

Untersuchungen zur Jasmonat-Signaltransduktion
in *Arabidopsis thaliana*
anhand des Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21*

Dissertation

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

vorgelegt der

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

von

Stephan Bau

geboren am 2. November 1969 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Elmar Wahle
3. PD Dr. Bernd Weißhaar

Halle (Saale), den 26. Januar 2001

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Symbole

| | |
|----------------|-----------------------------------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| ∅ | Durchmesser |
| Δ | Deletion |
| μ | Mikro (10 ⁻⁶) |
| 2-ODDs | 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen |
| 5'-UTR | 5'-nicht-translatierter Bereich |
| A | Alanin oder Adenin oder Ampere |
| ABA | Abscisinsäure |
| Abb. | Abbildung |
| ACC | 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| <i>Atjrg21</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> Jasmonat-reguliertes Gen 21 |
| <i>Atvsp</i> | Gen für <i>Arabidopsis thaliana</i> Vegetatives Speicherprotein |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| c | Centi (10 ⁻²) |
| C | Cystein oder Cytosin |
| C21 | bezogen auf cDNA <i>Atjrg21</i> |
| CaMV | „cauliflower mosaic virus“ |
| cDNA | „copy DNA“ |
| Ci | Curie |
| cM | Centimorgan |
| coi | „coronatine-insensitive“ |
| D | Asparaginsäure |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DKFZ | Deutsches Krebsforschungszentrum |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| E | Glutaminsäure |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure, Natriumsalz |
| EMS | Ethylmethansulfonat |
| et al. | „et alii“ bzw. und andere |
| F | Phenylalanin |
| <i>fad</i> | Fettsäuredesaturasegen |
| FR | Frisch bzw. unbehandelt |
| Fus | Fusion |
| G | Glycin oder Guanin |
| g | Gramm oder Fallbeschleunigung g=9,81m/s ² |
| G21 | bezogen auf gDNA <i>Atjrg21</i> |
| GA | Gibberellin A ₃ |
| GBFs | G-Box-bindende Faktoren |
| gDNA | genomische DNA |
| GG | Glycerylglyphosat |
| Glc | Glucose |
| Gly | hier Glycerol |
| GUS | β-Glucuronidase |
| h | Stunde(n) |
| H | Histidin |
| hnRNA | „heterogeneous nuclear RNA“ bzw. heterogene Kern-RNA |

| | |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|
| HSA | humanes Serumalbumin |
| I | Isoleucin |
| IAA | Indolyllessigsäure |
| IPB | Institut für Pflanzenbiochemie Halle |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid |
| ISR | „induced systemic resistance“ bzw. induzierte systemische Resistenz |
| JA | Jasmonsäure |
| JA-Ile | Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat |
| jar | „jasmonate-resistent“ |
| jin | „jasmonate-insensitiv“ |
| JM | Jasmonsäuremethylester bzw. Methyljasmonat |
| <i>jrg</i> | Jasmonat-reguliertes Gen |
| K | Lysin |
| kb | Kilobase(n) |
| kDa | Kilodalton |
| KF | Kulturfiltrat |
| l | Liter |
| L | Leucin |
| M | Methionin oder molar oder Marker |
| m | Milli (10^{-3}) oder Meter |
| MAP- | „mitogen-activated protein-“ |
| Mb | Megabase(n) |
| MDL | Max-Delbrück-Laboratorium |
| min | Minute(n) |
| mRNA | „messenger RNA“ |
| MU | 4-Methyl-umbelliferon bzw. 7-Hydroxy-4-methylcumarin |
| MUG | 4-Methyl-umbelliferyl- β -D-glucuronid |
| Mut | Mutation |
| n | Nano (10^{-9}) |
| N | Asparagin |
| NOS | Nopalinsynthase |
| O/N | über Nacht |
| OD | optische Dichte |
| P | Prolin |
| p | Pico (10^{-12}) |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCIA | Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) |
| PCR | „polymerase chain reaction“ bzw. Polymerasekettenreaktion |
| Pdf | „plant defensin“ |
| PEG | Polyethylenglycol |
| PEH | Phosphonsäuremonoesterhydrolase |
| <i>pehA</i> | Phosphonsäuremonoesterhydrolase-Gen |
| pfu | „plaque forming unit“ bzw. Plaque bildende Einheit |
| <i>pin</i> | Gen für Proteinaseinhibitor |
| PIN | Proteinaseinhibitor |
| pji | potenziell Jasmonat-insensitiv |
| Pos | Position |
| PR | „pathogenesis related“ |
| Q | Glutamin |
| R | Arginin |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |

| | |
|--------|--------------------------------------------------------------------|
| s | Sekunden |
| SA | Salicylat |
| SAR | „systemic acquired resistance“ bzw. systemisch erworbene Resistenz |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| Sor | Sorbitol |
| Suc | Saccharose |
| T | Threonin oder Thymin |
| Tab. | Tabelle |
| T-DNA | Transfer-DNA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin |
| Thi | Thionin |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| U | Uracil oder Unit(s) bzw. Einheit(en) |
| V | Valin oder Volt |
| v/v | Verhältnis Volumen zu Volumen |
| Vol. | Volumenanteil |
| W | Tryptophan oder Watt oder Wasser |
| w/v | Verhältnis Gewicht zu Volumen |
| WT | Wildtyp |
| X-Gluc | 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid |
| Y | Tyrosin |
| YAC | „yeast artificial chromosome“ |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Jasmonat als Signalstoff | 7 |
| 1.2 Funktion der Jasmonate in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 10 |
| 1.3 Anliegen der Arbeit | 13 |
| 2 Material und Methoden | 15 |
| 2.1 Pflanzenanzucht und -behandlung | 15 |
| 2.1.1 Pflanzenanzucht | 15 |
| 2.1.2 Pflanzenbehandlung | 15 |
| 2.1.3 Stabile Transformation mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 15 |
| 2.1.4 Sterilisation von <i>Arabidopsis thaliana</i> - Samen | 16 |
| 2.1.5 Mutagenese von Saatgut | 16 |
| 2.1.6 Selektion Jasmonat-insensitiver Mutanten (Mutantenscreen) | 16 |
| 2.2 Bakterienstämme / Bakterienanzucht und -behandlung | 17 |
| 2.2.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme | 17 |
| 2.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i> | 17 |
| 2.2.1.2 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 17 |
| 2.2.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -Stämme | 17 |
| 2.2.2.1 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 18 |
| 2.2.2.2 Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien | 18 |
| 2.3 Isolation von Nukleinsäuren | 18 |
| 2.3.1 Isolation von RNA | 18 |
| 2.3.2 Isolation von DNA | 19 |
| 2.3.2.1 Extraktion von Pflanzen-DNA für die PCR | 19 |
| 2.3.2.2 Isolation von Phagen-DNA | 19 |
| 2.3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA | 19 |
| 2.3.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen | 20 |
| 2.4 Proteintechniken | 20 |
| 2.4.1 Proteinisolation | 20 |
| 2.4.2 Proteinüberexpression und Affinitätsreinigung | 20 |
| 2.4.3 Antikörperproduktion | 21 |
| 2.4.4 Proteinquantifizierung | 21 |
| 2.4.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford | 21 |
| 2.4.4.2 Proteinbestimmung nach Esen | 21 |
| 2.5 Anreicherung genomischer <i>Atjrg21</i> -Klone | 21 |
| 2.6 Elektrophorese- und Transfertechniken | 22 |
| 2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese | 22 |
| 2.6.2 DNA-Transferblot (Southern-Blot) | 22 |
| 2.6.3 Plaquelift | 22 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.6.4 RNA-Agarosegelelektrophorese | 22 |
| 2.6.5 RNA-Transferblot (Northern-Blot) | 23 |
| 2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 23 |
| 2.6.7 Protein-Transferblot und Antikörpernachweis (Western-Blot) | 23 |
| 2.7 Hybridisierung mit markierten Sonden | 24 |
| 2.8 DNA-Sequenzierung | 25 |
| 2.8.1 Sequenzierreaktion und Sequenziergel | 25 |
| 2.8.2 Sequenzanalyse | 25 |
| 2.9 Transgennachweis | 25 |
| 2.9.1 GUS-Assay | 25 |
| 2.9.1.1 Fluorometrische Quantifizierung der GUS-Aktivität | 25 |
| 2.9.1.2 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität | 26 |
| 2.9.1.3 Transgennachweis mittels PCR | 26 |
| 2.9.2 Luciferase-Enzymassay | 26 |
| 2.10 Klonierungstechniken | 27 |
| 2.10.1 Vektoren | 27 |
| 2.10.2 Site Directed Mutagenesis | 28 |
| 2.10.3 Exonulease | 28 |
| 2.10.4 Primer Extension | 29 |
| 2.11 Oligonukleotide | 29 |
| 2.12 Anmerkungen | 30 |
| 3 Ergebnisse | 31 |
| 3.1 Expression der <i>Atjrg21</i> -mRNA | 31 |
| 3.2 Überexpression von AtJRG21-Protein in <i>E. coli</i> | 35 |
| 3.3 Isolierung genomischer <i>Atjrg21</i> -Klone | 37 |
| 3.4 Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche | 37 |
| 3.4.1 Sequenz und Genstruktur des <i>Atjrg21</i> -Gens | 37 |
| 3.4.2 AtJRG21-homologe Proteine | 40 |
| 3.4.3 Kartierung des <i>Atjrg21</i> -Genlokus | 43 |
| 3.5 Promotoranalysen - Suche nach regulatorischen Bereichen | 43 |
| 3.5.1 Promotor-GUS-Konstrukte (ProGUS, Pro509GUS) | 43 |
| 3.5.2 Einbezug des Exon/Intron-Bereichs (GFus) | 44 |
| 3.6 Deletionsanalysen | 45 |
| 3.6.1 Deletion des ersten Introns ($\Delta 1$) | 45 |
| 3.6.2 Deletion des zweiten Introns ($\Delta 2$) | 46 |
| 3.6.3 Deletion beider Introns ($\Delta 12$) | 46 |
| 3.6.4 Einfluss des Exon-Bereiches (CFus) | 46 |
| 3.6.5 Vergleich der Deletionsanalysen | 46 |
| 3.7 Einfluß Intron-lokalisierter G-Boxen | 49 |
| 3.8 Sind Intronsequenzen ausreichend für Jasmonat-Induzierbarkeit? | 51 |
| 3.9 Isolierung potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten | 53 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.10 Jasmonat-regulierte Luciferaseaktivität | 59 |
| 4 Diskussion | 61 |
| 4.1 <i>Atjrg21</i> -Expression | 61 |
| 4.2 Intron-lokalisierte G-Boxen sind notwendig für die Regulation des <i>Atjrg21</i> | 64 |
| 4.3 Betrachtungen zur <i>Atjrg21</i> -Genstruktur und -funktion | 69 |
| 4.4 Suche nach Jasmonat-insensitiven Mutanten | 71 |
| 4.5 Aussichten | 74 |
| 5 Zusammenfassung | 75 |
| 6 Literaturverzeichnis | 76 |
| 7 Anhang | 90 |
| 7.1 Der genomische <i>Atjrg21</i> -Klon pG21-5/2 | 90 |
| 7.2 Sequenzen <i>Atjrg21</i> -homologer Gene | 94 |
| 7.2.1 Genomische Sequenz <i>Atjrg22</i> | 94 |
| 7.2.2 Genomische Sequenz <i>Atjrg23</i> | 95 |
| 7.2.3 Genomische Sequenz <i>Atjrg25</i> | 96 |
| 7.3 Tabellen und Messwerte | 98 |
| 7.4 Farbtafeln | 107 |

1 Einleitung

1.1 Jasmonat als Signalstoff

Pflanzen sind in vielen Aspekten der Entwicklung, Morphologie und Biochemie einzigartig. Ihr Stoffwechsel wird durch photosynthetische Prozesse und einen ausgedehnten Sekundärstoffwechsel geprägt. Sie besitzen nicht die Fähigkeit der freien Ortsbewegung und sind gerade deshalb ständig wechselnden biotischen und abiotischen Reizen ausgesetzt. Für die Wechselwirkung mit der Natur und Wahrnehmung dieser Reize verfügen Pflanzen über spezielle Rezeptorsysteme und pflanzliche Signalstoffe, die eine Reizantwort und Reiztoleranz vermitteln. Man bezeichnet diese Signalstoffe als Pflanzenwachstumsregulatoren oder Phytohormone. Die Jasmonsäure und ihre Derivate, allgemein als Jasmonate bezeichnet, bilden eine Klasse von Phytohormonen. Sie sind an der Regulation vielfältiger Prozesse beteiligt und seit zwei Jahrzehnten Gegenstand pflanzenphysiologischer Untersuchungen.

Dem menschlichen Geruchssinn und dem intensiven Duft des Jasmins ist wohl unser ursprüngliches Interesse an den Jasmonaten zuzuschreiben. Unserem Beobachtungssinn ist es wiederum zu verdanken, dass Jasmonate, über ihre Bedeutung als Duftstoffe hinaus, Interesse aus pflanzenphysiologischer Sicht erlangten. Der als Duftkomponente des ätherischen Öls von *Jasminum grandiflorum* L. isolierte Jasmonsäuremethylester (Demole et al., 1962) wurde Jahre später als Seneszenz-fördernde Substanz beschrieben (Ueda & Kato, 1980). Dieser Entdeckung folgten eine Vielzahl klassischer Phytohormon-Experimente, die die Applikation des Wirkstoffs und die Beschreibung der beobachteten Effekte beinhalteten. Beispielsweise wurden nach der Applikation von Jasmonaten hemmende Effekte beim Keimlingswachstum (Yamane et al., 1980; Dathe et al., 1981), Wurzelwachstum (Yamane et al., 1981; Staswick et al., 1992) und der Samenkeimung (Corbineau et al., 1988) sowie induzierende Effekte bei der Fruchtreifung (Saniewski et al., 1987), Knollenbildung (Pelacho & Mingo-Castel, 1991; Koda et al., 1991) und Rankenwindung (Falkenstein et al., 1991) beschrieben. In der kombinierten Verabreichung von Jasmonaten mit „klassischen“ Phytohormonen wie Abscisinsäure, Gibberellinen und Cytokininen fand man die für Pflanzenwachstumsregulatoren typischen synergistischen und antagonistischen Effekte (Sembdner & Klose, 1985). Die vielfältigen Effekte der Jasmonate und ihr Zusammenspiel mit den bekannten Phytohormonen führten frühzeitig zu der Vermutung, dass es sich hierbei um eine neue Gruppe von Phytohormonen handelt (Yamane et al., 1981; Sembdner & Klose, 1985).

Den Eigenschaften eines Phytohormons entsprechend findet man eine ubiquitäre Verbreitung der Jasmonate im Pflanzenreich (Meyer et al., 1984). Die Biosynthese dieser Cyclopentanonverbindungen ist in den pflanzlichen Oxylinstoffwechsel eingebettet (Vick & Zimmerman, 1983; Hamberg & Gardner, 1992; Abb. 1.1). Ausgangssubstrat ist Linolensäure, die in einer Lipoxygenasereaktion zur 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure umgewandelt wird. Die Allenoxidsynthase bildet nachfolgend das Allenoxid, die 12,13-Epoxyoctadecatriensäure. Diese wird von einer Allenoxidcyclase zu 12-Oxophytodiensäure cyclisiert. Eine 12-Oxophytodiensäurereduktase katalysiert nachfolgend die Reduktion der ringständigen Doppelbindung unter Bildung von 12-Oxophytoensäure. Nach drei terminalen β -Oxidationsschritten an der Carboxylseitenkette entsteht die (+)-7-iso-Jasmonsäure, die im Gleichgewicht mit der isomeren (-)-Jasmonsäure steht. Als weitere, primäre Metabolisierungsschritte findet man vornehmlich eine Veresterung oder Aminosäurekonjugation an der Carboxylgruppe, die Reduktion der Doppelbindung und Hydroxylierungen in der Pentenylseitenkette und eine Reduktion der Ketogruppe (Übersicht in Sembdner & Parthier, 1993). Der Vergleich von Struktur und biologischer Aktivität verschiedener Jasmonsäurederivate ist schwierig, da man hier deutliche Unterschiede in Bezug auf die untersuchte Reaktion und Pflanzenart findet. Allgemein gelten die (+)-7-iso-Jasmonsäure und ihr Methylester als aktivste Substanzen (Herrmann et al., 1987), aber auch Biosynthesestufen wie die 12-Oxophytodiensäure

(Weiler et al., 1993; Bleichert et al., 1995) oder das bakterielle Jasmonatanalogon Coronatin (Weiler et al., 1994) zeigen der Jasmonsäure ähnliche Effekte.

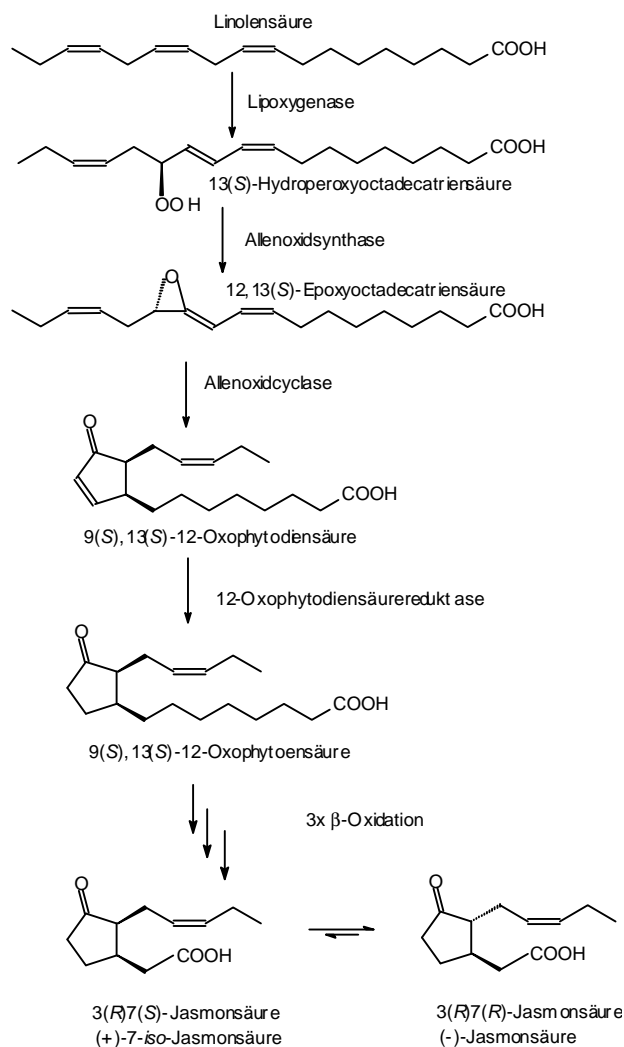


Abb. 1.1: Biosynthese der Jasmonsäure

Dargestellt ist die Biosynthese der Jasmonsäure ausgehend von der Linolensäure (nach Hamberg & Gardner, 1992). Im unteren Teil der Abbildung ist das Gleichgewicht der beiden natürlich vorkommenden Jasmonsäure-Isomere abgebildet.

In Struktur und Biosynthese besitzen die Jasmonate enge Verwandtschaft zu den proinflammatorischen Prostaglandinen der Säugetiere (Hamberg & Gardner, 1992). Dementsprechend postulierte man eine Funktion der Jasmonate als zelluläre Regulatoren von Wund- und Abwehrreaktionen (Farmer & Ryan, 1992). Erste Indizien für eine Funktion der Jasmonate in der Regulation der differentiellen Genexpression waren Änderungen im Proteinmuster und die Akkumulation spezifischer Proteine in Jasmonat-behandelten Gerstenblattsegmenten (Weidhase et al., 1987a). Die zugehörigen Jasmonat-regulierten Gene codieren u.a. für ein Thionin und ein Ribosomen-inaktivierendes Protein. Beiden Proteinen wurde eine antimikrobielle Wirkung zugewiesen (Andresen et al., 1992; Chaudhry et al., 1994).

Weitere, prominente Vertreter Jasmonat-regulierter Gene sind Gene von Proteinaseinhibitoren (PIN) aus Kartoffel und Tomate (Peña-Cortés et al., 1992; Farmer et al., 1992). Bereits Anfang der siebziger Jahre wurde beobachtet, dass Tomaten- und Kartoffelpflanzen nach mechanischer Verwundung oder Schädigung durch Insektenfraß Proteinaseinhibitoren akkumulieren (Green & Ryan, 1972). Die Bildung dieser als PIN I und PIN II bezeichneten Serinproteinaseinhibitoren ist Bestandteil einer Abwehrstrategie der Pflanze zum Schutz vor Schädlingen. Die starke Akkumulation an Proteinaseinhibitoren hemmt den proteolytischen Aufschluß der Nahrung und macht die Pflanze „geschmacklich“ unattraktiv für den weiteren Befall (Ryan, 1990). Eine konstitutive Expression dieser Proteinaseinhibitoren vermittelt transgenen Pflanzen erwartungsgemäß eine erhöhte Resistenz gegenüber schädigenden Insekten (Johnson et al., 1989).

Für die Expression der Proteinaseinhibitoren findet man ein komplexes und effizientes Regulationssystem. Die konstitutive Expression großer Mengen an Proteinaseinhibitoren oder anderer Abwehrproteine wäre mit einem hohen energetischen Aufwand für die Pflanze verbunden. Dieser Aufwand kann zu Einbußen bei vegetativen und generativen Wachstumsprozessen führen und würde den Fortbestand der Pflanzenart gefährden. Erst die Schädigung der Pflanze führt zur Aktivierung der Proteinaseinhibitorgene (*pin1*, *pin2*) sowohl an der verwundeten Stelle, als auch in der gesamten Pflanze (Graham et al., 1986; Peña-Cortés et al., 1988).

Für die Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen stellte sich die Frage, welche pflanzlichen Signalstoffe an der lokalen und systemischen Aktivierung den *pin*-Gene in Kartoffel und Tomate beteiligt sind (Ryan, 1992). Beispielsweise induzieren Oligogalacturonide als pflanzliche Zellwandfragmente, die durch enzymatischen Abbau nach Verwundung der Pflanze entstehen, die PIN-Expression, sind aber nicht fähig, die systemische Reaktion zu vermitteln (Bishop et al., 1981, 1984; Baydoun & Fry, 1985; Bergey et al., 1999). Weitere Induktoren der PIN-Expression sind die Phytohormone Abscisin- und Jasmonsäure (Peña-Cortés et al., 1989, 1991, 1992; Farmer et al., 1992). Die Applikation des jeweiligen Hormons führt, verglichen mit der Wundreaktion, zu einer vielfach höheren Akkumulation von Proteinaseinhibitoren. Für das flüchtige Methyljasmonat wurde außerdem gezeigt, dass eine Applikation über die Gasphase die PIN-Expression induziert. Man postulierte daher eine Funktion des Methyljasmonats als Kommunikationssignal zwischen benachbarten Pflanzen (Farmer & Ryan, 1990; Farmer et al., 1992). Auf der Suche nach einem systemischen Signalstoff wurde ein 18 Aminosäurereste langes Peptid isoliert, genannt Systemin (Pearce et al., 1991). Systemin ist höchst wirksam in der Aktivierung der *pin*-Gene und scheint an übergeordneter Stelle pflanzliche Abwehrgene zu regulieren (Bergey et al., 1996). Die Aktivierung der *pin*-Gene durch Systemin ist abhängig von den Phytohormonen ABA und JA. In ABA-defizienten Pflanzen oder bei blockierter JA-Biosynthese erfolgt keine Aktivierung der *pin*-Gene durch Systemin (Peña-Cortés et al., 1995; Doares et al., 1995a, 1995b). In Wildtyppflanzen induziert Systemin einen Anstieg des endogenen ABA- und JA-Gehalts. Die Aktivierung der *pin*-Gene durch ABA, wie auch durch Oligogalacturonide, ist wiederum an die JA-Biosynthese gebunden (Peña-Cortés et al., 1993; Doares et al., 1995b). Untersuchungen mit JA-Biosynthesemutanten von Tomate und Kartoffel zeigen entsprechend Ausfälle in der lokalen und systemischen Aktivierung der *pin*-Gene und der Resistenz gegenüber Insekten (Howe et al., 1996; Royo et al., 1999). Als weiteres Phytohormon ist Ethylen an der Aktivierung der *pin*-Gene beteiligt. Ethylen allein ist nicht fähig, die *pin*-Gene zu aktivieren, ist aber essentiell für die Jasmonat-vermittelte Aktivierung (O'Donnell et al., 1996).

Diese Resultate verdeutlichen die zentrale Rolle der Jasmonate bei der Aktivierung der *pin*-Gene. Dies steht wiederum in Analogie zur Funktion und Wirkungsweise der tierischen Prostaglandine (Bergey et al., 1996). Auf zellulärer Ebene beinhaltet eine Prostaglandin- als auch eine Jasmonat-vermittelte Abwehrreaktion die Beteiligung von Signalpeptiden, Änderungen im cytosolischen Kalziumspiegel und die Aktivierung von MAP-Kinasen und Phospholipasen.

In Bezug auf Signaltransduktionsprozesse hin zur Aktivierung der *pin*-Gene wurde als potenzieller Systeminrezeptor ein 160 kDa-Protein identifiziert (Scheer & Ryan, 1999). Weiterhin ist nach exogener Applikation von Systemin ein transienter Anstieg der zellulären Ca^{2+} -Konzentration (Moyen et al., 1998) und die Aktivierung von Calmodulingenen zu beobachten (Bergey & Ryan, 1999). Die Funktion von Calmodulin besteht in der Bindung von Kalziumionen, Bildung eines aktiven Ca^{2+} /Calmodulin-Komplexes und nachfolgender Stimulierung regulatorischer Proteine wie Kinasen, Phosphatasen, Lipasen und Ionentransportern. Entsprechend findet man als Antwort auf die Verwundung oder den Insektenbefall von Tomatenpflanzen die Aktivierung einer MAP-Kinase. Ebenso ist nach der exogenen Applikation des pflanzlichen Signalpeptids Systemin die Aktivierung dieser MAP-Kinase innerhalb weniger Minuten nachweisbar (Stratmann & Ryan, 1997). Als Hinweis über die Beteiligung von Lipasen an der Aktivierung der *pin*-Gene findet man nach der Verwundung der Pflanze oder nach der exogenen Applikation von Systemin erhöhte Phospholipaseaktivität. Die Funktion dieser Phospholipase A_2 wird in der Freisetzung der JA-Biosynthesevorstufe Linolensäure aus Lipiden angesehen (Narváez-Vásquez et al., 1999).

Die Studien zur Regulation der Proteinaseinhibitorgene in Kartoffel und Tomate gehören zu den bestuntersuchten Systemen in Bezug auf die Wundreaktion und Insektenabwehr und hiermit verbunden auf die Wirkungsweise und Funktion der Jasmonate. Ähnliche Beobachtungen wurden aber auch von anderen Pflanzenarten berichtet. Insgesamt offenbaren diese Ergebnisse ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalstoffe und regulatorischer Proteine, die an der Aktivierung von Abwehrgenen beteiligt sind.

Als weiterer, Jasmonat-vermittelter Abwehrmechanismus sei an dieser Stelle kurz die Bildung antimikrobieller Metabolite, sog. Phytoalexine, beschrieben. Mit der Applikation pilzlicher Zellwandfragmente, eines Elicitors, zu verschiedenen Zellkulturen wurde eine Pilzinfektion der Pflanze simuliert. Als Reaktion dieser Elicitierung findet man eine verstärkte Bildung von Sekundärmetaboliten. Als pflanzlicher Signalstoff dieser Abwehrreaktion wurden Jasmonate identifiziert (Gundlach et al., 1992; Mueller et al., 1993). Entsprechend kann man mit der exogenen Applikation von Jasmonaten die gleiche Reaktion induzieren. Die Wirkung der Jasmonate beruht in der Genregulation wichtiger Biosynthesenzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, die beispielsweise an der Bildung antimikrobieller Flavonoide, Isoprenoide oder Alkaloide beteiligt sind (Dittrich et al., 1992; Choi et al., 1994; Frick & Kutchan, 1999).

Weitere Aspekte zur Funktion und Wirkungsweise von Jasmonaten sollen im nachfolgenden Kapitel anhand der Untersuchungen am Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* beschrieben werden.

1.2 Funktion der Jasmonate in *Arabidopsis thaliana*

Die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ist nicht erst seit dem Durchbruch molekularbiologischer Arbeitstechniken Gegenstand pflanzlicher Untersuchungen. Auf der Suche nach einem Modellobjekt für seine Studien über Wuchsstoffe stößt Laibach (1943) auf *Arabidopsis* und die Vorzüge dieser Pflanze. Er beschreibt *Arabidopsis* als ein Objekt, „das für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen sehr geeignet ist und in mancher Beziehung dem Paradeobjekt der Genetiker, der *Drosophila*, nahe kommt“. „Es beruht das hauptsächlich auf der hohen Fruchtbarkeit, der raschen Entwicklung, der leichten Kultivierbarkeit, geringen Raumbeanspruchung, den vielen Rasseunterschieden und der geringen Chromosomenzahl.“

Arabidopsis thaliana ist eine sehr kleine Pflanze und wird allgemein als unscheinbares Unkraut beschrieben. *Arabidopsis* hat eine kurze Generationszeit von ca. 6 Wochen und bildet bis zu 10.000 Samen pro Pflanze. Weiterhin besitzt *Arabidopsis* ein für Pflanzen kleines Genom von ungefähr 100 Mb, was mit der Genomgröße des Nematoden *Caenorhabditis elegans* vergleichbar ist (Hwang et al., 1991). Ein weiterer, wesentlicher Vorteil ist die gute

Transformierbarkeit von *Arabidopsis* durch *Agrobacterium*. Diese Eigenschaften machen *Arabidopsis* auch in neuerer Zeit zum Modellorganismus für das Studium grundlegender molekulargenetischer Prozesse dikotyle Pflanzen. Die Attraktivität von *Arabidopsis* für pflanzliche Studien potenziert sich durch die Zunahme an Information über diese Pflanze. Dies beinhaltet nicht nur vielfältige Publikationen, sondern auch den Zugang zu speziellen Arbeitstechniken, eine große Sammlung an Mutanten und nicht zuletzt einen hohen Grad an Sequenzinformation. Das *Arabidopsis*-Genom ist Bestandteil eines Genom-Sequenzierprojekts und wird in naher Zukunft vollständig sequenziert sein.

Für die Untersuchung von Jasmonat-regulierten Prozessen und der JA-Biosynthese hat sich *Arabidopsis* als Untersuchungsobjekt bewährt. Mit der Isolierung von Jasmonat-regulierten Genen, JA-Biosynthesegenen und Untersuchungen an Jasmonat-insensitiven sowie Jasmonat-defizienten Mutanten wurden grundlegende Erkenntnisse über die Funktion und Wirkung der Jasmonate gewonnen.

Zu den funktionell bekannten Jasmonat-regulierten Genen in *Arabidopsis* gehören die Gene zweier Lipoxygenasen (*Atlox1*, Melan et al., 1993; *Atlox2*, Bell & Mullet, 1993). Eine exogene Applikation von Jasmonat als auch die Verwundung der Pflanzen oder eine Pathogeninfektion führen zur Akkumulation der korrespondierenden Transkripte. Da Lipoxygenasen Schlüsselenzyme des Oxylinstoffwechsels sind, wurde in Bezug auf die Aktivierung dieser Gene eine Beteiligung an Abwehrreaktionen und der Autoregulation der JA-Biosynthese postuliert. Der im Chloroplasten lokalisierten *AtLOX2* wurde aufgrund bestehender Modelle über die Lokalisation von JA-Biosynthesenzymen eine direkte Beteiligung an der Bildung von Jasmonsäure zugeschrieben. Die Kosuppression dieser Lipoxygenase in transgenen Pflanzen führt zum Ausfall des wundinduzierten Jasmonsäure-Anstiegs und zur verminderten Expression Jasmonat-regulierter Gene. In unverwundeten Pflanzen ist der Jasmonatgehalt im Vergleich zu Wildtyppflanzen unverändert (Bell et al., 1995).

Jasmonat-defiziente Mutanten konnten hingegen durch das Ausschalten von drei Fettsäuresaturasegenen (*fad3-2*, *fad7-2*, *fad8*) erzeugt werden. Die „triple *fad*“-Mutanten enthalten keine dreifach ungesättigten C₁₆- und C₁₈-Fettsäuren und sind dementsprechend nicht in der Lage Jasmonsäure zu bilden (McConn & Browse, 1996). Das Wachstum dieser Mutanten ist im Vergleich zu Wildtyppflanzen unbeeinflusst. Einziges phänotypisches Merkmal der „triple *fad*“-Mutanten ist ihre männliche Sterilität, welche sich spezifisch durch die Applikation von Jasmonat überwinden lässt. Ihrer Funktion als „Stresshormon“, d.h. der Beteiligung an der Regulation von Stresssituationen, werden die Jasmonate in weiteren Experimenten gerecht. In Versuchen mit schädigenden Insekten zeigen „triple *fad*“-Mutanten deutliche Einbußen in der Abwehr von Insekten im Vergleich zu Wildtyppflanzen oder Jasmonat-behandelten Mutanten (McConn et al., 1997). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen zur Funktion der Jasmonate bei der Insektenabwehr in Tomate und Kartoffel. Weiterhin zeigen „triple *fad*“-Mutanten eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Pflanzenpathogenen *Phytophthora mastophorum* und *Phytophthora irregulare* (Vijayan et al., 1998; Staswick et al., 1998).

Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Jasmonat-insensitiven Mutanten erzielt. Im Gegensatz zu Jasmonat-defizienten Mutanten lassen sich Jasmonat-insensitive Mutanten nicht durch exogen appliziertes Jasmonat komplementieren. Bisher sind vier Jasmonat-insensitive Mutanten beschrieben. Unter Ausnutzung der inhibierenden Effekte der Jasmonate auf das Wurzelwachstum konnten die Jasmonat-insensitiven Mutanten *jar1* („jasmonate-resistant“, Staswick et al., 1992), *jin1* und *jin4* („jasmonate-insensitive“, Berger et al., 1996) isoliert werden. Eine weitere Jasmonat-insensitive Mutante, *coi1* („coronatine-insensitive“), wurde aufgrund ihrer Insensitivität gegenüber dem *Pseudomonas-syringae*-Toxin und Jasmonatanalogon Coronatin selektiert (Feys et al., 1994). Alle vier Mutanten zeichnen sich durch eine größere Wurzellänge beim Wachstum auf Jasmonat-haltigem Medium und Änderungen in der Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene im Vergleich zu Wildtyppflanzen aus. Hierbei zeigt *coi1* die geringste Sensitivität gegenüber Jasmonat und die weitreichendsten

Effekte bei der Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene (Benedetti et al., 1995). Weiterhin ist *coi1* wie die „triple fad“-Mutanten männlich steril. Die *jar1* und *jln* Mutanten sind hingegen fertil.

Bisher ist *coi1* als einzige Mutante genetisch charakterisiert. Als Ort der Mutation wurde ein Gen kloniert, welches für ein Leucin-reiches Protein mit einer F-Box-Domäne codiert (Xie et al., 1998). F-Box-Proteine sind für die Rekrutierung von Proteinen für den Ubiquitin-abhängigen Proteinabbau verantwortlich (Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1997). Entsprechend wird vermutet, dass das COI1-Protein am Abbau regulatorischer Proteine beteiligt ist.

Ein weiteres Merkmal der *coi1*-Mutante ist die erhöhte Resistenz gegenüber dem Coronatin-produzierenden Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* (Feys et al., 1994). Diese Beobachtung widersprach dem damals vorherrschenden Modell über eine generelle Beteiligung der Jasmonate bei der Aktivierung von Abwehrgenen. Bei einer Infektion mit dem Pilz *Phytophthora mastophorum* findet man hingegen eine erhöhte Suszeptibilität der *coi1*-Mutante gegenüber diesem Pathogen (Vijayan et al., 1998). Dies ist konform mit den Untersuchungen bei den „triple fad“-Mutanten und spricht wiederum für eine Beteiligung von Jasmonaten bei der Pathogenabwehr. Ähnliche Ergebnisse wurden von Thomma et al. (1998) publiziert. Hier wird eine erhöhte Anfälligkeit der *coi1*-Mutante gegenüber den Pflanzenpathogenen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* beschrieben. Die Resistenz gegenüber *Peronospora parasitica* ist im Vergleich zum Wildtyp unbeeinflusst.

Diese Resultate zeigen, dass an der pflanzlichen Pathogenabwehr verschiedene Signalstoffe und Signalwege beteiligt sind. An dieser Stelle sei die Salicylsäure als „traditionelles“ Signalmolekül im Rahmen der Pathogenabwehr erwähnt (Übersicht in Dempsey et al., 1999). Salicylsäure ist für die Ausprägung einer systemischen Resistenz, der SAR, essentiell („systemic acquired resistance“, Ryals et al., 1996). Die SAR vermittelt nach einer lokalen Infektion die nachfolgende Resistenz der gesamten Pflanze gegenüber einem breiten Spektrum an Pathogenen. Diese Resistenz ist u.a. mit der Aktivierung der als „pathogenesis related“ beschriebenen PR-Gene verbunden (Uknes et al., 1992, 1993). Diese Salicylat-responsiven PR-Gene kodieren u.a. für hydrolytische, antimikrobielle Enzyme wie Glucanasen und Chitinasen. Analog hierzu ist eine Jasmonate-vermittelte Resistenz zu verstehen. Jasmonate sind ebenso an der Aktivierung von Genen beteiligt, welche direkt oder indirekt der Abwehr von Pathogenen dienlich sind. Hierzu zählen das *Thi2.1*- und das *Pdf1.2*-Gen, deren Cystein-reichen Genprodukten eine antimikrobielle Wirkung zugesprochen wird (Epple et al., 1995, 1997a, 1997b; Penninckx et al., 1996). Analog zu Tomate ist das Phytohormon Ethylen essentieller Bestandteil der durch Jasmonate vermittelten Abwehrreaktion (Alonso et al., 1999; Thomma et al., 1999). Entsprechend werden derzeit zwei verschiedene Signaltransduktionswege zur Pathogenabwehr diskutiert - ein Salicylat- und ein Jasmonat/Ethylen-abhängiger (Dong, 1998; Pieterse & van Loon, 1999). Die Aktivierung des jeweiligen Signalwegs hängt anscheinend von der Art des Pathogens und seiner Wirkungsweise ab (McDowell & Dangl, 2000). Biotrophe Pathogene, welche sich direkt aus lebenden Zellen ernähren, induzieren vornehmlich den Salicylat-abhängigen Abwehrmechanismus. Die Jasmonat/Ethylen-abhängige Abwehrreaktion wird hingegen durch nekrotrophe Pathogene induziert, d.h. durch Pathogene, die die Pflanze beim Aufschluss von Nahrungsquellen töten.

Über die Regulation verschiedener Signalwege, ihre Interaktion und die daran beteiligten Komponenten herrscht weitgehend noch Unklarheit. Wirkungsvolle Werkzeuge zur Aufklärung von Signaltransduktionswegen sind Mutanten. Mithilfe verschiedener Ansätze wurden bereits mehrere Mutanten mit verändertem Verhalten gegenüber diversen Pathogenen isoliert. Die Strategien zur Isolierung solcher Mutanten waren einerseits phänotypische Merkmale wie die erhöhte oder erniedrigte Resistenz, die Ausprägung von Krankheitssymptomen oder die Akkumulation von antimikrobiellen Phytoalexinen. Hierzu zählen beispielsweise die *eds*-Mutanten („enhanced disease susceptibility“; Glazebrook et al., 1996), *lsd*-Mutanten („lesions simulating disease resistance response“; Dietrich et al., 1994; Weymann et al., 1995), *pad*-Mutanten („phytoalexin-deficient“; Glazebrook & Ausubel, 1994) und die *pmr*-Mutanten

(„powdery mildew-resistant“; Vogel & Somerville, 2000). Andererseits führten molekularbiologische Ansätze über die Suche nach verändertem Expressionsverhalten von Reportergenen, welche durch Pathogen-responsive Promotoren reguliert werden, zur Isolierung von relevanten Mutanten. Hierbei wurden u.a. die *cpr*-Mutanten („constitutive expresser of PR genes; Bowling et al., 1994, 1997; Clarke et al., 1998) und die *npr1*-Mutante („non-expresser of PR genes“; Cao et al., 1994) isoliert. Weiterhin resultierten hieraus bereits sekundäre Ansätze, bei denen nach Mutationen gesucht wurde, welche den ursprünglichen Mutantenphänotyp kompensieren (Shah et al., 1999). Zur Gruppe der Mutanten mit veränderter Pathogenantwort zählen ferner, wenn auch unter anderen Gesichtspunkten isoliert, die Jasmonat- und Ethylen-Hormonmutanten. Ursprünglich aufgrund veränderter Reaktionen gegenüber dem Phytohormon isoliert, konnten später diese Defekte mit verändertem Abwehrverhalten gegenüber Pathogenen korreliert werden (Bent et al., 1992; Thomma et al., 1999).

Das Ziel solcher Mutantenanalysen ist die Charakterisierung des Mutantenallels und die Identifizierung regulatorischer Proteine sowie deren Einbindung in die pflanzliche Pathogenabwehr. Erste Ergebnisse mit Markergenen und verschiedenen Pathogenen zeigen, dass die pflanzliche Pathogenabwehr ein komplexes Zusammenspiel vieler Signalkomponenten ist. Weiterhin beweist das Auffinden allelischer Mutanten über verschiedene Ansätze, dass zentrale Elemente verschiedene Signalwege kontrollieren (Übersicht in Glazebrook, 1999).

1.3 Anliegen der Arbeit

Diese Arbeit ist in ein Projekt zur Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen bei der Aktivierung pflanzlicher Pathogenabwehrgene eingebunden. Jasmonate sind Bestandteil von Signaltransduktionsprozessen bei der Aktivierung von Abwehrmechanismen in Arabidopsis. Hierbei fungieren Jasmonate als Regulatoren der Genexpression. Jasmonat-regulierte Gene sind die Endglieder von Signaltransduktionsprozessen und an der Ausprägung der Reizantwort beteiligt. Durch die Isolierung Jasmonat-regulierter Gene und die Analyse ihrer Genprodukte lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion und Wirkungsweise von Jasmonaten ziehen. Unter diesem Gesichtspunkt wurde im Vorfeld dieser Arbeit mithilfe der Methode des „differential display“ (Liang & Pardee, 1992) und nachfolgendem Screening die cDNA eines Jasmonat-regulierten Gens aus Arabidopsis isoliert und charakterisiert (Bau, 1995; Löbler, 1996). Dieses Jasmonat-regulierte Gen 21 (*Atjrg21*) codiert für ein 41 kDa-Protein mit Homologie zu 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen. Die Funktion des *Atjrg21* ist unbekannt, jedoch ist eine Beteiligung an Abwehrreaktionen aufgrund bisheriger Studien über die Funktion von Jasmonaten in Arabidopsis und der Regulation dieses Gens anzunehmen.

Bei Northern-Analysen beobachtet man eine schnelle, transiente Akkumulation des *Atjrg21*-Transkripts nach Behandlung mit Methyljasmonat (Abb. 1.2). In allen Pflanzenteilen konnte durch Methyljasmonat eine Akkumulation des *Atjrg21*-Transkripts mit unterschiedlicher Intensität induziert werden. In unbehandeltem Pflanzengewebe ist unter diesen Bedingungen kein Transkript nachweisbar (Abb. 1.3).

Die cDNA des Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21* sollte im Rahmen dieser Arbeit als Marker und Werkzeug zur Untersuchung von Jasmonat-Signaltransduktionsprozessen dienen. Einerseits sollte in Northern-Analysen der Einfluss verschiedener Signalstoffe und Elicitoren auf die Aktivierung des *Atjrg21* getestet werden, um hierdurch Auskunft über an der Regulation beteiligte Signalwege zu bekommen. Andererseits sollten mit der Isolierung genomischer *Atjrg21*-Sequenzen die regulatorischen Genbereiche des *Atjrg21* erschlossen und charakterisiert werden. Die regulatorischen Genbereiche sollten zur Generierung von transgenen Pflanzen mit Jasmonat-regulierbaren Reportergenkonstrukten genutzt werden. Im Rahmen eines konditional letalen Screens sollten Pflanzen mit veränderter Reportergenexpression nach Jasmonatbehandlung isoliert werden. Diese potenziell Jasmonat-insensitiven Pflanzen sollen ein Ausgangspunkt für weitere, molekulare Studien von Jasmonat-Signaltransduktionsprozessen sein.

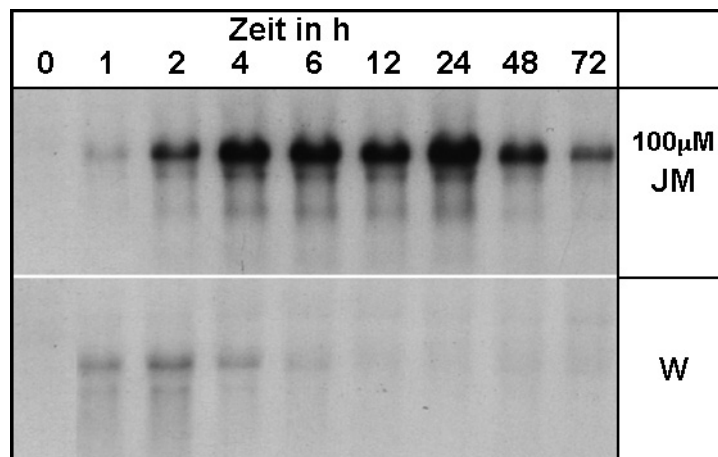


Abb. 1.2: Zeitliche Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA

Dargestellt ist ein Autoradiogramm von Northern-Analysen über die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in jungen Arabidopsispflanzen nach einer Behandlung mit 100 μM Methyljasmonat (JM) im Vergleich zu einer Behandlung mit Wasser (W) innerhalb eines Zeitraums von 72 Stunden (Bau, 1995). Von jeder Probe wurden 10 μg RNA aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde diente die ³²P-markierte cDNA.

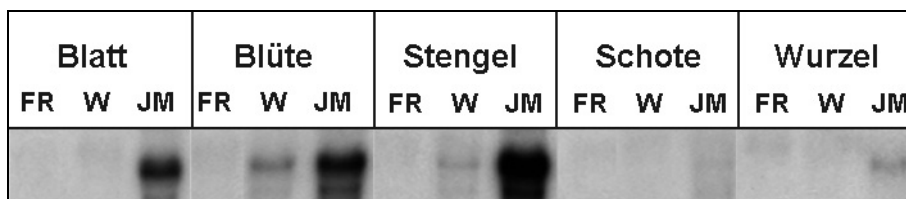


Abb. 1.3: Räumliche Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA

Dargestellt ist ein Autoradiogramm von Northern-Analysen zur Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in verschiedenen Geweben nach Behandlung für 24 h mit 100 μM Methyljasmonat (JM) im Vergleich zu Wasser-behandeltem (W) oder unbehandeltem Gewebe (FR). Von jeder Probe wurden 10 μg RNA aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde diente die ³²P-markierte cDNA.

2 Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht und -behandlung

2.1.1 Pflanzenanzucht

Die Anzucht von Arabidopsispflanzen erfolgte bei 24°C und einer Lichtstärke von 250 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ in klimatisierten Phytokammern. Für ein vegetatives Wachstum der Pflanzen dienen Kurztag-Bedingungen (8 h Tag/16 h Nacht) und Langtag-Bedingungen (16 h Tag/8 h Nacht) für generatives Wachstum. Das Kultursubstrat bestand aus einem Gemisch gleicher Teile Einheitserde und Sand.

Für alle Arbeiten wurde der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) verwendet.

2.1.2 Pflanzenbehandlung

Die Applikation von Phytohormonen und anderen Stressoren erfolgte durch ein Flottieren von Blättern oder anderen Pflanzengeweben auf wässriger Lösung in einer Lichtkammer unter konstantem Licht (120 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) und 25°C über definierte Zeitspannen.

Teilweise erfolgte eine Applikation von Methyljasmonat über das Besprühen von Pflanzen mit einer definierten, wässrigen Methyljasmonatlösung unter Zusatz von 0,2 % Tween® 20 (SERVA).

Verwundungsexperimente erfolgten an Blättern ca. 6 Wochen alter Kurztag-Pflanzen durch ein Quetschen eines Rosettenblattes längs zur Blattspreite mittels einer Venenzange. Die Pflanzen wurden 24 Stunden vor der Verwundung in die Lichtkammer gestellt und somit an diese Bedingungen adaptiert.

Die Gewinnung des für eine Behandlung der Pflanzen verwendeten Kulturfiltrats von *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae* (Stamm 247.61) erfolgte in einem Kartoffel-Dextrose-Medium (MERCK) bei 18°C unter Lichtausschluss für 4-6 Wochen bis zur Sporulierung des Pilzes. Das Kulturmedium wurde anschließend 10 Minuten bei 8000x g zentrifugiert und der Überstand durch einen 45 μm -Sterilfilter gefiltert und bei 4°C gelagert.

Die Pflanzenproben wurden unmittelbar nach Abbruch der Behandlung in flüssigem Stickstoff eingefroren und ggf. über längere Zeiträume bei -80°C gelagert.

Chemikalien für die Pflanzenbehandlung

(unter Angabe der allgemein verwendeten Konzentration und ihrer Herkunft):

(±)-Methyljasmonat (100 μM ; NIPPON ZEON)

(±)-cis,trans-Abscisinsäure (100 μM ; SIGMA)

Kinetin (100 μM ; DUCHEFA)

Gibberellin A₃ (100 μM ; SERVA)

Brassinolid (100 μM ; G. Adam, IPB)

Indolylessigsäure (100 μM ; MERCK)

1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (1 mM; SIGMA)

Natriumsalicylat (1 mM; SIGMA)

D(+)-Glucose (0,5 M; MERCK)

Silbernitrat (1 mM; MERCK)

(±)-Jasmonsäure (100 μM ; R. Kramell, IPB)

(-)-Jasmonsäure-L-Isoleucin-Konjugat (100 μM ; R. Kramell, IPB)

Glycerylglyphosat (125 μM ; MONSANTO)

2.1.3 Stabile Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Eine stabile Pflanzentransformation erfolgte über eine Vakuuminfiltration von Agrobakterien in adulte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Bechthold et al., 1993; Bent et al., 1998).

Hierfür wurden 500 ml YEB-Medium (siehe 2.2.2.1) mit je 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin und Rifampicin mit 10 ml einer Vorkultur des jeweiligen Agrobakterienstammes angeimpft und 24 h bei 28°C und 150 rpm angezogen. Die Agrobakterien wurden 10 Minuten bei 8.000x g pelletiert und in einem Liter Infiltrationsmedium resuspendiert.

Für die Vakuuminfiltration wurden die Blütenstände der zu infiltrierenden Pflanzen (T0-Generation) in das Agrobakterien-haltige Infiltrationsmedium ($OD_{600} \sim 1,0$) getaucht und nachfolgend für 15 Minuten in einem Exsikator einem Vakuum von 35 mbar ausgesetzt. Zur Regeneration wurden die Pflanzen anschließend für eine Nacht horizontal und abgedeckt in der Phytokammer gelagert. Nach zwei bis drei Wochen Wachstum unter Langtag-Bedingungen wurden die Samen der Pflanzen geerntet und für mindestens 4 Tage im Kühlschrank bei 4°C stratifiziert.

Zur Selektion transgener Pflanzen wurden Aliquots von 1000-2000 extern sterilisierter Samen mit 5 ml geschmolzenem, 0,3%igem Agar auf Gewebekulturschalen (\varnothing 15 cm) mit Selektionsmedium plattiert. Nach ein bis zwei Wochen Wachstum unter Langtag-Bedingungen wurden die Kanamycin-resistenten, nicht chlorotischen Pflanzen (T1-Generation) selektiert und zur weiteren Anzucht auf Erde/Sand umgesetzt.

Eine Kanamycin-Selektion zur Segregationsanalyse späterer Generationen erfolgte auf B5-Kan-Platten. Hierzu wurden ca. 50 Samen einer transgenen Linie plattiert und im Langtag angezogen.

Infiltrationsmedium (1 Liter):

½x MS-Salze (2,3 g; DUCHEFA)
1x B5-Salze mit Vitaminen (3,3 g; DUCHEFA)
20 g Saccharose
10 µl Benzylaminopurin (1 mg/ml im DMSO; SIGMA)
0,02 % Silwet L-77 (LEHLE SEEDS)

Selektionsmedium (1 Liter):

½x MS-Salze (2,3 g)
1x B5-Salze mit Vitaminen (3,3 g)
1,5 g Saccharose
8 g Agar
50 µg/ml Kanamycin (GIBCO BRL)

B5-Kan-Medium (1 Liter):

1x B5-Salze mit Vitaminen (3,3 g)
20 g Saccharose
8 g Agar
100 µg/ml Kanamycin

2.1.4 Sterilisation von *Arabidopsis thaliana*-Samen

Für die *in vitro* Anzucht von Arabidopsispflanzen wurden die Samen für zwei Minuten mit 70%igem Ethanol behandelt und nachfolgend 10 Minuten in einer Natriumhypochlorit-Lösung (ca. 5 % aktives Chlor, 0,15 % Tween® 20) geschüttelt. Die Samen wurden anschließend dreimal mit sterilem Wasser gewaschen.

2.1.5 Mutagenese von Saatgut

Für eine chemische Mutagenese von Arabidopsisssamen wurden Ansätze von 1000 Samen (ca. 20 mg) 16 Stunden in einer 0,1%igen Kaliumchloridlösung vorgequollen und anschließend in einer Lösung von 92 mM Ethylmethansulfonat (EMS; MERCK) in 0,1 M Na-Phosphat pH 5,0 und 5 % DMSO 3,5 Stunden mutagenisiert. Nachfolgend wurde 2x 15 Minuten mit einer 100 mM Natriumthiosulfatlösung und 2x 15 Minuten mit Wasser gewaschen. Das mutagenisierte Saatgut wurde auf zehn 9 x 9 cm große Töpfe (pro Ansatz) verteilt ausgesät. Samen jedes Topfes wurden separat geerntet und direkt zum Mutantenscreen der M2-Generation eingesetzt. Das mutagenisierte Saatgut eines Topfes entspricht einer Charge.

2.1.6 Selektion Jasmonat-insensitiver Mutanten (Mutantenscreen)

Für die Suche nach Jasmonat-insensitiven Mutanten wurden Chargen von 3x 2000 M2-Samen pro Pikierschale (ca. 25 x 40 cm) auf Erde/Sand ausgesät und unter Langtag-Bedingungen angezogen. Nach einer Woche Wachstum wurde begonnen, die Keimlinge alle 2 Tage mit ca. 50 ml/Schale einer Lösung aus 500 µM Methyljasmonat/125 µM Glycerylglyphosat/0,2 % Tween® 20 zu besprühen. Die Dauer der Behandlung erstreckte sich über 2-3 Wochen. Nachfolgend wurden vitale Pflanzen separiert und für weitere Analysen unter Kurztag-Bedingungen angezogen. Nach der Entnahme von Blattmaterial für Northern-Analysen

wurden die potenziell Jasmonat-insensitiven Pflanzen zur Samenbildung in Langtag-Kammern überführt.

2.2 Bakterienstämme / Bakterienanzucht und -behandlung

2.2.1 *Escherichia coli*-Stämme

Tab. 2.1: *E. coli*-Stämme

In der Tabelle sind die verwendeten *E. coli*-Stämme mit Angabe ihrer Herkunft und Referenz, ihrer genetischen Besonderheiten und dem Verwendungszweck aufgelistet.

| Stamm | Charakteristika | Verwendung |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| <i>E. coli</i> XL2-blue (STRATAGENE; Bullock et al., 1987; Greener & Jerpseth, 1993) | <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB lacI^qZDM15 Tn 10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r] ^a | allg. Klonierungsarbeiten |
| <i>E. coli</i> K802 (CLONTECH; Wallace et al., 1981) | <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>hsdR2</i> (<i>r_K⁻</i> , <i>m_K⁺</i>), <i>lacY1</i> , <i>mcrA⁻</i> , <i>mcrB⁻</i> , <i>metB1</i> , <i>mrr^r</i> , <i>supE44</i> | Screening der genomischen Bank |
| <i>E. coli</i> M15 pREP4 <i>E. coli</i> SG13009 pREP4 (QIAGEN) | keine Angaben | Proteinüberexpression |

2.2.1.1 Anzucht von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in/auf LB-Medium bei 37°C unter Zusatz von 100 µg/ml Antibiotikum (Ampicillin, APPLIGENE; Kanamycin, GIBCO BRL). Für die Anzucht in Flüssigkultur wurde zusätzlich mit 200 rpm geschüttelt.

Der *E. coli*-Stamm K802 wurde unter Zusatz von 0,2 % Maltose ohne Antibiotikum angezogen.

LB (Luria-Bertani; 1Liter):

10 g Bactotryptone

5 g Hefeextrakt

10 g Natriumchlorid; pH 7,5

15 g Agar (DUCHEFA) für Agarplatten

2.2.1.2 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Klonierung dienen einerseits käuflich erworbene Epicurian Coli® Ultracompetent Cells (XL2-blue; STRATAGENE), andererseits nach der von Hanahan (1983) beschriebenen Methode präparierte kompetente XL2-blue *E. coli*-Zellen.

Die weitere Behandlung und die Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Herstellerprotokoll der Firma STRATAGENE.

2.2.2 *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme

Für die Pflanzentransformation wurde anfänglich der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm LBA4404 (Hoekema et al., 1983) verwendet. Wegen schlechter Transformationsraten wurde dieser später durch den Stamm GV3101 (Koncz et al., 1986) ersetzt.

2.2.2.1 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht der *Agrobacterium tumefaciens*-Stämme erfolgte in YEB-Medium bzw. auf YEB-Agarplatten bei 28°C unter Zusatz von 100 µg/ml Rifampicin, ggf. 100 µg/ml Kanamycin.

YEB (1 Liter):

5 g Rinderextrakt (DIFCO)
 1 g Hefeextrakt (DIFCO)
 1 g Bactopeptone (DIFCO)
 5 g Saccharose
 2 mM Magnesiumchlorid
 15 g Agar (DUCHEFA) für Agarplatten

2.2.2.2 Präparation und Transformation kompetenter Agrobakterien

Für die Präparation kompetenter Agrobakterien wurden 100 ml YEB-Medium mit 100 µg/ml Rifampicin mit einer Übernachtskultur überimpft und auf eine OD₆₀₀ von 0,5 bis 1,0 angezogen. Die Zellen wurden für 10 min bei 8000x g abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1 ml eiskalter 20 mM Kalziumchloridlösung resuspendiert und anschließend als 100 µl Aliquots eingefroren.

Die Transformation (Höfgen & Willmitzer, 1988) kompetenter Agrobakterien erfolgte nach Zugabe von 1 µg Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenter *Agrobacterium*-Suspension durch Inkubation auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C für je 5 Minuten. Nachfolgend wurde 1ml YEB-Medium zugesetzt und die Zellen für 3 Stunden bei 28°C und 180 rpm geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde schließlich auf YEB-Agarplatten mit 100 µg/ml Kanamycin und Rifampicin plattiert und bei 28°C für 2-3 Tage inkubiert.

2.3 Isolation von Nukleinsäuren

2.3.1 Isolation von RNA

Zur Vermeidung von RNase-Kontamination wurden für die der PCIA-Extraktion nachfolgenden Schritte alle Gefäße mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC; SIGMA) behandelt, autoklaviert und getrocknet. Ebenso wurden wässrige Lösungen mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt und autoklaviert.

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe diente ein Protokoll von Goldberg et al. (1981). Pro Ansatz wurde ca. 100 mg gefrorenes Pflanzenmaterial mit 500 µl RNA-Extraktionspuffer und 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCIA, 25:24:1; ROTH) mit Stahlkugeln 1 Minute homogenisiert. Nach 2 Minuten Zentrifugation bei 15.800x g und Separation der wässrigen Phase erfolgte eine zweite Extraktion mit 500 µl PCIA. Aus der wässrigen Phase wurden nachfolgend mit 0,04 Vol. 5 M Kaliumacetat (pH 6,0) und 2,5 Vol. Ethanol für 1 Stunde bei -80°C die Nukleinsäuren gefällt und für 30 Minuten bei 4°C und 18.000x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl Wasser gelöst. Durch Zugabe von 1 Vol. 4 M Lithiumchlorid wurde die RNA bei 4°C über Nacht gefällt und für 30 Minuten bei 18.000x g und 4°C abzentrifugiert. Die RNA wurde in 100 µl Wasser gelöst und auf Quantität und Qualität mittels OD₂₆₀/OD₂₈₀-Verhältnis geprüft. Für weitere Anwendungen wurde die RNA mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat pH 5,5 und 2,5 Vol. Ethanol bei -80°C gefällt.

RNA-Extraktionspuffer:

0,25 M Tris/HCl pH 9,0
 0,25 M Natriumchlorid
 50 mM EDTA
 50 mM β-Mercaptoethanol
 4,8 % (w/v) p-Aminosalicylsäure, Natriumsalz (SIGMA)
 0,8 % (w/v) Tri-isopropyl-naphthalensulfonsäure, Natriumsalz (SERVA)

2.3.2 Isolation von DNA

2.3.2.1 Extraktion von Pflanzen-DNA für die PCR

Die Extraktion von DNA für die PCR-Analyse erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Cheung et al. (1993) (siehe auch Rogers et al., 1996). Hierfür wurde ein gefrorenes Blatt der zu untersuchenden Pflanze mit 250 µl Extraktionspuffer mittels Stahlkugeln 50 Sekunden homogenisiert und nachfolgend 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach 15 Minuten Zentrifugation bei 18.000x g und 4°C wurden 200 µl des Überstands entnommen, dieser mit 100 µl 10 M Ammoniumacetat und 250 µl Isopropanol zur DNA-Fällung versetzt und 15 Minuten bei 4°C und 18.000x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und bei 65°C in 50 µl Wasser gelöst. 2 µl dieser Lösung wurde für die PCR eingesetzt.

DNA-Extraktionspuffer:

2 M NaCl
200 mM Tris/HCl pH 8,0
70 mM EDTA
20 mM β-Mercaptoethanol

2.3.2.2 Isolation von Phagen-DNA

Ausgangspunkt für die Isolation von *Lambda*-DNA waren Plattenlysate. Hierfür wurden 10.000 pfu der entsprechenden Phagenklone mit 600 µl *E.coli* K802 Übernachtskultur auf Petrischalen (Ø 14,5 cm) plattiert und 7 Stunden bei 41°C inkubiert. Die Platten wurden zur Gewinnung der Phagen mit 10 ml 1x *Lambda*-Puffer (inkl. 100 µl Chloroform) überschichtet und 14 Stunden bei 4°C geschwenkt. Der Überstand wurde von den Platten abgehoben und 20 Minuten bei 3875x g zentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand erneut für 2 Stunden bei 20.000x g im Swing-Out-Rotor zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 800 µl 1x *Lambda*-Puffer mit einer Pasteurpipette homogenisiert und auf einen Cäsiumchloridgradienten aufgetragen. Der Cäsiumchloridgradient bestand aus 600 µl 3 M CsCl, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 unterschichtet von 800 µl 5 M CsCl, 10 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 7,5 in Polyallomer-Zentrifugationsröhrchen (BECKMAN). Die Zentrifugation erfolgte unter Vakuum in einem Swing-Out-Rotor (TLS-55, BECKMAN) bei 100.000x g bei 4°C für 3 Stunden. Die grauschimmernde Phagen-Bande wurde mithilfe einer Kanüle und Spritze abgesaugt. (Library Protocols, CLONTECH; Sambrook et al., 1989)

Zur Lyse der isolierten Phagen wurde 0,1 Vol. 2 M Tris/HCl pH 8,5 und 1 Vol. Formamid zugesetzt und 2 Stunden bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 Vol. Wasser und 6 Vol. Ethanol wurde die Phagen-DNA 10 Minuten auf Eis ausgefällt und anschließend 5 Minuten bei 8.000x g abzentrifugiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen und getrocknet (Thomas & Davis, 1975).

1x *Lambda*-Puffer:

0,1 M NaCl
10 mM MgSO₄
0,1 M Tris/HCl pH7,5
0,01 % Gelatine

2.3.2.3 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Matrix mit den QIAprep-Plasmid-Isolations-Kits der Firma QIAGEN dem Herstellerprotokoll entsprechend.

Die Isolation von Plasmid-DNA aus Agrobakterien erfolgte nach gleichem Prinzip. Hierbei wurde die isolierte Plasmid-DNA direkt für die Transformation kompetenter *E. coli* XL2-blue verwandt. Die Analyse der Plasmid-DNA erfolgte erst nach Rücktransformation in *E. coli* und Plasmid-Präparation aus *E. coli*.

2.3.2.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem QIAEX-DNA-Isolations-Kit (QIAGEN) über die Bindung von DNA an Glasmilch unter Hochsalzbedingungen (Vogelstein & Gillespie, 1979) bzw. später durch Elektroelution mit Qick-Pick™-Elektroelutionskapseln (STRATAGENE).

2.4 Proteintechniken

2.4.1 Proteinisolation

Die Gewinnung von pflanzlichen Protein für Western-Blot-Analysen erfolgte mit kombinierter RNA-Isolation (siehe 2.3.1) durch das Separieren der phenolischen Phase nach dem ersten Extraktionsschritt. Hierfür wurden 300 µl phenolische Phase zur Proteinfällung mit 4 Vol. Methanol/0,1 M Ammoniumacetat versetzt und für mindestens 4 Stunden bei -20°C gelagert (Lehmann et al., 1995). Das Protein wurde nachfolgend bei 18.000x g pelletiert und zum Entfernen phenolischer Rückstände viermal mit Methanol/0,1M Ammoniumacetat gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 200 µl 1x Probenpuffer gelöst und 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Der Proteingehalt der jeweiligen Probe wurde wie unter 2.4.4.2 beschrieben quantifiziert. Vor der Gelbeladung wurde den Proben 1 µl einer gesättigten Bromphenolblau-lösung als Laufmarker zugesetzt.

1x Probenpuffer:

68 mM Tris/HCl pH 6,8

2,3 % SDS

10 % Glycerol

0,72 M β-Mercaptoethanol

2.4.2 Proteinüberexpression und Affinitätsreinigung

Zur Überexpression rekombinanten Proteins in *E.coli* M15 (pREP4, pQE31/C21-1) wurden 1 l LB (100 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Kanamycin) mit 10 ml einer O/N-Kultur inokuliert und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach dem Erreichen einer Zelldichte von $OD_{600} \sim 0,8$ wurde für die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins 2 mM IPTG (SERVA) zugegeben und die Kultur für weitere 5 Stunden unter gleichbleibenden Bedingungen inkubiert. Die Bakterienzellen wurden anschließend durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 8000x g geerntet und bei -80°C eingefroren.

Für eine nachfolgende Affinitätsreinigung (QIAexpressionist Handbuch, QIAGEN) des rekombinanten Proteins wurden die aufgetauten Zellen in 40 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und unter Zugabe von 1 mg/ml Lysozym (SERVA) 30 Minuten auf Eis lysiert. Ein Aufschluß der Zellen wurde durch Ultraschall erzielt, 6x 30 Sekunden bei 250 W auf Eis. Die nachfolgende Lösung und Affinitätsreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde das Bakterienlysat auf eine Konzentration von 8 M Harnstoff, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Tris/HCl, pH8,0 eingestellt und eine Stunde unter Rühren bei 25°C inkubiert. Ungelöste Bestandteile wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 20.000x g abgetrennt. Dem Überstand wurden 4 ml Nickel-Agarose-Suspension (50 % Ni-NTA; QIAGEN) zugefügt. Zur Bindung des rekombinanten Proteins an die Nickel-Agarose-Matrix wurde 1 Stunde bei 25°C gerührt. Der Ansatz wurde auf eine Säule (Ø 1,5 cm) überführt und bei einer Flussrate von 400 µl/min mit 3x 50 ml Waschpuffer zur Abtrennung unspezifisch gebundener Proteine gespült. Zur Elution des rekombinanten Proteins wurde die Säule vorerst mit 4 ml Elutionspuffer versetzt. Am darauffolgenden Tag wurden unter Zugabe weiterer 14 ml Elutionspuffer insgesamt 14 Fraktionen à 2 ml eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden nach Bedarf durch Centricon®-30-Säulchen (AMICON) konzentriert.

Zur Überprüfung und Dokumentation der Proteinreinigung wurden allen Reinigungsschritten und -fraktionen Aliquots von 5 µl entnommen und mittels SDS-Page analysiert.

Resuspensionspuffer:

50 mM Natriumphosphat pH 8,0
 300 mM NaCl
 10 % Glycerol

Waschpuffer:

8 M Harnstoff
 100 mM Natriumphosphat
 10 mM Tris
 25 mM Imidazol (ROTH); pH 8,0

Elutionspuffer:

8 M Harnstoff
 100 mM Natriumphosphat
 10 mM Tris
 500 mM Imidazol; pH 8,0

2.4.3 Antikörperproduktion

Für die Gewinnung polyklonaler AtJRG21-Antikörper wurde gereinigtes, rekombinantes AtJRG21-Protein in Aliquots von 25 µg in einem 8%igen PAA-Gel aufgetrennt, gefärbt und ausgeschnitten. Insgesamt wurden Gelstücke mit 6x 100µg rekombinantes AtJRG21-Protein für eine dreimalige Immunisierung zweier Kaninchen isoliert. Die Immunisierung der Kaninchen und Gewinnung der Antiseren erfolgte durch die Firma EUROGENTECH.

2.4.4 Proteinquantifizierung**2.4.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford**

Eine Quantifizierung von Proteinen, basierend auf der von Bradford (1976) beschriebenen Methode, erfolgte mit dem Proteinassay-Reagenz der Firma BIO-RAD. Hierfür wurde ein Aliquot der Probe in 800 µl Wasser verdünnt, mit 200 µl Reagenz versetzt und die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand einer HSA-Eichreihe.

2.4.4.2 Proteinbestimmung nach Esen

Für eine Proteinbestimmung nach der von Esen (1978) beschriebenen Methode wurden 5 µl Proteinprobe auf einen FN7-Filter (FILTRAK) pipettiert und 15 Minuten bei 25°C in der Färbelösung inkubiert. Die Filter wurden nachfolgend zweimal mit kaltem Wasser und zweimal mit kochendem Wasser zur Entfernung von ungebundenem Farbstoff gewaschen. Die Elution des gebundenen Farbstoff der separierten Filter erfolgte mit 3 ml einer 0,5%igen SDS-Lösung für ca. 16 Stunden bei 25°C. Der Proteingehalt der Probe wurde über die Messung der Absorption bei 578 nm und Interpolation gegen eine BSA-Eichreihe bestimmt.

Färbelösung:

2,5 Vol. Isopropanol
 1 Vol. Eisessig
 6,5 Vol. Wasser
 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250

2.5 Anreicherung genomischer *Atjrg21*-Klone

Für die Anreicherung (Screening) genomischer *Atjrg21*-Klone diente eine käuflich erworbene, genomische Bibliothek von *Arabidopsis thaliana* Columbia, konstruiert aus DNA 4,5 Wochen alter Arabidopsisblätter. Die DNA wurde vom Hersteller (CLONTECH Laboratories) mit dem Restriktionsenzym *Mbol* partiell verdaut, in die *Bam*HI-Schnittstelle des EMBL3 SP6/T7-Klonierungsvektors (Frischauf et al., 1983) kloniert und in *Lambda*-Phagenköpfe verpackt. Nach Herstellerangaben umfaßt die genomische Bank 2,4 Millionen unabhängige Phagenklone mit einer Insertgröße von 8 bis 22 kb bzw. einer durchschnittlichen Größe von 15 kb.

Für das Screening wurden 2x 2 µl Phagensuspension (25.000 pfu/µl) mit je 600 µl einer *E.coli* K802-O/N-Kultur 15 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend mit 7 ml Topagarose (LB, 10 mM Magnesiumsulfat, 0,7 % Agarose) auf zwei Agarplatten (LB, 10 mM Magnesiumsulfat; Ø 15

cm) plattiert. Nach Inkubation für 8 Stunden bei 41°C wurden von jeder Platte zwei Replikafilterabdrücke gezogen (siehe 2.6.3) und mit der ³²P-markierten *Atjrg21*-cDNA hybridisiert. Mit Hilfe der Autoradiogramme wurden die Signale positiven Phagenklonen zugeordnet und diese mit einer Pasteurpipette aus der Platte gestochen und in 1 ml 1x *Lambda*-Puffer (siehe 2.3.2.2) überführt. In mindestens zwei weiteren Plattierungsrunden wurden die Klone vollständig isoliert (Benton & Davis, 1977).

Die DNA der isolierten Phagenklone wurde mit *Xho*I verdaut, in die *Xho*I Schnittstelle des pBluescript®-Vektors ligiert und in *E. coli* XL2-blue transferiert. Unter Einsatz bekannter cDNA-Primer und den Vektor-ständigen Primern wurden in einer PCR die erhaltenen Klone auf Anwesenheit, Größe und Orientierung der *Atjrg21*-genomischen DNA getestet.

2.6 Elektrophorese- und Transfertechniken

2.6.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden vor der Elektrophorese mit 0,1 Vol. 10x DNA-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten auf 65°C erhitzt. In Agarosegelen mit 0,7 bis 1,4 % Agarose und 1x TAE als Laufpuffer bei ca. 3 V/cm wurde die DNA aufgetrennt und nachfolgend in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (2 µg/ml) gefärbt.

10x TAE:

0,4 M Tris/HCl
0,2 M Natriumacetat
10 mM EDTA; pH 8,2

10x DNA-Probenpuffer:

20 % Ficoll
0,1 M EDTA
1 % SDS
0,4 % Bromphenolblau

2.6.2 DNA-Transferblot (Southern-Blot)

Die aufgetrennte DNA wurde unter denaturierenden Bedingungen mit 0,5 N NaOH/1,5 M NaCl mittels Kapillarblots für ca. 16 Stunden auf eine Nylonmembran (45 µm; SCHLEICHER & SCHUELL) transferiert. Durch nachfolgendes Backen des Filters für zwei Stunden bei 80°C wurde die DNA am Filter fixiert.

2.6.3 Plaquelift

Der Transfer von Phagen auf einen Nylonfilter (Qiabrane Ø 132 mm; QIAGEN) erfolgte durch das Auflegen der Filter auf die bei 4°C vorgekühlten Phagenplatten für 8 Minuten (Filter A) und 20 Minuten (Filter B) (Sambrook et al., 1989). Mithilfe einer Kanüle wurde die Orientierung der Filter markiert. Die Filter wurden nachfolgend für 5 Minuten mit Denaturierungslösung, 5 Minuten mit Neutralisierungslösung und 15 Minuten mit 2x SSC behandelt, getrocknet und die DNA durch zweistündiges Backen bei 80°C am Filter fixiert.

Denaturierungslösung:

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisierungslösung:

1 M Tris/HCl pH 7,5
1,5 M NaCl

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Natriumacetat; pH 7,0

2.6.4 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die präzipitierte und getrocknete RNA wurde vor der Elektrophorese in Lösepuffer gelöst und bei 65°C für 15 Minuten erhitzt. Für die Gelbeladung wurden 10 oder 20 µg RNA eingesetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte im Agarose-Formaldehyd-Gel (1 % Agarose; 0,18 Vol. 37%iges Formaldehyd; 0,1 Vol. 10x GB) mit 1x GB als Laufpuffer bei 3 V/cm.

Lösepuffer (1ml):

100 µl 10 x GB
 180 µl 37%iges Formaldehyd
 500 µl Formamid
 5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
 115 µl Wasser
 100 µl 10x RNA-Probenpuffer (50 % Glycerol, 1 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau)

10x GB:

0,2 M Morpholinopropansulfonsäure, Natriumsalz
 50 mM Natriumacetat
 1 mM EDTA; pH 7,0

2.6.5 RNA-Transferblot (Northern-Blot)

Transfer von RNA auf eine Nylonmembran (45 µm; SCHLEICHER & SCHUELL) erfolgte mit 10x SSC (siehe 2.6.3) mittels Kapillarblot für ca. 16 Stunden. Die RNA wurde anschließend durch zweistündiges Backen bei 80°C am Filter fixiert.

2.6.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinproben wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 Minuten bei 95°C denaturiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte wie bei Laemmli (1970) beschrieben. Hierzu wurden die Proben in einem 4%igen Sammelgel bei 24 mA konzentriert und in 8 oder 12%igen Trenngelen bei 48 mA elektrophoretisch aufgetrennt. Die Gele wurden nachfolgend mit Coomassie Brilliant Blue R250 gefärbt oder auf Nitrocellulose geblottet.

Sammelgel:

0,125 M Tris/HCl pH 6,8
 4 % Acrylamide (ROTH)
 1 % SDS
 + 0,008 Vol. 10 % APS (SERVA)
 + 0,002 Vol. TEMED (SERVA)

Trenngel:

0,375 M Tris/HCl pH 8,8
 8 oder 12 % Acrylamide
 5 % Glycerol
 1 % SDS
 + 0,005 Vol. 10 % APS
 + 0,001 Vol. TEMED

SDS-Probenpuffer:

0,625 M Tris/HCl pH 6,8
 10 % Glycerol
 2 % SDS
 4% β-Mercaptoethanol
 0,25 % Bromphenolblau

SDS-PAGE-Laufpuffer:

25 mM Tris
 0,2 M Glycin
 0,1 % SDS

Coomassie-Färbelösung:

0,2 % Coomassie Brilliant Blue R250
 10 % Essigsäure
 50 % Methanol
 1 % Glycerol
 (Entfärbung mit 7 % Essigsäure)

2.6.7 Protein-Transferblot und Antikörpernachweis (Western-Blot)

Die mittels SDS-PAGE (siehe 2.6.6) aufgetrennten Proteine wurden für einen nachfolgenden Antikörpernachweis im Halbtrockenblotverfahren (Khyse-Anderson, 1984) mit Transferpuffer 1,5 Stunden bei 0,8 mA/cm² auf eine Nitrocellulosemembran (0,45 µm; SARTORIUS) transferiert. Zur Kontrolle der Beladung wurde die Membran mit einer 0,1%igen Fast Green-Lösung (SIGMA) in 1 % Essigsäure 5 Minuten gefärbt. Ungebundener Farbstoff wurde mit Wasser entfernt. Die nun sichtbare Proteinbeladung der Membran wurde dokumentiert und schließlich mit 0,2 M NaOH vollständig entfärbt.

Für den folgenden Antikörpernachweis wurden die Filter 10 Minuten mit 1x PBS/0,1 % Tween® 20 äquilibriert und 30 Minuten in Blockierlösung inkubiert. Die Inkubation mit dem Antiserum erfolgte 1 Stunde bei 25°C in 1x PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % Tween® 20 für den Glucuronidase-Nachweis mittels Anti-GUS-AK (1:1500 verdünnt; MOLECULAR PROBES) bzw.

über Nacht bei 6°C für den AtJRG21-Nachweis mittels Anti-AtJRG21-Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 mit einem Anteil von 5 % BSA.

Die Filter wurden viermal für 15 Minuten in 1x PBS/0,1 % Tween® 20 bei 25°C gewaschen und nachfolgend für eine Stunde bei 25°C mit einem Anti-Kaninchen-Antikörper-alkalische Phosphatase-Konjugat (SIGMA) in einer Verdünnung von 1:2000 in 1x PBS mit 0,5 % BSA und 0,1 % Tween® 20 inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch viermaliges Waschen (siehe oben) entfernt. Für die Nachweisreaktion wurden die Membranen mit Enzympuffer für 10 Minuten bei 25°C äquilibriert und nachfolgend mit Substratlösung entwickelt. Die Reaktion wurde durch den Entzug der Substratlösung durch ein Überführen der Filter in Wasser gestoppt.

Transferpuffer:
25 mM Tris
150 mM Glycin
20 % Ethanol; pH 8,0

10x PBS:
0,58 M Na₂HPO₄
0,17 M NaH₂PO₄
0,68 M NaCl; pH 7,4

Blockierlösung:
1x PBS
5 % BSA
0,1 % Tween® 20

Enzympuffer:
0,1 M Tris/HCl pH 9,5
0,1 M NaCl
50 mM MgCl

Substratlösung:
10 ml Enzympuffer
+ 33 µl 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat-p-tolidinsalz (BCIP; 50 mg/ml in DMF; SIGMA)
+ 66 µl p-Nitrotetrazolium Blau Grade III (NBT; 75 mg/ml in 70%igem DMF; SIGMA)

2.7 Hybridisierung mit markierten Sonden

Für den RNA- und DNA-Nachweis wurden radioaktiv-markierte Sonden mit dem „Random Primers DNA Labeling System“ (GIBCO BRL) unter Einsatz von 50 µCi [α -³²P]dATP hergestellt. Hierzu wurden ca. 50 ng zu markierendes DNA-Fragment eingesetzt. Nach der Markierungsreaktion wurden nicht inkorporierte Nukleotide über „G-50 Micro Columns“ (PHARMACIA BIOTECH) abgetrennt. Die gereinigte Sonde wurde 10 Minuten bei 100°C denaturiert und nachfolgend der Hybridisierungslösung zugegeben.

Die Filter wurden 1 Stunde in Prähybridisierungslösung vorhybridisiert und anschließend für 16 Stunden bei 42°C im Hybridisierungssofen mit Hybridisierungslösung hybridisiert.

Nach der Hybridisierung wurden die Filter mit 2x SSC/0,1 % SDS bei 50°C für den RNA-Nachweis oder mit 0,1x SSC/0,1 % SDS bei 65°C für den DNA-Nachweis unter mehrfachem Wechsel der Waschlösung gewaschen und anschließend gegen einen Röntgenfilm (BioMax™ MR-1; KODAK) exponiert.

Prähybridisierungslösung:
50 % deionisiertes Formamid (FLUKA)
5x SSPE
0,1 % SDS
5x Denhardts
0,125 mg/ml Heringssperma-DNA

Hybridisierungslösung:
50 % deionisiertes Formamid
5x SSPE
0,1 % SDS
2x Denhardts
0,125 mg/ml Heringssperma-DNA
+ Sonde

20x SSPE:
3 M NaCl
0,2 M NaH₂PO₄
0,02 M EDTA; pH 7,4

50x Denhardts:
1 % Ficoll
1 % Polyvinylpyrrolidone
1 % BSA

Die Hybridisierung von CIC-YAC-Filtern für die Kartierung des *Atjrg21*-Genlokus erfolgte nach einem gesonderten Protokoll, welches mit den CIC-YAC-Filtern von Frau Dr. R. Schmidt (MDL, Köln) zur Verfügung gestellt wurde. Die Filter wurden 1 Stunde in einem PEG-haltigen

Hybridisierungspuffer bei 65°C vorhybridisiert. Nachfolgend wurde die denaturierte, radioaktiv-markierte Probe hinzugefügt. Nach 20 Stunden Hybridisierung wurden die Filter 30 Minuten mit 3x SSC/0,1 % SDS und nachfolgend 30 Minuten mit 0,1x SSC/0,1 % SDS bei je 65°C gewaschen. Es folgte die Exposition der Filter gegen einen Röntgenfilm (siehe oben).

PEG-Hybridisierungslösung:

0,25 M NaCl

0,5 Vol. Phosphatpuffer (aus 71 g Na₂HPO₄ in 996 ml + 4 ml 85 % H₃PO₄)

10 % PEG 6000

7 % SDS

1 mM EDTA

2.8 DNA-Sequenzierung

2.8.1 Sequenzierreaktion und Sequenziergel

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit dem T7-Sequencing™-Kit (PHARMACIA BIOTECH) basierend auf der von Sanger et al. (1977) beschriebenen Kettenabbruchmethode unter Einbau des radioaktiv markierten Nukleotidanalogs [α -³⁵S]dATP (NEN DU PONT).

Die Sequenzierreaktion wurden in einem 8%igem Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff in 1x TBE bei 60 W aufgetrennt, getrocknet und gegen einen Röntgenfilm (BioMax™ MR-1; KODAK) exponiert.

10x TBE:

1 M Tris

0,9 M Borsäure

0,2 M EDTA; pH 8,0

Später erfolgte die Sequenzierung zentral mit Hilfe der Automatic-DNA-Sequencer Licor 4000L und 4100 unter Einsatz IRD700- oder IRD800-markierter Standardprimer (MWG BIOTECH) und AMERSHAM-Thermo-Sequenase im Cycle-Sequencing-Verfahren.

2.8.2 Sequenzanalyse

Eine Auswertung der Sequenzierdaten erfolgte mithilfe der Programme PC/Gene (INTELLIGENETICS) oder HUSAR 5.0 (DKFZ Heidelberg).

Datenbankrecherchen und Sequenzvergleiche wurden über das World Wide Web einerseits am National Center for Biotechnology Information (NCBI) im Blast-Modus unter der Adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/> oder im Fasta-Modus bei „The Arabidopsis Information Resource“ (TAIR) unter <http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/fasta/TAIRfasta.pl> durchgeführt.

Multiple Sequenzvergleiche wurden im CLUSTAL-Modus mit dem Programm DNASTar erstellt. Das Dendrogramm nach Kimura (1980) wurde mithilfe der Programme PRODIST und FITCH des PHYLIP-Programmpakets auf der Grundlage des mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) erstellten multiplen Sequenzvergleiches erstellt.

2.9 Transgennachweis

2.9.1 GUS-Assay

2.9.1.1 Fluorometrische Quantifizierung der GUS-Aktivität

(Jefferson et al., 1987b; Jefferson & Wilson, 1991)

Eine Quantifizierung der β -Glucuronidase-Aktivität transgener Pflanzen erfolgte unter fluorometrischer Messung der enzymatischen Hydrolyse des Substrates 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (MUG; ROTH). Hierzu wurden ca. 50 mg gefrorenes Pflanzenmaterial mit 250 μ l eiskaltem GUS-Extraktionspuffer mittels Metallkugeln 40 s homogenisiert und nachfolgend 15 Minuten mit 10.000x g bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand

wurden 2x 7µl Extrakt zur Proteinquantifizierung nach Bradford (siehe 2.4.4.1) entnommen. Für die enzymatische Reaktion wurden von jeder Probe 2x 7 µl Extrakt zu je 200 µl GUS-Assay-Puffer (2mM MUG in GUS-Extraktionspuffer) pipettiert. Zu drei definierten Zeitpunkten (0, 30, 60 min oder 0, 15, 30 min) wurden Aliquots von je 50 µl dem Reaktionsansatz entnommen und in 250 µl 0,2 M Natriumcarbonatlösung zum Abstoppen der Reaktion überführt. Die Proben wurden im Mikrotiterplattenfluorometer (CytoFluor™ II; BIOSEARCH Inc.) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 440 nm vermessen.

Die Messwerte einer Probe wurden gemittelt. Unter Einbezug einer Eichreihe mit 4-Methyl-umbelliferon (MU; SIGMA) und der gemessenen Proteinkonzentrationen wurde die GUS-Aktivität in pmol MU/min x mg Protein errechnet. Eine Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte mit den Programmen Microsoft® Excel 97 und SigmaPlot 4.0 (SPSS Inc.).

GUS-Extraktionspuffer:

50 mM Natriumphosphat pH 7,0
 10 mM β-Mercaptoethanol
 10 mM EDTA
 0,1 % SDS
 0,1 % Triton X-100 (SERVA)

2.9.1.2 Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität

Für den histochemischen Nachweis (Stomp, 1992) der GUS-Aktivität wurden die zu färbenden Pflanzenteile in eine Lösung aus 0,1 M Natriumphosphat pH 7,0, 0,5 mM je Natriumhexacyanoferrat-(II) und Natriumhexacyanoferrat-(III), 10 mM EDTA, 0,1 % Triton X-100 (SERVA) und 2 mg/ml X-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronid; BIOSYNTH) bei 37°C für 16-20 Stunden inkubiert und anschließend mit 70%igem Ethanol gebleicht.

2.9.1.3 Transgennachweis mittels PCR

Ausgangspunkt zum PCR-vermittelten Nachweis des Transgens waren 2 µl DNA-Lösung der zu untersuchenden Pflanze (siehe 2.3.2.1). In einem 20 µl PCR-Ansatz wurden unter Einsatz von 2 µl DNA-Lösung der zu untersuchenden Pflanze und Transgen-spezifischer Primerpaare auf Anwesenheit und evtl. Einbau des Transgens getestet. Die PCR-Bedingungen waren auf die Primerpaare und den zu amplifizierenden Bereich optimiert.

PCR-Ansatz:

2 µl 10x Polymerasepuffer
 2 µl dNTP-Mix (je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 2 µl Template-DNA
 0,2 µl je Primer (100 µM)
 1 µl Taq-Polymerase 1 U/µl (Red-Taq; SIGMA)
 12,6 µl Wasser

Primerpaare (siehe 2.11):

GUS-Nachweis: SB104/SB105
pehA-Nachweis: SB 95/SB96 bzw. im pBI-Vektor mit SB102/103
 Bereich des 2. Intron in den GUS-Fusionskonstrukten: SB123/124
 Bereich zwischen dem 1. Exon und GUS in den GUS-Fusionskonstrukten: SB125/126
 pBI-Vektor T-DNA 3'-Bereich: SB106/SB107

2.9.2 Luciferase-Enzymassay

Zum Nachweis von Luciferase-Aktivität wurden die zu untersuchenden Pflanzen mit 2,5 mM Na-Luciferin (MOLECULAR PROBES) besprüht. Eine halbe Stunde später wurden die Pflanzen gestreßt und die Lichtemission mit einem Photo-Counting-Videosystem (HiPic5.1;

HAMAMATSU) im halbstündigen Rhythmus bei einer Belichtungszeit von 5 Minuten und Kameraeinstellung „8x“ im „Slice-Modus“ dokumentiert.

2.10 Klonierungstechniken

Die für die Konstruktion und Klonierung von Plasmiden angewandten Techniken entsprachen den von Sambrook et al. (1989) beschriebenen Standardtechniken. Restriktionsenzyme waren vornehmlich von der Firma NEW ENGLAND BIOLABS.

2.10.1 Vektoren

Tab. 2.1: Verwendete Vektoren

In der Tabelle sind die verwendeten Vektoren unter Angabe ihrer Herkunft und Referenz, ihrer Merkmale und dem Verwendungszweck aufgelistet.

| Vektor | Vektorbeschreibung | Verwendungszweck |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| pBluescript® II SK (+/-) (STRATAGENE) | bakterieller Klonierungsvektor, pUC19 Abkömmling (siehe pUC18), Größe: 2961 bp | - Subklonierung genomischer <i>Atjrg21</i> -Genfragmente und des <i>Atjrg21</i> -Promotors |
| pUC18 (Norrand et al., 1983) | bakterieller Klonierungsvektor mit multipler Klonierungsstelle im α -Peptid der β -Galaktosidase und Ampicillinresistenz Größe: 2686 bp | - Konstruktion bzw. Subklonierung der pBI-Konstrukte; - für site directed mutagenesis |
| pBI101.3 CLONTECH (Jefferson et al., 1987a) | binärer Vektor, Abkömmling des pBIN19-Vektors (Bevan, 1984; Frisch et al., 1995) mit Promotor-freier 1,87 kb GUS-Kassette (Jefferson et al., 1986) und stromaufwärts gelegenem Polylinker und Terminationsbereich (NOS-term) mit Polyadenylierungssignal des Nopalinsynthasegens vom <i>Agrobacterium tumefaciens</i> Ti-Plasmid (Bevan et al., 1983a,b); NPTII-Gen unter Kontrolle des Nopalinsynthasepromotors (NOS-Pro) als Selektionsmarker vermittelt Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin Größe: 12,2 kb | - Pflanzentransformation |
| pMon9443 MONSANTO (Dotson et al., 1996a) | Pflanzentransformationsvektor mit <i>pehA</i> -Gen unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors; Streptomycin-Resistenz für bakterielle Klonierung Größe: 12806 bp | - Quelle des <i>pehA</i> -Gens |
| pGEM®-luc (PROMEGA) | bakterieller Klonierungsvektor mit Firefly Luciferase-Gen und Ampicillinresistenz Größe: 4933 bp | - Quelle für Luciferase-Gen |
| pQE-31 (QIAGEN) | bakterieller Expressionsvektor mit Ampicillinresistenz, zur Expression von Proteinen mit N-terminalen 6xHis-Tag Größe: 3464 bp | - AtJRG21-Überexpression zur späteren Affinitätsreinigung |

| | | |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| pMiniGUS15 (Feltkamp et al., 1994) | GUS-Gen mit CaMV35S-Promotor, deletiert an Position -54, aus pRT104 (Klein et al., 1990), ligiert in <i>Pst</i> I-Schnittstelle des pUC18 (siehe oben) Größe: ca. 4,9 kb | - Minimalpromotorkonstrukte |
|------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|

2.10.2 Site Directed Mutagenesis

Eine PCR-vermittelte, gerichtete Mutagenese erfolgte mit dem „QUIKCHANGE Site-directed Mutagenesis Kit“ der Firma STRATAGENE.

Zum ersten Schritt der Mutagenese der Intron-lokalisierten G-Box-Sequenzen wurde das Plasmid pUCG21GUSFus mit einem Fusionskonstrukt des *Atjrg21*-Gens und dem GUS-Gen eingesetzt (siehe 3.5.2).

In einer PCR mit mutierten Primerpaaren wurde respektiv die erste (Mut1) oder zweite G-Box (Mut2) im zweiten Intron des *Atjrg21*-GUS-Fusionskonstrukts mutiert. Die Mutation beider G-Boxen (Mut12) erfolgte unter Einsatz des Mut1-Konstrukts in einer zweiten PCR mit den Primerpaaren SB121/SB122.

PCR-Ansatz (50 µl):

30 ng Plasmid
125 ng je Primer
1 µl dNTP-Mix
5 µl 10x Polymerasepuffer
1 µl Pfu-DNA-Polymerase (2,5 U/µl)

Primerpaare (siehe 2.11):

Mutation der ersten G-Box SB119/SB120
Mutation der zweiten G-Box SB121/SB122

PCR-Bedingungen:

1x 30 sec 95°C
15x 30 sec 94°C
1 min 55°C
16 min 68°C

Nach der PCR wurde der Parentalstrang mit dem Restriktionsenzym *DpnI* 1 Stunde verdaut. Dem PCR-Ansatz wurden nachfolgend 2 µl für eine Transformation von *E. coli* entnommen. Die mutierten Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau mit *MfeI* in Kombination mit *HpaI* analysiert. Die mutierten Konstrukte besitzen durch die Mutagenese von CACGTG zu CAATTG eine (Mut1, Mut2) bzw. zwei (Mut12) zusätzliche Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *MfeI*. Die Ergebnisse aus der Restriktionsanalyse wurden durch Sequenzierung verifiziert. Für die Pflanzentransformation wurden alle drei mutierten Konstrukte in den pBI-Vektor umklontiert.

2.10.3 Exonulease

Ausgang für die Herstellung von Promotordeletionen mit dem „Nested Deletion Kit“ (PHARMACIA) war das Plasmid pBIPROGUS mit einem 1461 bp großen *Atjrg21*-Promotorfragment. Hierfür wurden 20 µg Plasmid mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaut. Für eine gerichtete Exonukleasereaktion wurden die geschaffenen 5'-Überhänge des linearisierten Plasmids unter Einbau von αS-dNTP-Analoga in einer Klenowreaktion vor einem Exonukleaseabbau geschützt. Nachfolgend wurde über einen *SalI*-Verdau stromabwärts von der *HindIII*-Schnittstelle ein für die Exonuklease suszeptibles Ende geschaffen. In der nachfolgenden Exonukleasereaktion bei 25°C wurden in Zeitabständen von 4 Minuten über einen Zeitraum von 80 Minuten 2 µl dem Reaktionsansatz entnommen und in 3 µl S1-Reaktionsgemisch überführt. Für die S1-Reaktion wurde 30 Minuten bei 37°C inkubiert und nachfolgend unter Zugabe von 1 µl S1-Stopplösung (50 mM EDTA) die Reaktion abgestoppt. Jeweils 3 µl des Ansatzes wurden im Agarosegel analysiert bzw. in einem 20 µl Ligationsansatz

eingesetzt. Aus den Ansätzen 40', 56', 60', 64', 72' und 76' wurden 5 µl Ligationsansatz für die Transformation von *E. coli* eingesetzt. Die transformierten *E. coli* wurden in einer PCR auf die Größe des *Atjrg21*-Promotorfragments getestet.

Exonukleasereaktionsgemisch:

8 µl Exonukleasepuffer
12 µl 0,3 M NaCl
24 µl Wasser
1 µl Exonuklease III (110 U/µl)

S1-Reaktionsgemisch:

33 µl S1-Puffer
66 µl Wasser
1 µl S1-Nuklease (50 U/µl)

Ligationsansatz (für 20 Ansätze):

40 µl 10x Ligationspuffer
80 µl 25 % PEG
2 µl T4-Ligase (6 U/µl)
218 µl Wasser

2.10.4 Primer Extension

Die Kartierung des 5'-Terminus der *Atjrg21*-mRNA erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll in Ausubel et al. (1992). Hierfür wurde RNA aus unbehandelten und 24 Stunden mit 100 µM Methyljasmonat behandelten Arabidopsisblättern isoliert. 20 µg RNA wurden je in 10 µl Wasser gelöst. Nachfolgend wurden 1,5 µl 10x Hybridisierungspuffer und 3,5 µl Primer (SB116; 40 fmol) zugegeben. Zur Hybridisierung des Primers an die RNA wurden die Proben 2 Stunden bei 65°C inkubiert, anschließend auf 25°C abgekühlt und unter Zugabe von 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Die RNA/Primer-Proben wurden für die reverse Transkription in 14,1 µl Wasser gelöst. Anschließend wurden 4 µl 5x Erststrangpuffer (GIBCO BRL), 0,7 µl [α -³²P]dATP (ca. 7 µCi), 0,2 µl Nukleotidmix (dCTP, dGTP, dTTP je 20 mM) und 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/µl; GIBCO BRL) zu jeder Probe hinzugefügt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde später durch Zugabe von 40 µl RNase A (50 µg/ml; SERVA) verdaut und die Probe nach einer PCIA-Extraktion mit Ethanol gefällt. Die Analyse der Primer Extension-Reaktion erfolgte parallel zur Sequenzierreaktion im PAA-Gel (siehe 2.8.1).

5x Hybridisierungspuffer:

1,5 M KCl
100 mM Tris/HCl pH 8,5
10 mM EDTA

2.11 Oligonukleotide

Die für spezielle Klonierung und den PCR-vermittelten Transgennachweis genutzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-BIOTECH synthetisiert (Tab. 2.3).

Tab. 2.3: Oligonukleotide

In der Tabelle sind die verwendeten Oligonukleotide unter Angabe wichtiger Merkmale aufgelistet. In ersten Spalte sind die zugrunde liegenden Sequenzen/Plasmide angegeben. Die zweite Spalte beschreibt die Orientierung des gebundenen Oligonukleotides („+“ entspricht dem Plusstrang und „-“ dem Minusstrang). In der dritten Spalte ist die Nukleotidsequenz dargestellt. In der vierten Spalte ist die Funktion der Oligonukleotide beschrieben.

| Target | Orientierung | Signum | Sequenz in 5'-3' Richtung | Funktion |
|-------------|--------------|--------|-----------------------------|----------------------|
| pPRO21 | + | SB79 | GTA/ACC/AAC/GCC/G | MaellI/BamHI-Adaptor |
| pPRO21 | - | SB80 | GAT/CCG/GCG/TTG | |
| Gus | + | SB93 | AGC/ATC/AGG/GCG/GCT/ATA/CG | PCR-Primerpaar |
| Gus | - | SB94 | TAC/CGC/CAA/CGC/GCA/ATA/TGC | |
| <i>pehA</i> | + | SB95 | TCT/TGA/TCG/TCT/TTG/CCG/GG | PCR-Primerpaar |
| <i>pehA</i> | - | SB96 | TGC/GGG/CTG/GAT/CTG/TAA/TGG | |

| | | | | |
|-------------|---|-------|----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| | + | SB97 | GTA/CGC/AAC | <i>SplI/XmaI</i> -Adaptor |
| | - | SB98 | CCG/GGT/TGC | |
| | + | SB100 | GTA/CGG/ATC/C | <i>SplI/NcoI</i> -Adaptor |
| | - | SB101 | CAT/GGG/ATC | |
| <i>pehA</i> | + | SB102 | ATG/CCG/AGA/GCT/TCC/GTA/TTC/C | PCR-Primerpaar |
| pBi101.3 | - | SB103 | AGG/CGA/TTA/AGT/TGG/GTA/ACG/C | |
| Gus | + | SB104 | TCT/ACA/CCA/CGC/CGA/ACA/CC | PCR-Primerpaar |
| Gus | - | SB105 | CAT/GCA/CAC/TGA/TAC/TCT/TCA/CTC/C | |
| pBi101.3 | + | SB106 | CTT/CCT/CGT/GCT/TTA/CGG/TAT/CG | PCR-Primerpaar |
| pBi101.3 | - | SB107 | TTG/CCT/TTA/GCG/TCA/GAC/TGT/AGC | |
| | + | SB108 | CAC/GTC/AC | <i>BamHI/SacI</i> -Adaptor |
| | - | SB109 | GAT/CGT/GAC/GTG/AGC/T | |
| | + | SB110 | AAT/TCA/TTC | <i>EcoRI/SplI</i> -Adaptor |
| | - | SB111 | GTA/CGA/ATG | |
| | + | SB112 | GAT/CCA/TTC | mit SB111 <i>BamHI/SplI</i> -Adaptor |
| | + | SB113 | AAT/TCC/GTG | <i>EcoRI/BamHI</i> -Adaptor |
| | - | SB114 | GAT/CCA/CGG | |
| | - | SB116 | CGG/ACT/ATA/GGC/TCA/GGC/CAG | primer extension |
| pBi101.3 | + | SB117 | GGA/TAA/CAA/TTT/CAC/ACA/GGA/AAC/AGC/TAT | PCR-Primer für upstream GUS-Bereich |
| pBi101.3 | - | SB118 | CGT/AAC/ATA/AGG/GAC/TGA/CCG/TAC/C | |
| pGFus | + | SB119 | GAT/AAG/CAA/AAG/AAA/GTA/AAT/ATC/AA/T/TGG/AGG/GGA/CTT/GAT/TTT/GAT | G-Box1 Mutageneseprimer |
| pGFus | - | SB120 | GAT/CAA/AAT/CAA/GTC/CCC/TCC/AAT/TGA/TAT/TTA/CTT/TCT/TTT/GCT/TAT/C | |
| pGFus | + | SB121 | GAA/GTT/GTT/AAT/TTT/GAT/AAA/CCA/ATT/GCA/TGC/ATC/TTC/TTC/TTC/TTC | G-Box2 Mutageneseprimer |
| pGFus | - | SB122 | GAA/GAA/GAA/GAA/GAA/GAT/GCA/TGC/AA/T/TGG/TTT/ATC/AAA/ATT/AAC/AAC/TTC | |
| pGFus | + | SB123 | TCA/ACC/GGA/GCT/GAC/TCT/CG | PCR-Primerpaar |
| pGFus | - | SB124 | TAA/CAT/AAG/GGA/CTG/ACC/GTA/CCC | |
| pGFus | + | SB125 | TCC/GAG/CCA/TAC/CAA/ATC/GCT/ACG | PCR-Primerpaar |
| pGFus | - | SB126 | GCT/TTC/TTG/TAA/CGC/GCT/TTC/CCA/C | |
| | + | SB127 | GTA/CGC/AAG/G | <i>SplI/BamHI</i> -Adaptor |
| | - | SB128 | GAT/CCC/TTG/C | |
| pGFus | + | SB129 | TTT/TTT/GCA/TGC/ACC/TAA/CCA/TAA/TTG/AAA/TCG/AAC/TCC/C | PCR-Primerpaar |
| pGFus | - | SB130 | TTT/TTT/GCA/TGC/GAA/CGG/AAA/TGA/AT/A/TCA/CGA/CGT/GG | |

2.12 Anmerkungen

Falls nicht anders angegeben, entsprachen alle verwendeten Chemikalien einem analytischen Reinheitsgrad und wurden von den Firmen MERCK, SIGMA oder SERVA bezogen. Für alle Arbeiten wurde deionisiertes Wasser verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Expression der *Atjrg21*-mRNA

Auf der Suche nach Jasmonat-regulierten Genen wurde die cDNA des *Atjrg21* isoliert. Den Eigenschaften eines Jasmonat-regulierten Gens entsprechend findet man nach der Applikation von Methyljasmonat eine Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA (Abb. 1.2). Diese Jasmonat-induzierte Akkumulation war in allen getesteten Geweben mit unterschiedlicher Intensität zu beobachten. In unbehandeltem Gewebe konnte hingegen kein *Atjrg21*-Transkript nachgewiesen werden (Abb. 1.3). Im Rahmen dieser Dissertation wurden weitere Northern-Analysen durchgeführt, um hierdurch mehr Information über die Regulation des *Atjrg21* und daran beteiligten Signalwegen zu bekommen.

Die Abbildung 3.1 zeigt die Konzentrations-abhängige Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA im Blattgewebe 24 Stunden nach dem Flottieren auf Methyljasmonat in Konzentrationen von 1 bis 400 μM . Für den Nachweis von *Atjrg21*-mRNA war eine minimale Konzentration von 5 μM notwendig. Mit Zunahme der Konzentration an appliziertem Methyljasmonat wurde eine Zunahme der Menge an *Atjrg21*-mRNA beobachtet. Höhere Dosen an Methyljasmonat wurden nicht getestet, da die Lösung des hydrophoben Methyljasmonats bei höheren Konzentrationen kritisch ist. Insofern kann keine Aussage über einen Dosis-Effekt getroffen werden, d.h. über eine optimale Konzentration zur maximalen Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Der Einfluss von Licht auf die Aktivierung durch Methyljasmonat ist in Abbildung 3.2A dargestellt. Unter Dauerlicht ist 4 Stunden nach der Behandlung eine starke Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA zu beobachten, welche nach 12 Stunden rückläufig ist. Nach 24 Stunden wiederum ist eine Zunahme der Akkumulation im Northern-Blot zu verzeichnen. Unter Lichtausschluss findet man ein umgekehrtes Bild. Hier zeigt sich beim Vergleich der 3 Zeitpunkte, dass nach 12 Stunden Behandlung die stärkste Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA im Northern-Blot sichtbar ist.

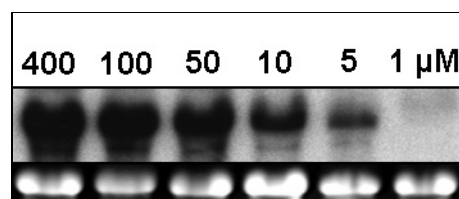
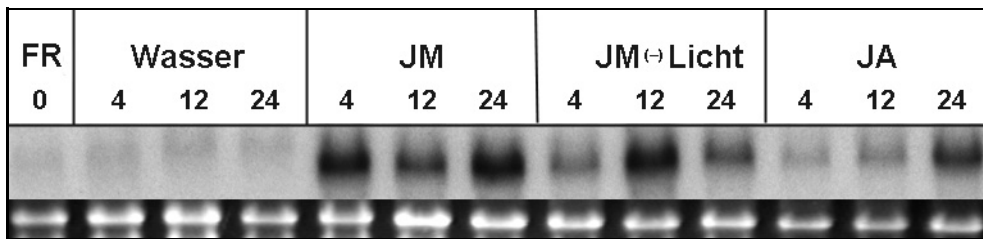


Abb. 3.1: Methyljasmonat-Dosiseffekt

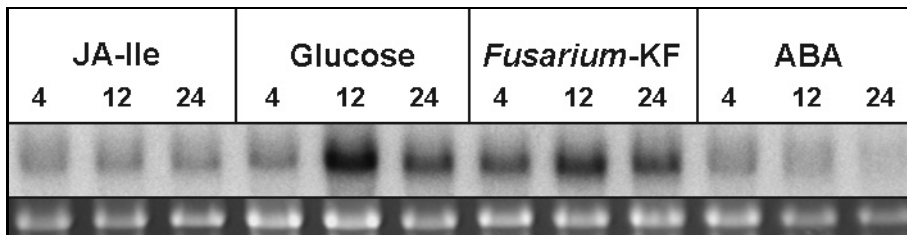
Die Abbildung zeigt das Autoradiogramm einer Northern-Analyse zur Konzentrations-abhängigen Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Behandlung mit Methyljasmonat in den Konzentrationen 1, 5, 10, 50, 100 oder 400 μM über einen Zeitraum von 24 h. Hierfür wurde Blattgewebe ca. 6 Wochen alter Kurztag-Pflanzen auf wässrigen Lösungen von Methyljasmonat flottiert. 20 μg RNA wurde von jeder Probe auf eine Nylonmembran transferiert und mit der ^{32}P -markierten *Atjrg21*-cDNA hybridisiert. Unterhalb des Autoradiogramms ist die RNA-Beladungsmenge anhand 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar.

In weiteren Experimenten wurden zwei weitere Jasmonate, die freie Jasmonsäure (JA) und das Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile), auf ihre Fähigkeit, die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA zu beeinflussen, getestet. Dies geschah im unmittelbaren Vergleich zu einer Behandlung mit Methyljasmonat (JM) und der Behandlung mit Wasser. Als weitere Kontrolle wurde unbehandeltes Gewebe (Frischkontrolle, FR) aufgearbeitet. Als Gewebe dienten hier drei Wochen alte Arabidopsissprosse. In den Abbildungen 3.2A und 3.2B sind die Ergebnisse dieser Analysen dargestellt. In unbehandeltem oder mit Wasser behandeltem Gewebe ist keine *Atjrg21*-mRNA nachweisbar. Die Applikation der Jasmonsäure und des Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugats in einer Konzentration von je 100 μM führt zu einer vergleichsweise geringen Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA. Die Akkumulation nimmt hier mit der Zeit zu.

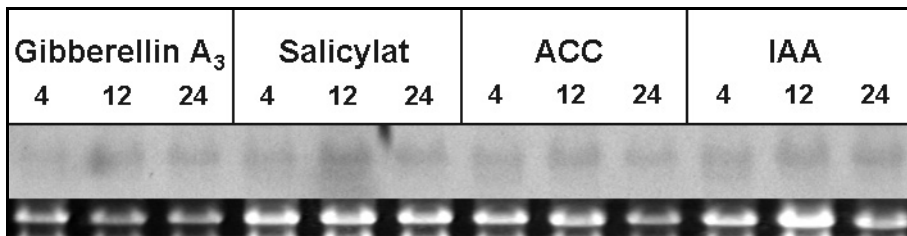
A)



B)



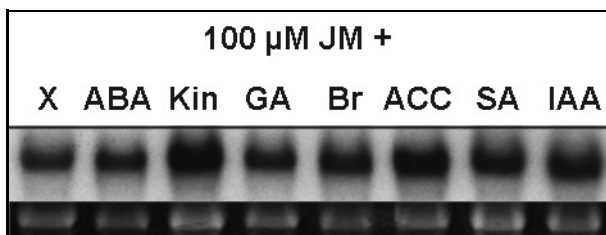
C)



D)



E)



F)

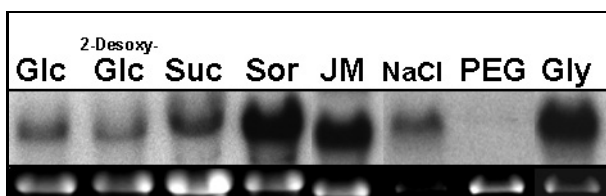


Abb. 3.2: Einfluss verschiedener Jasmonate, Phytohormone und anderer Stressoren

Die Abbildungen A bis F zeigen Autoradiogramme von Northern-Analysen zur Untersuchung der *Atjrg21*-Transkriptakkumulation nach verschiedenen Behandlungsbedingungen. Die Behandlung 3 Wochen alter Arabidopsis-Sprosse (Kurztag-Pflanzen) erfolgte durch das Flottieren auf wässriger Lösung. Zu 3 verschiedenen Zeitpunkten, 4, 12 und 24 h nach Beginn der Behandlung, wurden Proben entnommen und aufgearbeitet. Für die unter F dargestellten Untersuchungen dienten Blätter ca. 6 Wochen alter Kurztag-Pflanzen. Eine Behandlung erfolgte hier über 24 h. 10 µg RNA jeder Probe wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit der ³²P-markierten *Atjrg21*-cDNA hybridisiert.

Behandlungsbedingungen:

A) unbehandelt (FR), Wasser, 100 µM Methyljasmonat (JM), 100 µM Methyljasmonat unter Lichtausschluss (JM (-) Licht), 100 µM Jasmonsäure (JA)

B) 100 µM Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat (JA-Ile), 0,5 M Glucose, *Fusarium*-Kulturfiltrat (KF), 100 µM Abscisinsäure (ABA)

C) 100 µM Gibberellin A₃, 1 mM Natriumsalicylat (Salicylat), 1 mM Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC), 100 µM Indolylessigsäure (IAA)

D) 100 µM Kinetin, 100 µM Brassinolid, 1 mM Silbernitrat (AgNO₃)

E) 24 h 100 µM Methyljasmonat unter Zusatz von: X - kein Zusatz (Kontrolle), 100 µM Abscisinsäure (ABA), 100 µM Kinetin (Kin), 100 µM Gibberellin A₃ (GA), 100 µM Brassinolid (Br), 1 mM Aminocyclopropan-carbonsäure (ACC), 1 mM Natriumsalicylat (SA), 100 µM Indolylessigsäure (IAA)

F) 24 h 0,5 M Glucose (Glc), 0,5 M 2-Desoxy-Glucose (2-Desoxy-Glc), 0,5 M Saccharose (Suc), 0,5 M Sorbitol (Sor), 100 µM Methyljasmonat (JM), 0,5 M Natriumchlorid (NaCl), 20 % Polyethylenglycol 4000 (PEG), 20 % Glycerol (Gly)

Unterhalb des Autoradiogramms ist jeweils die RNA-Beladungsmenge anhand 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar.

Weiterhin wurden, wie in den Abbildungen 3.2B bis 3.2F sichtbar, weitere Phytohormone, Elicitoren und Stressoren getestet. Das Flottieren der Arabidopsis-Sprosse auf verschiedenen Phytohormonlösungen wie 100 µM Gibberellin A₃ (GA₃), 100 µM Indolylessigsäure als Auxin (IAA), 100 µM Kinetin als Cytokinin (Kin), 100 µM Brassinolid als Vertreter der Brassinosteroide (Br) oder mit der Ethylenvorstufe Aminocyclopropan-carbonsäure (1 mM, ACC) über einen Zeitraum von 24 Stunden führt zu keinem Anstieg in der Transkriptakkumulation des *Atjrg21*. Lediglich das Phytohormon Abscisinsäure (100 µM; ABA) induziert einen leichten, schnellen und reproduzierbaren Anstieg der *Atjrg21*-Transkriptmenge. Unter Betracht einer möglichen Funktion des *Atjrg21* bei der Abwehr von Pathogenen wurde getestet, ob Salicylat als Signalmolekül im Rahmen der SAR die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA beeinflusst. Eine Behandlung der Pflanzen mit 1 mM Natriumsalicylat induziert keine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Die Applikation von 1 mM Silbernitrat, einem Aktivator des Jasmonat-regulierten *Thi2.1*-Gens, führt zu einer schwachen Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in den hierbei sehr gestressten Pflanzen (Abb. 3.2D).

Bei kombinierter Applikation von 100 µM Methyljasmonat mit verschiedenen Phytohormonen bzw. -vorstufen findet man vorwiegend keine Effekte auf die Induktion durch Methyljasmonat. Nur bei gleichzeitiger Gabe von Kinetin oder ACC sind, trotz erhöhter Beladungsmenge, verstärkende Effekte sichtbar (Abb. 3.2E).

Der Einfluss verschiedener 0,5 M Zuckerlösungen und anderer osmotisch wirksamer Lösungen auf die *Atjrg21*-Transkriptakkumulation ist in der Abb. 3.2F dargestellt. Hierfür wurden Arabidopsisblätter für 24 Stunden auf der Lösung flottiert. Als wirksamste Substanz hat sich Sorbitol (Sor) erwiesen. Im Vergleich zu anderen Zuckerlösungen aus Saccharose, Glucose oder 2-Desoxyglucose war bei einer Sorbitolbehandlung die stärkste Akkumulation an *Atjrg21*-mRNA zu verzeichnen. Andere Hydroxyverbindungen wie Glycerol oder Polyethylenglycol 4000 zeigten sehr unterschiedliche Effekte bei einer Applikation als 20%ige Lösungen. Während man eine starke Akkumulation nach 24 Stunden bei einer Behandlung mit Glycerol beobachtet, ist kein Transkript nach einer Behandlung mit PEG nachweisbar. Setzt man die Pflanzen einem osmotischen Stress auf der Grundlage von 0,5 M Natriumchlorid aus, so ist nur eine schwache Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA zu detektieren. In der Abbildung 3.2B sei hier beispielhaft der Verlauf einer Induktion nach einer Behandlung mit einer 0,5 M Lösung von

Glucose (Glc) über 3 Zeitpunkte dargestellt. Glucose diente, aufgrund der Verfügbarkeit, für anderweitige Experimente als Standard für eine Zucker-vermittelte Induktion.

In Bezug auf eine mögliche Funktion des *Atjrg21* bei der Pathogenantwort wurde die Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA in infizierten Pflanzen untersucht. Hierfür wurden die Pflanzen mit dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae* infiziert (nach Eppe et al., 1998). Die RNA-Proben wurden freundlicherweise von H. Bohlmann (ETH, Zürich) zur Verfügung gestellt. Die Pilzinfektion führt nach 2 Tagen zu einer sehr starken Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA (Abb. 3.3). An den darauf folgenden Tagen ist eine weitere Zunahme der Transkriptakkumulation zu beobachten. Spätere Zeitpunkte wurden nicht getestet. Auch die Applikation des Kulturfiltrats des Pilzes führt unabhängig von einer Infektion zu einer geringen Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA mit einer maximalen Akkumulation bei 12 Stunden (Abb. 3.2B).

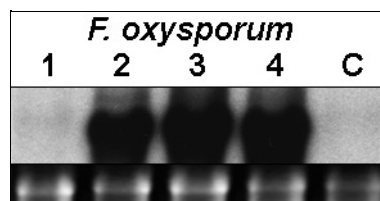


Abb. 3.3: Infektion mit *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae*

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Northern-Analysen zur *Atjrg21*-Transkriptakkumulation nach Infektion mit dem Pilz *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae*. Die RNA-Proben wurden freundlicherweise von H. Bohlmann (ETH, Zürich) zur Verfügung gestellt. Die RNA entstammt ca. 12 Tage alten *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (Col-2) 1 - 4 Tage nach der Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Keimlingen (C). Es wurden 10 µg RNA von jeder Probe auf eine Nylonmembran transferiert und mit der ³²P-markierten *Atjrg21*-cDNA hybridisiert. Unterhalb des Autoradiogramms ist die RNA-Beladungsmenge anhand 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar.

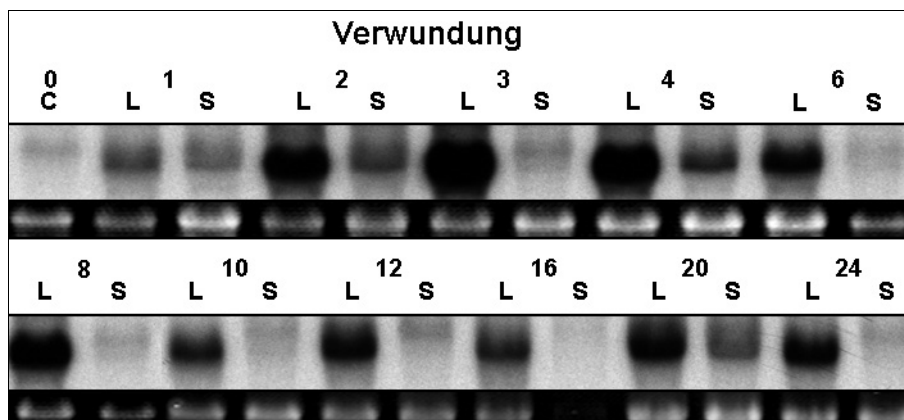


Abb. 3.4: Zeitliche und räumliche Akkumulation nach lokaler Verwundung

Dargestellt ist das Autoradiogramm zu Northern-Analysen über die Verwundungs-bedingte Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA in verwundeten (L, lokal) und benachbarten, unverwundeten Blättern (S, systemisch) nach 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 oder 24 h. Hierfür wurden insgesamt 11 ca. 6 Wochen alte Kurztag-Pflanzen durch Quetschen eines Blattes mit einer Zange verwundet. Pro Zeitpunkt wurde von jeweils einer Pflanze das verwundete Blatt und ein unverwundetes, benachbartes Blatt für die RNA-Isolation entnommen. 10 µg RNA jeder Probe wurden auf eine Nylonmembran transferiert und mit der ³²P-markierten *Atjrg21*-cDNA hybridisiert. Unter C wurde RNA einer unverwundeten Kontrollpflanze zum Zeitpunkt 0 aufgetragen. Die Beladungsmenge an RNA ist anhand der 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel unterhalb sichtbar.

Die Kinetik der Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach einer Verwundung der Pflanze ist in der Abbildung 3.4 dargestellt. Hierfür wurde für jeden Zeitpunkt eine Pflanze durch Quetschen eines Blattes (längs zur Blattspreite) verwundet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde das verwundete Blatt und ein benachbartes, unverwundetes Blatt zur Aufarbeitung entnommen. Die Northern-Analysen zeigen, dass bereits nach einer Stunde *Atjrg21*-mRNA im verwundeten Blatt (L, lokal) als auch im benachbarten, unverwundeten Blatt (S, systemisch) akkumuliert. Ein Maximum an *Atjrg21*-mRNA findet man 3 Stunden nach der Verwundung im verwundeten Blatt. Nach diesem frühen Maximum findet man einen zweiten, zeitlich späteren und schwächeren Anstieg der Transkriptmenge nach ca. 20 Stunden im verwundeten Blatt. In den unverwundeten Blättern findet man eine vielfach schwächere Akkumulation an *Atjrg21*-mRNA.

3.2 Überexpression von AtJRG21-Protein in *E. coli*

Das Ziel der Überexpression war die Herstellung von rekombinanten AtJRG21-Protein für die Immunisierung von Kaninchen und Gewinnung von Anti-AtJRG21-Antisera. Diese Antisera sollen speziell für zukünftige Untersuchungen an AtJRG21-überexprimierenden und AtJRG21-nicht-exprimierenden Pflanzen dienen. Die Reinigung des rekombinanten Proteins wurde durch die Fusion eines Vektor-vermittelten 6xHistidin-Epitops und Bindung an Nickel-Agarose erreicht. Hierfür wurde die *Atjrg21*-cDNA über eine *XmnI*-Schnittstelle im N-terminalen Bereich und eine Vektor-ständige *KpnI*-Schnittstelle in die aufgefüllte *Bam*HI- und die *KpnI*-Schnittstelle des pQE31-Vektors ligiert und in *E. coli* kloniert. Das Plasmid pQE31/C21-1 wurde in drei verschiedene *E. coli*-Stämme (XL2-blue, M15 pREP4, SG13009 pREP4) transferiert. Im Coomassie-gefärbten PAA-Gel zeigten alle drei Bakterienstämme nach Induktion mit IPTG, im Vergleich zur nicht induzierten Probe, die Akkumulation einer Proteinbande im erwarteten Bereich von 42 kDa. Alle drei Stämme zeigten mit geringen Abweichungen gute Expressionsraten des rekombinanten Proteins. Der *E. coli*-Stamm M15 pREP4 wurde für die nachfolgenden Schritte gewählt. Hier konnte eine maximale Akkumulation an rekombinantem Protein 5 Stunden nach der Induktion durch 2 mM IPTG nachgewiesen werden.

Der Aufschluss der induzierten Zellen erfolgte unter nicht denaturierenden Bedingungen mit Lysozym und Ultraschall. Nachfolgend wurde unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff das rekombinante Protein gelöst. Ungelöstes Protein und Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde für die Affinitätschromatographie mittels einer Nickel-Agarose-Matrix verwendet. Unspezifisch gebundenes Protein konnte mit 25 mM Imidazol von der Säule gewaschen werden. Stringentere Waschschrte waren weder nötig noch sinnvoll, weil sie mit dem Verlust an rekombinantem Protein einhergingen. Die Abbildung 3.5 zeigt die verschiedenen Reinigungsschritte für die Aufreinigung des rekombinanten AtJRG21-Protein.

Das aufgereinigte Protein wurde der Firma EUROGENTECH für die dreimalige Immunisierung von zwei Kaninchen zugesandt. Die gewonnenen Antisera wurden unter verschiedenen Bedingungen auf ihre Spezifität gegenüber AtJRG21 getestet. Die besten Ergebnisse konnten mit dem Antiserum erzielt werden, welches mit der ersten Blutung des ersten Kaninchen entnommen wurde. Für den Nachweis von AtJRG21 in Jasmonat-induziertem Gewebe war jedoch der Einsatz große Mengen an Antiserum nötig (Verdünnung 1:100). Dies war mit einem hohen Hintergrund durch den Nachweis anderer Proteine verbunden. Allgemein war es sehr schwierig, die in der Abbildung 3.6 dargestellte Akkumulation von AtJRG21 nach Jasmonatbehandlung zu reproduzieren. Für intensivere Studien über die Regulation des *Atjrg21* auf Proteinebene ist die Gewinnung neuer Antisera unumgänglich.

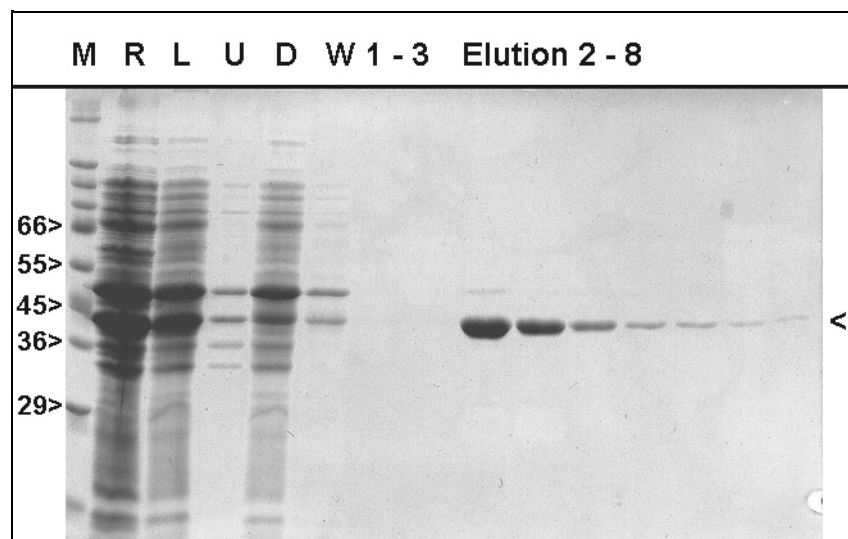


Abb. 3.5: Reinigungsschema für rekombinantes AtJRG21-Proteins

Dargestellt ist das Coomassie-gefärbte PAA-Gel mit Proteinproben verschiedener Reinigungsschritte zur Reinigung von rekombinantem AtJRG21. Unter M ist ein Proteinmarker mit Angabe der Größe der relevanter Markerproteine (in kDa) sichtbar. In der zweiten Spur (R, Rohextrakt) wurde ein Zellrohextrakt von 5 h mit 2 mM IPTG induzierten *E. coli*-Zellen (pQE31/C21-1) aufgetragen. Mit 8 M Harnstoff gelöstes Protein ist in der mit L bezeichneten Spur sichtbar. Hier wurden zuvor ungelöstes Protein und Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt. Diese abgetrennten Bestandteile wurden im Ausgangsvolumen resuspendiert und sind unter U (ungelöst) zu sehen. An die Nickel-Agarose-Matrix ungebundenes Protein ist unter D (Durchlauf) aufgetragen. In den nächsten 3 Spuren (W1-3) sind jeweils Aliquots von drei Waschfraktionen sichtbar (25 mM Imidazol). Die mit „Elution 2-8“ bezeichneten Spuren zeigen die Elution des rekombinanten Proteins mit 500 mM Imidazol. Hierfür wurde den Elutionsfraktionen 2-8 ein Aliquot entnommen. Eine Markierung am rechten Rand verweist auf das rekombinante AtJRG21 bei 42 kDa.

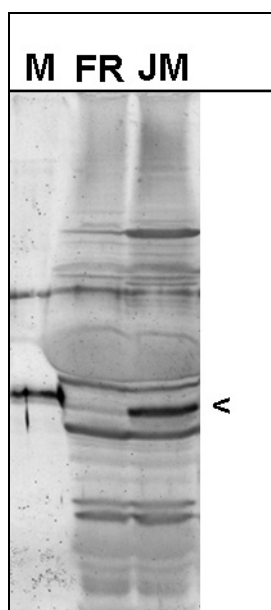


Abb. 3.6: Antikörpernachweis von AtJRG21-Protein

Dargestellt ist ein Immunoblot zum Nachweis von AtJRG21. Hierzu wurden 50 µg Rohextrakt aus unbehandeltem (FR) oder 24 h mit 100 µM Methyljasmonat behandeltem (JM) Blattgewebe aufgetragen. Zum Vergleich wurde gereinigtes, rekombinantes AtJRG21 als Marker aufgetragen (M, 50 ng). Für den Nachweis wurde Anti-AtJRG21-Antiserum in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Markierung am rechten Rand zeigt auf eine Proteinbande im erwarteten Bereich von 41 kDa in der JM-behandelten Probe.

3.3 Isolierung genomischer *Atjrg21*-Klone

Beim Screening einer genomischen Bank des *Arabidopsis thaliana* Ökotyps Columbia (Col-0) wurden 8 positive Phagenklone isoliert. Von diesen 8 Klonen wurde die Phagen-DNA isoliert und zur weiteren Klonierung in *E.coli* mit der Restriktionsendonuklease *XhoI* geschnitten und in den Bluescript-Vektor ligiert. Subklone der 8 Phagenklone wurden auf das Vorkommen des *Atjrg21*-Gens mittels PCR getestet. Hierzu dienten der cDNA homologe und Vektor-ständige Primer. Der Klon mit dem Plasmid pG21-5/2 mit ca. 1,5 kb Promotorregion und vollständigem Genbereich wurde beidsträngig sequenziert und für alle nachfolgenden Arbeiten verwendet. Mithilfe der nun bekannten Sequenz konnten alle isolierten Phagenklone über Restriktionsanalysen und nachfolgender Hybridisierung mit dem Subklon pG21-5/2 einem Genlokus zugeordnet werden (Abb. 3.8).

3.4 Sequenzanalysen und Datenbankvergleiche

3.4.1 Sequenz und Genstruktur des *Atjrg21*-Gens

Der sequenzierte, genomische Klon pG21-5/2 umfaßt 4380 bp mit 1473 bp Promotorregion stromaufwärts vom Translationsstart. Der codierende Bereich wird von zwei Introns auf drei Exons unterteilt und ist zu 100 % identisch zur bekannten cDNA-Sequenz. Die Abbildung 3.7 zeigt die Exon/Intron-Struktur des *Atjrg21*-Gens im Vergleich zur *Atjrg21*-cDNA. Unter 7.1 ist die vollständige Sequenz des Klons pG21-5/2 abgebildet. Ferner sind markante Sequenzmotive und für weitere Arbeiten wichtige Schnittstellen illustriert. Der Transkriptionsstart des *Atjrg21* wurde mittels einer „primer extension“-Reaktion in einem Bereich ca. 64 bp stromaufwärts vom Translationsstart kartiert (siehe Abb. 3.9 und Kapitel 7.1). In unmittelbarer Nähe befindet sich eine putative TATA-Box, welche in ihrer Sequenz mit der aus den 4-Cumarat-CoA-Ligase-Genen aus Petersilie (TATAT) übereinstimmt (Douglas et al., 1987). Weiterhin befindet sich stromaufwärts ein markanter poly(dA)-Bereich bestehend aus einer Sequenz von 22 aufeinanderfolgenden Adenosinresten. Derartige poly(dA:dT)-Bereiche wurden in vielen Promotoren von Hefe-Genen beschrieben. Hier sind diese poly(dA:dT)-Bereiche stromaufwärts von der TATA-Box für hohe Transkriptionsraten verantwortlich (Struhl, 1985). Entgegen anderen Promotorelementen fungieren diese Element nicht durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren, sondern erleichtern durch ihre Struktur den Zugang zur DNA (Iyer & Struhl, 1995).

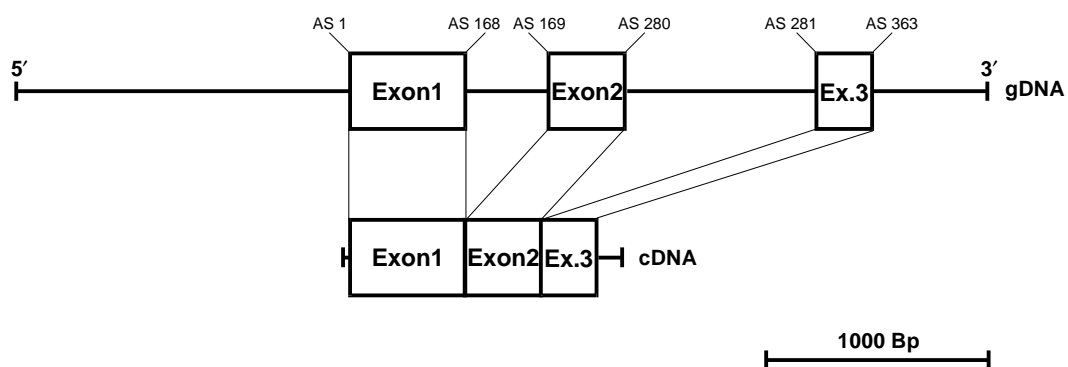


Abb. 3.7: *Atjrg21*-Genstruktur

Dargestellt ist die *Atjrg21*-Genstruktur im Vergleich zur *Atjrg21*-cDNA. Im oberen Teil ist die *Atjrg21*-Genstruktur bezogen auf den genomischen Klon pG21-5/2 abgebildet. Der codierende Bereich der drei Exons ist anhand von Boxen illustriert. Am oberen Rand der Exon sind die jeweilig codierten Aminosäurereste (AS) angegeben. Im unteren Teil der Abbildung erfolgt der Vergleich zur Intron-freien cDNA. Ein Balken am rechten, unteren Bildrand widerspiegelt einen Bereich von 1000 bp.

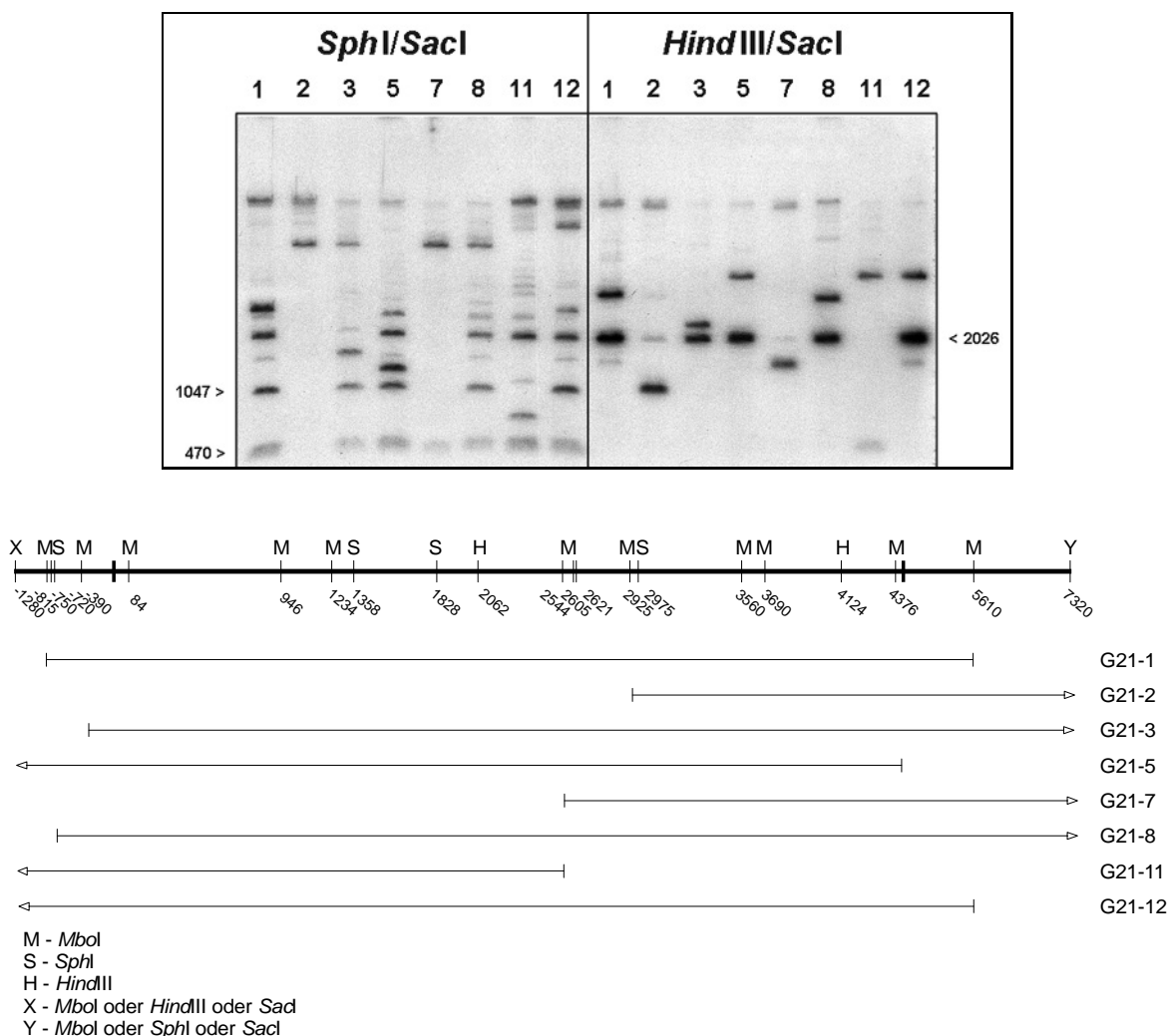


Abb. 3.8: Restriktionsanalyse der genomischen G21-Klone

Im oberen Teil der Abbildung ist das Autoradiogramm zu Southern-Analysen 8 verschiedener G21-Phagenklone dargestellt. Hierfür wurde die Phagen-DNA der 8 isolierten genomischen *Atjrg21*-Klone mit den Enzymen *SphI/SacI* (abgebildet auf der linken Seite) oder den Enzymen *HindIII/SacI* (rechte Seite) geschnitten. Pro Spur wurden 400 ng DNA aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde diente ein 4,4 kb großes *SacI*-Fragment des sequenzierten G21-5-Subklons pG21-5/2. Am rechten und linken Rand des Autoradiogramms ist die Größe bekannter, interner Fragmente gekennzeichnet.

Im unteren Teil der Abbildung ist die Zuordnung der einzelnen Phagenklone zum *Atjrg21*-Genloкус dargestellt. Der durch dicke Balken eingegrenzte Bereich auf oberen Linie entspricht dem durch *XhoI*-Verdau isolierten G21-5/2-Fragment des genomischen Klons G21-5 (0 bis 4380). Innerhalb dieses Bereichs sind die durch die Sequenzierung bekannten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *SphI* (S), *HindIII* (H) und *Mbol* (M) angegeben. *Mbol*-Schnittstellen entsprechen potenziellen Klonierungsstellen der DNA in den *Lambda*-Vektor. Außerhalb dieses Bereichs sind die aus dem Hybridisierungsmuster (oben) errechneten Schnittstellen markiert. Unterhalb ist die Zuordnung der einzelnen G21-Klone zum Genort graphisch dargestellt. Ein Balken am Ende einer Linie stellt die Klonierungsstelle in den *Lambda*-Vektor dar. Ein Pfeil am Ende zeigt den weiteren Verlauf der DNA an. Die an den Enden mit „X“ oder „Y“ bezeichneten Schnittstellen lassen keine eindeutige Zuordnung zu einen der vier Enzyme zu.

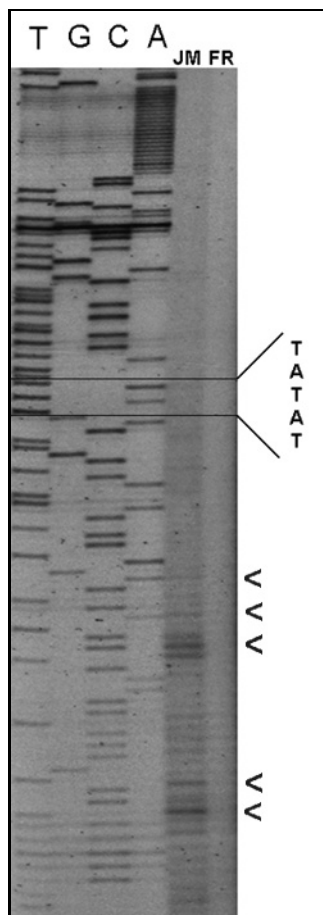


Abb. 3.9: Kartierung des Transkriptionsstarts

Dargestellt ist das Autoradiogramm der Analysen zur Bestimmung des 5'-Terminus der *Atjrg21*-mRNA. Im rechten Teil der Abbildung ist die ^{32}P -markierte „primer extension“-Reaktion aus RNA von JM-behandeltem Gewebe (JM) im Vergleich zu unbehandeltem Gewebe (FR) aufgetragen. Parallel hierzu wurde die ^{35}S -markierte Sequenzierreaktion mit demselben Primer (SB116, siehe 2.11) und dem genomischen Klon pG21-5/2 im PAA-Gel aufgetrennt. Am rechten Rand sind die putative TATA-Box und potenzielle Transkriptionsstartpunkte gekennzeichnet.

Datenbankvergleiche mit der genomischen *Atjrg21*-Sequenz enthüllen sehr hohe Homologien im Promotorbereich zu einer Vielzahl von genomischen Arabidopsissequenzen. Dieser Block an homologen, repetitiven Sequenzen beschränkt sich signifikant auf einen Bereich von ca. -1194 bis -334 bezogen auf die Position des Translationsstarts bzw. von 280 bis 1140 bezogen auf den genomischen Klon pG21-5/2. Der Grad an Übereinstimmung über diesen Bereich erreicht Maximalwerte von 97 %. Eine Funktion konnte diesen homologen Sequenzen nicht zugeteilt werden. Man findet diese repetitiven Sequenzen zufällig verstreut im Arabidopsisgenom. In anderen Pflanzenarten konnten keine hierzu homologen Sequenzen gefunden werden. Die Abbildung 3.10 zeigt im oberen Bereich das Histogramm nach einem exemplarischen Datenbankvergleich der *Atjrg21*-gDNA gegen die Arabidopsis-Datenbanken. Im Vergleich hierzu ist unterhalb ein unter gleichen Bedingungen erhaltenes Histogramm der genomischen Sequenz des *Atjrg21*-homologen *Atjrg25*-Gens (siehe 3.4.3) illustriert. Hier findet man zufällig verteilt, geringe Homologien zu anderen Sequenzen.

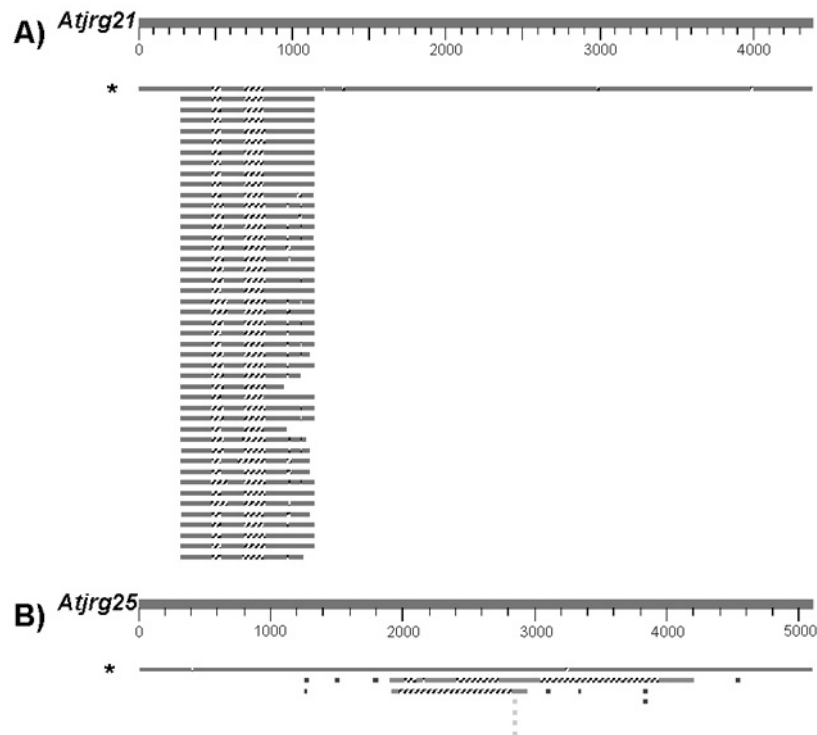


Abb. 3.10: *Atjrg21*-Promotorhomologien

Die Abbildung zeigt schematisch zwei exemplarische Histogramme nach Datenbankvergleichen mit der genomischen Sequenz des *Atjrg21* im oberen Teil und des *Atjrg25* im unteren Teil. Die Histogramme wurden nach Datenbankvergleichen am NCBI im Blast-Modus (siehe 2.8.2) erhalten. Unter A ist die zu Grunde liegende Sequenz des *Atjrg21*-Klons pG21-5/2 in 5'-3'-Richtung für einen Bereich von 1 bis 4380 symbolisiert. Der *Atjrg21*-Promotor erstreckt sich hier über einen Bereich von 0 bis ca. 1500. Unterhalb sind homologe Sequenzen für den zugehörigen Bereich abgebildet. Mit einem Stern ist direkte Übereinstimmung zu den korrespondierenden *Atjrg21*-Gensequenzen markiert. Unter B ist analog zu A das *Atjrg21*-homologe *Atjrg25* eingesetzt.

3.4.2 AtJRG21-homologe Proteine

Bei Datenbankvergleichen mit der AtJRG21-Peptidsequenz konnten in letzter Zeit drei AtJRG21-homologe Proteine detektiert werden. Diese als „putative leucoanthocyanidin dioxygenase“ ausgewiesenen Sequenzen wurden vorläufig als AtJRG22, AtJRG23 und AtJRG25 bezeichnet, wobei sich die letzte Ziffer auf das Chromosom ihres Genortes bezieht (z.B. AtJRG22 auf Chromosom 2). Im Grad der Homologie zur AtJRG21-Proteinsequenz grenzen sich diese Sequenzen deutlich von anderen Vertretern der Superfamilie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODDs) in *Arabidopsis thaliana* ab. Diese Befunde werden durch die in der Tabelle 3.1 aufgelisteten Homologien zur AtJRG21-Proteinsequenz und den in Abb. 3.12 dargestellten multiplen Sequenzvergleich Sequenzen illustriert. Im Dendrogramm (Abb. 3.11) findet man erwartungsgemäß eine eigenständige Gruppe der AtJRG21-homologen Proteine AtJRG22, 23 und 25 innerhalb ausgewählter 2-ODDs aus *Arabidopsis thaliana*.

Tab. 3.1: AtJRG21-homologe Proteine

In der Tabelle sind ausgewählte, homologe Proteine mit Angabe ihrer Zugangsnummer (Accession-Nr.) und dem Grad an Ähnlichkeit und Identität zur AtJRG21-Proteinsequenz aufgelistet. Die Proteinsequenzvergleiche wurden im „bestfit“-Modus mit dem Programm HUSAR 5.0 am DKFZ (Heidelberg) erstellt. Die homologen Proteine gehören zur Superfamilie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen und sind teilweise funktionell bekannt: LDOX-Leucoanthocyanindioxygenase, SRG1-unbekannte Funktion, F3H-Flavanon-3 β -hydroxylase, EFE-Ethylene-forming Enzyme, ACCOX-1-Aminocyclopropan-1-carbonsäureoxidase, GIBOX-Gibberellin-20-oxidase.

| Protein | Accession-Nr. | Ähnlichkeit zum AtJRG21 | Identität zum AtJRG21 |
|---------|---------------|-------------------------|-----------------------|
| AtJRG23 | - | 73,8 % | 65,9 % |
| AtJRG25 | - | 72,8 % | 63,7 % |
| AtJRG22 | - | 64,3 % | 55,4 % |
| LDOX | T05119 | 49,8 % | 35,9 % |
| SRG1 | S44261 | 48,9 % | 35,4 % |
| F3H | T45755 | 50,4 % | 36,7 % |
| EFE | JT0755 | 50,9 % | 36,1 % |
| ACCOX | T01448 | 48,4 % | 35,3 % |
| GIBOX | T05805 | 47,4 % | 38,4 % |

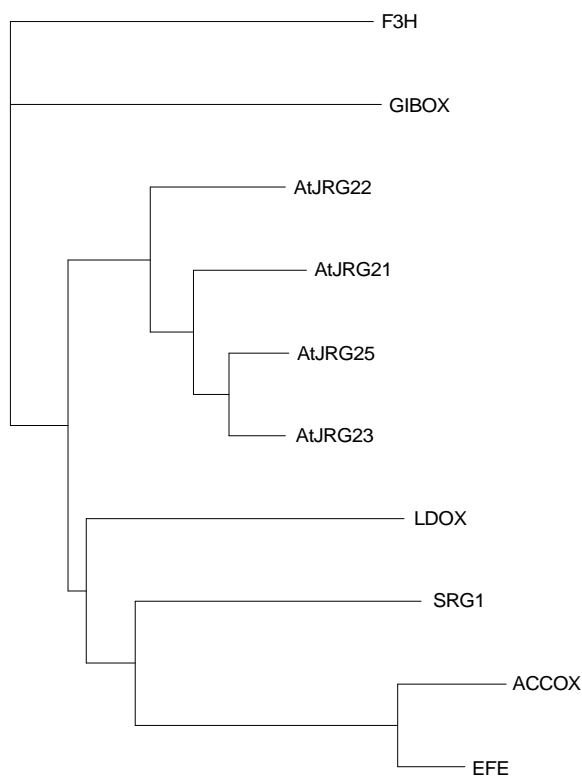


Abb. 3.11: Dendrogramm AtJRG21-homologer Proteine

Im Dendrogramm ist die Verwandtschaft ausgewählter, AtJRG21-homologer 2-Oxoglutarat-abhängiger Dioxygenasen dargestellt. Dem Dendrogramm (nach Kimura) liegt ein multipler Sequenzvergleich mit dem Programm CLUSTAL W zu Grunde (siehe 2.8.2). Die verwendeten Abkürzungen sind in der Tab. 3.1 (oben) ersichtlich.

| | | |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 1 | MNIFQD-----WPEPIVR-VQSLS-ESNLGAI-PNRVYKBLSCRENTIT--P-HNKHNQTTTIF | AtJRG21 |
| 1 | MNNLDEIKIESKTCINDQEQEVKIDNMHMSDQDKNKIEIKNKSGLGKWEPEPIVR-VQSLA-ESNLISLSDRYIKPESREPTT--IIDHQPEVADINIP | AtJRG23 |
| 1 | MNK-----NKIDVKIETKKGSMDEWPEPIVR-VQSLA-ESNLSSLPDRYIKPASIRPTT-----FDAPTATNIP | AtJRG25 |
| 1 | MA-----TC-----WPEPIVS-VQSLS-OTGVPTV-PNRVYKPAHQRP-----VFNNTQSDAGTEIP | AtJRG22 |
| 1 | M-----VAVERVESLAK-SGIISIPKEYIRKPELESIN-DVFLPEKKEDGPOVP | LDOX |
| 1 | M-----EAKG-----AACWSSILVPSVQEMVKEKTIITVPEFRVRSDDQKTEV-----DDDFDVKTEIP | SRG1 |
| 1 | MAP-----GTLTE-----LAGES--KLNKSFVRDEDERPKVAYNVFSDI-----IP | F3H |
| 1 | MES----- | EFE |
| 1 | MEK----- | ACCOX |
| 1 | MAV-----SFVTTSPFEEEDKPKLGLGNIQ-----TPLIFNPSMLNLOA--NIPNQFIWEDDKPSTI--NMLELD-----VP | GIBOX |
| 54 | IIDLGRITPDLTLQAKTLDETSKACRELGFFQVNVHGMSEQLMDQAKATWREFFNLPELKNMANSPKTI--YEGYGSRLGVEKCAILDWSD---YYYL | AtJRG21 |
| 97 | IIDLDSLFS----GNEDDKRRISEACREWGFQVINHGKPELMDAAREFNWKSFFNLPEVAKVYVNSPRTI--YEGYGSRLGVEKCAILDWSD---YYYL | AtJRG23 |
| 64 | IIDLEGFSSEGLSDIVIMARISEACRWGFFQVNVHGMKPELMDAAREFNWREFFHMPVNAKETYVNSPRTI--YEGYGSRLGVEKCAILDWSD---YYYL | AtJRG25 |
| 50 | VLDM----NDVWGKPEGLRIVRSACEWGFQVNVHGMVTHSLMERVRCARWREFFFLPEEKRYANSPTI--YEGYGSRLGVEKCAILDWSD---YFEL | AtJRG22 |
| 49 | IIDLKNIESDDEKIRENCIEELKASLDWGMHLINHGIPADLMERVKAGEEFFSLVSEEKEYANDQATGKICGYGSKLANNASGLWED---YFHH | LDOX |
| 55 | IIDMKRLCSSTIM--LSEVEKLDFAKCEWGFQVNVHGISSFTLQVNSEIQDFNLPEEKKKQWQREDE--IEGFCQAFVISEDQKLDWAD---IFHH | SRG1 |
| 40 | VISLACIDDDVGRGETC-ROHVEACENWEIFQVVDHGVDTNIVADMTRLARDFPALPEEDKLRDM--SGGKKGCFIVSSHLOGEAWQDREIVIVYSY | F3H |
| 6 | IINLEKNGEE---RAITMEKIKDACENWGFBEVNVHGISLELIDKVEKMTKHYKKCEBER--EKSISIKNRGLDSLSEV---NDVWREST---FVH | EFE |
| 9 | VVDLSKNGEE---RDTMALINACENWGFBEIVNHGLPHLMDKLEKMTKDHYKTCOEK--ENDMLKSKGLDNLETEV---EDVWREST---FVH | ACCOX |
| 63 | IIDQNLISLPSSTILAS-RLISEACKHGFIVNVHGISBELISDAHEYTSRFDMPLSEKQVRLR--KSGESVGYASSFTGRFSIKLWPKETLSFRFC | GIBOX |
| 149 | EYQ--PSSLKDY--TKWPSLPIHOREILEDYCKEYKICENIMKILSKNLGLOPDRLOAFGGKEESGCLRVNYYPKCPQPELALGLSPHSDPGGITIL | AtJRG21 |
| 188 | EHL--PLALKDF--NKWPSLSPNIREMNDYCKELVKIGGRIMTILSSNLGLRAEQLOAFGG--EDVGAQLRVNYYPKCPQPELALGLSPHSDPFGMTIL | AtJRG23 |
| 159 | EHL--PHHLKDF--NKWPSFPPTIREVIDEYGEELVKLSGRIMRVLSTINLGLKEDKFOAFGG--ENIGACLRVNYYPKCPPELALGLSPHSDPFGMTIL | AtJRG25 |
| 140 | NYL--PSSIRNP--SKWPSQPKIRELIEKYGEVVKLQERLIELESLGLKPNLMQALGGGKVGASLRINIEYKCPQPELALGLSSHSDPFGITIL | AtJRG22 |
| 146 | LAY--PEEKDIL--SIWPKTFSYIEATSEYAKLRLRLATKVFKALSVGLGLEPDRLEKEVGGLEELLQMKINYYPKCPQPELALGVEAHTDVSALTEI | LDOX |
| 148 | IVQ--FVEIRKP--HLFEKLPPIPHRDLIEYSSSEVQSVAKILIAKMARALEIKPELEKLFDDVDSV--QSMRNYYPECPQDQVIGLTPHSDSVGLTIL | SRG1 |
| 137 | FVRNR----DY--SRWPKPEGWVWTEEYSERLMSLACKLLEVLSEAMGLEKESLIVACVMDQK---IVVNYYPKCPQPELTLGLKRTDPGTTIL | F3H |
| 93 | KHLVPSN-ISDV----PILDDYRITLMKDFAGKIKELSEELDLLENLGLKGLKVVYGSKRPTFGTKVSNYPFCPNPLIVKGRRAHTDAGGLIIL | EFE |
| 96 | RHLVPSN-INDI----SDVSEYRTAMKDFCKRIENLAEDLLELLENLGLKGLKVVYGSKRPTFGTKVSNYPFCPKPEMKGRAHTDAGGLIIL | ACCOX |
| 160 | DDMSRSKSVQDYFCDALGHGQFPFGKYYQYQAMSSLSIKIMEELLGLSLGVKRDYFREFFEENDSI---MRLNYYPEKIKEDLTLGTCPHCDETSILIL | GIBOX |
| 245 | LEDEOVASLOV-RGSDDAWITVEPAPHAFIVNIGDQIQILSNSTIYKSVHRVIVNENR-RVSLAFFYNE-KGNVPI-----EPIKE--LVT | AtJRG21 |
| 283 | LEDDQVGLQV-R-HEDTWTIVNPLRHAFIVNIGDQIQILSNSTIYKSVHRVIVNSEK-RVSLAFFYNE-KSDIPI-----CEMQQ--LVT | AtJRG23 |
| 254 | LEDDQVGLQV-R-KDDTWTIVKPEPHAFIVNIGDQIQILSNSTIYKSVHRVIVNSDKE-RVSLAFFYNE-KSDIPI-----QPIQE--LVS | AtJRG25 |
| 236 | LEDEKVALQV-R-RGDAWITKSPNALIVNIGDQIQILSNSTIYKSVHRVIVNSGME-RVSLAFFYNE-RSDIPI-----GSIER--LVT | AtJRG22 |
| 242 | LHN-MVEGLQL-K-YBCKAVTAKCVFDSIVMHIGDLEILLSNGYKSIILHRGIVNKEKV-RISWAVECEPEKDKIVL-----KELPE--MVS | LDOX |
| 243 | MQVNDVEGLQI-K-KDCKVVPKHPNAFIVNIGDQILEIITNGYRSTIEHRGVVNSEK-RLSIATSENV-GMYKEV-----GSAKS--LVE | SRG1 |
| 227 | LQ-DQVGLQATRDNCKTWTIVQVEGAFVNVIGDHGHLSNGRFRKNADQAVVNSNS-RLSIATSENVFAPDATVYP---LKVREGEKATLEE---PIT | F3H |
| 187 | FQDEKVSGLQLLKD--GEVVDVEPVKHSIVVNLGDQLEVITNGYKYSVHRVIVLSDTDCGRVSIASFVYNGSDSVIFPPPELIGKEAEKKNYPRFVF | EFE |
| 190 | FQDEKVSGLQLLKD--GDWIDVEPLNHSIVVNLGDQLEVITNGYKYSVHRVIVLQEGN-RVSVASFVYNGSDAEISPATSLVEKDSE-----YPSFVF | ACCOX |
| 257 | HQ-DHWGLQVFNEN--QARSIRENKAFVNVIGDITFMALSNDRYKSLHRAVNVSESE-RVSLAFFLQERKDRVVTI-----PRDILDS---ITS | GIBOX |
| 327 | WDSPALYSSTIYDRYRQ-FIRTOGPRSKCHIDELKSPR | |
| 364 | STMPELYEPTFDQYRL-FIRTOGPRGKSHVESHSIPR | |
| 335 | THNPELYEPTFDQYRL-FIRTOGPGKSHVESHSIPR | |
| 317 | ANRPALYKPIRFDEYRS-IRQKGFCKGNQVDSLILTR | |
| 323 | MESPAKFFPRTFAQH-----IEHKLFGKEQ-EELVSEKND | |
| 324 | RQKVARERKRLIMKEYND-GLFSRTLLGMAYIDAIRI | |
| 319 | --FAEYKRRKMRDLPIARLKKLAKEERHKE-VAKEVDQIFA | |
| 285 | EDYMKLYSAVKEQAKEPRE---EAMKAMETIVA-NNVGLATA | |
| 281 | DDYMKLYAGVKEQAKEPRE---AAMKNASAWTEINPTAAVETP | |
| 341 | RRYFD-FTWSMLEFTEQKHVADMMTLQAFSDWITKEI | |

Abb. 3.12: Multipler Sequenzvergleich AtJRG21-homologer Proteine

Dargestellt ist ein multipler Sequenzvergleich AtJRG21-homologer Proteinsequenzen: LDOX-Leucoanthocyanindioxygenase, SRG1-unbekannte Funktion, F3H-Flavanon-3 β -hydroxylase, EFE-Ethylene-forming Enzyme, ACCOX-1-Aminocyclopropan-1-carbonsäureoxidase, GIBOX-Gibberellin-20-oxidase. Als schwarze Boxen sind übereinstimmende Bereiche markiert. Erstellt wurde dieser Sequenzvergleich über die CLUSTAL-Funktion mit dem Programm DNASTar.

3.4.3 Kartierung des *Atjrg21*-Genlokus

Eine Kartierung des *Atjrg21*-Genortes erfolgte über eine Hybridisierung von CIC-YAC-Filtern einer genomischen Bibliothek des *Arabidopsis thaliana* Ökotyps Columbia (Col-0) in „Yeast Artificial Chromosomes“ (Creusot et al., 1995). Diese Bibliothek umfasst ca. 92 % des *Arabidopsis thaliana*-Genoms. Die Filter wurden freundlicherweise von R. Schmidt (MDL, Köln) zur Verfügung gestellt. Mit einer *Atjrg21*-cDNA-Sonde konnten Hybridisierungssignale mit den CIC-Klonen 12-G-4, 12-F-10 und 7-F-7 detektiert werden. Alle detektierten CIC-Klone sind auf dem Chromosom 3, Contig 9, kartiert (Camilleri et al., 1998). Die Klone überlappen mit den Markern ve022 (73,50 cM) und BGL1 (71,90 cM).

Innerhalb dieses Bereichs wurden bisher folgende Gene (mit Angabe ihrer Funktion) kartiert:

- 5'-Phosphoribosyl-5-aminoimidazolsynthasegen; Purin *de novo* Synthese (Accession-Nr. L12457; Senecoff et al., 1993)
- Chalcon-Flavanon-Isomerasegen, Anthocyan- und Flavanol-Biosynthese (Accession-Nr. M86358; Shirley et al., 1992)
- Gen für Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2, Proteinabbau (Accession-Nr. X72625; Genschick et al., 1994)

Mit dem 13. April 2000 wurden die Genbereiche des Chromosom 3 mit dem *Atjrg21*-Genbereich im Rahmen des Arabidopsis-Genom-Sequenzierprojekts an die Datenbanken übermittelt. Hierdurch konnten die oben beschriebenen Ergebnisse bestätigt werden.

3.5 Promotoranalysen - Suche nach regulatorischen Bereichen

3.5.1 Promotor-GUS-Konstrukte (ProGUS, Pro509GUS)

Für die Klonierung eines Jasmonat-responsiven Reportergenkonstrukts wurde der *Atjrg21*-Promotorbereich mit 5'-UTR über eine *MaellI*-Schnittstelle an Position 1461 und einen *MaellI/BamHI*-Adaptor (Oligos SB79/SB80) im Bluescript-Vektor subkloniert. Durch den Einbau dieser *BamHI*-Schnittstelle und der *SalI*-Schnittstelle an Position 13 ist der *Atjrg21*-Promotorbereich für weitere Klonierungsarbeiten leicht verfügbar. Entsprechend wurde der *Atjrg21*-Promotorbereich über die *BamHI*- und *SalI*-Schnittstellen vor das β -Glucuronidase-Gen in den pBI101.3-Vektor ligiert. Eine schematische Darstellung dieses Konstrukts und aller nachfolgend beschriebenen Konstrukte findet man in der Abbildung 3.17 am Ende des Kapitels 3.8.

Über *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wurden 14 Kanamycin-resistente Arabidopsis-pflanzen (T1-Generation) mit dem *Atjrg21*-Promotor-GUS-Konstrukt (ProGUS) generiert. Alle 14 Pflanzen wurden zunächst auf Jasmonat-induzierbare GUS-Aktivität mittels Farbsubstrat X-Gluc getestet. Hierbei war nach Behandlung mit 100 μ M Methyljasmonat für 24 Stunden im Vergleich zur Wasserkontrolle bei keiner der Pflanzen eine erhöhte GUS-Aktivität zu verzeichnen. Auch eine Verwundung oder Behandlung mit 0,5 M Glucose, was zur Transkriptakkumulation des *Atjrg21* führt, induzierte keine GUS-Aktivität. Bei Northern-Analysen wurden nach Jasmonatbehandlung bei keiner der transgenen Pflanzen GUS-Transkripte nachgewiesen.

Parallel wurden für angedachte Promotorstudien transgene Pflanzen angezogen, welche ein um ca. 900 bp verkürztes, 509 bp großes *Atjrg21*-Promotorfragment vor dem GUS-Gen tragen (Pro509GUS). Auch für die hierfür generierten 3 Pflanzenlinien war keine erhöhte GUS-Aktivität nach Applikation von Methyljasmonat nachweisbar.

In der nächsten Generation wurden für jeweils 4 transgene Pflanzen von 5 T2-Linien mit dem ProGUS-Konstrukt und 3 T2-Linien mit dem Pro509GUS-Konstrukt die GUS-Aktivität mit dem

Fluoreszenzsubstrat MUG quantifiziert. Die ermittelten Werte bestätigen die vorangegangenen Ergebnisse und zeigen, dass der *Atjrg21*-Promotorbereich keine Induzierbarkeit durch Jasmonat vermittelt. In den Tabellen 7.1 und 7.2 (Anhang) ist die mittlere GUS-Aktivität der Pflanzen in pmol gebildetes Methylumbelliferon pro Minute und mg Protein (pmol MU/min x mg) nach 24 h Wasser- oder 100 μ M JM-Behandlung dargestellt. Als Vergleichswert wurde der Median berechnet. Die Abbildung 3.13 zeigt graphisch die Verteilung der GUS-Aktivität in Form eines Boxplots unter Angabe des 50 %-Bereichs, d.h. dem Bereich, in dem 50 % der Werte liegen (graue Box), des 90 %-Bereichs, dargestellt durch Balken, und den außerhalb dieses Bereichs liegenden Werten (durch Punkte sichtbar). Weiterhin ist innerhalb des Boxplots der Median sichtbar.

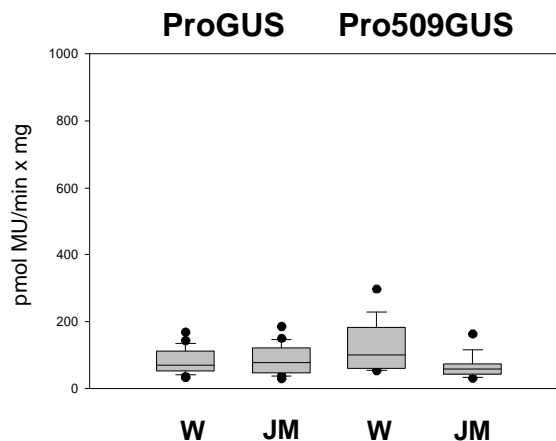


Abb. 3.13: Verteilung der GUS-Aktivität bei ProGUS- und Pro509GUS-Pflanzen

Dargestellt ist eine Verteilung der in den Tabellen 7.1 und 7.2 aufgelisteten mittleren GUS-Aktivitäten (in pmol MU/min x mg) einer Population von T2-Pflanzen der Konstrukte ProGUS und Pro509GUS nach 24 h Wasser- oder 100 μ M JM-Behandlung (W oder JM).

3.5.2 Einbezug des Exon/Intron-Bereichs (GFus)

Zur Konstruktion eines Jasmonat-responsiven Reportergenkonstrukts wurde mit der Hypothese möglicher Intron-lokalisierter Regulationselemente der *Atjrg21*-Genbereich im dritten Exon mit dem GUS-Gen translational fusioniert. Hierfür wurde ein über die *SalI*-Schnittstelle (Pos 13) und eine im dritten Exon lokalisierte *SplI*-Schnittstelle (Pos 3712) gewonnenes Genfragment mithilfe eines *SplI/XmaI*-Adaptors (Oligos SB97/SB98) in den pBI101.3-Vektor ligiert und somit mit dem GUS-Gen *in frame* fusioniert. Dieses Genkonstrukt (G21GUSFus oder GFus) enthält, neben ca. 1,4 kb *Atjrg21*-Promotorbereich und dem GUS-Gen, den Lesebereich für die AtJRG21-Aminosäuren 1-348 (von 363), unterteilt von zwei Introns. Insgesamt kodiert das G21GUS-Fusionskonstrukt für 957 Aminosäurereste, was einem Protein von 109 kDa entspricht.

Pflanzen mit dem G21GUS-Fusionskonstrukt zeigen nach Applikation von 100 μ M Methyljasmonat im Vergleich zu den ProGUS-Linien einen deutliche Anstieg der GUS-Aktivität. Dies konnte für die 3 generierten, transgenen T1-Pflanzen mittels Farbsubstrat X-Gluc gezeigt werden. Methyljasmonat-behandelte Blätter zeigen im Vergleich zu unbehandelten oder mit Wasser behandelten Blättern die Akkumulation des blauen Farbstoffs Indigo (siehe Abb. 7.1 im Anhang).

Für die 3 GFus-Linien (41, 42, 43) wurden 6 homozygote T3-Linien selektiert und von je zwei Pflanzen jeder Linie die GUS-Aktivität nach verschiedenen Behandlungsbedingungen

quantifiziert. Die Werte dieser Quantifizierung sind in der Tabelle 7.3 (Anhang) zusammengefasst. Als Vergleichswert für die GUS-Aktivität wurde der Median berechnet. Mithilfe dieses Wertes kann man den Faktor der Induktion abschätzen. Hierbei ergibt sich nach JM-Behandlung im Vergleich zu unbehandeltem oder mit Wasser behandeltem Gewebe eine ca. 15-fache Erhöhung der GUS-Aktivität. Nach Behandlung mit 0,5 M Glucose ist ein ca. 17-facher Anstieg der GUS-Aktivität zu verzeichnen. Auch die Behandlung mit *Fusarium*-Kulturfiltrat, 100 μ M ABA oder die Verwundung der Pflanze induzieren, wenn auch im geringeren Maße, einen ca. 2- bis 3-fachen Anstieg der GUS-Aktivität.

3.6 Deletionsanalysen

Der direkte Vergleich der ProGUS-Pflanzen und der GFus-Pflanzen und ihrer Stimulierbarkeit der GUS-Aktivität durch Methyljasmonat zeigt, dass sich im Exon/Intron-Bereich des *Atjrg21*-Gens *cis*-aktive Elemente befinden, die an der Regulation des Gens durch Jasmonat beteiligt sind. Nachfolgend sollten Deletionsanalysen Auskunft darüber geben, welche Bereiche die Induzierbarkeit durch Jasmonat vermitteln. Zur Konstruktion der Deletionen wurden Bereiche des GFus-Fusionskonstrukts über Schnittstellen im *Atjrg21*-Genbereich deletiert. Alle Angaben zu Schnittstellen beziehen sich auf die Sequenz des genomischen Klons pG21-5/2. Die Pflanzen mit den nachfolgend beschriebenen Konstrukten wurden in der T1-Generation zunächst durch den Farbtest mit X-Gluc auf ihre GUS-Aktivität getestet. Eine Quantifizierung der Aktivität erfolgte in der nächsten Generation oder später. Hierfür wurden je 4 Pflanzen von 4 bis 6 unabhängigen Linien untersucht. Eine Behandlung der Blätter erfolgte über 24 h mit Wasser oder 100 μ M Methyljasmonat. Als Kontrolle diente unbehandeltes Blattgewebe. Weiterhin wurde der Einfluss anderer Stressoren auf die GUS-Aktivität getestet. Hierzu wurden Blätter mit 0,5 M Glucose, 100 μ M Abscisinsäure oder *Fusarium*-Kulturfiltrat einheitlich 24 Stunden behandelt bzw. verwundet und für 24 Stunden auf Wasser ausgelegt.

Die Ergebnisse des histochemischen Nachweises der GUS-Aktivität durch das Substrat X-Gluc sind exemplarisch in der Abbildung 7.1 (Anhang) veranschaulicht. Eine schematische Darstellung der Konstrukte findet man in der Abbildung 3.17 am Ende des Kapitels 3.8.

3.6.1 Deletion des ersten Introns ($\Delta 1$)

Über eine *EcoRI*-Schnittstelle (Pos 1789) im ersten Exon und eine *BamHI*-Schnittstelle (Pos 2605) im zweiten Exon wurden das erste Intron und angrenzende Bereiche aus dem G21GUS-Fusionskonstrukt deletiert. Durch einen *EcoRI/BamHI*-Adaptor (Oligos SB113/SB114) wurden die verbliebenen Bereiche des ersten und zweiten Exons *in frame* fusioniert. Der resultierende Leserahmen kodiert für 809 Aminosäurereste, was einem Protein von 92 kDa entspricht.

Transgene T1-Pflanzen mit diesem Konstrukt (G21GUSFus $\Delta 1$ oder $\Delta 1$) zeigen im Vergleich zu den G21GUSFus-Pflanzen im Farbtest keinen Verlust der Jasmonat-vermittelten Regulation. In Tabelle 7.4 (Anhang) sind die Ergebnisse der Quantifizierung der GUS-Aktivität vier verschiedener, homozygoter $\Delta 1$ -T3-Linien mit jeweils zwei Vertretern aufgelistet. Der Vergleich der GUS-Aktivitäten über den Median zeigt eine ca. 17-fache Induktion in JM-behandeltem Gewebe gegenüber unbehandeltem oder mit Wasser behandeltem Gewebe. Eine Behandlung mit Glucose resultiert in noch höheren Aktivitäten. Andere Stressoren zeigen, analog zum GFus-Konstrukt, nur einen geringen, aber signifikanten Anstieg der GUS-Aktivität.

3.6.2 Deletion des zweiten Introns ($\Delta 2$)

Über eine im zweiten Exon gelegene *Bam*HI-Schnittstelle (Pos 2605) und die im dritten Exon befindliche *Spl*I-Schnittstelle (Pos 3712) wurden das zweite Intron sowie angrenzende Bereiche des zweiten und dritten Exons deletiert. Über einen *Bam*HI/*Spl*I-Adaptor (Oligos SB111/SB112) wurde das zweite Exon translational mit dem GUS-Gen fusioniert. Der so entstandene Leserahmen kodiert für 871 Aminosäurereste, was einem Protein von 99 kDa entspricht.

Transgene T1-Pflanzen mit diesem Konstrukt (G21GUSFus $\Delta 2$ oder $\Delta 2$) zeigen keine erhöhte GUS-Aktivität nach JM-Behandlung. Für die nachfolgende Generation wurden die GUS-Aktivität nach verschiedenen Behandlungsbedingungen quantifiziert. Insgesamt wurden je 4 Pflanzen von 4 transgenen T2-Linien auf ihre Induzierbarkeit durch Methyljasmonat im Vergleich zu einer Behandlung mit Wasser oder unbehandeltem Blattgewebe untersucht. Weiterhin wurde stichprobenartig jeweils eine Pflanze einer Linie auf erhöhte GUS-Aktivität nach anderen Behandlungsbedingungen überprüft. Die mittleren Aktivitäten sind in der Tabelle 7.5 (Anhang) aufgelistet. Diese Ergebnisse zeigen den Verlust an Induzierbarkeit durch Methyljasmonat bzw. andere Stressoren bei Ausschluss des zweiten Introns.

3.6.3 Deletion beider Introns ($\Delta 12$)

Über eine *Eco*RI-Schnittstelle (Pos 1789) im ersten Exon und die *Spl*I-Schnittstelle im dritten Exon wurden alle stromabwärts gelegenen *Atjrg21*-Bereiche, inklusive beider Introns, im G21GUSFus-Konstrukt deletiert. Ein *Eco*RI/*Spl*I-Adaptor (Oligos SB110/111) restaurierte den Leserahmen. Diese Fusion des ersten Exons mit dem GUS-Gen (G21GUSFus $\Delta 12$ oder $\Delta 12$) kodiert für 720 Aminosäurereste, was einem Protein von 79 kDa entspricht.

Transgene Pflanzen mit diesem T-DNA-Konstrukt zeigen nach Applikation von Methyljasmonat keine erhöhte GUS-Aktivität im Vergleich zu anderen Behandlungsbedingungen und Konstrukten. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 7.6 dargestellt.

3.6.4 Einfluss des Exon-Bereiches (CFus)

Zur Untersuchung des Einfluss möglicher Exon-lokalisierter Regulationselemente wurde ein *Atjrg21*-Promotor-cDNA-Konstrukt translational mit dem GUS-Gen fusioniert. Hierzu wurde die *Atjrg21*-cDNA hinter 1,4 kb *Atjrg21*-Promotorbereich geschaltet und über die *Spl*I-Schnittstelle translational durch einen *Spl*I/*Xma*I-Adaptor, analog zu 3.5.2, mit dem GUS-Gen fusioniert. Der kodierende Leserahmen und das zu erwartende Fusionsprotein entspricht dem der G21GUS-Fusion.

Transgene Pflanzen mit dem Intron-freien C21GUSFus-Konstrukt (CFus) zeigen keine erhöhte GUS-Aktivität nach JM-Behandlung beim Nachweis mit X-Gluc. Bei der Quantifizierung der GUS-Aktivität mit dem Fluoreszenz-Substrat MUG von 4x6 transgenen T2-Pflanzen findet man eine vergleichsweise breite Streuung der Werte (Tab. 7.7). Eine erhöhte GUS-Aktivität ist beim Vergleich der verschiedenen Behandlungsmethoden für keinen der getesteten Stressoren zu verzeichnen.

3.6.5 Vergleich der Deletionsanalysen

Der Vergleich der verschiedenen Deletionskonstrukte zeigt, dass Konstrukte mit beiden Introns (GFus) oder mit dem zweiten Intron ($\Delta 1$) durch Jasmonat regulierbar sind. Auch für andere Stressoren sind diese Bereiche für die Aktivierung des Markergens notwendig. Andere Konstrukte zeigen keine signifikanten Änderungen der GUS-Aktivität nach Applikation von Methyljasmonat oder anderen Stressoren. In der Abbildung 3.15 ist die Verteilung

GUS-Aktivität für die verschiedenen Pflanzenlinien der entsprechenden Konstrukte in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Die Bedeutung regulatorischer Bereiche des zweiten Intron für die Induktion der GUS-Aktivität ist am eindrucksvollsten beim direkten Vergleich und gleicher Skalierung der nach JM-Behandlung gemessenen GUS-Aktivitäten aller Konstrukte sichtbar (Abb. 3.15F). Bei Linien mit dem $\Delta 1$ -Konstrukt konnten die höchsten Aktivitäten gemessen werden. Keine Aussagen können zur genauen Anzahl T-DNA-Insertionen gemacht werden. Southern-Analysen erbrachten keine auswertbaren Ergebnisse. Allgemein ist aber beschrieben, dass mit der Methode der Vakuuminfiltration vornehmlich transgene Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion entstehen und diese Pflanzen unabhängigen Transformationsereignissen entstammen (Ye et al., 1999). Außerdem erfolgte ein Nachweis des Transgens und seines Einbaus über PCR. Bei Western-Analysen (Abb. 3.14) findet man beim Vergleich von Proteinextrakten aus unbehandeltem (FR) und JM-behandeltem Gewebe der Jasmonat-responsiven Linien (GFus, $\Delta 1$) eine Akkumulation des Fusionsproteins in der berechneten Größe. Auch hier sind größere Mengen an Protein bei den $\Delta 1$ -Linien im Vergleich zu den GFus-Linien zu detektieren. In allen anderen Linien ist kein GUS-Protein nachweisbar (nicht abgebildet). Im Northern-Blot sind für keine der getesteten Linien Transkripte nachweisbar. Möglicherweise beeinträchtigt eine Fusion der *Atjrg21*-Genbereiche mit dem GUS-Gen die mRNA-Stabilität. Entsprechend ist anzunehmen, dass die Stabilität der kürzeren Transkripte der $\Delta 1$ -Linien weniger beeinflusst ist als die der GFus-Linien und so zu erhöhten Mengen an GUS-Protein führt. Diese Erklärung ist eher vorstellbar, als mögliche negative Regulations-elemente im Bereich des ersten Introns oder resultierende Aktivitätsverluste durch den erhöhten AtJRG21-Proteinanteil bei der G21GUS-Fusion.

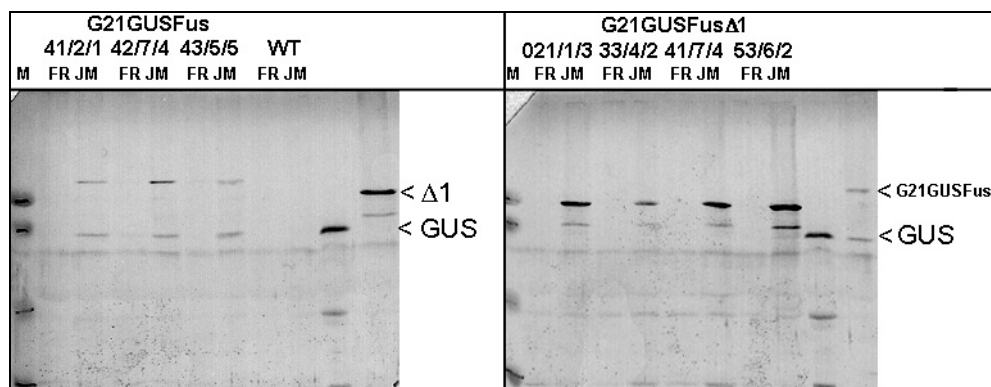


Abb. 3.14: Immunologischer Nachweis des GUS-Proteins

Dargestellt sind Immunoblots von Western-Analysen zum Nachweis des GUS-Proteins. Hierzu wurden je 10 μg Protein von unbehandeltem (FR) und 24 h mit 100 μM JM-behandeltem (JM) Blattgewebe aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Eine gleichmäßige Beladung der Membran wurde zuvor mittels „Fast Green“-Färbung überprüft. Der Nachweis erfolgte mit einem Anti-Gus-Antikörper. Am linken Rand sind Molekulargewichtsmarker (M) einer Größe von 101, 79, 50 und 28,4 kDa zu sehen (von oben nach unten).

Auf der linken Seite ist der Nachweis des G21GUS-Fusionsproteins in 3 Pflanzen 3 verschiedener, homozygoter G21GUSFus-Linien zu sehen. Nebenstehend sind Extrakte aus Wiltypfpflanzen als Kontrolle aufgetragen. Auf den beiden äußeren, rechten Spuren sind zwei interne Marker sichtbar, das GUS-Protein mit 68 kDa und das $\Delta 1$ -Fusionsprotein mit 92 kDa. Das mit einer Größe von 109 kDa berechnete G21GUS-Fusionsprotein ist sowohl oberhalb der $\Delta 1$ -Bande als auch oberhalb der 101 kDa-Markerbande in JM-behandelten Proben transgener Pflanzen sichtbar.

Auf der rechten Seite ist der Nachweis des G21GUSFus $\Delta 1$ -Proteins in 4 Pflanzen 4 verschiedener, homozygoter G21GUSFus $\Delta 1$ -Linien zu sehen. Hier wurden zum Größenvergleich das 109 kDa große GFus-Protein und das GUS-Protein mit 68 kDa aufgetragen. Das mit einer Größe von 92 kDa berechnete $\Delta 1$ -Protein ist unterhalb der G21GUSFus-Bande zwischen den Markern bei 101 und 79 kDa in den JM-behandelten Proben sichtbar.

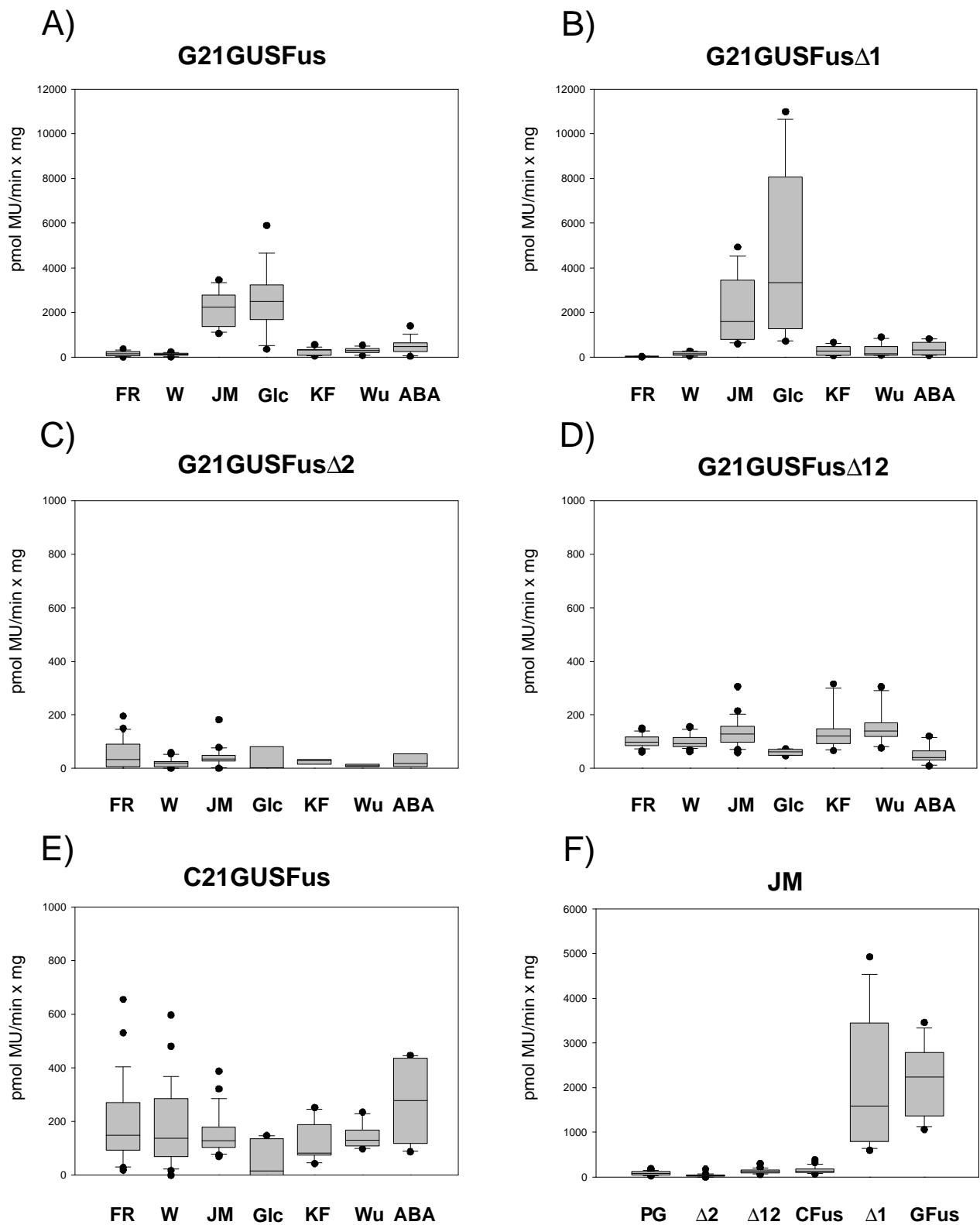


Abb. 3.15: Verteilung der GUS-Aktivität verschiedener Deletionskonstrukte

Dargestellt ist jeweils die Verteilung der GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) einer Population von transgenen Pflanzen mit den angegebenen GUS-Konstrukt nach verschiedenen Behandlungsbedingungen: unbehandelt (FR), 24 h Wasser (W), 24 h 100 µM Methyljasmonat (JM), 24 h 0,5 M Glucose (Glc), 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat (KF), 24 h nach Verwundung (Wu), 24 h 100 µM Abscisinsäure (ABA).

- A) G21GUSFus-Pflanzen (GFus) mit beiden Introns
- B) G21GUSFus Δ 1-Pflanzen (Δ 1) mit dem zweiten Intron
- C) G21GUSFus Δ 2-Pflanzen (Δ 2) mit dem ersten Intron
- D) G21GUSFus Δ 12-Pflanzen (Δ 12) ohne Introns
- E) C21GUSFus-Pflanzen (CFus) ohne Introns

Unter **F** ist der direkte Vergleich der GUS-Aktivität von Populationen 6 verschiedener Konstrukte nach JM-Behandlung (24 h, 100 µM) dargestellt. Mit PG sind hier ProGUS-Pflanzen bezeichnet. Die Werte sind den Tabellen 7.1, 7.3 bis 7.7 entnommen.

3.7 Einfluß Intron-lokalisierter G-Boxen

Die aus den Deletionsanalysen gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass Sequenzen des zweiten Introns für eine Jasmonat-vermittelte Regulation des *Atjrg21* notwendig sind. Schaut man nach möglichen Regulationselementen innerhalb des zweiten Introns, so findet man an Position 2907 (G-Box1) und 2969 (G-Box2), also im Abstand von 62 bp, zwei G-Box-Motive (CACGTG). Dieses als Bindungsort von Transkriptionsfaktoren bekannte Motiv wurde bereits in vielen Promotoren differenziell regulierter Gene beschrieben. Intron-lokalisierete, funktionelle G-Boxen wurden bisher nicht beschrieben.

Zum Nachweis ihrer Funktionalität sollten die Intron-ständigen G-Boxen des G21GUS-Fusionskonstrukts (G21GUSFus) durch gerichtete Mutagenese verändert werden. Hierzu wurde das G-Box Kernmotiv CACGTG zu CAatTG mutiert. Dies geschah wahlweise mit der ersten (G21GUSFusmut1 oder Mut1), mit der zweiten (G21GUSFusmut2 oder Mut2) oder mit beiden G-Boxen (G21GUSFusmut12 oder Mut12). Die schematische Darstellung der Konstrukte ist in der Abbildung 3.17 am Ende des Kapitels 3.8 ersichtlich.

Transgene Pflanzen, die das jeweilige Konstrukt mit mutierter G-Box tragen, sind in ihrer Induzierbarkeit durch Jasmonat vollständig gehemmt. Sowohl die Mutation beider G-Boxen, als auch die Mutation einzelner G-Boxen, führt zum vollständigen Verlust der Regulation durch Jasmonat. Auch andere Stressoren wie ABA (100 µM), Glucose (0,5 M), Verwundung oder *Fusarium*-Kulturfiltrat induzieren keine Anstieg der GUS-Aktivität bei mutierter G-Box. Analog zu den vorangegangenen Deletionsanalysen wurde von jeweils 4 transgenen Pflanzen 6 verschiedener T2-Linien die GUS-Aktivität quantifiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den Tabellen 7.8 bis 7.10 (Anhang) aufgelistet. Die Verteilung der GUS-Aktivität dieser Linien in Form von Boxplots ist in der Abbildung 3.16 ersichtlich. Die Abbildung 3.16D zeigt den direkten Vergleich zu den nicht mutierten GFus-Linien nach der JM-Behandlung jeweilig. Auf RNA-Ebene waren für keine der getesteten Linien Transkripte im Northern-Blot nachweisbar. Gleiche Ergebnisse erbrachten Western-Analysen. Mit dem Anti-GUS-Antikörper war in keiner der mutierten Linien GUS-Protein nachweisbar (nicht abgebildet). In der Abbildung 7.2 (Anhang) ist der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität ausgewählter Linien im Vergleich zu GFus-Pflanzen illustriert.

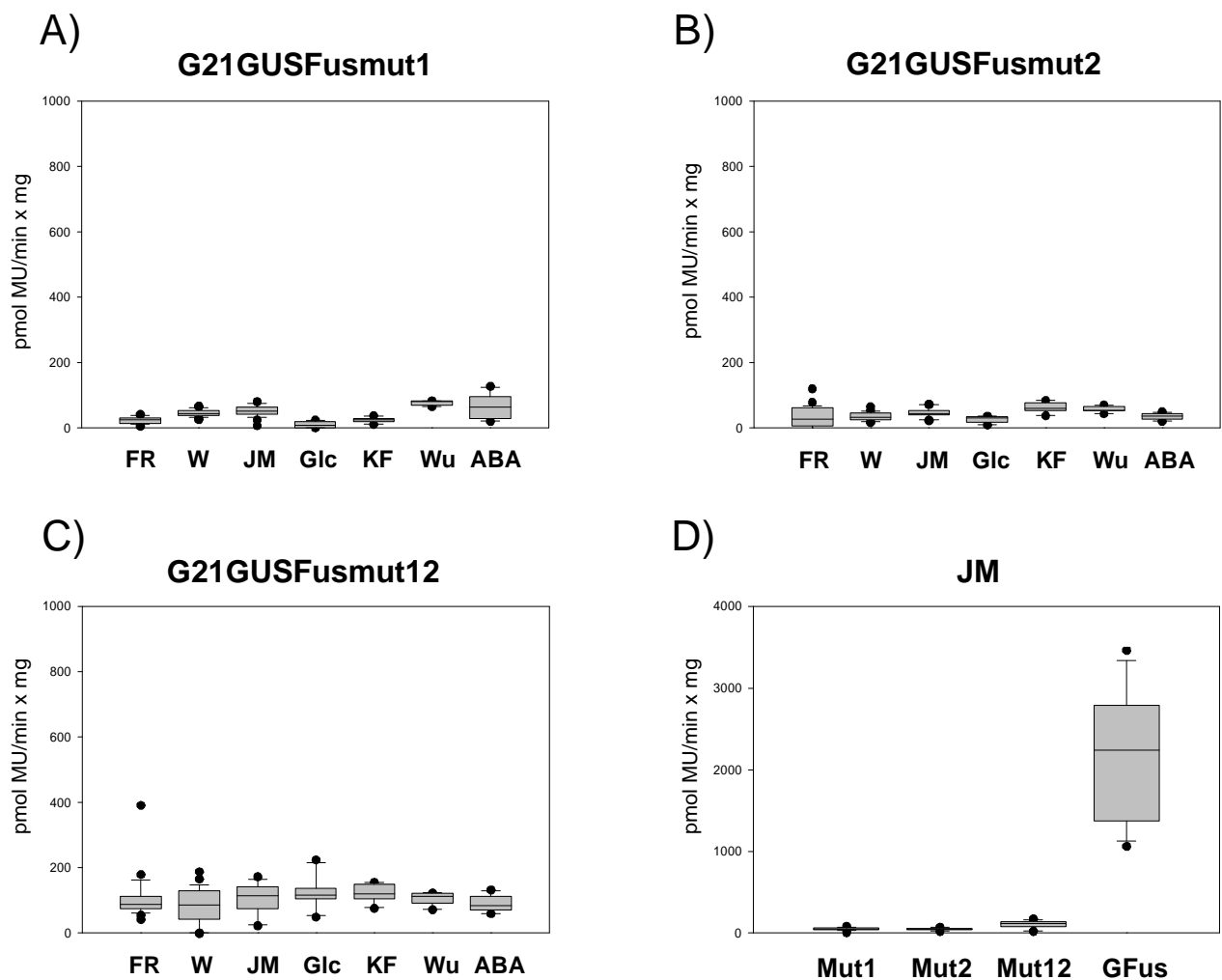


Abb. 3.16: Verteilung der GUS-Aktivität bei mutierter G-Box

Dargestellt ist die Verteilung der GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) einer Population von transgenen Pflanzen mit angegebenen GUS-Konstrukt nach verschiedenen Behandlungsbedingungen: unbehandelt (FR), 24 h Wasser (W), 24 h 100 μ M Methyljasmonat (JM), 24 h 0,5 M Glucose (Glc), 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat (KF), 24 h nach Verwundung (Wu), 24 h 100 μ M Abscisinsäure (ABA).

- A) G21GUSFusmut1-Pflanzen (Mut1) mit mutierter erster G-Box
 B) G21GUSFusmut2-Pflanzen (Mut2) mit mutierter zweiter G-Box
 C) G21GUSFusmut12-Pflanzen (Mut12) mit beiden, mutierten G-Boxen

Unter D) ist der Vergleich der 3 verschiedenen Konstrukte mit mutierter G-Box zum nicht mutierten GFus-Konstrukt jeweils nach 24 h 100 μ M JM-Behandlung abgebildet. Die Werte sind den Tabellen 7.3, 7.8-7.10 entnommen.

3.8 Sind Intronsequenzen ausreichend für Jasmonat-Induzierbarkeit?

Die unter 3.5 und 3.7 beschriebenen Experimente belegen, dass einerseits der Promotorbereich des *Atjrg21*-Gens nicht ausreichend und andererseits Intron-lokalisierte G-Boxen notwendig für die Jasmonat-vermittelte Genaktivierung des *Atjrg21* sind. Nachfolgende Experimente sollten nun die Frage beantworten, ob Bereiche des zweiten Introns, inklusive der beiden G-Box-Motive, ausreichend für die Jasmonat-vermittelte Genaktivierung des *Atjrg21* sind. Weiterhin wurde der Einfluss mutierter G-Boxen im Promotorbereich untersucht.

Hierzu wurden Bereiche des Introns durch eine PCR mit den Primern SB129/SB130 amplifiziert und über *SphI*-Schnittstellen vor ein $-54\text{CaMV}35\text{S}$ -Minimalpromotor-GUS-Konstrukt geschaltet. Diese 170 bp langen PCR-Fragmente enthielten die Bereiche von -100 bis +6, bezogen auf die Zentren der G-Boxen. Als Matrize dienten die unter 3.5.2 und 3.7 beschriebenen Konstrukte GFus, Mut1, Mut2 und Mut12. Hieraus resultierten 4 verschiedene Minimalpromotorkonstrukte, in denen einerseits beide intakten G-Boxen (2GMiniGUS oder 2GM) und andererseits die jeweiligen Varianten an mutierten G-Boxen (Mut1MiniGUS bzw M1M; Mut2MiniGUS bzw. M2M; Mut12MiniGUS bzw. M12M) vorgeschaltet waren. Als Kontrolle diente das unveränderte 35S-Minimalpromotor-GUS-Konstrukt (Mini). Die schematische Darstellung der Konstrukte ist in der Abbildung 3.17 ersichtlich.

Zum Nachweis der Jasmonat-vermittelten Regulation des Transgens wurden pro Konstrukt 12 T1-Pflanzen, die 6 verschiedenen T0-Pflanzen entstammten, getestet. In allen getesteten Pflanzen konnte keine erhöhte GUS-Aktivität nach JM-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten oder mit Wasser behandelten Blättern nachgewiesen werden (Tab. 7.11). Weitere Stressoren oder spätere Generationen wurden nicht getestet. Dies zeigt, dass die Intron-lokaliserten G-Boxen nicht ausreichend für die Genaktivierung sind.

Abb. 3.17: T-DNA-Konstrukte (nächste Seite)

Dargestellt ist eine Übersicht aller getesteten T-DNA-Konstrukte. Zu jedem Konstrukt ist die mittlere GUS-Aktivität (als Median) nach Wasser- (W) oder JM-Behandlung (JM) angegeben. Mithilfe des jeweiligen Medians wurde die Induktion der GUS-Aktivität nach JM-Behandlung im Vergleich zur Wasserbehandlung errechnet. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Vergleich von Promotor-, Fusions- und Deletionskonstrukten abgebildet. Im mittleren Bereich sieht man den Vergleich der Konstrukte mit intakten und mutierten G-Boxen. Im unteren Teil der Abbildung sind die Minimalpromotorkonstrukte sichtbar. Blaue Bereiche zeigen das GUS-Gen. Am Ende ist weiß der NOS-Terminator (NOS term) gekennzeichnet. Orange sind Exonsequenzen und gelb Promotor- und Intronsequenzen des *Atjrg21* veranschaulicht. Rote Bereiche zeigen mutierte G-Boxen. Grün ist im unteren Bereich der Abbildung der $\text{CaMV}35\text{S}$ -Minimalpromotor dargestellt. An den Enden der T-DNA sind als Dreiecke („directed repeats“) die Grenzen der T-DNA („left border“-LB, „right border“-RB) abgebildet. Die unterbrochene Linie oberhalb des Promotorbereichs steht für das nicht eingezeichnete NPTII-Gen (Kanamycin-Resistenz) mit NOS-Promotor und NOS-Terminator.

| | GUS-Aktivität in pmol MU/min x mg | | |
|--------------------|-----------------------------------------|-----------|------------------|
| | <u>W</u> | <u>JM</u> | <u>Induktion</u> |
| ProGUS | 71 | 78 | 1,1 |
| Pro509GUS | 101 | 60 | 0,6 |
| G21GUSFus | 127 | 2239 | 17,6 |
| G21GUSFusΔ1 | 156 | 1589 | 12,5 |
| G21GUSFusΔ2 | 19 | 35 | 1,8 |
| G21GUSFusΔ12 | 91 | 128 | 1,4 |
| C21GUSFus | 137 | 129 | 0,9 |
| G21GUSFus | 127 | 2239 | 17,6 |
| G21GUSFusmut1 | 45 | 52 | 1,2 |
| G21GUSFusmut2 | 33 | 45 | 1,4 |
| G21GUSFusmut12 | 86 | 114 | 1,3 |
| 2GMiniGUS | 24 | 39 | 1,6 |
| Mut1MiniGUS | 0 | 0 | 0 |
| Mut2MiniGUS | 0 | 0 | 0 |
| Mut12MiniGUS | 43 | 21 | 0,5 |
| MiniGUS | 37 | 37 | 1,0 |

3.9 Isolierung potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten

Die Basis für den Aufbau eines konditional letalen Screens auf Jasmonat-Insensitivität war die Verfügbarkeit eines Jasmonat-induzierbaren Markergenkonstrukts. Hierfür wurden die im Kapitel 3.5.2 gewonnenen Erkenntnisse mit dem G21GUSFus-Konstrukt genutzt. In gleicher Weise wurde das als konditional letaler Marker gewählte *pehA*-Gen mit dem *Atjrg21*-Gen unter Einschluss beider Introns mithilfe eines *Spl/NcoI*-Adaptors (Oligos SB100/SB101) translational fusioniert (siehe Abb. 3.18).

Das bakterielle *pehA*-Gen aus *Burkholderia caryophylli* PG2982 codiert für eine Phosphorsäuremonoesterhydrolase (PEH). Dieses Enzym besitzt die Eigenschaft, Glycerylglyphosat (GG) als artifizielles Substrat zu Glycerol und Glyphosat zu hydrolysieren (Dotson et al., 1996b). Glyphosat wiederum ist eine als Herbizid bekannte Verbindung, die an der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase angreift und hierdurch die Biosynthese aromatischer Aminosäuren hemmt (Jaworski, 1972; Steinbrücken & Amrhein, 1980). Pflanzen mit PEH-Aktivität sterben nach Verabreichung des Protoxins GG, während Pflanzen ohne PEH-Aktivität diese Behandlung überleben. Diese Eigenschaft macht das *pehA*-Gen zu einem probaten Markergen für eine konditional letale Selektion von Mutanten (Dotson et al., 1996a).

Für den Aufbau eines konditional letalen Screen auf Jasmonat-Insensitivität bedeutet dies, dass man mithilfe der regulatorischen Bereiche des *Atjrg21* PEH-Aktivität durch Jasmonat induzieren kann. Die gleichzeitige Applikation des Protoxins Glycerylglyphosat resultiert in der PEH-katalysierten Hydrolyse des GG und Bildung des toxischen Herbizids. Der Effekt ist durch chlorotische Symptome und ein Absterben der Pflanzen sichtbar. Sollten aber Defekte bei der Jasmonat-Signaltransduktion auftreten, würde man keine Aktivierung des Markergens und entsprechend ein Überleben der Pflanze erwarten. Diese Pflanzen können als potenzielle Jasmonat-insensitive Mutanten (*pji*) selektiert werden (siehe Abb. 3.18).

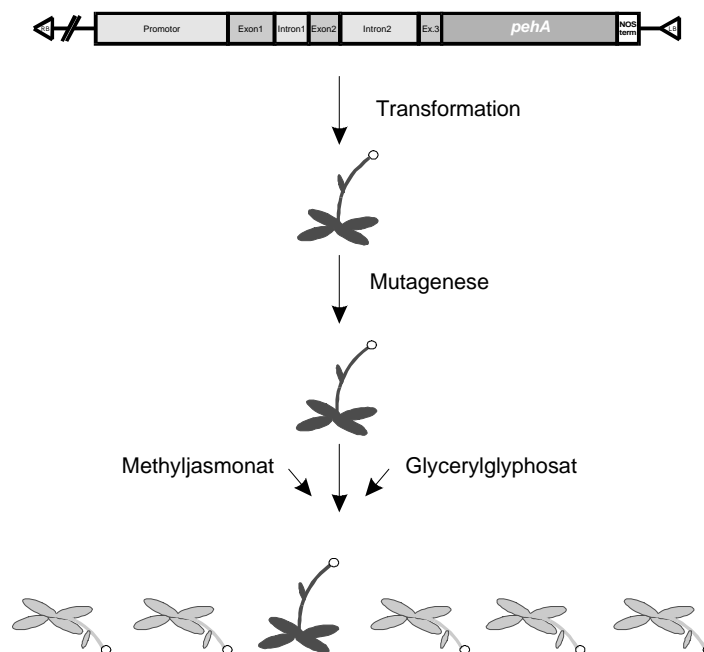


Abb. 3.18: Aufbau eines konditional letalen Screens auf Jasmonat-Insensitivität

Dargestellt ist der schematische Aufbau eines konditional letalen Screens auf Jasmonat-Insensitivität. Am Anfang steht die Konstruktion eines Jasmonat-regulierten Selektionsmarkers. Hier abgebildet die Fusion des *Atjrg21* mit dem *pehA*-Gen. Der nächste Schritt ist die Generierung von transgenen Marker-Pflanzen und die Mutagenese homozygoter Pflanzenlinien. In der Folgegeneration können nach Applikation von Methyljasmonat und Glycerylglyphosat vitale, potenziell Jasmonat-insensitive Pflanzen selektiert werden.

Als erster Schritt wurden transgene Pflanzen mit einem *Atjrg21-pehA*-Fusionskonstrukt (G21PehFus bzw. PFus) generiert. Die Nachkommenschaft der T2-Generation wurde über eine Kanamycin-Selektion auf ihr Segregationsverhältnis überprüft. Der Anteil an homozygoten und heterozygoten, transgenen Linien (Verhältnis 1:2) und das Spaltungsverhältnis der heterozygoten Linien (3:1) läßt auf das Vorkommen einer T-DNA-Insertion schließen. Hierbei wurden 7 homozygote Pflanzen-Linien der T3-Generation selektiert. Diese Linien entstammten 5 verschiedenen T1-Pflanzen. Alle 7 Linien wurden zur Optimierung des Selektionssystems mit verschiedenen Konzentrationen und Mengen an Glycerylglyphosat und Methyljasmonat behandelt. Hier erwies sich der Einsatz hoher Konzentrationen an Methyljasmonat (500 µM) als vorteilhaft. Zur Vermeidung unspezifischer, toxischer Effekte des Protoxins wurde die Konzentration an Glycerylglyphosat (125 µM) sehr klein gewählt. Gleichzeitig wurde der Zeitraum zwischen den Behandlungen auf 2 Tage erhöht (siehe 2.1.6 und Abb. 3.19).

Jeweils 1000 Samen der 7 homozygoten T3-Linien wurden mit Ethylmethansulfonat (EMS) mutagenisiert. Die mutagenisierten Samen (M1) jeder Linie wurden auf 10 Töpfe verteilt ausgesät. Die pro Topf gebildeten Samen (M2) wurden separat geerntet und entsprechen einer Charge. Unter den Keimlingen der M2-Generation fand man einen Anteil von ca. 1 % an Chlorophyll-defizienten Mutanten, was dem erwarteten Wert für eine wirkungsvolle Mutagenese entspricht.

Die 7 homozygoten PFus-Linien wurden durch Northern-Analysen auf die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach JM-Behandlung (100 µM, 24 h) getestet. Die Abbildung 3.20 zeigt das Ergebnis dieser Northern-Analyse. Die Linien PFus011/1, PFus011/3 akkumulieren im Vergleich zu Wildtyppflanzen geringere Mengen an *Atjrg21*-Transkript. Die *Atjrg21*-Expression scheint hier durch Kosuppressionseffekte beeinträchtigt zu sein. Beide Linien zeigen auch phänotypisch eine geringere Sensitivität gegenüber einer Behandlung mit Glycerylglyphosat und Methyljasmonat.

Abb. 3.19: PEH-Test (nächste Seite)

Dargestellt ist ein exemplarischer Test der PEH-Aktivität in 7 verschiedenen PFus-Linien im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Wt). In der Abbildung sind 5 unterschiedliche Behandlungsbedingungen abgebildet (von links nach rechts):

1/4 GG/JM) 250 µM Glycerylglyphosat + 500 µM Methyljasmonat

1/8 GG/JM) 125 µM Glycerylglyphosat + 500 µM Methyljasmonat

JM) 500 µM Methyljasmonat

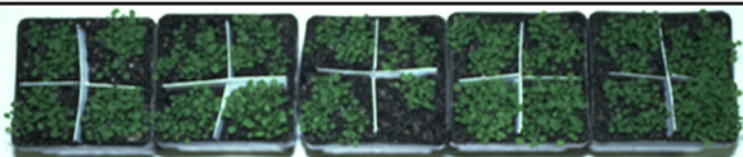
1/8 GG) 125 µM Glycerylglyphosat

1/4 GG) 250 µM Glycerylglyphosat

Die Applikation erfolgte alle 2 Tage über das Besprühen der Pflanzen mit insgesamt 60 ml pro Topf über einen Zeitraum von 25 Tagen. Den applizierten Substanzen wurde zur besseren Aufnahme 0,2 % Tween 20 zugesetzt. Mit der Behandlung der Keimlinge wurde 14 Tage nach der Keimung begonnen. Über den Zeitraum der Behandlung erfolgte die Anzucht der Pflanzen unter Kurztag-Bedingungen. Die vier Abschnitte zeigen den Verlauf der Behandlung über einen Zeitraum von 30 Tagen. Weiterhin ist rechts die pro Topf ausgesäte PFus-Linie bzw. ausgesäter Wildtyp (Wt) angegeben.

Nach zwanzig Tagen sind bei den PFus-Linien bei kombinierter Applikation von JM und GG erste Chlorosen sichtbar. Dreißig Tage nach der Behandlung sind die meisten Pflanzen, die einer Behandlung mit beiden Substanzen ausgesetzt waren, stark chlorotisch bzw. tot. Auch Wildtyppflanzen zeigen, wenn auch weniger stark ausgeprägt, ähnliche Auswirkungen. Eine Behandlung mit Methyljasmonat allein bewirkt lediglich eine reversible Wachstumshemmung. Pflanzen, welche nur mit GG behandelt wurden, zeigen insgesamt ein kräftigeres Wachstum. Auch hier sind 30 Tage nach der Behandlung Chlorosen sichtbar.

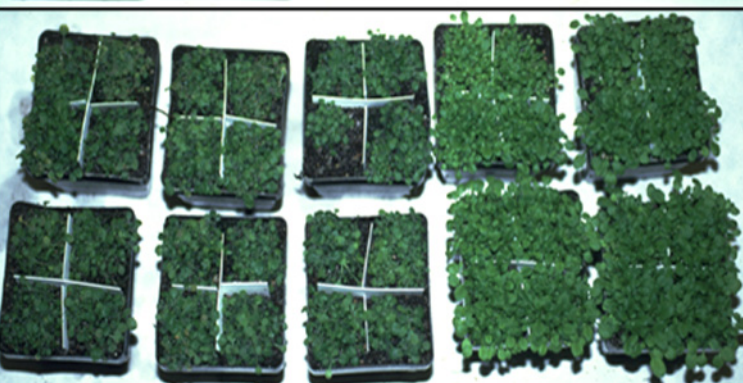
1/4 GG 1/8 GG JM 1/8 GG 1/4 GG
 JM JM



Tag 0

$\frac{61/9}{41/2} | \frac{71/2}{41/12}$ oben

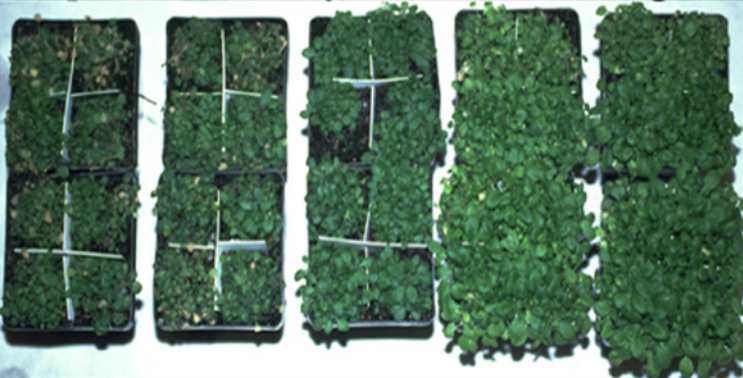
$\frac{011/3}{Wt} | \frac{021/8}{011/1}$ unten



Tag 10

$\frac{61/9}{41/2} | \frac{71/2}{41/12}$ oben

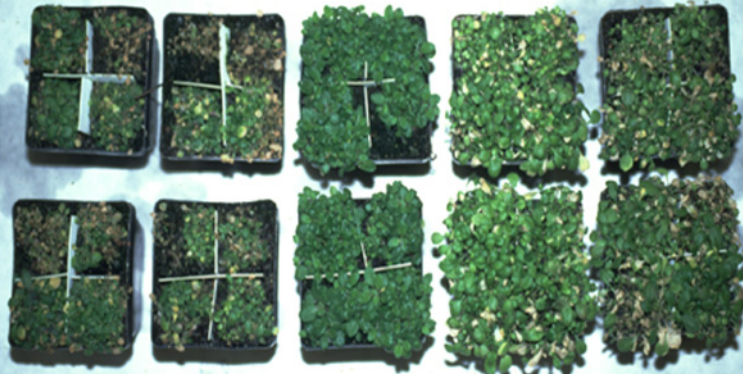
$\frac{011/3}{Wt} | \frac{021/8}{011/1}$ unten



Tag 20

$\frac{61/9}{41/2} | \frac{71/2}{41/12}$ oben

$\frac{011/3}{Wt} | \frac{021/8}{011/1}$ unten



Tag 30

$\frac{71/2}{41/12} | \frac{61/9}{41/2}$ oben

$\frac{021/8}{011/1} | \frac{011/3}{Wt}$ unten

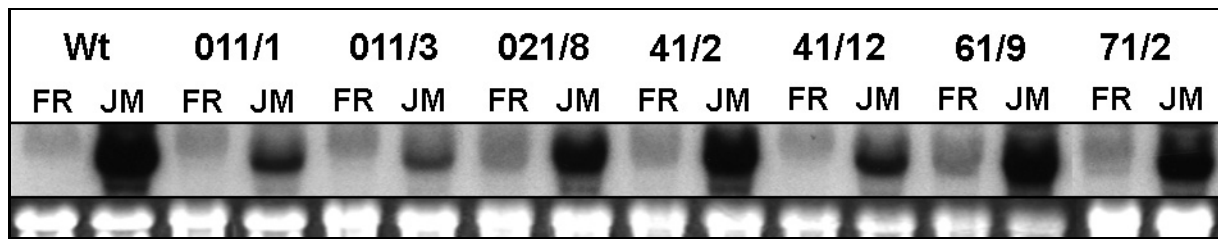


Abb. 3.20: Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in den G21Peh-Fusions-Linien

Dargestellt ist das Autoradiogramm zu Northern-Analysen zur Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in 7 homozygoten PFus-Linien (T3-Generation) im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Wt). Arabidopsisssprosse 3 Wochen alter Kurztag-Pflanzen wurden hierfür 24 h auf 100 μ M Methyljasmonat (JM) flottiert. Als Kontrolle diente unbehandeltes Gewebe (FR). 20 μ g RNA jeder Probe wurde aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Als Sonde diente die 32 P-markierte *Atjrg21*-cDNA. Unterhalb des Autoradiogramms ist die RNA-Beladungsmenge anhand 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar.

Zur Selektion von potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten in der M2-Generation wurden insgesamt 124.000 Samen von 53 unabhängigen Chargen ausgesät. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte unter Langtag-Bedingungen, da hier im Vergleich zum Kurztag (siehe Abb. 3.19) eine bessere Selektion erzielt werden konnte. Bereits nach einer Woche wurde begonnen, die Keimlinge über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen mit 500 μ M Methyljasmonat und 125 μ M Glycerylphosphat alle 2 Tage zu besprühen. Ungefähr eine Woche nach der letzten Behandlung wurden vitale Pflanzen isoliert (Abb. 7.3; Anhang). Insgesamt konnten ca. 45 potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten hochgezogen werden. Soweit es möglich war, wurde den Mutanten Blattmaterial entnommen und für 24 Stunden mit 100 μ M Methyljasmonat oder 0,5 M Glucose behandelt bzw. als Kontrolle unbehandelt eingefroren. Aus den Proben wurde RNA isoliert und durch Northern-Analysen auf die *Atjrg21*-Transkriptmenge im Vergleich zu Wildtyppflanzen untersucht. In der Abbildung 3.21 sind die Northern-Analysen der potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten dargestellt. Zum Vergleich sind je zwei unabhängige Wildtyp-Kontrollen aufgetragen. Bei den Kontrollen in der Abb. 3.21A ist unerklärlicherweise nur eine sehr schwache Induktion nach JM-Behandlung zu beobachten. In der Regel zeigte sich die Induktion von *Atjrg21* unabhängig vom Alter und den Wachstumsbedingungen als gut reproduzierbar. Als Vergleich und Kriterium für das in Tabelle 3.13 aufgelistete Expressionsverhalten der potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten diente weiterhin die Transkriptmenge der anderen Pflanzen. Die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach einer Behandlung mit 0,5 M Glucose ist leider sehr heterogen und lässt somit keine konkrete Aussage über die Zucker-induzierte Transkriptakkumulation in den Mutanten zu. Trotzdem ist eine vergleichsweise starke Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Glucoseapplikation im Vergleich zu der nach JM-Behandlung in den Pflanzen *pji18* und *pji23* auffällig. Insgesamt wurden 15 Mutanten mit verändertem *Atjrg21*-Expressionverhalten isoliert. Diese 15 Mutanten sind 10 verschiedenen Chargen und entsprechend 10 unterschiedlichen Mutationsereignissen zuzuordnen. Für die Pflanzen *pji1*, *pji3*, *pji6*, *pji7*, *pji8* und *pji9* wurden diese Northern-Analysen zweimal, zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt, um Aussagen über die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu erlangen. Hier zeigten sich keine wesentlichen Änderungen in der *Atjrg21*-Transkriptakkumulation beim Vergleich der zwei Experimente.

Phänotypische Abnormitäten waren bei den hier untersuchten potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten nicht auffällig. Unter Berücksichtigung einer Funktion der Jasmonate bei der Ausprägung der männlichen Fertilität wurde aber spezielles Augenmerk auf die Anlage von Samen gelegt. Einige Pflanzen zeigten vergleichsweise kleine Schoten und geringe Mengen an gebildeten Samen. Diese Beobachtung korrelierte nicht in jedem Fall mit der bei Northern-Analysen beobachteten Insensitivität gegenüber Jasmonat.

Tab. 3.13: Auflistung potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten (*pji*)

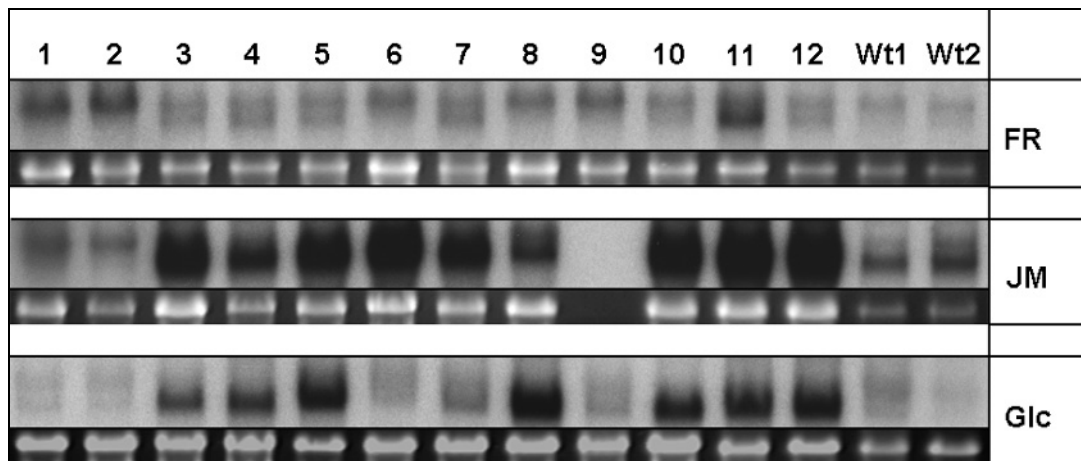
Aufgelistet sind hier die als „potenziell Jasmonat-insensitiv“ isolierten und über Northern-Analysen charakterisierten Pflanzen. In der zweiten Spalte ist Herkunft der potenziellen Mutanten angegeben, welche sich auf die mutagenisierte Charge und Ausgangs-Linie bezieht. Spalte 3 interpretiert die unter 3.21 abgebildeten Ergebnisse der Northern-Analysen. Eine Abnahme der Transkriptakkumulation im Vergleich zum Wildtyp ist durch (-) und unveränderte Akkumulation durch (+/-) dargestellt. Ferner sind in der Spalte 4 weitere Besonderheiten der Pflanzen aufgeführt. Mit (+) ist hier eine erhöhte Transkriptmenge symbolisiert.

| potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten (<i>pji</i>) | Herkunft/Charge | <i>Atjrg21</i> -Expression nach JM | Bemerkungen |
|---------------------------------------------------------|-----------------|------------------------------------|-----------------------------|
| <i>pji1</i> | PFus011/3/M2/5 | (-) | kleine Schoten |
| <i>pji2</i> | PFus011/3/M2/6 | (-) | kleine Schoten |
| <i>pji3</i> | PFus41/12/M2/10 | (+/-) | |
| <i>pji4</i> | PFus021/8/M2/7 | (-)? | |
| <i>pji5</i> | PFus021/8/M2/7 | (+/-) | |
| <i>pji6</i> | PFus021/8/M2/4 | (+/-) | |
| <i>pji7</i> | PFus021/8/M2/7 | (+/-) | |
| <i>pji8</i> | PFus71/2/M2/12 | (-) | |
| <i>pji9</i> | PFus71/2/M2/12 | (-) | |
| <i>pji10</i> | PFus41/2/M2/10 | (+/-) | kleine Schoten |
| <i>pji11</i> | PFus41/2/M2/7 | (+/-) | |
| <i>pji12</i> | PFus41/2/M2/10 | (+/-) | |
| <i>pji15</i> | PFus41/12/M2/10 | (+/-) | |
| <i>pji16</i> | PFus71/2/M2/10 | (-) | |
| <i>pji17</i> | PFus71/2/M2/10 | (-) | |
| <i>pji18</i> | PFus41/12/M2/4 | (-) | relativ starker Glc-Effekt |
| <i>pji19</i> | PFus011/1/M2/8 | (+/-) | kleine Schoten |
| <i>pji20</i> | PFus71/2/M2/12 | (-) | |
| <i>pji21</i> | PFus71/2/M2/12 | (-) | |
| <i>pji22</i> | PFus41/2/M2/9 | (+/-) | (+) bei FR aber (-) bei Glc |
| <i>pji23</i> | PFus41/12/M2/3 | (-) | relativ starker Glc-Effekt |
| <i>pji24</i> | PFus41/12/M2/6 | (+/-) | |
| <i>pji25</i> | PFus41/2/M2/9 | (+/-) | |
| <i>pji26</i> | PFus41/2/M2/9 | (+/-) | |
| <i>pji27</i> | PFus021/8/M2/2 | (-) | |
| <i>pji28</i> | PFus41/2/M2/8 | (-) | |
| <i>pji29</i> | PFus41/2/M2/3 | (+/-) | |
| <i>pji30</i> | PFus41/12/M2/3 | (+/-) | |
| <i>pji31</i> | PFus41/12/M2/3 | (+/-) | |
| <i>pji32</i> | PFus41/12/M2/6 | (-) | |
| <i>pji33</i> | PFus41/12/M2/6 | (-) | |
| <i>pji34</i> | PFus41/2/M2/9 | (+/-) | |

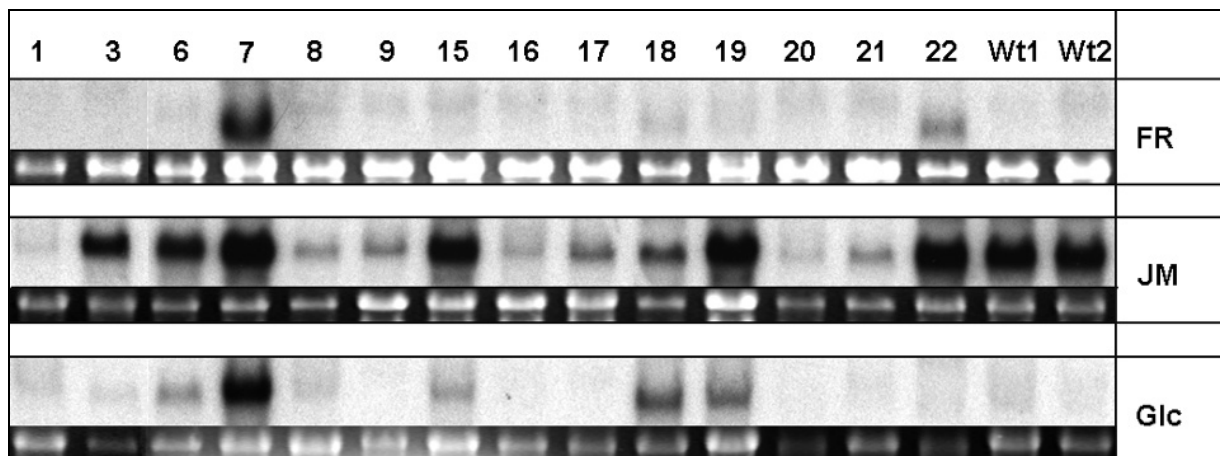
Abb. 3.21: Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten (nächste Seite)

Dargestellt sind Autoradiogramme zu 3 unabhängigen Northern-Analysen (A, B, C) potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen. Hierfür wurden Blätter der ca. 8 Wochen alten Pflanzen für 24 h auf 100 µM Methyljasmonat (JM) oder 0,5 M Glucose (Glc) flottiert. Weiterhin wurden unbehandelte Blätter zur Kontrolle entnommen. Von jeder Probe wurden 10 µg RNA auf eine Nylon-Membran transferiert. Als Sonde diente die ³²P-markierte *Atjrg*-cDNA. Unterhalb des Autoradiogramms ist die RNA-Beladungsmenge anhand 28S-rRNA-Bande im Ethidiumbromid-gefärbten Gel sichtbar.

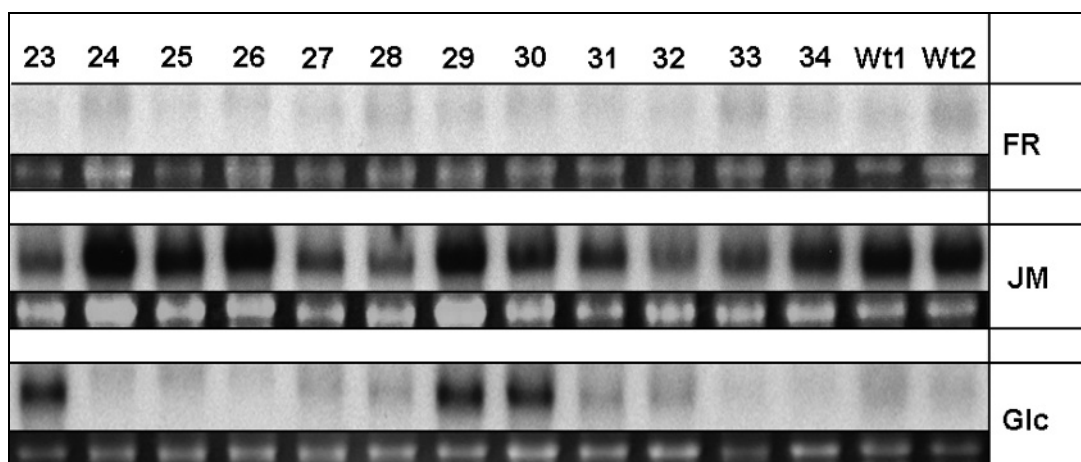
A)



B)



C)



3.10 Jasmonat-regulierte Luciferaseaktivität

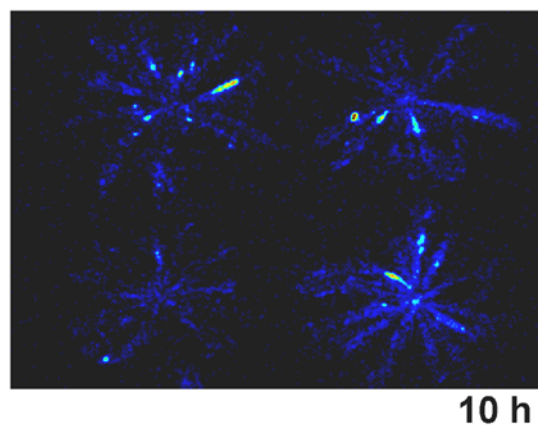
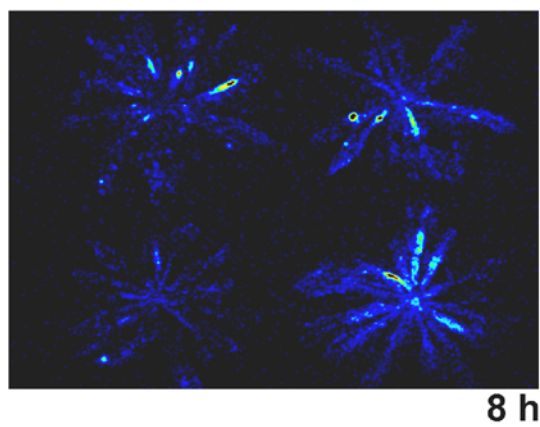
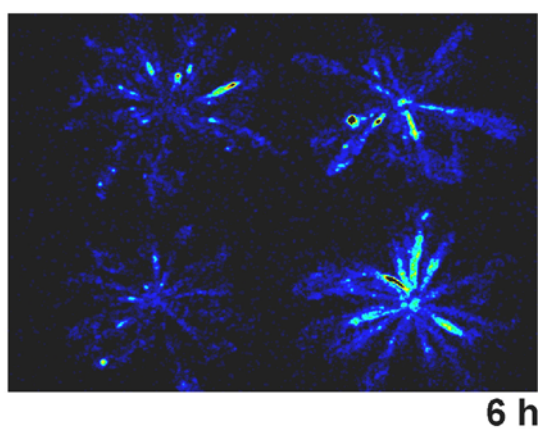
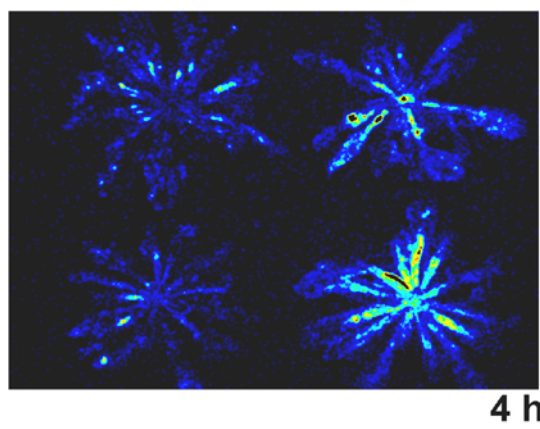
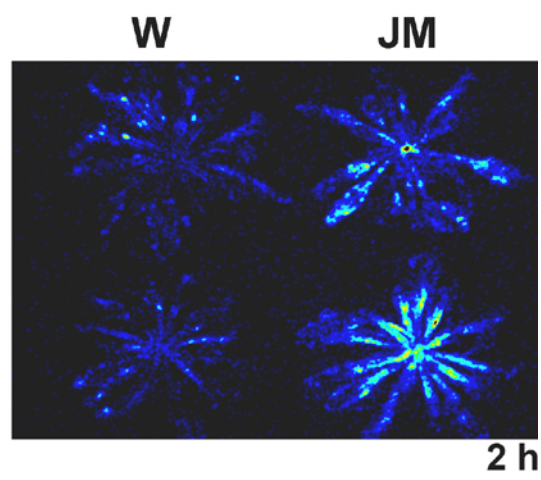
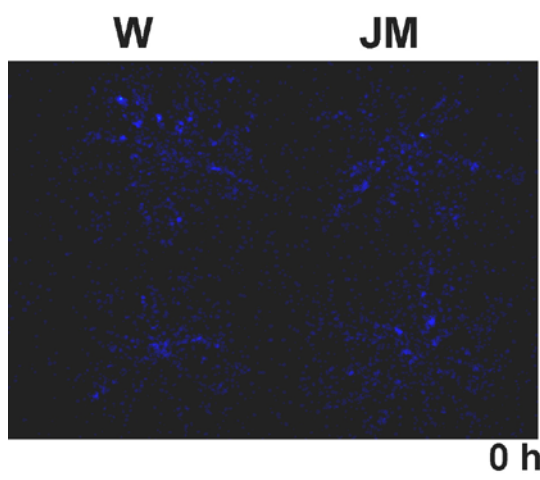
Als drittes Reporter-gen wurde das Luciferasegen mit dem *Atjrg21*-Gen über einen *SplI/BamHI*-Adaptor (Oligos SB127/SB128) fusioniert. Dies geschah in Analogie zum G21GUSFus-Konstrukt unter Einbezug beider Introns. Transgene Pflanzen mit diesem G21LucFus-Konstrukt (LFus) zeigen nach dem Besprühen der Pflanzen mit 500 μ M Methyljasmonat/0,2 % Tween einen schnellen Anstieg der Luciferaseaktivität (Abb. 3.22). Nach 2 bis 3 Stunden ist hier maximale Luciferaseaktivität zu beobachten. Nachfolgend ist kein zweiter Anstieg der Aktivität zu sehen. Ein erneuter Anstieg der Luciferaseaktivität kann aber durch Substratgabe induziert werden. Dies wurde 24 h nach der JM-Behandlung getestet. Insofern ist anzunehmen, dass eine Verarmung an Luciferin Einfluss auf den beobachteten Verlauf der Aktivität nimmt. Die höchste Luciferaseaktivität ist bei den LFus-Pflanzen im Blattbereich entlang der Leitbündel und im zentralen Bereich der Rosette zu beobachten. Auch bei Wasser-behandelten Pflanzen findet man einen leichten Anstieg der Luciferaseaktivität in diesem Bereich. Jedoch ist keine Luciferaseaktivität zu Beginn des Experiments nachzuweisen. Eine Induktion durch das Detergenz Tween oder gasförmiges Methyljasmonat von benachbarten Pflanzen kann nicht ausgeschlossen werden.

Gleiche Beobachtungen wurden beim histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität in unbehandelten GFus- und $\Delta 1$ -Pflanzen gemacht (siehe Abb. 7.1, 7.2 im Anhang). Auch hier ist eine Blaufärbung im Blatt im Bereich der Leitbündel sichtbar. Bei dieser Nachweismethode kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass sofort nach der Applikation der Färbelösung alle zellulären Prozessen ausgeschaltet sind. Die Beobachtungen bei den Luciferase- und GUS-Pflanzen deuten vielmehr darauf hin, dass dieser Bereich im Zusammenhang mit der Aktivierung des *Atjrg21* am sensitivsten auf Stress reagiert.

Mit den LFus-Pflanzen besteht nun die Möglichkeit die Aktivierung des *Atjrg21* zu visualisieren. Dies wäre speziell für die Untersuchung einer räumlichen Aktivierung des Gens nach Verwundung oder Pathogenbefall interessant. Weiterhin bieten diese Pflanzen die Möglichkeit im Rahmen eines Mutantenscreens, Pflanzen mit veränderter Luciferaseaktivität, speziell mit konstitutiver Expression, zu isolieren.

Abb. 3.22: Jasmonat-regulierte Luciferaseexpression (nächste Seite)

Dargestellt ist die Luciferaseaktivität in transgenen T2-Pflanzen der Linie LFus022 mit dem G21LucFus-Konstrukt über einen Zeitraum von 10 Stunden. Hierzu dienten ca. 6 Wochen alte Kurztag-Pflanzen. Die Pflanzen wurden 30 Minuten vor Beginn des Experiments mit 2,5 mM Luciferin besprüht. Die Luciferaseexpression wurde durch Besprühen von 2 Pflanzen mit 500 μ M Methyljasmonat/0,2 % Tween (JM) induziert. Diese Pflanzen sind auf der rechten Seite jedes Zeitfensters sichtbar. Links daneben befinden sich 2 Pflanzen, welche zum Vergleich mit einer wässrigen 0,2%igen Tween-Lösung (W) behandelt wurden. Rote und gelbe Bereiche verdeutlichen hohe Luciferaseaktivität. Niedrigere Aktivität findet man in den hellblauen Bereichen.



4 Diskussion

4.1 *Atjrg21*-Expression

Untersuchungen mit Jasmonat-insensitiven und -defizienten Mutanten zeigen, dass Jasmonate aus entwicklungsphysiologischer Sicht im pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* an der Ausprägung der männlichen Fertilität beteiligt sind (Feys et al., 1994; McConn & Browse, 1996). Weitaus komplexere Aufgaben scheinen den Jasmonaten hingegen bei Signaltransduktionsprozessen unter Stressbedingungen wie der Verwundung der Pflanze oder einem Pathogenbefall zuzukommen. Verbunden mit solchen Ereignissen findet man die Bildung von Jasmonaten und die Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene in der Pflanze (Penninckx et al., 1996; Laudert & Weiler, 1998). Zur Gruppe der Jasmonat-regulierten Gene gehören beispielsweise Gene für JA-Biosyntheseenzyme wie Lipoxygenasen (Melan et al., 1993; Bell & Mullet, 1993) und Allenoxidsynthasen (Laudert & Weiler, 1998; Norman et al., 1999), deren Funktion in der Amplifikation des Jasmonatsignals gesehen wird. Weiterhin sind Jasmonat-regulierte Gene mit antimikrobiellen Genprodukten wie das *Thi2.1*- und das *Pdf1.2*-Gen (Epple et al., 1995; Penninckx et al., 1996, 1998) und Gene wie das Extensin-Gen (*atExt1*) und dem Chalconsynthasegen (*CHS*) beschrieben, deren Genprodukte in indirekter Weise an der Abwehrreaktion beteiligt sind (Merkouropoulos et al., 1999; Vijayan et al., 1998). Als „Verwundungs-responsiv“ wurden die Jasmonat-regulierten Gene *Jr1*, *Jr2* und *Jr3* isoliert (Titarenko et al., 1997). Sie sind Bestandteil der Jasmonat-regulierten Wundantwort. Ihre Funktion ist weitgehend unbekannt, wie auch die des Jasmonat-regulierten *Atvsp*-Gens, welches als homologes Gen der vegetativen Speicherproteine der Sojabohne in *Arabidopsis* entdeckt wurde (Berger et al., 1995). Auch dem Jasmonat-regulierten Gen *Atjrg21* konnte bisher keine Funktion zugeordnet werden. Seinem Namen entsprechend findet man eine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Applikation von Jasmonaten. Beim Vergleich verschiedener Jasmonate hat sich der Jasmonsäuremethylester (Methyljasmonat) als wirksamste Substanz erwiesen. Die Jasmonsäure und das Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat zeigen im Verlauf und Intensität der induzierten Akkumulation der *Atjrg21*-Transkripte deutliche Unterschiede. Das JA-Isoleucin-Konjugat ist in *Arabidopsis* das meistvorkommende JA-Aminosäurekonjugat (R. Kramell, persönliche Kommunikation). Im Gerstenblattsystem zeigt es eine dem Methyljasmonat vergleichbare Aktivität (Kramell et al., 1997). In *Arabidopsis* ist das JA-Ile-Konjugat in Bezug auf die Aktivierung des *Atjrg21* nahezu inaktiv. Diese gegensätzlichen Beobachtungen erschweren das Verständnis zur Funktion dieser Jasmonsäurederivate. Die hohe Wirksamkeit des hydrophoben Methyljasmonats wird allgemein einer besseren Aufnahme zugesprochen. Weiterhin kann das flüchtige Methyljasmonat auch über die Gasphase wirken und so möglicherweise zusätzliche Signalwege aktivieren. Dies würde einen biphasischen Verlauf erklären, welcher in mehreren Experimenten beobachtet werden konnte (siehe Abb. 1.2, 3.2A). Als weiterer Aspekt für die unterschiedliche Wirksamkeit ist nicht zuletzt die direkte Interaktion mit einem putativen Jasmonatrezeptor und die unterschiedliche Affinität der einzelnen Jasmonate zu sehen.

Licht ist an der Jasmonat-regulierten Aktivierung des *Atjrg21* beteiligt. Die hier gemachten Northern-Analysen lassen jedoch keine Aussagen über die Ursache dieses Effektes zu. Für das *Atvsp*-Gen konnte eine strikte Lichtabhängigkeit bei der Aktivierung durch Jasmonat nachgewiesen werden (Berger et al., 1995). Hier ist, entgegen den Beobachtungen beim *Atjrg21*, keine Akkumulation unter Lichtausschluss zu beobachten. Möglicherweise bewirkt der Lichtausschluss eine Verzögerung der Jasmonat-regulierten Aktivierung des *Atjrg21*.

Andere Phytohormonvertreter wie Gibberellin A₃, Indolylessigsäure, Brassinolid und Kinetin induzieren unter den gewählten Bedingungen keine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit denen bei der Aktivierung des *Thi2.1*-Gens (Epple et al., 1995). Im Gegensatz zum *Thi2.1*-Gen konnte in mehreren Experimenten aber eine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA, wenn auch in geringen Mengen, nach einer Behandlung mit Abscisinsäure nachgewiesen werden. Ähnliche Beobachtungen beschreiben Titarenko et al. (1997) für das Jasmonat-regulierte Gen *Jr3*. Insgesamt ist die Aktivierung Jasmonat-regulierter

Gene durch ABA sehr heterogen. Im Vergleich zur Expression der PIN-Gene bei Kartoffel und Tomate ist in Arabidopsis kein direkter Zusammenhang zwischen einer Aktivierung durch ABA und Jasmonat beschrieben. Bei der kombinierten Applikation der oben beschriebenen Phytohormone mit Methyljasmonat findet man nur beim Kinetin deutliche verstärkende Effekte in Bezug auf die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Diese Beobachtung ist insofern erstaunlich, als dass Cytokinine in den anfänglichen Untersuchungen zur Jasmonatwirkung als Jasmonatantagonisten beschrieben wurden. Cytokinine hemmen den durch Jasmonat verursachten Chlorophyllabbau bei Gerste (Weidhase et al., 1987b). Bei Arabidopsis sind keine Seneszenzerscheinungen nach mehrwöchiger Applikation hoher Dosen von Methyljasmonat zu beobachten - es ist aber beschrieben, dass Kinetin und andere Cytokinine die Ethylenproduktion stimulieren (Vogel et al., 1998). Im Einklang mit den unten diskutierten Ergebnissen zur Wirkung der Ethylenbiosynthesestufe ACC kann man spekulieren, dass Ethylen der Auslöser dieser verstärkenden Effekte ist.

Die Applikation der Ethylenbiosynthesestufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC; 1 mM) führt zur Bildung des Phytohormons Ethylen und zur Transkriptakkumulation Ethylen-responsiver Gene in der Pflanze (Pieterse et al., 1998). Unter diesen Bedingungen beobachten die Autoren auch eine Transkriptakkumulation des Jasmonat-regulierten *Pdf1.2*-Gens. Epple et al. (1995, 1997b) erzielen in ihren Experimenten mit dem Ethylenanalogon Ethephon keine Transkriptakkumulation des *Pdf1.2*- und *Thi2.1*-Gens. Bezogen auf das *Atjrg21*-Gen führt die Applikation von 1 mM ACC zu keiner Transkriptakkumulation. Bei kombinierter Applikation mit Methyljasmonat ist aber ein geringer, verstärkender Effekt erzielbar.

Die Behandlung von Arabidopsistissue mit 1 M Sorbitol stimuliert die JA-Biosynthese und induziert einen endogenen Anstieg an Jasmonaten (Bohlmann et al., 1998). Gleiche Beobachtungen wurden zuvor bei Gerste beschrieben (Lehmann et al., 1995). Eine Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene durch Sorbitol oder andere Zucker steht somit in Verbindung mit Änderungen endogener Jasmonatgehalte. Als Auslöser dieser Reaktion wird ein osmotischer Stress für die Pflanze angesehen; jedoch besteht kein genereller Zusammenhang zwischen osmotischem Stress und der Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene. Bei Gerste wurde gezeigt, dass osmotischer Stress nicht das alleinige Kriterium für die Geninduktion ist. Eine Behandlung mit einer vom osmotischen Potenzial vergleichbaren Natriumchloridlösung führt nicht zur Akkumulation Jasmonat-regulierter Gene (Lehmann et al., 1995; Lee, 1997). Andererseits bedeutet die endogene Erhöhung an Jasmonat nicht unweigerlich die Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene (Löbner & Lee, 1998). Bei Arabidopsis konnte nach einer Behandlung mit verschiedenen Zuckerlösungen die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Beobachtungen bei Gerste war auch nach einer Behandlung mit Natriumchlorid und der nicht metabolisierbaren 2-Desoxyglucose *Atjrg21*-mRNA nachweisbar. Eine Behandlung mit Polyethylenglycol induzierte entgegen den Beobachtungen bei Gerste keine Transkriptakkumulation. Diesbezüglich scheint auch in Arabidopsis die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nicht direkt mit einem osmotischen Stress verbunden zu sein.

Die Applikation von 1 mM Silbernitrat induziert die Transkriptakkumulation des *Thi2.1*- und des *Pdf1.2*-Gens (Epple et al., 1995, 1997b). Die Autoren verweisen hierbei auf die Wirkung des Silbernitrats als Elicitor bei der Induktion von antimikrobiellen Phytoalexinen (Tsuji et al., 1992). Silberionen sind aber auch als Inhibitoren der durch Ethylen ausgelösten Reaktionen beschrieben (Beyer, 1976). Bohlmann et al. (1998) zeigen, dass eine Behandlung mit 1 mM Silbernitrat in der Pflanze zum endogenen Anstieg an Jasmonsäure führt und erklärt hiermit die Induktion des *Thi2.1*-Gens. Der mit der Applikation von 1 mM Silbernitrat induzierte Anstieg an endogener Jasmonsäure ist mit dem nach einer Behandlung mit 1M Sorbitol vergleichbar. Jedoch findet man nach der jeweiligen Behandlung recht unterschiedliche Ergebnisse bei der Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA. Silbernitrat induziert im Vergleich zur *Thi2.1*- und *Pdf1.2*-mRNA nur sehr schwach eine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Eine Behandlung mit 0,5 M Sorbitol führt andererseits zu einer starken Transkriptakkumulation.

Im Rahmen einer kompatiblen Interaktion befällt das nekrotrophe Pilzpathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolarum* Arabidopsis. Der Arabidopsis Ökotyp Columbia (Col-0; Col-2) ist suszeptibel gegenüber dem Pathogen. Die Infektion ist anhand von Chlorosen und dem Hyphenwachstum des Pilzes sichtbar. Auf zellulärer Ebene findet man keine Aktivierung der Salicylat-responsiven PR-Gene („pathogenesis related genes“; Epple et al., 1995), jedoch ist eine starke Akkumulation der *Thi2.1*-mRNA nachweisbar. Die Überexpression dieses Thionin-Gens verleiht der Pflanze erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen (Epple et al., 1997a). Im infizierten Gewebe ist auch eine starke Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nachweisbar. Der zeitliche Verlauf und die Intensität der Akkumulation ist mit der des *Thi2.1*-Transkripts vergleichbar (Epple et al., 1995). Im Vergleich zum direkt wirkenden Methyljasmonat ist bei der Pilzinfektion erst nach zwei Tagen eine Transkriptakkumulation sichtbar. Dies hängt mit der Keimung der Sporen und der Bildung von Elicitoren und/oder einer Verwundung nach dem Befall der Pflanze zusammen (Vignutelli et al., 1998). Auch die Applikation des Kulturfiltrats des Pilzes induziert, wenn auch in geringerem Maße, die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Dies zeigt, dass unabhängig von der Infektion, pilzliche Elicitoren im Kulturfiltrat eine Transkriptakkumulation induzieren können. Als solche Elicitoren sind beispielsweise pilzliche Enzyme zum Abbau der pflanzlichen Zellwand oder Bruchstücke der pilzlichen Zellwand beschrieben, welche von der Pflanze erkannt werden und Abwehrmechanismen auslösen (Nürnberg, 1999). Für den in diesen Versuchen verwendeten Pilzstamm ist weiterhin publiziert, dass der Pilz eine Vielzahl von Jasmonaten und verwandten Verbindungen bildet (Miersch et al., 1999). Das hier verwendete Kulturfiltrat enthielt, neben anderen Jasmonaten, Jasmonsäure in einer Konzentration von 2 µM. Insofern ist anzunehmen, dass die induzierte Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in erster Linie auf die pilzlichen Jasmonate zurückzuführen ist bzw. diese als Elicitoren fungieren. Ein Vergleich mit *Fusarium*-Stämmen, welche keine Jasmonate bilden, wäre hier interessant - nicht nur in Bezug auf die Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene, sondern auch in Korrelation mit der Pathogenität des Pilzes. Von vielen anderen Mikroorganismen ist bekannt, dass sie pflanzliche Signalstoffe wie Salicylat, Ethylen und Jasmonate oder analoge Verbindungen bilden (siehe Reymond & Farmer, 1998). Es ist bisher nicht verstanden, inwieweit Pathogene Nutzen von der Aktivierung pflanzlicher Signalwege haben.

Verwundete Pflanzenteile sind Angriffspunkte für Pathogeninfektionen. Weiterhin ist Insektenfraß mit der Verwundung der Pflanze verbunden. In diesem Zusammenhang ist eine Aktivierung von Abwehrgenen nach einer Verwundung zu verstehen. Diese Gene dienen einerseits der Wundheilung und andererseits dem Schutz der Pflanze vor Schädlingen. Eine Verwundung der Pflanze führt zu erhöhten Mengen an Jasmonaten in den verwundeten und unverwundeten Pflanzenteilen (Laudert & Weiler, 1998). Ein Großteil der Jasmonat-regulierten Gene lässt sich durch eine Verwundung aktivieren. Umgekehrt lassen sich aber nicht alle Verwundungs-responsiven Gene durch Jasmonat regulieren. Die Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene ist nur ein Teil der Wundantwort (Titarenko et al., 1997). Bei der Verwundungs-induzierten Expression Jasmonat-regulierter Gene findet man verschiedene Expressionsmuster in Bezug auf die Transkriptmenge am Verwundungsort und in anderen Pflanzenteilen (Titarenko et al., 1997). Bestimmte Gene werden vornehmlich im verwundeten Blatt exprimiert, während andere Gene stärkere Expression in den unverwundeten Pflanzenteilen zeigen. Allen Genen gemeinsam ist die schnelle Akkumulation ihrer Transkripte. Eine Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA ist bereits nach einer Stunde im verwundeten Blatt nachweisbar. Maximale Transkriptmengen sind nach drei Stunden zu finden. In den unverwundeten, benachbarten Rosettenblättern akkumulieren nur geringe Mengen an Transkript. Der Verlauf der Aktivierung entspricht dem beobachteten biphasischen Verlauf des Anstiegs endogener Jasmonate (Laudert & Weiler, 1998). Nach einem schnellen Anstieg des Jasmonatgehalts in den verwundeten und unverwundeten Blättern findet man nach ca. 10 Stunden ein Minimum an Jasmonat, bevor ein zweiter, langfristiger Anstieg erfolgt. In unverwundeten Blättern der verwundeten Pflanze ist die Menge des gebildeten Jasmonats jedoch signifikant geringer. Neben Jasmonaten wird auch Ethylen an der verwundeten Stelle gebildet (Rojo et al., 1999). Dieser Anstieg kann nicht durch exogen appliziertes Jasmonat

induziert werden. Ethylen scheint aber an der Regulation Jasmonat-regulierter Gene beteiligt zu sein. Durch Verwundung aktivierte Gene wie das *Atvsp*-, *Jr1*- und *Jr2*-Gen, welche vornehmlich im unverwundeten Bereichen exprimiert werden, sind durch Ethylen lokal reprimiert. Analog hierzu kann man die Aktivierung dieser Gene durch kombinierte Applikation von Jasmonat und Ethylen inhibieren. Auch Auxine können die Jasmonat-vermittelte Aktivierung dieser Gene inhibieren. Andere Gene wie *Pdf1.2* und *Jr3* werden in ihrer Expression durch Ethylen positiv reguliert und zeigen keinen Auxin-Effekt (Rojo et al., 1998, 1999; Norman-Setterblad et al., 2000). Auch pharmakologische Studien belegen, dass hier zwei verschiedene Signalwege für die Jasmonat-regulierte Genexpression nach einer Verwundung existieren (Rojo et al., 1998).

Als dritter Jasmonat-abhängiger Signalweg ist eine durch nicht pathogene Wurzelbakterien (*Pseudomonas fluorescens*) vermittelte induzierte, systemische Resistenz beschrieben (ISR; Pieterse et al., 1996, 1998). Diese induzierte Resistenz ist unabhängig von der Expression bekannter Salicylat- oder Jasmonat-regulierter Abwehrgene. Lediglich das *Atvsp*-Gen wird bei Inokulation mit *Pseudomonas fluorescens* leicht induziert (van Wees et al., 1999). Untersuchungen mit Jasmonat-insensitiven und Ethylen-insensitiven Mutanten zeigen, dass eine ISR an beide Signalwege gekoppelt ist. Weiterhin erfolgt keine Ausprägung der ISR in der *npr1*-Mutante (Pieterse et al., 1998). Die *npr1*-Mutante ist defekt in der Expression Salicylat-regulierter PR-Gene und ein zentraler Regulationspunkt für die Salicylat-abhängige systemisch erworbene Resistenz (SAR; Cao et al., 1994, 1998). Die Expression des Jasmonat-regulierten *Pdf1.2*-Gen ist hier aber unbeeinflusst (Bowling et al., 1997).

Aus den Untersuchungen zur Expression Jasmonat-regulierter Gene in Wildtyppflanzen und Mutanten durch verschiedene Stressoren ergeben sich drei Jasmonat-abhängige Signalwege. Alle drei Signalwege werden durch das COI1-Protein reguliert, unterscheiden sich aber in ihrer Interaktion mit Ethylen- oder Salicylat-abhängigen Signalwegen.

Die Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA wird nicht durch Salicylat reguliert. In den Jasmonat-insensitiven Mutanten *jin1* und *jin4* findet man geringere Transkriptmengen als in Wildtyppflanzen (S. Berger, persönliche Kommunikation). Die Transkriptakkumulation des *Atjrg21* kann bei gleichzeitiger Behandlung mit ACC oder Cytokinin verstärkt werden. Mit Auxinen lassen sich keine gegenläufigen Effekte erzielen. Außerdem findet man nach einer Verwundung eine starke, lokale Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Diese Beobachtungen sprechen für eine Einordnung der *Atjrg21*-Genregulation in den Ethylen-abhängigen Jasmonat-Signalweg, analog zum *Pdf1.2*- und *Thi2.1*-Gen, oder einen alternativen Signalweg. Weitere Hinweise werden aber erst vergleichende Untersuchungen an Signaltransduktionsmutanten bringen.

4.2 Intron-lokalisierte G-Boxen sind notwendig für die Regulation des *Atjrg21*

Im Jahre 1977 wurden erstmalig diskontinuierliche Gene beschrieben (Berget et al., 1977; Breathnach et al., 1977). Bis zu diesem Zeitpunkt war man der Ansicht, dass analog zu bakteriellen Genen, Polypeptide generell von einer zusammenhängenden Kette aus Triplettcodons codiert werden. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass die meisten eukaryotischen Gene Mosaik aus Introns und Exons sind (Gilbert, 1978). Die Größe der codierenden Exons ist hierbei relativ eng begrenzt, wobei die Größe der Introns mit 36 bis 100.000 bp sehr breit gefächert ist (Hawkins, 1988). Beim Vergleich homologer Gene findet man in der Regel eine starke Konservierung der codierenden Exonsequenzen, im Gegensatz zu den nicht codierenden Intronsequenzen. Konservierte Bereiche beschränken sich hier meist nur auf die ersten und letzten zwei Nukleotide (GT...AG), einem Bereich, welcher in allen spleißbaren Introns hoch konserviert ist (Breathnach & Chambon, 1981; Long et al., 1998).

Dies warf die Frage nach der Funktion dieser „intervening sequences“ auf. Sind Introns Strukturelemente oder evolutionärer Müll (Cornish-Bowden, 1985)? John H. Rogers (1990)

entgegnet in seinem Übersichtsartikel über die Funktion der Introns hierzu „... there is no need to believe that introns were primitive ...“. So spekulieren Gilbert und Blake 1978 erstmalig über eine Funktion der Introns als „hot spots“ der Rekombination zur Assoziation von Exons, dem „exon shuffling“, zur Bildung neuer Gene. Hiermit verbunden, stellt sich die fundamentale Frage, ob Introns möglicherweise generell an der Entstehung von Genen beteiligt waren und ob bereits Urorganismen Introns besaßen (Doolittle, 1978). Diese „intron-early“-Hypothese mündet in der von Gilbert (1987) beschriebenen Exon-Theorie der Gene, welche eine Entstehung der Gene in der Intron-vermittelten Kombination sog. Module oder Minigene (Go, 1981; de Souza et al., 1996), d.h. Exons für ca. 15-20 Aminosäurereste, sieht und gleichzeitig den Ursprung einer Vielzahl von eukaryotischen Introns erklärt (de Souza et al., 1998). Dem entgegengesetzt vertreten eine Reihe anderer Wissenschaftler die Ansicht, dass eine Entstehung von Introns erst mit der Entwicklung höherer Organismen einhergeht (Cavalier-Smith, 1985; Logsdon et al., 1994). Diese „intron-late“-Theorie stützt sich hierbei auf das Fehlen von Introns in prokaryotischen Genomen. Beide Parteien sind sich hingegen einig darüber, dass eine Intron/Exon-Genstruktur und damit verbundene Ereignisse wie „exon-shuffling“ (Patthy, 1985; Südhof et al., 1985; Long et al., 1996) und alternatives Spleißen (Breitbart et al., 1987; Smith et al., 1989) die Basis für die Entwicklung komplexer, höherer Organismen ist.

Ein weiterer, wichtiger Gesichtspunkt im Zusammenhang mit der Intron/Exon-Genstruktur eukaryotischer Gene ist die Genregulation. Hier bilden Introns zusätzliche Angriffsfläche für die Regulation der Genexpression auf DNA- und RNA-Ebene. Erste Versuche mit dem Virus SV40 zeigten entsprechend, dass Introns für die Funktionalität bestimmter Gene essentiell sind und das Spleißen nicht nur dem Herausschneiden der Introns dient, sondern auch zur Stabilisierung der RNA beitragen kann (Gruss et al., 1979; Hamer & Leder, 1979; Lai & Khoury, 1979; Khoury et al., 1979). Später wurde für eine Vielzahl tierischer Gene das Vorkommen von Enhancer-Sequenzen innerhalb von Introns und ihre stimulierende Funktion auf die Transkription beschrieben (Bornstein et al., 1987; Rossi & de Crombrugge, 1987; Konieczny & Emerson, 1987). Callis et al. beschrieben 1987 erstmalig anhand des Alkoholdehydrogenasegens aus Mais, dass auch Introns pflanzlicher Gene die Genexpression stimulieren können. Ähnliche Beobachtungen wurden darauffolgend für eine Vielzahl anderer Gene monokotyler (McElroy et al., 1990; Vasil et al., 1989; Donath et al., 1995) und dikotyler (Dean et al., 1989; Curie et al., 1993; Norris et al., 1993; Gidekel et al., 1996) Pflanzen publiziert. Arbeiten von Fu et al. (1995a,b) über die Saccharosesynthasegene *Sus3* und *Sus4* aus Kartoffel und von Sieburth & Meyerowitz (1997) über das *AGAMOUS*-Gen aus *Arabidopsis* zeigen darüber hinaus, dass Intronsequenzen nicht nur Verstärker an sich, sondern auch Regulatoren der räumlichen und zeitlichen Genexpression sein können. Außerdem wird eindrucksvoll beschrieben, dass hier Regulationselemente in verschiedenen Genbereichen verankert sind und diese im gegenseitigen Zusammenspiel die Expression dieser Gene steuern.

Diese Entdeckungen durchbrachen die lang vorherrschende Auffassung darüber, dass sich die Lage von Regulationselementen auf den Promotorbereich beschränkt. Nichtsdestotrotz konnte aber für die Mehrzahl der untersuchten Gene gezeigt werden, dass einerseits Promotorsequenzen für eine authentische Expression von Reportergenen ausreichend und andererseits Introns nicht zwangsläufig an der Regulation der Genexpression beteiligt sind.

Zur Konstruktion eines Jasmonat-regulierten Reportergenkonstrukts wurden ca. 1,5 kb des *Atjrg21*-Promotorbereichs, inklusive des 5'-UTR, vor das GUS-Gen geschaltet. Anhaltspunkte für mögliche Promotorelemente der Jasmonat-vermittelten Genregulation gab es aus Sequenzvergleichen und der Literatur nicht. Thornburg et al. (1987) und An et al. (1989) beschreiben zwar, dass 3'-Genbereiche die Genexpression des Proteinaseinhibitor II-Gens (*pin2*) erhöhen, dies aber auf eine erhöhte mRNA-Stabilität zurückzuführen und nicht mit der Regulation durch Jasmonat verbunden ist. Der Vergleich verschiedener Terminatorsequenzen (An et al., 1989; Mason et al., 1993) zeigt, dass der Einsatz chimärer Terminatoren zwar mit einer Abnahme der Expression, nicht aber mit dem vollständigen Ausfall der Expression einhergeht.

Wider Erwarten zeigen transgene Pflanzen mit dem *Atjrg21*-Promotor-GUS-Konstrukt keine Jasmonat-vermittelte Regulation des GUS-Gens. Promotorstudien über die Jasmonat-regulierten Gene *pin2* aus Kartoffel (Kim et al., 1991, 1992) und *vspB* aus der Sojabohne (Mason et al., 1993) ergaben, dass eine Induktion dieser Gene durch Methyljasmonat unabhängig von der Induktion durch Saccharose oder Verwundung ist. Dementsprechend wurde getestet, ob eine Verwundung der Pflanzen oder eine Behandlung mit 0,5 M Glucose, 100 µM ABA oder *Fusarium*-Kulturfiltrat GUS-Aktivität induzieren. Keiner der getesteten Stressoren war in der Lage GUS-Aktivität zu induzieren.

Da der getestete Promotorbereich keine Aktivierbarkeit des Reportergens durch Jasmonat vermittelt, sollte eine translationale Fusion der *Atjrg21*-gDNA im dritten Exon mit dem GUS-Gen zeigen, ob möglicherweise Intron/Exon-Sequenzen an der Regulation beteiligt sind. Transgene Pflanzen mit diesem Konstrukt zeigen den anvisierten Phänotyp für eine Jasmonat-vermittelte Regulation des Reportergens. Unbehandelte Pflanzen besitzen nur geringe GUS-Aktivität, während eine Behandlung dieser Pflanzen mit Methyljasmonat zum deutlichen Anstieg der GUS-Aktivität führt. Ebenso induzieren verschiedene Stressoren in verschiedener Intensität einen Anstieg der GUS-Aktivität in diesen Pflanzen. Nachfolgende Deletionsanalysen sollten Aufschluß darüber bringen, in welchen Genbereichen Elemente für die Jasmonat-vermittelte Regulation verankert sind, bzw. welche Genbereiche die Aktivierung durch andere Stressoren vermitteln. Einerseits sollte der Ausschluss der jeweiligen Intronsequenzen Auskunft darüber geben, ob diese Bereiche an der Regulation beteiligt sind. Andererseits sollte eine translationale Fusion der *Atjrg21*-cDNA mit dem GUS-Gen unter dem *Atjrg21*-Promotor zeigen, ob Exonsequenzen (siehe Douglas et al., 1991) für die Regulation von Bedeutung sind. Das Ergebnis dieser Analysen zeigt deutlich, dass das zweite Intron essentiell für die Regulation des Gens durch Jasmonat und andere Stressoren ist. Der Verlust des zweiten Intron ging mit dem vollständigen Verlust der Aktivierbarkeit durch Jasmonat einher.

Als mögliche regulatorische Elemente findet man innerhalb des zweiten Introns im Abstand von 62 bp zwei Palindrome mit der Sequenz CACGTG. Dieses Motiv bildet den Kern der von Giuliano et al. (1988) beschriebenen G-Box. Die G-Box ist ein im Pflanzenreich ubiquitär vorkommendes Regulationselement (Menkens et al., 1995) und ist als regulatorisches Element in einer Vielzahl von induzierbaren Promotoren beschrieben. So sind G-Boxen an der Expression verschiedener Gene durch Licht (Donald & Cashmore, 1990; Schulze-Lefert et al., 1989a), bei Sauerstoffmangel (McKendree & Ferl, 1992), nach Verwundung (Kawaoka et al., 1994) und durch Phytohormone wie Abscisinsäure (Guiltinan et al., 1990; Shen & Ho, 1995), Ethylen (Eyal et al., 1993) und Jasmonsäure (Kim et al., 1992; Mason et al., 1993) beteiligt. DNA-Footprinting-Experimente (Schulze-Lefert et al., 1989b) und Gelshiftassays (Donald et al., 1990) zeigen, dass G-Boxen Bindungsorte von Kernproteinen sind, der GBFs (G-Box binding factors, Giuliano et al., 1988). Mittels South-Western-Screening konnten zahlreiche dieser GBFs isoliert und charakterisiert werden. Hierzu gehören beispielsweise EmBP-1 aus Weizen (Guiltinan et al., 1990), CPRF1 bis 4 aus Petersilie (Weisshaar et al., 1991; Kircher et al., 1998), TAF-1 aus Tabak (Oeda et al., 1991), GBF1 bis 4 aus Arabidopsis (Schindler et al., 1992a; Menkens & Cashmore, 1994) und SGBF-1 und -2 aus der Sojabohne (Hong et al., 1995). Mit wenigen Ausnahmen (Kawagoe et al., 1996; de Pater et al., 1997) gehören die GBFs zur Superfamilie der bZIP-Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine zeichnen sich durch zwei charakteristische, namensgebende Motive aus, einer basischen Region und einer „leucine zipper“-Domäne (Landschulz et al., 1988). Während die basische Region der DNA-Bindung dient, ist die „leucine zipper“-Domäne für eine Dimerisierung der Transkriptionsfaktoren essentiell (Armstrong et al., 1992). Weiterhin besitzen eine Reihe von GBFs (Bsp. GBF1,2,3; CPRF1) eine Prolin-reiche Domäne. Für GBF1 aus *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass dieser Bereich in Analogie zu tierischen Transkriptionsfaktoren als Transkriptionsaktivator fungiert (Schindler et al., 1992b). Die transkriptionelle Regulation der GBFs ist heterogen. Während einige GBFs konstitutiv in der gesamten Pflanze exprimiert werden, zeigen andere eine gewebespezifische Expression oder werden durch externe Stimuli induziert (Weisshaar et al., 1991; Schindler et al., 1992a; Feldbrügge et al., 1994, 1996; Lu et al., 1996). Ein weiterer

Aspekt der Regulation von GBFs ist in Zusammenhang mit ihrer intrazellulären Lokalisation zu sehen. So findet man beispielsweise einen großen Teil an G-Box-bindender Aktivität im Cytosol. Der Kerntransport dieser Proteine wird anscheinend durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsmechanismen reguliert (Harter et al., 1994; Terzaghi et al., 1997). Somit beeinflusst der gezielte Kerntransport verschiedener GBFs die jeweilige Population an GBFs im Zellkern, welche miteinander dimerisieren und funktionell wirksam werden können.

Die Spezifität der DNA-Interaktion ist nicht zuletzt in der DNA-Erkennungssequenz verankert. Pflanzliche bZIP-Proteine haben in ihrer Erkennungssequenz ein ACGT-Kernmotiv als Gemeinsamkeit (Weisshaar et al., 1991; Armstrong et al., 1992; Schindler et al., 1992c; Foster et al., 1994). G-Box-bindende Faktoren als Teil der bZIP-Superfamilie besitzen entsprechend eine hohe Affinität zu DNA-Sequenzen mit dem CACGTG-Motiv. Das Vorkommen eines G-Box-Motivs ist aber kein Garant für seine Funktionalität (Fiedler et al., 1993; Pasquali et al., 1999). Selektierend auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren wirken hier nicht zuletzt angrenzende DNA-Bereiche (Williams et al., 1992; Izawa et al., 1993).

Bisher wurden keine funktionellen G-Boxen im Intronbereich beschrieben. Lediglich im nicht translatierten 5'-Bereich des CPRF1-Gens aus *Petersilie* wurde das Vorkommen einer G-Box und eines benachbarten *hex*-Elements (GACGTG) detektiert und analysiert (Feldbrügge et al., 1994). Diese Elemente dienen wahrscheinlich der Autoregulation des Gens. Folgt man der Frage nach der Funktionalität der im Intron lokalisierten G-Boxen und betrachtet die flankierenden G-Box-Bereiche, so zeigt sich, dass die G-Box1 (ATCACGTGGA) mit der aus dem Jasmonat-regulierten *pin2*-Promotor identisch ist (Keil et al., 1986). Den Untersuchungen von Williams et al. (1992) entsprechend, sollte die G-Box1 die mit „Typ B“ klassifizierte Kernproteinfraktion binden. Gleiches gilt für die 62 bp entfernte zweite G-Box (ACCACGTGCA). Den endgültigen Nachweis der Funktion dieser Intron-lokalisierten G-Boxen sollte die gezielte Mutagenese des CACGTG-Motivs bringen. Hierzu wurde die CACGTG-Sequenz im dem für die Proteininteraktion essentiellen ACGT-Kern zu CAATG mutiert (Williams et al., 1992). Dies geschah sowohl mit der ersten und der zweiten als auch mit beiden G-Boxen. Das Resultat dieser Mutagenese zeigte eindeutig, dass die im Intron-lokalisierten G-Boxen essentiell für die Regulation des *Atjrg21* sind. Bereits der Verlust einer G-Box führt zum vollständigen Ausfall der Regulierbarkeit durch Jasmonat. Dies zeigt, dass jede der zwei G-Boxen für sich essentiell für die Jasmonat-vermittelte Genregulation ist. Weiterhin ist bewiesen, dass die Aktivierung des *Atjrg21* nach der Behandlung mit 0,5 M Glucose, *Fusarium*-Kulturfiltrat, Abscisinsäure oder nach der Verwundung der Pflanze von der Anwesenheit dieser G-Boxen abhängig ist. Hiermit konnte erstmalig gezeigt werden, dass, entgegen bisherigen Publikationen über die Funktion der G-Boxen als Promotor-lokalisiertes Regulationselement, auch Intron-lokalisierte G-Boxen an der Genregulation beteiligt sein können.

Nachfolgende Versuche sollten klären, ob die im zweiten Intron des *Atjrg21* lokalisierten G-Boxen im Promotorbereich funktionell sind und ob diese Intronsequenzen ausreichend für die Genaktivierung durch Jasmonat sind. Hierzu wurden Intronfragmente von 170 bp im Bereich von -100 bis +6, bezogen auf die Zentren der G-Boxen, vor einen Minimalpromotor geschaltet. Diese Intronfragmente enthielten einerseits die zwei intakten G-Boxen und andererseits die drei mutierten Varianten. Um Artefakte in den Promotoranalysen zu vermeiden, wurde, im Vergleich zum sonst gebräuchlichen -90CaMV35S-Minimalpromotor, ein auf -54 verkürzter Minimalpromotor verwendet (Feltkamp et al., 1994). In diesem Konstrukt wurde der als *as-1*-Element (activating sequence; Lam et al., 1989) bezeichnete Bereich entfernt. Dieser 21 Basenpaare umfassende Bereich enthält *cis*-aktive Elemente, die u.a. eine Induktion durch Methyljasmonat, Salicylsäure und Auxinen vermitteln (Xiang et al., 1996).

Bei keinem der vier Minimalpromotor-Varianten ist Promotoraktivität nach Behandlung mit Methyljasmonat in transgenen Pflanzen nachweisbar. Dies verdeutlicht, dass diese Intron-lokalisierten G-Boxen notwendig, aber nicht ausreichend für die Regulation des *Atjrg21* durch Jasmonat sind. Was sind mögliche Erklärungen für dieses Ergebnis? Und wie können Intron-lokalisierte G-Boxen in die Genregulation des *Atjrg21* eingebunden sein?

Für eine Vielzahl regulatorischer Introns vornehmlich monokotyle Pflanzen wurde beschrieben, dass ein regulatorischer Effekt an bestimmte strukturelle Gegebenheiten gebunden ist. So vermitteln die entsprechenden Introns keine verstärkte Genexpression, wenn sie außerhalb des transkribierten Bereichs positioniert sind (McElroy et al., 1990; Clancy et al., 1994; Donath et al., 1995). Ein optimaler Effekt wird erreicht, wenn sich das Intron 60 bis 90 bp vom Transkriptionsstart entfernt befindet (Mascarenhas et al., 1990; Sinibaldi & Mettler, 1992). Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass regulatorische Introns vorzugsweise im 5'-UTR vorkommen (bzw. ihr regulatorischer Einfluss darauf zurückzuführen ist). Ebenso ist die Orientierung der Introns bedeutsam. Chimäre Konstrukte mit Introns in „anti-sense“-Orientierung zeigen keinen Effekt (Maas et al., 1991; Donath et al., 1995). Diese Beobachtungen lassen schlussfolgern, dass ein stimulierender Effekt eher an das Spleißen der Introns als an interne Enhancer-Elemente gebunden ist (Sinibaldi & Mettler, 1992; Simpson & Filipowicz, 1996). Dies wird zusätzlich dadurch untermauert, dass regulatorische Introns monokotyle Pflanzen meist gegenläufige Effekte in dikotylen Pflanzen zeigen (Sinibaldi & Mettler, 1992), was sich durch den höheren GC-Gehalt monokotyle Introns und die somit erschwerte Prozessierung der hnRNA erklären lässt (Goodall & Filipowicz, 1991). Doch allein durch Spleiß-Effekte lassen sich eine erhöhte Transkriptakkumulation und Intronspezifität nicht erklären. Es ist derzeit unklar, inwieweit das Spleißen der hnRNA die Quantität und Qualität der Transkripte beeinflusst. Als Erklärung für den unterschiedlichen Einfluss verschiedener Introns favorisieren Donath et al. (1995) das Vorkommen eines Oktamer-Motivs (CGTGCCGC), welches als Tetramer im 5'-UTR ca. 20 % der Intron-vermittelten Aktivität zeigt und in verschiedenen regulatorischen Introns monokotyle Pflanzen gefunden wurde.

In dikotylen Pflanzen sind hingegen regulatorische Introns nur selten beschrieben, obwohl gerade hier ein Großteil der publizierten Promotoranalysen durchgeführt worden sind. Auch scheinen die Regulationsprinzipien dieser Intronsequenzen von denen monokotyle Pflanzen deutlich abzuweichen. Während regulatorische Introns monokotyle Pflanzen die Genexpression anscheinend posttranskriptionell beeinflussen, wird eine Funktion regulatorischer Introns dikotyle Pflanzen vornehmlich auf transkriptioneller Ebene vermutet. Beispielsweise fungiert das erste Intron des Elongationsfaktor-1 β aus *Arabidopsis* auch im Promotorbereich als Enhancer, und dies unabhängig von seiner Orientierung (Gidekel et al., 1996). Auch Curie et al. (1993) schließen eine posttranskriptionelle Regulation des Elongationsfaktor-1 α -Gens aus *Arabidopsis* aus. Sie konnten zeigen, dass das erste Intron im 5'-UTR im Zusammenhang mit einem chimären Promotor zu keiner verstärkten Genexpression führt und erklären dies mit der fehlenden Interaktion von Promotor- und Intron-lokalisierten Elementen. Als möglichen Bindungsort postuliert man einen *as-1*-homologen Bereich im Intron.

Ebenso ist eine Regulation des *Atjrg21* durch das zweite Intron auf posttranskriptioneller Ebene eher unwahrscheinlich. Das Spleißen der Introns in dikotylen Pflanzen wird im wesentlichen von den 3'- und 5'-Spleißstellen und der Nukleotidzusammensetzung der Introns beeinflusst (Goodall & Filipowicz, 1989, 1991). Das Erkennen der Spleißstellen ist an einen vergleichsweise hohen AU-Gehalt der Introns im Vergleich zu den angrenzenden Exons gebunden (Bayton et al., 1996; McCullough & Schuler, 1997). Entsprechend sollte die Mutation der G-Boxen, d.h. der Austausch zweier Nukleotide an unterschiedlichen Positionen (Mut1, Mut2) nicht zu Defekten im Spleißen führen. Weiterhin erfüllt die G-Box-Sequenz nicht das Kriterium einer internen Verzweigungsstelle, eines „branchpoints“, zur Lariatbildung im Spleißprozess. Dieser in Pflanzen lang umstrittene „branchpoint“ konnte einem CUNAN-Motiv zugeordnet werden, welches sich durchschnittlich 27 bp von der 3'-Spleißstelle befindet (Simpson et al., 1996; Liu & Filipowicz, 1996). Ein solches Motiv (CUGAU) findet man 42 bp von der 3'-Spleißstelle und 509 bp von der zweiten G-Box entfernt. Dies bekräftigt die oben getroffene Aussage und macht eine Einbindung der G-Boxen in transkriptionelle Ereignisse wahrscheinlicher. Diese Annahme beinhaltet, dass die Intron-ständigen G-Boxen des *Atjrg21* in gleicher Weise wie die bisher beschriebenen Promotor-lokalisierten G-Boxen agieren.

Die Tatsache, dass G-Boxen in einer Vielzahl von Promotoren beschrieben und somit an der Regulation unterschiedlicher Gene beteiligt sind, führte zur Annahme, dass G-Box-bindende Faktoren lediglich allgemeine Transkriptionsregulatoren sind. Die Spezifität der Reizantwort wird nach diesem Modell durch benachbarte Elemente vermittelt (Menkens et al., 1995). Für das Licht-regulierte *rbcS-1A*-Gen aus *Arabidopsis* wäre dies ein I-Box-Motiv (GATTAG; Giuliano et al., 1988) und ein hieran bindender I-Box-bindender Faktor (Borello et al., 1993). Die G-Box und die I-Box wirken synergistisch und sind essentiell für die Licht-induzierte Expression des Gens (Donald & Cashmore, 1990). Ähnliche Beobachtungen machten Shen & Ho (1995) für das *HVA22*-Gen aus Gerste. Hier sind neben einer G-Box zwei weitere Motive an der Regulation des Gens durch ABA beteiligt. Deletionsanalysen zeigen auch hier, dass die G-Box essentiell, aber nicht ausreichend für Genregulation ist. Und nicht zuletzt wurde für das *pin2*- und *vspB*-Gen gezeigt, dass neben einer G-Box weitere *cis*-Elemente für die Regulation durch Jasmonat essentiell sind (Kim et al., 1992; Mason et al., 1993). Für das *Atjrg21*-Gen gibt es keine Hinweise auf mögliche Jasmonat-regulierende Elemente, welche in Kombination mit den G-Boxen für die spezifische Regulation des Gens verantwortlich sind. Andererseits spricht gegen einer generelle, „unspezifische“ Funktion der GBFs als Transkriptionsfaktoren die Regulation dieser Gene und ihre Bindungsspezifität (Menkens et al., 1995). So findet man oft identische G-Box-Motive in ähnlich regulierten Genen (Übersicht in Williams et al., 1992), und entsprechend ist auch zu vermuten, dass eine Übereinstimmung der *Atjrg21* G-Box1 zu der aus dem *pin2*-Gen kein Zufall ist. Dies führte zu der Überlegung, ob vielleicht die G-Box1 synergistisch mit der G-Box2 für die Jasmonat-vermittelte Regulation des *Atjrg21* ausreichend ist. Experimente mit den G-Boxen im Promotorbereich widersprechen dieser Vermutung. Entsprechend ist anzunehmen, dass weitere Elemente an der Regulation beteiligt sind. Solche Elemente sollten nach den Ergebnissen der Deletionsanalysen zu urteilen im Promotor oder innerhalb des zweiten Introns lokalisiert sein. Möglicherweise ist in Analogie zu den von Curie et al. (1993) beschriebenen Studien ein Zusammenspiel von Jasmonat-regulierenden Promotor- und Intronsequenzen notwendig. Das würde beinhalten, dass die Position der G-Boxen relativ zum Promotorbereich entscheidenden Einfluss auf die Regulation ausübt. Beispiele hierfür sind aus dem tierischen System bekannt (Chung & Perry, 1993).

Für zukünftige Studien wäre insofern interessant, die Auswirkungen einer Promotordeletion im Fusionskonstrukt bzw. den Einsatz chimärer Promotoren in Verbindung mit dem *Atjrg21* Exon/Intron-Bereich mit der Induzierbarkeit durch Jasmonat zu korrelieren.

4.3 Betrachtungen zur *Atjrg21*-Genstruktur und -funktion

Das Jasmonat-regulierte Gen *Atjrg21* aus *Arabidopsis thaliana* zeigt in zweierlei Hinsicht interessante Erscheinungen. Einerseits findet man im Promotorbereich nach Sequenzanalysen einen Bereich sehr hoher Homologie zu repetitiven Sequenzen, andererseits konnte durch die im Kapitel 3.6 dargestellten Promotorstudien gezeigt werden, dass Intronsequenzen für die Regulation des Gens von Bedeutung sind.

Der *Atjrg21*-Promotor zeigt, beschränkt auf einen Bereich von ca. -1194 bis -334 bezogen auf den Translationsstart bzw. von ca. 280 bis 1140 bezogen auf den genomischen Klon pG21-5/2, Homologie zu einer Vielzahl von repetitiven Sequenzen des *Arabidopsis*genoms. Diese Sequenzen zeigen bis zu 97 % Identität zum angegebenen *Atjrg21*-Promotorbereich. Die Anzahl der Kopien dieser Sequenzen lässt sich nur grob abschätzen. Es dürften mehr als hundert Kopien dieser Sequenzen im *Arabidopsis*genom vorkommen. Über die Funktion dieser AT-reichen Sequenzen findet man keine Angaben. Ebenso findet man keine terminalen „inverted repeats“ oder andere Hinweise auf mögliche Insertionssequenzen (IS-Elemente). Innerhalb dieses Bereiches findet man lediglich in unmittelbarer Nähe zwei 19 bp-lange „directed repeats“, welche aber nicht zu den hochkonservierten Sequenzen dieses Bereiches gehören. Insgesamt lässt sich derzeit nur sagen, dass diese Sequenzen zufällig im Genom von

Arabidopsis verteilt sind und somit keine typischen Promotorsequenzen darstellen. In Genomen anderer Organismen konnten keine hierzu homologen Sequenzen gefunden werden. Fraglich bleibt weiterhin, ob dieser Bereich Einfluss auf die Regulation des *Atjrg21* nimmt. Analog zu den oben beschriebenen Besonderheiten des *Atjrg21*-Promotors ist wohl auch die Regulation durch Intron-lokalisierte Elemente, nach dem derzeitigen Stand der Forschung zu urteilen, ein Ausnahmefall. Interessant wäre es in dieser Hinsicht, die Vielfalt an verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Ökotypen zu nutzen, um hier die Regulation *Atjrg21*-homologer Gene zu charakterisieren. Für die *Arabidopsis thaliana* Ökotypen „Landsberg erecta“ und „Blanes“ konnte bereits in Northern-Analysen ein Jasmonat-reguliertes *Atjrg21*-homologes Transkript nachgewiesen werden. Diesbezüglich wäre ein Vergleich der genomischen Sequenzen dieser Gene in Bezug auf das Vorkommen und die Lage regulatorischer Elemente reizvoll.

Weiterhin ist die Funktion des *Atjrg21*-Gens bzw. seines Genprodukts unklar. Die Untersuchungen mit Jasmonat-insensitiven Mutanten oder Jasmonat-defizienten Mutanten bei *Arabidopsis* zeigen, dass Jasmonate im Rahmen entwicklungsphysiologischer Prozesse scheinbar nur für die Ausprägung der männlichen Fertilität essentiell sind (Feys et al., 1994; McConn & Browse, 1996). Größere Bedeutung scheint den Jasmonaten in Rahmen der Pathogenabwehr oder allgemein gesagt als Stresshormon zuzukommen. Aufgrund der zuvor beschriebenen Northern-Analysen ist eine mögliche Funktion des *Atjrg21* wohl eher im Rahmen derartiger Ereignisse zu suchen.

Die Sequenzanalysen mit der AtJRG21-Proteinsequenz zeigen, dass das AtJRG21 zur Superfamilie der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (2-ODDs) gehört (Britsch et al., 1993). Wenn auch die Zuordnung zu dieser Enzymklasse eindeutig ist, gibt es diesbezüglich keine Hinweise auf die Substratspezifität des AtJRG21. Andy G. Prescott betitelt seinen 1993 veröffentlichten Übersichtsartikel über 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen mit „A Dilemma of Dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet)“ und beschreibt hier die Divergenz zwischen enzymatischer Funktion und Sequenzhomologie innerhalb dieser Superfamilie.

Neben den P450-Monooxygenasen besitzen die 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenasen eine wichtige Rolle bei oxidativen Prozessen innerhalb des Primär- und Sekundärstoffwechsels bei Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen. Innerhalb des Pflanzenreichs sind 2-ODDs beispielsweise an der Ethylen-, Gibberellin- und Flavonoidbiosynthese beteiligt. Die Klonierung und Sequenzierung zahlreicher cDNAs von 2-ODDs zeigt, dass Sequenzhomologie nicht unweigerlich mit der enzymatischen Aktivität des Genprodukts korreliert. Einer Zuordnung zur Klasse der 2-ODDs liegt meist eine Homologie in der DNA-Sequenz zu Grunde. Aus biochemischer Sicht ist diese Zuordnung oft kontrovers, weil sich innerhalb der 2-ODDs Vertreter befinden, die Desaturase-, Oxidase- oder Epoxidaseaktivität zeigen. Beispielsweise zeigt die Aminocyclopropan-carbonsäureoxidase (ACC-Oxidase) hohe Homologie zu 2-ODDs auf DNA-Ebene und enthält die für diese Enzymklasse postulierten konservierten Aminosäurereste (Britsch et al., 1993). Ihren biochemischen Eigenschaften entsprechend ist eine Zuordnung zu dieser Enzymklasse aber inkorrekt. Die ACC-Oxidase braucht kein 2-Oxoglutarat als Cosubstrat und die von ihr katalysierte Reaktion entspricht der einer Oxidase. Entsprechend ist es schwer, Anhaltspunkte zur Substratspezifität und zum Enzymmechanismus des AtJRG21 zu finden.

Durch Datenbankrecherchen konnten in den letzten Monaten drei für das AtJRG21 homologe Proteinsequenzen auf den Chromosomen 2, 3 und 5 gefunden werden. Diese als AtJRG22, 23 und 25 bezeichneten Proteinsequenzen zeigen 55-66 % Identität zur AtJRG21-Proteinsequenz. Im Vergleich hierzu, beschränkt sich die Homologie des AtJRG21 zu Proteinsequenzen anderer 2-ODDs auf durchschnittlich 35 % Identität. Vor allem im N- und C-terminalen Bereich findet man Peptidsequenzen mit hohem Konservierungsgrad, die sich deutlich von einer generell zu verzeichnenden Homologie innerhalb der 2-ODDs absetzen. Im Dendrogramm findet man erwartungsgemäß eine separate Gruppierung der AtJRG21-homologen Sequenzen. Der Vergleich der Genstruktur aller vier *Atjrg21*-homologen Gene verdeutlicht die evolutionäre

Verwandtschaft dieser Gene. *Atjrg21*, *22* und *25* besitzen jeweils 2 Introns, die den codierenden Bereich in 3 Exons unterteilen. Die Position dieser Introns ist, gemessen an der Peptidsequenz, in allen 4 homologen Genen identisch. Nur *Atjrg23* besitzt ein zusätzliches Intron, welches das „erste Exon“ zergliedert. Abgesehen von diesem zusätzlichen Intron findet man eine hohe Übereinstimmung in der Größe der beiden C-terminalen Exons. Das vorletzte Exon differiert in seiner Größe lediglich um 6 Basenpaare bzw. zwei Codons. Das letzte Exon hat in allen 4 Genen eine identische Länge von 249 Basenpaaren. Betrachtet man hingegen die Größe der Introns, so findet man eine hohe Variabilität innerhalb dieser Gene.

Aus diesen Daten läßt sich mit hoher Wahrscheinlichkeit eine gemeinsame enzymatische Funktion aller vier AtJRG21-homologen Proteine bzw. eine Einordnung als Isoenzyme postulieren. Auf genomischer Ebene zeigt sich hierdurch, dass das *Atjrg21*-Gen Teil einer kleinen Genfamilie ist. Die genaue Anzahl der Gene einer solchen Genfamilie lässt sich jedoch erst mit Vollendung des Arabidopsis-Genomprojekts sagen. Vorherige Southern-Analysen zeigten das *Atjrg21* als „single copy“-Gen (Bau, 1995).

Die Regulation dieser *Atjrg21*-homologen Gene wurde wegen der Aktualität der Daten bisher nicht untersucht. Insofern läßt sich derzeit keine Aussage über eine Aktivierung dieser Gene durch z. B. Jasmonate treffen. Somit ist eine Bezeichnung dieser Gene als *Atjrg* sicherlich nur von vorläufiger Natur. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen zur Regulation des *Atjrg21* sucht man aber unweigerlich nach dem Vorkommen von G-Box-Motiven. So findet man im *Atjrg22*, analog zum *Atjrg21*, zwei Intron-lokalisierte G-Box-Motive im Abstand von 26 bp (siehe 7.2.1). Den Untersuchungen über die flankierenden Bereiche des G-Box-Motivs (Williams et al., 1992) entsprechend, sollten diese im ersten Intron von *Atjrg22* gefundenen G-Boxen funktionell in der Bindung von Transkriptionsfaktoren sein.

Die Kenntnis über diese *Atjrg21*-homologen Sequenzen und der Vergleich ihrer Proteinsequenz zu anderen 2-ODDs ist insofern nützlich, als dass man hierdurch Informationen über Sequenzbereiche erhält, welche sich von einer generellen Homologie dieser Enzymklasse abheben. In solchen Bereichen sollten Eigenschaften wie die Substratspezifität verankert sein. Mithilfe dieser Sequenzen kann man wiederum spezifisch nach homologen Sequenzen suchen, um Hinweise auf eine Funktion des AtJRG21 zu bekommen. Weiterhin ist es zur Charakterisierung transgener Pflanzen mit ausgeschaltetem *Atjrg21* wichtig, Information zur Expression homologer Gene und deren möglichen kompensierenden Einfluss zu haben.

Nicht zuletzt lassen sich Rückschlüsse auf die Funktion eines Gens durch seinen Genort ziehen. Für viele Resistenzgene konnte nicht nur in Arabidopsis gezeigt werden, dass diese Gene sich auf bestimmten Chromosomenbereichen konzentrieren und man Resistenzloci innerhalb des Arabidopsisgenoms findet (Speelman et al., 1998). Das *Atjrg21*-Gen wurde auf dem Chromosom 3 zwischen den Markern *ve022* bei 73,5 cM und *BGL1* bei 71,9 cM kartiert. Dieser Bereich fällt nicht in einen der beschriebenen Resistenzloci. Interessant ist aber die Nachbarschaft zu einem Gen für ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym. Durch die Identifizierung des Genortes der *coi1*-Mutation, welche Jasmonat-Insensitivität verleiht, ist bekannt, dass der Ubiquitin-abhängige Abbau für die Regulation innerhalb der Jasmonat-Signaltransduktion wichtig ist.

4.4 Suche nach Jasmonat-insensitiven Mutanten

Jasmonate agieren als Signalstoffe und Regulatoren der Genexpression. Die Wirkungsweise eines solchen Signalstoffes beinhaltet seine Erkennung. Modelle über die Jasmonat-Signaltransduktion sehen den initialen Schritt in der Erkennung von Jasmonaten durch einen Jasmonatrezeptor (Löbner & Lee, 1998). Die Endglieder dieser Signalkette sind Jasmonat-regulierte Gene, deren Genprodukte die Reizantwort vermitteln. Um Jasmonat-Signaltransduktionsprozesse zu studieren ist es sinnvoll, die terminalen Elemente der Signalkette für weitere Untersuchungen zu isolieren und charakterisieren. Das bedeutet einerseits Jasmonat-bindende Proteine zu suchen und andererseits Jasmonat-regulierte Gene

zu isolieren (Löbler, 1996). Diese Gene sind Marker und Werkzeuge für das Studium von Signaltransduktionsprozessen. Im Rahmen dieser Dissertation wurde ein genomischer Klon des Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21* isoliert und regulatorische Elemente für die Jasmonat-vermittelte Regulation identifiziert. Mithilfe dieser regulatorischen Genbereiche war es möglich, Jasmonat-regulierte Reportergenkonstrukte zu klonieren und deren Expression in transgenen Pflanzen zu untersuchen.

Als effektives Mittel zum Studium von Signaltransduktionsprozessen hat sich die Isolierung von Signaltransduktionsmutanten erwiesen. Zur Selektion von Jasmonat-Signaltransduktionsmutanten diente einerseits die Insensitivität gegenüber dem Jasmonatanalogon Coronatin als Marker. Hier wurden Mutanten isoliert, die in Gegenwart des bakteriellen Toxin uneingeschränktes Wachstum zeigten (Feys et al., 1994). Die Insensitivität gegenüber Coronatin ist mit der gegenüber Jasmonaten gekoppelt. Andererseits wurden drei Mutanten anhand ihrer Wurzellänge beim Wachstum auf Methyljasmonat isoliert. Hier wurde der inhibierende Effekt des Jasmonats auf das Wurzelwachstum genutzt.

Die als „Coronatin-insensitiv“ isolierten *coi*-Mutanten konnten alle einem Genort zugeordnet werden. Als Ort der Mutationen wurde ein Gen kloniert, welches für ein Leucin-reiches Protein mit einer F-Box-Domäne codiert (Xie et al., 1998). Der Ort der Mutation der als „jasmonate-resistent“ oder „jasmonate-insensitiv“ isolierten *jar1*, *jin1* und *jin4* Mutanten ist bisher nicht bekannt (Staswick et al., 1992; Berger et al., 1996). Es ist anzumerken, dass die als *jar1* und *jin4* isolierten Mutanten möglicherweise allelisch sind, d.h. die Mutation einem Genort zuzuordnen ist (S. Berger, persönliche Kommunikation).

Physiologische und pharmakologische Untersuchungen zeigen, dass die Signalwege hin zur Aktivierung Jasmonat-regulierter Gene verzweigt sind und aus einer Vielzahl regulatorischer Elemente bestehen (Rojo et al., 1998, 1999; León et al., 1999). Diese Resultate geben Anreiz zur Identifizierung neuer regulatorischer Proteine durch die Isolierung weiterer Jasmonat-insensitiver Mutanten. Die Strategie zur Selektion neuer Mutanten mit veränderter Jasmonat-Sensitivität war der Einsatz anderer Selektionsmarker. Im Gegensatz zu den bisherigen Ansätzen sollte hier, anstelle phänotypischer Merkmale, ein molekularer Marker zur Auffindung von Mutanten dienen. Hierfür wurden die regulatorischen Bereiche des *Atjrg21* zur Jasmonat-vermittelten Steuerung eines konditional letalen Markergens genutzt. An der Expression eines solchen Markergens nach Jasmonatapplikation sollten grundlegende, zelluläre Komponenten der Jasmonat-Signalkette beteiligt sein. Insofern sollte man bei der Suche nach Mutanten mit verminderter Markergenexpression gezielter auf regulatorische Elemente zugreifen können.

Als konditional letales Markergen wurde das *pehA*-Gen gewählt. Das bakterielle *pehA*-Gen aus *Burkholderia caryophilli* PG2982 codiert für eine Phosphonsäuremonoesterhydrolase. Dieses Enzym besitzt die Eigenschaft, Glycerylglyphosat als artifizielles Substrat zu Glycerol und Glyphosat zu hydrolysieren (Dotson et al., 1996b). Glyphosat als Herbizid hemmt die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und führt so zum Tod der Pflanze. Im Vergleich zu anderen, negativen Selektionsmarkern wie z.B. RNasen (Mariani et al., 1990) hat man bei einem konditional letalen Marker mit dem extern applizierten Protoxin eine weitere Variable zur Kontrolle der Mutantenselektion.

Transgene Pflanzen mit dem G21Peh-Fusionskonstrukt zeigen keine Einbußen im Wachstum gegenüber Wildtyppflanzen. Nach der Applikation von Methyljasmonat sind in transgenen und nicht transgenen Pflanzen vergleichbare, generelle Effekte zu beobachten. Eine Expression des *pehA*-Proteins hat somit keinen sichtbaren Effekt auf das Wachstum der Pflanzen. Auf zellulärer Ebene findet man im Vergleich zum Wildtyp in einigen Linien geringere Mengen an *Atjrg21*-mRNA nach Applikation von Methyljasmonat. Die Ursache hierfür sind wahrscheinlich der *Atjrg21*-Anteil am Markergenkonstrukt und dadurch ausgelöste Kosuppressionseffekte. Die Applikation des Protoxins Glycerylglyphosat über einen längeren Zeitraum zeigt bereits toxische Effekte bei transgenen und nicht transgenen Pflanzen, welche durch Blattchlorosen sichtbar sind. Dotson et al. (1996a) schreiben dem Glycerylglyphosat eine 50-fach geringere

Toxizität als Glyphosat zu. Da sich eine Behandlung durchschnittlich über drei Wochen erstreckte, war es zur Vermeidung unspezifischer Effekte nötig, die Konzentration an Protoxin so gering wie möglich zu halten (125 µM). Diese relativ lange Behandlungsdauer war nötig, um klare Effekte bei der Selektion potenziell Jasmonat-insensitiver Pflanzen zu erzielen. Dotson et al. (1996a) erreichen durch den Einsatz des CaMV35S-Promotors, eines konstitutiven, starken Promotors, deutlichere Ergebnisse innerhalb eines kleineren Zeitrahmens. Nachteilig auf das Selektionssystem wirkt sich sicherlich der *Atjrg21*-Anteil am Markergen aus. Einerseits ist in Northern-Analysen im Vergleich zum endogenen *Atjrg21* kein Transkript nachweisbar und andererseits sind Einbußen in der enzymatischen Aktivität der PEH durch den AtJRG21-Anteil am Protein nicht auszuschließen. Zur Unterstützung der Selektion wurden zusätzliche Effekte genutzt. Die Kombination von Wasserstress und Methyljasmonat induziert in den Pflanzen eine starke Akkumulation von Anthocyanen, sichtbar durch die rot-blaue Blattfärbung. Für die Jasmonat-insensitive *coi1*-Mutante sind Defekte in der Akkumulation dieser Farbstoffe beschrieben (Feys et al., 1994). Weiterhin sollten die längeren Wurzeln der potenziell Jasmonat-insensitiven Pflanzen eine bessere Wasserversorgung ermöglichen. Als weitere Komponente wurde der Wachstums-inhibierende Effekt hoher Konzentrationen an Methyljasmonat ausgenutzt. Unter Ausnutzung aller Faktoren wurden potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten durch ihr besseres Wachstum und vitales Erscheinungsbild isoliert.

Northern-Analysen zur Untersuchung der Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA in den potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten nach Jasmonat- oder Glucosebehandlung bzw. in unbehandeltem Gewebe sollten zeigen, inwieweit die selektierten Pflanzen Defekte in der Jasmonatsignaltransduktion besitzen. Neben Mutanten mit Defekten in der Jasmonatsignaltransduktion können auch Mutanten mit Defekten im Markergen (*cis*-Effekte) oder mit stillgelegtem Markergen einen Jasmonat-insensitiven Phänotyp vortäuschen. Pflanzen mit Mutationen im Markergen sollten keine Defekte in der Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Jasmonatbehandlung zeigen. Kosuppressionseffekte können hingegen erst durch Kreuzungsexperimente oder andere Markergene ausgeschlossen werden. Weiterhin sind Mutanten mit veränderter Aufnahme oder verändertem Metabolismus gegenüber Glycerylglyphosat und Methyljasmonat denkbar. Glyphosat-resistente Pflanzen dürften hingegen selten zu finden sein. Mutationen der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat-Synthase, die zum Verlust der Glyphosat-Bindung führen, sind meist mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität verbunden (Shuttleworth et al., 1999).

Von den 32 untersuchten Pflanzen zeigen ungefähr die Hälfte der Pflanzen Änderungen in der Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Jasmonatbehandlung. Northern-Analysen nach einer Behandlung der Pflanzen mit 0,5 M Glucose sollten zeigen, inwieweit die Sensitivität gegenüber endogenen Jasmonaten verändert ist. Diese Analysen geben kein klares Bild wieder und sollten in der nächsten Generation mit einer Sorbitollösung wiederholt werden.

Die Untersuchungen von Feys et al. (1994) und McConn & Browse (1996) zeigten, dass Jasmonate zur Ausbildung der männlichen Fertilität und somit zur Samenbildung notwendig sind. Es gibt bisher keine Befunde darüber, dass alternative Signalwege bestehen. Insofern sollte Jasmonat-Insensitivität mit dem Ausfall der Samenbildung verbunden sein. Von den isolierten Pflanze zeigt keine der potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten einen 100%igen Ausfall der Samenbildung, analog zur Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA. Es ist entsprechend anzunehmen, dass es sich hierbei nicht um „Nullmutanten“ handelt, d.h. um Mutanten mit vollständiger Blockierung des Jasmonat-Signalwegs. Die *jar1*- und die *jir*-Mutanten zeigen, dass ein partieller Signalfluss für die Samenbildung ausreichend ist. Ähnliche Beobachtungen machten McConn & Browse (1996) bei den *fad*-Mutanten. Bereits kleinste Mengen an Linolensäure, 5 % im Vergleich zum Wildtyp, sind für die vollständige Ausprägung der Samenanlagen ausreichend.

Nachfolgende Untersuchungen einer breiten Population der Nachkommenschaft potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten werden zeigen, inwieweit sich der Jasmonat-insensitive

Phänotyp bestätigt und phänotypische Erscheinungen sich manifestieren. Weiterhin sollen eine Vielzahl an Markergenen genutzt werden, um anhand des Expressionsmusters dieser Gene eine Klassifizierung der Mutanten treffen zu können. Diese Befunde müssen später mit Kreuzungsanalysen bestätigt werden.

4.5 Aussichten

Studien zur Genaktivierung im Rahmen der Pathogenantwort offenbaren ein komplexes Regulationsmuster dieser Gene (Glazebrook, 1999). Die an der Regulation von Abwehrgenen beteiligten Komponenten sind hingegen weniger gut bekannt. Hier bilden Signaltransduktionsmutanten Ansatzpunkte zur Identifizierung regulatorischer Proteine und ihrer Positionen innerhalb des Regulations-Netzwerkes. Mit Hauptaugenmerk auf Jasmonat-Signaltransduktionsprozesse konnten mithilfe des Markergens *Atjrg21* potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten isoliert werden. Die weitere Aufgabe besteht nun in der Analyse dieser Mutanten in den folgenden Generationen in Bezug auf die Expression des *Atjrg21* sowie anderer Jasmonat- und Pathogen-responsiver Gene. Die Unterschiede in der Genexpression sollen mit verändertem Abwehrverhalten gegenüber verschiedenen Pathogenen korreliert werden. Ferner ist eine Kartierung des Mutationsorts und die Identifizierung von Genen regulatorischer Proteine das Ziel dieser Mutantenanalysen.

Die Ergebnisse verschiedener Mutantenansätze sollen zur Vervollständigung und zum Verständnis derzeitiger Modelle über die Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr beitragen. Hierzu gehören, neben der Charakterisierung des Mutationsorts und der Identifizierung regulatorischer Proteine, Studien über Interaktionspartner dieser Proteine über „two hybrid“-Analysen, Kreuzungsversuche zur Erzeugung von Doppelmutanten und sekundäre Ansätze zur Isolierung Mutanten die den ursprünglichen Mutantenphänotyps kompensieren.

In Bezug auf die *Atjrg21*-Genfunktion werden derzeit laufende Ansätze zur Überexpression und Ausschaltung des *Atjrg21* Auskunft darüber geben, inwieweit das *Atjrg21* an Abwehrmechanismen im Rahmen der Pathogenabwehr beteiligt ist. Mithilfe von Northern-Analysen sollen die Expressionsmuster der *Atjrg21*-homologen Gene untersucht werden.

Das Verständnis über pflanzliche Abwehrmechanismen soll dazu beitragen, im landwirtschaftlichen Bereich den Einsatz großer Mengen unspezifisch wirkender Pestizide durch pflanzliche Signalstoffe zu ersetzen. Ein weiterer, transgener Ansatz ist die Erzeugung von Saatgut mit verändertem Expressionsverhalten wichtiger regulatorischer Elemente der Pathogenabwehr, welche der Pflanze eine erhöhte Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen verleiht.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit ist Bestandteil eines Projekts zur Untersuchung von Signaltransduktionsprozessen bei der Aktivierung pflanzlicher Pathogenabwehrgene. Die Erkennung von Pathogenen und die Auslösung von Abwehrreaktionen wird durch das Zusammenspiel verschiedener, pflanzlicher Signalstoffe moduliert. Die Jasmonsäure und ihre Derivate, die Jasmonate, sind Bestandteil pflanzlicher Signaltransduktionsprozesse. Im pflanzlichen Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* sind sie an der Ausprägung der männlichen Fertilität beteiligt. Weiterhin werden Jasmonate infolge einer Verwundung der Pflanze oder dem Befall mit Pathogenen gebildet. Ihre Funktion besteht in der Regulation der Reizantwort durch die Aktivierung spezifischer Gene. Im Vorfeld dieser Arbeit wurde die cDNA des Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21* isoliert. Es sollte als Marker und Werkzeug für molekulare Studien Jasmonat-regulierter Signaltransduktionsprozesse dienen.

Die Funktion des *Atjrg21* ist bisher nicht bekannt, jedoch zeigen Northern-Analysen, dass das *Atjrg21* in die Genaktivierung bei der Pathogenabwehr eingebunden ist. Nach einer Verwundung der Pflanze oder der Infektion mit dem Pflanzenpathogen *Fusarium oxysporum* sind große Menge an *Atjrg21*-Transkript nachweisbar. Die gleiche Reaktion lässt sich durch die Applikation von Methyljasmonat induzieren. Neben Jasmonaten ist das Phytohormon Ethylen essentieller Bestandteil Jasmonat-vermittelter Abwehrreaktionen. In Northern-Analysen kann man durch die kombinierte Applikation der Ethylenbiosynthesevorstufe ACC mit Methyljasmonat die Transkriptakkumulation des *Atjrg21* verstärken. Gleiche Effekte erzielt man bei gleichzeitiger Applikation von Methyljasmonat und Kinetin, einem Cytokinin. Da bekannt ist, dass Cytokinine die Bildung von Ethylen stimulieren, ist dieser Effekt wahrscheinlich auf Ethylen zurückzuführen. Diese Vermutung wird dadurch bekräftigt, dass weder ACC noch Kinetin allein zu einer Akkumulation von *Atjrg21*-mRNA führen. Diese Resultate deuten darauf hin, dass das *Atjrg21* analog zu anderen Jasmonat-regulierten Abwehrgenen über einen Jasmonat/Ethylen-abhängigen Signalweg reguliert wird.

Genomische Sequenzen des *Atjrg21*-Gens wurden zur Steuerung von Reporter genen genutzt. Hierbei zeigte sich, dass Intronbereiche essentiell für die Aktivierung des *Atjrg21* durch Jasmonat und andere Stressoren sind. Als Regulationselemente wurden durch Mutageneseexperimente zwei G-Boxen (CACGTG) im zweiten Intron identifiziert. G-Boxen sind als Regulationselemente und Bindungsorte von Transkriptionsfaktoren in einer Vielzahl von pflanzlichen Promotoren beschrieben. Die Funktionalität Intron-lokalisierter G-Boxen wurde hiermit erstmalig beschrieben. Mit der Verlagerung beider G-Boxen vor einen Minimalpromotor lässt sich keine Regulierbarkeit durch Jasmonat erzielen. Entsprechend ist zu vermuten, dass weitere Regulationselemente und/oder die Position der G-Boxen für eine Jasmonat-vermittelte Regulation des *Atjrg21* wichtig sind.

Pflanzen mit Jasmonat-responsiven Reporter genen wurden weiterhin genutzt, um Mutanten mit veränderter Reporter genexpression nach der Applikation von Methyljasmonat aufzufinden. In einem konditional letalen Screen konnten potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten isoliert werden. Bei Northern-Analysen wurde in einer Vielzahl dieser Mutanten eine verminderte Akkumulation der *Atjrg21*-mRNA nach Applikation von Methyljasmonat beobachtet. Diese potenziell Jasmonat-insensitiven Mutanten sollen nun zur Bestätigung ihrer Jasmonat-Insensitivität und zur Einordnung in bestehende Modelle Jasmonat-regulierter Signalwege auf die Expression anderer Markergene und ihrem Verhalten gegenüber Pathogenen in den Folgegenerationen getestet werden. Ferner ist es das Ziel, den Ort der Mutation zu kartieren, um somit regulatorische Komponenten von Jasmonat-Signaltransduktionsprozessen zu identifizieren.

6 Literaturverzeichnis

- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., Ecker, J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**: 2148-2152
- An, G., Mitra, A., Choi, H.K., Costa, M.A., An, K., Thornburg, R.W., Ryan, C.A.** (1989). Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell* **1**: 115-122
- Andresen, I., Becker, W., Schlüter, K., Burges, J., Parthier, B., Apel, K.** (1992). The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol. Biol.* **19**: 193-204
- Armstrong, G.A., Weisshaar, B., Hahlbrock, K.** (1992). Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell* **4**: 525-537
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.** (1992). *Current protocols in molecular biology*. Suppl. **20** Wiley New York
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., Elledge, S.J.** (1996). *SKP1* connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263-274
- Bau, S.** (1995). Isolierung und Charakterisierung der cDNA eines Methyljasmonat-regulierten Gens aus *Arabidopsis thaliana*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Baydoun, E.A.-H., Fry, S.C.** (1985). The immobility of pectic substances in injured tomato leaves and its bearing on the identity of the wound hormone. *Planta* **165**: 269-276
- Bayton, C.E., Potthoff, S.J., McCullough, A.J., Schuler, M.A.** (1996). U-rich tracts enhance 3' splice site recognition in plant nuclei. *Plant J.* **10**: 703-711
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.** (1993). *In planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences*, **316**: 1194-1199
- Bell, E., Creelman, R.A., Mullet, J.E.** (1995). A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8675-8679
- Bell, E., Mullet, J.E.** (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* **103**: 1133-1137
- Benedetti, C.E., Xie, D., Turner, J.G.** (1995). COI1-dependent expression of an *Arabidopsis* vegetative storage protein in flowers and siliques and in response to coronatine or methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **109**: 567-572
- Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R., Staskawicz, B.J.** (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 372-378
- Bent, A.F., Clough, S.J.** (1998). *Agrobacterium* germ-line transformation: Transformation of *Arabidopsis* without tissue culture. In *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S.B. ed.). Netherlands: Kluwer Academic Publishers, **B7**: 1-14
- Benton, W.D., Davis, R.W.** (1977). Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182
- Berger, S., Bell, E., Sadka, A., 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 Mol. Biol.* **27**: 933-942
- Berger, S., Bell, E., Mullet, J.E.** (1996). Two methyl jasmonate-insensitive mutants show altered expression of *Atvsp* in response to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol.* **111**: 525-531
- Berget, S.M., Moore C., Sharp, P.A.** (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 3171-3175

- Bergey, D.R., Howe, G.A., Ryan, C.A.** (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 12053-12058
- Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D.S., Ryan, C.A.** (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1756-1760
- Bergey, D.R., Ryan, C.A.** (1999). Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* **40**: 815-823
- Bevan, M., Barnes, W.M., Clinton, M.D.** (1983a). Structure and transcription of the nopaline synthase gene region of T-DNA. *Nucleic Acids Res.* **11**: 369-385
- Bevan, M.W., Flavell, R.B., Chilton, M.D.** (1983b). A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* **304**: 184-187
- Bevan, M.** (1984). Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* **12**: 8711-8721
- Beyer, E.M., Jr.** (1976). A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol.* **58**: 268-271
- Bishop, P.D., Makus, D.J., Pearce, G., Ryan, C.A.** (1981). Proteinase inhibitor inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymatically released from cell walls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 3536-3540
- Bishop, P.D., Pearce, G., Bryant, J.E., Ryan, C.A.** (1984). Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. *J. Biol. Chem.* **259**: 13172-13177
- Blake, C.C.F.** (1978). Do genes-in-pieces imply protein-in-pieces? *Nature* **273**: 276-268
- Blechert, S., Brodschelm, W., Hölder, S., Kammerer, L., Kutchan, T.M., Mueller, M.J., Xia, Z.-Q., Zenk, M.H.** (1995). The octadecanoid pathway: Signal molecules for the regulation of secondary pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4099-4105
- Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C., Apel, K.** (1998). Wounding and chemicals induce expression of the *Arabidopsis thaliana* gene *Thi2.1*, encoding a fungal defense thionin, via the octadecanoid pathway. *FEBS Lett.* **437**: 281-286
- Borello, U., Ceccarelli, E., Giuliano, G.** (1993). Constitutive, light-responsive and circadian clock-responsive factors compete for the different I box elements in plant light-regulated promoters. *Plant J.* **4**: 611-619
- Bornstein, P., McKay, J., Morishima, J.K., Devarayalu S., Gelinis, R.E.** (1987). Regulatory elements in the first intron contribute to transcriptional control of the human alpha 1(I) collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 8869-8873
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, S., Klessig, D.F., Dong, X.** (1994). A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1845-1857
- Bowling, S.A., Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *Plant Cell* **9**: 1573-1584
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- Breathnach, R., Mandel, J.L., Chambon, P.** (1977). Ovalbumin gene is split in chicken DNA. *Nature* **270**: 314-319
- Breathnach, U., Chambon, P.** (1981). Organization and expression of eukaryotic split genes coding for proteins. *Annu. Rev. Biochem.* **50**: 349-384
- Breitbart, R.E., Andreadis, A., Nadal-Ginard, B.** (1987). Alternative splicing: A ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. *Annu. Rev. Biochem.* **56**: 467-495
- Britsch, L., Dedio, J., Saedler, H., Forkmann, G.** (1993). Molecular characterization of flavanone 3 β -hydroxylases. Consensus sequence, comparison with related enzymes and role of conserved histidine residues. *Eur. J. Biochem.* **217**: 745-754
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M.** (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**: 376-379

- Callis, J., Fromm, M., Walbot, V.** (1987). Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev.* **1**: 1183-1200
- Camilleri, C., Lafleurriel, J., Macadré, C., Varoquaux, F., Parmentier, Y., Picard, G., Caboche, M., Bouchez, D.** (1998). A YAC contig map of *Arabidopsis thaliana* chromosome 3. *Plant J.* **14**: 633-642
- Cao, H., Li, X., Dong, X.** (1998). Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 6531-6536
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1583-1592
- Cavalier-Smith, T.** (1985). Selfish DNA and the origin of introns. *Nature* **315**: 283-284
- Chaudhry, B., Müller-Uri, F., Cameron-Mills, V., Gough, S., Simpson, D., Skriver, K., Mundy, J.** (1994). The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein. *Plant J.* **6**: 815-824
- Cheung, W.Y., Hubert, N., Landry, B.S.** (1993). A simple and rapid DNA microextraction method for plant, animal and insect suitable for RAPD and other PCR analysis. *PCR Meths. Applics.* **3**: 69-70
- Choi, D., Bostock, R.M., Avdiushko, S., Hildebrand, D.F.** (1994). Lipid-derived signals that discriminate wound- and pathogen-responsive isoprenoid pathways in plants: Methyl jasmonate and the fungal elicitor arachidonic acid induce different 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase genes and antimicrobial isoprenoids in *Solanum tuberosum* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2329-2333
- Chung, S., Perry, R.P.** (1993). The importance of downstream δ -factor binding elements for the activity of the rpl32 promoter. *Nucleic Acids Res.* **21**: 3301-3308
- Clancy, M., Vasil, V., Hannah, L.C., Vasil, I.K.** (1994). Maize *Shrunken-1* intron and exon regions increase gene expression in maize protoplasts. *Plant Science* **98**: 151-161
- Clarke, J.D., Liu, Y., Klessig, D.F., Dong, X.** (1998). Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterization of a dominant *Arabidopsis cpr6-1* mutant. *Plant Cell* **10**: 557-569
- Corbineau, F., Rudnicki, R.M., Come, D.** (1988). The effect of methyl jasmonate on sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed germination and seedling development. *Plant Growth Regul.* **7**: 157-169
- Cornish-Bowden, A.** (1985). Are introns structural elements or evolutionary debris? *Nature* **313**: 434-435
- Creusot, F., Fouilloux, E., Dron, M., Lafleurriel, J., Picard, G., Billaut, A., Paslier, D.L., Cohen, D., Chabouté, M.-E., Durr, A., Fleck, J., Gigot, C., Camilleri, C., Bellini, C., Caboche, M., Bouchez, D.** (1995). The CIC library: A large insert YAC library for genome mapping in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **8**: 763-770
- Curie, C., Axelos, M., Bardet, C., Atanassova, R., Chaubet, N., Lescure, B.** (1993). Modular organization and developmental activity of an *Arabidopsis thaliana* EF-1 α gene promoter. *Mol. Gen. Genet.* **238**: 428-436
- Dathe, W., Rönch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., Schreiber, K.** (1981). Endogenous plant hormones of the broad bean, *Vicia faba* L. (-)-jasmonic acid, a plant growth inhibitor in pericarp. *Planta* **153**: 530-535
- de Pater, S., Pham, K., Memelink, J., Kinje, J.** (1997). RAP-1 is an *Arabidopsis* MYC-like R protein homologue, that binds to G-Box sequence motifs. *Plant Mol. Biol.* **34**: 169-174
- de Souza, S.J., Long, M., Klein, R., Roy, S., Lin, S., Gilbert, W.** (1998). Toward a resolution of the introns early/late debate: Only phase zero introns are correlated with the structure of ancient proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5094-5099
- de Souza, S.J., Long, M., Schoenbach, L., Roy, S.W., Gilbert, W.** (1996). Intron positions correlate with module boundaries in ancient proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 14632-14636
- Dean, C., Favreau, M., Bond-Nutter, D., Bedbrook, J., Dunsmuir, P.** (1989). Sequences downstream of the translation start regulate quantitative expression of two petunia *rbcS* genes. *Plant Cell* **1**: 201-208

- Demole, E., Lederer, E., Mercier, D.** (1962). Isolement et de détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helv. Chim. Acta* **45**: 675-685
- Dempsey, D.A., Shah, J., Klessig, D.F.** (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Rev. Plant Sci.* **18**: 547-575
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., Dangi, J.L.** (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**: 565-577
- Dittrich, H., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992). The jasmonate precursor, 12-oxo-phytodienoic acid, induces phytoalexin synthesis in *Petroselinum crispum* cell cultures. *FEBS Lett.* **309**: 33-36
- Doares, S.H., Narváez-Vásquez, J., Conconi, A., Ryan, C.A.** (1995a). Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **108**: 1741-1746
- Doares, S.H., Syrovets, T., Weiler, E.W., Ryan, C.A.** (1995b). Oligogalacturonides and chitosan activate plant defensive genes through the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4095-4098
- Donald, R.G.K., Schindler, U., Batschauer, A., Cashmore, A.R.** (1990). The plant G box promoter sequence activates transcription in *Saccharomyces cerevisiae* and is bound *in vitro* by a yeast activity similar to GBF, the plant G box binding factor. *EMBO J.* **9**: 1727-1735
- Donald, R.G.K., Cashmore, A.R.** (1990). Mutation of either G box or I box sequences profoundly affects expression from the *Arabidopsis rbcS-1A* promoter. *EMBO J.* **9**: 1717-1726
- Donath, M., Mendel, R., Cerff, R., Martin, W.** (1995). Intron-dependent transient expression of the maize *GapA1* gene. *Plant Mol. Biol.* **28**: 667-676
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 316-323
- Doolittle, W.F.** (1978). Genes in pieces: Were they ever together? *Nature* **272**: 581-582
- Dotson, S.B., Lanahan, M.B., Smith, A.G., Kishore, G.M.** (1996a). A phosphonate monoester hydrolase from *Burkholderia caryophylli* PG2982 is useful as a conditional lethal gene in plants. *Plant J.* **10**: 383-392
- Dotson, S.B., Smith, C.E., Ling C.S., Barry G.F., Kishore, G.M.** (1996b). Identification, characterization, and cloning of a phosphonate monoester hydrolase from *Burkholderia caryophylli* PG2982. *J. Biol. Chem.* **271**: 25754-25761
- Douglas, C., Hoffmann, H., Schulz, W., Hahlbrock, K.** (1987). Structure and elicitor or u.v.-light-stimulated expression of two 4-coumarate:CoA ligase genes in parsley. *EMBO J.* **6**: 1189-1195
- Douglas, C.J., Hauffe, K.D., Ites-Morales, M.-E., Ellard, M., Paszkowski, U., Hahlbrock, K., Dangi, J.L.** (1991). Exonic sequences are required for elicitor and light activation of a plant defense gene, but promoter sequences are sufficient for tissue specific expression. *EMBO J.* **10**: 1767-1775
- Epple, P., Vignutelli, A., Apel, K., Bohlmann, H.** (1998). Differential induction of the *Arabidopsis thaliana* *Thi2.1* gene by *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthiolae*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 523-529
- Epple, E., Apel, K., Bohlmann, H.** (1997a). Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**: 509-520
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H.** (1997b). ESTs reveal a multigene family for plant defensins in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* **400**: 168-172
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* **109**: 813-820
- Esen, A.** (1978). A simple method for quantitative, semiquantitative, and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.* **89**: 264-273
- Eyal, Y., Meller, Y., Lev-Yadun, S., Fluhr, R.** (1993). A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J.* **4**: 225-234
- Falkenstein, E., Groth, B., Mithöfer, A., Weiler, E.W.** (1991). Methyljasmonate and α -linolenic acid are potent inducers of tendril coiling. *Planta* **185**: 316-322

- Farmer, E.E., Johnson, R.R., Ryan, C.A.** (1992). Regulation of expression of proteinase inhibitor genes by methyl jasmonate and jasmonic acid. *Plant Physiol.* **98**: 995-1002
- Farmer, E.E., Ryan, C.A.** (1990). Interplant communication: Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7713-7716
- Farmer, E.E., Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid-derived signals in plants. *Trends Cell Biol.* **2**: 236-241
- Feldbrügge, M., Hahlbrock, K., Weisshaar, B.** (1996). The transcriptional regulator *CPRF1*: Expression analysis and gene structure. *Mol. Gen. Genet.* **251**: 619-627
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K., Weisshaar, B.** (1994). Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell* **6**: 1607-1621
- Feltkamp, D., Masterson, R., Starke, J., Rosahl, S.** (1994). Analysis of the involvement of ocs-like bZip-binding elements in the differential strength of the bidirectional *mas1'2'* promoter. *Plant Physiol.* **105**: 259-268
- Fey, B.J.F., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759
- Fiedler, U., Filistein, R., Wobus, U., Bäumlein, H.** (1993). A complex ensemble of *cis*-regulatory elements controls the expression of *Vicia faba* non-storage seed protein gene. *Plant Mol. Biol.* **22**: 669-679
- Foster, R., Izawa, T., Chua, N.-H.** (1994). Plant bZIP proteins gather at ACGT elements. *FASEB J.* **8**: 192-200
- Frick, S., Kutchan, T.M.** (1999). Molecular cloning and functional expression of *O*-methyltransferases common to isoquinoline alkaloid and phenylpropanoid biosynthesis. *Plant J.* **17**: 329-339
- Frisch, D.A., Harries-Haller, L.W., Yokubaitis N.T., Thomas, T.L., Hardin, S.H., Hall, T.C.** (1995). Complete sequence of the binary vector Bin 19. *Plant Mol. Biol.* **27**: 405-409
- Frischauf, A.M., Lehrbach, H., Poustka, A., Murray, N.** (1983). *Lambda* replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170**: 827-842
- Fu, H., Kim, S.Y., Park, W.D.** (1995a). High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron. *Plant Cell* **7**: 1387-1394
- Fu, H., Kim, S.Y., Park, W.D.** (1995b). A potato *Sus3* sucrose synthase gene contains a context-dependent 3' element and a leader intron with both positive and negative tissue-specific effects. *Plant Cell* **7**: 1395-1403
- Genschick, P., Durr, A., Fleck, J.** (1994). Differential expression of several E2-type ubiquitin carrier protein genes at different developmental stages in *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana glauca*. *Mol. Gen. Genet.* **244**: 548-556
- Gidekel, M., Jimenez, B., Herrera-Estrella, L.** (1996). The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 β contains an enhancer-like element. *Gene* **170**: 201-206
- Gilbert W.** (1987). The exon theory of genes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **52**: 901-905
- Gilbert, W.** (1978). Why genes in pieces? *Nature* **271**: 501
- Giuliano, G., Pichersky, E., Malik, V.S., Timko, M.P., Scolnick, P.A., Cashmore, A.R.** (1988). An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7089-7093
- Glazebrook, J.** (1999). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 280-286
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**: 973-982

- Glazebrook, J., Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8955-8959
- Go, M.** (1981). Correlation of DNA exonic regions with protein structural units in haemoglobin. *Nature* **291**: 90-93
- Goldberg, R.B., Hoschek, G., Tam, S.H., Ditta, G.S., Breidenbach, R.W.** (1981). Abundance, diversity, and regulation of mRNA sequence sets in soybean embryogenesis. *Develop. Biol.* **83**: 201-217
- Goodall, G.J., Filipowicz W.** (1989). The AU-rich sequences present in the introns of plant nuclear pre-mRNAs are required for splicing. *Cell* **58**: 473-483
- Goodall, G.J., Filipowicz W.** (1991). Different effects of intron nucleotide composition and secondary structure on pre-mRNA splicing in monocot and dicot plants. *EMBO J.* **10**: 2635-2644
- Graham, J.S., Hall, G., Pearce, G., Ryan, C.A.** (1986). Regulation of synthesis of proteinase inhibitors I and II mRNAs in leaves of wounded tomato plants. *Planta* **169**: 399-405
- Green, T.R., Ryan, C.A.** (1972). Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. *Science* **175**: 776-777
- Greener, A., Jerpseth, B.** (1993). Stratagene develops the highest-efficiency chemically competent cells available. *Strategies* **6**: 57
- Gruss, P., Lai, C.J., Dhar, R., Khoury, G.** (1979). Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4317-4321
- Guiltinan, M.J., Marcotte, W.R., Jr., Quatrano, R.S.** (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* **250**: 267-270
- Gundlach, H., Müller, M.J., Kutchan, T.M., Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 2389-2393
- Hamberg, M., Gardner, H.W.** (1992). Oxylin pathway to jasmonates: Biochemistry and biological significance. *Biochim. Biophys. Acta* **1165**: 1-18
- Hamer, D.H., Leder, P.** (1979). Splicing and the formation of stable RNA. *Cell* **18**: 1299-1302
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Harter, K., Kircher, S., Frohnmeyer, H., Krenz, M., Nagy, F., Schäfer, E.** (1994). Light-regulated modification and nuclear translocation of cytosolic G-box binding factors in parsley. *Plant Cell* **6**: 545-559
- Hawkins, J.D.** (1988). A survey on intron and exon lengths. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9893-9908
- Herrmann, G., Kramell, H.-M., Kramell, R., Weidhase, R.A., Sembdner, G.** (1987). Biological activity of jasmonic acid conjugates. In *Conjugated Plant Hormones: Structure, Metabolism and Function*, ed. K. Schreiber, H.-R. Schütte, G. Sembdner, pp. 315-322. Berlin: Deutscher Verlag der Wissenschaften
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., Schilperoort, R.A.** (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* **303**: 179-180
- Höfgen, R., Willmitzer, L.** (1988). Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res.* **16**: 9877
- Hong, J.C., Cheong, Y.H., Nagao, R.T., Bahk, J.D., Key, J.L., Cho, M.J.** (1995). Isolation of two soybean G-box binding factors which interact with a G-box sequence of an auxin-responsive gene. *Plant J.* **8**: 199-211
- Howe, G.A., Lightner, J., Browse, J., Ryan, C.A.** (1996). An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack. *Plant Cell* **8**: 2067-2077
- Hwang, I., Kohchi, T., Hauge, B.M., Goodman, H.M., Schmidt, R., Cnops, G., Dean, C., Gibson, S., Iba, K., Lemieux, B., Arondel, V., Danhoff, L., Somerville, C.** (1991). Identification and map position of YAC clones comprising one-third of the *Arabidopsis* genome. *Plant J.* **1**: 367-374

- Iyer, V., Struhl, K. (1995). Poly(dA:dT), a ubiquitous promoter element that stimulates transcription via its intrinsic DNA structure. *EMBO J.* **14**: 2570-2579
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N.-H. (1993). Plant bZip protein DNA binding specificity. *J. Mol. Biol.* **230**: 1131-1144
- Jaworski, E.G. (1972). Mode of action of N-Phosphonomethylglycin: Inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. *J. Agr. Food Chem.* **20**: 1195-1198
- Jefferson, R.A., Burgess, S.M., Hirsh, D. (1986). β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8447-8451
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. (1987a). GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker. *EMBO J.* **6**: 3901-3908
- Jefferson, R.A. (1987b). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* **5**: 387-405
- Jefferson, R.A., Wilson K.J. (1991). The GUS gene fusion system. In "Plant Molecular Biology Manual" (S.B. Gelvin, R.A. Schilperoort, and D.P.S. Verma, eds.), pp. B14/1-B14/33. Kluwer, Boston.
- Johnson, R., Narvaez, J., An, G., Ryan, C.A. (1989). Expression of proteinase inhibitor I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 9871-9875
- Kawagoe, Y., Murai, N. (1996). A novel basic region/helix-loop-helix protein binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein β -*phaseolin* gene. *Plant Science* **116**: 47-57
- Kawaoka, A., Kawamoto, T., Sekine, M., Yoshida, K., Takano, M., Shinmyo, A. (1994). A *cis*-acting element and a *trans*-acting factor involved in the wound-induced expression of a horseradish peroxidase gene. *Plant J.* **6**: 87-97
- Keil, M., Sánchez-Serrano, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1986). Primary structure of a proteinase inhibitor II gene from potato. *Nucleic Acids Res.* **14**: 5641-5650
- Khoury, G., Gruss, P., Dhar, R., Lai, C.J. (1979). Processing and expression of early SV40 mRNA: A role for RNA conformation in splicing. *Cell* **18**: 85-92
- Khyse-Anderson, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: A simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**: 203-209
- Kim, S.-R., Choi, J.-L., Costa, M.A., An, G. (1992). Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter. *Plant Physiol.* **99**: 627-631
- Kim, S.-R., Costa, M.A., An, G. (1991). Sugar response element enhances wound response of the potato proteinase inhibitor II promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **17**: 973-983
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **16**: 111-120
- Kircher, S., Ledger, S., Hayashi, H., Weisshaar, B., Schäfer, E., Frohnmeier, H. (1998). CPRF4a, a novel plant bZIP protein of the CPRF family: Comparative analysis of light-dependent expression, post-transcriptional regulation, nuclear import and heterodimerisation. *Mol. Gen. Genet.* **257**: 595-605
- Klein, B., Töpfer, R., Sohn, A., Schell, J., Steinbiß, H.-H. (1990). Promoterless reporter genes and their use in plant gene transformation. In H.J.J. Mijkamp, L.H.W. van der Plas, J. van Aatrijk, eds, *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 79-84
- Koda, Y., Kikuta, Y., Tazaki, H., Tsujino, Y., Sakamura, S., Yoshihara, T. (1991). Potato tuber-inducing activities of jasmonic acid and related compounds. *Phytochemistry* **30**: 1435-1438
- Koncz, C., Schell, J. (1986). The promoter of the T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric gene carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396
- Konieczny, S.F., Emerson, C.P. (1987). Complex regulation of the muscle-specific contractile protein (Troponin I) gene. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 3065-3075

- Kramell, R., Miersch, O., Hause, B., Ortel, B., Parthier, B., Wasternack, C.** (1997). Amino acid conjugates of jasmonic acid induce jasmonate-responsive gene expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *FEBS Lett.* **414**: 197-202
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lai, C.J., Khoury, G.** (1979). Deletion mutants of simian virus 40 defective in biosynthesis of late viral mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 71-75
- Laibach, F.** (1943). *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. *Bot. Archiv.* **44**: 439-455
- Lam, E., Benfey, P.N., Gilmartin, P.M., Fang, R.-X., Chua, N.-H.** (1989). Site-specific mutations alters *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7890-7894
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L.** (1988). The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA-binding proteins. *Science* **240**: 1759-1764
- Laudert, D., Weiler, E.M.** (1998). Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.* **15**: 675-684
- Lee, J.** (1997). Jasmonate-regulated genes of barley (*Hordeum vulgare* L.): Molecular cloning, characterisation and expression studies. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Lehmann, J., Atzorn, R., Brückner, C., Reinbothe, S., Leopold, J., Wasternack, C.** (1995). Accumulation of jasmonate, abscisic acid, specific transcripts and proteins in osmotically stressed barley leaf segments. *Planta* **197**: 156-162
- León, J., Rojo, E., Titarenko, E., Sánchez-Serrano, J.J.** (1998). Jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways are differentially regulated by Ca²⁺/calmodulin in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **258**: 412-419
- Liang, P., Pardee, A.B.** (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* **257**: 967-971
- Liu, H.-X., Filipowicz, W.** (1996). Mapping of branchpoint nucleotides in mutant pre-mRNAs expressed in plant cells. *Plant J.* **9**: 381-389
- Löbler, M., Lee, J.** (1998). Jasmonate signalling in barley. *Trends Plant Sci.* **3**: 8-9
- Löbler, M.** (1996). Erkennung und Weiterleitung des Jasmonatsignals in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) und *Arabidopsis thaliana* Heynh. Habilitationsschrift, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle
- Logsdon, J.M., Palmer, J.D., Stoltzfus, A., Cerff, R., Martin, W., Brinkmann, H.** (1994). Origin of introns - early or late? *Nature* **369**: 526-528
- Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C., Gilbert, W.** (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c1 precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7727-7731
- Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C., Gilbert, W.** (1998). Relationship between "proto-splice sites" and intron phases: Evidence from dicodon analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 219-223
- Lu, G., Paul, A.-L., McCarty, D., Ferl, R.J.** (1996). Transcription factor veracity: Is GBF3 responsible for ABA-regulated expression of *Arabidopsis Adh*? *Plant Cell* **8**: 847-857
- Maas, C., Laufs, J., Grant, S., Korfhage, C., Werr, W.** (1991). The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *Shrunken-1* gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold. *Plant Mol. Biol.* **16**: 199-207
- Mariani, C., de Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., Goldberg, R.B.** (1990). Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene. *Nature* **347**: 737-741
- Mascarenhas, D., Mettler, I.J., Pierce, D.A., Lowe, H.W.** (1990). Intron-mediated enhancement of heterologous gene expression in maize. *Plant Mol. Biol.* **15**: 913-920

- Mason, H.S., DeWald, D.B., Mullet, J.E.** (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean *vspB* promoter. *Plant Cell* **5**: 241-251
- McConn, M., Browse, J.** (1996). The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an *Arabidopsis* mutant. *Plant Cell* **8**: 403-416
- McConn, M., Creelman, R.A., Bell, E., Mullet, J.E., Browse, J.** (1997). Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 5473-5477
- McCullough, A.J., Schuler, M.A.** (1997). Intronic and exonic sequences modulate 5' splice site selection in plant nuclei. *Nucleic Acids Res.* **25**: 1071-1077
- McDowell, J.M., Dangl, J.L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**: 79-82
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., Wu, R.** (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell* **2**: 163-171
- McKendree, W.L., Ferl, R.J.** (1992). Functional elements of the *Arabidopsis Adh* promoter include the G-box. *Plant Mol. Biol.* **19**: 859-862
- Melan, M.A., Dong, X., Endara, M.E., Davis, K.R., Ausubel, F., Peterman, T.K.** (1993). An *Arabidopsis thaliana* lipoxygenase gene can be induced by pathogens, abscisic acid, and methyl jasmonate. *Plant Physiol.* **101**: 441-450
- Menkens, A.E., Schindler, U., Cashmore, A.R.** (1995). The G-box: A ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem. Sci.* **20**: 506-510
- Menkens, A.E., Cashmore, A.R.** (1994). Isolation and characterization of a fourth *Arabidopsis thaliana* G-box-binding factor, which has similarities to Fos oncoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2522-2526
- Merkouropoulos, G., Barnett, D.C., Shirsat, A.H.** (1999). The *Arabidopsis* extensin gene is developmentally regulated, is induced by wounding, methyl jasmonate, abscisic acid and salicylic acid, and codes for a protein with unusual motifs. *Planta* **208**: 212-219
- Meyer, A., Miersch, O., Büttner, C., Dathe, W., Sembdner, G.** (1984). Occurrence of the plant growth regulator jasmonic acid in plants. *J. Plant Growth Regul.* **3**: 1-8
- Miersch, O., Bohlmann, H., Wasternack, C.** (1999). Jasmonates and related compounds from *Fusarium oxysporum*. *Phytochemistry* **50**: 517-523
- Moyen, C., Hammond-Kosack, K.E., Jones, J., Knight, M.R., Johannes, E.** (1998). Systemin triggers an increase of cytoplasmic calcium in tomato mesophyll cells: Ca²⁺ mobilization from intra- and extracellular compartments. *Plant Cell Environ.* **21**: 1101-1112
- Mueller, M.J., Brodschelm, W., Spannagl, E., Zenk, M.H.** (1993). Signaling in the elicitation process is mediated through the octadecanoid pathway leading to jasmonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7490-7494
- Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J., Ryan, C.A.** (1999). Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharides elicitors in tomato leaves. *Plant Cell* **11**: 2249-2260
- Norman-Setterblad, C., Vidal, S., Palva, E.T.** (2000). Interacting signal pathways control defense gene expression in *Arabidopsis* in response to cell wall-degrading enzymes from *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 430-438
- Norman, C., Vidal, S., Palva, E.T.** (1999). Oligogalacturonides-mediated induction of a gene involved in jasmonic acid synthesis in response to the cell wall-degrading enzymes of the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 640-644
- Norrander, J., Kempe, T., Messing J.** (1983). Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* **26**: 101-106
- Norris, S.R., Meyer, S.E., Callis, J.** (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Mol. Biol.* **21**: 895-906

- Nürnberg, T.** (1999). Signal perception in plant defense. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**: 167-182
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., Bowles, D.J.** (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science* **274**: 1914-1917
- Oeda, K., Salinas, J., Chua, N.-H.** (1991). A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes. *EMBO J.* **10**: 1793-1802
- Pasquali, G., Erven, A.S.W., Ouwerkerk, P.B.F., Menke, F.L.H., Memelink, J.** (1999). The promoter of the strictosidine synthase gene from periwinkle confers elicitor-inducible expression in transgenic tobacco and binds nuclear factors GT-1 and GBF. *Plant Mol. Biol.* **39**: 1299-1310
- Patthy, L.** (1985). Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. *Cell* **41**: 657-663
- Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C.A.** (1991). A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* **253**: 895-898
- Pelacho, A.M., Mingo-Castel, A.M.** (1991). Jasmonic acid induces tuberization of potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **97**: 1253-1255
- Peña-Cortés, H., Liu, X., Sánchez-Serrano, J., Schmid, R., Willmitzer, L.** (1992). Factors affecting gene expression of patatin and proteinase-inhibitor-II gene families in detached potato leaves: Implications for their co-expression in developing tubers. *Planta* **186**: 495-502
- Peña-Cortés, H., Fisahn, J., Willmitzer, L.** (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 4106-4113
- Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J., Rocha-Sosa, M., Willmitzer, L.** (1988). Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. *Planta* **174**: 84-98
- Peña-Cortés, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., Willmitzer, L.** (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**: 123-128
- Peña-Cortés, H., Sánchez-Serrano, J.J., Mertens, R., Willmitzer, L.** (1989). Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9851-9855
- Peña-Cortés, H., Willmitzer, L., Sánchez-Serrano, J.** (1991). Abscisic acid mediates wound induction but not developmental-specific expression of the proteinase inhibitor II gene family. *Plant Cell* **3**: 963-972
- Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Métraux, J.-P., 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**: 2103-2113
- Penninckx, I.A.M.A., Eggermont, K., Terras, F.R.G., Thomma, B.P.H.J., de Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, J.-P., Manners, J.M., 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
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A., van Loon, L.C.** (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237
- Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-1580
- Pieterse, C.M.J., van Loon, L.C.** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci.* **4**: 52-58
- Prescott, A.** (1993). A dilemma of dioxygenases (or where biochemistry and molecular biology fail to meet). *J. Exp. Bot.* **44**: 849-861
- Reymond, P., Farmer, E.E.** (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**: 404-411

- Rogers, H.J., Burns, N.A., Parkes, H.C.** (1996). Comparison of small-scale methods for the rapid extraction of plant DNA suitable for PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **14**: 170-183
- Rogers, J.** (1990). The role of introns in evolution. *FEBS Lett.* **268**: 339-343
- Rojo, E., Titarenko, E., León, J., Berger, S., Vancanneyt, G., Sánchez-Serrano, J.J.** (1998). Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent and -independent wound signal transduction pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **13**: 153-165
- Rojo, E., León, J., Sánchez-Serrano, J.J.** (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **20**: 135-142
- Rossi, P., de Crombrughe, B.** (1987). Identification of a cell-specific transcriptional enhancer in the first intron of the mouse α_2 (type I) collagen gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5590-5594
- Royo, J., León, J., Vancanneyt, G., Albar, J.P., Rosahl, S., Ortego, F., Castañera, P., Sánchez-Serrano, J.** (1999). Antisense-mediated depletion of a potato lipoxygenase reduces wound induction of proteinase inhibitors and increases weight gain of insect pests. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1146-1151
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., Hunt, M.D.** (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Ryan, C.A.** (1992). The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Mol. Biol.* **19**: 123-133
- Ryan, C.A.** (1990). Proteinase inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopath.* **28**: 425-449
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor; NY: Cold Spring Harbor Press)
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Saniewski, M., Nowacki, J., Czapski, J.** (1987). The effect of methyl jasmonate on ethylene production and ethylene-forming enzyme activity in tomatoes. *J. Plant Physiol.* **129**: 175-180
- Scheer, J.M., Ryan, C.A.** (1999). A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* **11**: 1525-1535
- Schindler, U., Menkens, A.E., Beckmann, H., Ecker, J.R., Cashmore A.R.** (1992a). Heterodimerization between light-regulated and ubiquitously expressed *Arabidopsis* GBF bZIP proteins. *EMBO J.* **11**: 1261-1273
- Schindler, U., Terzaghi, W., Beckmann, H., Kadesch, T., Cashmore A.E.** (1992b). DNA binding site preferences and transcriptional activation properties of the *Arabidopsis* transcription factor GBF1. *EMBO J.* **11**: 1275-1289
- Schindler, U., Beckmann, H., Cashmore, A.R.** (1992c). TGA1 and G-Box binding factors: Two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-Box-like element TGACGTGG. *Plant Cell* **4**: 1309-1319
- Schulze-Lefert, P., Becker-André, M., Schulz, W., Hahlbrock, K., Dangl, J.L.** (1989a). Functional architecture of light-responsive chalcone synthase promoter from parsley. *Plant Cell* **1**: 707-714
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J.L., Becker-André, M., Hahlbrock, K., Schulz, W.** (1989b). Inducible *in vivo* DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene. *EMBO J.* **8**: 651-656
- Sembdner, G., Klose, C.** (1985). (-)-Jasmonsäure - ein neues Phytohormon? *Biol. Rdsch.* **23**: 29-40
- Sembdner, G., Parthier, B.** (1993). The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44**: 569-598
- Senecoff, J.F., Meagher, R.B.** (1993). Isolating the *Arabidopsis thaliana* genes for *de novo* purine synthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. I. 5'-Phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthase. *Plant Physiol.* **102**: 387-399

- Shah, J., Kachroo, P., Klessig, D.F.** (1999). The *Arabidopsis ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**: 191-206
- Shen, Q., Ho, T.-H.D.** (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell* **7**: 295-307
- Shirley, B.W., Hanley, S., Goodman, H.M.** (1992). Effects of ionizing radiation on a plant genome: Analysis of two *Arabidopsis* transparent testa mutation. *Plant Cell* **4**: 333-347
- Shuttleworth, W.A., Pohl, M.E., Helms, G.L., Jakeman, D.L., Evans, J.N.S.** (1999). Site-directed mutagenesis of putative active site residues of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Biochemistry* **38**: 296-302
- Sieburth, L.E., Meyerowitz E.M.** (1997). Molecular dissection of the *AGAMOUS* control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**: 355-365
- Simpson, G.G., Filipowicz, W.** (1996). Splicing of precursors to mRNA in higher plants: Mechanism, regulation and sub-nuclear organisation of the spliceosomal machinery. *Plant Mol. Biol.* **32**: 1-41
- Simpson, C.G., Clark, G., Davidson, D., Smith, P., Brown, J.W.S.** (1996). Mutation of putative branchpoint consensus sequences in plant introns reduces splicing efficiency. *Plant J.* **9**: 369-380
- Sinibaldi, R.M., Mettler, I.J.** (1992). Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **42**: 229-257
- Skowrya, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W.** (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209-219
- Smith, C.W.J., Patton, J.G., Nadal-Ginard, B.** (1989). Alternative splicing in the control of gene expression. *Annu. Rev. Genet.* **23**: 527-577
- Speulman, E., Bouchez, D., Holub, E.B., Beynon, J.L.** (1998). Disease resistance gene homologs correlate with disease resistance loci of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **14**: 467-474
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., Lehman, C.C.** (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Phytophthora irregularis*. *Plant J.* **15**: 747-754
- Staswick, P.E., Su, W., Howell, S.H.** (1992). Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6837-6840
- Steinbrücken, H.C., Amrhein, N.** (1980). The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-Enolpyruvyl-shikimate acid-3-phosphate synthase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**: 1207-1212
- Stomp, A.-M.** (1992). Histochemical localization of β -Glucuronidase. In *GUS Protocols: Using the GUS gene as a reporter of expression*, ed. Gallagher, S.R., pp. 103-113. Academic Press, Inc. San Diego
- Stratmann, J.W., Ryan, C.A.** (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11085-11089
- Struhl, K.** (1985). Naturally occurring poly(dA-dT) sequences are upstream promoter elements for constitutive transcription in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 8419-8423
- Südhof, T.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Russell, D.W.** (1985). The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. *Science* **228**: 815-822
- Terzaghi, W.B., Bertekap, R.L., Jr., Cashmore, A.R.** (1997). Intracellular localization of GBF proteins and blue light-induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured *Arabidopsis* and soybean cells. *Plant J.* **11**: 967-982
- Thomas, M., Davis, R.W.** (1975). Studies on the cleavage of bacteriophage lambda DNA with *EcoRI* restriction endonuclease. *J. Mol. Biol.* **91**: 315-328
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M.-J., Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **121**: 1093-1101

- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 15107-15111
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680
- Thornburg, R.W., An, G., Cleveland, T.E., Johnson, R., Ryan, C.** (1987). Wound-inducible expression of a potato inhibitor II-chloramphenicol acetyltransferase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 744-748
- Titarenko, E., Rojo, E., León, J., Sánchez-Serrano, J.J.** (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **115**: 817-826
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol.* **98**: 1304-1309
- Ueda, J., Kato, J.** (1980). Isolation and identification of a senescence-promoting substance from wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.* **66**: 246-249
- Uknes, S., Winter, A., Delaney, T., Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Potter, S., Ward, E., Ryals, J.** (1993). Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 692-698
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 645-656
- van Wees, S.C.M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J.** (1999). *Rhizobacteria*-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol. Biol.* **41**: 537-549
- Vasil, V., Clancy, M., Ferl, R.J., Vasil, I.K., Hannah, L.C.** (1989). Increased gene expression by the first intron of maize *Shrunken-1* locus in grass species. *Plant Physiol.* **91**: 1575-1579
- Vick, B.A., Zimmerman, D.C.** (1984) Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiol.* **75**: 458-461
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K., Bohlmann, H.** (1998). Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* **14**: 285-295
- Vijayan, P., Shockey, J., Lévesque, C.A., Cook, R.J., Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 7209-7214
- Vogel, J.P., Woeste, K.E., Theologis, A., Kieber, J.J.** (1998). Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis* confers cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4766-4771
- Vogel, J., Somerville, S.** (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 1897-1902
- Vogelstein, B., Gillespie, D.** (1979). Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 615-619
- Wallace, R.B., Johnson, M.J., Hirose, T., Mivake, T., Kawashima, E.H., Itakura, K.** (1981). The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II. Hybridization of oligonucleotides of mixed sequences to rabbit β -globin DNA. *Nucleic Acids Res.* **9**: 879-894
- Weidhase, R.A., Lehmann, J., Kramell, R., Sembdner, G., Parthier, B.** (1987b). Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and chlorophyll in senescing barley leaf segments triggered by jasmonic acid methylester, and counteraction by cytokinin. *Physiol. Plant.* **69**: 161-166

- Weidhase, R.A., Kramell, H.-M., Lehmann, J., Liebisch, H.-W., Lerbs, W., Parthier, B.** (1987a). Methyljasmonate-induced changes in the polypeptide pattern of senescing barley leaf segments. *Plant Sci.* **51**: 177-186
- Weiler, E.W., Albrecht, T., Groth, B., Xia, Z.-Q., Luxem, M., Liß, H., Andert, L., Spengler, P.** (1993). Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of *Bryonia dioica*. *Phytochemistry* **32**: 591-600
- Weiler, E.W., Kutchan, T.M., Gorba, T., Brodschelm, W., Niesel, U., Bublitz, F.** (1994). The *Pseudomonas* phytotoxin coronatine mimics octadecanoid signalling molecules of higher plants. *FEBS Lett.* **345**: 9-13
- Weisshaar, B., Armstrong, G.A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K.** (1991). Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* **10**: 1777-1786
- Weymann, K., Hunt, M., Uknes, S., Neuenschwander, U., Lawton, K., Steiner, H.-Y., Ryals, J.** (1995). Suppression and restoration of lesion formation in *Arabidopsis lsd* mutants. *Plant Cell* **7**: 2013-2022
- Williams, M.E., Foster, R., Chua, N.-H.** (1992). Sequences flanking the hexameric G-Box core CACGTG affect the specificity of protein binding. *Plant Cell* **4**: 485-496
- Xiang, C., Miao, Z.-H., Lam, E.** (1996). Coordinated activation of *as-1*-type elements and a tobacco glutathion S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.* **32**: 415-426
- Xie, D.-X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J.G.** (1998). COI1: An *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094
- Yamane, H., Takagi, H., Abe, H., Yokota, T., Takahashi, N.** (1981). Identification of jasmonic acid in three species of higher plants and its biological activities. *Plant Cell Physiol.* **22**: 689-697
- Yamane, H., Sugawara, J., Suzuki, Y., Shimamura, E., Takahashi, N.** (1980). Synthesis of jasmonic acid related compounds and their structure-activity relationship on the growth of rice seedlings. *Agric. Biol. Chem.* **44**: 2857-2864
- Ye, G.-N., Stone, D., Pang, S.-Z., Creely, W., Gonzalez, K., Hinchee, M.** (1999). *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *Plant J.* **19**: 249-257

7 Anhang

7.1 Der genomische *Atjrg21*-Klon pG21-5/2

Unten dargestellt ist die vollständige Sequenz des genomischen *Atjrg21*-Klons pG21-5/2 mit korrespondierender Peptidsequenz unter Angabe wichtiger Schnittstellen von Restriktionsendonukleasen, der Exon/Intron-Grenzen und markanter Sequenzmotive.

```

          SalI
          |
TCGAGATTTAACGTCGACCTCATCTAGATGCTTTTATTTTCTGTGGTTATAAATTGAT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGCTCTAAATTGCAGCTGGAGTAGATCTACGAAAAATAAAAAGACACCAATATTTAACTA

AGGGTTTTTAAGTATCTATCCATTAGATCTCCCCGTTTGTGCGTTTATATATATACATTGTT
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCCCAAAATTCATAGATAGGTAATCTAGAGGGGCAAACAGCAAATATATATATGTAACAA

ATTCAAAACATTGCGTTTGTGTTTTCTTATTTAAACTTTATGTTTAGGCTATATATGCAT
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAGTTTTGTAAACGCAACACAAAAGAATAATTTGAAATACAATCCGATATATACGTA

ATTAATGCACACTAATTGAATTGATTAGTATATAGTATATATTTTCTTGAAAATTATAAA
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAATTACGTGTGATTAACCTTAACCTAATCATATATCATATATAAAAAGAACTTTTAAATTT

CTCAGTAATCTGGGTTGAATTAGTATTTAGCAAACAATGTATATATACATTTTTCAGGCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GAGTCATTAGACCAACTTAATCATAAATCGTTTGTTCATATATATGTAAAAACGTCGG

ATTTTAACAAATAAATCCTAGAGTTGGACTTATTTACAACCAATGCCATTAGCATTAAAT
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAAATTGTTTATTTAGGATCTCAACCTGAATAAATGTTGGGTTACGGTAATCGTAATTA

TGTTTTCCAAAATAAATTAATTTTACTTTAAATACTTAATTTAAATTTGCAATCACATTAT
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAAAGGTTTTTATTAATTTAAATGAAATTTATGAATTAATTTAACAGTTAGTGAATA

CAATCAACAAACAAACTTCACATTAATCCCTTAAAATTAGCATAAACGTATTTGTTAACA
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
GTTAGTTGTTTGTGTTGAAGTGAATTAGGGAATTTTAATCGTATTTGCATAAACAAATTGT

ATATTTTAAAACAAAATTTTTTGTGTTAAATAAATAATTATTCTTACTAAACGTTTTTTGTT
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TATAAAATTTTGTGTTTAAAAAACAAATTTATTTATAATAAGAAATGATTTGCAAAAAACAA
19 bp directed repeats

TAAATAAATAAATTCTGTATTTGAACCTTATTTACAATGTCATGCTATTGACATTAATTAT
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTTATTTATTTAAGACATAAACTTGAATAAATGTTACAGTACGATAACTGTAATTAATA

TTAGAAAATAAAAATATTTAATTAACGATTTAAATCTTCTAAATCTTTGCTTTTAGAGTTA
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATCTTTATTTTATAAATTAATGCTAAATTTAGAAGATTTAGAAACGAAAATCTCAAT

TTATGTCATTACCTAAAAGGCAAAAAATATATATTTTTTTTAAATATTATTATTTATATAT
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATACAGTAATGGATTTTCCGTTTTTATATATAAAAAATTTATAATAATAAATATATA

TTAAACTTTATAAACATTATTAATATTTAAACTTATAAAAAGTTTAATATATCAAAAAA
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATTTGAAATATTTTGTAAATAATATAAATTTGAATATTTTCAAATTATATAGTTTTTTT

TTAACATCATTATATAATATATAGTTTTAAAAAATCTCAAAAAAATTCGGTCATATTTT
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAATTGTAGTAATATATATATATCAAAATTTTTTAGAGTTTTTTTTTAAGGCAGTATAAAA

GTGATTCAAAATTTTAAAAATGAACATATATTAACCAATTGGCCAAAAATGTGTGGGTTTC
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACTAAGTTTAAAAATTTTACTTGTATATAAATGGTTAACCGGTTTTTACACACCCAAG

AACATCCCGCATCGACTAAAATATTTAGACAATGATTCATAAATAAGATCAACATTAATA
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTGTAGGGCGTAGCTGATTTTATAAATCTGTTACTAAGTATTTTCTAGTTGTAATTAT

AAATAAATAGTTTTTTTTTGCAGGATGGGTTTTGCGGGACGAGTTTGGCAGGACGTTACTT
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTTATTTATCAAAAAAACGTCCTACCCAAAACGCCCTGCTCAAACCGTCTGCAATGAA

```

```

AATAACAATTGTAAACTATAAAAATAAAAATATTTTATAGATAGATACAATTTACAAATTT
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
TTATTGTTAACATTTGATATTTTATTTTATAAAAATATCTATCTATGTTAAATGTTTAAA

TTATATACTAACTTTAAAAATAAATTTGCCGGGTGTACCGGGTTAAAATCTAGTT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
AATATATATGATTGAAATTTTTTATTTAACAGGCCACATGGCGCCCAATTTTAGATCAA

GTTTTCATTTTATGAGCCAATATTTTCATTAATATATAGTCATGTAAAAACAGACAAT
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
CAAAAGTAAAATACTCGGTTATAAAAAGTAATTATATATCAGTACATTTTTTGTCTGTTA

TTTTTTATTTATTTTTTTGGCATGGATGAGATTTGATCTCTGGCTATATCAAGTAAGATG
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
AAAAATAAATAAAAAACCCTACTCTAACTAGAGACCGATATAGTTCATTCTAC

ATTTTTCAACTGTTGTAAAAACGTGTACCCTACAAATGTTAATTTTCGCATATATTTTT
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
TAAAAAGTTGACAAACATTTTGCACATGGTGATGTTTAAACAATTAAGCGTATAATAAAA

                                SphI
                                |
ATAAGTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCCTATGCATGCCCTCTGTAGCTTTCTCTTCTC
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
TATTCATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATACGTACGGGAGACATCGAAAGAGAAGAG

                                ↓
TATTTATATGACTTGCTCATTACTCCTAGACTCATCCTCAACCTCCCGTCTCCCCCTTC
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
ATAAATATACTGAACGAGTAATGAGGATCTGAGTAGGAGTTGGAGGGCAGGAGGGGAAG

                                MaeIII                                XmnI
                                |                                |
ATCTCTTAGAGCCTTTTAAAAAGTAACCAACGCCATGAATATCTTCCAAGACTGGCCTGAG
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
TAGAGAATCTCGGAAATTTTCATTGGTTGCGGTACTTATAGAAGGTTCTGACCGGACTC

                                M N I F Q D W P E -
CCTATAGTCCGTGTCCAATCCTTATCTGAAAGCAACCTCGGAGCCATACCAAATCGCTAC
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1560
GGATATCAGGCACAGGTTAGGAATAGACTTTCGTTGGAGCCTCGGTATGGTTTAGCGATG

P I V R V Q S L S E S N L G A I P N R Y -
GTCAAGCCTCTATCTCAGCGTCCAAACATAACCCTCACAACAAACACAACCCCTCAGACC
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1620
CAGTTCGGAGATAGAGTTCGACGTTTGTATTGGGGAGTGTGTTGTGTGTTGGGAGTCTGG

V K P L S Q R P N I T P H N K H N P Q T -
ACCACCATCCCCATATTGACTTAGGTCGCCTATACACGGACGACCTAACTCTACAAGCC
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1680
TGGTGGTAGGGGTAGTAATCCAGCGGATATGTGCCTGCCTGGATGAGATGTTCCG

T T I P I I D L G R L Y T D D L T L Q A -
AAAACGCTTGATGAAATCTCAAAGGCTTGTAGAGAATTGGGATTTTTCCAAGTGGTGAAC
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1740
TTTTCGAACTACTTTAGAGTTTCCGAACATCTCTTAACCTAAAAAGGTTCCACCACTTG

K T L D E I S K A C R E L G F F Q V V N -

                                EcoRI
                                |
CACGGGATGAGTCTCAGCTCATGGACCAAGCTAAAGCAACATGGAGAGAATTTCTTTAAT
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1800
GTGCCCTACTCAGGAGTCGAGTACCTGGTTCGATTTGTTGTACCTCTCTTAAGAAATTA

H G M S P Q L M D Q A K A T W R E F F N -

CTCCCCATGGAACATAAAAATATGCATGCTAATTCGCCGAAAACCTTACGAGGGATATGGA
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1860
GAGGGGTACCTTGAGTTTTTATACGTACGATTAAGCGGCTTTTGAATGCTCCCTATACCT

L P M E L K N M H A N S P K T Y E G Y G -

```

poly(dA)-Bereich

putative TATA-Box,
Transkriptionsstart(↓)

1445-Beginn cDNA/C21-1
1474-Translationsstart

```

AGCCGACTAGCGCTAGAAAAGGGTGCTATTCTTGATTGGAGCGACTACTATTATCTCCAT
1861 -----+-----+-----+-----+-----+ 1920
TCGGCTGATCCGATCTTTTCCACGATAAGAACCTAACCTCGTGATGATAATAGAGGTA

  S R L G V E K G A I L D W S D Y Y Y L H -

TACCAGCCTTCGTCTTTGAAGGATTACACCAAGTGGCCTTCCTTGCCCTTTCATTGCCGg
1921 -----+-----+-----+-----+-----+ 1980
ATGGTCGGAAGCAGAACTTCCTAATGTGGTTCACCGGAAGGAACGGAGAAGTAACGGCc

  Y Q P S S L K D Y T K W P S L P L H C R -

tatgtttaatttcaaaatttcttcttccttaattagttatgatacctaaaaggctccact
1981 -----+-----+-----+-----+-----+ 2040
atacaaataaagttttaaagaagaaggaattaatcaatactatggattttccgaggtga

                HindIII
                |
ttttaaaaaattaaacttgtctaaagcttacttatgcaccctcaggattgattcgtatgagt
2041 -----+-----+-----+-----+-----+ 2100
aaaatttttaatttgaacagattcgaatgaatacgtgggagtcctaactaagcatactca

gtaaattaatatcggttcataaaaaaaaaaatgagattcttaaaaaataattttattcac
2101 -----+-----+-----+-----+-----+ 2160
catttaattatagccaagtatTTTTTTTTTactcctaagaatttttatataaataagtg

tgttatgtaaaataatcatcgtagaaaaacaaaccgactcttattagaagattataa
2161 -----+-----+-----+-----+-----+ 2220
acaatacattttattagtagcatcttttggctgcatgaaataatcttctaatatt

ttcataaagcaagatacatattatagttgtcaatcgagcttatattttaagttttcaa
2221 -----+-----+-----+-----+-----+ 2280
aagtatttcgttctatgtataatatcaacagttagctcgaatataaaatttcaaaagttt

ttaatcataagacagcaaaagtcgaatattttaataaattttcacgttattgaattatt
2281 -----+-----+-----+-----+-----+ 2340
aattagtatctctgctgcttttcagcttataaaattactttaaaagtgcaataacttaataa

agAGAAATATTGGAGGATTATTGCAAGGAAATGGTGAAACTATGCGAGAACTTGATGAAA
2341 -----+-----+-----+-----+-----+ 2400
tcTCTTTATAACCTCCTAATAACGTTTCCCTTTACCACTTTGATACGCTCTTGAACACTTT

  E I L E D Y C K E M V K L C E N L M K -

ATCTTATCCAAAACTTTGGGATTACAAGAAGACAGACTTCAAAATGCATTTGGTGGTAAA
2401 -----+-----+-----+-----+-----+ 2460
TAGAATAGGTTTTTGAACCTAATGTTCTTCTGTCTGAAGTTTTACGTAAACCACCATTT

  I L S K N L G L Q E D R L Q N A F G G K -

GAGGAATCAGGTGGATGTTTAAAGGGTTAATTATTACCCAAAATGCCCTCAACCGAGCTG
2461 -----+-----+-----+-----+-----+ 2520
CTCCTTAGTCCACCTACAAATTCCTAATAATGGGTTTTACGGGAGTTGGCCTCGAC

  E E S G G C L R V N Y Y P K C P Q P E L -

ACTCTCGGTATCTCTCCGCACTCTGATCCCGGCGGTTTGACCATTCTCTTGCCGGACGAA
2521 -----+-----+-----+-----+-----+ 2580
TGAGAGCCATAGAGAGGCGTGAGACTAGGGCCGCAAACTGGTAAGAGAACGGCCTGCTT

  T L G I S P H S D P G G L T I L L P D E -

                BamHI
                |
CAAGTCGCCAGTCTTCAGGTCCGTGGATCCGACGACGCTTGGATCACAGTCGAACCAGCT
2581 -----+-----+-----+-----+-----+ 2640
GTTTCAGCGGTGAGAGTCCAGGCACCTAGGCTGCTGCGAACCTAGTGTCTGCTGCTGCTG

  Q V A S L Q V R G S D D A W I T V E P A -

CCTCATGCTTTCATCGTTAACATGGGTGACCAAAATTCAGgtgactgttttattttccata
2641 -----+-----+-----+-----+-----+ 2700
GGAGTACGAAAGTAGCAATTGTACCCACTGGTTTAAAGTCcactgacaaaataaaaggtat

  P H A F I V N M G D Q I Q

taccaattacttttttatatatataaaaacttcaaaactttaactaaacttcagacgaaa
2701 -----+-----+-----+-----+-----+ 2760
atggttaatgaaaaaatatatatattttgaagttttgaaatttgatttgaagctctgcttt

```

1979-Beginn 1. Intron

2342-Ende 1. Intron

2680-Beginn 2. Intron

```

aagtcggacacttttgttgtttgtttaaacttctttcattacctaaccataattgaaatc
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2820
ttcagcctgtgaaaaacaacaacaatttgaagaaagtaatggattggtattaacttttag

gaactcccatatataatgataactcctagattggtttttccattattgactaaaaaatcaat
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2880
cttgaggggtatataactattgaggatctaaccaaaaagtaataactgatTTTTTatagtta

gataagcaaaagaaagtaaatatCACGTGgaggggacttgattttgatcttctttttttc
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 2940
ctattcgttttctttcatttataGTGCACctcccctgaaactaaaactagaagaaaaaaag

                                SphI
                                |
attgaagtgttaattttgataaacCACGTGcatgcatcttcttcttcttcttcttctt
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3000
taacttcaacaattaaaactatttgGTGCACgtacgtagaagaagaagaagaagaagaa

tttcttgttcatttttaataaagttaatgcgtaattggaagaaacataaagttgatag
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3060
aaagaacaagtaaaaaatttcaattacgcattaacctttcttttgtatttcaactatc

gaaaccaataatgtatcgggtgaagccacgtcgtgatattcatttccgttctttaaattcga
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3120
ctttgggtattacatagccacttccgggtgcagcactataagtaaaggcaagaaattaagct

catgtgcctgtattaaaggaaaaagaaagggtccaacaaggaacagaaaaaaacaattc
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3180
gtacacggacataaatttcttttcttttccaggtgtttccttcttctttttgttaag

aacgactaagacgctctcacaactattaacatgtttcgaacgtgctaaaaatcaaatttgc
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3240
ttgctgatctcgcgagagtgttgataattgtacaaagcttgcaagattttagtttaaacg

agacttagtcaaactagactaattttcttcttcttcttcttcttcttcttcttcttctt
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3300
tctgaatcagtttgatctgattaaaagaagaagaagaagcaaaactataaaaaacgtgca

ctatgattacattctttgctttgttaaatcaaacagtttaataataaggactatcagagtt
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3360
gataactaatgtaagaaacgaaacaatttagtttgcataattatattcctgatagtctcaa

ttatataaagataaaaccgtataacttaacttaagttgttcaaaacttgataaaaaagaat
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3420
aaataattttctatttggcatattgattgaattaccaacaagtttgaactattttctta

taatgatttcataatattcagggttcttttttcaatatctcactatattttggactgata
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3480
attactaaagtataataaagtccaagaaaaagttatagagtgatataaaacctgactat

gaatatttaatgaacgttgaacattttgtttttggctagATGCTGAGCAATTC AATATAC
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3540
cttataaattacttgcaacttgtaaaacaaaaaccgatcTACGACTCGTTAAGTTATATG

                                M L S N S I Y -
AAAAGCGTAGAACACAGAGTGATCGTGAACCCTGAAAAATGAGAGGTTGTCATTGGCATT
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3600
TTTTCGCATCTTGTGTCTCACTAGCACTTGGGACTTTTACTCTCCAACAGTAACCGTAAA

K S V E H R V I V N P E N E R L S L A F -
TTCTACAACCCAAAGGGCAATGTTCTATCGAGCCATTGAAGGAGCTAGTGACCGTAGAT
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3660
AAGATGTTGGGTTTCCCGTTACAAGGATAGCTCGGTAACCTCCTCGATCACTGGCATCTA

F Y N P K G N V P I E P L K E L V T V D -

                                SplI
                                |
TCACCTGCTCTCTACTCCTCCACCACATACGATCGTTACCGTCAATTCATTCGTACGCAA
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3720
AGTGGACGAGAGATGAGGAGGTGGTGTATGCTAGCAATGGCAGTTAAGTAAGCATGCGTT

S P A L Y S S T T Y D R Y R Q F I R T Q -
GGCCCAGTAGCAAATGTCATATTGACGAACCTTAAATCCCTCGATAGTGCGTACATTTG
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 3780
CCGGGTGCATCGTTTACAGTATAACTGCTTGAATTTAGGGGAGCTATCACGCATGTAAC

G P R S K C H I D E L K S P R *

```

2907-G-Box1

2969-G-Box2

3478-put. „branchpoint“

3519-Ende 2. Intron

3766-Stopcodon

```

3781  ATTTGTTAATAGTGAACATGCGTTCTTGTGTATAAAATAATGAACAATGCTTCTTTTAA 3840
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAACAATATCACTTGTATACGCAAGAACAACATATTTATTACTTGTACGAAGAAAAAT

3841  TCTGTTATAAGTACTGTAATATTTATTGTGTTTGTATGTGAGCATGTTTATATTTATGTT 3900
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACAATATTCATGACATTATAAATAACACAAAACAATACACTCGTACAAATATAATACAA

3901  TTAGGATATGGGTTTGTATGCGTTTCTTTTCTTTTAAATGTTTACATGTTCAAGTCTTGTGTG 3960
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATCCTATACCCAAACTACGCAAAAAAGAAAAATTACAAATGTACAAGTTCAGAACACAC

3961  TTTTGATTAAACTAATATATATATATATATATATATTTTTTTTCAAATATTACTGATGTTTAA 4020
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AAAATAATTTTGATTATATATATATATATATAAAAAAAGTTTTATAATGACTACAAAAT

4021  TGTTTATGGCAAATTTTGTGGATTTGCTGCTTTTCTCTATAGAGAATTAGCTAATATG 4080
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ACAAATACCGTTTAAACAACCTTAAACGACAGAAAAGATATCTCTTAATCGATTATAC

EcoRI                               HindIII
|                                   |
4081  TAAAGAATTTCTCTGTTTTTGGCTGGTGCATCTCTTGTAGTCAGAAGCTTTAATTTGGTTA 4140
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTTCTTAAGAGACAAAAACCGACCACGTAGAGAACATCAGTCTTCGAAATTAACCAAT

4141  AAGGTCTTGAATCTATAAAGAGCTTTTGGGAAATGAGTTATCTTTCCAAGTGACTTTGAT 4200
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTCCAGAACTTAGATATTTCTCGAAAACCCCTTACTCAATAGAAAGGTTCACTGAAACTA

4201  TACTCTCATTCTTTTCAATGGTTAGTATCTACGAAATATTTTATAAATTAATATGTGGT 4260
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATGAGAGTAAGAAAAGTTAACCAATCATAGATGCTTTAATAATATTAATTTATACACCA

4261  TTATATAAAATTTATGTACTCAGCGTTGAATGTTTAAATGGCCTCCATATCTGAGATGATG 4320
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AATATATTTTAAATACATGAGTCGCAACTTACAAATTACCGGAGGTATAGACTCTACTAC

4321  ATTTTTTTATTTATTCATTTCCGATCAACTCCACCTTTTCATTAAATTAGTTATACGATC 4380
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TAAAAAATAAATAAGTAAAGCCTAGTTGAGGTGGAAAAGTAATTTAATCAATATGCTAG

```

7.2 Sequenzen *Atjrg21*-homologer Gene

Unten dargestellt sind die genomischen Sequenzen der *Atjrg21*-homologen Gene mit Promotor- und Exon/Intron-Bereich unter Angabe der abgeleiteten Proteinsequenz. Introns sind durch Kleinbuchstaben ersichtlich.

7.2.1 Genomische Sequenz *Atjrg22*

```

CATTTAAATTAGTTTTTGGAGTATTTATAAATTATCTTTTGGGAATTTTCAAGTCATCCAAA 60
ATCATTCAACAATGTTGCGCCAAACAGAAGATGGTTCAACCACTATAATCAAACCATTTT
TCAAATGATTTTCGTTTTTTTGGTTTATTTTGGCTTTTGTGGATTACAAACCAAACAA 180
TAATTTAAATTATGATGATCTCTACTTTAGTCTATATAAATACAATGACCATGAAAAAAA
TACACTATGGGTTTGGCTGTTTTCGTTCCAAATGTTGGCATGACCTCCACCGATAATCTG 300
TTGTTGATTAGTATTTTAAAGTCTGTCAATCGTGAATCGACATCTGATGTGTCATCAAAC
TCTTATCTATAAGATGCAAAAGTAGTAAAGCATAATCATTATTTTACATAAACACATT 420
GTTTATTACTTTTTGTACATGTTGCAAAACCGTCGCACGGCGCCGAAATTCGTTCCCTATCT
CCTTCACCTTCAAAGTCACTGAAGACATCAAAAAGCAATATTGTCGACATTTATCCACAA 540
CTCTTTTAAAAACGTTCTTATTAATTTATCATCCAACCTAGCTTAGCATGCAAGGTTTTT
ATTATGTCGAGTGTGACCTCAATATTCAATAGAAAAAAGGCTGGAATAAAGAATAT 660
CATCGTTTCATTTTGGTTTTTACAATTTCCCTATTTATATCCCCACTCGTCTTGTCTTCT
TCCACCATCTACAACCTTTCATTCTTCCACTACATTTCTCTCCTTGAGTATCTTCTTATCC 780
TATTTTCAAATTCAAAAACAATTACAAAAATGGCTACATGCTGGCCTGAGCCGATTGTT
M A T C W P E P I V
TCCGTGCAATCCTTGTCCAAACCGGTGTACCAACTGTACCAACCGCTATGTGAAGCCG 900
S V Q S L S Q T G V P T V P N R Y V K P
GCTCATCAGAGACCGGCTTTAACACCACCCAAATCCGATGCTGGGATAGAAATCCCTGTT
A H Q R P V F N T T Q S D A G I E I P V
CTAGACATGAACGACGTTTGGGGGAAACAGAGGGGCTAAGGCTCGTGAGGAGCGCGTGT 1020
L D M N D V W G K P E G L R L V R S A C
GAGGAGTGGGTTTTCTTCCAAATGGTGAACCATGGTGTGACCCACTCGTTGATGGAGAGA
E E W G F F Q M V N H G V T H S L M E R
GTGAGAGGAGCGTGGCGAGAGTTCTTCGAGCTACCGCTAGAGGAGAAACGGAAGTATGCA 1140
V R G A W R E F F E L P L E E K R K Y A

```

AACTCACCGGACCGTACGAGGGATATGGAAGCCGCTTGGGGTTGTGAAAGATGCTAAA
 N S P D D T Y E G Y G S R L G V V K D A K
 TTAGATTGGAGTGATTATTTCTTCTCAATTACTTGCCTTCTTCCATAAGAAACCTTCC 1260
 L D W S D Y F F L N Y L P S S I R N P S
 AAGTGGCCATCTCAGCCTCTAAGATCAGgtacatgcatataaattcttctaactttttt
 K W P S Q P P K I R
 gtccatacatatgggttaggtctatgtattatattctctgagtgtaaatgtttataagtta 1380
 tacttataacggaaccgtttactaaaagaagttttttactaagtgaatgttttgcacatgg
 ggacacgttgcgtggtgtgtgttttaaattttaggagttcaagcatctgaattatgtgga 1500
 agtacaacttgcataaaacgtacacacatggccgtttgggtctaaatgtttatttagg**ca**
cg
tgtctcatgtgtgaacacgtt**acacg**tggtcattatacccacgtgaaacatgacttttct 1620
 ttataatacatacaatttgaccgattgactaaataaaacaatgatgacatattgtctgt
 tgttttattttgtaacctagatctcgagattcattatgatcaatgggttagttcacgaaa 1740
 aacaaaaattcagtaaacggatctcacaatagttgttcataggaatcaatcgattaaat
 gaaaattgagaaaaataatctattaagattttcgttttcccttgcataaagatcactata 1860
 taactaacatttcgagggaaaaactgatgtgcag**AGA**ATTGATCGAAAAGTACGGAGAAGA
 E L I E K Y G E E
 AGTGAGAAAACGTGCGAAAGGCTAACAGAGACGTTGTCAGAGAGTTTAGGTTTAAAACC 1980
 V R K L C E R L T E T L S E S L G L K P
 AAACAAGTTCATGACGCTTTAGGAGGCGACAAAGTCGGAGCTTCTGAGGACAAA
 N K L M Q A L G G G D K V G A S L R T N
 CTCTACCCAAAATGCCCTCAGCCGACGCTCAGTTTAGGTTCTCTTCTCATTCTGACCC 2100
 F Y P K C P Q P Q L T L G L S S H S D P
 TGGAGGATCACCATCTTCTCCCGACGAGAAGGTCGCTGGCCTTCAGGTCCTCGTGG
 G G I T I L L P D E K V A G L Q V R R G
 TGATGGTGGGTCACTTAAATCAGTCCCTAATGCTTTGATCGTTAACATTGGAGATCA 2220
 D G W V T I K S V P N A L I V N I G D Q
 ACTTCAGgtactatttttgactttcttgaatttagttgtctctctaaatacgttaatta
 L Q
 tcgaaagtctatttggtttggcttgggtgtgttttactttcgttgcctaaaactactat 2340
 tttatggtttttagagactttatgtctttttacaacatatataaatattttaattttattt
 agcgttgggcaaacatcatatgggtatgtgtgatatttgatctactatcttgaatg 2460
 gactctacaaatataactaacccgatggatataatcaatgtgtag**ATA**CTTAGCAATGGA
 I L S N G
 ATTTACAAAAGCGTGAACATCAAGTGATCGTTAATCCGGTATGGAACGAGTCTCTTTG 2580
 I Y K S V E H Q V I V N S G M E R V S L
 GCATTCTTCTATAACCGAGAAGTGATATCCCGTTGGACCAATCGAAGAAGTAGTA
 A F F Y N P R S D I P V G P I E E L V T
 GCAAACCGACCTGCTCTTTATAACCAATCAGGTTTCGACGAGTACCGTTCTCTGATAAG 2700
 A N R P A L Y K P I R F D E Y R S L I R
 CAAAAGGTCCTTGTGGAAAACCAAGTCGACTCACTGTTATTAACATAGATAATAATTG
 Q K G P C G K N Q V D S L L L T R *

7.2.2 Genomische Sequenz *Atjrg23*

ATAAGGAAGTTAAAGTTAAATATTTTAAATGTTGAAGTCGTCAGATTCTTTTAGTA 60
 TATATCTCAAGGCATTAATATTTCAAGGTTGAGTACGTCGTTAAGCTACCCAAACATTC
 TCAAACAGAAGAAAATCATACCGATCTTAATTTATATTGTTAGGGTTAAAACATCTACGA 180
 ACTTTACAGCTAATAACAAAAAATGAACTCC**ACG**TGATAGCTAAAAATTATTTGTAAGG
 AAGCTACAAAACCTTTTCATTGCAAAATGCTTCGTAGTTTTCACATTTGGAATTTATCA 300
 AATACATCCACGTCATTTCACTTTTACCACGTATCAGAAAAAACATTTTATCA
 CGTTTCTTGAACATAACCAAGCAACAACTTTAATCGTATGGACTATTCGACTTCCTCA 420
 TCGGTTACAAACTTACAATTACGATTCTTACATACGTTACGATTTTCTTCAGTACTTA
 TTACAAAGGAAGATAATTAATTTTCGATTACAGAGAATAGTCTGAAACATGTCGGTCC 540
 GAGTTTGATTTTATTGTTGATGATAGTTAATATTCACAATTCATTTATTTATGTTAATC
 CAAATCTTGTTCCTTTCTCTCTCTCTCTCTCCCTTAACCATATAAACCAACTATAT 660
 ATAACAGCACTTCAACTTCTCATGAACAAGTAGAAAAAAGAGCAAGACTAATAAGC
 CATATAAGAGACAAC**ATGA**ACAACCTAGACGAGATCAAGATCGAGAGCAAGACCTGCCTC 780
 M N N L D E I K I E S K T C L
 AACGATCAAGAACAAGAAGTCAAATAGACAACATGCACATGACGACCAAGACAAGAAC
 N D Q E Q E V K I D N M H M S D Q D K N
 AAGATCGAAATCAAGAACAAGAGTGGCCTCGGCGAAAAGTGGCCAGAACCATCGTCCGA 900
 K I E I K N K S G L G E K W P E P I V R
 GTCCAATCTCTAGCCGAGACCACTCACTAGTCTCCCTGACCGTTACATCAAGCCGCCG
 V Q S L A E S N L T S L P D R Y I K P P
 TCTCAACGCCCTCAAACCACCATCATCGACCACCAACCGGAAGTAGCTGACATAAATATA 1020
 S Q R P Q T T I I D H Q P E V A D I N I
 CCGATCATAGACCTAGACAGTCTATTCTCTGGCAATGAAGACGACAAGAAGAGGATATCC
 P I I D L D S L F S G N E D D K K R I S
 GAGGCATGCCGTGAATGGGGATTCTCCAGgtaagaatggcactggaagataaaaatagt 1140
 E A C R E W G F F Q
 cacggttaatttttagacatgcatgttttttagtatgacaattattagtctagaacat
 gtatgctataaaaatttagattgggttcggttgacatctagagttctattttcagGTAAT 1260
 V I
 CAACCATGGCGTGAAGCCGGAGCTGATGGACGCAGCTAGAGAACTTGAAGAGGCTTCTT
 N H G V K P E L M D A A R E T W K S F F
 TAATTTGCTGTGAAGCAAAGAAGTTTACTCAAACCTCCCAAGAACCTATGAAGGATA 1380
 N L P V E A K E V Y S N S P R T Y E G Y
 TGAAGCAGATTGGGTGTGAAAAGGAGCCATCTTGATTGGAATGATTATTACTATCT
 G S R L G V E K G A I L D W N D Y Y Y L

CCATTTTCTTCTTCTTGCTTGAAGGATTTCAACAAATGGCCTTCTTTACCTTCCAACAT 1500
 H F L P L A L K D F N K W P S L P S N I
 TAGgtaattaactaagtcctctaattcttcttatgtctttatgagttttatttgataattaatt
 R
 aacgaattagtttgggttcattattcctatgagttttgggaaattgagaatttatagc 1620
 tagtataattgtaactcgatcattttatagggaaagcttgagactgaagtcagcaactagt
 ttcagttgttctttatctttttctatataaagaagacccaaactatgattctggct 1740
 ttaataaataaatttagaaataaatcaatataaaagaaaattgatcatgtggttattgt
 tgattggcaatcatgttaataacataatataatcaccatgttggttatttttctaattta 1860
 caaacaatttatagtttttaaattgtgcaacttcatcaaatcaaatcaaatcaaatcaaatcaag
 aaagagttgaatattttaattgaaactaaccttcttgttaaatattatctacatttgaaca 1980
 aaagattatgtttctcaaatattaatataacagaaacattcaatataattgtataat
 atgcttatttctacttcttaaaatggatatagAGAAATGAATGATGAGTACGGTAAGGAA 2100
 E M N D E Y G K E
 CTAGTGAAGCTAGGTGGGAGACTAATGACGATCTTATCGTCAAATTTGGGGCTAAGAGCA
 L V K L G G R L M T I L S S N L G L R A
 GAACAACCTTCAAGAAGCATTGGTGGAGAAGACGTTGGTGCATGTTGAGGGTTAATTAT 2220
 E Q L Q E A F G G E D V G A C L R V N Y
 TACCCAAAGTGCCTCAACCGGAGCTTGCCTCGGCCTCTCCCCTCATTCTGATCCCGGC
 Y P K C P Q P E L A L G L S P H S D P G
 GGCATGACCATCTCTTCCGGGACGATCAAGTCGTCGGCCTCAGGTCGGTCACGGTGAC 2340
 G M T I L L P D D Q V V G L Q V R H G D
 ACGTGGATCACTGCAATCCTTCCGCCACGCTTTATCGTCAATATCGGCGATCAAATT
 T W I T V N P L R H A F I V N I G D Q I
 CAGgtaacctcttaaatttttctttttcttttcttttcttttcttttcttttcttttctttt 2460
 Q
 aaaatggtgacataaaaaggtaaaacactaataattgtcatgatagttgggtactgaact
 actgatagaggatcatattccttagttgtagttccacgttttagacatgacttagaatag 2580
 cgataaaaagactaacggttccaacttcaggccaaaattttaaataaaaactactaagt
 ttttccaaaaatgatttagtttagtctttctgtagcgtcaagccatcaaaaatgatttgatt 2700
 tatacaagactaaatataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaataaacttt
 tagagtaccatcgtagacaataatcatgttgcaaaagcaaatgtccgaaagtgcatgc 2820
 acaaatgagttatttaacgtttaatgaagtacaataatagtttagtcatgcaatagatg
 caattttcaactaacgtatattgtttcttctgtgaaaaccggcagATACTAAGCAATTC 2940
 I L S N S
 GAAATACAAGAGCGTGGAAACATCGAGTGATGTAATTCGGAAAAAGAAAGGGTTTCACT
 K Y K S V E H R V I V N S E K E R V S L
 AGCATTCTTCTATAACCTAAGAGTGACATTCCGATCCAACCAATGCAACAACCTGTCCAC 3060
 A F F Y N P K S D I P I Q P M Q Q L V T
 CTCTACGATGCCCTTGTATCTCCATGACCTTTGATCAATATAGACTCTTCATTAG
 S T M P P Q P L Y P P M T F D Q Y R L F I R
 AACGCAAGGTCCACGTGAAAAATCCACGTTGAGTCTCATATATCTCCTGTTAATTGAT 3180
 T Q G P R G K S H V E S H I S P R *

7.2.3 Genomische Sequenz *Atjrg25*

CAGTAAAACTCATTGTGAAGTGAAATCCATGAAGTCTAAGTCGAATAATATTTAGAAA 60
 CAAGAGTTAAAACTTTTATGTAATTTCAATTTCTAATTTGGTTGAACATAAGCTAAACTCT
 ATATATATATTGTATTGTTTTCTTAAAATCAATCATAACATACAGAAATAGTTTTCTCAA 180
 ATCATTGCTAATTTATCTGTTTCTATTTTCTTAGCATCACCAAAATAGATATGCAATT
 TCCCATCTCTTTATATAACAAAATATGATTTATTCTATAAAAATAACAATCATCTCAT 300
 ACACATTAATCTCGTTGTGTGTCATCTATTGTGCAAAACTGTTTAATTAGTATCTTAAAA
 TATTAATATATTTACTCTTAGTCTTTGTGCGACACTTAGTCATTGAAATAGTTAAAACTAT 420
 TACAACCAAGAGATTGCCTCAAACTCAAAGTAATGCATAGTTTTCACATGTGATACAAATT
 TTGTTTTGTCCCTTTATCCCAAGAAAATAAAAATTAATCAATACTTATTCACACGTTTC 540
 ATTAATAAACAAGAGCTTTGCTTTTCATCGTCTCTAGCCGATTTCTAGATTCTCCTCCACC
 ACCATTTTACCCCTCTTTTAAATTCCTTCTCAATCAAATTAAGAATATTTTCTCAAAC 660
 CTCTTCTTTATATACTAAACGCTCTCACATGAACAAGAAGAATAAATAGAAACAAGAAG
ATGAACAAGAACAAGATTGATGTTAAGATCGGAGACGAAGAAGGATCGATGGATGAGTGG 780
 M N K N K I D V K I E T K K G S M D E W
 CCTGAGCCAATCGTCCGAGTCCAGTCCCTTAGCCGAGAGCAACCTCTCCTCTCCTCCCGAC 900
 P E P I V R V Q S L A E S N L S S L P D
 CGTTACATCAAACCAGCGTCTCTACGCCACCACGACCGAAGACGCTCCTACCGCGACC
 R Y I K P A S L R P T T T E D A P T A T
 AACATCCAATCATAGACCTTGAAGGACTCTTCTCGGAAGAAGGGTTGTCTGATGACGTC 1020
 N I P I I D L E G L F S E E G L S D D V
 ATCATGGCTCGGATATCGGAGGCTTGCCTGGTGGGGTCTTCCAGGTGGTGAACCAC
 I M A R I S E A C R G W G F F Q V V N H
 GGGTCAAACCGGAGCTGATGGACGCGGCTAGGGAGAATTGGAGAGAGTTTTCCATATG 1140
 G V K P E L M D A A R E N W R E F F H M
 CCGGTTAATGCCAAGAGACTTACTCAAACCTCAACAAGACCTACGAAGGCTATGGAAGT
 P V N A K E E T Y S N S P R T Y E G Y G S
 AGACTAGGTGTTGAGAAAGGCAAGTCTTGATGAGGAGTATTACTTTCTCCATCTT 1260
 R L G V E K G A S L D W S D Y Y F L H L
 CTTCCTCATATTTGAAAGACTTCAACAAGTGGCCTTCTTTCTCCACCATAAAGgttc
 L P H H L K D F N K W P S F P P T I R
 ctcttctttaatcattttctcttctttttaaagaatttttttagtgaattttcatgagtac 1380
 tgagtagaaaaataaataacggtatttttctattctttaaagtacggacatgtggta
 caatcttgggaaattatcctctttttattagttttgatataactattaagttcttggggaa 1500
 tgtgagaaggctgatttttcttcttttcaagcagaggagaattatgtgagtttaacgttggga
 taaagtccaatatagggaaatggataaattattgattatatttatatttcaaaaaat 1620

agAGAAGTGATCGATGAATACGGCGAAGAGCTAGTGAAGCTAAGTGGGAGAATTATGAGG
E V I D E Y G E E L V K L S G R I M R
GTATTATCGACAAACTTGGGACTAAAAGAGGATAAGTTTCAAGAAGCATTGGAGGTGAA 1740
V L S T N L G L K E D K F Q E A F G G E
AACATTGGGGCGTGTGTTGAGGGTTAATTATTACCCAAAATGCCCTCGACCGGAGCTGGCT
N I G A C L R V N Y Y P K C P R P E L A
CTTGGTCTCTCCACACTCCGATCCTGGCGGTATGACCATTCTTACCGGACGATCAA 1860
L G L S P H S D P G G M T I L L P D D Q
GTCTTCGGTCTCCAGTTCGTAAGATGACACGTGGATCACCGTCAAGCCTCATCCCCAT
V F G L Q V R K D D T W I T V K P H P H
GCTTTCATCGTCAATATTGGTGTCAAATACAGGtagattaactttttattaatatccat 1980
A F I V N I G D Q I Q
gttgctaataattctataaataatattttaacaaccttaaaaaataatgtaaacaaattaa
catagtattagaagaaacgataaattaagaaacataaaacaaagtaaatatcacctaaa 2100
gaattactaatttactacttggtagtttaactcttaaaactgtaaatatTTTTTTTaaac
aaaaaaaaaagactgtaaatTTTTTTTcgaaaaacaatgttttaagaatatctaaattc 2220
cctattatcttgatcagagaaaaatcgtctatacagaaaaggcaaaatgcgaaagtgtt
atTTgacaaccaatgaatatgatataagctatagttccacgTTTTtagacacgTTTTaaa 2340
atgcaagtatgataaacagctaccacttggTgcacaaaatgcctttatgattTTTTTcaacg
aaaataatgtaattattaagtcattattccgacaatagaattacgtccttttagatcta 2460
tcctgtcaaaccaattttatggacaactttctttagaagatagtacagcaatcgtaatt
tggaaattaatcgTTTTatttattaatctgtgtctgtctctatatttgtaatacgaacaa 2580
atagtacatcaaatcctcactgcgcacatgtgtgtgtttggccgTTTTgccatgttgca
tagaaggaatattttttctacaatgtataaacacgatttttaaaacaaacaccatatgta 2700
tatgacacatgaaattttctcaaaacatcataaacttagatatttaaatgtttttctaaat
tgttgtacttttagaaaaataatattgtgtttttgtcctaaattttaccttagaatcacaca 2820
acttacgtgttgataagctaatacatgtttgcgatgatgaaaaatgcagATACTAAGCAAC
I L S N
TCAACATACAAGAGTGTGGAGCATAGAGTGATAGTGAAGTCCGACAAGGAGAGAGTTTCA 2940
S T Y K S V E H R V I V N S D K E R V S
CTTGCCTTCTTACAATCCTAAAAGCGATATTCCGATCCAACCATTACAAGAAGTGTGTA
L A F F Y N P K S D I P I Q P L Q E L V
TCAACTCATAATCCTCCTTTATACCTCCCATGACCTTTGATCAGTATAGACTCTTTATC 3060
S T H N P P L Y P P M T F D Q Y R L F I
AGAACTCAAGGTCCACAAGGCAATCCCATGTTGAATCTCATATTTCTCCTCGTTGATTG
R T Q G P Q G K S H V E S H I S P R *

7.3 Tabellen und Messwerte

Tab. 7.1 (links): GUS-Aktivität der ProGUS-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je vier T2-Pflanzen fünf verschiedener Promotor-GUS-Linien (PG1, 3, 6, 7, 14). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (24 h Wasser; 24 h 100 µM Methyljasmonat).

Tab. 7.2 (rechts): GUS-Aktivität der Pro509GUS-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je vier T2-Pflanzen drei verschiedener Promotor509-GUS-Linien (5091, 5092, 5093). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (24 h Wasser; 24 h 100 µM Methyljasmonat).

| Pflanze | Wasser | Jasmonat |
|---------------|-----------|-----------|
| PG1/2 | 48 | 41 |
| 3 | 110 | 63 |
| 4 | 37 | 82 |
| 6 | 50 | 99 |
| PG3/1 | 144 | 74 |
| 2 | 109 | 123 |
| 7 | 47 | 66 |
| 9 | 75 | 39 |
| PG6/1 | 73 | 40 |
| 2 | 122 | 86 |
| 3 | 33 | 47 |
| 5 | 68 | 151 |
| PG7/2 | 118 | 120 |
| 3 | 66 | 49 |
| 5 | 169 | 143 |
| 8 | 67 | 138 |
| PG14/1 | 60 | 30 |
| 2 | 126 | 186 |
| 8 | 101 | 54 |
| 10 | 65 | 96 |
| Median | 71 | 78 |

| Pflanze | Wasser | Jasmonat |
|---------------|------------|-----------|
| 5091/1 | 200 | 70 |
| 5 | 101 | 31 |
| 6 | 193 | 81 |
| 8 | 58 | 49 |
| 5092/2 | 297 | 37 |
| 3 | 58 | 60 |
| 4 | 65 | 42 |
| 5 | 174 | 66 |
| 5093/1 | 147 | 95 |
| 2 | 55 | 164 |
| 11 | 101 | 61 |
| 12 | 100 | 58 |
| Median | 101 | 60 |

Tab. 7.3: GUS-Aktivität der GFus-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je zwei T3-Pflanzen sechs homozygoter G21GUSFus-Linien (GFus/41/2, 42/7, 42/10, 42/12, 43/3, 43/5). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 μ M Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|---------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| GFus/41/2/3 | 0 | 6 | 1155 | 581 | 72 | 90 | 83 |
| 4 | 27 | 13 | 1064 | 359 | 57 | 81 | 40 |
| GFus/42/7/3 | 185 | 115 | 2141 | 5891 | 368 | 259 | 1401 |
| 4 | 36 | 46 | 2457 | 2036 | 92 | 292 | 366 |
| GFus/42/10/2 | 251 | 152 | 2900 | 3652 | 421 | 251 | 617 |
| 3 | 252 | 114 | 1420 | 1352 | 84 | 298 | 287 |
| GFus/42/12/1 | 142 | 140 | 2338 | 2536 | 204 | 349 | 654 |
| 3 | 262 | 121 | 3461 | 2530 | 327 | 284 | 613 |
| GFus/43/3/3 | 280 | 134 | 3286 | 2396 | 559 | 475 | 286 |
| 4 | 147 | 187 | 1684 | 2427 | 316 | 444 | 623 |
| GFus/43/5/3 | 370 | 232 | 1323 | 2822 | 335 | 181 | 215 |
| 4 | 117 | 202 | 2676 | 4119 | 334 | 545 | 857 |
| Median | 166 | 127 | 2239 | 2478 | 322 | 288 | 490 |

Tab. 7.4: GUS-Aktivität der Δ 1-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je zwei T3-Pflanzen von vier homozygoten G21GUSFus Δ 1-Linien (Δ 1/021/1, 33/4, 41/7, 53/6). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 μ M Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|--------------------|-----------|------------|-------------|-------------|------------|------------|------------|
| Δ 1/021/1/2 | 38 | 261 | 2102 | 6318 | 440 | 250 | 820 |
| 3 | 40 | 274 | 3611 | 4662 | 354 | 182 | 484 |
| Δ 1/33/4/2 | 37 | 94 | 600 | 779 | 62 | 140 | 106 |
| 3 | 39 | 91 | 752 | 1763 | 94 | 100 | 149 |
| Δ 1/41/7/2 | 33 | 72 | 1076 | 2019 | 182 | 97 | 102 |
| 3 | 13 | 46 | 841 | 713 | 68 | 82 | 74 |
| Δ 1/53/6/2 | 16 | 217 | 4927 | 9829 | 500 | 899 | 810 |
| 3 | 13 | 254 | 3281 | 10988 | 662 | 720 | 507 |
| Median | 35 | 156 | 1589 | 3340 | 268 | 161 | 317 |

Tab. 7.5: GUS-Aktivität der $\Delta 2$ -Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je vier T2-Pflanzen vier verschiedener G21GUSFus $\Delta 2$ -Linien ($\Delta 2/13$, 79, 91, 122). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 μ M Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|------------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| $\Delta 2/13/1$ | 149 | 2 | 30 | | | | |
| 2 | 47 | 23 | 0 | | | | |
| 5 | 32 | 29 | 20 | | | | |
| 7 | 34 | 19 | 35 | 6 | 33 | 12 | 81 |
| $\Delta 2/79/1$ | 103 | 54 | 35 | | | | |
| 4 | 0 | 11 | 47 | 155 | 23 | 17 | 0 |
| 5 | 93 | 1 | 54 | | | | |
| 7 | 194 | 10 | 78 | | | | |
| $\Delta 2/91/3$ | 3 | 26 | 39 | | | | |
| 4 | 8 | 24 | 26 | | | | |
| 5 | 23 | 59 | 29 | 0 | 34 | 3 | 24 |
| 8 | 0 | 18 | 49 | | | | |
| $\Delta 2/122/2$ | 9 | 0 | 181 | | | | |
| 5 | 0 | 0 | 26 | | | | |
| 6 | 86 | 14 | 37 | | | | |
| 7 | 49 | 20 | 0 | 0 | 9 | 8 | 11 |
| Median | 33 | 19 | 35 | 3 | 28 | 10 | 17 |

Tab. 7.6: GUS-Aktivität der $\Delta 12$ -Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von je vier T2-Pflanzen sechs verschiedener G21GUSFus $\Delta 12$ -Linien ($\Delta 12/022$, 43, 53, 61, 91, 111). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 μ M Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|-------------------|-----------|-----------|------------|-----------|------------|------------|-----------|
| $\Delta 12/022/1$ | 79 | 74 | 159 | 47 | 92 | 76 | 9 |
| 3 | 83 | 69 | 117 | | | | |
| 4 | 93 | 87 | 305 | | | | |
| 7 | 100 | 87 | 150 | | | | |
| $\Delta 12/43/1$ | 99 | 97 | 95 | 51 | 315 | 170 | 45 |
| 2 | 125 | 133 | 214 | | | | |
| 6 | 124 | 137 | 154 | | | | |
| 8 | 87 | 84 | 152 | | | | |
| $\Delta 12/53/1$ | 146 | 153 | 200 | | | | |
| 4 | 95 | 100 | 186 | 70 | 146 | 145 | 64 |
| 5 | 78 | 97 | 130 | | | | |
| 6 | 110 | 77 | 96 | | | | |
| $\Delta 12/61/1$ | 117 | 82 | 58 | 69 | 114 | 118 | 120 |
| 2 | 137 | 113 | 69 | | | | |
| 3 | 107 | 114 | 106 | | | | |
| 5 | 84 | 79 | 97 | | | | |
| $\Delta 12/91/2$ | 85 | 143 | 109 | | | | |
| 6 | 60 | 62 | 70 | 47 | 66 | 135 | 31 |
| 7 | 90 | 91 | 105 | | | | |
| 8 | 74 | 76 | 125 | | | | |
| $\Delta 12/111/2$ | 110 | 155 | 167 | | | | |
| 3 | 65 | 91 | 93 | 72 | 126 | 304 | 34 |
| 4 | 149 | 86 | 133 | | | | |
| 5 | 115 | 102 | 151 | | | | |
| Median | 97 | 91 | 128 | 60 | 120 | 140 | 39 |

Tab. 7.7: GUS-Aktivität der CFus-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von vier T2-Pflanzen sechs verschiedener C21GUSFus-Linien (CFus012, 3, 4, 6, 9, 15). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 µM Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 µM Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|---------------|------------|------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|
| CFus012/1 | 120 | 481 | 172 | | | | |
| 2 | 271 | 215 | 137 | | | | |
| 5 | 112 | 53 | 108 | | | | |
| 8 | 656 | 86 | 322 | 148 | 252 | 169 | 236 |
| CFus3/3 | 272 | 154 | 81 | 0 | 89 | 111 | 321 |
| 4 | 218 | 330 | 115 | | | | |
| 6 | 249 | 350 | 187 | | | | |
| 8 | 276 | 350 | 71 | | | | |
| CFus4/1 | 48 | 205 | 130 | | | | |
| 2 | 148 | 112 | 76 | | | | |
| 4 | 227 | 142 | 116 | | | | |
| 6 | 152 | 132 | 136 | 136 | 189 | 148 | 118 |
| CFus6/1 | 531 | 244 | 122 | 0 | 78 | 235 | 446 |
| 2 | 294 | 356 | 99 | | | | |
| 4 | 390 | 161 | 80 | | | | |
| 7 | 128 | 597 | 168 | | | | |
| CFus9/3 | 269 | 0 | 195 | | | | |
| 5 | 116 | 18 | 111 | | | | |
| 6 | 128 | 85 | 135 | 26 | 74 | 110 | 437 |
| 7 | 41 | 34 | 127 | | | | |
| CFus15/2 | 32 | 40 | 388 | | | | |
| 5 | 77 | 25 | 235 | | | | |
| 6 | 28 | 97 | 282 | | | | |
| 7 | 19 | 99 | 101 | 7 | 43 | 98 | 88 |
| Median | 150 | 137 | 129 | 16 | 83 | 129 | 278 |

Tab. 7.8: GUS-Aktivität der Mut1-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von vier T2-Pflanzen sechs verschiedener G21GUSFusmut1-Linien (Mut1/011, 023, 35, 43, 51, 62). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 µM Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 µM Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|---------------|-----------|-----------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Mut1/011/1 | 38 | 48 | 68 | 5 | 38 | 82 | 20 |
| 3 | 34 | 43 | 55 | | | | |
| 5 | 25 | 67 | 44 | | | | |
| 7 | 39 | 39 | 41 | | | | |
| Mut1/021/1 | 42 | 38 | 58 | 24 | 27 | 68 | 29 |
| 2 | 30 | 38 | 53 | | | | |
| 5 | 29 | 38 | 48 | | | | |
| 6 | 13 | 42 | 45 | | | | |
| Mut1/35/1 | 13 | 30 | 7 | 0 | 28 | 81 | 68 |
| 3 | 29 | 53 | 59 | | | | |
| 4 | 13 | 60 | 25 | | | | |
| 6 | 17 | 51 | 54 | | | | |
| Mut1/43/2 | 25 | 53 | 43 | 0 | 25 | 82 | 127 |
| 3 | 5 | 48 | 37 | | | | |
| 4 | 21 | 61 | 50 | | | | |
| 7 | 24 | 65 | 66 | | | | |
| Mut1/51/1 | 41 | 41 | 80 | | | | |
| 2 | 6 | 42 | 73 | | | | |
| 3 | 17 | 53 | 79 | 13 | 11 | 65 | 96 |
| 4 | 26 | 25 | 74 | | | | |
| Mut1/62/1 | 13 | 33 | 33 | 18 | 19 | 80 | 59 |
| 2 | 13 | 46 | 42 | | | | |
| 6 | 19 | 47 | 59 | | | | |
| 7 | 30 | 35 | 52 | | | | |
| Median | 24 | 45 | 52 | 9 | 26 | 80 | 64 |

Tab. 7.9: GUS-Aktivität der Mut2-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von vier T2-Pflanzen sechs verschiedener G21GUSFusmut2-Linien (Mut2/013, 023, 34, 41, 55, 65). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 μ M Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Mut2/013/1 | 66 | 50 | 22 | 36 | 58 | 54 | 32 |
| 2 | 65 | 43 | 70 | | | | |
| 3 | 120 | 65 | 41 | | | | |
| 4 | 61 | 24 | 58 | | | | |
| Mut2/023/5 | 60 | 32 | 70 | | | | |
| 6 | 61 | 31 | 25 | 33 | 84 | 53 | 27 |
| 7 | 57 | 46 | 41 | | | | |
| 8 | 78 | 53 | 42 | | | | |
| Mut2/34/5 | 28 | 53 | 45 | | | | |
| 6 | 30 | 34 | 48 | | | | |
| 7 | 26 | 31 | 50 | | | | |
| 8 | 35 | 20 | 73 | 17 | 53 | 70 | 49 |
| Mut2/41/4 | 22 | 32 | 44 | | | | |
| 6 | 14 | 49 | 41 | | | | |
| 7 | 38 | 25 | 37 | 28 | 60 | 44 | 20 |
| 8 | 8 | 18 | 35 | | | | |
| Mut2/55/1 | 8 | 46 | 53 | 35 | 38 | 53 | 43 |
| 2 | 0 | 40 | 43 | | | | |
| 4 | 0 | 20 | 47 | | | | |
| 7 | 13 | 16 | 24 | | | | |
| Mut2/65/1 | 4 | 28 | 41 | 9 | 77 | 65 | 45 |
| 2 | 0 | 37 | 53 | | | | |
| 3 | 0 | 40 | 60 | | | | |
| 7 | 0 | 21 | 56 | | | | |
| Median | 27 | 33 | 45 | 30 | 59 | 54 | 37 |

Tab. 7.10: GUS-Aktivität der Mut12-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) von vier T2-Pflanzen sechs verschiedener G21GUSFusmut12-Linien (Mut12/011, 023, 82, 93, 134, 142). Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 µM Methyljasmonat; 24 h 0,5 M Glucose; 24 h nach Verwundung = Wund; 24 h *Fusarium*-Kulturfiltrat = KF; 24 h 100 µM Abscisinsäure = ABA).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Glucose | Wund | KF | ABA |
|---------------|-----------|-----------|------------|------------|------------|------------|-----------|
| Mut12/011/3 | 160 | 45 | 77 | | | | |
| 4 | 77 | 41 | 26 | 120 | 133 | 93 | 74 |
| 5 | 81 | 22 | 22 | | | | |
| 6 | 76 | 47 | 50 | | | | |
| Mut12/023/1 | 63 | 146 | 143 | | | | |
| 3 | 134 | 188 | 164 | | | | |
| 5 | 92 | 145 | 147 | | | | |
| 8 | 55 | 123 | 173 | 115 | 76 | 121 | 132 |
| Mut12/82/4 | 117 | 136 | 172 | | | | |
| 5 | 110 | 104 | 148 | | | | |
| 6 | 103 | 12 | 116 | 106 | 150 | 122 | 95 |
| 7 | 110 | 82 | 113 | | | | |
| Mut12/93/1 | 179 | 44 | 75 | | | | |
| 6 | 73 | 0 | 141 | | | | |
| 7 | 74 | 0 | 60 | 49 | 111 | 105 | 60 |
| 8 | 42 | 0 | 23 | | | | |
| Mut12/134/3 | 132 | 165 | 85 | | | | |
| 4 | 82 | 119 | 106 | 137 | 155 | 124 | 113 |
| 5 | 95 | 102 | 100 | | | | |
| 6 | 78 | 143 | 125 | | | | |
| Mut12/142/1 | 75 | 90 | 127 | | | | |
| 2 | 391 | 89 | 118 | | | | |
| 5 | 103 | 81 | 124 | | | | |
| 8 | 85 | 49 | 103 | 224 | 105 | 72 | 70 |
| Median | 88 | 86 | 114 | 118 | 122 | 113 | 84 |

Tab. 7.11: GUS-Aktivität der Minimalpromotor-Pflanzen

Aufgelistet ist die mittlere GUS-Aktivität (in pmol MU/min x mg) für je 12 T1-Pflanzen mit den 2GMiniGUS-, Mut1MiniGUS-, Mut2MiniGUS-, Mut12MiniGUS- oder Mini-Konstrukt. Als Vergleichswert ist der Median angegeben. Für die Messung dienten Blätter von ca. 6 Wochen alten Kurztag-Pflanzen, welche durch ein Flottieren auf der angegebenen Lösung behandelt wurden (unbehandelt = Frisch; 24 h Wasser; 24 h 100 μ M Methyljasmonat).

| Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat | Pflanze | Frisch | Wasser | Jasmonat |
|---------------|-----------|-----------|-----------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| M1M/12 | 20 | 0 | 0 | M2M/11 | 35 | 14 | 0 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 12 | 0 | 0 | 0 |
| 21 | 5 | 8 | 0 | 21 | 0 | 0 | 0 |
| 22 | 0 | 7 | 0 | 22 | 0 | 0 | 0 |
| 31 | 0 | 16 | 0 | 32 | 0 | 0 | 0 |
| 33 | 0 | 23 | 0 | 33 | 0 | 0 | 51 |
| 41 | 0 | 0 | 0 | 41 | 0 | 0 | 1 |
| 42 | 21 | 0 | 0 | 42 | 35 | 25 | 28 |
| 51 | 0 | 0 | 0 | 51 | 0 | 0 | 19 |
| 52 | 0 | 0 | 31 | 52 | 10 | 0 | 0 |
| 61 | 3 | 0 | 0 | 62 | 0 | 0 | 0 |
| 62 | 0 | 0 | 0 | 63 | 0 | 18 | 0 |
| Median | 0 | 0 | 0 | Median | 0 | 0 | 0 |
| M12M/12 | 0 | 45 | 51 | 2GM/12 | 42 | 22 | 25 |
| 13 | 0 | 28 | 0 | 13 | 37 | 14 | 73 |
| 21 | 25 | 60 | 2 | 21 | 41 | 30 | 51 |
| 23 | 22 | 34 | 12 | 22 | 104 | 34 | 134 |
| 32 | 10 | 0 | 0 | 32 | 53 | 32 | 17 |
| 33 | 30 | 34 | 32 | 33 | 83 | 41 | 28 |
| 41 | 0 | 42 | 28 | 41 | 0 | 13 | 58 |
| 43 | 68 | 73 | 0 | 43 | 17 | 25 | 62 |
| 52 | 9 | 69 | 31 | 51 | 9 | 23 | 49 |
| 53 | 12 | 41 | 14 | 53 | 30 | 0 | 12 |
| 62 | 13 | 73 | 31 | 61 | 6 | 0 | 29 |
| 63 | 28 | 43 | 55 | 63 | 45 | 28 | 4 |
| Median | 13 | 43 | 21 | Median | 39 | 24 | 39 |
| Mini/11 | 18 | 55 | 37 | | | | |
| 12 | 38 | 62 | 30 | | | | |
| 21 | 28 | 18 | 43 | | | | |
| 23 | 44 | 46 | 62 | | | | |
| 31 | 10 | 21 | 30 | | | | |
| 32 | 39 | 39 | 26 | | | | |
| 41 | 24 | 41 | 52 | | | | |
| 42 | 37 | 35 | 37 | | | | |
| 52 | 0 | 32 | 36 | | | | |
| 53 | 65 | 30 | 46 | | | | |
| 61 | 14 | 47 | 30 | | | | |
| 62 | 27 | 30 | 40 | | | | |
| Median | 28 | 37 | 37 | | | | |

7.4 Farbtafeln

Abb. 7.1: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität (Teil 1, Seite 108)

Dargestellt ist der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität durch das Farbsubstrat X-Gluc bei Pflanzen mit verschiedenen GUS-Konstrukten im Vergleich zu Wildtyppflanzen (Wt). Hierzu wurden die Pflanzen 24 h mit 100 μ M Methyljasmonat behandelt (JM, rechte Seite). Zum Vergleich dienten unbehandelte Pflanzen (FR, linke Seite). Der GUS-Nachweis erfolgte wie unter 2.9.1.2 beschrieben. Die Pflanzen entstammten folgenden Linien (von oben nach unten): GFus/42/12, Δ 1/021/1, Δ 2/79, Δ 12/111, CFus/6. GUS-Aktivität ist anhand von Blaufärbung sichtbar.

Bei Pflanzen mit zweitem Intron (GFus und Δ 1) ist nach JM-Behandlung die Bildung des blauen Farbstoffs Indigo sichtbar. In unbehandelten GFus und Δ 1-Pflanzen ist geringe Blaufärbung im Bereich der Leitbündel zu sehen. In allen anderen Pflanzen ist weder bei JM-Behandlung noch in unbehandelten Pflanzen blauer Farbstoff sichtbar.

Abb. 7.2: Histochemischer Nachweis der GUS-Aktivität (Teil 2, Seite 109)

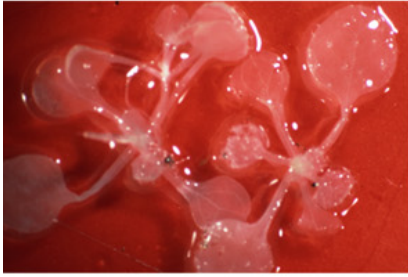
Dargestellt ist der histochemische Nachweis der GUS-Aktivität durch das Farbsubstrat X-Gluc bei GUS-Pflanzen mit mutierten G-Boxen (Mut1/011, Mut2/023, Mut12/134) im Vergleich zu GUS-Pflanzen mit intakten G-Boxen (GFus/42/12). Hierzu wurden die Pflanzen 24 h mit 100 μ M Methyljasmonat behandelt (JM, rechte Seite). Zum Vergleich dienten unbehandelte Pflanzen (FR, linke Seite). Der GUS-Nachweis erfolgte wie unter 2.9.1.2 beschrieben.

Im Vergleich zu den GFus-Pflanzen mit intakten G-Boxen im zweiten Intron findet man bei den Pflanzen mit mutierter G-Box im Reportergerkonstrukt den vollständigen Ausfall der GUS-Aktivität, sichtbar durch die fehlende Blaufärbung der Mut-Pflanzen.

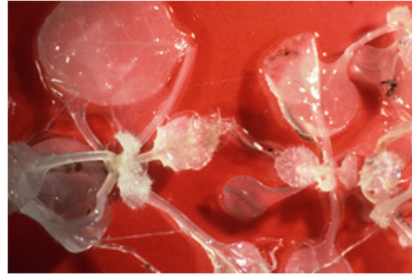
Abb. 7.3: Potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten (Seite 110)

Dargestellt ist der Phänotyp potenziell Jasmonat-insensitiver Mutanten im Rahmen des konditional letalen Screens mit dem *pehA*-Gen 3 Wochen nach dem Beginn der Selektion mit 500 μ M Methyljasmonat und 125 μ M Glycerolglyphosat. Potenziell Jasmonat-insensitive Mutanten wurden, wie in der Abbildung sichtbar ist, aufgrund ihrer Größe und Vitalität selektiert. Im Vergleich hierzu sind Jasmonat-sensitive Pflanzen durch ihren kleinen Wuchs, der starken Akkumulation von Anthocyanen und den Chlorophyll-Verlust bzw. als letale Pflanzen sichtbar.

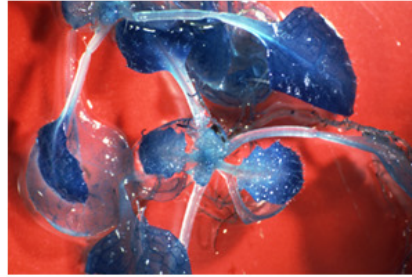
FR



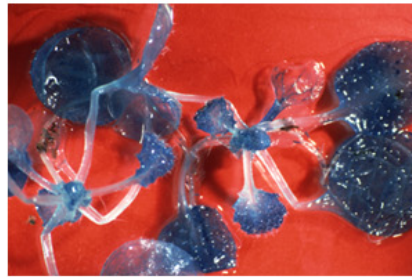
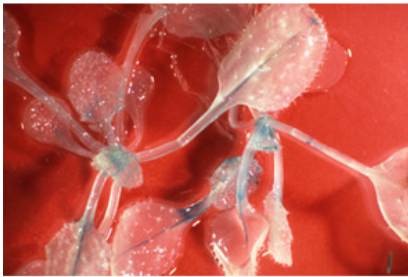
JM



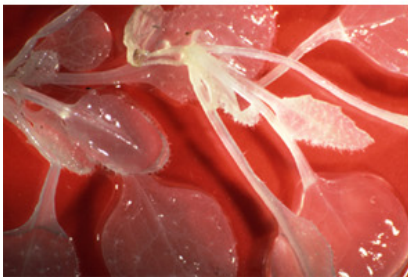
Wt



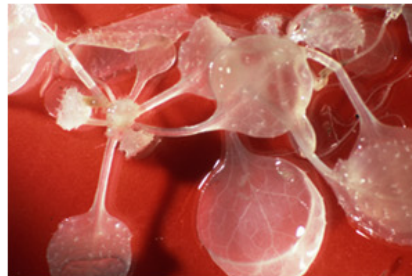
GFus



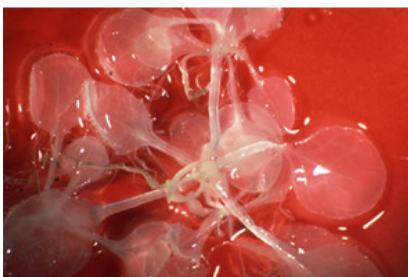
Δ1



Δ2

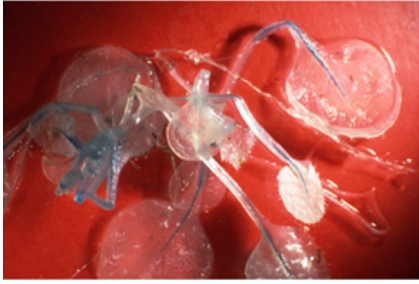


Δ12

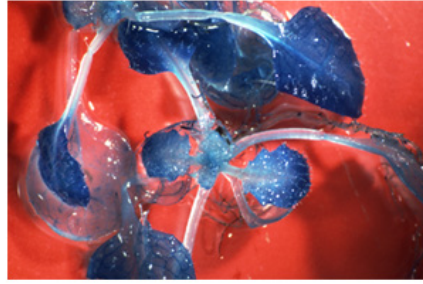


CFus

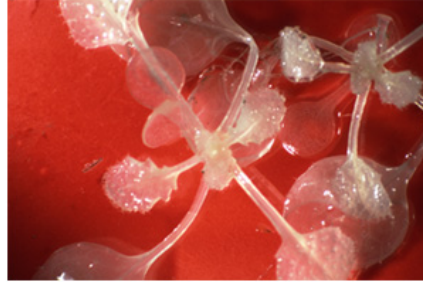
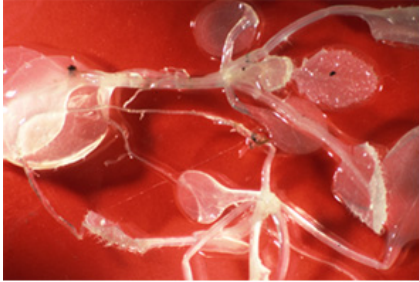
FR



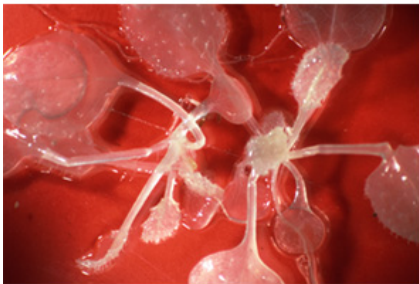
JM



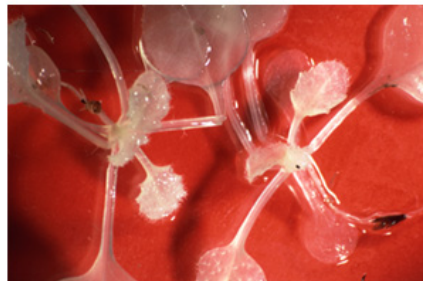
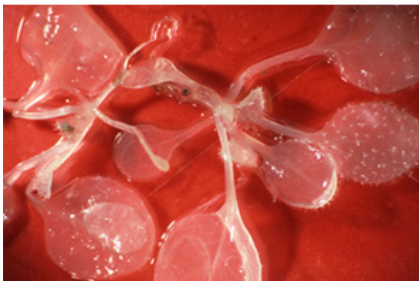
GFus



Mut1



Mut2



Mut12



Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit bedanken. Weiterhin gilt Dr. Marian Löbler, unter dessen Betreuung die Arbeit begonnen wurde, mein Dank.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Sabine Rosahl, Frau Silvia Wegener, Herrn Dr. Justin Lee, Herrn Dr. Helmut Maucher, Herrn Dr. Axel Schmidt, Herrn Dr. Thomas Vogt und Herrn Dr. Jörg Ziegler, die durch ihre konstruktive Hilfe und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Signaltransduktionsmutanten“, speziell bei Herrn Dr. Norbert Naß für die geleistete Hilfe bei der Messung und Darstellung der Luciferaseaktivität.

Bei Dr. Robert Kramell und Dr. Otto Miersch möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und interessanten Diskussionen in Bezug auf chemische und analytische Probleme des Jasmonatstoffwechsels und die durchgeführten Jasmonatbestimmungen bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Dr. Renate Schmidt für ihre Hilfe bei der Kartierung des *Atjrg21*-Genlokus.

Herrn Dr. Holger Bohlmann danke ich für die RNA-Proben Pilz-infizierter Pflanzen.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Wahle und Herrn PD Dr. B. Weißhaar bedanke ich mich für ihre Bereitschaft zur Erstellung eines Gutachtens zu dieser Arbeit.

Ferner gilt allen derzeitigen und vormaligen Mitarbeitern der Abteilung Hormonforschung (jetzt Naturstoffbiotechnologie) unter der Leitung von Herrn Prof. Benno Parthier, Herrn Prof. Claus Wasternack und Frau Prof. Toni Kutchan und den Mitarbeitern der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie mein Dank.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen 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, im Mai 2000

Stephan Bau

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Stephan Bau
Geburtsdatum: 2.11.1969
Geburtsort: Halle/Saale
Familienstand: ledig

Schulbildung

1976-1986 Polytechnische Oberschule „Brunnenschule“ in Halle/Saale
1986-1988 Erweiterte Oberschule „Thomas Müntzer“ in Halle/Saale
1988 Abitur

Wehrdienst

1988-1990 Grundwehrdienst in Schwerin

Studium

1990-1995 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie;
Diplomarbeit zum Thema
„Isolierung und Charakterisierung der cDNA eines
Methyljasmonat-regulierten Gens aus *Arabidopsis thaliana*“;

Tätigkeiten

1996-2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für
Pflanzenbiochemie Halle innerhalb des SFB-Projekts 363,
Teilprojekt C9 „Signaltransduktion bei der Aktivierung pflanzlicher
Pathogenabwehrgene“ unter Leitung von Prof. Dr. D. Scheel;
Arbeiten zur Promotionsarbeit zum Thema „Untersuchungen zur
Jasmonat-Signaltransduktion in *Arabidopsis thaliana* anhand des
Jasmonat-regulierten Gens *Atjrg21*“

Halle, im Mai 2000