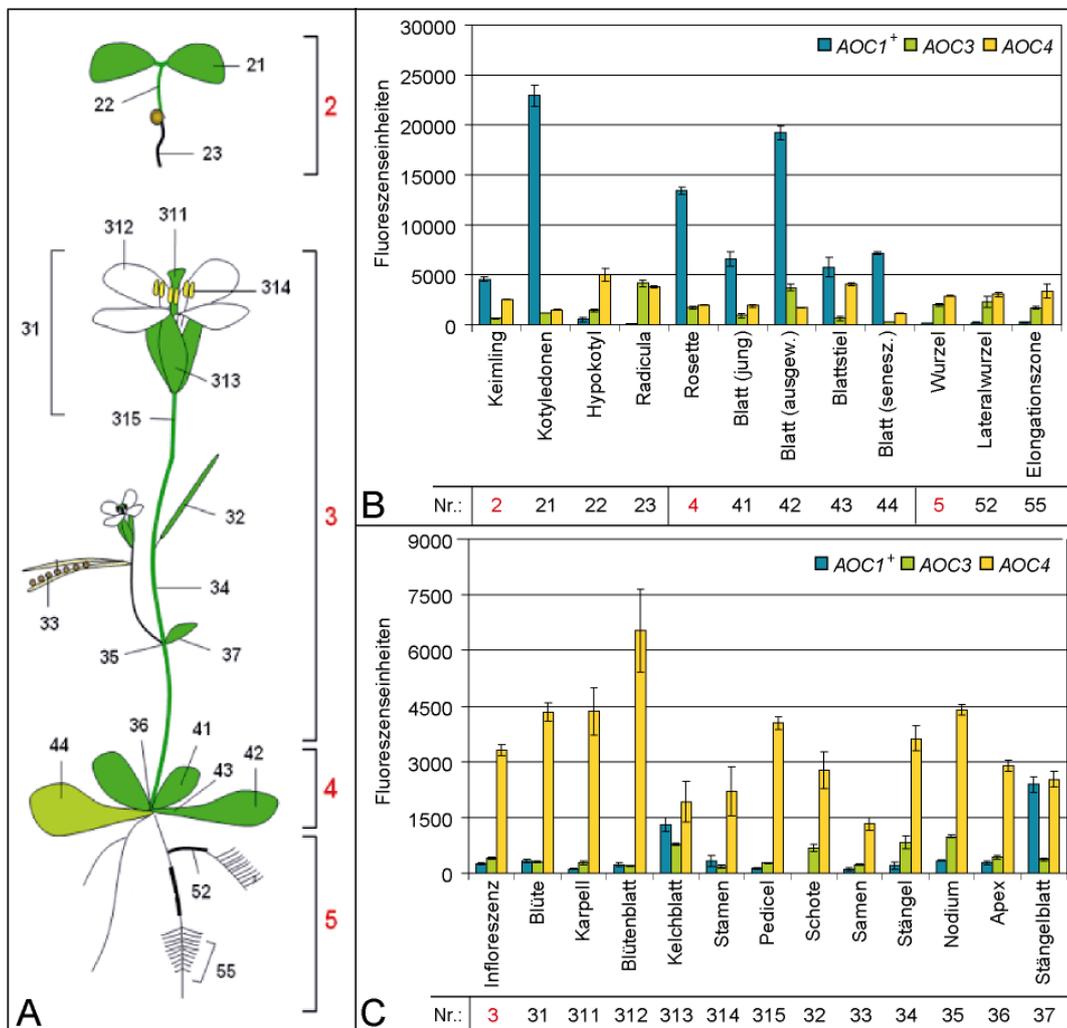


Abb. 3.8: Microarray-Daten zur gewebspezifischen Expression der AOCs

Die Nummerierung der Expressionsdaten (B und C) bezieht sich auf die in der Übersichtszeichnung (A) angegebenen Pflanzengewebe. Die Mittelwerte, Standardfehler und die Übersichtszeichnung wurden dem *Gene Atlas* der *Genevestigator* Datenbank (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) entnommen (⁺Array-Oligonukleotidsonde zeigt auch Homologie zu *AOC2*).

Dies galt vor allem für die Rosettenblätter, aber auch in Stängel- und Kelchblättern war die detektierte *AOC1*⁺-Transkriptmenge relativ hoch. Hier wurde allerdings im gleichen Maße auch die *AOC4* exprimiert. In Infloreszenzen dominierte die *AOC4*-Expression in nahezu allen Geweben (Abb. 3.8 C). In jungen (*Radicula*) und älteren Wurzelgeweben war nahezu ausschließlich *AOC3*- und *AOC4*-Expression nachweisbar (Abb. 3.8 B).

Für keine der *AOCs* konnte eine Korrelation mit der Expression einer anderen *AOC* festgestellt werden. Allerdings zeigten Gene für andere JA-Biosynthesenzyme eine Übereinstimmung im Expressionsmuster mit *AOC1* bzw. *AOC3* (Tab. 3.4). So war beispielsweise die Übereinstimmung zwischen *AOC1*⁺ und *AOS* (*At5g42650*) mit einem r-Wert von 0,914 sehr hoch. Weiterhin zeigten unterschiedliche *LOX*-Gene eine Co-Expression zu verschiedenen *AOCs*. So glichen sich die Expressionsmuster von *AOC1*⁺ und *LOX2* (*At3g45140*), wohingegen die *LOX3* (*At1g17420*) mit der *AOC3* co-exprimiert wurde.

AOC1⁺		AOC3		AOC4	
r-Wert	AGI code	r-Wert	AGI code	r-Wert	AGI code
0,914	<i>At5g42650</i>	0,925	<i>At1g19180</i>	0,694	<i>At1g18840</i>
0,783	<i>At3g44860</i>	0,906	<i>At4g17615</i>	0,664	<i>At3g20120</i>
0,763	<i>At1g28050</i>	0,893	<i>At1g73080</i>	0,655	<i>At1g74690</i>
0,762	<i>At3g51450</i>	0,893	<i>At2g06050</i>	0,634	<i>At1g67750</i>
0,762	<i>At2g24860</i>	0,882	<i>At3g51450</i>	0,629	<i>At4g26760</i>
0,754	<i>At3g45140</i>	0,877	<i>At3g21230</i>	0,622	<i>At2g19160</i>
0,749	<i>At4g34120</i>	0,869	<i>At5g54170</i>	0,614	<i>At3g50630</i>
0,746	<i>At5g53050</i>	0,868	<i>At1g17380</i>	0,610	<i>At1g01300</i>
0,745	<i>At2g06050</i>	0,862	<i>At4g34390</i>	0,595	<i>At5g67130</i>
0,744	<i>At3g50760</i>	0,859	<i>At2g32140</i>	0,594	<i>At1g26100</i>
0,740	<i>At4g31780</i>	0,859	<i>At1g17420</i>	0,582	<i>At5g07030</i>
0,732	<i>At1g19670</i>	0,857	<i>At2g27310</i>	0,582	<i>At5g55730</i>

Tab. 3.4: Microarray-Daten zu co-exprimierten Genen

Angegeben sind jeweils die 12 Gene (AGI code), deren Expressionsmuster die höchste Korrelation zur Expression der jeweiligen *AOCs* aufwiesen. Der Pearson Koeffizient (r-Wert) gibt den Grad der Korrelation an (0 = keine Korrelation, 1 = absolute, positive Korrelation). Farblich hervorgehoben sind Gene, die für Enzyme der Jasmonatbiosynthese kodieren (grün und rot), Gene, die mit zwei *AOCs* co-exprimiert werden (rot = *OPR3*, blau = Gen mit Homologie zur Strictosidinsynthese-Genfamilie) sowie das Coronatin-induzierbare Gen *CORI1* (gelb). Weitere Erläuterungen finden sich im Text bzw. im Anhang (Tab. 7.6). Die Daten wurden der *ACT*-Funktion der *Arabidopsis Coexpression Data Mining Tools* Datenbank (<http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/coexpanalyser.php>) entnommen (⁺Array-Oligonukleotidsonde zeigt auch Homologie zu *AOC2*).

Nur zwei Gene zeigten Übereinstimmungen mit der Expression von mehreren *AOCs*. So wies das Expressionsmuster der *OPR3* (*At2g06050*) sowohl eine Korrelation mit der *AOC1*⁺- als auch der *AOC3*-Expression auf. Dies traf auch auf die Expression eines Gens der Strictosidinsynthese-Genfamilie (*At3g51450*) zu. In *Arabidopsis* kodieren insgesamt 15 Gene für Proteine mit Strictosidinsynthese-Aktivität, deren biologische Relevanz in *Arabidopsis* jedoch bislang nicht bekannt ist (<http://www.arabidopsis.org>). Keine bekannten JA-relevanten Gene zeigten eine Co-Expression mit der *AOC4*. Die r-Werte waren hier generell sehr niedrig. Daher sind die angegebenen Gene vermutlich nicht von direkter biologischer Relevanz in Bezug auf Jasmonate.

Die Datenbankanalysen legen insgesamt nahe, dass die Expression der *AOCs* differentiell reguliert wird. Eine generelle Co-Expression liegt scheinbar nicht vor. Es kommt vielmehr nur partiell zu einem redundanten Auftreten mehrerer *AOC*-Transkripte.

3.3 RNAi vermittelte *loss of function* aller Allenoxidcyclasen

3.3.1 Isolation unabhängiger transgener Linien

Ziel des RNAi-vermittelten *loss of function*-Ansatzes war eine Reduktion aller AOC-Transkripte und damit eine Reduktion im AOC-Gesamtgehalt zu erreichen. Dazu wurde in 118 individuellen kanamycinresistenten T₁-Pflanzen zunächst das Vorkommen von AOC-Protein im Blatt 5 Stunden nach Verwundung per Westernblot überprüft. Von den Pflanzen 2, 3, 5, 14, 16 und 19, in denen kein AOC-Protein mehr detektierbar war, wurde Saatgut gewonnen. In den kanamycinresistenten Nachkommen dieser unabhängigen Primärtransformanten wurde der AOC-Gehalt sowie der JA- und OPDA-Gehalt 1,5 Stunden nach Verwundung bestimmt. In den Pflanzen 2-9, 3-1, 5-3, 5-8 und 16-1 konnte kein AOC-Protein nachgewiesen werden, und die Pflanzen zeigten reduzierte OPDA- und JA-Gehalte. Individuelle T₃-Nachkommen dieser Pflanzen wurden abermals auf die AOC-Präsenz im Blatt untersucht, um die Homogenität des Phänotyps in den Folgegenerationen sicherzustellen (3.3.2.2). Alle Nachkommen der Linien 5-8 und 16-1 zeigten den Verlust von AOC-Protein in unverwundetem und verwundetem Blattmaterial (Abb. 3.11). In Ausnahmefällen traten 24 Stunden nach Verwundung geringe Mengen an AOC-Protein in T₄-Proben der Linie 16-1-x auf (Daten nicht gezeigt). Daher wurden T₃- bzw. T₄-Nachkommen dieser beiden unabhängigen Linien für die molekulare und phänotypische Charakterisierung eingesetzt.

3.3.2 Molekulare Charakterisierung

Die molekulare Charakterisierung der RNAi-Pflanzen umfasste die Bestimmung von AOC-Transkriptmengen und den Nachweis von AOC-Gesamtprotein. Southern Blot-Analysen zur Bestimmung der Anzahl integrierter RNAi-Konstrukte im Genom der Linien 5-8-x und 16-1-x (T₃) waren wiederholt nicht auswertbar. Daher wurde anhand des Segregationsverhaltens der Kanamycinresistenz in der T₂ die Insertionszahl abgeschätzt. Nachkommen der Pflanze 16 zeigten ein Spaltungsverhältnis von 1:3,1 (WT:Kan^R; n = 183), was auf eine Einzelkopie-Insertion hinweist. Nachkommen der Pflanze 5 zeigten ein Spaltungsverhältnis von 1 : 6,5 (WT : Kan^R; n = 225) was auf die Insertion mehrerer T-DNAs hindeutet. Da alle T₃- und T₄-Nachkommen der Pflanze 5-8 kanamycinresistent waren, lag jedoch wahrscheinlich an mindestens einem Insertionsort Homozygotie vor.

3.3.2.1 Expression der AOCs

Die Expression der AOCs wurde in unverwundeten und verwundeten Blattproben untersucht, da die Transkriptmengen in der Regel im unverwundeten Blatt kaum nachweisbar sind und die mRNAs erst durch den wundinduzierten Anstieg in der Expression detektiert werden können.

Die Bestimmung der AOC-Transkripte in den RNAi-Linien lieferte jedoch z.T. widersprüchliche Ergebnisse. In der Mehrheit der Northern Blots waren die AOC-Transkriptmengen reduziert. Dabei war primär die Expression der AOC1 und AOC2 betroffen, wohingegen AOC3-Transkript in den

RNAi-Linien sowohl in den unverwundeten als auch in den verwundeten Proben nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.10). In einigen Fällen war die AOC-Expression aber scheinbar nicht betroffen, da die Transkriptmengen im Northern Blot keine Unterschiede aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die Transkriptmengen der einzelnen AOCs lagen hier im Bereich des WT. Weiterhin konnten die AOC-Transkripte in den RNAi-Pflanzen auch in semiquantitativer RT-PCR nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Unabhängig von der AOC-Transkriptmenge lag der AOC-Proteingehalt im Westernblot jedoch in allen untersuchten Proben der RNAi-Linien unterhalb der Nachweisgrenze.

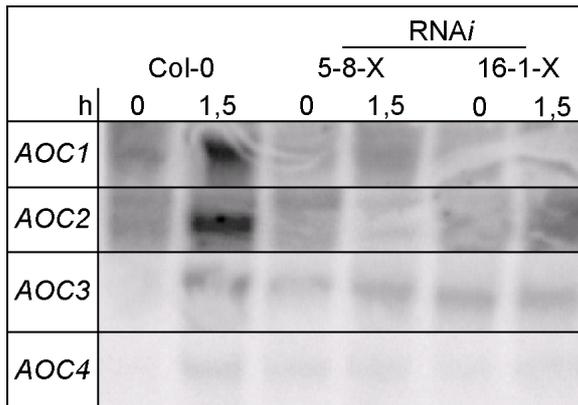


Abb. 3.10: AOC-Expression nach Verwundung

Die Gesamt-RNA wurde aus Rosettenblättern von unverwundeten (0 h) und verwundeten (1,5 h) Pflanzen isoliert (n = 5). Jeweils 20 µg Gesamt-RNA wurde für die Northern Blot-Analyse eingesetzt. Als Sonden dienten die 3'-UTR-Bereiche der einzelnen AOC-Gene.

3.3.2.2 Qualitativer AOC-Nachweis (Western Blot)

Um die Stabilität des RNAi-Effekts zu überprüfen, wurde das AOC-Vorkommen in individuellen T₃- und T₄-Nachkommen mittels Westernblot wiederholt untersucht. Alle Nachkommen der Linien 5-8 und 16-1 zeigten den Verlust von AOC-Protein in unverwundetem und verwundetem Blattmaterial. In Ausnahmefällen traten 24 Stunden nach Verwundung geringe Mengen an AOC-Protein in T₄-Proben der Linie 16-1-x auf (Daten nicht gezeigt).

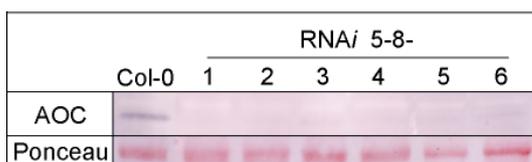


Abb. 3.11: Qualitativer Nachweis von AOC in individuellen T₃-Pflanzen der RNAi-Linie 5-8

Rosetten der T₃-Pflanzen wurden mechanisch verwundet und nach 1,5 Stunden geerntet. 10 µg Gesamtprotein wurde im Western Blot eingesetzt.

3.3.2.3 Immunhistochemischer AOC-Nachweis

In *Arabidopsis* konnten mehrere Enzyme der JA-Biosynthese immunhistochemisch in allen Geweben des Blattes nachgewiesen werden (Stenzel *et al.* 2003b). Um zu überprüfen, ob alle Blattgewebe gleichermaßen von der Reduktion im AOC-Gehalt betroffen sind, sollte AOC-Protein in Blattquerschnitten per Immunlokalisation nachgewiesen werden.

Während im WT AOC-Protein in nahezu allen Blattgeweben, vorrangig aber in Mesophyllzellen detektiert werden konnte (Abb. 3.12 B), traten keine oder nur geringfügige Fluoreszenzmarkierungen in den RNAi-Linien auf (Abb. 3.12 D). Von der Reduktion waren alle Gewebetypen

gleichermaßen betroffen, und nur sehr vereinzelt war AOC-Protein in Mesophyllzellen nachweisbar.

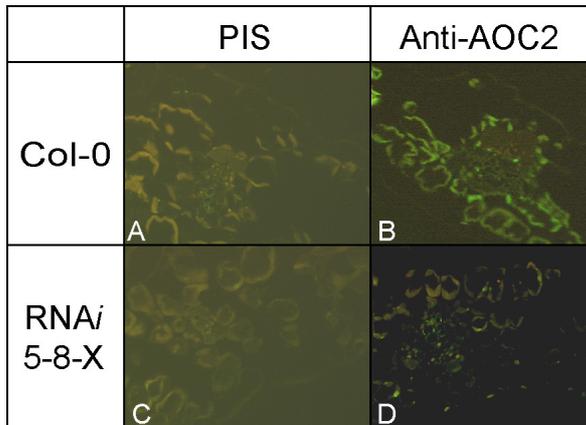


Abb. 3.12: Immunhistochemischer AOC-Nachweis in Blattquerschnitten

Die 2 µm Blattquerschnitte wurden mit anti-AtAOC2-Antikörper (B und D) bzw. Präimmunserum (A und C) behandelt (jeweils 1:2000).

3.3.3 Analyse jasmonatabhängiger Phänotypen

Die Charakterisierung von Mutanten der Jasmonat-Biosynthese (z.B. *opr3* und *dde2-2*) haben einige physiologische und entwicklungsabhängige Prozesse offenbart, die eine Beteiligung verschiedener Oktadekanoide und Jasmonate erfordern. In den RNAi-Linien sollte nun untersucht werden, inwieweit eine Reduktion im AOC-Gehalt der Pflanzen zu ähnlichen Phänotypen führt und ob sich weitere phänotypische Veränderungen aufzeigen lassen. Ein wesentliches Merkmal von JA-defizienten *Arabidopsis* Pflanzen wie z.B. *dad1*, *opr3* oder *dde 2-2* ist die männliche Sterilität der Blüten, die in diesen Mutanten durch eine Störung der Antherenentwicklung verursacht wird. Dabei ist die Filamentelongation verzögert oder bleibt vollständig aus. Teilweise unterbleibt auch die Antherendehiszenz, wodurch die Selbstbestäubung der Blüte unterbunden wird (Stintzi und Browse 2000; Ishiguro *et al.* 2001; von Malek *et al.* 2002). Trotz der deutlichen Reduktion der AOC-Proteinmenge zeigte keine der untersuchten RNAi-Linien Veränderungen in der Blütenmorphologie und keinen Verlust der Fertilität. Weitere untersuchte JA-relevante Phänotypen umfassten die Fähigkeit zur Bildung von OPDA und JA nach Verwundung (3.3.3.1) und die Reaktion des Wurzelwachstums auf exogene JAME-Applikation (3.3.3.2).

3.3.3.1 Wundantwort

Jasmonate spielen eine wesentliche Rolle in der Auslösung und Modulierung der Stressantwort wie z.B. nach Verwundung. Dabei kommt es lokal zu einem transienten Anstieg der JA- und OPDA-Gehalte. Die JA-Werte liegen bereits 24 Stunden nach dem Verwundungsreiz wieder im Bereich der Gehalte des unverwundeten Blattes, wohingegen die OPDA-Werte im Allgemeinen länger erhöht bleiben.

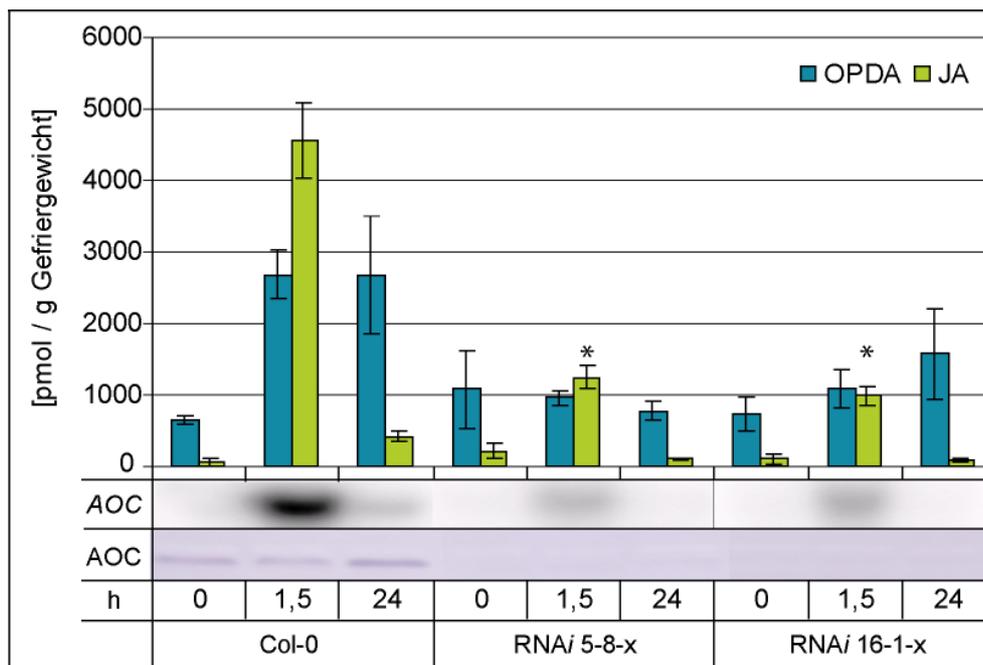


Abb. 3.13: Wundinduzierte Bildung von OPDA und JA

Northern Blot-Analyse (10 µg Gesamt-RNA), Western Blot-Analyse (10 µg Gesamtprotein) und die Gehaltsbestimmungen erfolgten von Pflanzenmaterial aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten mit Blattgewebe von 6 Pflanzen je Zeitpunkt. Die Graphiken zeigen Mittelwerte sowie Standardfehler. Auf Signifikanz wurde mit Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-HSD-Test geprüft.

In den unverwundeten Blattproben waren zwischen dem WT (Col-0) und den RNAi-Linien keine signifikanten Unterschiede bezüglich der JA- und OPDA-Werte feststellbar (Abb. 3.13). In allen untersuchten Pflanzen kam es zu einem signifikanten Anstieg der JA-Werte 1,5 Stunden nach Verwundung. Der JA-Anstieg fiel jedoch in den RNAi-Linien signifikant geringer aus. Dabei waren die JA-Mengen um etwa 75 % gegenüber dem WT reduziert. Der wundinduzierte Anstieg der OPDA-Gehalte war nur im WT nachweisbar. In beiden RNAi-Linien blieben die Mengen an OPDA relativ konstant im Bereich der Werte im unverwundeten WT-Blatten und waren im Vergleich zu den WT-Werten nach Verwundung deutlich, aber nicht signifikant reduziert. In Übereinstimmung damit konnte eine deutlich Reduktion der AOC-Expression und des AOC-Vorkommens im Blatt der RNAi-Linien beobachtet werden (Abb. 3.13).

3.3.3.2 Einfluss der JAME-Applikation auf das Wurzelwachstum

Die exogene Applikation von JAME führt mit steigender Konzentration zunehmend zur Inhibierung des Primärwurzelwachstums (Staswick *et al.* 1992). Um zu überprüfen, ob die AOC-RNAi-Linien eine veränderte Reaktion gegenüber appliziertem Jasmonat aufweisen, wurden Keimlinge auf Medien mit verschiedenen Methyljasmonat-Konzentrationen angezogen.

Unabhängig von der applizierten JAME-Konzentration konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Wurzellänge zwischen dem WT (Col-0) und den RNAi-Linien festgestellt werden. Alle untersuchten Pflanzen reagierten auf steigende JAME-Gehalte im Medium gleichermaßen mit einer zunehmenden Verkürzung der Wurzel.

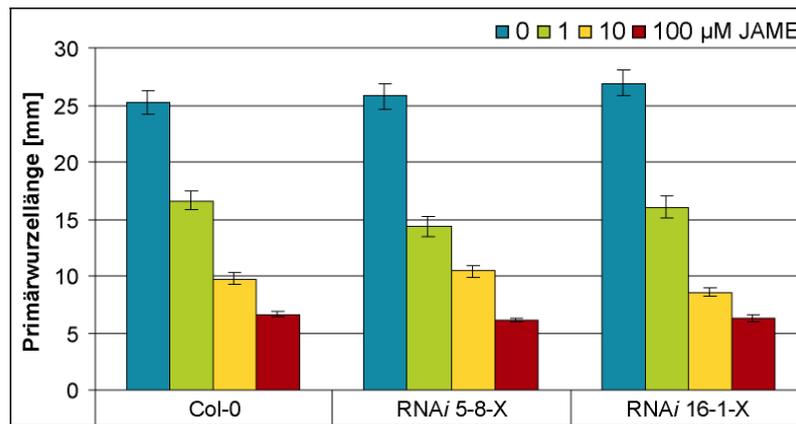


Abb. 3.14: Einfluss von JAME-Applikation auf die Primärwurzellänge

Die Anzucht erfolgte auf vertikalen MS-Platten (+/- JAME in angegebener Konzentration) für 12 d unter Langtag-Bedingungen. Die Graphiken zeigen MWs aus 5 unabhängigen biologischen Replikaten (je n=15) sowie Standardfehler. Die Varianzanalyse ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wurzellängen des WT (Col-0) und der RNAi-Linien.

3.4 Isolierung homozygoter T-DNA-Insertionslinien

Die AOC-T-DNA-Insertionslinien wurden von verschiedenen Forschungseinrichtungen generiert und wurden direkt bzw. über NASC bezogen. Eine T-DNA-Insertionslinie für die AOC2 ist bislang von keiner der Einrichtungen verfügbar. Zur Isolierung homozygoter Pflanzen wurden die Pflanzen per PCR genotypisiert.

3.4.1 GABI-Kat AOC1 T-DNA-Insertionslinie (*aoc1 KO*)

Der *aoc1 KO* (845C10) der GABI-Kat-Sammlung (Li *et al.* 2003; Rosso *et al.* 2003) wurde unter Verwendung des Col-0 Ökotyps generiert und trägt eine T-DNA-Insertion des Vektors pAC106, die innerhalb der Intronsequenz lokalisiert ist. Nach GABI-Kat-Angaben zeigte die Linie ein Segregationsverhalten von 50 : 28 : 26 (Samen gesamt : gekeimte Samen : resistente Samen) bezüglich der Sulfadiazinresistenz. Daher muss von mehreren T-DNA-Insertionen im Genom ausgegangen werden (<http://www.gabi-kat.de/db/>).

Die Genotypisierung der Pflanzen erfolgte per PCR, wobei individuelle Pflanzen des erhaltenen T₂-Saatguts genotypisiert wurden.

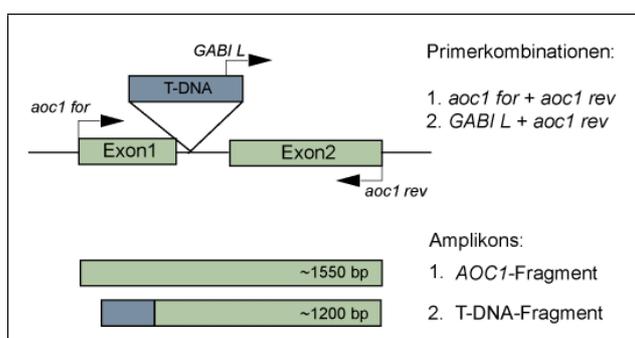


Abb. 3.15: PCR-Nachweis zur Identifizierung homozygoter *aoc1 KO*-Pflanzen

Die Genotypisierung potentieller *aoc1 KO*-Pflanzen erfolgte unter Verwendung von zwei verschiedenen Primerkombinationen (1 u. 2), die jeweils zur Generierung von verschiedenen Amplikons dienen.

Die resultierenden Amplikons hatten eine Größe von etwa 1550 bp für das WT-*AOCI*-Allel, während das T-DNA-Fragment eine Größe von ca. 1200 bp aufwies (Abb. 3.15). Von den Pflanzen, die lediglich das T-DNA-Amplikon aufwies, wurde erneut Saatgut gewonnen. Nachkommen der Pflanze 12 zeigten in einem ersten *Screen* fast ausnahmslos Homozygotie für die T-DNA-Insertion am *AOCI*-Locus, wobei die von GABI-Kat angegebene Insertionsstelle noch durch erneute Sequenzierung zu überprüfen bleibt. Einzelne homozygote *aoc1 KO*-Pflanzen wurden bereits mit *aoc3 KO*- bzw. *aoc4 KO*-Pflanzen gekreuzt, um Doppel-*knockouts* zu generieren. Ausführliche Charakterisierungen des *aoc1 KO*s konnten bislang aus zeitlichen Gründen nicht durchgeführt werden. Allerdings konnte der Verlust des *AOCI*-Transkripts bereits in einer Northern Blot-Analyse bestätigt werden. Weiterhin wurde keine offensichtliche Beeinträchtigung der Fertilität in homozygoten Pflanzen beobachtet.

3.4.2 UWBC *AOC3*-T-DNA-Insertionslinie (*aoc3 KO*)

Die UWBC Basta-T-DNA-Insertionspopulation wurde im Ws-Hintergrund unter Verwendung des Vektors pSKI015 generiert (Weigel *et al.* 2000).

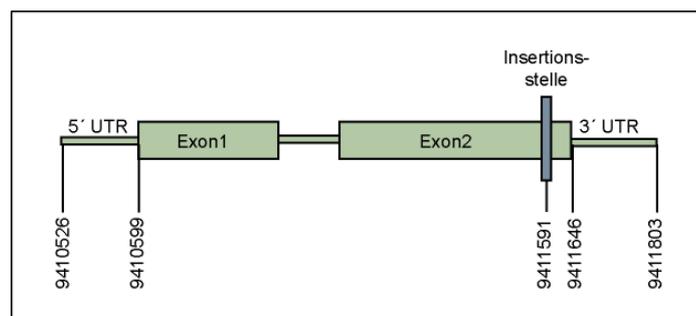


Abb. 3.16: Position der T-DNA-Insertionsstelle im *aoc3 KO*

Die T-DNA-Insertion liegt im *aoc3 KO* an Position 9411591 auf Chromosom 3. Weiterhin ist die Anfangsposition des 5'UTRs, das Ende des 3'UTRs und die Position von Start- bzw. Stoppcodon angegeben. Die Bestimmung des Insertionsortes erfolgte durch Sequenzierung eines PCR-Amplikons, für dessen Generierung die Primer *JL202* und *aoc3 rev* verwendet wurden. Die Positionsnummern wurden der TAIR-Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/>) entnommen.

Die Isolierung homozygoter *aoc3 KO*-Pflanzen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe von Tobias Kurz begonnen und im Rahmen dieser Arbeit beendet. Die Genotypisierung erfolgte per PCR und das erhaltene T-DNA-Fragment wurde sequenziert, um den exakten Insertionsort zu bestimmen (<http://www.arabidopsis.org/>). Dabei wurde bestätigt, dass die Insertionsstelle der T-DNA im hinteren Abschnitt des Exon 2 an Position 9411591 des Chromosoms 3 liegt (Abb. 3.16).

3.4.3 Salk *AOC4* T-DNA-Insertionslinie (*aoc4 KO*)

Die *aoc4 KO*-Linie (SALK_124897) entstammt der SALK-T-DNA-Kollektion, die im Col-0-Hintergrund unter Verwendung des Vektors pROK2 generiert wurde (Alonso *et al.* 2003). Die Selektion transgener Pflanzen per Kanamycinresistenz war nicht möglich, da scheinbar eine Co-Suppression des *NPTII*-Gens vorlag. Die Genotypisierung per PCR ermöglichte jedoch die

Identifizierung mehrerer homozygoter T₄-Pflanzen, deren Saatgut erneut ausgesät wurde. Die daraus resultierenden Pflanzen wurden erneut per PCR überprüft. Alle zeigten ausnahmslos ein oder beide T-DNA-Fragmente, während kein *AOC4*-Fragment nachgewiesen werden konnte.

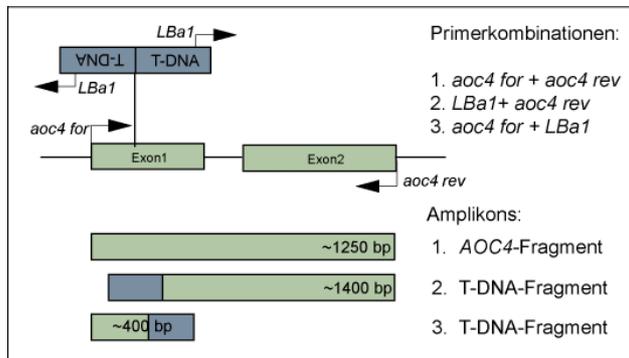


Abb. 3.17: PCR-Nachweis zur Identifizierung homozygoter *aoc4* KO-Pflanzen

Die Genotypisierung per PCR lieferte bei allen Primerkombinationen ein Amplikon. Dies lässt darauf schließen, dass zwei T-DNAs in umgekehrter Orientierung innerhalb einer Insertionsstelle integriert wurden.

Aufgrund der Tatsache, dass sowohl mit dem *aoc4 for*- als auch mit dem *aoc4 rev*-Primer ein T-DNA-Fragment generiert werden konnte, kann von der Insertion von zwei T-DNAs in gegensätzlicher Orientierung ausgegangen werden (Abb. 3.17). Die exakten Insertionsorte müssen jedoch noch durch Sequenzierung überprüft werden.

3.5 Charakterisierung der UWBC *AOC3* T-DNA-Insertionslinie (*aoc3 KO*)

3.5.1 Molekulare Charakterisierung

Die molekulare Charakterisierung homozygoter *aoc3 KO*-Pflanzen beinhaltete in erster Linie die Analyse der *AOC*-Expression zum Nachweis der Funktionalität des *knockouts* sowie eine Western Blot-Analyse des *AOC*-Vorkommens im Blatt nach Verwundung. Die Southern Blot-Analyse zur Bestimmung der T-DNA-Anzahl im Genom war trotz wiederholten Versuchen nicht auswertbar. Daher wurde eine Kreuzungsanalyse durchgeführt, auf die in Abschnitt 3.5.2.10 näher eingegangen wird.

3.5.1.1 Expression der *AOC*-Gene

Die Analyse der *AOC*-Expression erfolgte wie schon bei den *RNAi*-Linien an verwundetem Blattmaterial, da die *AOC*-Transkripte im unverwundeten Zustand nur sehr schlecht nachweisbar sind.

Sowohl im WT (Ws) als auch im *aoc3 KO* war ein wundinduzierter Anstieg der Transkripte von *AOC1* und *AOC2* zu verzeichnen. Das *AOC3*-Transkript war hingegen 1,5 Stunden nach Verwundung nur im WT nachweisbar (Abb. 3.18). Im *aoc3 KO* war weder vor noch nach Verwundung *AOC3*-Expression detektierbar, was einen funktionalen *knockout* der *AOC3* nahe legt.

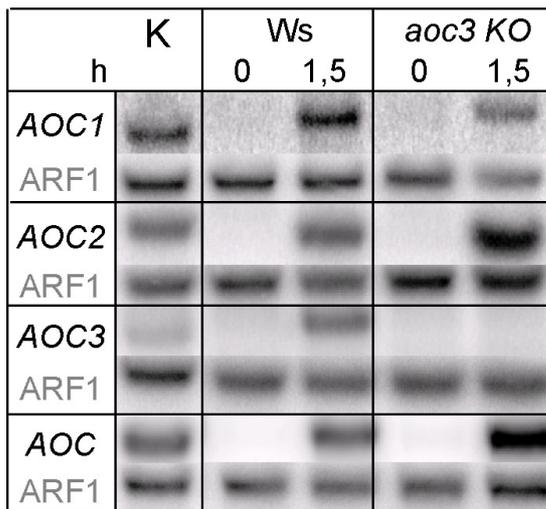


Abb. 3.18: AOC-Expression nach Verwundung

Die Gesamt-RNA wurde aus unverwundeten und lokal verwundeten Rosettenblättern isoliert. Dazu wurden jeweils 10 Pflanzen aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten gepoolt. Für die Northern Blot-Analyse wurden 20 µg (*AOC1-3*) bzw. 10 µg (*AOC*) RNA eingesetzt. Als Sonden dienten die 3'-UTR-Bereiche der einzelnen *AOCs* (*AOC1-3*), bzw. die *AOC2*-cDNA (*AOC*) zum Nachweis aller *AOCs*. Die Detektion im Phosphoimager erfolgte für jede der *AOCs* unabhängig. Als Hybridisierungskontrolle (K) diente JAME-behandeltes Ws-Blattmaterial (50 µM JAME für 1,5 h). Eine anschließende Hybridisierung mit einer *ARF1* Sonde diente als Beladungskontrolle.

Die *AOC4*-Transkriptmengen waren im WT und im *aoc3 KO* sowohl im unverwundeten Blatt als auch nach Verwundung so gering, dass sich keine eindeutigen Banden nachweisen ließen. Daher wurde auf die Darstellung der *AOC4*-Expression verzichtet. Die Detektion der *AOC*-Expression insgesamt (*AOC*) erfolgte unter Verwendung einer vollständigen *AOC2*-cDNA als Sonde, die Homologie zu allen vier *AOCs* aufweist. Die Gesamt-*AOC*-Expression weist keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT und *aoc3 KO* auf. In beiden Fällen kommt es zu einem wundinduzierten Anstieg der Transkriptmenge. Die scheinbar erhöhte *AOC*-Gesamttranskriptmenge im *aoc3 KO* nach Verwundung konnte in Folgeexperimenten nicht reproduziert werden.

Eine Western Blot-Analyse des Proteinextrakts ergab weder im unverwundeten noch verwundeten Blatt Unterschiede im *AOC*-Vorkommen von WT und *aoc3 KO* (Daten nicht gezeigt). Dies war zu erwarten, da der zur Verfügung stehende Antikörper immunreaktiv gegenüber allen vier *AOCs* ist, wobei die *AOC2* bevorzugt detektiert wird (Stenzel *et al.* 2003b).

3.5.2 Analyse jasmonatabhängiger Phänotypen

Die phänotypische Charakterisierung des *aoc3 KO*s beinhaltete die Analyse der Wundantwort (3.5.2.1) und der Seneszenz (3.5.2.2). Weiterhin wurde das Wurzellängenwachstum un behandelter Pflanzen (3.5.2.3) und nach Applikation von Phytohormonen untersucht (3.5.2.9). Die Jasmonat- und IAA-Gehalte in Keimlingen wurden bestimmt (3.5.2.6 bzw. 3.5.2.7) und ein Vergleich mit Datenbank-Expressionsanalysen vorgenommen (3.5.2.7).

Zwischen WT und *aoc3 KO* konnten keine Unterschiede in der Keimungsrate, der Größe und dem Gewicht der Samen gefunden werden. Auch in den Blühzeitpunkten und der Blütenmorphologie des WTs und des *aoc3 KO*s bestanden keine Unterschiede. Weder die Filamentelongation noch die Antherendehiszens war gestört, und die Pflanzen waren fertil. Weiterhin zeigten sich keine Unterschiede in der Reaktion auf Pathogenbefall mit *Alternaria brassicicola*. Dabei waren keine Unterschiede in der Ausprägung der Blattsymptome (Nekrosen) sichtbar und auch die Expression

von *PR1* und *PDF1.2* war im WT und im *aoc3 KO* vergleichbar. Die Analyse der *AOC*-Expression ergab keine spezifische Induktion einzelner *AOCs* durch den Pathogenbefall (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.1 Wundantwort

In verwundeten Blättern des WT (Ws) trat 1,5 Stunden nach Verwundung ein Anstieg der Mengen von JA, OPDA, dnOPDA und 12-OH-JA auf. Die 11-OH-JA- und 12-HSO₄-JA-Gehalte hingegen wiesen erst 24 Stunden nach Verwundung erhöhte Werte auf. Die OPDA und dnOPDA-Mengen waren 24 Stunden nach Verwundung ebenfalls noch erhöht, wohingegen die JA-Gehalte bereits nahezu auf das Niveau im unverwundeten Blatt zurückgegangen waren (Abb. 3.19).

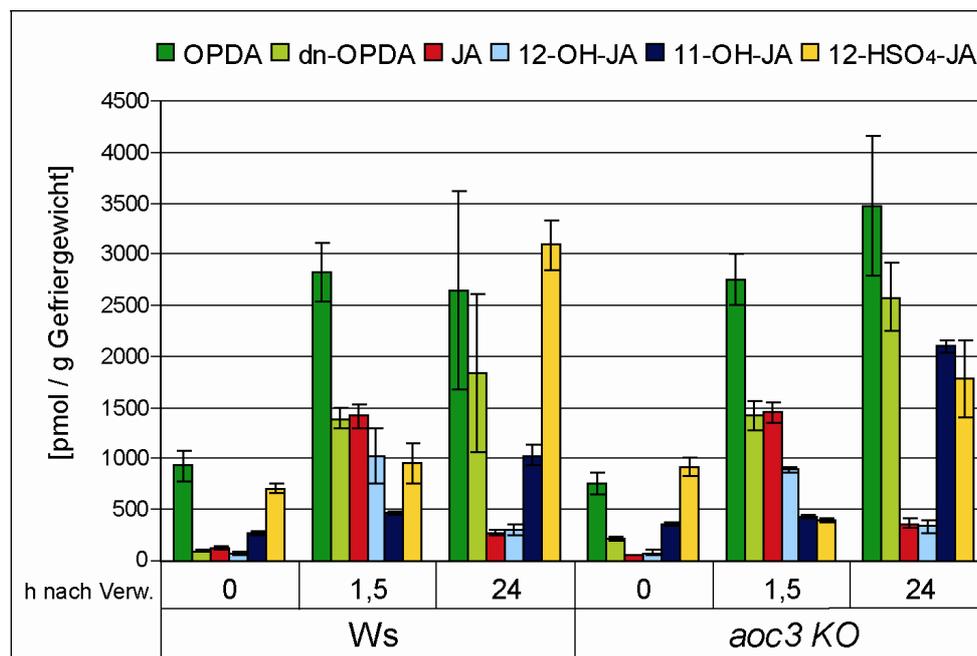


Abb. 3.19: Wundinduzierte Bildung von OPDA, dnOPDA und Jasmonaten

Die Gehaltsbestimmung erfolgte per GC-MS von unverwundetem und verwundetem Pflanzenmaterial aus 3 biologischen Replikaten (jeweils n = 6). Die Daten zeigen Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten (je 6 Pflanzen), sowie Standardfehler.

Im *aoc3 KO* lagen jeweils ähnlich hohe Mengen der jeweiligen Verbindungen vor und zeigten auch den wundinduzierten Anstieg. Unterschiede zum WT traten lediglich für die Werte an 11-OH-JA und 12-HSO₄-JA auf.

Der wundinduzierte Anstieg der JA-Werte spiegelten sich auch in der Expressionsanalyse JA-responsiver Gene (*AOS*, *OPR3* und *VSP*) wider (Abb. 3.20). Sowohl im WT (Ws) als auch im *aoc3 KO* war die Expression der drei analysierten Gene im unverwundeten Zustand (0 h) kaum nachweisbar. Nach Verwundung (1,5 h) kam es hingegen zu einem Anstieg der Transkriptmengen, der jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem WT (Ws) und dem *aoc3 KO* aufwies.

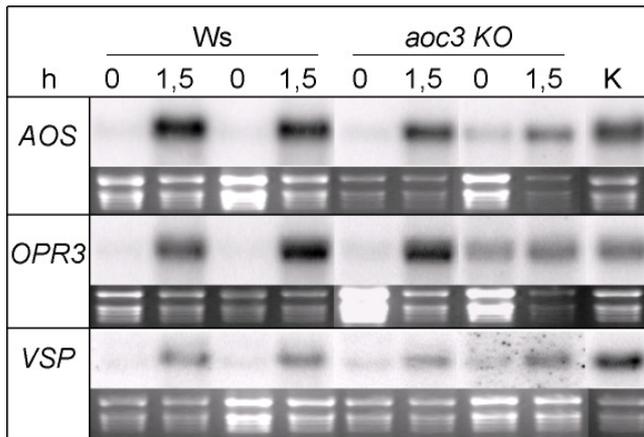


Abb. 3.20: Genexpressionsanalyse nach Verwundung

Die Northern Blot-Analyse wurde an 10 µg Gesamt-RNA aus unverwundetem (0 h) und verwundetem (1,5 h) Blattmaterial aus zwei unabhängigen Anzuchten durchgeführt. Als Hybridisierungskontrolle (K) diente JAME-behandeltes Ws-Blattmaterial (50 µM JAME für 1,5 h).

3.5.2.2 Seneszenz

Bereits frühzeitig wurde entdeckt, dass Jasmonate die Blattseneszenz fördern (Ueda und Kato 1980). Daher sollte anhand des Chlorophyllgehaltes der Seneszenzstatus des *aoc3 KO*s zu unterschiedlichen Zeitpunkten an verschieden alten Rosettenblättern überprüft werden.

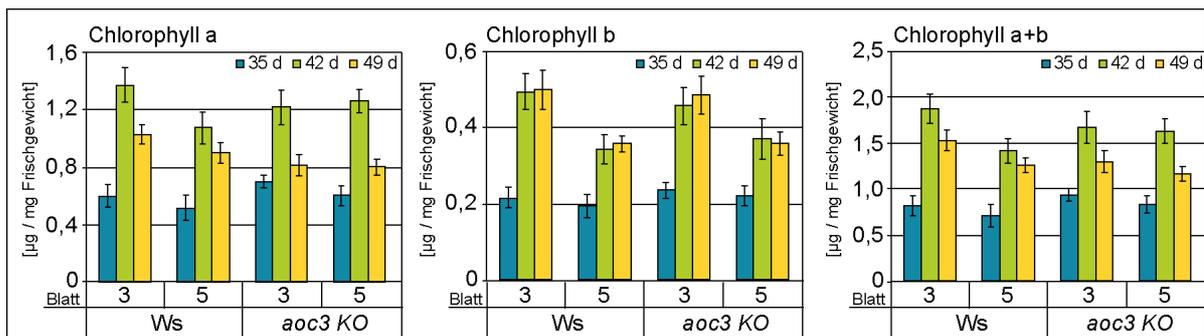


Abb. 3.21: Chlorophyllgehalte 35, 42 und 49 Tage nach Aussaat

Die Blattchlorophylle wurden mit Ethanol extrahiert und photometrisch quantifiziert. Dabei wurde jeweils ein jüngeres (Blatt 3) und ein älteres Blatt (Blatt 5) verwendet. Die Daten zeigen Mittelwerte (n = 6) und Standardfehler.

In beiden Linien war der Gehalt an Chlorophyll a in 42 Tage alten Pflanzen am höchsten, wobei nur im WT (Ws) Unterschiede zwischen dem jüngeren (Blatt 3) und dem älteren (Blatt 5) Rosettenblatt auftraten. (Abb. 3.21). Für Chlorophyll b waren die Werte 42 und 49 Tage nach Aussaat etwa gleich hoch und lagen deutlich über den Werten der 35 Tage alten Pflanzen. Unterschiede zwischen jüngerem und älterem Blattmaterial ergaben sich für Chlorophyll b für die 42 bzw. 49 Tage alten Pflanzen. Hier lagen die Werte im älteren Blatt (Blatt 5) im WT und im *aoc3 KO* gleichermaßen niedriger als im jüngeren Blatt (Blatt 3). Der Chlorophyll-Gesamtgehalt zeigte nur im WT eine leichte Reduktion im älteren Blatt sowohl in den 42 als auch 49 Tage alten Pflanzen, während im *aoc3 KO* die Werte von Blatt 3 und Blatt 5 in etwa gleich hoch blieben. Allerdings zeigten die *aoc3 KO*-Pflanzen keinen offensichtlich verzögerten Seneszenzverlauf bei

Anzucht auf Erde, so dass die geringfügigen Unterschiede im Chlorophyllgehalt keinen zwingenden Beleg für eine verzögerte Seneszenz darstellen.

3.5.2.3 Wurzelwachstum

Aufgrund der relativ hohen Promotoraktivität der *AOC3*, die in den *AOC3*_{Prom}:*uidA*-Pflanzen in der Wurzel nachgewiesen werden konnte, wurde das Wurzelwachstum im *aoc3 KO* näher untersucht.

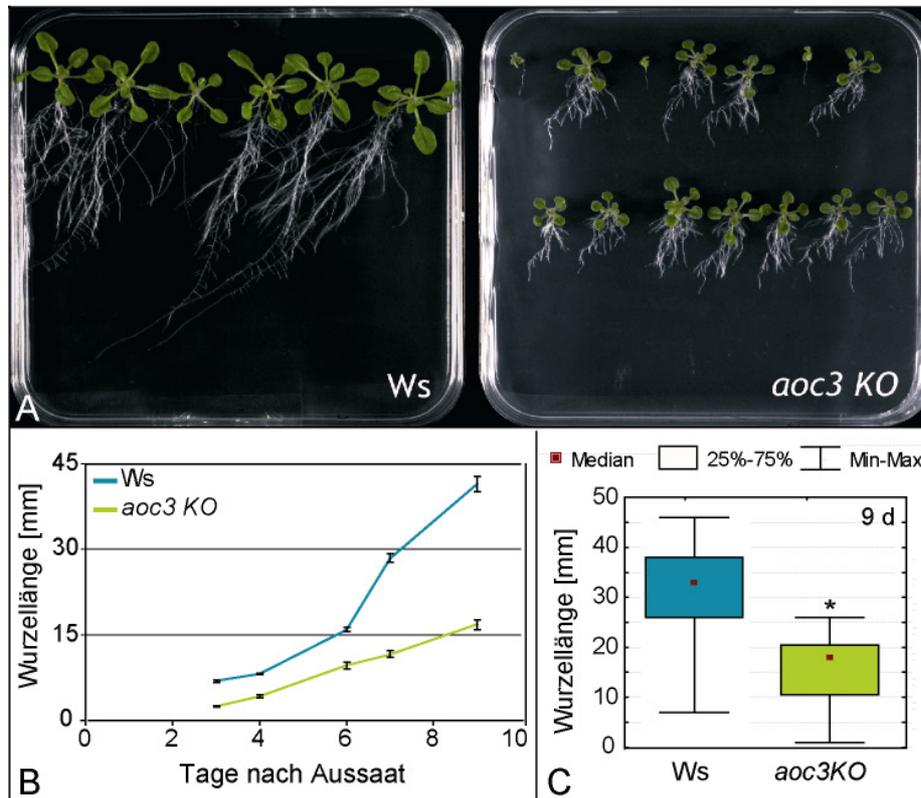


Abb. 3.22: Bestimmung der Primärwurzellängen

Übersichtsaufnahme von 14 Tage alten Keimlingen (A) und Quantifizierung der Wurzellängen bis zum Alter von 9 Tagen (B und C). Analyse der Wurzellängen durch einen Mann-Whitney- sowie Wald-Wolfowitz-Test ergab signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) in den Wurzellängen 9 Tage nach Aussaat (C). Die Anzucht erfolgte auf vertikal orientierten $\frac{1}{2}$ -MS-Platten im Dauerlicht. Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus 4 unabhängigen biologischen Replikaten mit jeweils 25 Messungen ($n = 100$) sowie Standardfehler (B) bzw. Mediane mit Interquartilabständen (25%-75%) und Varianzbreiten (C).

Die Keimlinge wurden dafür auf vertikalen $\frac{1}{2}$ -MS-Platten im Dauerlicht angezogen. Dabei zeigte sich während der Keimlingsentwicklung eine deutliche Reduktion in der Primärwurzellänge des *aoc3 KO*s, die bereits 3 Tage nach Aussaat nur etwa die Hälfte der WT-Wurzellänge ausmachte und 9 Tage nach Aussaat nur etwa 40 % der WT-Wurzellänge betrug (Abb. 3.22 A u. B). Trotz relativ hoher Varianzbreite der Daten konnte die statistische Auswertung die signifikante Reduktion der Primärwurzellänge 9 Tage alter Keimlinge des *aoc3 KO* belegen (Abb. 3.22).

3.5.2.4 Wurzelzellgröße

Als eine mögliche Ursache für die verkürzte Primärwurzel im *aoc3 KO* wurde eine verminderte Zellelongation postuliert. Daher wurde die Länge der Kortezellen in propidiumiodidgefärbten Wurzeln von 9 Tage alten Keimlingen des WTs und des *aoc3 KO*s im CLSM bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit im Entwicklungszustand der Zellen zu gewährleisten, wurden Zellen im Bereich der Lateralwurzelinitiation zwischen den ersten und dritten sichtbaren Lateralwurzelprimordien vermessen (Abb. 3.23 A).

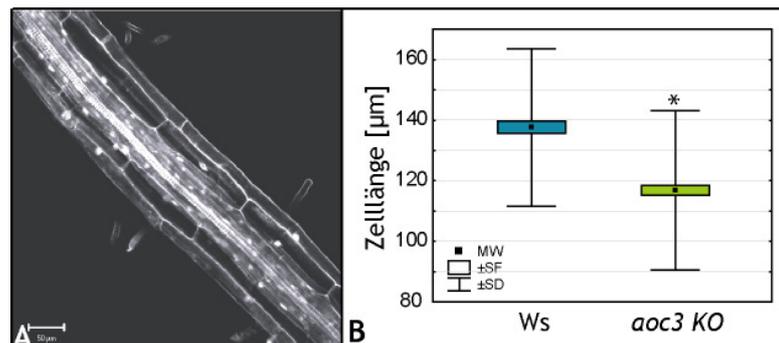


Abb. 3.23: Zellgrößenbestimmung in Wurzeln (9d)

Die Zelllängen von Kortezellen im Bereich zwischen 1. und 3. sichtbaren Lateralwurzelprimordien wurden im CLSM bestimmt (A: WT-Wurzel). ANOVA und Scheffé-Test ergaben signifikante Unterschiede zwischen den Zelllängen (B). Die Graphik zeigt Mittelwerte (n = 178 [Ws]; n = 254 [*aoc3 KO*]) sowie Standardfehler (SF) und Standardabweichung (SD).

Die mikroskopische Vermessung der Wurzelzellen ergab für den *aoc3 KO* durchschnittlich um 20 µm verkürzte Kortezellen. Die Varianzanalyse bestätigte die Signifikanz in der Reduktion der Zelllänge des *aoc3 KO*s. Inwieweit die Zelllängen in anderen Bereichen der Wurzel betroffen sind, wurde bislang nicht überprüft, da die Vergleichbarkeit im Differenzierungszustand schwieriger zu gewährleisten ist.

3.5.2.5 Qualitativer AOC-Nachweis in Wurzeln

Die phänotypischen Veränderungen im *aoc3 KO* legten eine besondere Rolle der AOC3 in der Wurzel nahe, die scheinbar nicht durch andere AOCs kompensiert werden konnte. Daher wurde das Vorkommen von AOC-Protein in Wurzeln und Blättern 9 Tage alter Keimlinge durch Western Blot-Analyse überprüft. Während sich in Blattgeweben keine wesentlichen Unterschiede zwischen dem WT und dem *aoc3 KO* im Vorkommen von AOC-Protein feststellen ließen, zeigten sich deutliche Unterschiede in Wurzelgeweben. In den zwei unabhängigen WT-Proben konnte AOC-Protein detektiert werden, wohingegen die entsprechende Bande in den *aoc3 KO*-Wurzelproben fehlte. Außer den AOC-Banden, traten sowohl in den Blatt- als auch Wurzelproben schwache Banden unterschiedlicher Größe auf, wobei es sich um unspezifische Kreuzreaktionen handelte.

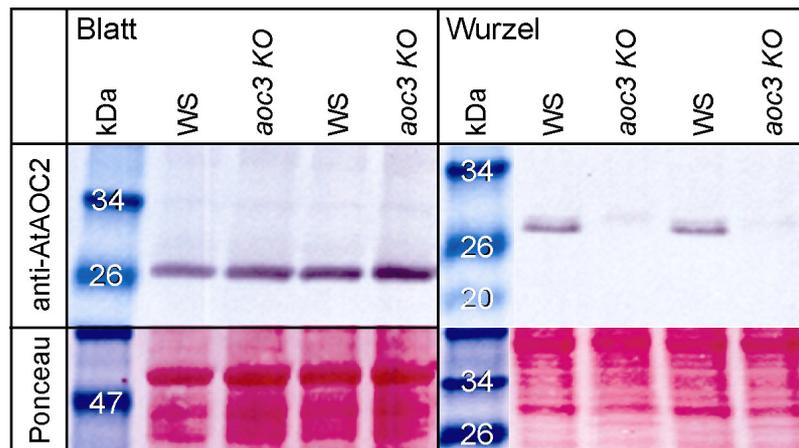


Abb. 3.24: Nachweis von AOC-Protein in Blättern und Wurzeln von Keimlingen (9 d)

Proteine wurden aus gepooltem Material von ca. 100 Keimlingen extrahiert, wobei Material aus zwei unterschiedlichen Anzuchten getrennt verwendet wurde. Für die Western Blot-Analyse wurde 15 µg Gesamtprotein in der SDS-PAGE eingesetzt und anschließend per *semi dry*-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der anti-AtAOC2-Antikörper wurde 1:5000 verdünnt verwendet.

3.5.2.6 OPDA-, dnOPDA- und Jasmonatgehalte in Keimlingen

Da in WT-Wurzeln anscheinend primär die AOC3 vorliegt und ein Verlust von AOC3-Expression zu phänotypischen Veränderungen in der Wurzel führt, wurden Veränderungen in OPDA- und Jasmonatgehalten als potentielle Ursache für die Wurzellängenreduktion vermutet. Um dies zu überprüfen, wurden Blätter und Wurzeln 9 Tage alter Keimlinge getrennt auf ihre jeweiligen Gehalte an OPDA, dnOPDA und Jasmonaten hin untersucht (Abb. 3.25). Dabei wurden sowohl in Blättern als auch Wurzeln relativ hohe Mengen an OPDA und 12-HSO₄-JA detektiert, wohingegen dnOPDA und andere Jasmonate wesentlich geringere Mengen aufwiesen und 12-OGluc-JA nur in Blättern, nicht aber in Wurzeln nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.25 A). Die statistische Absicherung der Daten per zweifaktorieller Varianzanalyse (im Fall des 12-O-Gluc-JAs: *One-Way ANOVA*) ergab nur für die dnOPDA-Werte der Blätter signifikante Unterschiede zwischen WT und *aoc3 KO*. Hier lag der Gehalt in WT-Blättern signifikant höher als in den Blättern des *aoc3 KO*s.

Da für die Bestimmung der Jasmonatgehalte das Blatt- bzw. Wurzelgewebe insgesamt eingesetzt wurde, waren keine Aussagen zur Lokalisation der Verbindungen innerhalb der Organe wie z.B. in verschiedenen Wurzelbereichen möglich. Um zu überprüfen, ob Jasmonate in der Wurzel im Bereich der Promotoraktivität der AOC3 vorkommen, wurde ein indirekter Jasmonat-Nachweis gewählt. Dafür wurden transgene Pflanzen verwendet, die ein Reporter-gen unter Kontrolle eines jasmonatresponsiven Promotors exprimieren. Hinreichende Jasmonatmengen können so über das Genprodukt des Reporter-gens angezeigt werden. Zur gewebsspezifischen Lokalisierung von Jasmonat in der Wurzel wurden *VSPI:LUC*-Pflanzen verwendet. In den Pflanzen steht das Luciferase-Gen unter Kontrolle des jasmonatresponsiven Promotors des *VSPI*-Gens (Ellis und Turner 2001) und erlaubt so den lokalen Nachweis von Jasmonatvorkommen.

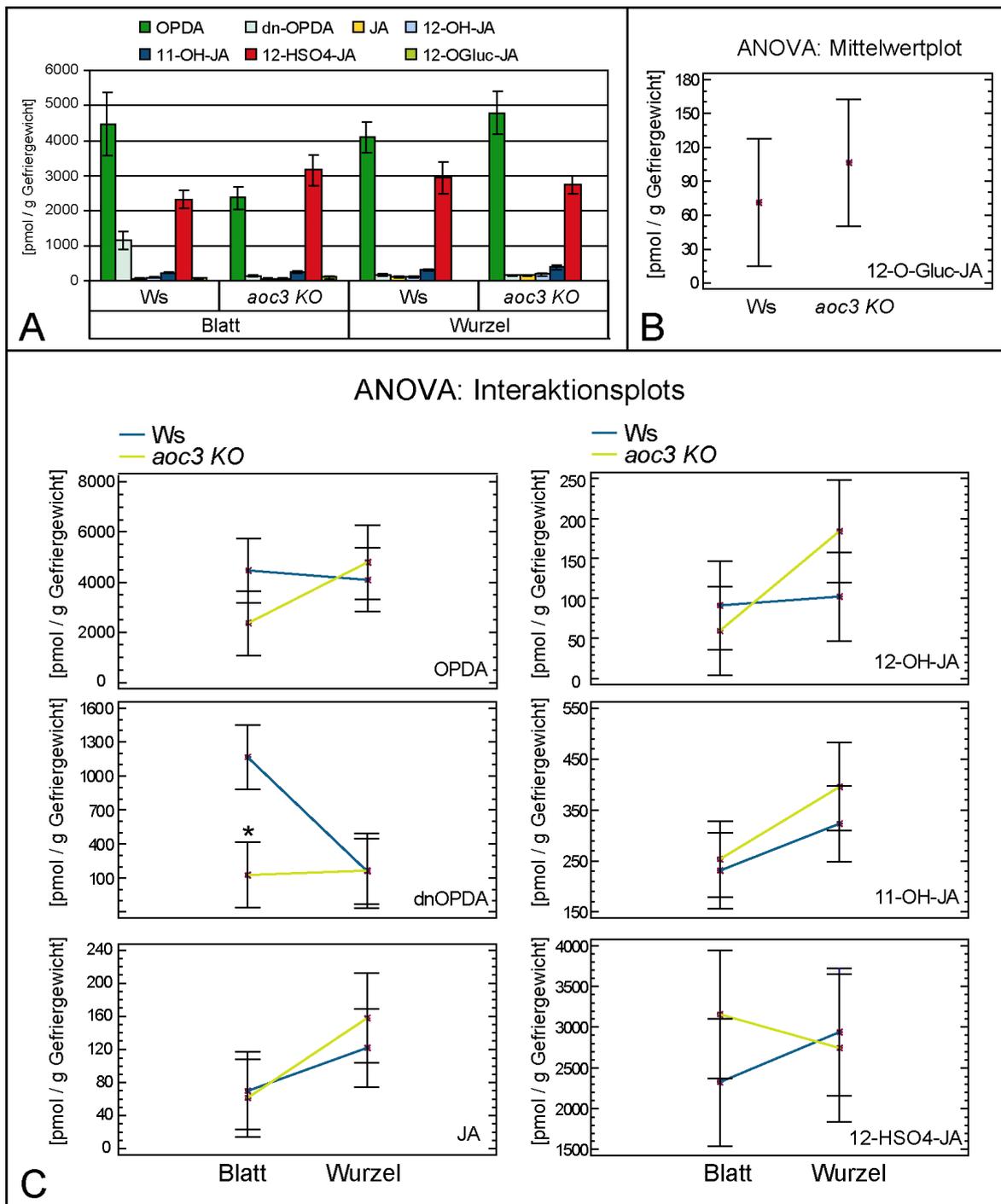


Abb. 3.25: Organspezifische Akkumulation von OPDA, dnOPDA und Jasmonaten in Keimlingen

Für die GC-MS bzw. LC-MS Quantifizierungen wurde Material aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten verwendet, wobei jeweils Blätter bzw. Wurzeln von 500 – 1000 Keimlingen (9d) gepoolt wurden. Die Grafiken zeigen Mittelwerte und Standardfehler (A), einen Mittelwertplot mit Tukey HSD Intervallen (B) und Mittelwertplots der zweifaktoriellen ANOVAs mit Tukey HSD Intervallen (C). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit einer One-Way-ANOVA (B) bzw. mit zweifaktoriellen ANOVAs und Tukey-HSD-Tests (C) geprüft.

In unbehandelten 14 Tage alten Keimlingen konnte jedoch weder in Blättern noch in Wurzeln Luciferaseaktivität nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurden Keimlinge 14 Tage lang auf 100 μM JAME-haltigen Platten angezogen. Diese Keimlinge zeigten starke Luciferaseaktivität in

Blättern und Sprossen. In Wurzeln konnte allerdings auch in diesen Pflanzen keine *VSP1*-Promotoraktivität detektiert werden (Abb. 3.26).

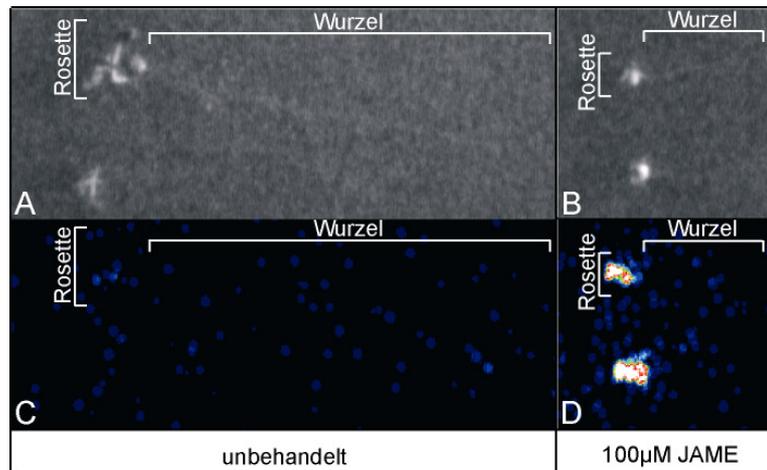


Abb. 3.26: Luciferaseaktivität in *VSP1:LUC*-Keimlingen

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 d im Dauerlicht auf vertikal orientierten ½-MS-Platten mit (B und D) und ohne (A und C) 100 µM JAME. Die Bilder zeigen Übersichtsaufnahmen der untersuchten Keimlinge (A und B) sowie Falschfarbenbilder der Luciferaseaktivität (C und D).

Das Experiment wurde unter Verwendung von *Thi2.1:uidA*-Pflanzen wiederholt, in denen das *uidA*-Gen unter Kontrolle des JA-responsiven Promotors des *Thi2.1*-Gens steht (Vignutelli *et al.* 1998). Auch hier war weder in unbehandelten noch in JAME-behandelten Keimlingen *Thi2.1*-Promotoraktivität in Wurzeln nachweisbar. Im Blattapex der Keimlinge trat der durch Vignutelli *et al.* (1998) bereits beschriebenen Anstieg der Promotoraktivität durch die JAME-Behandlung auf (Daten nicht gezeigt).

Da beide Promotoren scheinbar nicht in der Wurzel aktiv sind und auch die im Blatt beobachtete JA-Responsivität in der Wurzel nicht auftritt, kann aufgrund dieser Daten keine Aussage bezüglich potentieller Veränderungen im lokalen JA-Vorkommen der *aoc3 KO*-Wurzeln getroffen werden.

3.5.2.7 Digitale *in situ*-Analysen – Datenbank Expressionsanalysen

Da die Bestimmung der OPDA- und Jasmonat-Gehalte in Wurzeln gezeigt hat, dass JA zwar nur in geringen Mengen nachweisbar war, OPDA und 12-HSO₄-JA aber in relativ hohen Mengen auftraten (Abb. 3.25), ist von einer aktiven JA-Biosynthese und Metabolisierung in der Wurzel auszugehen. Andererseits könnte aber auch ein Transport der Signalstoffe vom Spross in die Wurzel vorliegen. Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob OPDA und Jasmonate in der Wurzel gebildet werden können, wurde die Expression der JA-Biosynthesegene per Microarray-Daten der AREX-Datenbank überprüft (<http://www.arexdb.org/database.jsp>). Die Datenbank erlaubt zudem die Lokalisation präferentieller Expressionsorte in der Wurzel per digitaler *in situ*-Analyse, da AREX u.a. klassische *in situ*-RNA-Hybridisierungsexperimente mit Microarray-Expressionsdaten spezifischer Gewebe kombiniert. Die zugrundeliegende Methode beruht auf der Isolierung

einzelner Gewebe aus unterschiedlichen Abschnitten der Wurzel durch Nutzung GFP-exprimierender Linien (Abb. 3.28 A). Anschließend erfolgt die Microarray-Analyse unter Verwendung des Affymetrix ATH1-GeneChips (Birnbaum *et al.* 2003). Anhand der so gewonnenen Daten kann die gewebs- und stadienspezifische Expression ausgewählter Gene analysiert werden.

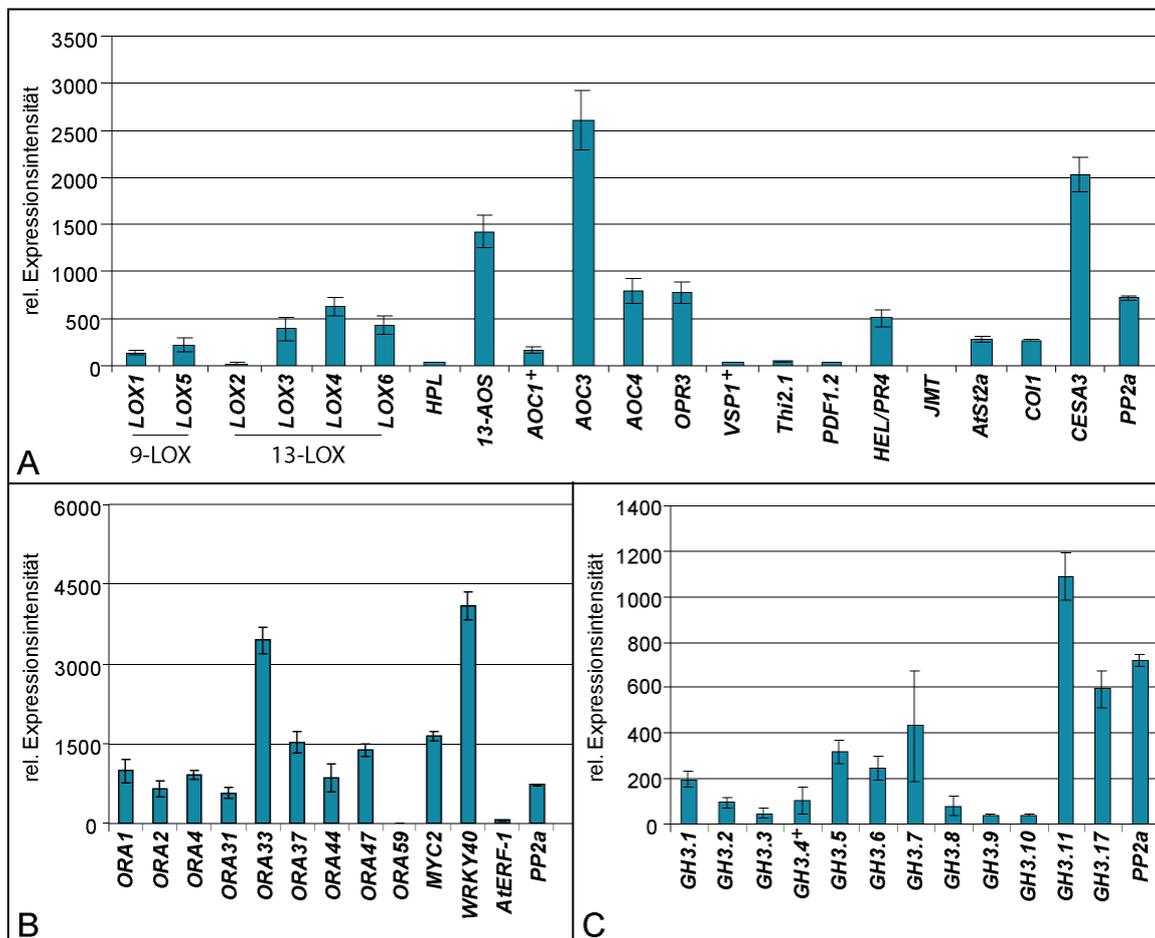


Abb. 3.27: Microarray-Daten zur wurzelspezifischen Genexpression

Auszug aus der Expressionsanalyse von insgesamt 96 Genen (vollständige Liste s. Anhang Tab. 7.7) zeigt die relativen Expressionsintensitäten einiger Gene der Oxilipin-Biosynthese und JA-induzierbarer Gene (A), von Genen, die für Transkriptionsfaktoren kodieren (B), sowie für Gene der *GH3*-Familie (C). Das konstitutiv exprimierte *PP2A*-Gen wurde als Referenzgen verwendet. Die Graphiken zeigen Mittelwerte der relativen Expressionsintensitäten über 14 Subzonen sowie die Standardfehler. Die Rohdaten wurden der AREX Datenbank (<http://www.arexdb.org/database.jsp>) entnommen (⁺Array-Oligonukleotidsonde zeigt Homologie zu mehr als einem Genprodukt).

Neben den eigentlichen JA-Biosynthesegenen wurde auch die Expression JA- und wundresponssiver Gene sowie die Expression der *GH3*-Genfamilie und einiger Gene, die für JA-responssive Transkriptionsfaktoren kodieren untersucht. Zunächst wurde jeweils der relative Expressionslevel in der Wurzel insgesamt bestimmt, in dem die Expressionsdaten aller Stadien und Gewebe gemittelt wurden (Abb. 3.27). In Wurzeln wurden die Gene der vier *13-LOX*, der *AOS*, der *AOCs* und auch der *OPR3* exprimiert, wobei allerdings z.T. deutliche Unterschiede in der

Expressionsintensität einzelner Mitglieder einer Genfamilien auftraten. Dies traf insbesondere auf die Expression der AOCs zu, von denen in der Wurzel präferentiell die *AOC3* exprimiert wurde. Von den JA- und wundresponsiven Genen trat lediglich *HEL/PR4*-Transkript in der Wurzel auf (Abb. 3.27 A). Auch die Expressionsintensitäten einiger Transkriptionsfaktoren, die an der JA-Signaltransduktion beteiligt sind, wiesen teilweise erhebliche Unterschiede auf. So war beispielsweise die Expression der Gene, die für ERF1 und *ORA59* kodieren, in der Wurzel kaum nachweisbar (Abb. 3.27 B). Beide Transkriptionsfaktoren aktivieren u.a. die *PDF1.2*-Expression. Für *ORA47* hingegen, dessen Genprodukt aktivierend auf JA-Biosynthesegene wirkt, konnte eine Expression in der Wurzel nachgewiesen werden.

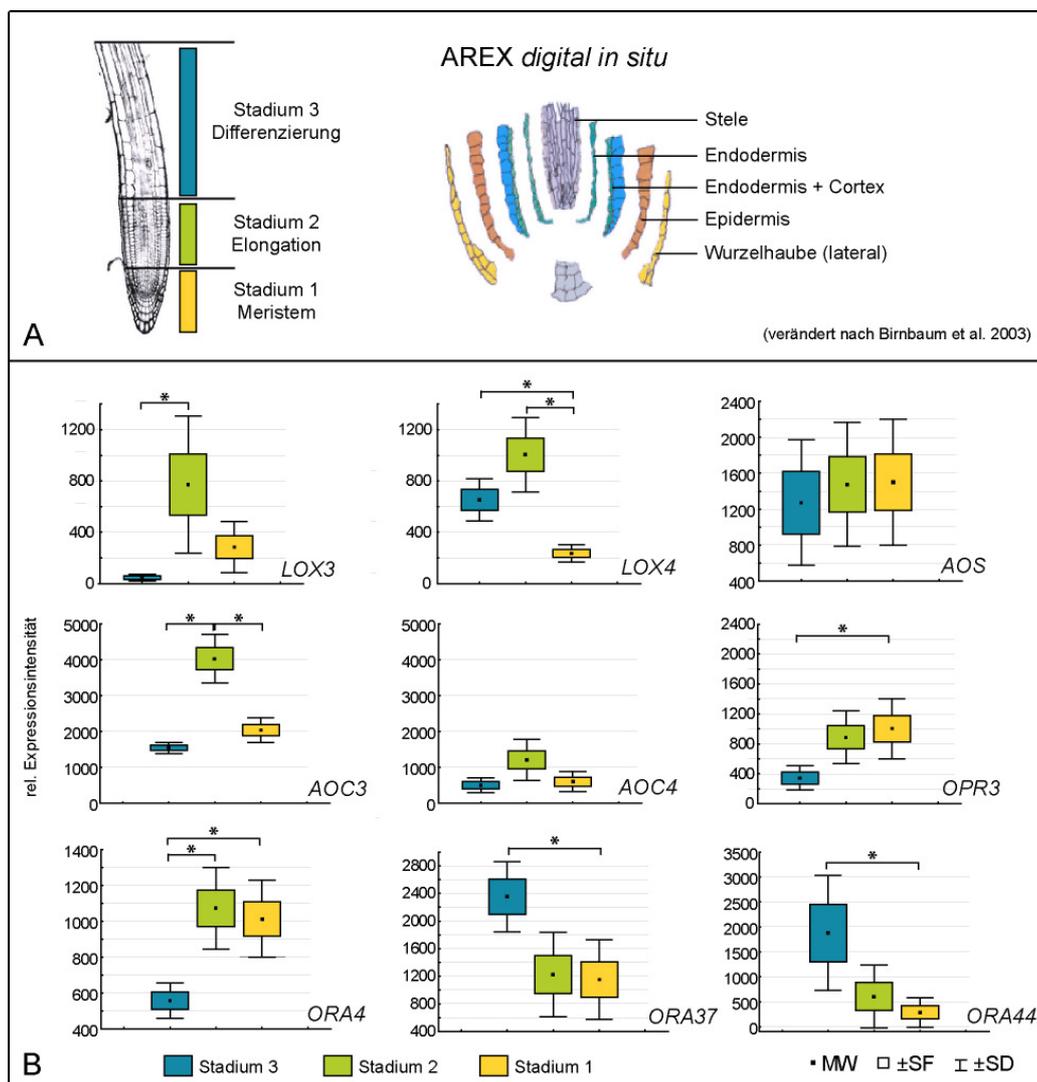


Abb. 3.28: Stadienspezifische Expressionsanalyse

Die digitale *in situ*-Methode erlaubt die Genexpressionsanalyse in einzelnen Stadien und Geweben der Wurzel (A). Zur Bestimmung der stadienspezifischen Expression ausgewählter Gene wurden die relativen Expressionsintensitäten der Gewebe innerhalb eines Stadiums gemittelt (B). Die Rohdaten wurden der AREX Datenbank (<http://www.arexdb.org/database.jsp>) entnommen. Die Graphiken zeigen Mittelwerte (MW), Standardfehler (SF) und Standardabweichungen (SD). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde per ANOVA und Scheffé-Test geprüft.

Der Transkriptionsfaktor *ORA37* kann JA-responsive Gene sowohl negativ als auch positiv regulieren und zeigte ebenfalls Expression in der Wurzel. Weiterhin traten relativ hohe Transkriptmengen für *ORA33* und das Pathogen-induzierbare *WRKY40*-Gen auf. Obwohl *MYC2* in der Wurzel exprimiert wird, zeigen die von ihm positiv regulierten JA-responsiven Gene *LOX2*, *VSP1⁺* und *Thi2.1* keine Expression (Abb. 3.27 A). Die Gene der *GH3*-Familie kodieren für Enzyme, die intermediär Substat-Adenylat-Komplexe ausbilden und nachfolgend Aminosäuren an IAA, SA oder JA konjugieren. Von den 12 Mitgliedern der Enzymfamilie, deren Substrate bekannt sind, wurde *GH3.11 (JAR1)* in der Wurzel am stärksten exprimiert.

Weiterhin erfolgte die Analyse hinsichtlich einer potentiellen gewebs- bzw. stadienspezifischen Expression einzelner Gene. Die JA-Biosynthesegene wurden gleichermaßen in allen Gewebetypen exprimiert (Daten nicht gezeigt). Allerdings ergaben sich teilweise Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen verschiedenen Stadien der Wurzel (Abb. 3.28). Während die Expression der *AOC4* und der *AOS* keine deutliche Gewebsspezifität aufwies, war die *AOC3*-Expression in der Elongationszone signifikant erhöht. Hier wurden auch vermehrt die Transkripte von *LOX3* und *LOX4* nachgewiesen, wohingegen für die *OPR3* eine erhöhte Expression in der meristematischen Zone und der Elongationszone vorlag. Während *ORA4* in diesen Geweben ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert wurde, wurden Transkripte von *ORA37* und *OPRA47* präferentiell in der Differenzierungszone nachgewiesen.

3.5.2.8 IAA-Gehalte in Keimlingen

Als eine mögliche Ursache des Wurzelphänotyps des *aoc3 KO*s wurde eine Veränderung im Auxingehalt postuliert. Auxin ist wesentlich für die Regulation des Wurzelwachstums verantwortlich. Die Notwendigkeit von antagonistischen oder synergistischen Wechselwirkungen zwischen Phytohormonen sind in der Regulation vieler physiologischer oder entwicklungsabhängiger Prozesse von Bedeutung und wurden für Auxin und JA bereits in der Regulation des Gravitropismus von Reiskoleoptilen postuliert (Gutjahr *et al.* 2005). Daher wurden der Gesamt-IAA-Gehalt (freie und Konjugate) und der Anteil an freier IAA bestimmt. Weder in Blättern noch in Wurzeln traten signifikanten Unterschiede zwischen WT und *aoc3 KO* in den Mengen an freier IAA auf (Abb. 3.29 A). Die Menge an Gesamt-IAA der Blätter war im *aoc3 KO* nicht signifikant verändert. In Wurzeln war jedoch der Gesamt-IAA-Gehalt des *aoc3 KO*s signifikant gegenüber den WT-Werten erhöht (Abb. 3.29 B). Leider sind bisher aber keine Aussagen darüber möglich, welche der vielen natürlich auftretenden IAA-Konjugate im *aoc3 KO* vermehrt gebildet wurden. Dies könnte weitere Hinweise auf die potentielle Ursache des Wurzelphänotyps geben.

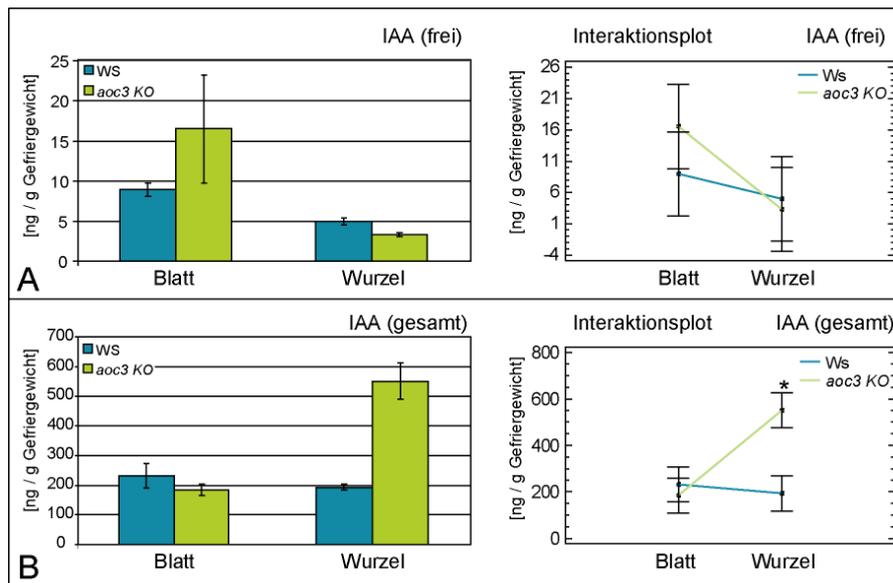


Abb. 3.29: Organspezifische Akkumulation von IAA in Keimlingen

Für die Quantifizierung per GC-MS wurde Material aus 3 unabhängigen biologischen Replikaten verwendet, wobei jeweils Blätter bzw. Wurzeln von 500 – 1000 Keimlingen (9d) gepoolt wurden. Die Graphiken zeigen Mittelwerte und Standardfehler bzw. Interaktionsplots mit Tukey HSD Intervallen für freies IAA (A) und Gesamt-IAA (B). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde mit zweifaktoriellen ANOVAs und Tukey HSD-Tests geprüft.

3.5.2.9 Phytohormonapplikationen

Die inhibitorische Wirkung von Jasmonaten auf das Primärwurzelwachstum war einer der ersten physiologischen Effekte, die den Jasmonaten zugeordnet werden konnte (Yamane *et al.* 1980; Corbineau *et al.* 1988). Gleichzeitig wird dabei auch die Lateralwurzelbildung gefördert (Wang *et al.* 2002). Um zu Überprüfen, ob im *aoc3 KO* eine Veränderung in der JA-Sensitivität vorliegt, erfolgte die Anzucht der Pflanzen auf JAME-haltigen 1/2-MS-Platten. Zum Vergleich wurden außerdem zwei JA-defiziente T-DNA-Insertionsmutanten mit in die Analyse einbezogen. Die *opr3*-Mutante kann OPDA bilden, ist aber in dessen weiterer Umsetzung zur JA behindert. Außerdem wurde ein *aos KO* verwendet, in dem weder OPDA noch JA gebildet wird.

Alle Keimlinge wiesen nach Behandlung mit 10 μ M JAME eine reduzierte Wurzellänge gegenüber den unbehandelten Pflanzen auf (Abb. 3.30). Signifikante Unterschiede zum WT zeigte dabei nur der *aoc3 KO*, wobei diese unabhängig von der Behandlung auftraten. Vielmehr blieben die Unterschiede der unbehandelten Pflanzen auch nach Behandlung mit JAME bestehen. Für die anderen beiden Mutanten traten signifikante Unterschiede lediglich bei dem *aos KO* auf, der weniger sensitiv als der WT (Col-0) auf die Behandlung mit 100 μ M JAME reagierte. Weiterhin sollte überprüft werden, ob durch Applikation von Jasmonaten in geringeren Konzentrationen der Wurzelphänotyp des *aoc3 KO*s aufgehoben und der WT-Phänotyp wieder hergestellt werden kann. Neben JAME wurden die Pflanzen auch mit JA und OPDA behandelt, da auch OPDA selbst eine Signalwirkung besitzt und in relativ hohen Mengen in Wurzeln nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.25).

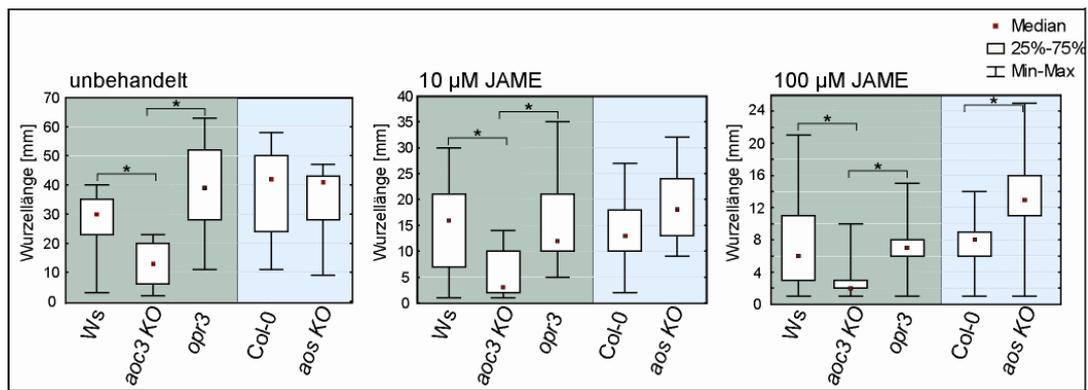


Abb. 3.30: JAME-Einfluss auf das Wurzelwachstum von Mutanten der JA-Biosynthese

Die Anzucht der Keimlinge erfolgte für 14 Tage im Dauerlicht auf vertikal orientierten 1/2-MS-Platten mit und ohne 10 bzw. 100 µM JAME. Die Graphiken zeigen Boxplots mit Medianen (n = 25), Interquartilabständen und Varianzbreiten (B). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. Auf Signifikanz (p < 0,05) wurde per Kruskal-Wallis-ANOVA und Nemenyi-Test geprüft

Alle Pflanzen reagierten gleichermaßen auf die applizierten Substanzen. In niedrigen Konzentrationsbereichen (1 nM bis 1 µM) hatte weder die Applikation von JA noch von JAME oder OPDA einen wesentlichen Effekt auf die Wurzellängen des WT's und der Mutanten. Erst bei Konzentrationen von 10 – 100 µM JA und JAME bzw. 10 µM OPDA im Medium reagierten alle untersuchten Linien mit einer Reduktion der Primärwurzellänge.

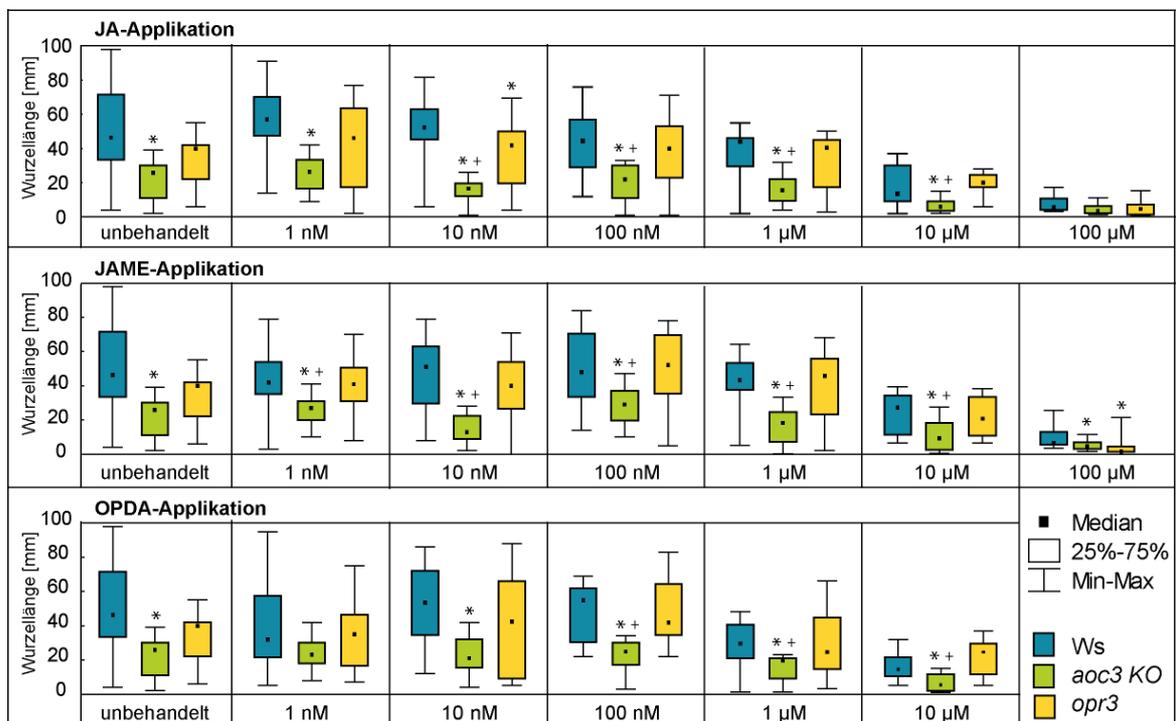


Abb. 3.31: Einfluss der Applikation von OPDA, JA und JAME auf die Primärwurzellänge

Die Pflanzen wurden 14 Tage auf vertikal orientierten 1/2-MS-Platten im Dauerlicht angezogen. Dem Medium wurden JA, JAME und OPDA in den angegebenen Konzentrationen zugegeben. Daten (n = 20) stammen aus zwei unabhängigen biologischen Replikaten. Die Graphiken zeigen Boxplots mit Interquartilabständen und Varianzbreiten. Auf Signifikanz wurde mittels Kruskal-Wallis-ANOVA und Nemenyi-Test geprüft (*signifikante Unterschiede zwischen *aoc3 KO* und WT bzw. *opr3* und WT; +signifikante Unterschiede zwischen *aoc3 KO* und *opr3*).

Die signifikanten Unterschiede zwischen den Wurzellängen des WT's und des *aoc3 KO*s blieben weitgehend bestehen (Abb. 3.31), und keine der applizierten Substanzen konnte den Wurzelphänotyp des *aoc3 KO*s normalisieren (Abb. 3.31). Die inhibitorische Wirkung von OPDA war ebenso hoch, wie die von JA und JAME. Dies konnte durch die Einbeziehung der *opr3*-Mutante gezeigt werden, in der die Umsetzung von OPDA zu Jasmonaten nahezu vollständig ausbleibt. Die hier gezeigte Reduktion im Primärwurzelwachstum ist also auf die Wirkung des OPDAs zurückzuführen.

Außer der Applikation von Jasmonaten und OPDA wurde der Einfluss von anderen Phytohormonen auf das Wurzelwachstum untersucht. So erfolgte die Anzucht für 9 bis 14 Tage im Dauerlicht auch auf ½-MS-Platten, die jeweils mit NAA (1 nM, 10 nM und 100 nM), IAA (20 nM, 50 nM und 100 nM), TIBA (100 µM), ACC (50 nM und 500 nM), Zeatin (100 nM und 1 µM), GA (5 nM und 100 nM) und den Brassinosteroiden Epibrassinolid (0,1 nM) und Epicastasteron (10 nM) versetzt wurden. Die Reaktion von WT und *aoc3 KO* wiesen jedoch keine Unterschiede auf. In nahezu allen Applikationsexperimenten blieben die signifikanten Unterschiede in den Wurzellängen erhalten. (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.10 Kreuzungsanalysen

Eine Southern Blot-Analyse zur Bestimmung der Anzahl der T-DNA-Insertionen lieferte trotz wiederholten Versuchen keine auswertbaren Ergebnisse. Daher sollte eine Kreuzungsanalyse durchgeführt werden um auszuschließen, dass eine Mutation oder eine zusätzliche T-DNA-Insertion an einem anderen Locus verantwortlich für die Veränderungen im Wurzelwachstum des *aoc3 KO*s ist. Dafür wurde einerseits in den korrespondierenden WT (Ws) zurückgekreuzt und andererseits auch in einen fremden Ökotyp (Col-0) ausgekreuzt.

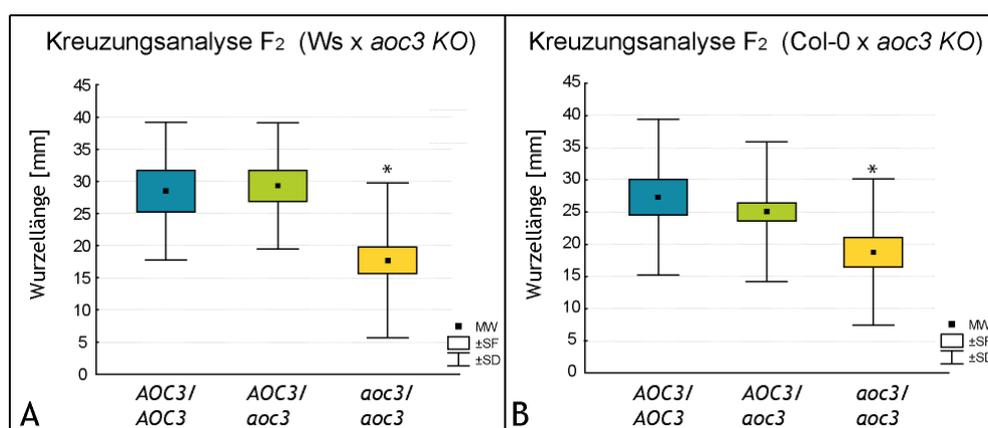


Abb. 3.32: Wurzellängen der F₂-Generation der Kreuzungen Ws x *aoc3 KO* und Col-0 x *aoc3 KO*
 Die F₂-Keimlinge wurden vermessen und per PCR genotypisiert. Unterschieden wurde in homozygote *aoc3 KO*s (*aoc3/aoc3*), heterozygote *aoc3 KO*s (*AOC3/aoc3*) und WT's (*AOC3/AOC3*). Die Graphiken zeigen Mittelwerte (MW) sowie Standardfehler (SF) und Standardabweichungen (SD). Stichprobenumfänge (n) waren für A: 59 Keimlinge (n = 11 [*AOC3/AOC3*], n = 14 [*AOC3/aoc3*], n = 34 [*aoc3/aoc3*]) und für B: 106 Keimlinge (n = 19 [*AOC3/AOC3*], n = 62 [*AOC3/aoc3*], n = 25 [*aoc3/aoc3*]). Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet. Auf Signifikanz (p < 0,05) wurde per ANOVA und Scheffé-Test geprüft

Nach Selbstbestäubung der F₁-Pflanzen wurden die resultierenden F₂-Keimlinge bezüglich ihrer Wurzellängen untersucht und anschließend per PCR genotypisiert. Aus beiden Kreuzungen gingen erneut homozygote *aoc3 KO*-Keimlinge hervor, die signifikant verkürzte Primärwurzellängen zeigten (Abb. 3.32 A u. B). Heterozygote Keimlinge mit einer T-DNA-Integration in nur einem der *AOC3*-Allele waren nicht im Wurzelwachstum beeinträchtigt und zeigten den WT-Phänotyp. Das Spaltungsverhältnis der F₂ entsprach bei der Kreuzung *Ws* x *aoc3 KO* mit 1:1,2:3 nicht dem erwarteten Verhältnis von 1:2:1. Bei der Kreuzung *Col-0* x *aoc3 KO* hingegen lag das Verhältnis von 1:3:1,3 eher im Bereich des erwarteten Spaltungsverhältnisses.

3.5.2.11 Komplementierung der *aoc3 KO*-Mutante

Die Komplementierung des *aoc3 KO*s sollte letztendlich den Nachweis erbringen, dass die Reduktion im Wurzelwachstum durch den Verlust der *AOC3*-Funktion verursacht wurde. Dazu wurde jeweils die kodierende *AOC3*-Sequenz aus *Ws* bzw. *Col-0* in dem binären Transformationsvektor pBI101-526 unter Kontrolle des 35S:Promotors gestellt und in *aoc3 KO*-Pflanzen transformiert.

Nach Selektion der T₁ auf kanamycinhaltigen ½-MS-Platten erfolgte die Aussaat der T₂ auf vertikalen ½-MS-Platten ohne Kanamycin. Nach 14 Tagen wurde zunächst die Wurzellänge individueller Keimlinge bestimmt. Anschließend erfolgte die Genotypisierung per PCR.

Es zeigte sich, dass sich transgene Keimlinge in ihrer Wurzellänge nicht von den nicht-transgenen Keimlingen unterschieden. Dabei war es irrelevant, ob die *AOC3*-Sequenz aus *Ws* oder *Col-0* in den Mutantenhintergrund eingebracht wurde. Weiterhin traten auch keine Unterschiede zu den Keimlingen auf, die mit dem leeren Vektor (LV) transformiert wurden.

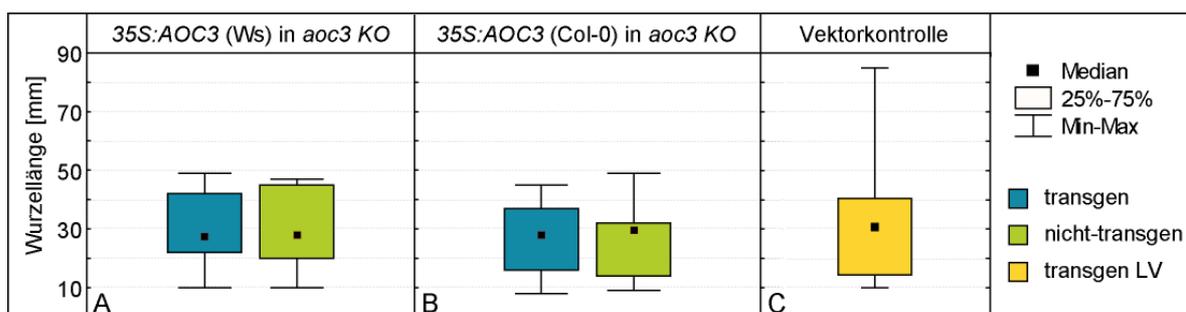


Abb. 3.33: Wurzellängen der komplementierten Keimlinge

Die Pflanzen wurden 14 Tage auf vertikal orientierten ½-MS-Platten im Dauerlicht angezogen. Keimlinge wurden vermessen und per PCR genotypisiert. Die Graphiken zeigen Boxplots mit Medianen, Interquartilabständen und Varianzbreiten. Stichprobenmenge für A: n = 29 (davon 22 transgen), für B: n = 29 (davon 19 transgen) und für C: n = 28 (alle transgen für den Leervektor [LV]).

Die Genotypisierung erlaubte jedoch nur Aussagen über die Präsenz der jeweiligen 35S:AOC3-Konstrukte, nicht jedoch über eine funktionale Komplementierung. Um sicherzustellen, dass es auch zur Expression und Translation der *AOC3* kommt, sollte daher das *AOC*-Vorkommen in Wurzeln per Western Blot überprüft werden. Die Pflanzen wurden dafür zunächst 2 Wochen steril kultiviert und im Fall der Linie 1-1 (35S:AOC3 [Ws] in *aoc3 KO*) auf Kanamycin selektiert.

Danach wurden die Pflanzen für weitere 6 Wochen unter Kurztagbedingungen auf Erde kultiviert. Anschließend erfolgte die Proteinextraktion, wobei das Wurzelmaterial von jeweils 3-6 Pflanzen gepoolt wurde.

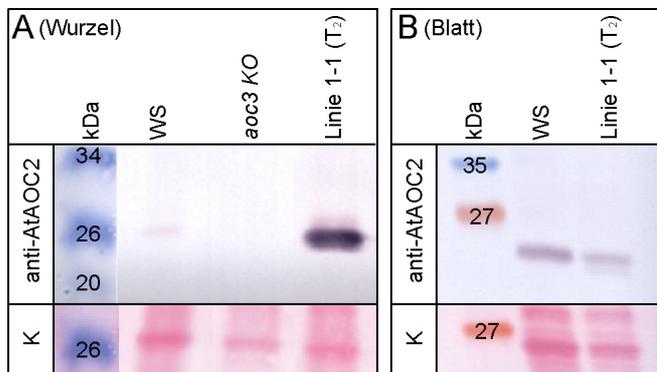


Abb. 3.34: AOC-Vorkommen in Wurzeln komplementierter Pflanzen (8 Wochen)

Western Blot-Nachweis von AOC-Protein in Wurzelproben. Proteine wurden aus gepooltem Wurzelmaterial von jeweils 3-6 Pflanzen extrahiert. Für die Western Blot Analyse wurde 15 (Wurzel) bzw. 10µg (Blatt) Gesamtprotein in einer SDS-PAGE (15 %) eingesetzt und anschließend per *semi dry*-Blot auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der anti-AtAOC2-Antikörper wurde 1:5000 verdünnt verwendet.

Im *aoc3 KO* war kein AOC-Protein nachweisbar und im WT (Ws) kamen geringe AOC-Mengen vor. In den Wurzeln der komplementierten Pflanzen der Linie 1-1 konnte im Gegensatz dazu wesentlich mehr AOC-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.34 A). Damit konnte belegt werden, dass es in den komplementierten Mutanten zur Überexpression der *AOC3* kommt. Allerdings traf dies nur auf das Wurzelmaterial zu. In Blattproben traten zwischen Ws und Pflanzen der Linie 1-1 keine Unterschiede im AOC-Vorkommen auf (Abb. 3.34 B).

Weiterhin sollte eine Überprüfung der AOC-Aktivität in der Arbeitsgruppe (durch Christian Böttcher) vorgenommen werden. Dazu sollte die AOC-Aktivität im Proteinrohextrakt aus Wurzeln in einem gekoppelten Enzymassay bestimmt werden. Es konnte jedoch weder für WT und *aoc3 KO* noch für Pflanzen der Linie 1-1 AOC-Aktivität in der Wurzel nachgewiesen werden. Wiederholungen des Experiments waren aufgrund mangelnden Pflanzmaterials bisher nicht möglich. Daher muss vom gegenwärtigen Stand der Daten davon ausgegangen werden, dass eine Komplementierung des Phänotyps durch die Überexpression der *AOC3* im *aoc3 KO*-Hintergrund nicht möglich ist. Damit erscheint es als unwahrscheinlich, dass der Verlust der *AOC3* Auslöser des reduzierten Wurzelwachstums ist.

Die Ursache für die Reduktion im Wurzelwachstum könnte entweder in einer zusätzlichen T-DNA-Insertion oder in einer spontan aufgetretenen Mutation in der T₀- oder T₁-Generation liegen. Die Kreuzungsanalysen haben zwar keinen Hinweis hierauf gegeben, die Mutation oder T-DNA-Insertion könnte jedoch innerhalb einer Kopplungsgruppe mit dem *AOC3*-Locus liegen und daher über Kreuzungen nicht detektierbar sein.

3.5.2.12 Identifizierung weiterer T-DNA-Insertionen im *aoc3 KO* per GenomeWalk

Um zu überprüfen, ob eine weitere T-DNA im Genom des *aoc3 KO*s vorliegt, wurde nach dem GenomeWalk-Prinzip aus der *left border*-Region der T-DNA sequenziert. Von den insgesamt sieben erhaltenen Fragmenten wies die Sequenz von fünf Homologie zur *AOC3*-Sequenz auf. Die Sequenz der anderen beiden Fragmente erbrachte keine auswertbaren Ergebnisse. Bei drei Klonen

konnte neben der *AOC3*-Sequenz auch die *left border* (LB)-Sequenz des binären Transformationsvektors pBSKI015 (Abb. 3.35 B) identifiziert werden. Dies ermöglichte die Bestimmung der Orientierung des inserierten T-DNA-Fragments. Bei zwei Klonen (Klon 5-2 und Klon 7-3) wurde die bereits bekannte Insertion an Position 9411591 auf Chromosom 3 bestätigt. Hier liegen die vier *35S-enhancer* (35Se) des *activation tagging*-Vektors (Abb. 3.35 B) in *antisense*-Orientierung vor. In einem Fall (Klon 4-1) konnte eine weitere T-DNA-Insertion im *AOC3*-Gen identifiziert werden (Position 9411569), bei der die 35Se in *sense*-Orientierung liegen (Abb. 3.35 A).

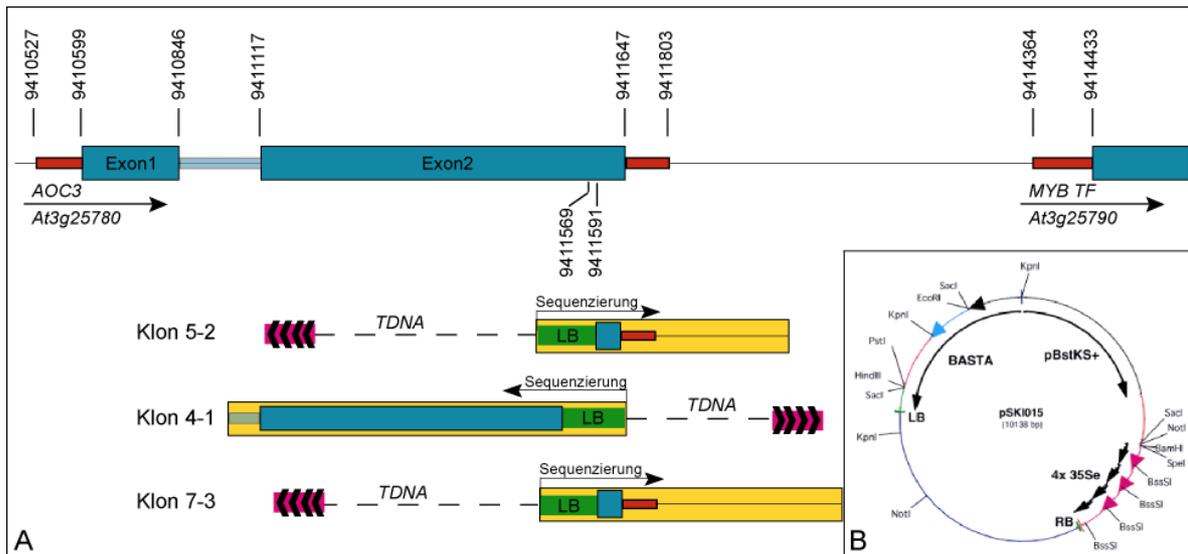


Abb. 3.35: Lokalisation von T-DNA-Insertionen per GenomeWalk

Die erhaltenen Sequenzinformationen von 3 Klonen ist durch gelbe Balken angegeben (A). Die Bereiche mit Homologie zur Sequenz des Chromosoms 3 sind darin eingezeichnet. Rote Balken stellen 5'- bzw. 3'-UTR-Bereiche dar. Grün markiert ist die Sequenz der *left border* (LB). Integrationsorte wurden im Exon 2 der *AOC3* Sequenz markiert. Zur Übersicht über die Orientierung der T-DNA wurde auch die *35S-enhancer*-Region (4x35Se) der *right border* (RB) angegeben (A u. B, Vektorkarte: www.weigelworld.org).

Da keine der Sequenzen Homologie zu einem anderen Bereich des Arabidopsisgenoms zeigten, ist eine T-DNA-Insertion an einem weiteren Locus als unwahrscheinlich anzusehen.

Eine weitere mögliche Ursache des Wurzelphänotyps ergibt sich jedoch aus der *sense*-Orientierung des 35Se, die durch Klon 4-1 nachgewiesen wurde. Dies könnte zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität des Gens *At3g25790* führen, das für einen bislang nicht charakterisierten MYB-Transkriptionsfaktor kodiert.

Da *At3g25790* hauptsächlich in Wurzelgeweben exprimiert wird (Abb. 3.36 B), wäre hier ein Wurzelphänotyp bei veränderter Expression durchaus zu erwarten. Daher wurde die Expression von *At3g25790* in Wurzeln von 9 Tage alten Ws und *aoc3 KO*-Pflanzen untersucht. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede in den Transkriptmengen (Abb. 3.36 C). Die T-DNA-Insertion in der *AOC3*-Sequenz führte also nicht zur Verstärkung der *At3g25790*-Expression.

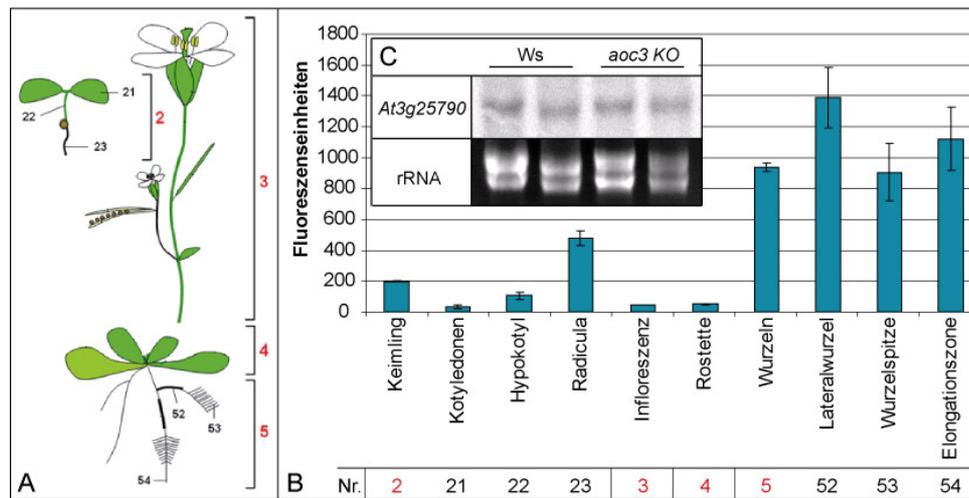


Abb. 3.36: Expression von *At3g25790*

Microarray-Expressionsdaten zur gewebsspezifischen Expression (B). Die angegebene Nummerierung bezieht sich auf die schematische Zeichnung (A). Für die Northern Blot-Analyse der Expression in Wurzeln des WT (Ws) und des *aoc3 KO* (C) wurden 10 µg Gesamt-RNA eingesetzt (C). Es wurden jeweils zwei unabhängige biologische Replikate verwendet. Als Sonde wurde die komplette genomische Sequenz von *At3g25790* verwendet. Die Mittelwerte und Standardfehler wurden dem *Gene Atlas* der *Genevestigator* Datenbank (<https://www.genevestigator.ethz.ch/>) entnommen. Die Übersichtszeichnung (A) wurde leicht verändert übernommen.

Die Veränderungen im Wurzelwachstum des *aoc3 KO* sind also vermutlich durch eine spontan aufgetretene Mutation verursacht, deren genaue Position im Arabidopsisgenom unbekannt ist. Aufgrund der gekoppelten Vererbung der T-DNA-Insertion und des Wurzelphänotyps ist jedoch eine Nähe der Mutation zum *AOC3*-Locus nicht unwahrscheinlich.

3.6 Analyse der β -Oxidation als terminaler Schritt der JA-Biosynthese

Trotz der Vielzahl an experimentellen Daten, die für einen Großteil der JA-Biosyntheseschritte vorliegen, waren Details zur β -Oxidation von OPC-8 zu (+)-7-*iso*-JA lange Zeit eher spekulativ und sollten daher im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht werden.

Aufgrund der Lokalisation der OPR3 in Peroxisomen wurde bereits frühzeitig angenommen, dass Enzyme der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation an der JA-Biosynthese beteiligt sein könnten. Experimentelle Belege dafür wurden jedoch erst in jüngster Zeit publiziert und waren zu Beginn dieser Arbeiten nicht bekannt (Castillo *et al.* 2004; Li *et al.* 2005; Koo *et al.* 2006).

3.6.1 Auswahl geeigneter Mutanten

Analog zur JA-Biosynthese erfordert auch die Konversion von IBA zu IAA einen β -Oxidationsschritt. Durch die Isolation und Charakterisierung IBA-resistenter Mutanten konnte eine Beteiligung von Enzymen der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation an der Auxin-Biosynthese nachgewiesen werden (Zolman *et al.* 2000; Bartel *et al.* 2001). In einigen dieser charakterisierten Mutanten sollte nun überprüft werden, ob zudem auch eine potentielle Störung im analogen β -Oxidationsschritt der JA-Biosynthese vorliegt. Daher wurden zum einen *pxa1* und *pex6*

ausgewählt, die in einem Mutantenscreen eine erhöhte IBA-Resistenz aufwiesen und zum anderen die Mutante *aim1* verwendet, die resistent gegenüber Behandlung mit dem synthetischen Auxin 2,4-DB war, das *in planta* ebenfalls durch β -Oxidation zu 2,4-D umgewandelt wird (Richmond und Bleecker 1999). PXA1 wurde als ein peroxisomaler ABC-Transporter charakterisiert (Zolman *et al.* 2001), wohingegen PEX6 eine ATPase ist, die zusammen mit PEX1 für den Import von Matrixproteinen während der Peroxisom-Biogenese verantwortlich ist (Zolman und Bartel 2004). AIM1 wurde als eines der beiden *multifunctional proteins* in *Arabidopsis* identifiziert, die eine Enoyl-CoA-Hydratase- und eine Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität besitzen und für die Umwandlung des Enoyl-CoAs zum Ketoacyl-CoA verantwortlich sind. Da die *aim1*-Mutante u.a. Veränderungen in der Blütenmorphologie aufweist, produziert sie nur in Ausnahmefällen homozygotes Saatgut und musste für die Experimente jeweils aus dem Saatgut heterozygoter Pflanzen selektiert werden. Die Selektion erfolgte anhand des generellen Wuchsphänotyps und wurde in Stichproben per PCR überprüft. Die potentielle Beeinträchtigung der JA-Biosynthese in den Mutanten wurde anhand der Fähigkeit zur wundinduzierten Bildung von JA überprüft.

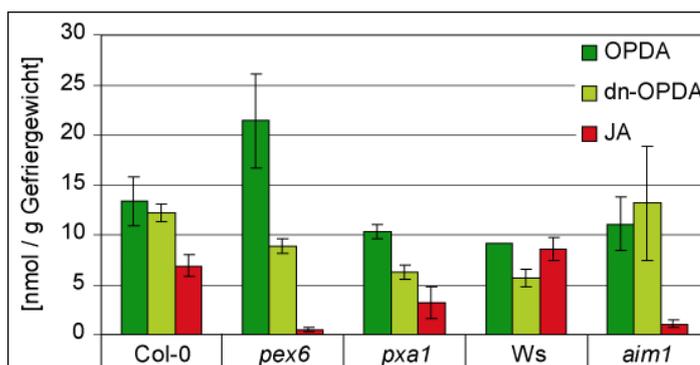


Abb. 3.37: Wundinduzierte Bildung von OPDA, dnOPDA und JA

Für die Quantifizierung per GC-MS wurde Blattmaterial von jeweils neun Rosetten 1,5 h nach lokaler Verwundung gepoolt. Die Daten zeigen Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten 6 Wochen alter Pflanzen sowie Standardfehler.

Alle Mutanten zeigten 1,5 Stunden nach Verwundung niedrigere JA-Gehalte als ihre korrespondierenden WTs, wobei die Werte in *pex6* und *aim1* deutlich stärker reduziert waren als in *pxa1* (Abb. 3.37). Die Fähigkeit zur Bildung von OPDA war in den Mutanten nicht beeinträchtigt und in *pex6* traten gegenüber dem WT (Col-0) leicht erhöhte OPDA-Werte auf. Die dnOPDA-Werte der Mutanten waren in *pex6* und *pxa1* leicht reduziert, wohingegen in *aim1* geringfügig höhere Mengen vorlagen.

Aufgrund der deutlich stärkeren Reduktion der JA-Werte in *pex6* und *aim1* wurde *pxa1* in die weiteren Untersuchungen nicht mehr mit einbezogen.

3.6.2 Jasmonatgenerierung nach Verwundung

Die ausgewählten Mutanten *pex6* und *aim1* wurden erneut einer Verwundung unterzogen, um neben den OPDA-, dnOPDA- und JA-Gehalten auch die wundinduzierbaren Mengen der Zwischenprodukte OPC-8, OPC-6 und OPC-4 zu bestimmen. Im unverwundeten Zustand waren für keine der Substanzen signifikante Unterschiede in den Gehalten zwischen Mutanten und WTs messbar, wohingegen nach Verwundung deutliche Unterschiede auftraten (Abb. 3.38).

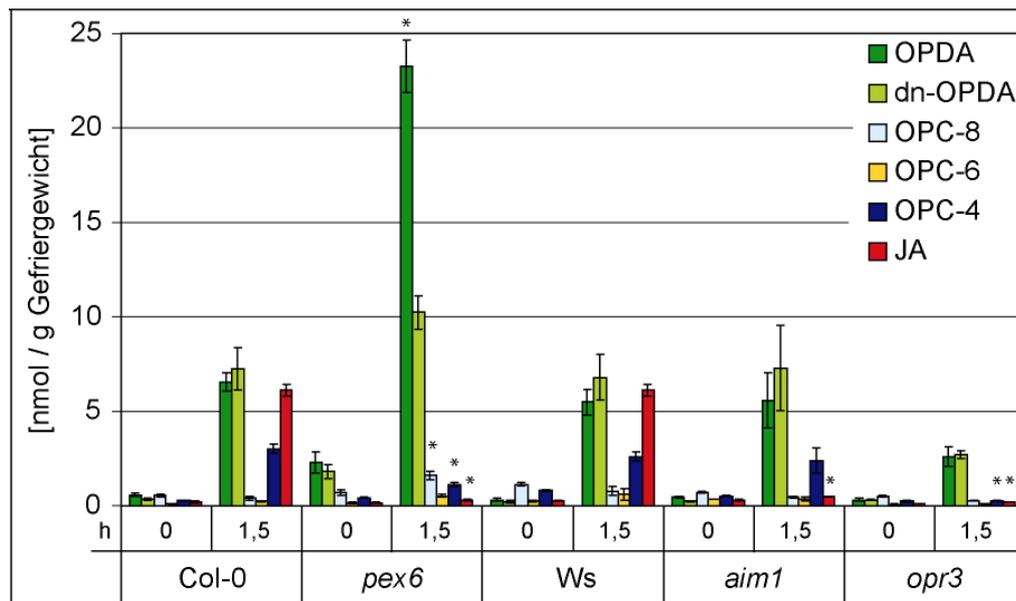


Abb. 3.38: Wundinduzierte Bildung von OPDA, dnOPDA, OPCs und JA

Für die Quantifizierung per GC-MS wurde Blattmaterial von jeweils neun Rosetten 1,5 h nach lokaler Verwundung (1,5 h) bzw. unverwundet (0 h) gepoolt. Die Graphiken zeigen Mittelwerte aus 3 biologischen Replikaten drei Wochen alter Pflanzen sowie Standardfehler. Signifikante Unterschiede zum jeweils korrespondierenden WT-Wert sind mit * markiert. Auf Signifikanz ($p < 0,05$) wurde per ANOVA und Tukey-HSD-Test geprüft.

Alle Mutanten zeigten im Vergleich zu den jeweiligen WT-Proben signifikant reduzierte JA-Werte. Während in den WTs die JA-Gehalte 1,5 Stunden nach Verwundung signifikant anstiegen, blieben die Werte der Mutanten in etwa auf dem Niveau des unverwundeten Blatts. In allen Linien war ein wundinduzierter Anstieg der OPDA- und dnOPDA-Werte feststellbar, wobei in *pex6* 1,5 Stunden nach Verwundung signifikant höhere OPDA-Werte auftraten als im WT (Col-0). Für OPC-8 trat ein signifikanter Anstieg nach Verwundung nur in *pex6* auf, und im OPC-6-Gehalt waren keine Unterschiede zwischen WTs und Mutanten detektierbar. Ein wundinduzierter Anstieg der OPC-4-Werte war in den WTs sowie in *aim1* messbar und trat nicht in *pex6* bzw. *opr3* auf. Hier lagen die Werte nach Verwundung signifikant niedriger als in den korrespondierenden WTs.

3.6.3 Wundinduzierte Bildung von OPCs und JA nach Applikation von [D₅]-OPDA

Um weitere Anhaltspunkte bezüglich der wundinduzierten Bildung von OPCs und JA zu erhalten, wurde ein Fütterungsexperiment durchgeführt, in dem die Pflanzen zunächst mit [²H₅]-OPDA bzw. einer Kontrolllösung behandelt wurden. 30 Minuten nach der Applikation wurde die Pflanzen mechanisch verwundet bzw. unverwundet geerntet. Das verwundete Pflanzenmaterial wurde 1,5 Stunden nach Verwundung (= 2 h nach Applikation) gesammelt. Anschließend wurden die Mengen an OPC-8, OPC-6, OPC-4 und JA per GC-MS quantifiziert, wobei jeweils die Menge an markierter und unmarkierter Substanz bestimmt wurde (Abb. 3.39).

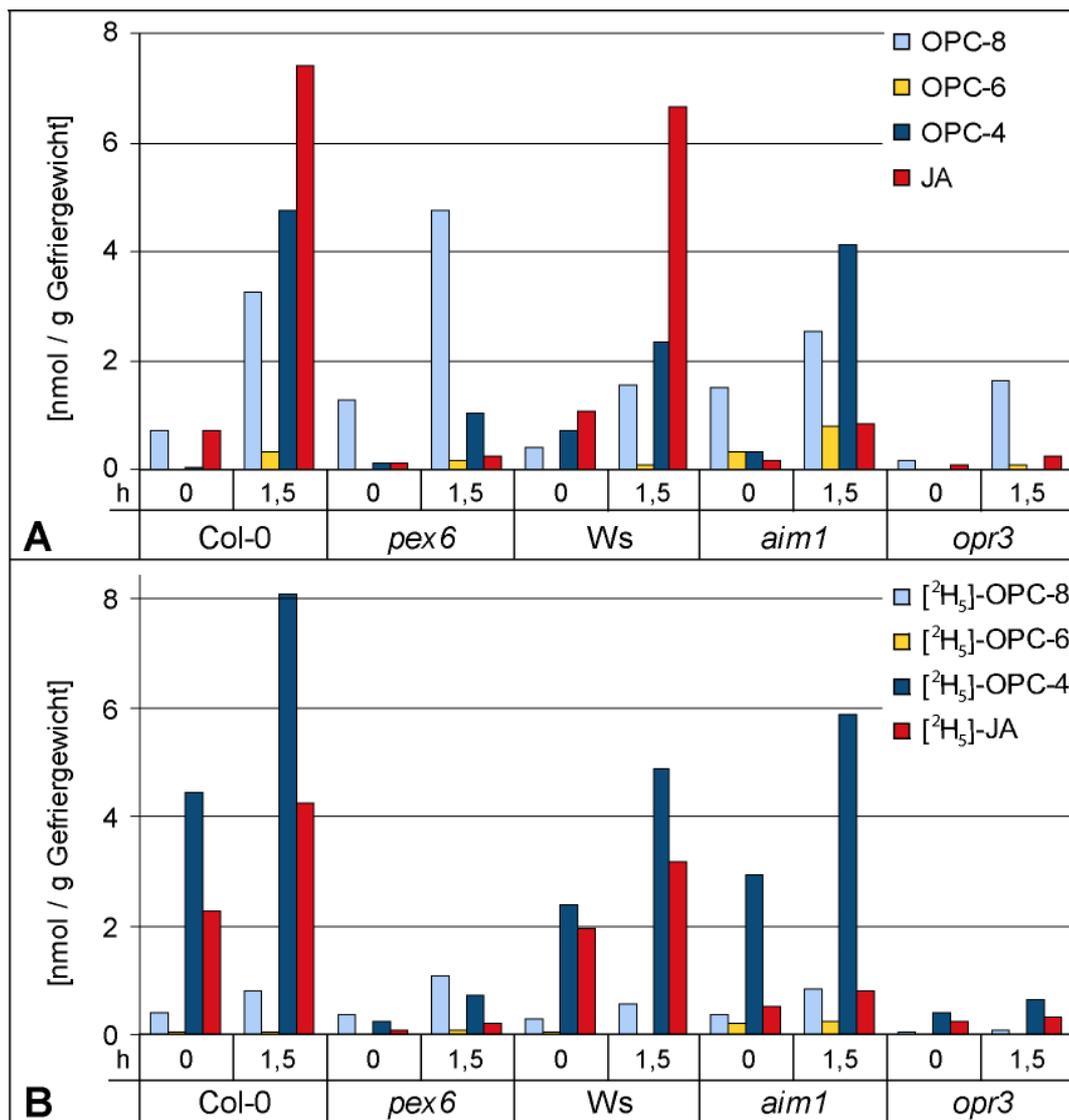


Abb. 3.39: Wundinduzierte Bildung von OPCs und JA nach Applikation von [²H₅]-OPDA

Je 150 µl einer 1 mM [²H₅]-OPDA wurden pro 0,5 g Frischgewicht mit einem Pinsel auf die Blattoberflächen aufgetragen. 30 min nach Applikation wurden die Pflanzen mechanisch verwundet bzw. direkt unverwundet geerntet (0 h). Nach weiteren 1,5 h wurden die verwundeten Rosetten (1,5 h). Die Gehalte an endogenen (A) und [²H₅]-markierten (B) Substanzen wurden per GC-MS bestimmt. Für die Quantifizierung wurde Blattmaterial von jeweils neun Rosetten drei Wochen alter Pflanzen gepoolt. Dargestellt sind repräsentative Daten aus einem von zwei Experimenten.

Obwohl die Gehalte an endogenen Oxylipinen nach Verwundung (Abb. 3.38) mit denen nach Applikation und Verwundung im Wesentlichen übereinstimmten, führte die Applikation von [²H₅]-OPDA teilweise bereits im unverwundeten Zustand zu erhöhten OPC-8 und JA-Werten (Abb. 3.39 A). Die Ursache dafür lag vermutlich in einer Wundinduktion durch das Aufbringen der Lösung auf die Blattoberfläche. Die applizierte Substanz selbst schien dabei keinen Einfluss auf die endogenen Gehalte zu haben, da keine wesentlichen Unterschiede in den Gehalten zwischen den Applikationen mit [²H₅]-OPDA bzw. Kontrolllösung auftraten (Daten nicht gezeigt).

Wahrscheinlich war die erhöhte Substratverfügbarkeit die Ursache dafür, dass die [$^2\text{H}_5$]-JA-Werte der WT's bereits im unverwundeten Zustand zweimal so hoch wie die endogenen JA-Werte, und der wundinduzierte Anstieg im JA-Gehalt fiel für das markierte JA wesentlich geringer aus als für das unmarkierte.

Weiterhin konnten sowohl in den WT's als auch in den Mutanten relativ hohe Mengen an OPC-8 nachgewiesen werden, die nur teilweise mit den Daten der unbehandelten Pflanzen (Abb. 3.38) übereinstimmen. Dies traf besonders auf die überraschend hohen OPC-8-Werte der verwundeten *opr3*-Pflanzen zu, da diese Pflanzen eigentlich in der Reduktion der OPDA zum OPC-8 gestört sind. Die Mengen an JA und [$^2\text{H}_5$]-JA in den Mutanten blieben sowohl im unverwundeten Zustand als auch nach Verwundung konstant niedrig. Während die Gehalte an [$^2\text{H}_5$]-OPC-8 z.T. wesentlich geringer waren als die endogenen OPC-8-Werte, kam es zu einer starken Erhöhung an [$^2\text{H}_5$]-OPC-4 in den WT's und in *aim1*.

3.6.4 Expressionsanalyse JA-responsiver Gene

Die eingeschränkte Fähigkeit zur wundinduzierten JA-Bildung der Mutanten sollte sich auch in der Expression jasmonatresponsiver Gene widerspiegeln. Durch Expressionsstudien mit der *opr3*-Mutante konnte bereits gezeigt werden, dass die *VSP*-Expression in erster Linie durch JA, nicht aber durch OPDA induziert wird (Stintzi *et al.* 2001; Taki *et al.* 2005). Die *VSP*-Transkriptmenge kann daher zum indirekten Nachweis der JA-Bildung herangezogen werden. Die *VSP*-Expression wurde zunächst mittels Northern Blot in 9 Wochen alten Pflanzen nachgewiesen. Dabei wurde die cDNA des *VSP1*-Gens als Sonde eingesetzt, die auch Homologie zur *VSP2* aufweist. In Northern Blot-Analysen war für *pex6* eine deutliche und für *aim1* eine geringfügige Reduktion der *VSP*-Expression nach Verwundung sichtbar (Abb. 3.40 A). Die Quantifizierung der *VSP*-Expression von WT und *aim1* erfolgte anhand drei unabhängiger Northern Blot-Analysen, wobei jeweils die WT-0 h Probe als 100% gesetzt wurde. Zum Vergleich wurde ein Northern Blot der *VSP*-Expression in *opr3* mit zur Analyse herangezogen (B). Während im WT ein wundinduzierter Anstieg der *VSP*-Expression auftrat, blieb die *VSP*-Transkriptmenge in *aim1* relativ konstant im Bereich der unverwundeten WT-Werte (0 h). Für die *opr3* war ebenfalls kein Anstieg der *VSP*-Expression zu verzeichnen, die Werte lagen hier jedoch niedriger als im WT und in der *aim1*. Um eine genauere Quantifizierung der *VSP*-Expression sowie die Unterscheidung zwischen *VSP1* und *VSP2* zu ermöglichen, wurde weiterhin eine erste Analyse der Expression per qRT-PCR an drei Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Hier ergaben sich eindeutige Unterschiede zwischen *VSP1* und *VSP2* in der Reaktion der Transkriptmengen auf die Verwundung. Während die *VSP2* Transkriptmenge im WT und in *aim1* konstant auf relativ hohem Niveau blieb, zeigte sich ein wundinduzierter Anstieg der Transkriptmenge in der *opr3*.

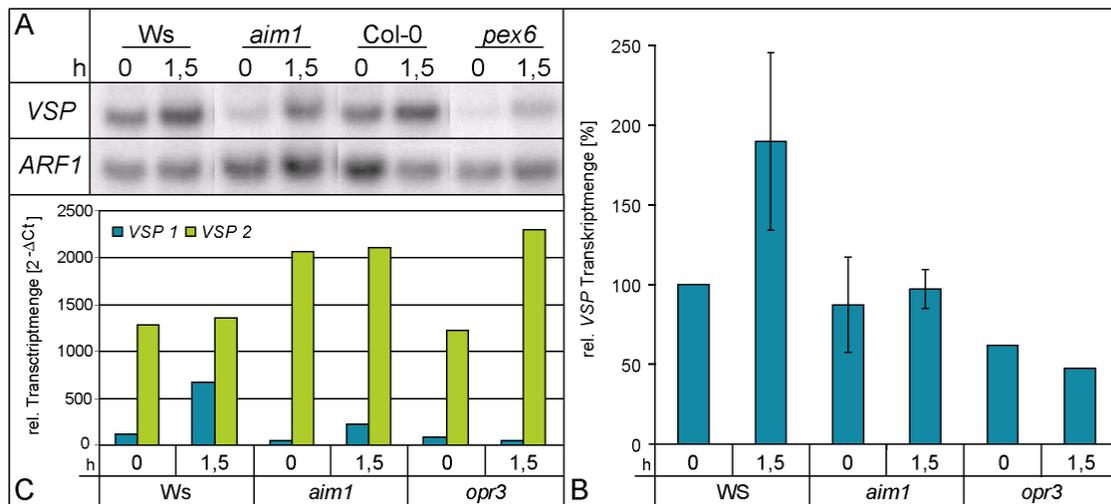


Abb. 3.40: VSP-Expression nach Verwundung

Northern Blot-Analyse der VSP-Expression (A) Die Phosphoimager-Quantifizierung (B) erfolgte für WS und *aim1* von drei unabhängigen Northern Blots. Die Quantifizierung eines *opr3*-Northern Blots wurde zum Vergleich verwendet (B). Durch qRT-PCR konnten die relativen Transkriptmengen von *VSP1* und *VSP2* getrennt bestimmt werden, wobei *PP2A* als Referenzgen diente (C). Die RNA-Extraktion für Northern Blot Analysen (A) erfolgte aus unverwundeten (0 h) und lokal verwundeten (1,5 h) neun Wochen alten Rosettenblättern, wobei jeweils 18 – 20 Pflanzen gepoolt wurden. Die RNA-Isolierung für die qRT-PCR-Analyse (C) erfolgte aus einzelnen drei Wochen alten Pflanzen.

Die *VSP1*-Expression wurde im WT durch die Verwundung induziert, wohingegen keine Veränderungen der *VSP1*-Transkriptmenge in *opr3* zu verzeichnen war und nur ein sehr geringer Anstieg in *aim1* auftrat. Wiederholungen der qRT-PCR-Analyse an unabhängigem Material sowie die Applikation von JA und OPDA an WT und Mutanten werden weiteren Aufschluss über die JA-responsive Genexpression in *aim1*, *pex6* und *opr3* geben können und weiterhin auch Aussagen zur Wundinduktion der Expression von *VSP1* und *VSP2* liefern.

4 Diskussion

In den letzten zwei Jahrzehnten wurde der JA-Biosyntheseweg aufgeklärt und die Bedeutung der Jasmonate für die Regulation der Entwicklung sowie von Stressantworten in Pflanzen wurde zunehmend mit molekularen Techniken analysiert. Viele der Enzyme, die an der JA-Biosynthese beteiligt sind, konnten aus unterschiedlichen Pflanzenspezies kloniert und charakterisiert werden. Über die Regulation der JA-Bildung ist bisher wesentlich weniger bekannt. Viele der JA-Biosyntheseenzyme werden durch Genfamilien kodiert und die differentielle Regulation einzelner Mitglieder der Genfamilien könnte ein wichtiger Faktor in der Kontrolle der zeitlich, räumlich und gewebsspezifischen Bildung von Jasmonaten sein. Aufgrund der Schlüsselfunktion der AOC für die JA-Biosynthese war die Frage nach redundanter oder nicht-redundanter Funktion der einzelnen AOCs aus *Arabidopsis* von besonderem Interesse und sollte daher innerhalb dieser Arbeit untersucht werden.

Um eine umfassende Charakterisierung der AOC-Genfamilie zu ermöglichen, wurden verschiedene Ansätze verfolgt. Umfangreiche Expressionsanalysen anhand frei verfügbarer Microarray-Expressionsdaten haben Aussagen bezüglich spezifischer und redundanter Expressionsmuster ermöglicht. Die Interpretation der Daten wurden jedoch dadurch limitiert, dass bei Verwendung des ATH1-GeneChips die Expression von *AOC1* und *AOC2* vermutlich durch eine gemeinsame Sonde detektiert wurde und kein spezifischer Nachweis der Transkriptmengen von *AOC1* und *AOC2* vorliegt.

Die Analyse des Vorkommens potentiell regulatorischer *cis*-Elemente in den AOC-Promotoren erbrachte den Nachweis, dass die Promotorstrukturen der AOCs untereinander relativ heterogen sind. Die Mehrzahl der Elemente konnte in zwei oder drei der vier AOC-Promotoren nachgewiesen werden. Außerdem wurde die Identifizierung von Faktoren ermöglicht, die potentiell an der Regulation der AOC-Expression beteiligt sind. Aussagen über die tatsächliche Funktionalität der identifizierten Signalsequenzen würden aber letztendlich die Herstellung und Charakterisierung von Promotordeletionen erfordern. Von größerer Aussagekraft sind daher die Ergebnisse der Promotoraktivitätsuntersuchungen. Diese ermöglichten die Identifizierung sowohl redundanter als auch partiell-redundanter und spezifischer Aktivitätsmuster der vier AOC-Promotoren in unterschiedlichen Geweben und Prozessen.

Die transgenen *loss of function*-Ansätze sollten schließlich die funktionale Charakterisierung einzelner AOCs (T-DNA-Insertionslinien) und der AOC-Familie insgesamt (AOC-RNAi-Linien) ermöglichen. Die transgenen Pflanzen konnten aber nur in einigen der jasmonatvermittelten Prozesse auf phänotypische Veränderungen untersucht werden. Eine potentielle Funktion in anderen, bisher nicht analysierten Prozessen oder Entwicklungsabschnitten ist daher nicht auszuschließen.

Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit der Aufklärung von molekularen Details der β -Oxidationsschritte der JA-Biosynthese. Obwohl bereits zahlreiche molekulare Details der JA-Biosynthese lange aufgeklärt sind, waren zu Beginn dieser Arbeiten nur wenige Einzelheiten zur β -Oxidation innerhalb der JA-Biosynthese bekannt.

4.1 Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation sind an der JA-Biosynthese beteiligt

Durch Miersch und Wasternack (2000) gelang der Nachweis, dass nur OPCs mit geradzahliger Carboxyl-Seitenkette zu JA umgewandelt werden können. Dies und die Tatsache, dass die OPR3 in den Peroxisomen lokalisiert wurde (Strassner *et al.* 2002), legten nahe, dass ein Teil der JA-Biosynthese in den Peroxisomen erfolgt und eine Beteiligung der Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation erfordert.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen diese Theorie ebenso wie andere in jüngster Zeit publizierte Daten, bei denen verschiedene experimentelle Ansätze in Arabidopsis und Tomate verfolgt wurden. Castillo *et al.* (2004) erbrachten den Nachweis, dass die Expression einiger der Arabidopsis-Gene, die für Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation kodieren (*ACX1*, *KAT2*, *KAT5*), durch Verwundung und JA-Applikation induziert werden. *ACX1*- und *KAT2*-antisense-Pflanzen zeigten außerdem stark reduzierte Jasmonat-Werte nach Verwundung (Castillo *et al.* 2004). In Übereinstimmung damit wurden nach Verwundung auch reduzierte JA-Werte für die *ped1*-Mutante nachgewiesen, die in der *KAT2*-Funktion beeinträchtigt ist (Afitlhile *et al.* 2005).

Der Defekt einer ACX in Tomate (*ACX1A*) führt ebenfalls zu einer stark verminderten Fähigkeit zur wundinduzierten JA-Bildung, die sich auch durch eine verminderte Expression JA-responsiver Gene zeigt, die für Proteinaseinhibitoren kodieren (Li *et al.* 2005).

Auch die Notwendigkeit der Substrataktivierung für die β -Oxidationsschritte der JA-Biosynthese konnte belegt werden. Schneider *et al.* (2005) konnten *in vitro* die Aktivierung von OPC-8 bzw. OPDA durch zwei Arabidopsis-4CL-like Proteine nachweisen und Koo *et al.* (2006) identifizierten ein weiteres 4CL-like-Protein aus Arabidopsis, das *in vitro* sowohl OPC-8 als auch OPDA aktiviert. Die Beteiligung der OPCL1 an der JA-Biosynthese *in planta* wurde auch durch einen transgenen *loss of function*-Ansatz bestätigt (Koo *et al.* 2006).

Innerhalb dieser Arbeit wurden mit *pex6*, *pxa1* und *aim1* verschiedene Mutanten verwendet, anhand derer bereits eine Beteiligung von Enzymen der peroxisomalen Fettsäure- β -Oxidation an der Auxinbiosynthese belegt werden konnte. Sollten diese Enzyme auch an der β -Oxidation innerhalb der JA-Biosynthese beteiligt sein, wäre in den Mutanten neben der eingeschränkten Fähigkeit zur Fettsäure- β -Oxidation und IAA-Bildung auch eine Beeinträchtigung der JA-Bildung zu erwarten. Im Rahmen der Arbeit sollte zum einen die wundinduzierte Bildung von JA aus endogen bereitgestellter OPDA untersucht werden. Zum anderen sollte der Umsatz einer definierten Menge exogen applizierter OPDA verfolgt werden. Um dabei eine Unterscheidung zwischen der applizierten und der endogen synthetisierten OPDA zu ermöglichen, wurde markierte

[²H₅]-OPDA appliziert. Als Kontrolle wurde teilweise die *opr3*-Mutante mit in die Untersuchung einbezogen, da hier die fehlende Reduktion der OPDA zur OPC-8 die JA-Bildung verhindert.

Die Peroxisombiogenesemutante *pex6* ist im Import von Matrixproteinen gestört. Aufgrund der Einschränkung der Peroxisomfunktion kommt es zu einer starken Beeinträchtigung der Fettsäure-β-Oxidation, die dazu führt, dass die Mutante u.a. bei der Keimung auf eine exogene Kohlenstoffquelle angewiesen ist (Zolman und Bartel 2004). Dies trifft auch auf die beiden weiteren Mutanten *aim1* und *pxa1* zu (Richmond und Bleecker 1999; Zolman *et al.* 2001).

Die Mutanten *pex6*, *aim1* und *pxa1* wurden im Rahmen der Arbeit zunächst auf ihre Fähigkeit zur wundinduzierten JA-Bildung (aus endogener OPDA) untersucht. Da die Reduktion im JA-Gehalt nach Verwundung in *pex6* und *aim1* wesentlich stärker als in *pxa1* war (Abb. 3.37), wurde *pxa1* nicht in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen. Die *pxa1*-Mutante ist in dem gleichen peroxisomalen ABC-Transporter defekt wie die *cts*-Mutanten. Auch in *cts1* und *cts2* ist die Fähigkeit zur wundinduzierten JA-Bildung eingeschränkt (Theodoulou *et al.* 2005). Es kommt jedoch wie in *pxa1* noch zu einem Anstieg der JA-Werte nach Verwundung. Daher wurde postuliert, dass OPDA nicht ausschließlich über den CTS/PXA-ABC-Transporter in die Peroxisomen gelangt und alternative Transportwege über weitere Transporter oder *ion trapping* bestehen (Theodoulou *et al.* 2005), durch die ein Import von OPDA in die Peroxisomen in geringerem Umfang gewährleistet wird.

In drei Wochen alten Pflanzen traten für *pex6*, *aim1* und *opr3* signifikant reduzierte JA-Werte nach Verwundung auf (Abb.3.38). In *pex6* kam es außerdem zu einer signifikant erhöhten wundinduzierten Akkumulation von OPDA. Auch die Werte an freier OPC-8 waren im Vergleich zum WT (Col-0) nach Verwundung signifikant erhöht, wohingegen die Gehalte an freier OPC-4 und die JA-Mengen gegenüber dem WT signifikant reduziert waren. Dies könnte möglicherweise auf eine fehlende Substrataktivierung von OPDA und/oder OPC-8 in den *pex6*-Pflanzen hindeuten, wodurch eine weitere β-Oxidation zur JA behindert wird. Dies stimmt mit Daten zu den bisher charakterisierten 4CL-like-Enzymen überein, die sowohl OPDA als auch OPC-8 aktivieren können (Schneider *et al.* 2005; Koo *et al.* 2006). Allerdings waren die Unterschiede zwischen den endogenen OPC-8-Gehalten des WTs und *pex6* nach Verwundung in dem einmalig durchgeführten Fütterungsexperiment wesentlich geringer und die [²H₅]-OPC-8-Werte von *pex6* wiesen keine Veränderungen gegenüber dem WT auf (Abb. 3.39). In den *opr3*-Pflanzen konnte keine Akkumulation von OPDA beobachtet werden. Hier lagen im Vergleich zum WT (Ws) sogar reduzierte OPDA-Werte vor. Dies könnte auf die fehlende positive *feedback*-Regulation zurückgeführt werden, sollte dann allerdings auch in *aim1* und *pex6* auftreten.

In *aim1* waren die JA-Werte nach Verwundung gegenüber dem WT (Ws) signifikant reduziert. Alle anderen Gehalte entsprachen denen des WTs (Abb. 3.38). Es konnte auch keine Akkumulation von freier OPC-8 oder der anderen OPCs nachgewiesen werden. Da keine Bestimmung der OPC-

CoA-Ester durchgeführt werden konnte, sind Aussagen über potentielle Anstiege in den Werten der aktivierten Verbindungen nicht möglich.

Zwischen den Genprodukten von *MFP2* und *AIM1* scheint nur eine geringe funktionale Redundanz zu bestehen. Obwohl beide Gene in den meisten Geweben und Entwicklungsabschnitten gleichstark exprimiert werden (www.genevestigator.ethz.ch), löst der Verlust von *AIM1* eine starke Beeinträchtigung in der Entwicklung und Fertilität der Pflanzen aus (Richmond und Bleecker 1999). Ein Defekt in *MFP2* (*mfp2-1*) hingegen führt nur zu einer essentiellen Abhängigkeit von einer exogenen Kohlenstoffquelle, um eine Samenkeimung zu ermöglichen. Die weitere Entwicklung der Mutanten ist nicht beeinträchtigt und eine Beteiligung von *MFP2* an der Auxinbiosynthese wurde aufgrund der fehlenden Resistenz gegenüber dem synthetischen Auxin 2,4DB ebenfalls weitgehend ausgeschlossen (Rylott *et al.* 2006). Aufgrund der stark reduzierten JA-Werte in *aim1*-Pflanzen ist einer Funktion von *MFP2* an der wundinduzierten JA-Bildung ebenfalls eine untergeordnete Bedeutung beizumessen.

Überraschenderweise konnte in *opr3*-Pflanzen geringe JA-Mengen nachgewiesen werden (Abb. 3.38 und 3.39). Da die Mutante keine funktionsfähige OPR3 besitzt, sollte die OPDA nicht mehr reduziert werden und damit kein OPC-8 als Ausgangssubstanz für die β -Oxidation zur JA zur Verfügung stehen. Das Auftreten geringer Mengen an JA in *opr3*-Pflanzen konnte jedoch auch in anderen Experimenten der Arbeitsgruppe beobachtet werden (Miersch, persönliche Mitteilung) und trat auch in den Analysen anderer Gruppen auf (Stintzi *et al.* 2001). Möglicherweise kommt es beim Verlust der OPR3-Funktion in geringem Maße zur Reduktion der OPDA durch OPR1 und/oder OPR2, die eine wesentlich geringere Substratspezifität aufweisen (Schaller *et al.* 1998) und im Gegensatz zum WT dann einen Beitrag zur Reduktion der OPDA liefern könnten.

Die Unterschiede, die in der Verwundungskinetik für die unmarkierten und [$^2\text{H}_5$]-markierten Substanzen auftraten, beruhen vermutlich auf Unterschieden in der Substratverfügbarkeit, der eine wesentliche Rolle in der Regulation der JA-Bildung zukommt (Laudert *et al.* 2000; Stenzel *et al.* 2003a). Durch die Applikation von [$^2\text{H}_5$]-OPDA stand bereits 30 Minuten vor der Verwundung markiertes Substrat für die JA-Bildung zur Verfügung. Dementsprechend sind die Werte der markierten Substanzen im unverwundeten Zustand wesentlich höher als die der endogenen Gehalte. Außerdem könnte eine unterschiedlich schnelle Metabolisierung der applizierten [$^2\text{H}_5$]-OPDA und der endogen generierten bzw. freigesetzten OPDA vorliegen. Stelmach *et al.* (2001) konnten demonstrieren, dass im Blattohextrakt die Metabolisierung von applizierter [$^2\text{H}_5$]-OPDA und endogener OPDA sehr unterschiedlich verläuft. Während die markierte OPDA innerhalb 1 Stunde fast vollständig metabolisiert wurde, stiegen die Werte an endogener OPDA innerhalb der ersten Stunde zunächst deutlich an. Dann erst begann auch hier der OPDA-Gehalt zu sinken. Die Unterschiede zwischen den endogenen und [$^2\text{H}_5$]-markierten OPC-Gehalten könnten also auch auf eine zeitliche Verschiebung der JA-Biosynthese in Abhängigkeit von der Substratherkunft (appliziert vs. endogen) zurückzuführen sein.

Die gebildeten JA-Mengen wurden ansatzweise auch durch die Expression der JA-induzierbaren *VSP*-Gene reflektiert (Abb. 3.40). Die Quantifizierung der in Northern Blot-Analysen detektierten Transkriptmengen ergab für den WT (Ws) den charakteristischen wundinduzierten Anstieg der *VSP*-Transkriptmenge. In *aim1* hingegen blieb die *VSP*-Expression durchschnittlich auf dem Niveau der unverwundeten Proben und entsprach etwa den Werten der *opr3* (Abb. 3.40 B). Aufgrund von Materialmangel waren für *pex6* keine wiederholten Expressionsanalysen möglich. In einer Northern Blot-Analyse zeigte sich gegenüber dem WT (Col-0) allerdings eine verminderte *VSP*-Transkriptmenge (Abb. 3.40 A).

Die *VSP*-Expression dient allgemein als ein indirekter Indikator für die Jasmonatbildung. In Arabidopsis kodieren zwei Gene (*At5g24780* und *At5g24770*) für *VSPs*. Die kodierenden Sequenzen von *VSP1* und *VSP2* weisen eine hohe Identität von 89% auf. Ein spezifischer Nachweis der einzelnen Transkripte wäre per Northern Blot-Analyse nur schlecht über die Nutzung der relativ kurzen 3'- bzw. 5'-UTR-Bereiche als Sondentemplates möglich. In vielen Fällen wird daher die vollständige cDNA einer der beiden *VSPs* als Sondentemplate verwendet (z.B. Taki *et al.* 2005). Dies führt aufgrund der Sequenzhomologie vermutlich zum Nachweis beider *VSP*-Transkripte. Daher ist die angegebene Expression (*VSP1* bzw. *VSP2*) insofern irreführend, als dass nur die *VSP*-Expression insgesamt bestimmt werden konnte und kein spezifischer Nachweis der Expression eines der beiden *VSP*-Gene vorliegt.

Microarray-Analysen der *VSP*-Expression lassen ebenfalls keine Aussagen über die spezifische Regulation der *VSPs* zu, da auf dem ATH1-GeneChip lediglich eine *VSP*-Sonde vorliegt, die Sequenzhomologie zu beiden *VSP*-Transkripten aufweist. Daher stehen bislang kaum Daten zur spezifischen oder redundanten Regulation von *VSP1* und *VSP2* zur Verfügung. Durch Promotor-GUS-Fusionen konnte bereits gezeigt werden, dass die Promotoren von *VSP1* und *VSP2* beide durch JAME-Applikation induziert werden können (Ellis und Turner 2001).

In einer quantitativen RT-PCR-Analyse wurden jeweils die relativen Transkriptmengen von *VSP1* und *VSP2* für *aim1*, *opr3* und dem korrespondierenden WT (Ws) bestimmt. Ein wundinduzierter Anstieg der Expression konnte im WT nur für *VSP1* gezeigt werden. Die *VSP2*-Transkriptmenge hingegen stieg nach Verwundung nicht an. Dies konnte auch in *aim1* nachgewiesen werden, wobei der Anstieg der *VSP1*-Transkriptmenge nach Verwundung wesentlich geringer ausfiel als im WT. In *opr3*-Pflanzen trat keine Veränderung der *VSP1*-Expression auf, aber für die *VSP2* konnte ein wundinduzierter Anstieg verzeichnet werden. Aufgrund fehlenden Materials konnte bisher keine Wiederholung der qRT-PCR-Analyse erfolgen. Daher sind Aussagen bezüglich der spezifischen Regulation der *VSP*-Gene durch JA zum gegenwärtigen Zeitpunkt rein spekulativ.

Sollten die Expressionsdaten der qRT-PCR reproduzierbar sein, müsste davon ausgegangen werden, dass primär *VSP1* wundresponsiv exprimiert wird. Durch Applikation von JA bzw. OPDA an WT und Mutantenkeimlingen könnte zudem untersucht werden, ob die Expression beider *VSPs* diesbezüglich redundant oder spezifisch reguliert wird.

Eine Beteiligung einiger Enzyme der Fettsäure- β -Oxidation an der JA-Biosynthese konnte wie oben beschrieben durch verschiedene experimentelle Ansätze belegt werden und gilt mittlerweile als gesichert. Mit dieser Arbeit konnte nun auch die Beteiligung eines der beiden Arabidopsis *multifunctional proteins* (AIM1) und der essentielle Bedarf an funktionalen Peroxisomen an der JA-Biosynthese belegt werden.

4.2 Die Bedeutung der Arabidopsis AOCs

Die Generierung von *AOC*-RNAi-Linien sollte dazu dienen, einen *knockdown* aller *AOC*-Transkripte zu erreichen und damit die Bedeutung der Arabidopsis-AOCs insgesamt zu untersuchen. Die erfolgreiche Reduktion der Transkriptmengen aller vier *AOCs* konnte nur teilweise erreicht werden. In den meisten Fällen waren die Transkripte von *AOC1* und *AOC2* stark reduziert, wohingegen die Transkriptmengen der *AOC3* unverändert waren (Abb. 3.10). Aussagen über eine Verminderung der *AOC4*-Expression wurden durch die bereits geringen Transkriptmengen im WT erschwert. Die Expression scheint aber in den RNAi-Pflanzen ebenfalls reduziert zu sein.

Unklar ist jedoch, warum gerade die *AOC3*-Expression scheinbar nicht betroffen ist. Da für das RNAi-Konstrukt das Exon 2 der *AOC3* verwendet wurde, besteht eine absolute Sequenzhomologie zur *target*-mRNA. Daher sollte die *AOC3*-mRNA bevorzugt von siRNAs abgebaut werden.

Unwahrscheinlich ist, dass im Northern Blot die *AOC3*-Sequenz des RNAi-Konstrukts nachgewiesen wurde und damit ein falsch-positives Ergebnis vorliegt, weil zur Bestimmung der einzelnen *AOC*-Transkriptmengen die jeweiligen 3'-UTR-Bereiche der *AOC*-Gene als Sonden-*template* verwendet wurden. Im RNAi-Konstrukt sind jedoch nur ca. 40 bp des *AOC3*- 3'-UTR-Bereichs enthalten, die für eine ausreichend starke Bindung der DNA-Sonde vermutlich nicht ausreichend sind.

Überraschend war weiterhin, dass die *AOC*-Transkripte in einigen Fällen in Northern Blots und auch in der semiquantitativen RT-PCR nachgewiesen werden konnten. Für tierische Systeme wurde beschrieben, dass endogene niedermolekulare RNAs (miRNA), die keine absolute Sequenzhomologie zur *target*-mRNA aufweisen, eher eine Inhibierung der Translation als den Abbau der RNA auslösen (Olsen und Ambros 1999). Dies scheint bei Pflanzen nicht zwingend der Fall zu sein. Hier kann sowohl die Transkriptstabilität als auch die Translation durch miRNAs betroffen sein (Llave *et al.* 2002; Chen 2004). Für transgen generierte siRNAs wurde jedoch bislang nur in tierischen, nicht aber in pflanzlichen Systemen eine Inhibierung der Translation beschrieben (Doench *et al.* 2003). Ein Wechsel der siRNA-Funktion zwischen Abbau der mRNA und Inhibierung der Translation ist als unwahrscheinlich anzusehen und wurde bisher weder für pflanzliche noch für tierische Systeme beschrieben. Daher sind die Unterschiede in den detektierten Transkriptmengen der *AOCs* zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zu erklären.

Die AOC-Transkriptmenge insgesamt war jedoch in den RNAi-Linien deutlich reduziert und AOC-Protein war weder im Western Blot (Abb. 3.11) noch immunzytologisch nachweisbar (Abb. 3.12), was eine erfolgreiche Reduktion im AOC-Vorkommen belegt. Es ist jedoch anzunehmen, dass in den RNAi-Pflanzen geringe Restmengen an AOC-Protein gebildet werden können, da ein RNAi-vermitteltes systemisches Gen-*silencing* im Allgemeinen nur zu einer Reduktion, nicht aber zu einem totalen Ausfall eines Genproduktes führt.

Überraschenderweise kam es trotz des deutlichen Verlusts an AOC-Protein nicht zu einer Reduktion in den OPDA- und JA-Mengen der unverwundeten Blätter. Erst nach Verwundung konnte ein Effekt des AOC-*knockdowns* auch auf Ebenen der OPDA und JA-Werte nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Da nur *cis*-(+)-OPDA nachgewiesen wurde, kann von einer enzymatischen Bildung der OPDA ausgegangen werden (Miersch, persönliche Mitteilung).

In WT-Pflanzen liegt ein Großteil der OPDA normalerweise in veresterter Form als Teil plastidärer Galactolipide vor (Stelmach *et al.* 2001; Hisamatsu *et al.* 2005; Andersson *et al.* 2006). Für Blattohextrakte konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der OPDA-Gehalte innerhalb der ersten Stunde größtenteils auf die Freisetzung aus der Plastidenmembran zurückzuführen ist und nicht auf einer *de novo*-Synthese beruht (Stelmach *et al.* 2001). Die potentiellen Restmengen an AOC-Protein in den RNAi-Linien sind scheinbar in der Lage, geringe Mengen an freier OPDA zu bilden, die den Werten des unverwundeten WTs entsprechen. Möglicherweise ist die gebildete Menge der OPDA jedoch nicht ausreichend, um eine dem WT entsprechende Menge an OPDA als Teil der plastidären Galactolipide zu bilden. In diesem Fall würden nach Verwundung geringere Mengen an OPDA als Substrat für die Jasmonatbildung freigesetzt. Zudem wird eine *de novo*-Synthese von OPDA wahrscheinlich durch die stark verminderte AOC-Menge beeinträchtigt. Kombiniert könnte dies die Ursache der signifikant reduzierten JA-Gehalte und des fehlenden Anstiegs der OPDA-Werte nach Verwundung sein. Dies würde bedeuten, dass der Freisetzung von OPDA aus plastidären Galactolipiden innerhalb der Verwundung auch *in planta* eine große Bedeutung für die schnelle JA-Bildung innerhalb der Wundantwort zukommt und eine *de novo*-Synthese von OPDA erst sekundär von Bedeutung ist. Um dies zu überprüfen, müssten für die RNAi-Linien u.a. die Gehalte an membrangebundener OPDA in Form von Galactolipiden bestimmt werden. Außerdem könnten Langzeit-Fütterungsversuche von geringen Mengen markierter α -LeA und OPDA dazu beitragen, die Bildung, Inkorporation und Freisetzung der OPDA-haltigen Galactolipide zu untersuchen.

Die Mengen an JA und OPDA, die in den RNAi-Linien gebildet werden, sind scheinbar ausreichend hoch, um zu verhindern, dass charakteristische JA-Mangel-Phänotypen auftreten. So waren alle untersuchten RNAi-Linien fertil und zeigten keine Veränderungen in der Blütenmorphologie, wie sie in anderen JA-Biosynthesemutanten zu finden ist (Stintzi und Browse 2000; Park *et al.* 2002; von Malek *et al.* 2002). Eine Beeinträchtigung in anderen Prozessen, die einen schnellen Anstieg der OPDA- bzw. JA-Gehalte erfordern, ist allerdings nicht ausgeschlossen.

4.3 Die Rolle der AOC3

Die Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten (*knockouts*) sollte Aufschluss über redundante und spezifische Funktionen einzelner AOCs geben. Bislang sind nur *knockout*-Linien für *AOC1*, *AOC3* und *AOC4* verfügbar. Eine Mutante, die eine T-DNA-Insertion im stark wundresponsiven *AOC2*-Gen trägt, ist leider nicht verfügbar. Eine ausführliche molekulare und phänotypische Charakterisierung war aus zeitlichen Gründen bisher nur für den *aoc3 KO* möglich. Die Isolierung von homozygoten *aoc1 KO* und *aoc4 KO*-Pflanzen war aus bisher ungeklärten Gründen sehr schwierig und langwierig. Die Charakterisierung der homozygoten Pflanzen und die Herstellung von Doppel-*knockouts* wurde aber mittlerweile begonnen.

Die Charakterisierung des *aoc3 KO*s zeigte, dass der Verlust von *AOC3*-Transkript keine Veränderungen in der Wund- und Pathogenantwort zur Folge hatte. Auch im Seneszenzstatus der Pflanzen konnten keine Unterschiede zum WT identifiziert werden. Eine Funktion der *AOC3* in der Seneszenz wurde durch publizierte semiquantitative RT-PCR-Daten der *AOC*-Transkriptmengen nahegelegt, die eine Induktion der *AOC3*-Expression in seneszenten Blättern ergab (He *et al.* 2002). WT- und *aoc3 KO*-Pflanzen wiesen in unterschiedlich alten Blättern jedoch keine Unterschiede im Chlorophyllgehalt auf (Abb. 3.21). Da die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes nur über einen relativ kurzen Zeitraum erfolgte, sind Unterschiede zu einem späteren Zeitpunkt nicht völlig ausgeschlossen. Allerdings konnte durch die Datenbank-Expressionsanalysen ebenfalls keine spezifische Induktion der *AOC3*-Expression in seneszenten Blättern festgestellt werden (Abb. 3.7).

Überraschend war die Reduktion des Primärwurzelwachstums des *aoc3 KO*s. Diese korrelierte aber sowohl mit den *AOC*-Expressionsmustern der Datenbankanalysen (Abb.3. und 3.27) als auch mit dem Promotoraktivitätsmuster der *AOC3* (Abb. 3.3). Auch das scheinbar dominierende Vorkommen von *AOC3*-Protein in Wurzeln (Abb. 3.24) und die Kreuzungsanalysen (Abb. 3.32) schienen zunächst die Theorie zu bestätigen, dass der Verlust der *AOC3*-Funktion zu der Reduktion im Wurzelwachstum führte. Erstaunlich war daher, dass sich keine Unterschiede im OPDA und JA-Gehalt der Wurzeln finden ließen (Abb. 3.25) und auch keine Normalisierung des Phänotyps durch Applikation von OPDA oder Jasmonaten möglich war (Abb. 3.31).

Der Komplementationsversuch schließlich zeigte, dass die Reduktion im Wurzelwachstum nicht durch ein Fehlen der *AOC3* verursacht wurde. Durch die Überexpression einer *AOC3* im *aoc3 KO*-Hintergrund konnte keine Veränderung im Wurzelphänotyp ausgelöst werden. Es traten auch keine Unterschiede zwischen den Wurzellängen der zwei komplementierten Linien gegenüber den Kontrollpflanzen auf, die mit dem leeren Vektor transformiert wurden. In einem weiteren Versuch wurden die Wurzellängen der 35S:*AOC3*(Ws)-Pflanzen mit denen des *aoc3 KO*s und des WTs verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den komplementierten und den *aoc3 KO*-Wurzellängen auftraten (Daten nicht gezeigt). In beiden Fällen waren die Wurzellängen gegenüber dem WT signifikant reduziert. Unwahrscheinlich ist auch, dass die Überexpression der

AOC3 und der Verlust der *AOC3*-Expression die gleiche Reduktion im Wurzelwachstum zur Folge hat. Da eine Normalisierung der Wurzelreduktion des *aoc3 KO*s durch eine Überexpression der *AOC3* nicht erfolgte, ist nicht von einer essentiellen Funktion der *AOC3* für das Elongationswachstum der Wurzel in ungestressten Keimlingen auszugehen. Allerdings wurden die Analysen zur Wurzelentwicklung ausschließlich an ungestressten Pflanzen durchgeführt. Eine Bedeutung der *AOC3* in der Wurzel in anderen Prozessen, z.B. in Reaktion auf abiotischen oder biotischen Stress ist nicht auszuschließen. Wie bereits erwähnt könnte aufgrund des gehäuft Vorkommens von W-Box-Elementen im *AOC3*-Promotor eine Funktion der *AOC3* in der Abwehr von Wurzelpathogenen vorliegen. Dahingehende Analysen sollten jedoch mit einem anderen *aoc3 KO* (z.B. der Salk-Sammlung) durchgeführt werden. Da vermutlich eine zusätzliche Mutation im Genom des *aoc3 KO*s der UWBC-Sammlung vorliegt, die eine erhebliche Beeinträchtigung der Wurzelentwicklung verursacht, sind weitere Analysen der *AOC3*-Funktion in diesem Hintergrund nicht vorgesehen.

4.4 Potentielle Ursachen der Wurzelreduktion im *aoc3 KO*

Da der Verlust der *AOC3* als Ursache für den Wurzelphänotyp ausgeschlossen werden konnte, wurde zunächst per *Genome Walk* nach einer weiteren T-DNA-Insertion im Genom des *aoc3 KO*s gesucht. Dabei wurden lediglich Sequenzabschnitte mit Homologie zum *AOC3*-Gen erhalten (Abb. 3.35). Die Präsenz einer weiteren T-DNA im Genom ist damit sehr unwahrscheinlich, aber nicht völlig ausgeschlossen. Auch ein aktivierender Effekt der identifizierten T-DNAs auf das nachfolgende Gen (*At3g25790*), das für einen bisher nicht charakterisierten MYB-Transkriptionsfaktor kodiert, konnte anhand einer Northern Blot-Analyse ausgeschlossen werden (Abb. 3.36 C).

Damit ist eine spontane Mutation in einem bisher unbekanntem Bereich des Genoms als die wahrscheinlichste Ursache für die Veränderungen im Wurzelwachstum des *aoc3 KO*s anzusehen. Über die Lage einer solchen Mutation kann zum gegenwärtigen Stand lediglich spekuliert werden. Die Ergebnisse der Kreuzungsanalysen legen jedoch die Vermutung nahe, dass die Mutation möglicherweise in der Nähe des *AOC3*-Gens auf Chromosom 3 lokalisiert ist. In der F₂-Generation beider Kreuzungen trat der Wurzelphänotyp erneut mit der T-DNA-Insertion gekoppelt auf. Für eine eindeutige Aussage wären jedoch wiederholte Rück- oder Auskreuzungsexperimente notwendig.

Da die Gesamt-IAA-Gehalte in den Wurzeln der *aoc3 KO*-Pflanzen signifikant erhöht waren, könnte die Ursache der Reduktion im Wurzelwachstum in einer Störung der Auxinhomeostase liegen. Dabei ist unwahrscheinlich, dass die leicht verminderten Gehalte an freier IAA (Abb. 3.29 A) zu der Störung im Wurzelwachstum geführt haben, da eine Normalisierung durch Applikation von IAA und NAA nicht möglich war (Daten nicht gezeigt). In *aux1-7*, einer Auxin-Influx-Mutante, die u.a. verkürzte Wurzelhaare aufweist, konnte der Mutantenphänotyp jedoch durch

Applikation von NAA auf WT-Werte normalisiert werden (Rahman *et al.* 2002). Auch die verminderte Anzahl von Lateralwurzeln in der *aux1*-Mutante war durch NAA-Applikation normalisierbar (Marchant *et al.* 2002).

In den Gesamt-IAA-Werten sind die Mengen an freier IAA und an IAA-Konjugaten zusammengefasst. Demzufolge liegen in den *aoc3 KO*-Wurzeln signifikant erhöhte IAA-Konjugatmengen vor. IAA liegt *in planta* hauptsächlich in Form von IAA-Konjugaten vor (Cohen und Bandurski 1982; Campanella *et al.* 1996), wobei in WT-Wurzeln vermehrt IAA-Leu vorkommt und im Spross mehr IAA-Ala auftritt (Kowalczyk und Sandberg 2001). Um detaillierte Aussagen bezüglich potentieller Ursachen der Wurzelreduktion im *aoc3 KO* treffen zu können, wäre es notwendig zu wissen, welche der IAA-Konjugate in Wurzeln des *aoc3 KO*s vermehrt vorliegen. Da jedoch diesbezüglich keine Informationen zur Verfügung stehen, kann über mögliche Ursachen nur spekuliert werden.

Einige der Gene, die für Enzyme der Auxinbiosynthese oder des Auxinmetabolismus kodieren, sind auf Chromosom 3 lokalisiert. Zwei der Gene kodieren für die AUX/IAA-Proteine IAA19 und AXR2/IAA7. *Loss of function*-Mutanten dieser Gene zeigen jedoch nicht den gleichen Wurzelphänotyp wie der *aoc3 KO*. Während die IAA19-Mutante (*msg2*) keine Lateralwurzeln bildet (Tatematsu *et al.* 2004), zeigt *axr2-5* keine Veränderungen in der Wurzelentwicklung (Nagpal *et al.* 2000). Zwei weitere Gene kodieren für die Nitrilasen NIT1 (*At3g44310*) und NIT2 (*At3g44300*), die beide die Umwandlung von Indol-3-acetonitril (IAN) zu freier IAA katalysieren können. *TSA1/TRP3* (*At3g15540*) kodiert für die Tryptophansynthase α -Untereinheit und *TIR1* (*At3g62980*) kodiert für ein F-Box-Protein, das als Auxinrezeptor fungiert und u.a. den Abbau von AUX/IAA-Proteinen vermittelt (Dharmasiri *et al.* 2005; Kepinski und Leyser 2005). Die Mutante *tir1* ist jedoch resistent gegenüber dem wurzelwachstumshemmenden Effekt von IAA (Ruegger *et al.* 1998), was im *aoc3 KO* nicht der Fall war (Daten nicht gezeigt).

Mit *ILR1* (*At3g02875*) und *ILR2* (*At3g18485*) liegen zwei weitere Gene auf Chromosom 3, deren Genprodukte am IAA-Konjugatmetabolismus beteiligt sind. Mutanten beider Gene (*ilr1* und *ilr2-1*) sind u.a. resistent gegenüber dem wachstumshemmenden Effekt von IAA-Leu, zeigen aber verkürzte Wurzeln nach IAA-Applikation (Bartel und Fink 1995; Magidin *et al.* 2003). *Ilr1*, die in einer IAA-Amidohydrolase defekt ist, zeigt jedoch keinen Wurzelphänotyp im unbehandelten Zustand. Unbehandelte *ilr2-1*-Pflanzen haben genau wie *aoc3 KO*-Keimlinge kürzere Wurzeln als der WT und die Reaktion auf eine IAA-Behandlung entsprach der des WT. Allerdings bilden *ilr2-1*-Pflanzen weniger Lateralwurzeln aus als der WT. Dies konnte auch für den *aoc3 KO* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), trat allerdings nach den Kreuzungen mit WT-Pflanzen nicht mehr auf. Daher wurde dieses Merkmal nicht dem Verlust der *AOC3* zugesprochen und auch nicht weiter untersucht. *ILR2* ist ein Protein, das weder eine Homologie zu Amidohydrolasen oder Transportern noch zu anderen bekannten Proteinen aufweist. Es ist vermutlich im Cytoplasma

lokalisiert und eine putative Funktion in der Modulation von Metalltransportern wurde postuliert (Magidin *et al.* 2003).

Aufgrund der Übereinstimmung des Wurzelphänotyps und der Nähe der beiden Loci zueinander wäre eine Mutation im *ILR2*-Gen des *aoc3 KO*s als Ursache der reduzierten Wurzellänge möglich. Um dies zu überprüfen, sollte sowohl die Expression als auch die Sequenz von *ILR2* im *aoc3 KO* überprüft werden. Weiterhin sollte die Wurzelentwicklung des *aoc3 KO*s in Reaktion auf eine Applikation von IAA-Leu überprüft werden. Eine Kreuzung von *aoc3 KO*- und *ilr2-1*-Pflanzen könnte Aussagen darüber ermöglichen, ob die Ursache des Wurzelphänotyps des *aoc3 KO*s ein *ilr2*-Allel ist.

4.5 Redundante und nicht-redundante Expression der AOCs

4.5.1 Einfluss abiotischer Faktoren

Der Nachweis bekannter *cis*-Elementsequenzen in den *AOC*-Promotoren ermöglichte die Identifizierung von Faktoren, die potentiell an der Regulation der *AOC*-Expression beteiligt sind. Darunter waren viele Elemente, deren Funktion u.a. in der Lichtregulation und in der Vermittlung von abiotischem Stress belegt ist.

Aussagen über eine differentielle lichtabhängige Regulation der *AOC*-Gene ist anhand dieser Daten jedoch nicht möglich, da die Präsenz einzelner *cis*-Elemente nicht zwingend mit einer tatsächlichen Regulation der Expression durch Licht verknüpft ist. Die Funktion von Lichtelementen ist vielmehr abhängig von Art, Anzahl und Lokalisation der Signalsequenzen zueinander (Guilfoyle 1997). Prinzipiell erscheint ein Einfluss von Licht auf die *AOC*-Expression jedoch als wahrscheinlich, da dies bereits für eine *AOS* (*OsAOS1*) aus Reis demonstriert werden konnte. Demnach scheint die Lichtregulation der *OsAOS1*-Expression in Keimlingen in Abhängigkeit von Phytochrom A zu erfolgen (Haga und Iino 2004). Es wurde postuliert, dass die lichtinduzierte JA-Generierung zur phytochromvermittelten Inhibierung des Keimlingswachstums beiträgt. Für die Expression eines weiteren *AOS*-Gens aus Reis konnte ein additiver Effekt der Induktion durch Verwundung und Licht nachgewiesen werden (Agrawal *et al.* 2002). Eine Lichtregulation der Expression der *AOC*s aus *Arabidopsis* wird auch durch Expressionsanalysen von Phytochrommutanten unterstützt, die in der Arbeitsgruppe durchgeführt wurden (Schumann, persönliche Mitteilung).

In allen Promotoren konnten zahlreiche Elemente identifiziert werden, die in Zusammenhang mit Trockenstress und ABA stehen (Tab. 3.1 und 3.2). Die Reaktion auf Trockenstress wird wesentlich durch ABA vermittelt und Überschneidungen zwischen ABA- und JA-vermittelten Prozessen sind bereits in verschiedenen Systemen beschrieben worden. So werden in Reaktion auf Trockenstress nicht nur ABA-responsive Gene vermehrt exprimiert, sondern auch Transkripte von JA-responsiven Genen treten signifikant vermehrt auf (Ozturk *et al.* 2002). Weiterhin werden einige Gene synergistisch durch ABA und JA reguliert. Dies konnte beispielsweise für ein Dehydrin-Gen

aus *Picea glauca* gezeigt werden, dessen Expression sowohl durch Kälte und Trockenheit als auch durch ABA und Jasmonate induziert wird (Richard *et al.* 2000). Die ABA-induzierte Expression von *OsLEA3* in Reiszurzelwurzeln hingegen wird durch JA negativ reguliert und ist damit ein Beispiel für die antagonistische Vernetzung von ABA und JA (Moons *et al.* 1997).

Ein Einfluss von ABA auf die *AOC*-Expression wird auch durch die Analyse der *AOC*-Promotoraktivitäten gestützt. Die Applikation von ABA führte zu einer starken Induktion der *AOC*-Promotoraktivität im Hypokotyl und in den Kotyledonen (Abb.3.6). Dies war besonders deutlich für die Promotoren der *AOC1* und der *AOC4* zu sehen. Im Fall der *AOC4* wurde dabei auch die Gewebsspezifität in den oberirdischen Pflanzenteilen durchbrochen. In unbehandelten Pflanzen war hier nur in Leitgeweben Promotoraktivität nachweisbar. Nach ABA-Behandlung hingegen trat eine starke Aktivität im Bereich des Übergangs vom Hypokotyl in die Wurzel auf und auch das restliche Hypokotyl und die Kotyledonen wiesen eine Aktivierung des *AOC4*-Promotors auf.

Die applizierte ABA-Konzentration führte jedoch zu einer drastischen Hemmung der Keimlingsentwicklung. Daher wären Applikationsversuche mit geringeren Konzentrationen angebracht, um sicherzustellen, dass die Veränderungen der Promotoraktivität ABA-induziert sind und nicht indirekt durch die Wachstumshemmung ausgelöst wurden.

4.5.2 Einfluss biotischer Faktoren

Die Reaktionen auf Pathogeninfektionen sowie auf Verwundung durch Herbivoren werden wesentlich durch Jasmonate, Ethylen, Salicylsäure und auch ABA vermittelt (Abb. 1.3). Einige daran beteiligten Transkriptionsfaktoren sowie die korrespondierenden *cis*-Elemente wurden in verschiedenen Pflanzenspezies identifiziert. Davon konnten manche Signalsequenzen in den 1500 bp-Abschnitten der *AOC*-Promotoren identifiziert werden. So kamen diverse Elemente vor, deren Funktion in Abwehrprozessen belegt ist. Darunter fanden sich beispielsweise Signalsequenzen, die von MYB- bzw. WRKY-Transkriptionsfaktoren genutzt werden. Die Expression vieler Gene, die für Transkriptionsfaktoren einer dieser beiden Klassen kodieren, wird durch JA bzw. *A. brassicicola*-Infektion signifikant verändert (McGrath *et al.* 2005). Pathogeninfektion und SA-Applikation führt zudem zu einem Anstieg der Transkriptmengen vieler *WRKY*-Gene (Chen und Chen 2000).

In der Pathogenantwort wird die Reaktion auf nekrotrophe Erreger hauptsächlich durch den ET/JA-Signalweg vermittelt, während die Abwehr biotropher Pathogene primär über den SA-Weg erfolgt (Glazebrook 2005b). Beide Signalwege beeinflussen sich antagonistisch, wobei diese Vernetzung der Signalwege wesentlich durch Transkriptionsfaktoren vermittelt wird (Abb. 1.3). *WRKY70* stellt einen solchen „Knotenpunkt“ in der antagonistischen Vernetzung der JA/ET- und SA-Signalwege dar. Während die Expression SA-induzierbarer Gene (z.B. PR-Gene) durch *WRKY70* induziert wird, werden die JA-responsiven Gene *VSP* und *PDF1.2* negativ reguliert (Li *et al.* 2004).

WRKY-Faktoren nutzen W-Box-Signalsequenzen zur Regulation der Promotoraktivität. Diese Signalsequenzen treten vermehrt in Promotoren von 26 untersuchten SA- bzw. pathogenregulierten Genen auf. Hier liegen durchschnittlich 4,3 W-Box-Elemente vor, wohingegen in willkürlich ausgewählten Genen durchschnittlich weniger als zwei W-Box-Elemente auftreten (Maleck *et al.* 2000). Im Promotor der *AOC3* konnten wesentlich mehr W-Box-Elemente identifiziert werden als in den anderen *AOC*-Promotoren (Tab.3.1). Dies könnte auf eine bevorzugte Funktion der *AOC3* in der Pathogenantwort hindeuten. Sollte die *AOC3* an der Bereitstellung von JA für den JA/ET-Signalweg nach Infektion mit nekrotrophen Pathogenen beteiligt sein, wäre eine Repression der *AOC3*-Expression nach Infektion mit biotrophen Pathogenen sinnvoll. Dies könnte u.a. über SA-induzierte WRKYs vermittelt werden. Unter den Genen, die eine Co-Expression mit der *AOC3* aufweisen, befand sich an Position 20 auch ein WRKY-kodierendes Gen (WRKY40; Daten in Tab 3.4. nur bis Position 12 gezeigt). Mit einem r-Wert von 0,843 war hier der Grad der Korrelation sogar höher als beispielsweise zwischen den Expressionsmustern von *AOC1*⁺ und *OPR3* (Tab. 3.4). Eine Infektion der *AOC*_{prom:}*uidA*-Pflanzen mit *A. brassicicola* führte zu einer starken lokalen Induktion der *AOC3*-Promotoraktivität an den Inokulationsstellen im Blatt (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte im WT kein pathogeninduzierter Anstieg der *AOC3*-Transkriptmengen verzeichnet werden und die *aoc3 KO*-Pflanzen zeigten keine Veränderungen in der Reaktion auf die Infektion mit *A. brassicicola* (Daten nicht gezeigt). Daher scheint eine spezifische Funktion der *AOC3* in der Pathogenantwort im Blatt eher unwahrscheinlich.

Ein spezifischer Nachweis des *AOC3*-Proteins in unterschiedlichen Geweben war durch den zur Verfügung stehenden anti-*AOC2*-Antikörper nicht möglich, weil dieser immunreaktiv gegenüber allen vier *AOCs* ist (Stenzel *et al.* 2003b). Da in den Wurzeln des *aoc3 KO*s kein *AOC*-Protein mehr nachgewiesen werden konnte, kann man aber davon ausgehen, dass es sich bei dem in WT-Wurzeln detektierten *AOC*-Protein hauptsächlich um *AOC3*-Protein handelt (Abb. 3.24). Daher könnte eine spezifische Funktion der *AOC3* in der Abwehr von Wurzelpathogenen vorliegen. Dies kann anhand der Reaktion auf Infektion mit nekrotrophen Wurzelpathogenen wie beispielsweise *Fusarium oxysporum* untersucht werden. Diese Analysen sind vorgesehen, sobald die molekulare Charakterisierung einer Salk-*AOC3*-T-DNA-Insertionslinie abgeschlossen ist. Die Funktion der W-Box-Elemente im *AOC3*-Promotor könnten zudem durch Applikation von SA bzw. durch Infektion mit biotrophen Pathogenen untersucht werden. Sollten die W-Box-Signalsequenzen von SA-induzierten WRKYs zur Repression der *AOC3*-Expression genutzt werden, sollte sich dies in der *AOC3*-Transkriptmenge widerspiegeln.

In den Promotoren von *AOC1*, *AOC2* und *AOC3* konnten auch G-Box bzw. G-Box-like (= T/G-Box) Signalsequenzen identifiziert werden (Tab. 3.2). Diese dienen als Erkennungssequenzen für MYC-Transkriptionsfaktoren, deren Beteiligung an der JA-Signaltransduktion sowohl in Arabidopsis als auch in Tomate nachgewiesen wurde (Boter *et al.* 2004). So ergab die Charakterisierung der JA-insensitiven Arabidopsis-Mutante *jin1*, dass AtMYC2 an der Repression

von Abwehrgenen und an der JA-vermittelten Induktion von wundresponsiven Genen beteiligt ist (Lorenzo *et al.* 2004). Antagonistisch dazu induziert ERF1 die Expression von Abwehrgenen, wobei wundresponsive Gene reprimiert werden (Lorenzo *et al.* 2003). ERF1 gehört zur Familie der AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren. Sowohl JA-Applikation als auch eine Infektion mit *A. brassicicola* induziert bevorzugt Gene dieser Transkriptionsfaktorfamilie und legt damit eine essentielle Funktion dieser Faktoren im JA-Signalweg nahe (McGrath *et al.* 2005). Die Beteiligung von AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren an jasmonatinduzierten Prozessen wurde erstmals in Zellsuspensionskulturen von *Catharanthus roseus* nachgewiesen. Mit den als ORCAs bezeichneten Proteinen waren die ersten Transkriptionsfaktoren des JA-Signalwegs identifiziert (Menke *et al.* 1999a; van der Fits und Memelink 2000). In Arabidopsis konnten ebenfalls diverse JA-induzierbare AP2/ERF-Proteine identifiziert werden, die als ORAs bezeichnet wurden (Atallah 2005) und deren Beteiligung an verschiedenen JA-induzierten Prozessen belegt werden konnte (Pré 2006).

In verschiedenen Systemen konnte gezeigt werden, dass die AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren bevorzugt an GCC-Box- bzw. GCC-Box-like-Elemente binden (Menke *et al.* 1999a; Fujimoto *et al.* 2000; van der Fits und Memelink 2001; Zhang *et al.* 2004). Bekannte Vertreter dieser *cis*-Elementsequenzen konnten jedoch nicht innerhalb der 1500 bp der AOC-Promotoren lokalisiert werden. Die Expression der AOC-Gene ist aber durch Jasmonate induzierbar und es wurde gezeigt, dass der AP2/ERF-Transkriptionsfaktor ORA47 COI1-abhängig an der Kontrolle der Expression von JA-Biosynthesegenen (insbesondere AOS und AOC) beteiligt ist und so zur positiven *feedback*-Regulation beiträgt (Pré 2006). Das Fehlen klassischer GCC-Box-Signalsequenzen könnte bedeuten, dass diese Regulation über bisher nicht charakterisierte GCC-Elemente oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren verläuft.

Teilweise können auch andere Signalsequenzen wie z.B. DRE-Elemente von JA-induzierbaren AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren genutzt werden. Dies wurde beispielsweise für JERF1 aus Tomate gezeigt (Zhang *et al.* 2004) und für PTi4 postuliert (Chakravarthy *et al.* 2003). Auch für die Regulation der *PDF1.2*-Expression in Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass neben der GCC-Box weitere Elemente für die JA-Induzierbarkeit erforderlich sind. Durch Mutation oder Deletion der GCC-Box kam es hier zwar zu einer deutlichen Verringerung, nicht jedoch zum völligen Erliegen der JA-induzierten Expression (Brown *et al.* 2003).

4.5.3 Gewebsspezifität

Neben der potentiellen Rolle der biotischen und abiotischen Faktoren scheint die Expression der AOCs sehr stark gewebsspezifisch reguliert zu sein. Dies wird sowohl durch die Analyse der Promotoraktivitäten als auch durch die Expressionsdaten belegt. So zeigten beispielsweise die *Gene Atlas*-Daten lediglich Expression für *AOC3* und *AOC4* in Wurzelgeweben. Korrespondierend dazu konnte in Wurzeln auch nur Promotoraktivität dieser beiden AOCs festgestellt werden (Abb. 3.3). Es traten jedoch Unterschiede im Vergleich der Expressionsdaten des *Gene Atlas* (*Genevestigator*)

und der AREX-Datenbank auf. Während die Expression von *AOC3* und *AOC4* in Wurzeln im *Gene Atlas* als etwa gleichstark angegeben wird (Abb. 3.8), zeigen die AREX-Daten eine wesentlich höhere Transkriptmenge für *AOC3* an (Abb. 3.27). Beide Datenbanken fassen Expressionsdaten aus unterschiedlichen Microarray-Experimenten zusammen. Die Genevestigator-Datenbank umfasst dabei ein sehr breites Spektrum an Expressionsdaten aus unterschiedlichsten Experimenten verschiedener Gewebe und Applikationen. AREX hingegen beinhaltet nur Expressionsdaten der Arabidopsis-Wurzel. Daher sind die AREX-Daten zur *AOC*-Expression in Wurzeln als wahrscheinlicher anzusehen. Dies wird zudem durch die Western Blot-Analysen des *aoc3 KO*s belegt. Durch den Verlust an *AOC3*-Transkript konnte auch kein AOC-Protein in den Wurzeln mehr nachgewiesen werden (Abb. 3.24). Zwar weist der anti-AtAOC2-Antikörper eine wesentlich geringere Affinität gegenüber der *AOC4* auf (Stenzel *et al.* 2003b), allerdings sollten bei gleichstarker Expression der *AOC3* und *AOC4* zumindest noch geringe *AOC4*-Proteinmengen nachweisbar sein.

Weitere Widersprüche zwischen der Promotoraktivität und der Expression einzelner *AOCs* trat in Infloreszenzen auf. Die Notwendigkeit der JA-Bildung für die Blütenentwicklung, insbesondere der Koordination von Stamen- und Karpell-Elongation, wurde durch die Charakterisierung von JA-Mangelmutanten belegt (Stintzi und Browse 2000; Ishiguro *et al.* 2001; Park *et al.* 2002). Die Erstellung eines stamenspezifischen Expressionsprofils hat zudem die Identifikation molekularer Komponenten des Jasmonat-Signalweges in der Regulation der Stamenentwicklung ermöglicht (Mandaokar *et al.* 2006). Von besonderer Bedeutung ist dabei der JA-induzierbare MYB-Transkriptionsfaktor MYB21. Während der vegetative Zustand von Pflanzen einer korrespondierenden T-DNA-Insertionsmutante (*myb21-1*) keine phänotypischen Veränderungen zeigt, weisen die Blüten den typischen männlich sterilen JA-Mangelphänotyp durch verkürzte Filamente und verzögerte Antherendehiszenz auf. In der Doppel-*knockout*-Mutante *myb21-1 myb24-1* wird dieser Phänotyp durch den zusätzlichen Verlust von MYB24 noch verstärkt, obwohl der alleinige Verlust von MYB24 (*myb24-1*) keine phänotypischen Veränderung zur Folge hat (Mandaokar *et al.* 2006). Mit MYB21 und MYB24 konnten blütenspezifische Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die teilweise überlappend an der JA-vermittelten Regulation der Blütenentwicklung beteiligt sind.

Die Daten zur überlappenden oder spezifischen Regulation der *AOC*-Gene widersprachen sich teilweise. Die *Gene Atlas*-Daten zeigen eine dominierende Expression der *AOC4* in nahezu allen Blütengeweben. Lediglich in den Kelchblättern war die Expression für *AOC1* und *AOC4* annähernd gleich hoch (Abb. 3.8). Bei der Charakterisierung der *AOC_{Prom:uidA}*-Pflanzen konnte auch in anderen Blütengeweben *AOC1*-Promotoraktivität detektiert werden. Der Promotor der *AOC1* zeigte starke Aktivität in den Kelchblättern, dem Stigma, den Filamenten und Antheren. Auch in isoliertem Pollen konnte spezifisch für die *AOC1* Promotoraktivität nachgewiesen werden. Teilweise überlagern sich in der Blüte die Promotoraktivitätsmuster von *AOC1* und *AOC4*. Auch

der *AOC4*-Promotor wies starke Aktivität in den Kelchblättern, dem Stigma und den Filamenten auf. In den Antheren war nur wenig *AOC4*-Promotoraktivität nachweisbar und auch im Pollen trat nur vereinzelt eine Aktivität des *AOC4*-Promotors auf. Im Pedicel konnte nur *AOC4*-Promotoraktivität nachgewiesen werden. Dieses präferentielle Vorkommen von *AOC4*-Transkript im Pedicel konnte auch durch *in situ*-Hybridisierung bestätigt werden (Abb 3.2 B) und stimmt auch mit den *Gene Atlas*-Daten überein. In einer gewebsspezifischen Analyse der *AOC*-Expression durch Northern Blots wurde gezeigt, dass in Blüten präferentiell *AOC4* exprimiert wird, aber auch *AOC1*-Transkript nachgewiesen werden konnte (Stenzel, persönliche Mitteilung). Aufgrund des relativ hohen Bedarfs an Material für diese Analysen wurden die entsprechenden Gewebe über einen längeren Zeitraum gesammelt und die Pflanzen waren wiederholt einer Verwundung ausgesetzt. Um eine mögliche Verfälschung der Expressionsdaten durch die Wundinduktion auszuschließen, wäre es daher sinnvoll, die Expressionsdaten durch eine weniger materialintensive Methode (z.B. qRT-PCR) erneut zu überprüfen.

Weiterhin traten auch widersprüchliche Ergebnisse für die *AOC*-Expression in Rosettenblättern auf. Hier wurde eine nahezu konstitutive Promotoraktivität für *AOC1* und *AOC2* festgestellt. Diese wird jedoch nur ansatzweise durch die im *Gene Atlas* angegebene hohe Expression für *AOC1*⁺ gestützt. Interpretationen auf Grundlage dieser Daten sind jedoch schwierig, da hier nicht zwischen den *AOC1*- und dem *AOC2*-Transkripten differenziert werden kann. In Northern Blot-Analysen konnten die *AOC*-Transkripte jedoch in unverwundeten Blättern kaum nachgewiesen werden. Dies war erst nach Verwundung oder JAME-Applikation möglich.

Die Unterschiede, die zwischen den teilweise hohen Promotoraktivitäten und den tatsächlich nachgewiesenen Transkriptmengen auftraten, könnten verschiedene Ursachen haben. Zum einen erfolgt der Nachweis der Promotoraktivität über die Aktivität des gebildeten GUS-Proteins, das möglicherweise eine andere Stabilität aufweist als eine gebildete *AOC*-mRNA. Dies könnte jedoch durch Northern Blot-Analysen der *uidA*-Expression in den *AOC*_{Prom:}*uidA*-Linien überprüft werden. Außerdem ist nicht völlig auszuschließen, dass sich außerhalb der klonierten Promotorsequenzen weitere regulatorisch relevante Sequenzabschnitte befinden.

Eine weitere Ursache für die teilweise unterschiedlichen Daten könnte in einer posttranskriptionellen Regulation der *AOC*-Transkriptabundanz liegen. Beispielsweise könnten die *AOC*-Transkriptmengen in Blättern über miRNAs oder endogene siRNAs reguliert werden. Dies würde auch erklären, warum es in den komplementierten *aoc3 KO*-Pflanzen zwar zu einem drastischen Anstieg der *AOC*-Proteinmenge in Wurzeln kam, in Blättern jedoch kein vermehrtes *AOC*-Proteinvorkommen vorlag (Abb. 3.35). Bisher stehen jedoch so gut wie keine experimentellen Belege zur Verfügung, die eine solche posttranskriptionelle Regulation der *AOCs* oder anderer JA-Biosynthesegene nachweisen. Die *AOC*-Expressiondaten, die durch die *Genevestigator*-Datenbank (*Response Viewer*) zur Verfügung stehen, geben erste Hinweise auf

eine unterschiedliche posttranskriptionelle Kontrolle der *AOC*-Transkriptmengen. Nach Cycloheximid-Behandlung (3 h) stieg die *AOC3*-Expression auf das 37-fache an, wohingegen die *AOC4*-Transkriptmenge auf das 0,18-fache sank und die *AOC1*⁺-Expression mit einem Anstieg um das 1,7-fache nahezu unverändert blieb (www.genevestigator.ethz.ch/).

Die Bedeutung der gewebsspezifischen Expression der *AOCs* wird auch durch die Applikationsexperimente an Wurzeln verdeutlicht. So konnte die Promotoraktivität von *AOC3* und *AOC4* durch die Applikation von JAME wesentlich verstärkt werden. Für *AOC1* und *AOC2* jedoch konnte die Behandlung mit 10 µM JAME keinerlei Promotoraktivität in den Wurzeln induzieren (Abb. 3.4). In Blättern hingegen führte die JAME-Behandlung zu einer Verstärkung der Promotoraktivität in Keimlingen. Auch auf Expressionsebene konnte gezeigt werden, dass eine JAME-Applikation an älteren Rosettenblättern zu einem Anstieg der Transkriptmengen von *AOC1* und *AOC2* führt (Abb. 3.18). Offensichtlich sind Jasmonate lediglich in der Lage, die Expression eines *AOC*-Gens zu verstärken, heben aber die Gewebsspezifität der Expression nicht prinzipiell auf. In Übereinstimmung damit konnte für *FAD7* gezeigt werden, dass in Wurzeln und Blättern jeweils distinkte Promotorbereiche die wund- und JA-induzierte Expression regulieren (Nishiuchi *et al.* 1999).

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich auch für die Expression bekannter JA-responsiver Gene. Von den jasmonat- und wundinduzierbaren Genen *HEL*, *VSP*, *THI2.1* und *PDF1.2* wurde lediglich für *HEL* eine Expression in Wurzeln nachgewiesen (Abb. 3.27). In Übereinstimmung damit zeigten die Experimente zum lokalen JA-Nachweis in Wurzeln, dass sich die Promotoren von *VSP1* und *THI2.1* in der Wurzel durch hohe Konzentrationen von JAME nicht aktivieren lassen (Abb. 3.27). Dies widerspricht teilweise den Daten zur *VSP*-Expression in Keimlingen und in 4 - 6 Wochen alten Pflanzen (Berger *et al.* 1995). Hier traten in unverwundeten Pflanzen nur in Knospen und Blüten große Mengen an *VSP*-Transkript auf. Auch hier war weder in den Wurzeln von Keimlingen, noch in Wurzeln älterer Pflanzen *VSP*-Expression nachweisbar. Erst nach Verwundung oder JAME-Applikation kam es sowohl in Blättern als auch in Wurzeln zur Expression von *VSP* (Berger *et al.* 1995).

Auch die Analyse der JA-induzierbaren Genexpression in Stamen konnte die Gewebsspezifität der Expression JA-responsiver Gene bestätigen. Von den 1296 identifizierten Genen, die in Stamen spezifisch durch JA reguliert werden, sind weniger als 13 % bekannte oder putative Abwehrgene, die in Zusammenhang mit Herbivorbefall und Pilzinfektionen stehen (Mandaokar *et al.* 2006).

Eine Expression des im Blatt JA- und wundresponsiven *LOX2*-Gens (Bell *et al.* 1995) wurde ebenfalls nicht in Wurzeln nachgewiesen. Dafür konnten in Wurzelgeweben Transkripte der Gene *LOX3* und *LOX4* detektiert werden, die für 13-LOX-Enzyme kodieren (Abb. 3.27). Beide Gene werden ebenso wie die *AOC3* präferentiell in der Elongationszone exprimiert (Abb. 3.28). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Co-Expressionsanalyse überein. Dabei trat eine generelle

Übereinstimmungen der Expressionsmuster von *AOC3* und *LOX3* bzw. *AOC1*⁺ und *LOX2* auf (Tab. 3.4). Dies deutet auf eine organspezifische Funktion unterschiedlicher LOX- und AOC-Enzyme hin (*LOX3/AOC3* in Wurzeln; *LOX2* und *AOC1/AOC2* im Blatt).

In den *AOC*-Promotoren konnten nur wenige bekannte *cis*-Elemente identifiziert werden, die Hinweise auf die gewebsspezifische Regulation der *AOC*-Expression geben. Unter den Signalsequenzen, die in Zusammenhang mit einer gewebs- oder organellspezifischen Regulation stehen, fanden sich primär samenspezifische Elemente (Tab. 3.2 und 3.3). In den *AOC*_{Prom:}*uidA*-Linien war jedoch während der gesamten Entwicklung für keine der *AOCs* GUS-Aktivität in den Samen nachweisbar. Samenspezifische *cis*-Elemente könnten jedoch auch an der Repression der *AOC*-Expression beteiligt sein und somit eine Jasmonatbildung verhindern. Dies erscheint sinnvoll, da bereits frühzeitig die keimungshemmende Wirkung von Jasmonaten beschrieben wurde (Corbineau *et al.* 1988).

4.5.4 Vernetzung mit Signalwegen anderer Phytohormone

Auch eine Beteiligung anderer Phytohormone an der Regulation der *AOC*-Gene ist anzunehmen. Die komplexe Vernetzung von Signalwegen verschiedener Phytohormone mit dem Jasmonat-Signalweg konnte in unterschiedlichen Prozessen belegt werden. Neben der bereits beschriebenen antagonistischen Vernetzung der SA- und JA/ET-Signalwege in der Reaktion auf verschiedene Pathogene konnten zahlreiche weitere „Überschneidungen“ mit anderen Phytohormonen in einer Vielzahl von Prozessen nachgewiesen werden. Die Vernetzung von Signalwegen kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen (Abb. 1.3 und Abb. 4.1 B). Beispielsweise konnte durch die Charakterisierung der *cev1*-Mutante der Nachweis erbracht werden, dass sowohl die Bildung von Ethylen als auch die JA-Biosynthese gleichermaßen durch Zellwandbestandteile beeinflusst wird (Ellis und Turner 2001). Die ubiquitinvermittelte Proteolyse ist essentiell für die Signaltransduktion vieler phytohormoninduzierter Prozesse. Daher zeigen Mutanten mit Defekten in der Bildung funktionaler SCF-Komplexe oft Beeinträchtigungen in Signalwegen verschiedener Phytohormone. So ist eine *axr1*-Mutante (*axr1-24*) u.a. in den Signalwegen von Auxin, JA und ET beeinträchtigt (Tiryaki und Staswick 2002). Auch auf Ebene der Transkriptionsfaktoren besteht ein komplexes Netzwerk synergistischer und antagonistischer Wechselwirkungen verschiedener hormoneller Signalwege (Abb. 1.3 und Abb. 4.1 B). In den *AOC*-Promotoren finden sich zahlreiche Signalsequenzen, die in Zusammenhang mit einer Regulation durch Phytohormone stehen (Tab. 3.2).

Die Applikation verschiedener Phytohormone hatte jedoch in den verwendeten Konzentrationen nur geringfügige Veränderungen der *AOC*-Promotoraktivitäten zur Folge. Nur die Applikation von ABA führte zu den bereits beschriebenen Veränderungen in den gewebsspezifischen Promotoraktivitäten (Abb. 3.6 und Abb. 4.1 A). In den meisten Fällen wurden die Phytohormone in relativ niedrigen Konzentrationsbereichen eingesetzt, für die eine stimulierende Wirkung auf das Elongationswachstum der Wurzel nachgewiesen wurde (Müssig *et al.* 2003).

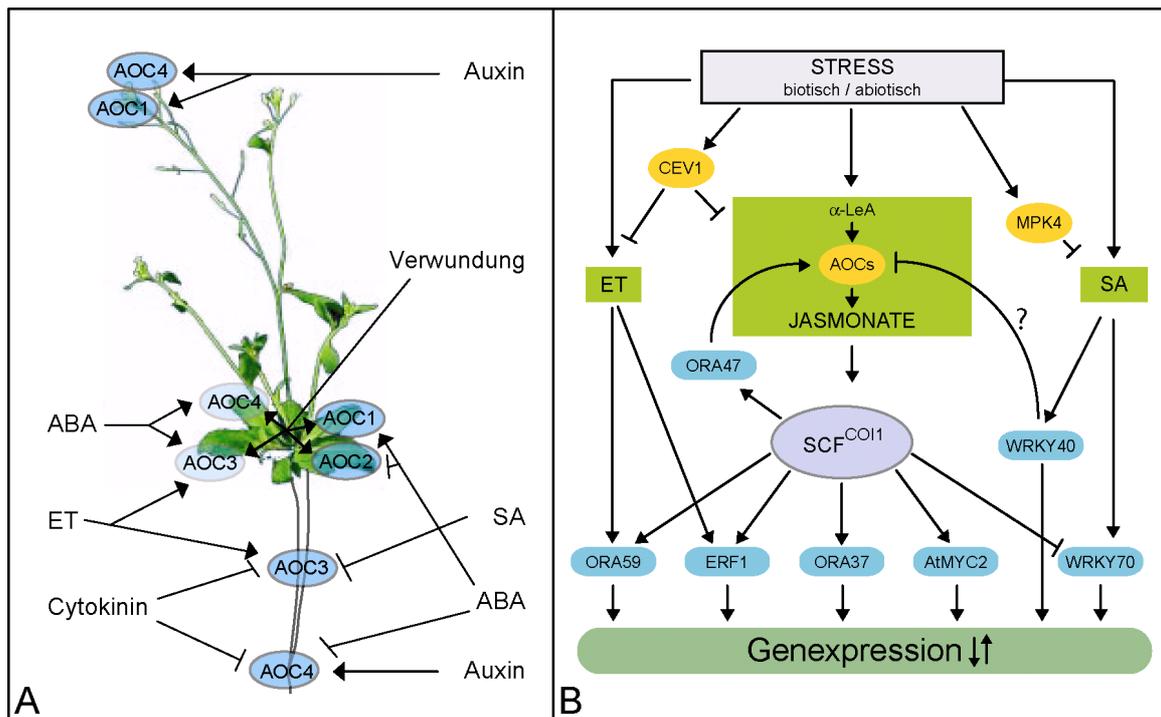


Abb. 4.1: Vernetzung mit Signalwegen anderer Phytohormone

Gewebsspezifischer Einfluss verschiedener Phytohormone auf die AOC-Promotoraktivitäten (A) basierend auf den Daten der AOC_{prom::uidA}-Linien. Nagpal *et al.* (2005) konnten die Auxinabhängigkeit der JA-Bildung in Blüten belegen. Daher wird hier ein Einfluss von Auxin auf die Expression von AOC1 und AOC4 postuliert. Die Vernetzung von Signalwegen verschiedener Phytohormone wird u.a. durch Transkriptionsfaktoren realisiert (B; verändert nach Lorenzo und Solano 2005 und Pré 2006). Die Beteiligung von ORA47 an der positiven *feedback*-Regulation der JA-Biosynthese konnte anhand von Überexpressionslinien belegt werden (Pré 2006). Eine potentielle Beteiligung von WRKY40 an der Regulation der AOC-Expression (insbesondere der AOC3) basiert auf Datenbankanalysen und ist bisher nicht funktional belegt.

Dieser Effekt konnte für keines der verwendeten Phytohormone beobachtet werden. Allerdings wurden in den Experimenten von Müssig *et al.* (2003) wesentlich höhere Saccharosekonzentrationen im Medium verwendet. In den eigenen Arbeiten wurden nur 0,15 % Saccharose im Medium eingesetzt, da höhere Konzentrationen die Promotoraktivität der AOCs induziert. Da Zucker über ein eigenes Signalpotential verfügen (Smeekens 2000), könnten die Unterschiede im beobachteten Wachstumsverhalten durch die Anzuchtbedingungen verursacht worden sein.

Die Aktivität des AOC3-Promotors wurde durch Behandlung mit 500 nM ACC deutlich verstärkt. Da JA und ET synergistisch in der Pathogenantwort agieren (Penninckx *et al.* 1998), kann die spezifische Induktion der AOC3-Promotoraktivität durch ACC als ein weiterer Hinweis auf eine Funktion der AOC3 in der Pathogenantwort gewertet werden.

Nach der Applikation von 1 µM Zeatin trat nahezu keine AOC-Promotoraktivität in der Wurzel mehr auf. Lediglich für den Promotor der AOC4 konnte noch Aktivität in der Wurzelspitze nachgewiesen werden. Die Behandlung mit TIBA führte zu einer Induktion der AOC4-Promotoraktivität in der Wurzel (Abb. 3.5). TIBA ist ein Inhibitor des polaren Auxintransports

(PAT). Da viele auxinkontrollierte Prozesse von der Etablierung eines Auxingradienten abhängig sind, kommt es daher nach TIBA-Applikation zu entwicklungsphysiologischen Veränderungen wie beispielsweise dem Verlust gravitroper Wachstumsreaktionen. In Keimlingen erfolgt u.a. ein acropetaler Auxintransport über die Leitgewebe vom Spross in die Wurzeln. Verschiedene Bereiche der Wurzel haben allerdings ebenfalls die Kapazität zur Auxinbiosynthese. Dies gilt insbesondere für den meristematischen Bereich der Wurzelspitze. Durch die Applikation des PAT-Inhibitors NPA konnte gezeigt werden, dass es die Inhibierung des basipetalen Auxintransports zu einer IAA-Akkumulation in der Wurzelspitze führt (Casimiro *et al.* 2003; Ljung *et al.* 2005).

Auxin, Cytokinin und Ethylen sind in der Wurzel an der Induktion der Lateralwurzelbildung beteiligt (Aloni *et al.* 2006). Da auch die Behandlung mit Jasmonaten zur vermehrten Bildung von Lateralwurzeln führt, ist eine Beteiligung der Jasmonate innerhalb dieser regulatorischen Vernetzung von Auxin, Cytokinin und Ethylen vorstellbar.

Eine Vernetzung der Wirkung von Auxin und Jasmonaten ist u.a. bereits für gravitrope Wachstumsreaktionen in Haferkoleoptilen beschrieben worden (Gutjahr *et al.* 2005). Auch die Regulation der Blütenentwicklung ist sowohl auxin- als auch jasmonatabhängig. Nagpal *et al.* (2005) konnten nachweisen, dass die für die Filamentelongation notwendige JA-Bildung dosisabhängig von ARF6 und ARF8 reguliert wird. In *arf6-2/arf8-3*-Doppelmutanten lagen die Jasmonat-Gehalte der Blüten im Gegensatz zum WT unterhalb der Nachweisgrenze und die zeitliche Koordination der Elongation von Karpell und Filamenten zum Zeitpunkt der Antherendehiszenz war beeinträchtigt. Dies konnte auf eine verminderte Zellexpansion zurückgeführt werden (Nagpal *et al.* 2005). Die essentielle Rolle von Jasmonaten für die Elongation und Dehiszenz der Antheren konnte wie bereits erwähnt durch JA-Mangelmutanten belegt werden. Ishiguro *et al.* (2001) konnte anhand der *dad1*-Mutante belegen, dass eine chloroplastidäre Phospholipase A1 (DAD1) an der JA-Biosynthese beteiligt ist und notwendig für die Filamentelongation und Pollenfreisetzung ist. Eine Promotoraktivität von *DAD1* konnte in Filamenten nachgewiesen werden, die sich im Elongationswachstum befanden (Ishiguro *et al.* 2001). Auch für *AOC1* und *AOC4* konnte hier Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Zudem wiesen auch die Promotoraktivitätsmuster von *ARF6* und *ARF8* größtenteils Übereinstimmungen mit denen von *AOC1* und *AOC4* auf (Nagpal *et al.* 2005).

Ob auch in der Wurzel eine Vernetzung von JA- und Auxin-Signalwegen besteht, bleibt zu untersuchen. Der Auxin-Signalweg wird über *AXR2/IAA7* negativ reguliert (Nagpal *et al.* 2000). Da die Expression von *AXR2/IAA7* durch Applikation von JAME reprimiert wird (Devoto *et al.* 2005), könnte JA an der positiven Regulation des Auxin-Signalwegs beteiligt sein. Die Bedeutung der Jasmonate für die Lateralwurzelbildung wird nicht nur dadurch belegt, dass es nach exogener Applikation von Jasmonaten zur vermehrten Bildung von Lateralwurzeln kommt. Auch der JA-responsive bHLH-Transkriptionsfaktor *AtMYC2* ist an der positiven Regulation der Lateralwurzelbildung beteiligt (Yadav *et al.* 2005). Dies korreliert auch mit der detektierten

Promotoraktivität von *AOC3* und *AOC4* im Bereich der Lateralwurzelsprimordien (Daten nicht gezeigt). Die parallele Applikation von JAME und dem Antiauxin PCIB könnte Hinweise darauf geben, inwieweit die jasmonatinduzierte Bildung von Lateralwurzeln in Abhängigkeit von Auxin erfolgt.

4.5.5 Partielle Redundanz

Die Ergebnisse der Co-Expressionsanalysen schließen eine generelle Co-Regulation der *AOC*-Gene weitgehend aus. Für keines der *AOC*-Gene war eine der anderen *AOCs* unter den Genen mit den höchsten Übereinstimmungen im Expressionsmuster (Tab. 3.4). Der direkte Vergleich des Vorkommens zweier *AOC*-Transkripte in verschiedenen Microarray-Experimenten zeigte jedoch, dass auch zahlreiche Überlappungen im Auftreten bzw. Fehlen der *AOC*-Transkripte vorkamen (Abb. 3.9). Dies würde eine partielle Redundanz in der Regulation der *AOC*-Expression nahelegen und entspricht grundsätzlich auch den Ergebnissen der Promotoranalysen. So waren in nahezu allen untersuchten Geweben immer mindestens zwei *AOC*- Promotoren aktiv. Lediglich im Bereich der Wurzel konnten spezifische Aktivitätsmuster für die Promotoren von *AOC3* und *AOC4* nachgewiesen werden (Abb. 3.4). Allerdings konnte dieser spezifischen Promotoraktivität bisher keine biologische Relevanz zugeordnet werden, da der Wurzelphänotyp des *aoc3 KO*s scheinbar nicht auf den Verlust der *AOC3* zurückzuführen ist. Da weder für *AOC1* noch für *AOC2* eine Expression in Wurzeln nachgewiesen wurde, wird der Verlust der *AOC3* entweder durch die *AOC4* kompensiert oder die *AOC3* ist in diesem Bereich von untergeordneter Funktion. Eine spezifische Funktion der *AOC3* in Wurzeln konnte innerhalb dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Da die Promotoraktivitätsmuster von *AOC3* und *AOC4* in Wurzeln ein hohes Maß an Spezifität aufwiesen, ist eine spezifische Funktion der beiden Proteine aber für andere Abläufe (z.B. Pathogenantwort) nicht auszuschließen.

Weiterhin ist eine Redundanz in der Funktion einzelner *AOCs* in Blättern und Blüten wahrscheinlich. In Rosettenblättern werden bevorzugt *AOC1* und *AOC2* exprimiert, deren Transkriptmengen nach Verwundung oder JA-Behandlung stark ansteigen (Stenzel *et al.* 2003b). In Blüten hingegen konnte hauptsächlich für die Promotoren von *AOC1* und *AOC4* Aktivität verzeichnet werden (Abb.3.2). Die JA-Bildung in Blüten ist essentiell für die Filamentelongation, Antherendehiszens und Pollenentwicklung. Daher sind viele der JA-Biosynthese- und JA-Signaltransduktionsmutanten männlich steril (Xie *et al.* 1998; Stintzi und Browse 2000; Park *et al.* 2002; von Malek *et al.* 2002). Da homozygote *aoc1 KO*- und *aoc4 KO*-Pflanzen fertil sind, scheint auch in der Blütenentwicklung eine partielle Redundanz der *AOCs* vorzuliegen. Da die Elongation der Filamente essentiell JA-abhängig ist (Ishiguro *et al.* 2001), kann die Fertilität des *aoc1 KO*s bzw. des *aoc4 KO*s durch die Redundanz der Promotoraktivitäten von *AOC1* und *AOC4* im Bereich der Filamente erklärt werden (Abb. 3.2). Genauere Aussagen zur partiellen Redundanz der *AOCs* *in planta* werden jedoch erst durch die Charakterisierungen der *aoc1 KO*- und *aoc4 KO*-Pflanzen sowie von Doppel-*knockout*-Mutanten möglich sein.

Die potentielle Redundanz der AOC-Regulation und -Funktion wirft die Frage nach der Kontrolle der AOC-Aktivität durch Oligomerisierung auf. Die Kristallstruktur der AOC2 legt eine trimere Form des Enzyms nahe (Hofmann *et al.* 2006). Daher stellt sich die Frage, ob es zur Bildung von Homo- und/oder Heterotrimeren kommt und ob diese Formen eine unterschiedliche spezifische Aktivität aufweisen. Da auch die AOC-Monomere *in vitro* spezifische Aktivität zeigen (Hofmann *et al.* 2006), wäre auch eine Inaktivierung des Enzyms durch Oligomerisierung denkbar, wie sie für die OPR3 postuliert wird (Breithaupt *et al.* 2006a).

Die Regulation der Enzymaktivität über Heterodimerisierung konnte z.B. für die ACC-Synthase-(ACS)-Familie aus Arabidopsis gezeigt werden. ACS katalysiert die Bildung der Ethylenvorstufe ACC und stellt einen limitierenden Schritt der Ethylenbiosynthese dar. Die neun ACS-Gene von Arabidopsis weisen sowohl spezifische als auch redundante Expressionsmuster auf (Tsuchisaka und Theologis 2004b). Acht der neun ACS-Proteinen können funktionale Homodimere bilden und auch einige Heterodimere dieser Proteine zeigen *in vitro* eine spezifische Aktivität (Tsuchisaka und Theologis 2004a). Die spezifische und redundante Regulation der ACS-Bildung ermöglicht vermutlich eine hoch differenzierte Kontrolle der Ethylen-Bildung in unterschiedlichen Prozessen und Geweben.

Inwieweit es *in planta* zur Bildung von AOC-Heterotrimeren kommt und ob sie sich in ihren enzymatischen Eigenschaften unterscheiden, bleibt zu untersuchen. Aussagen zur Interaktion von AOC-Proteinen *in vivo* sind beispielsweise durch FRET-Analysen zu erwarten.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten legen eine komplexe Verknüpfung der Regulation der JA-Biosynthese mit anderen Signalwegen und Prozessen nahe. Diese reicht von der Fettsäure- β -Oxidation bis hin zur Vernetzung mit den Signalwegen anderer Phytohormone. Zudem wurde die essentielle Bedeutung von Komplementationsexperimenten verdeutlicht, die zur eindeutigen Korrelation von Phänotyp und Genotyp von Mutanten notwendig ist.

Die differentielle Regulation der einzelnen Mitglieder einer Genfamilie scheint auch im Fall der AOCs sowohl auf transkriptioneller als auch posttranskriptioneller Ebene zu verlaufen. Die Regulation der Expression und Promotoraktivität der AOCs weist dabei partielle Redundanz auf. Weitere Experimente, insbesondere die Charakterisierung von Doppel-*knockout*-Mutanten, werden konkretere Hinweise auf die partielle Redundanz der AOC-Funktionen liefern können.

5 Zusammenfassung

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte konnten viele molekulare Abläufe der JA-Biosynthese identifiziert und aufgeklärt werden. Einzig über die Details der β -Oxidationsschritte bei der JA-Bildung wurde aufgrund mangelnder experimenteller Daten bis vor Kurzem vorrangig spekuliert. Darüberhinaus waren auch viele Einzelheiten zur Regulation der JA-Bildung unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein Beitrag zur Aufklärung der β -Oxidation innerhalb der JA-Biosynthese geleistet werden. Ein weiteres umfangreiches und wesentliches Ziel der Arbeit bestand in der Charakterisierung der AOC-Genfamilie aus Arabidopsis. Von besonderem Interesse war dabei die Frage nach der redundanten oder nicht-redundanten Funktion der einzelnen AOCs und damit nach der Bedeutung der spezifischen Regulation individueller Vertreter dieser Genfamilie für die zeitlich und räumlich differenzierte JA-Bildung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mutanten *pex6* und *aim1*, die in der peroxysomalen Fettsäure- β -Oxidation gestört sind, auch eine verminderte Fähigkeit zur wundinduzierten JA-Bildung aufweisen. Dies konnte anhand des Umsatzes von endogener OPDA zu JA gezeigt werden und wurde durch Fütterungsexperimente mit [$^2\text{H}_5$]-markierter OPDA bestätigt. Die verminderte Fähigkeit zur JA-Bildung spiegelte sich auch in einer verminderten VSP-Expression wider, die als indirekter JA-Nachweis dient. Die qRT-PCR-Daten gaben erstmalig Hinweise darauf, dass die Expression von *VSP1* und *VSP2* unterschiedlich durch den wundinduzierten Anstieg der JA-Gehalte reguliert wird.

Die Beteiligung von Enzymen der Fettsäure- β -Oxidation an der JA-Biosynthese, die zwischenzeitlich auch durch transgene und genetische Ansätze anderer Gruppen belegt wurde, konnte so in dieser Arbeit erstmalig anhand eines der beiden Arabidopsis *multifunctional proteins* (AIM1) nachgewiesen werden. Damit konnte der essentielle Bedarf an funktionalen Peroxisomen für die JA-Bildung bestätigt werden.

Bei der Charakterisierung der AOC-Genfamilie kamen mit den $AOC_{\text{Prom}}:uidA$ -Linien, den RNAi-Linien und der begonnenen *knockout*-Charakterisierung unterschiedliche transgene Ansätze zum Einsatz, die durch Datenbankanalysen der AOC-Expression und der Promotorstrukturen ergänzt wurden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die Promotoraktivitäten der einzelnen AOCs in verschiedenen Geweben teilweise unterschiedliche Aktivitätsmuster aufwiesen, und auch die Datenbankexpressionsanalysen haben Hinweise auf eine partielle gewebsspezifisch differentielle Regulation der AOC-Gene ergeben. So konnte gezeigt werden, dass die AOC-Gene nur vereinzelt co-exprimiert werden und keine allgemeine Übereinstimmung der Expressionsmuster der AOCs besteht. Für die Promotoraktivitätsmuster lag ebenfalls in nahezu allen Fällen eine partielle Redundanz für mindestens zwei der AOCs vor. Nur im Bereich der Wurzel konnten spezifische Bereiche der Promotoraktivität für *AOC3* und *AOC4* festgestellt werden. Eine *AOC3*-T-DNA-Insertionslinie (*aoc3 KO*) zeigte dementsprechend auch einen Wurzelphänotyp, dieser konnte

allerdings nicht durch die Überexpression einer *AOC3* komplementiert werden. Im *aoc3 KO* konnte außer am *AOC3*-Locus keine weitere T-DNA-Insertion lokalisiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass in *aoc3 KO*-Wurzeln erhöhte IAA-Konjugatmengen vorlagen, wurde als mögliche Ursache der Wurzellängenreduktion eine spontane Mutation im *ILR2*-Gen postuliert. Der spezifischen Promotoraktivität der *AOC3* in der Elongationszone der Wurzel, die auch durch Datenbankexpressionsanalysen belegt wurde, konnte daher noch keine biologische Relevanz zugeordnet werden. Aufgrund der vermehrt auftretenden W-Box-Elemente im Promotor der *AOC3* sowie der nachgewiesenen Co-Expression mit einem WRKY-Transkriptionsfaktor wurde eine putative Funktion der *AOC3* in der Abwehr nekrotropher Wurzelpathogene postuliert.

Widersprüchliche Ergebnisse der Promotoraktivitätsstudien und der Expressionsdaten ebenso wie Datenbankexpressionsanalysen und das Komplementationsexperiment deuten erstmalig auf eine unterschiedliche posttranskriptionelle Regulation der Transkriptabundanz der jeweiligen *AOCs* im Blatt hin.

Insgesamt kann also mehrheitlich von einer partiell redundanten Funktion der vier Arabidopsis-*AOCs* ausgegangen werden, wobei wahrscheinlich in verschiedenen Geweben eine funktionelle Redundanz von unterschiedlichen *AOCs* vorliegt. Die postulierte partielle Redundanz sowie die nicht-redundante Funktion von *AOC3* und *AOC4* in Wurzeln bleibt anhand weiterer Analysen von *knockout*- und *Doppel-knockout*-Linien zu untersuchen.

6 Literatur

- Afitlhile, M. M., Fukushige, H., Nishimura, M. und Hildebrand, D. F. (2005): A defect in glyoxysomal fatty acid β -oxidation reduces jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**: 603-609.
- Agrawal, G. K., Rakwal, R., Jwa, N.-S., Han, K.-S. und Agrawal, V. P. (2002): Molecular cloning and mRNA expression analysis of the first rice jasmonate biosynthetic pathway gene allene oxide synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**: 771-782.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. und Ullrich, C. I. (2006): Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. *Ann Bot* **97**: 883-893.
- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E. und Ullrich, C. (2004): Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. *Planta* **220**: 177-182.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- Andersson, M. X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnstrom, A., McPhail, K. L., Gerwick, W. H., Gobel, C., Feussner, I. und Ellerstrom, M. (2006): Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*: formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, Arabidopside E. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 31528-31537.
- Ashikawa, I. (2002): Gene-associated CpG islands and the expression pattern of genes in rice. *DNA Res* **9**: 131-134.
- Atallah, M. (2005): Jasmonate-responsive AP2-domain transcription factors in *Arabidopsis*. Dissertationsschrift: Universität Leiden
- Bartel, B. und Fink, G. (1995): ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science* **268**: 1745-1748.
- Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M. und Zolman, B. K. (2001): Inputs to the active Indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth and Regulation* **20**: 198-216.
- Bell, E., Creelman, R. A. und Mullet, J. E. (1995): A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 8675-8679.
- Bell, E. und Mullet, J. E. (1993): Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiology* **103**: 1133-1137.
- Berger, S., Bell, E., Sadka, A. und Mullet, J. E. (1995): *Arabidopsis thaliana* AtVSP is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding vegetative storage protein acid phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. *Plant Molecular Biology* **27**: 933-942.
- Birnbaum, K., Shasha, D. E., Wang, J. Y., Jung, J. W., Lambert, G. M., Galbraith, D. W. und Benfey, P. N. (2003): A gene expression map of the *Arabidopsis* root. *Science* **302**: 1956-1960.
- Blee, E. (2002): Impact of phyto-oxylipins in plant defense. *Trends in Plant Science* **7**: 315-321.
- Boter, M., Ruiz-Rivero, O., Abdeen, A. und Prat, S. (2004): Conserved MYC transcription factors play a key role in jasmonate signaling both in tomato and *Arabidopsis*. *Genes & Development* **18**: 1577-1591.
- Brash, A. R. (1999): Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 23679-23682.

- Breithaupt, C., Kurzbauer, R., Lilie, H., Schaller, A., Strassner, J., Huber, R., Macheroux, P. und Clausen, T. (2006a): Crystal structure of 12-oxophytodienoate reductase 3 from tomato: self-inhibition by dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 14337-14342.
- Breithaupt, C., Strassner, J., Breiting, U., Huber, R., Macheroux, P., Schaller, A. und Clausen, T. (2006b): X-Ray structure of 12-oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. *Structure* **9**: 419-429.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.-A., Shokat, K. M., Rietz, S., Parker, J. und Mundy, J. (2006): Arabidopsis MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**: 532-546.
- Brown, R. L., Kazan, K., McGrath, K. C., Maclean, D. J. und Manners, J. M. (2003): A role for the GCC-Box in jasmonate-mediated activation of the PDF1.2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**: 1020-1032.
- Buseman, C. M., Tamura, P., Sparks, A. A., Baughman, E. J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M. R., Esch, S. W., Shah, J., Williams, T. D. und Welti, R. (2006): Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor-oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* **142**: 28-39.
- Campanella, J. J., Ludwig-Mueller, J. und Town, C. D. (1996): Isolation and characterization of Mutants of Arabidopsis thaliana with Increased Resistance to Growth Inhibition by indoleacetic acid-amino acid conjugates. *Plant Physiology* **112**: 735-745.
- Casimiro, I., Beeckman, T., Graham, N., Bhalerao, R., Zhang, H., Casero, P., Sandberg, G. und Bennett, M. J. (2003): Dissecting Arabidopsis lateral root development. *Trends in Plant Science* **8**: 165-171.
- Castillo, M. C., Martinez, C., Buchala, A., Metraux, J.-P. und Leon, J. (2004): Gene-specific involvement of β -Oxidation in wound-activated responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* **135**: 85-94.
- Chakravarthy, S., Tuori, R. P., D'Ascenzo, M. D., Fobert, P. R., Despres, C. und Martin, G. B. (2003): The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell* **15**: 3033-3050.
- Chen, C. H. und Chen, Z. X. (2000): Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* **42**: 387-396.
- Chen, X. (2004): A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in Arabidopsis flower development. *Science* **303**: 2022-2025.
- Clough, S. J. und Bent, A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16**: 735-743.
- Cohen, J. D. und Bandurski, R. S. (1982): Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **33**: 403-430.
- Corbineau, F., Rudnicki, R. M. und Come, D. (1988): The effects of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regulation* **7**: 157-169.
- Darwin, C. R. (1880): The power of movements in plants. London, Murray.
- Dathe, W., Ronsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G. und Schreiber, K. (1981): Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535.
- Datla, R. S. S., Bekkaoui, F., Hammerlindl, J. K., Pilate, G., Dunstan, D. I. und Crosby, W. L. (1993): Improved high-level constitutive foreign gene expression in plants using an AMV RNA4 untranslated leader sequence. *Plant Science* **94**: 139-149.
- Delker, C., Zolman, B. K., Miersch, O. und Wasternack, C. (in Vorbereitung): Characterization of pex6 and aim1 indicate jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana requires peroxisomal β -oxidation enzymes.
- Demole, E., Lederer, E. und Mercier, D. (1962): Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta* **45**: 675-685.

- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.-S., Chilcott, C., Zhu, T. und Turner, J. G. (2005): Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Molecular Biology* **58**: 497-513.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M. und Turner, J. G. (2002): COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *The Plant Journal* **32**: 457-466.
- Devoto, A. und Turner, J. G. (2003): Regulation of Jasmonate-mediated plant responses in Arabidopsis. *Ann Bot* **92**: 329-337.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. und Estelle, M. (2005): The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 441-445.
- Doench, J. G., Petersen, C. P. und Sharp, P. A. (2003): siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development* **17**: 438-442.
- Domoney, C., Firmin, J. L., Sidebottom, C., Ealing, P. M., Slabas, A. und Casey, R. (1990): Lipoxygenase heterogeneity in *Pisum sativum*. *Planta* **181**: 35-43.
- Dorer, C. (2004): Enzymatische Eigenschaften der vier Allenoxidcyclasen aus Arabidopsis thaliana und Untersuchungen zur AOC-Aktivität transgener Pflanzen sowie Arabidopsis-Mutanten. Diplomarbeit Fachbereich Biochemie: Martin-Luther-Universität Halle (Saale).
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Wasternack, C. und Turner, J. G. (2002): The Arabidopsis mutant cev1 links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell* **14**: 1557-1566.
- Ellis, C. und Turner, J. G. (2001): The Arabidopsis mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens. *The Plant Cell* **13**: 1025-1033.
- Epple, P., Apel, K. und Bohlmann, H. (1995): An Arabidopsis thaliana thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology* **109**: 813-820.
- Esen, A. (1978): A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Analytical Biochemistry* **89**: 264-273.
- Farmer, E. und Ryan, C. (1990): Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 7713-7716.
- Feussner, I. und Wasternack, C. (2002): the lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 275-297.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N. und Turner, J. G. (1994): Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759.
- Fujimoto, S. Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. und Ohme-Takagi, M. (2000): Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* **12**: 393-404.
- Gazzarini, S. und McCourt, P. (2003): Cross-talk in plant hormone signalling: what Arabidopsis mutants are telling us. *Ann Bot* **91**: 605-612.
- Gerhard, B. (1992): Fatty acid degradation in plants. *Progress in Lipid Research* **31**: 417-446.
- Gidra, S. K., Miersch, O., Levitin, A., Schmidt, J., Wasternack, C. und Varin, L. (2003): Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 17895-17900.
- Glazebrook, J. (2005a): Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Guilfoyle, T. J. (1997): The structure of plant gene promoters. *Genetic Engineering*. J. K. Setlow. New York, Plenum Press. **19**: 15-47.
- Guo, H.-S., Xie, Q., Fei, J.-F. und Chua, N.-H. (2005): MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *Plant Cell* **17**: 1376-1386.
- Gutjahr, C., Riemann, M., Müller, A., Düchting, P., Weiler, E. W. und Nick, P. (2005): Cholodny-Went revisited: a role for jasmonate in gravitropism of rice coleoptiles. *Planta*: 1-11.
- Haga, K. und Iino, M. (2004): Phytochrome-mediated transcriptional up-regulation of allene oxide synthase in rice seedlings. *Plant Cell Physiol.* **45**: 119-128.

- Hamberg, M. und Fahlstadius, P. (1990): Allene oxide cyclase: A new enzyme in plant lipid metabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **276**: 518-526.
- Hamberg, M. und Hughes, M. (1988): Fatty acid allene oxides. III. Albumin-induced cyclization of 12,13(s)-epoxy-9(Z),11-octadecadienoic acid. *Lipids* **23**.
- Harms, K., Atzorn, R., Brash, A., Kuhn, H., Wasternack, C., Willmitzer, L. und Pena-Cortes, H. (1995): Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of JA-responding genes. *Plant Cell* **7**: 1645-1654.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J. und Wasternack, C. (2000): Tissue-specific oxylipin signature of tomato flowers: allene oxide cyclase is highly expressed in distinct flower organs and vascular bundles. *Plant Journal* **24**: 113-126.
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O. und Wasternack, C. (2003): Occurrence of the allene oxide cyclase in different organs and tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **64**: 971-980.
- He, Y., Fukushige, H., Hildebrand, D. F. und Gan, S. (2002): Evidence supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiology* **128**: 876-884.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. und Korenaga, T. (1999): Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucl. Acids Res.* **27**: 297-300.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Sekiguchi, M., Hasegawa, K. und Shigemori, H. (2005): Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *J. Nat. Prod.* **68**: 600-603.
- Hofmann, E., Zerbe, P. und Schaller, F. (2006): The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: insights into the oxylipin cyclization reaction. *Plant Cell* **18**: 3201-3217.
- Howe, G. A. (2004): Jasmonates as signals in the wound response. *J Plant Growth Regul* **23**: 223-237.
- Howe, G. A., Lightner, J., Browse, J. und Ryan, C. A. (1996): An octadecanoid pathway mutant (j15) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**: 2067-2077.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. und Okada, K. (2001): The defective in anther dehiscence1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 2191-2209.
- Kepinski, S. und Leyser, O. (2005): The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **435**: 446-451.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. und Chory, J. (2005): Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. **433**: 167-171.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. und Somssich, I. E. (2000): A novel regulatory element involved in rapid activation of parsley ELI7 gene family members by fungal elicitor or pathogen infection. *Molecular Plant Pathology* **1**: 243-251.
- Koch, T., Bandemer, K. und Boland, W. (1997): Biosynthesis of cis-Jasmone: a pathway for the inactivation and the disposal of the plant stress hormone jasmonic acid to the gas phase? *Helvetica Chimica Acta* **80**: 838-850.
- Köhler, W., Schachtel, G. und Voleske, P. (2002): Biostatistik. Berlin, Heidelberg, Springer.
- Koo, A. J. K., Chung, H. S., Kobayashi, Y. und Howe, G. A. (2006): Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of Jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*: M607854200.
- Kowalczyk, M. und Sandberg, G. (2001): Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **127**: 1845-1853.
- Kramell, R., Atzorn, R., G., S., Miersch, O., Bruckner, C., Schmidt, J., Sembdner, G. und Parthier, B. (1995): Occurrence and identification of jasmonic acid and its amino-acid conjugates induced by osmotic-stress in barley leaf tissue. *J Plant Growth Regul* **14**: 29-36.
- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B. und Wasternack, C. (1997): Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Letters* **414**: 197-202.
- Kunkel, B. N. und Brooks, D. M. (2002): Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 325-331.

- Laudert, D., Hennig, P., Stelmach, B. A., Muller, A., Andert, L. und Weiler, E. W. (1997): Analysis of 12-oxo-phytodienoic acid enantiomers in biological samples by capillary gas chromatography-mass spectrometry using cyclodextrin stationary phases. *Analytical Biochemistry* **246**: 211-217.
- Laudert, D., Schaller, F. und Weiler, E. W. (2000): Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta* **211**: 163-165.
- Laudert, D. und Weiler, E. W. (1998): Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *The Plant Journal* **15**: 675-684.
- Leyser, H. M. O., Lincoln, C. A., Timpte, C., Lammer, D., Turner, J. und Estelle, M. (1993): *Arabidopsis* auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. **364**: 161-164.
- Li, C., Schillmiller, A. L., Liu, G., Lee, G. I., Jayanty, S., Sageman, C., Vrebalov, J., Giovannoni, J. J., Yagi, K., Kobayashi, Y. und Howe, G. A. (2005): Role of β -Oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* **17**: 971-986.
- Li, J., Brader, G. und Palva, E. T. (2004): The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* **16**: 319-331.
- Li, Y., Rosso, M. G., Strizhov, N., Viehoveer, P. und Weisshaar, B. (2003): GABI-Kat SimpleSearch: a flanking sequence tag (FST) database for the identification of T-DNA insertion mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* **19**: 1441-1442.
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J. und Sandberg, G. (2005): Sites and Regulation of Auxin Biosynthesis in *Arabidopsis* Roots. *Plant Cell* **17**: 1090-1104.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D. und Carrington, J. C. (2002): Cleavage of scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **297**: 2053-2055.
- Lorenzo, O., Chico, J. M., Sanchez-Serrano, J. J. und Solano, R. (2004): jasmonate-insensitive1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1938-1950.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J. J. und Solano, R. (2003): ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**: 165-178.
- Lorenzo, O. und Solano, R. (2005): Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 532-540.
- Ludwig-Müller, J., Pieper, K., Ruppel, M., Cohen, J. D., Epstein, E., Kiddle, G. und Bennett, R. (1999): Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta* **208**: 409-419.
- Magidin, M., Pittman, J. K., Hirschi, K. D. und Bartel, B. (2003): ILR2, a novel gene regulating IAA conjugate sensitivity and metal transport in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **35**: 523-534.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. und Dietrich, R. A. (2000): The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. **26**: 403-410.
- Mallory, A. C., Bartel, D. P. und Bartel, B. (2005): MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* auxin response factor17 is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **17**: 1360-1375.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Markus Lange, B., Choi, G., Koo, Y. J., Yoo, Y. J., Choi, Y. D., Choi, G. und Browse, J. (2006): Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *The Plant Journal* **46**: 984-1008.
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklof, J., Casero, P. J., Bennett, M. und Sandberg, G. (2002): AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling. *Plant Cell* **14**: 589-597.
- Maucher, H., Stenzel, I., Miersch, O., Stein, N., Prasad, M., Zierold, U., Schweizer, P., Dorer, C., Hause, B. und Wasternack, C. (2004): The allene oxide cyclase of barley (*Hordeum vulgare* L.)--cloning and organ-specific expression. *Phytochemistry* **65**: 801-811.

- McGrath, K. C., Dombrecht, B., Manners, J. M., Schenk, P. M., Edgar, C. I., Maclean, D. J., Scheible, W.-R., Udvardi, M. K. und Kazan, K. (2005): Repressor- and activator-type ethylene response factors functioning in jasmonate signaling and disease resistance identified via a genome-wide screen of Arabidopsis transcription factor gene expression. *Plant Physiology* **139**: 949-959.
- Meixner, C., Ludwig-Müller, J., Miersch, O., Gresshoff, P., Staehelin, C. und Vierheilig, H. (2005): Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007. *Planta* **222**: 709-715.
- Memelink, J., Verpoorte, R. und Kijne, J. W. (2001): ORCAization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science* **6**: 212-219.
- Menke, F. L. H., Champion, A., Kijne, J. W. und Memelink, J. (1999a): A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene Str interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *Embo Journal* **18**: 4455-4463.
- Menke, F. L. H., Parchmann, S., Mueller, M. J., Kijne, J. W. und Memelink, J. (1999b): Involvement of the Octadecanoid Pathway and Protein Phosphorylation in Fungal Elicitor-Induced Expression of Terpenoid Indole Alkaloid Biosynthetic Genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiology* **119**: 1289-1296.
- Meyer, A., Miersch, O., Büttner, C., Dathe, W. und Sembdner, G. (1984): Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *Journal of Plant Growth Regulation* **3**: 1-8.
- Miersch, O., Schmidt, J., Sembdner, G. und Schreiber, K. (1989): Jasmonic acid-like substances from the culture filtrate of *Botryodiplodia theobromae*. *Phytochemistry* **28**: 1303-1305.
- Miersch, O. und Wasternack, C. (2000): Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: Endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biological Chemistry* **381**: 715-722.
- Miersch, O., Weichert, H., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Feussner, I. und Wasternack, C. (2004): Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves. *Phytochemistry* **65**: 847-856.
- Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G. und Van Montagu, M. (1997): Antagonistic Effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**: 2243-2259.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay, with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-496.
- Müssig, C., Shin, G.-H. und Altmann, T. (2003): Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**: 1261-1271.
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., Hagen, G., Alonso, J. M., Cohen, J. D., Farmer, E. E., Ecker, J. R. und Reed, J. W. (2005): Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **132**: 4107-4118.
- Nagpal, P., Walker, L. M., Young, J. C., Sonawala, A., Timppte, C., Estelle, M. und Reed, J. W. (2000): AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. *Plant Physiology* **123**: 563-574.
- Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, S. und Iba, K. (1999): Wound-induced expression of the FAD7 gene is mediated by different regulatory domains of its promoter in leaves/stems and roots. *Plant Physiology* **121**: 1239-1246.
- O'Connor, T. R., Dyreson, C. und Wyrick, J. J. (2005): Athena: a resource for rapid visualization and systematic analysis of Arabidopsis promoter sequences. *Bioinformatics* **21**: 4411-4413.
- Olsen, P. H. und Ambros, V. (1999): The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Developmental Biology* **216**: 671-680.
- Ozturk, Z. N., Talamé, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. und Bohnert, H. J. (2002): Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* **48**: 551-573.

- Park, J. H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T., Feldmann, K. A. und Feyereisen, R. (2002): A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *The Plant Journal* **31**: 1-12.
- Pauw, B. und Memelink, J. (2004): Jasmonate-responsive gene expression. *Journal of Plant Growth Regulation* **23**: 200-210.
- Penninckx, I., Eggermont, K., Terras, F., Thomma, B., Samblanx, G., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M. und Broekaert, W. F. (1996): Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Penninckx, I. A. M. A., Thomma, B. P. H. J., Buchala, A., Metraux, J.-P. und Broekaert, W. F. (1998): Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**: 2103-2114.
- Porta, H. und Rocha-Sosa, M. (2002): Plant lipoxygenases. physiological and molecular features. *Plant Physiology* **130**: 15-21.
- Pré, M. (2006): ORA EST:Functional analysis of jasmonate-responsive AP2/ERF-domain transcription factors in Arabidopsis thaliana. Dissertationsschrift (ISBN 90-5335-088-8): Universität Leiden.
- Qunkert, G., Adam, F. und Dürner, G. (1982): Asymmetrische Synthese von Methyljasmonat. *Angewandte Chemie* **94**: 866-867.
- Rahman, A., Hosokawa, S., Oono, Y., Amakawa, T., Goto, N. und Tsurumi, S. (2002): Auxin and ethylene response interactions during Arabidopsis root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology* **130**: 1908-1917.
- Rao, M. V., Lee, H.-i., Creelman, R. A., Mullet, J. E. und Davis, K. R. (2000): Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646.
- Razem, F. A., El-Kereamy, A., Abrams, S. R. und Hill, R. D. (2006): The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. **439**: 290-294.
- Ren, C., Pan, J., Peng, W., Genschik, P., Hobbie, L., Hellmann, H., Estelle, M., Gao, B., Peng, J., Sun, C. und Xie, D. (2005): Point mutations in Arabidopsis Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response. *The Plant Journal* **42**: 514-524.
- Richard, S., Morency, M.-J., Drevet, C., Jouanin, L. und Séguin, A. (2000): Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Molecular Biology* **43**: 1-10.
- Richmond, T. A. und Bleecker, A. B. (1999): A defect in β -oxidation causes abnormal inflorescence development in Arabidopsis. *Plant Cell* **11**: 1911-1924.
- Rajo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G. und Sanchez-Serrano, J. J. (1998): Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid dependent and independent wound signal transduction pathways in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **13**: 153-165.
- Rosso, M. G., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003): An Arabidopsis thaliana T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* **53**: 247-259.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W. M., Hobbie, L., Turner, J. und Estelle, M. (1998): The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes & Development* **12**: 198-207.
- Ryan, C. A. (2000): The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1477**: 112-121.
- Rylott, E. L., Eastmond, P. J., Gilday, A. D., Slocombe, S. P., Larson, T. R., Baker, A. und Graham, I. A. (2006): The Arabidopsis thaliana multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal β -oxidation is essential for seedling establishment. *The Plant Journal* **45**: 930-941.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989): Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K.-i., Ohta, H. und Tabata, S. (2001): Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res* **8**: 153-161.
- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T. und Weiler, E. W. (2000): 12-Oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* **210**: 979-984.
- Schaller, F., Hennig, P. und Weiler, E. W. (1998): 12-Oxophytodienoate-10,11-Reductase: occurrence of two isoenzymes of different specificity against stereoisomers of 12-Oxophytodienoic Acid. *Plant Physiology* **118**: 1345-1351.
- Schaller, G. E. und Bleecker, A. B. (1995): Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis ETR1 gene. *Science* **270**: 1809-1811.
- Schilmiller, A. L. und Howe, G. A. (2005): Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 369-377.
- Schmidt, D. (2001): Analyse zur Regulation der Allenoxid-Cyclase-Promotoren aus Arabidopsis thaliana mittels transgener Ansätze. Diplomarbeit Fachbereich Biochemie: Martin-Luther-Universität Halle.
- Schneider, K., Kienow, L., Schmelzer, E., Colby, T., Bartsch, M., Miersch, O., Wasternack, C., Kombrink, E. und Stuible, H.-P. (2005): A new type of peroxisomal Acyl-coenzyme A synthetase from Arabidopsis thaliana has the catalytic capacity to activate biosynthetic precursors of jasmonic acid. *Journal of Biological Chemistry*: M413578200.
- Sembdner, G. und Parthier, B. (1993): The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 569-589.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S. und Choi, Y. D. (2001): Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 4788-4793.
- Seo, S., Sano, H. und Ohashi, Y. (1999): Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**: 289-298.
- Singh, K. B., Foley, R. C. und Onate-Sanchez, L. (2002): Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 430-436.
- Smeeckens, S. (2000): sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 49-81.
- Staswick, P., Su, W. und Howell, S. (1992): Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an Arabidopsis thaliana mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 6837-6840.
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C. und Suza, W. (2005): Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616-627.
- Staswick, P. E. und Tiryaki, I. (2004): The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 2117-2127.
- Staswick, P. E., Tiryaki, I. und Rowe, M. L. (2002): Jasmonate response locus JAR1 and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415.
- Stelmach, B. A., Muller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M. und Weiler, E. W. (2001): A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-Oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl)-monogalactosyl diglyceride, from Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 12832-12838.
- Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Miersch, O., Ziegler, J., Ryan, C. A. und Wasternack, C. (2003a): Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato - amplification in wound signalling. *The Plant Journal* **33**: 577-589.

- Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Kurz, T., Maucher, H., Weichert, H., Ziegler, J., Feussner, I. und Wasternack, C. (2003b): Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **51**: 895-911.
- Stenzel, I., Schmidt, D., Dorer, C., Delker, C., Miersch, O., Hause, B. und Wasternack, C. (in Vorbereitung): Non-redundant and redundant expression patterns among the *Arabidopsis* allene oxide cyclase family members.
- Stintzi, A. und Browse, J. (2000): The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. und Farmer, E. E. (2001): Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 12837-12842.
- Strassner, J., Schaller, F., Frick, U. B., Howe, G. A., Weiler, E. W., Amrhein, N., Macheroux, P. und Schaller, A. (2002): Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response. *The Plant Journal* **32**: 585-601.
- Swiatek, A., Dongen, W. V., Esmans, E. L. und Onckelen, H. V. (2004): Metabolic Fate of Jasmonates in Tobacco Bright Yellow-2 Cells. *Plant Physiology* **135**: 161-172.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H. und Hirochika, H. (1999): A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon *Tto1* is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *The Plant Journal* **18**: 383-393.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., Takamiya, K.-i., Shibata, D., Kobayashi, Y. und Ohta, H. (2005): 12-Oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*: pp.105.067058.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M. K., Harper, R. M., Liscum, E. und Yamamoto, K. T. (2004): *MASSUGU2* encodes *Aux/IAA19*, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator *NPH4/ARF7* to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 379-393.
- Theodoulou, F. L., Job, K., Slocombe, S. P., Footitt, S., Holdsworth, M., Baker, A., Larson, T. R. und Graham, I. A. (2005): Jasmonic acid levels are reduced in comatose ATP-Binding cassette transporter Mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Physiology* **137**: 835-840.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. und Broekaert, W. F. (1998): Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 15107-15111.
- Timko, M. P., Kausch, A. P., Castresana, C., Fassler, J., Herrera-Estrella, L., Van den Broeck, G., Van Montagu, M., Schell, J. und Cashmore, A. R. (1985): Light regulation of plant gene expression by an upstream enhancer-like element. **318**: 579-582.
- Tiryaki, I. und Staswick, P. E. (2002): An *Arabidopsis* mutant defective in jasmonate response is allelic to the auxin-signaling mutant *axr1*. *Plant Physiology* **130**: 887-894.
- Traw, M. B. und Bergelson, J. (2003): Interactive effects of jasmonic acid, salicylic acid, and gibberellin on induction of trichomes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **133**: 1367-1375.
- Tsuchisaka, A. und Theologis, A. (2004a): Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 2275-2280.
- Tsuchisaka, A. und Theologis, A. (2004b): unique and overlapping expression patterns among the *Arabidopsis* 1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiology* **136**: 2982-3000.

- Ueda, J. und Kato, J. (1980): Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiology* **66**: 246-249.
- Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T.-y., Hsing, Y.-i. C., Kitano, H., Yamaguchi, I. und Matsuoka, M. (2005): Gibberellin insensitive dwarf1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *437*: 693-698.
- van der Fits, L. und Memelink, J. (2000): ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science* **289**: 295-297.
- van der Fits, L. und Memelink, J. (2001): The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *The Plant Journal* **25**: 43-53.
- Venter, M. und Botha, F. C. (2004): Promoter analysis and transcription profiling: Integration of genetic data enhances understanding of gene expression. *Physiologia Plantarum* **120**: 74-83.
- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C. (1979): Substrate specificity for the synthesis of cyclic fatty acids by a flaxseed extract. *Plant Physiology* **63**: 490-494.
- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C. (1983): The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **111**: 470-477.
- Vick, B. A. und Zimmerman, D. C. (1984): Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology* **75**: 458-461.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. und Bohlmann, H. (1998): Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J* **14**: 285-295.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K. und Keller, B. (2002): The *Arabidopsis* male-sterile mutant *dde2-2* is defective in the Allene oxide synthase gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**: 187-192.
- Wang, S., Ichii, M., Taketa, S., Xu, L., Xia, K. a. i. und Zhou, X. i. e. (2002): Lateral root formation in rice (*Oryza sativa*): promotion effect of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **159**: 827-832.
- Wasternack, C. (2006): Oxilipins: biosynthesis, signal transduction and action. Plant Hormone Signaling. P. Hedden and S. Thomas. Oxford, UK, Blackwell: 185-228.
- Wasternack, C. und Parthier, B. (1997): Jasmonate signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* **2**: 302-307.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I. und Miersch, O. (2006): The wound response in tomato - Role of jasmonic acid. *Journal of Plant Physiology* **163**: 297-306.
- Weber, H., Vick, B. A. und Farmer, E. E. (1997): Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**: 10473-10478.
- Weigel, D., Ahn, J. H., Blazquez, M. A., Borevitz, J. O., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Ferrandiz, C., Kardailsky, I., Malancharuvil, E. J., Neff, M. M., Nguyen, J. T., Sato, S., Wang, Z.-Y., Xia, Y., Dixon, R. A., Harrison, M. J., Lamb, C. J., Yanofsky, M. F. und Chory, J. (2000): Activation Tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 1003-1014.
- Weiler, E. W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Li, H., Andert, L. und Spengler, P. (1993): Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendrill coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* **32**: 591-600.
- Went, F. (1926): On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proc. Kon.Ned.Acad. Wet* **30**: 10-19.
- Woo, H. R., Chung, K. M., Park, J.-H., Oh, S. A., Ahn, T., Hong, S. H., Jang, S. K. und Nam, H. G. (2001): ORE9, an F-Box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1779-1790.
- Xie, D.-X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M. und Turner, J. G. (1998): COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W. L., Ma, H., Peng, W., Huang, D. und Xie, D. (2002): The SCFCOI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 1919-1935.

- Yadav, V., Mallappa, C., Gangappa, S. N., Bhatia, S. und Chattopadhyay, S. (2005): A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *Plant Cell* **17**: 1953-1966.
- Yamane, H., Sugawara, J., Suzuki, Y., Shimamura, E. und Takahashi, N. (1980): Synthesis of jasmonic acid related compounds and their structure activity relationship on the growth of rice seedlings. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**: 2857-2864.
- Yoshihara, T., Omer, E. A., Koshino, H., Sakamura, S., Kikuta, Y. und Koda, Y. (1989): Structure of a tuber-inducing stimulus from potato leaves (*Solanum tuberosum* L.). *Agricultural and Biological Chemistry* **53**: 2835-2837.
- Zhang, H., Huang, Z., Xie, B., Chen, Q., Tian, X., Zhang, X., Zhang, H., Lu, X., Huang, D. und Huang, R. (2004): The ethylene-, jasmonate-, abscisic acid- and NaCl-responsive tomato transcription factor JERF1 modulates expression of GCC box-containing genes and salt tolerance in tobacco. *Planta* **220**: 262-270.
- Zhang, J., Simmons, C., Yalpani, N., Crane, V., Wilkinson, H. und Kolomiets, M. (2005): Genomic analysis of the 12-oxo-phytodienoic acid reductase gene family of *Zea mays*. *Plant Molecular Biology* **59**: 323-343.
- Ziegler, J., Hamberg, M., Miersch, O. und Parthier, B. (1997): Purification and Characterization of allene oxide cyclase from dry corn seeds. *Plant Physiology* **114**: 565-573.
- Ziegler, J., Stenzel, I., Hause, B., Maucher, H., Hamberg, M., Grimm, R., Ganai, M. und Wasternack, C. (2000): Molecular cloning of allene oxide cyclase - The enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 19132-19138.
- Zolman, B. K. und Bartel, B. (2004): An Arabidopsis indole-3-butyric acid-response mutant defective in PEROXIN6, an apparent ATPase implicated in peroxisomal function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 1786-1791.
- Zolman, B. K., Silva, I. D. und Bartel, B. (2001): The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an atp-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta - oxidation. *Plant Physiology* **127**: 1266-1278.
- Zolman, B. K., Yoder, A. und Bartel, B. (2000): Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in Arabidopsis thaliana reveals four mutant classes. *Genetics* **156**: 1323-1337.

7 Anhang

Linie	WT	AGI-code	Charakteristika	Herkunft / Referenz
<i>aim1</i>	Ws	<i>At4g29010</i>	T-DNA-Ins.-Linie	A. Bleeker (Richmond und Bleeker 1999)
<i>aoc1 KO</i>	Col-0	<i>At3g25760</i>	T-DNA-Ins.-Linie	GABI-KAT (845C10)
<i>aoc3 KO</i>	Ws	<i>At3g25780</i>	T-DNA-Ins.-Linie	UWBC, s. 2.1.2.1
<i>aoc3 KO(2)</i>	Col-0	<i>At3g25780</i>	T-DNA-Inst.-Linie	SALK 101850 (Alonso <i>et al.</i> 2003)
<i>aoc4 KO</i>	Col-0	<i>At1g13280</i>	T-DNA-Inst.-Linie	SALK 124897 (Alonso <i>et al.</i> 2003)
<i>AOC(1-4):uidA</i>	Col-0		Promotor-Gus-Fusion	AG Wasternack, (Schmidt 2001)
<i>35S:AtAOC(RNAi)</i>	Col-0		<i>AOC</i> -RNAi-Linien	AG Wasternack, s. 2.3.7.3
<i>aos KO</i>	Col-0	<i>At5g42650</i>	T-DNA-Ins.-Linie	SALK_017756 Michael Stumpe
<i>opr3</i>	Ws	<i>At2g06050</i>	T-DNA-Ins.-Linie	J. Browse und A. Stintzi (Stintzi und Browse 2000)
<i>pex6-1</i>	Col-0	<i>At1g03000</i>	EMS-Mutante	B. Bartel (Zolman und Bartel 2004)
<i>Thi2.1:uidA</i>	Col-2		Prom-GUS-Fusion	H. Bohlmann (Vignutelli <i>et al.</i> 1998)
<i>VSP1:LUC</i>	Col-gl.		Prom-LUC-Fusion	J. Turner

Tab. 7.1: verwendetes Pflanzenmaterial

Angegeben ist jeweils der korrespondierende Wildtyp, der zu Vergleichszwecken in den einzelnen Untersuchungen herangezogen wurde, der AGI-code des betroffenen Gens (soweit zutreffend), sowie allgemeine Charakteristika und Herkunft der Linie. Zusätzliche Informationen finden sich in den angegebenen Referenzen bzw. in der Einführung zu den einzelnen Experimenten.

Primer	Gen	Gen-ID	Sequenz
<i>PP2A-824F</i>	<i>PP2A</i>	<i>At1g13320</i>	agccaactaggacggatctggt
<i>PP2A-896R</i>			gctatccgaactctgcctcatta
<i>VSP1-582F</i>	<i>VSP1</i>	<i>At5g24780</i>	cactgtcgagaatctcaaggctg
<i>VSP1-646R</i>			cgtttgcttgagtatgagatgc
<i>VSP2-553F</i>	<i>VSP2</i>	<i>At5g24770</i>	ttgtggaagaatgtcactctcgac
<i>VSP2-626R</i>			ggcttcaatatgagatgctccag

Tab. 7.2: Sequenzen der verwendeten qRT-PCR-Primer

Primer	template	Sequenz
<i>AP1</i>	Adapter Primer	gtaatacgactcactatagggc
<i>AP2</i>		actatagggcagcgtggt
<i>JL_plus190_comp</i>	T-DNA-left	agcttgcacgctgcaggctcctgctgag
<i>JL_plus70_comp</i>	border Primer	gaaatctttatttcgacgtgtctacattcactcctcaaatgg
<i>JL_min90comp</i>		catgtccgggaaattctacatggatcagcaatgag

Tab. 7.3: Sequenzen der beim GenomeWalk verwendeten PCR-Primer

Primer	Sequenzierung	Sequenz
<i>M13 uni</i> (-21)	Gelsequenzierer	tgtaaacgacggccagt
<i>M13 rev</i> (-29)		caggaaacagctatgacc
<i>M13 for</i> (-20)	Kapillarsequenzierer	gtaaacgacggccagt
<i>M13 rev</i>		aacagctatgaccatg

Tab. 7.4: verwendete Sequenzierprimer

Primer	Amplifikat	Gen-ID	Sequenz (5' - 3')
<i>aoc1 for</i>	AOC1	At3g25760	aacaacttgccgcatggaaaccgaatc
<i>aoc1 rev</i>			ctcccaaaaaggggacaactcaaaactaa
<i>aoc2 for</i>	AOC2	At3g25770	tcatcccatcactcatccaacatg
<i>aoc2 rev</i>			cgtgtaccaacgtccaaacgacttaaac
<i>aoc3 for</i>	AOC3	At3g25780	aacgcttttagacaattcgaaccgagtg
<i>aoc3 rev</i>			acaacagttccacgtttagaaagaccag
<i>aoc4 for</i>	AOC4	At1g132800	ctttccatatttacgacatggctctc
<i>aoc4 rev</i>			gaaggtggagttcacgcgttaaatccag
<i>aoc1-3UTR-A</i>	3'UTR AOC1	At3g25760	gtcgacaataaaattagcttatcttctc
<i>aoc1-3UTR-B</i>			gtcgacattcgattacaagatttttc
<i>aoc2-3UTR-A</i>	3'UTR AOC2	At3g25770	gtcgacttcagaaataaaatgtttctc
<i>aoc2-3UTR-B</i>			gtcgacccaaaaagattacaaagacttttc
<i>aoc3-3UTR-A</i>	3'UTR AOC3	At3g25780	gtcgacgtaattagctgtttaatagttgtttg
<i>aoc3-3UTR-B</i>			gtcgactttgaaatcgagtacaacagttcc
<i>aoc4-3UTR-A</i>	3'UTR AOC4	At1g132800	gtcgacaatctaaatctttgtgggtgt
<i>aoc4-3UTR-B</i>			gtcgacggagttcacgcgttaaatcca
<i>BamHI_gAOC3</i>	AOC3	At3g25780	ggatccatggcttcttctctgctgc
<i>gAOC3_BamHI</i>			ggatcccagtagacaacagttccacg
<i>aim1 5UTR for</i>	AIM1	At4g29010	ctcatcagagaaattaagctatgg
<i>g_aim1_600_rev</i>			ctg cag caa caa ccg gct tc
<i>Nos ter</i>	T-DNA-Fragment	<i>pBI101-526</i>	cgatctagtaacatagatgacacc
<i>pBR322-2</i>	T-DNA-Fragment	<i>pGV3850:1004</i>	aagtgccacctgacgtctaag
<i>JL202</i>	T-DNA-Fragment	<i>pSKI015</i>	cattttataataacgctgacgacatctac
<i>LBa1</i>	T-DNA-Fragment	<i>pBIN-pROK2</i>	tggttcacgtagtgggccatc
<i>GABI-L</i>	T-DNA-Fragment	<i>pAC106</i>	cccatttgacgtgaatgtagacac
<i>Thi2.1 for</i>	THI2.1	At1g72260	acgtataataacatcccttgtgatc
<i>Thi2.1 rev</i>			acacgtacgtttaactctttatttagg
<i>PDF1.2 for</i>	PDF2.1	At5g44420	atcatcatggctaaagttgcttccatc
<i>PDF1.2 rev</i>			ttgtagatttaacatgggacgtaacag
<i>AtVSP2F</i>	VSP2	At5g24770	caactaaacaataaacataacc
<i>AtVSP2R</i>			gatgaagatagattcttaagaag
<i>AtARF1-a</i>	ARF1	At2g47170	gatcaaatggggttgcatt
<i>AtARF1-b</i>			aagcagaagaggaatctgg

Tab. 7.5: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer

	r-Wert	AGI	Annotation (aus: <i>Arabidopsis Coexpression Data Mining Tools</i>)
AOC1 ⁺	0,914	AT5G42650	allene oxide synthase (AOS) / hydroperoxide dehydrase / cytochrome P450 74A (CYP74A)
	0,783	AT3G44860	S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein similar to defense-related protein cjs1 [Brassica carinata][GI:14009292][Mol Plant Pathol (2001) 2(3):159-169]
	0,763	AT1G28050	zinc finger (B-box type) family protein
	0,762	AT3G51450	strictosidine synthase family protein similar to hemomucin [Drosophila melanogaster][GI:1280434], strictosidine synthase [Rauvolfia serpentina][SP P15324]
	0,762	AT2G24860	chaperone protein dnaJ-related similar to Tsi1-interacting protein TSIP1 (GI:4337001) [Nicotiana tabacum]
	0,754	AT3G45140	lipoygenase (LOX2) identical to SP P38418
	0,749	AT4G34120	CBS domain-containing protein contains Pfam profile PF00571: CBS domain
	0,746	AT5G53050	hydrolase, alpha/beta fold family protein contains Pfam profile PF00561: hydrolase, alpha/beta fold family
	0,745	AT2G06050	12-oxophytodienoate reductase (OPR3) / delayed dehiscence1 (DDE1)
	0,744	AT3G50760	glycosyl transferase family 8 protein contains Pfam profile: PF01501 Glycosyl transferase family 8 1,2-diacylglycerol 3-beta-galactosyltransferase, putative / monogalactosyldiacylglycerol synthase, putative / MGDG synthase, putative similar to MGD synthase type A from Arabidopsis thaliana [gi:9927297], similar to monogalactosyldiacylglycerol synthase,
	0,740	AT4G31780	
0,732	AT1G19670	coronatine-responsive protein / coronatine-induced protein 1 (COR11)	
AOC3	0,925	AT1G19180	expressed protein
	0,906	AT4G17615	calcineurin B-like protein 1 (CBL1) identical to calcineurin B-like protein 1 (GI:3309082) [Arabidopsis thaliana]
	0,893	AT1G73080	leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative similar to receptor protein kinase GI:1389566 from [Arabidopsis thaliana]
	0,893	AT2G06050	12-oxophytodienoate reductase (OPR3) / delayed dehiscence1 (DDE1)
	0,882	AT3G51450	strictosidine synthase family protein similar to hemomucin [Drosophila melanogaster][GI:1280434], strictosidine synthase [Rauvolfia serpentina][SP P15324]
	0,877	AT3G21230	4-coumarate--CoA ligase, putative / 4-coumaroyl-CoA synthase, putative
	0,869	AT5G54170	expressed protein weak similarity to SP Q9UUKL6 Phosphatidylcholine transfer protein (PC-TP) {Homo sapiens}
	0,868	AT1G17380	expressed protein
	0,862	AT4G34390	extra-large guanine nucleotide binding protein, putative / G-protein, putative similar to extra-large G-protein (XLG) [Arabidopsis thaliana] GI:3201680; contains Pfam profile PF00503: G-protein alpha subunit
	0,859	AT2G32140	disease resistance protein (TIR class), putative domain signature TIR exists, suggestive of a disease resistance protein.
	0,859	AT1G17420	lipoygenase (LOX3)
0,857	AT2G27310	F-box family protein contains Pfam PF00646: F-box domain;; similar to SKP1 interacting partner 2 (SKIP2) TIGR_Ath1:At5g67250	
AOC4	0,694	AT1G18840	calmodulin-binding family protein low similarity to SF16 protein [Helianthus annuus] GI:560150; contains Pfam profile PF00612: IQ calmodulin-binding motif
	0,664	AT3G20120	cytochrome P450 family protein contains Pfam profile: PF00067 cytochrome P450
	0,655	AT1G74690	calmodulin-binding family protein low similarity to SF16 protein [Helianthus annuus] GI:560150; contains Pfam profile PF00612: IQ calmodulin-binding motif
	0,634	AT1G67750	pectate lyase family protein similar to pectate lyase GI:14289169 from [Salix gilgiana]
	0,629	AT4G26760	microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein low similarity to protein regulating cytokinesis 1 (PRC1) [Homo sapiens] GI:2865521; contains Pfam profile PF03999: Microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family)
	0,622	AT2G19160	expressed protein contains Pfam profile PF03267: Arabidopsis protein of unknown function, DUF266 kip-related protein 2 (KRP2) / cyclin-dependent kinase inhibitor 2 (ICK2) / cdc2a-interacting protein identical to Cdc2a-interacting protein (ICK2) (cyclin-dependent kinase inhibitor) [Arabidopsis thaliana] GI:7160669
	0,614	AT3G50630	
	0,610	AT1G01300	aspartyl protease family protein contains Pfam domain, PF00026: eukaryotic aspartyl protease
	0,595	AT5G67130	expressed protein
	0,594	AT1G26100	cytochrome B561 family protein contains Pfam domain, PF03188: Cytochrome b561
	0,582	AT5G07030	aspartyl protease family protein contains Pfam profile:PF00026 eukaryotic aspartyl protease rascinin-like arabinogalactan-protein (FLA1) identical to gi 13377776 AAK20857 13377775 gb AF333970
0,582	AT5G55730		

Tab. 7.6: Co-Expressionsanalyse

Angegeben sind jeweils die 12 Gene (AGI code), deren Expressionsmuster die höchste Korrelation zur Expression der jeweiligen AOCs aufwiesen. Der Pearson Koeffizient (r-Wert) gibt den Grad der Korrelation an (0 = keine Korrelation, 1 = absolute, positive Korrelation).

Die Daten wurden der ACT-Funktion der *Arabidopsis Coexpression Data Mining Tools* Datenbank (<http://www.arabidopsis.leeds.ac.uk/act/coexpanalyser.php>) entnommen (⁺Array-Oligonukleotidsonde zeigt auch Homologie zu AOC2).

AGI code	Name	MW	+/- SF	AGI code	Name	MW	+/- SF
AT3G21230	4CL5	487	184	At3g15540	IAA19	420	103
At1g20510	4-CL-like (1)	1361	112	At5g55250	IAMT1	37	12
At4g05160	4-CL-like (2)	706	72	At1g68100	IAR1	429	22
At5g20960	AAO1	577	81	At1g24180	IAR4	1882	139
At1g08980	AMI1	64	4	At5g56650	ILL1*	53	8
At3g25760	AOC1*	161	35	At1g51780	ILL5*	329	40
At3g25780	AOC3	2608	320	At3g02875	ILR1	347	24
At1g13280	AOC4	792	131	At1g19640	JMT	6	1
At5g42650	AOS	1427	173	At1g55020	LOX1	137	24
At2g47170	ARF1	5390	231	At3g45140	LOX2	23	3
At1g59750	ARF1	109	8	At1g17420	LOX3	390	119
At1g19220	ARF19	140	10	At1g72520	LOX4	629	103
At5g62000	ARF2	135	15	At3g22400	LOX5	220	72
At1g19180	At1g19180	5271	511	At1g67560	LOX6	429	105
At3g44860	At3g44860*	2283	521	At1g32640	MYC2	1638	80
At3g23240	AtERF-1	49	11	At3g44300	NIT2*	1304	143
At5g07010	AtSt2a	279	31	At2g06050	OPR3	774	112
At1g05180	AXR1	497	15	At4g17500	ORA1	982	219
At3g23050	AXR2/IAA7	2134	281	At2g22200	ORA19	18	3
At2g02560	CAND1/ETA2	426	28	At5g47220	ORA2	654	142
At5g05170	CESA3	2028	178	At5g47230	ORA31	570	107
At2g39940	COI1	268	9	At4g34410	ORA33	3451	248
At1g22920	CSN5B	715	67	At3g15210	ORA37	1521	203
At4g39950	CYP79B2	904	407	At2g44840	ORA4	904	78
At2g22330	CYP79B3	338	148	At1g43160	ORA44	855	257
At4g31500	CYP83B1/SUR2	762	191	At1g74930	ORA47	1363	115
At2g14960	GH3.1	196	35	At1g06160	ORA59	10	2
At4g03400	GH3.10	42	4	At5g61890	ORA63	183	33
At2g46370	GH3.11	1089	101	At5g13330	ORA68	173	31
At5g13320	GH3.12	7	3	At5g07310	ORA71	32	4
At5g13350	GH3.13	28	5	At1g12630	ORA91	54	5
At5g13360	GH3.14*	89	15	At5g44420	PDF1.2	34	6
At5g13380	GH3.16	45	5	At1g23080	PIN7	58	18
At1g28130	GH3.17	593	81	At1g13320	PP2a	720	24
At1g48670	GH3.18	29	8	At1g13320	PP2a	720	24
At1g48660	GH3.19	6	1	At5g20570	RBX1	1226	50
At2g37390	GH3.2	94	20	At4g36800	RCE1	228	30
At1g48690	GH3.20	4	1	At4g11260	SGT1b	692	26
At2g23170	GH3.3	48	22	At2g20610	SUR1	389	64
At1g59500	GH3.4*	104	59	At1g72260	Thi2.1	48	8
At4g27260	GH3.5	317	53	At3g62980	TIR1	478	52
At5g54510	GH3.6	246	50	At3g54640	TSA1/TRP3	820	30
At1g23160	GH3.7	433	242	At2g23260	UGT84B1	8	2
At5g51470	GH3.8	80	44	At5g24780	VSP1*	31	6
At2g47750	GH3.9	40	4	At1g80840	WRKY40	4098	258
At3g04720	HEL /PR4	507	95	At4g32540	YUCCA	70	5
At4g15440	HPL	37	3	At4g13260	YUCCA2	94	6
At4g14560	IAA1	613	70	At5g43890	YUCCA-like	282	41

Tab. 7.7: Wurzelspezifische Expressionsanalyse

Expressionsanalyse von insgesamt 96 Genen. Angegeben sind Mittelwerte der relativen Expressionsintensitäten über 14 Subzonen sowie die Standardfehler. Die Rohdaten wurden der AREX Datenbank (<http://www.arexdb.org/database.jsp>) entnommen (*Array-Oligonukleotidsonde zeigt Homologie zu mehr als einem Genprodukt).

Danksagung

Von den vielen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer, Herrn Prof. Dr. Claus Wasternack, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, dieses vielseitige Thema bearbeiten zu dürfen, bedanken. Ich fand in ihm stets einen interessierten und konstruktiven Diskussionspartner und bin sehr dankbar für die Unterstützung, gerade auch in einer für mich schwierigen Zeit. Vielen Dank für das in mich gesetzte Vertrauen und die Erfahrungen, die ich sammeln durfte.

Ich möchte mich sehr herzlich bei Otto Miersch und Birgit Ortel für die Durchführung der vielen Jasmonatbestimmungen bedanken, die im Laufe der Zeit zusammengekommen sind. Das war wirklich eine enorme Hilfe! Frau Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller (TU Dresden) möchte ich herzlich für die Durchführung der Auxinbestimmung danken. Irene Stenzel sei dafür gedankt, dass sie mir die Einarbeitung in das Thema erleichtert und mir viele grundlegende molekularbiologische Methoden beigebracht hat. Bettina Hause möchte ich herzlich für Hilfestellungen bei den Fragen zu mikroskopischen Techniken und die vielen konstruktiven Diskussionen danken. Sabine Rosahl und Lore Westphal möchte ich für die vielen fruchtbaren Diskussionen, wertvollen Tips und motivierenden Gespräche danken – das hat immer sehr ermutigt! Einen ganz herzlichen Dank auch an Bethany Zolman für die nette Zusammenarbeit bei den β -Oxidationsmutanten (Thanks!).

Ein besonderer Dank gilt Petra, Dani, Ulrike, Stef und Jana. Ihr habt nicht nur durch euer fleißiges Korrekturlesen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, vielmehr noch hat mich eure Freundschaft beflügelt. Danke, dass ihr immer für mich da seid. Durch euch war eine schwierige Zeit weniger hart und ihr schafft es immer wieder, auch in dunkle Tage warme und bunte Stunden zu bringen. Danke, dass ihr ein Teil meines Lebens seid!

Ich möchte allen Mitarbeitern des IPBs und besonders den Mitgliedern der AG Jasmonatwirkungsweise danken. Ihr habt für ein tolles Arbeitsklima gesorgt! Besonderer Dank gilt Elke Hillert und den Diplomanden, Praktikanten und Hiwis, die im Laufe der Zeit auf die eine oder andere Weise an den Arbeiten beteiligt waren. Ein herzliches Dankeschön auch an die Mitarbeiter der Gärtnerei und der administrativen Dienste. Besonders erwähnen möchte ich hier Christine Kaufmann, Annett Kohlberg, Holger Bartz und Kerstin Balkenhohl. Weiterhin möchte ich Michael Lattorff für die Hilfe bei der Einarbeitung in die Biostatistik und Ingo Hofmann für die Hilfestellung beim Luciferaseassay danken.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Familie: Meiner Tochter Charlotte, meinen Eltern Annelly und Jürgen, meinen Großeltern Marianne, Erich und Friedchen sowie meinen „Schwiegereltern“ Peter und Maria, von denen leider nicht alle die Fertigstellung dieser Arbeit erleben durften. Auch allen anderen Mitgliedern meiner Familie sei herzlich gedankt. Ihr alle erfüllt mein Leben mit Freude und Wärme und ich bin Euch unendlich dankbar für Eure Liebe und Unterstützung. Es ist wunderbar, ein Teil dieser Familie zu sein!

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle, den 08.01.2007

Carolin Delker

Lebenslauf

Persönliche Informationen:

Name: Carolin Delker
Geb.: 15.05.1975 in Lemgo
Familienstand: ledig, ein Kind

Werdegang:

09/1981 - 07/1994 Schulausbildung (Grundschule und Gymnasium)
09/1991 - 07/1992 Hopewell Valley High School, Hopewell; New Jersey, USA
07/1994 Abitur am Marianne-Weber-Gymnasium, Lemgo
10/1994 - 8/2000 Biologiestudium an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fächer: Zoologie, Genetik, Geologie, Botanik
01/2000 - 08/2000 Diplomarbeit in der AG Entwicklungsbiologie am Institut für Zoologie (Prof. Dr. G. Moritz). Thema: ITS-RFLP-Analyse zur Frühdiagnostik von Schad-Thysanopteren
10/2000 – 04/2002 Arbeit zur Vektorspezifität von Thysanopteren gefördert durch Graduiertenstipendium des Landes Sachsen-Anhalt
seit 05/2002 Promotionsstelle in der AG Jasmonatwirkungsweise am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie (Prof. Dr. C. Wasternack).

Publikationen:

Delker, C.; Stenzel, I.; Hause, B.; Miersch, O.; Feussner, I. und Wasternack, C. (2006). Jasmonate Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, Products, Regulation. *Plant Biology*(3): 297-306.