

Analyse von Genen der Stilben-Synthese aus Kiefern

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
dem Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg

von

Patrick Supp

aus Limburg/Lahn

Marburg/Lahn 2001

Vom Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg

als Dissertation angenommen am: 16.10.2001

Erstgutachter: Prof. Dr. H. Kindl

Zweitgutachter Prof. Dr. B. Kadenbach

Tag der mündlichen Prüfung am: 24.10.2001

Die Natur kreiert nichts ohne Bedeutung

Aristoteles

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Interaktion Pflanze/Pathogen	1
1.2 Chemische Abwehrstoffe und Phytoalexine	2
1.3 Stilbene und Stilben-Synthasen	3
1.4 Erworbene Resistenz	7
2 Materialien und Methoden	9
2.1 Puffer und Medien	9
2.2 Enzyme, Kits und Chemikalien	9
2.3 Pflanzenmaterial	11
2.3.1 Suspensionskulturen	11
2.3.1.1 Suspensionskulturen von <i>Vitis vinifera</i> cv. Optima	11
2.3.1.2 Suspensionskulturen von <i>Nicotiana tabacum</i>	12
2.3.2 Kalluskulturen	12
2.3.3 Kultivierung von Tabakpflanzen	13
2.3.4 Anzucht von <i>Pinus sylvestris</i>	13
2.4 Pilzmaterial	13
2.4.1 Kultur von <i>Botrytis cinerea</i>	13
2.5 Arbeiten mit DNA	14
2.5.1 Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	14
2.5.2 Ethanol-fällung	15
2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	15
2.5.4 Präparation von DNA im mittleren und großen Maßstab	16
2.5.5 Gelelektrophorese von DNA	16
2.5.6 PCR	17
2.5.7 Cycle-Sequenzierung	17
2.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
2.5.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.5.10 Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	19
2.5.11 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	20
2.5.12 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	20
2.5.13 Ligation von DNA	20
2.5.14 Radioaktive Markierung von synthetischen Oligonukleotiden	20
2.5.15 DMS-Behandlung von Suspensionskulturzellen	21
2.5.16 Spaltung von methylierter genomischer DNA	21
2.5.17 <i>in-vivo</i> -footprinting	21
2.5.18 Gelelektrophorese nach Maxam und Gilbert	22
2.5.19 Ortsspezifische Mutagenese	23
2.5.20 Herstellung kompetenter Zellen	24
2.5.21 Transformation von <i>E. coli</i>	24
2.5.21.1 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.5.22 Herstellung transgener Tabakpflanzen	26
2.5.23 Transiente Transformation von Weinprotoplasten	27
2.5.24 Infektion von <i>N. tabacum</i> mit einem viralen Vektor	29
2.6 Arbeiten mit Proteinen	30
2.6.1 Aufarbeitung rekombinanter Proteine aus <i>E. coli</i> unter	30

denaturierenden Bedingungen	
2.6.2 Aufarbeitung rekombinant überexprimierter Pinosylvin-Synthase aus <i>E. coli</i> unter nativen Bedingungen	30
2.6.3 Aufreinigung über eine Ni ²⁺ -Chelatsäule	31
2.6.4 Aktivitätstest der rekombinanten Stilben-Synthase	31
2.6.5 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen rekombinante Pinosylvin-Synthase	32
2.6.6 Proteinfällung	32
2.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford	32
2.6.8 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)	33
2.6.9 Proteinfärbung mit Coomassie Blue R-250	34
2.6.10 Western-Blot	34
2.6.11 Immunanfärbungen	35
2.6.12 Gel-Shift-Experimente (EMSA)	36
2.6.12.1 Radioaktive Markierung von PCR-Fragmenten am 5'-Ende	36
2.6.12.2 Gel-Shift-Experimente mit <i>Vitis</i> -Gesamtprotein	36
2.7 Elizitierung von Pflanzenmaterial mit biotischen und abiotischen Faktoren	38
2.7.1 Behandlung von transgenen Pflanzen mit Methyljasmonat	38
2.7.2 Behandlung mit Salizylat	38
2.7.3 Induktion mit UV-Licht	38
2.7.4 Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i>	38
2.7.5 Histochemischer Nachweis der GUS-Expression	38
2.7.6 Applikation von Methyljasmonat auf Kieferkeimlinge	39
2.7.7 Applikation von Ethylen auf Kieferkeimlinge	39
2.7.8 Elizitierung von Kieferkeimlingen mit UV-Licht	40
2.8 Aufschluss von Kieferkeimlingen	40
3 Ergebnisse	41
3.1. Untersuchungen an transgenen Tabakpflanzen	41
3.1.1 Induktion mit UV-Licht	41
3.1.2 Induktion durch Jasmonat	44
3.1.3 Induktion durch Salizylat	45
3.1.4 Versuche zur Induktion durch biotische Faktoren: Infektion mit dem phytopathogenen Pilz <i>Botrytis cinerea</i>	47
3.2 Transiente Expression in Weinprotoplasten	49
3.3 Versuche zum <i>in-vivo</i> -footprint	57
3.4 Versuche zur Infektion von <i>Nicotiana tabacum</i> mit einem viralen Vektor	61
3.5 Bakterielle Überexpression der Pinosylvin-Synthase als His ₆ -Fusionsprotein und Aufreinigung über eine Chelatsäule	63
3.6 Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase in Kiefer-Keimlingen durch UV-Licht und Methyljasmonat	66
3.7 Analyse von Promotorelementen durch Gelshift-Experimente	70
4 Diskussion	73
4.1 Experimente mit transgenen Tabakpflanzen	73
4.1.1 Infektion mit dem nekrotrophen Pilz <i>Botrytis cinerea</i>	75
4.3 Induktion des Pinosylvin-Synthase in Kieferkeimlingen	77
4.4 Gel-Shift-Experimente (EMSA)	77
4.5 Die Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase-Gene im Vergleich mit anderen an der Pathogenabwehr beteiligten Genen	79

5 Zusammenfassung	82
6 Anhang	83

Abkürzungen

*g	Erdbeschleunigung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
4-MU	4-Methyl-Umbelliferon
4-MUG	4-Methyl-Umbelliferon-β-D-glucuronid
A	Absorption
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAP	Benzylaminopurin
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaar
CEF.	Cefotaxim
d	Tag
DMS	Dimethylsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
g	Gramm
GUS	β-Glucuronidase
h	Sunde
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
Kana.	Kanamycin
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	molar
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PVP	Polyvinylpyrrolidon
PVX	potato virus X
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Strept.	Streptomycin
T	Temperatur
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-glucuronid

1 Einleitung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur Regulation der Stilben-Synthese in Pflanzen, insbesondere in Kiefer (*Pinus sylvestris*). Stilbene spielen in einigen Pflanzen eine wichtige Rolle als antimikrobielle Abwehrstoffe (Kindl, 1985). Aufgrund der ökonomischen Bedeutung der Stilbene in Zusammenhang mit der Resistenz von Kulturpflanzen, nämlich bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen soll zunächst auf die verschiedenen Verteidigungsmechanismen der Pflanze eingegangen werden.

1.1 Interaktion Pflanze/Pathogen:

Pflanzen unterliegen einer ständigen Bedrohung durch pathogene Mikroorganismen (Pilze, Bakterien, Viren). Dies hat eine immense praktische Bedeutung, da die gesamte Nahrungsmittelproduktion letztlich von einigen wenigen Kulturpflanzen abhängt. Zwei Faktoren machen Kulturpflanzen anfälliger für Pathogene als vergleichbare Pflanzen in ihrer natürlichen Umwelt: Zum einen bedingt die moderne Landwirtschaft großflächige Monokulturen, die die Ausbreitung von hinsichtlich ihrer Wirtspflanzen sehr oft hochspezialisierten Pathogenen begünstigen. Zum anderen werden Kulturpflanzen auf bestimmte Eigenschaften gezüchtet. Dabei kann es zu einer genetischen Verarmung kommen, die dann wiederum die großflächige Verbreitung von Pathogenen begünstigt. Ein sehr berühmtes Beispiel ist die Hungersnot in Irland 1845/46: Durch den Erreger der Kraut- und Knollenfäule, den Oomyceten *Phytophthora infestans*, wurde ein großer Teil der Kartoffelernte vernichtet. Etwa eine Million Iren verhungerte, eine noch größere Zahl wanderte aus.

Pflanzen besitzen keinen der Immunabwehr von Säugetieren vergleichbaren Schutz vor Pathogenen. Im Laufe der Evolution haben Pflanzen aber eigene Mechanismen zum Schutz vor Mikroorganismen und Fraßfeinden entwickelt. Bei Anfälligkeit oder Suszeptibilität einer Pflanze gegenüber einem bestimmten Pathogen spricht man von kompatibler Interaktion Pflanze-Pathogen; ist die Pflanze resistent, so liegt eine inkompatible Interaktion vor. Interessanterweise ist Resistenz die Regel und Suszeptibilität die Ausnahme. Man kann das als Momentaufnahme eines evolutionären Prozesses sehen, in dem die generelle Resistenz der Pflanzen ab und zu von veränderten Pathogenen durchbrochen wird, gegen die die meisten Pflanzen nach einiger Zeit auch wieder resistent werden. Die erste Verteidigungslinie der Pflanze besteht in mechanischen Barrieren, die dem Pilz das Eindringen erschweren. Dabei handelt es sich z. B. um Lignineinlagerungen in die Zellwand sowie Kutin und Suberin, die in die Epidermis eingelagert werden. Ist es einem Pathogen gelungen, in die Pflanze einzudringen, laufen verschiedene biochemische Vorgänge ab. Die hypersensitive Reaktion begrenzt das vom Pathogen befallene Gewebe, Phytoalexine hemmen das Wachstum des Pathogens. Außerdem führt ein Befall oft zu einer systemischen Reaktion, die die gesamte Pflanze vorübergehend in einen Zustand unspezifischer, erhöhter Resistenz versetzt (SAR, systemic acquired resistance).

1.2 Chemische Abwehrstoffe und Phytoalexine

Eine entscheidende Rolle bei der Interaktion von Pflanzen mit Pilzen und Bakterien spielen chemische Abwehrstoffe aus dem Sekundärstoffwechsel der Pflanzen. Wenn man sich auf antimikrobielle Abwehrstoffe beschränkt, ist folgende Klassifizierung möglich (Harborne, 1995)

<u>Klasse:</u>	<u>Beschreibung:</u>	<u>Beispiele:</u>
<u>präinfektionelle Verbindungen:</u>		
1. Prohibitine:	Hemmung von Mikroorganismen <i>in vivo</i>	Saponine
2. Inhibitine:	Metabolite, die nach der Infektion zunehmen, um die volle Giftwirkung zu erreichen	Cumarin
<u>postinfektionelle Verbindungen:</u>		
1. Postinhibitine:	Metabolite, die z. B. durch Hydrolyse oder Oxidation aus vorher schon vorhandenen nichttoxischen Substraten gebildet werden.	cyanogene Glykoside, Allylithiocyanate, Chinone
2. Phytoalexine:	Metabolite, die nach einer Infektion durch Anschalten von Genen oder Aktivierung von Enzymsystemen <i>de novo</i> gebildet werden.	Pisatin

Besonders wichtig sind Phytoalexine. Seit der Entwicklung des Phytoalexin-Konzepts (gr. phyton=Pflanze, alexis=Abwehr) durch Müller und Börger im Jahre 1940 (Müller und Börger, 1940) wurde dieser wichtige Aspekt der induzierbaren Pflanzenabwehr intensiv erforscht. Phytoalexine werden von der Pflanze als Reaktion auf eine Infektion, aber auch nach abiotischem Stress gebildet. Dies geschieht normalerweise mittels *de novo*-Synthese durch Enzyme, die auf der Ebene der Transkription reguliert werden, d.h., durch verstärkte Synthese der entsprechenden mRNA.

Chemisch betrachtet gehören Phytoalexine den verschiedensten Stoffgruppen an wie z. B. Terpene, Isoflavonoide, Polyacetylene und Stilbene; gemeinsam ist ihnen eine gute Fettlöslichkeit.

In einigen Fällen konnte der Beweis erbracht werden, dass die Anwesenheit eines Phytoalexins in einer Pflanze der entscheidende Faktor der Resistenz gegen bestimmte Stämme eines Pathogens ist. Beispielsweise schützt das Phytoalexin Pisatin in Erbsen vor Befall mit inkompatiblen Stämmen von *Nectria haematococca*. Pathogene Stämme dieses Pilzes verfügen über ein Enzym, das Pisatin in eine inaktive Verbindung umwandelt (Pisatin-Demethylase) (van Etten *et al.*, 1989; Kuc, 1995).

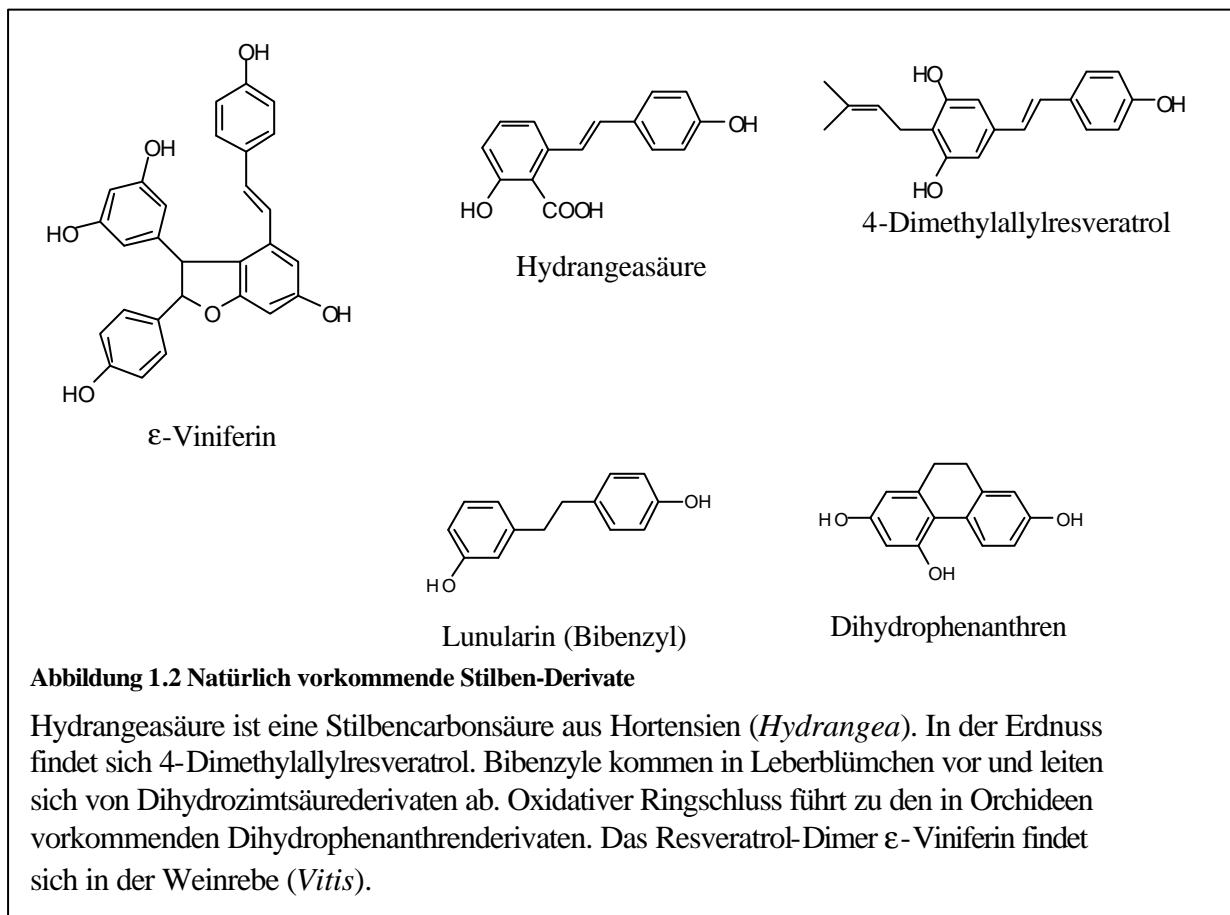
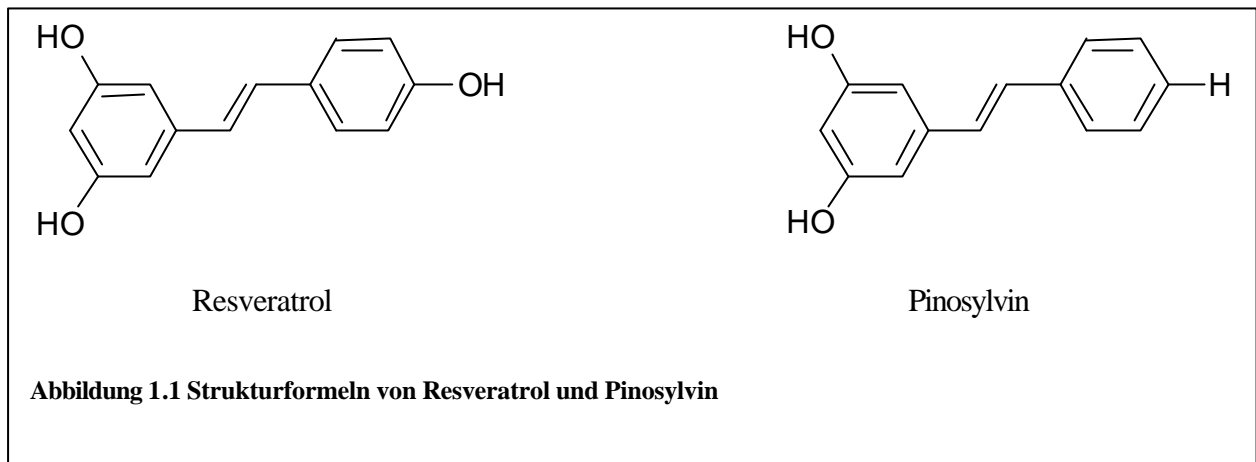
Den besten Beweis lieferten Experimente, wo die Fähigkeit zur Phytoalexinbildung auf andere Pflanzen übertragen wurde (Coutos-Thevenot *et al.*, 2001; Hain *et al.*, 1993). Die Stilben-Biosynthese benötigt lediglich ein Enzym, da die Vorstufen die ubiquitären Metabolite Malonyl-CoA und p-Coumaroyl-CoA sind. Die Übertragung einer Stilben-Synthase vom Resveratrol-Typ in transgenen Tabak führte zu erhöhter Resistenz gegen *Botrytis cinerea*. Dabei wurden bis zu 40 µg Resveratrol pro g Frischgewicht gebildet (Hain *et al.*, 1990; Hain *et al.*, 1993).

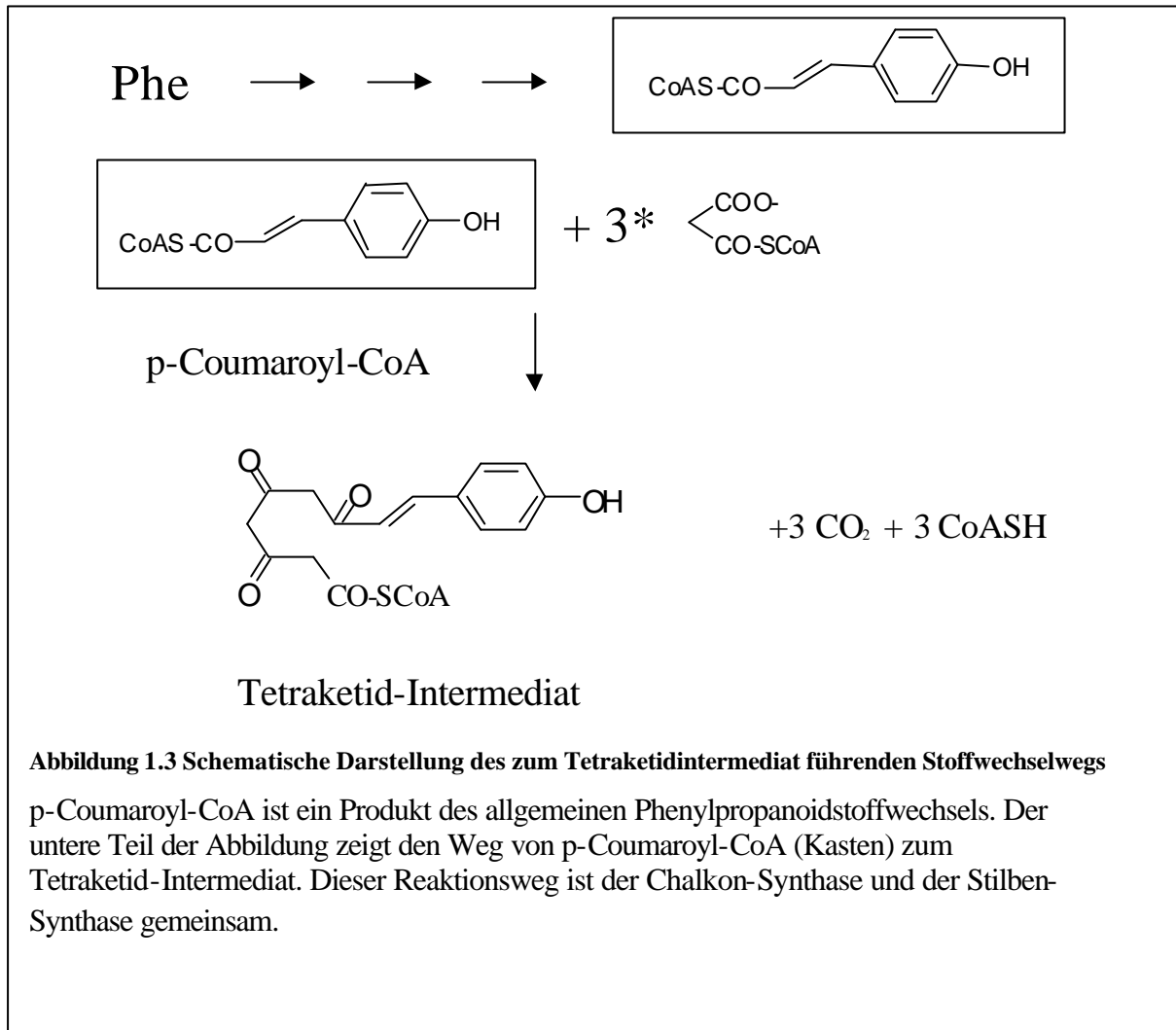
1.3 Stilbene und Stilben-Synthasen

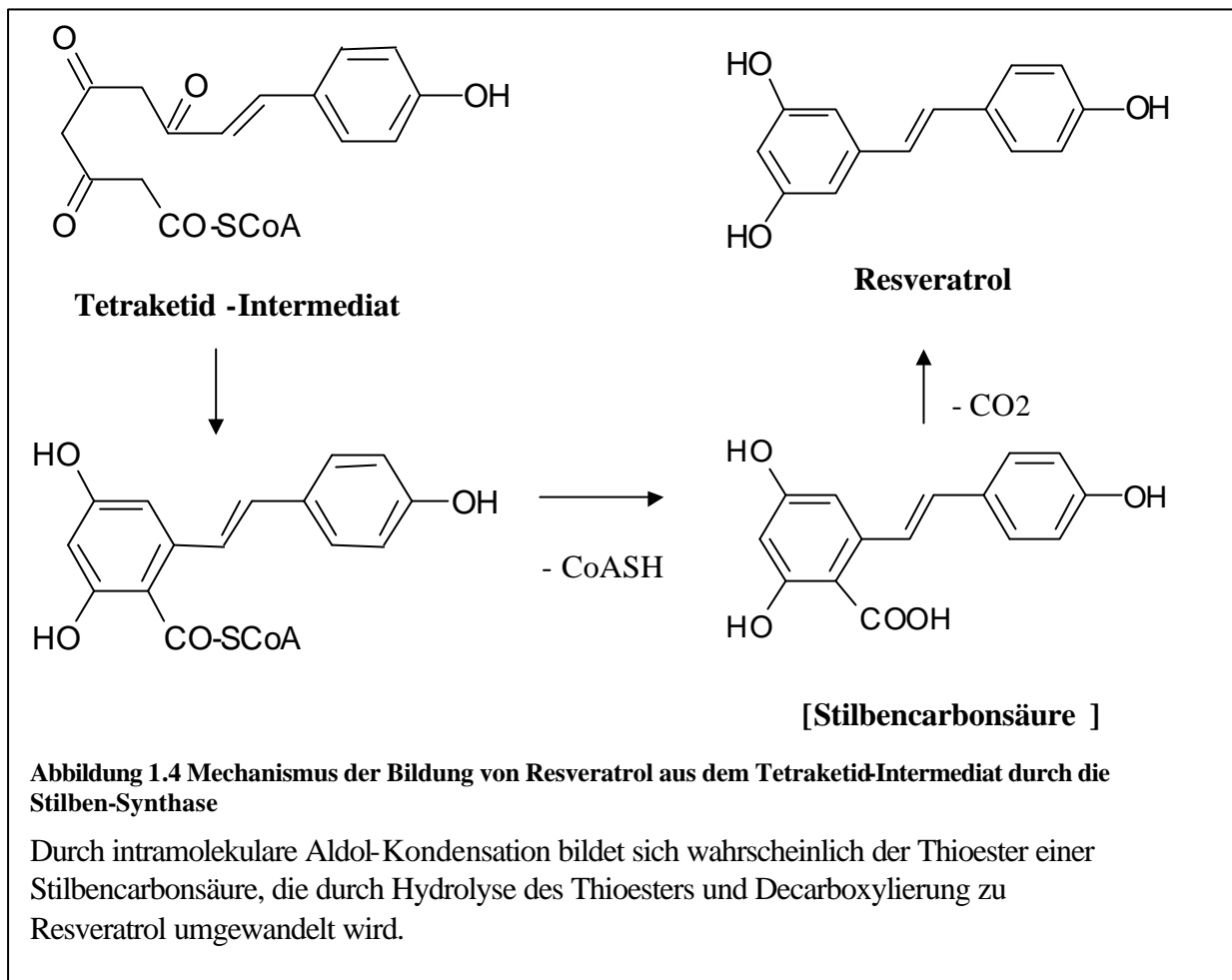
Hydroxystilbene kommen in einer begrenzten Zahl von Pflanzenfamilien vor und wirken dort als effektive Phytoalexine gegen Pilzbefall (Kindl, 1985). Pinosylvin wurde 1939 von Erdtmann aus Kiefernholz isoliert. Die Bildung von Pinosylvin geht nicht von einer Hydroxylimtsäure (p-Coumarinsäure im Falle von Resveratrol), sondern von der Zimtsäure selbst aus (Schwekendiek *et al.*, 1992).

Pinosylvin wirkt zusammen mit Pinosylvin-Monomethylether als Schutz vor Pilzbefall und Insektenfraß. Pinosylvin kommt in verschiedenen Kiefern (z.B. *Pinus sylvestris*) vor und ist konstitutiver Bestandteil des Hartholzes, wo es als Prohibitin vor Pilzbefall schützt. In Kieferkeimlingen schützt Pinosylvin und sein Monomethylether als echtes Phytoalexin vor Pilzbefall. Die Induktion in Kieferkeimlingen nach Pathogenbefall, aber auch nach UV-Strahlung und Ozoneinwirkung wurde gezeigt. Interessanterweise ist Pinosylvin außerhalb der Gattung *Pinus* im Pflanzenreich wenig verbreitet. Es kommt u. a. noch im Walnussbaum vor. Die entsprechende Stilbencarbonsäure findet sich als Aglykon in *Gaylussacia*-Arten. Das am weitesten verbreitete Stilben ist Resveratrol (Kindl, 1985). Es findet sich u. a. in der Weinrebe (*Vitis vinifera*), der Erdnuss (*Arachis hypogaea*) und Rhabarber (*Rheum raponticum*). Auch Kiefern, die bereits durch Pinosylvin gekennzeichnet sind, enthalten Resveratrol (Kindl, 1985). Die Biosynthese geht stets von Zimtsäurederivaten aus. Durch Kondensation mit 3 Molekülen Malonyl-CoA entsteht ein Tetraketidintermediat, welches durch Claisen-Kondensation, Hydrolyse des Thioesters und Decarboxylierung zum Stilben-Gerüst führt. Allerdings lassen sich die Zwischenstufen nicht isolieren.

Trotz der Ähnlichkeit der biochemischen Synthese der Stilbene mit der von zusammengesetzten Polyketid-Synthasen ist die Enzymologie der Stilben-Synthasen sehr verschieden. Alle bekannten Stilben-Synthasen gehören mit den sehr nahe verwandten Chalkon-Synthasen zu den einfachen Polyketid-Synthasen. Es handelt sich um Homodimere mit einem MW von etwa 43 kD pro Untereinheit. Sie besitzen keinen Cofaktor. Chalkon-Synthasen sind im Gegensatz zu Stilben-Synthasen ubiquitär in allen Pflanzen. Aufgrund von Sequenzvergleichen in Pflanzenfamilien, in denen beide Enzyme vorkommen, wurde die im Laufe der Evolution mehrfache unabhängige Bildung von Stilben-Synthasen aus Chalkon-Synthasen postuliert (Tropf *et al.*, 1994). Obwohl heute die Kristallstruktur der Chalkonsynthase und zahlreiche Sequenzen von Chalkon- und Stilbensynthasen vorliegen, ist die Entscheidung, ob es sich um eine Chalkon- oder Stilben-Synthase handelt, nicht anhand der Primärsequenz möglich (Ferrer *et al.*, 1999).







In Wein (*Vitis vinifera*) kommen 6 unterschiedliche Stilben-Synthase-Gene vor, drei als Cluster auf einem Fragment von 13 kbp Länge (Wiese *et al.*, 1994). Im Genom von *Pinus sylvestris* gibt es mindestens 5 Pinosylvin-Synthase-Gene, die aber nicht als Cluster vorliegen (Preisig-Müller *et al.*, 1999). Diese unterscheiden sich im kodierenden Teil kaum, stark jedoch im Promotorbereich. Bei Analysen der Promotoraktivität stellte sich der Promotor des Gens 1 (PST1) als am stärksten induzierbar heraus (Brehm *et al.*, 1999). Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Promotoranalyse des Promotors des Gens PST1 und die Identifizierung der cis-agierenden Elemente.

Im Zusammenhang mit den cis-agierenden Elementen soll an dieser Stelle ein Überblick über die Signaltransduktion der Pathogenabwehr der Pflanzen gegeben werden. Die Abwehr eines Pathogens setzt dessen Erkennung voraus. Diese erfolgt über Elizitoren, die entweder vom Pathogen selbst stammen, oder von den geschädigten Teilen der Pflanze. Eine unmittelbare Reaktion auf den Kontakt mit dem Pathogen oder dem Elizitor ist der sog. „oxidative burst“; durch Aktivierung einer membrangebundenen NADP(H)-Oxidase werden Superoxid-Anionen freigesetzt, welche durch die Superoxid-Dismutase zu H_2O_2 und O_2 disproportioniert werden (Wojtaszek, 1997). Reaktiven Sauerstoffspezies wird eine Rolle

sowohl bei der direkten Bekämpfung der eingedrungenen Mikroorganismen als auch der Koordination der weiteren Abwehrreaktionen zugesprochen (Alvarez *et al.*, 1998). Eine sehr wichtige Rolle spielt die hypersensitive Reaktion: Die befallenen Zellen sterben durch eine Apoptose-ähnliche Reaktion ab. Dies kann als der wichtigste Resistenzmechanismus angesehen werden; etwa bei biotrophen Pilzen, die sich über ein Haustorium nur von der lebenden Zelle ernähren können.

Die Inkompatibilität zwischen einer Pflanze und einem Pathogen (d. h., die Resistenz der Pflanze in bezug auf dieses Pathogen) beruht oft auf der Expression komplementärer Gene in der Pflanze und dem Pathogen („gene-for-gene disease resistance“) (Parker und Coleman, 1997). Das entsprechende Gen der Pflanze wird als R-Gen bezeichnet, weil es zur Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen führt; das Fehlen dieses R-Gens führt zur Suszeptibilität, d. h. zur Anfälligkeit der Pflanze.

Ob ein bestimmtes R-Gen der Pflanze Resistenz gegen ein bestimmtes Pathogen verleiht, hängt davon ab, ob das Pathogen das avr-Gen trägt. Die Bezeichnung avr steht für avirulence; ein Pathogen wird durch das Tragen eines avr-Gens avirulent für alle Pflanzen, die das entsprechende R-Gen tragen. Die Rezeptor-Ligand-Hypothese ist in einigen Fällen durch die Bindung des avr-Genprodukts an das R-Genprodukt bestätigt worden.

1.4 Erworbene Resistenz

Der lokale Kontakt mit einem Pathogen kann zu einem Phänomen führen, das formal der Immunisierung bei Säugetieren entspricht: Die Pflanze wird für einen gewissen Zeitraum in erhöhte Abwehrbereitschaft versetzt und dadurch resistent.

Entdeckt wurde dieses Phänomen von Ross im Jahre 1961 (Ross, 1961a; Ross, 1961b) durch Behandlung von Tabak mit abgetöteten TMV-Viren. Da es sich hierbei um eine systemische Antwort der ganzen Pflanze auf einen lokalen Kontakt handelt, wurde dieses Phänomen als systemische erworbene Resistenz (SAR; systemic acquired resistance) bezeichnet in Abgrenzung zur ebenfalls existenten LAR (local acquired resistance).

Es stellt sich die Frage, was die SAR auslöst, und wie das Signal in der Pflanze weitergeleitet wird. Als auslösender Faktor wird eine Mindestmenge an nekrotischen Läsionen angenommen. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen intermediates, ROI) begleitet die HR und ist an der Auslösung der SAR beteiligt (Chen *et al.*, 1993). Die genaue Funktion von ROI und H₂O₂ ist aber umstritten (Dorey *et al.*, 1999). Salizylsäure bindet an Katalase und inhibiert das Enzym; die Implikationen dieser Tatsache sind aber umstritten (Ruffer *et al.*, 1995; Yu *et al.*, 1999). Die Natur des systemischen Signalstoffs ist unbekannt, man weiß aber, daß die Akkumulation von Salizylsäure (SA), die die SAR begleitet, eine „conditio sine qua non“ ist. Beispielsweise sind transgene Pflanzen, die das Gen nahG tragen (ein Gen aus dem Naphthalinabbau; baut Salizylsäure zu Brenzcatechin ab) keine SAR mehr ausbilden (Friedrich *et al.*, 1995). Auch kann die Expression SAR-abhängiger Gene durch exogene Salizylsäure oder 2,6-Dichlorisonicotinsäure, einem SA-Analogen, induziert werden (Durner and Klessig, 1995). Aufgrund von Pfropfungsexperimenten mit nahG-Pflanzen wird aber ein unbekannter systemischer Faktor vermutet, der dann über eine Erhöhung der SA-Konzentration die systemische Resistenz bewirkt.

Auch die Phytohormone Ethylen (Ecker, 1995) und Jasmonsäure (Beale and Ward, 1998) (und das flüchtige Methyljasmonat) sind an den Abwehrreaktionen der Pflanze beteiligt. Es wird neben der SAR noch ein mehr oder weniger unabhängiger Signalweg postuliert, in dem Ethylen und Jasmonat synergistisch wirken, Salizylsäure aber antagonistisch wirkt (Dong, 1998).

Letztlich führen diese Signaltransduktionswege zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an cis-agierende Elemente in Promotoren binden und so zur Aktivierung oder gegebenenfalls auch Repression dieser Gene führen. Die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren kann sowohl durch Neusynthese als auch durch Phosphorylierung (Gu *et al.*, 2000) (Rojo *et al.*, 1998) oder Interaktion mit anderen Proteinen (Xu *et al.*, 1998) erfolgen. Auch durch den Abbau dominant-negativer regulatorischer Faktoren kann die Aktivierung eines Promotors erfolgen (Becker *et al.*, 2000).

2 Materialien und Methoden

2.1 Puffer und Medien

Alle Geräte, Lösungen, Puffer sowie Medien wurden vor Gebrauch durch 30minütiges Erhitzen im Autoklaven bei 120 °C und 1 bar Überdruck sterilisiert. Hitzesensitive Chemikalien und Antibiotika wurden sterilfiltriert und den erkalteten Lösungen beigegeben.

2.2 Enzyme, Kits und Chemikalien

Agar	Roth,
ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applichem Perkin-Elmer
Agarose Typ 1	Sigma
Amplify	Amersham
Anti-Kaninchen-IgG, AP-gekoppelt	Dragoco, Biorad
BCIP-Färbereagens in DMF	Promega
Blotting Papier GB002	Schleicher-Schuell
Bradford-Reagens für Proteinbestimmung	Biorad
Cellulase "Onozuka R-10"	Sigma
Desoxyribonucleotridtriphosphate	Amersham
Expressionssystem Qiaexpressionist™	Qiagen
Filterpapier Whatman 3MM	Schleicher&Schuell
Gamborg B5-Medium	Duchefa
Linsmaier-Skoog-Medium	Duchefa
Maceroenzym R-10	Serva

Methyljasmonat	Duchefa
Miracloth	Calbiochem
NBT-Färbereagenz (Nitrotetrazoliumblau)	Promega
Nitrocellulosefilter BA85 Proteinmolmarker (10kDa-Leiter mit verstärkter 50kDa-Bande)	Schleicher&Schuell Lifetechnologies
Qiagen Gel Extraktion Kit	Qiagen
Röntgenfilme „X-Omat AR“	Kodak
Rotiphorese Gel 30	Roth
Rotiphorese Gel 40	Roth
unlösliches Polyvinylpyrrolidon (Polyclar AT)	Serva
Vent-DNA-Polymerase	New England Biolabs

In der Liste nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Serva, Duchefa oder Sigma bezogen.

Verwendete Bakterienstämme:

<i>E. coli</i> NM 522	<i>hsd</i> Δ5Δ(lac-pro)[F' <i>lac</i> qZ ΔM15pro ⁺]λ
<i>E. coli</i> DH5a	F-O80d <i>lac</i> ZΔ(<i>lac</i> ZYA-argF)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (<i>r</i> _K ⁻ , <i>m</i> _K ⁺) <i>supE44</i> λ ⁻ <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
<i>E. coli</i> M15	<i>Nal</i> ^S <i>Str</i> ^S <i>rif</i> ^S <i>lac</i> ⁻ <i>ara</i> ⁻ <i>gal</i> ⁻ <i>mtl</i> ⁻ <i>F</i> ⁻ <i>recA</i> ⁺ <i>uvr</i> ⁺

2.3 Pflanzenmaterial

2.3.1 Suspensionskulturen

2.3.1.1 Suspensionskulturen von *Vitis vinifera* cv. Optima

Nicht-embryogene Zellkulturen von *Vitis vinifera* cv. Optima waren bereits im Arbeitskreis etabliert (Melchior, 1987). Die Suspensionskultur der Weinzellen erfolgte bei Dauerbeleuchtung in einem bei 24-25 °C klimatisierten Raum auf einem Schüttler bei 116 rpm. Als Kulturgefäße dienten mit 2 Lagen Alufolie verschlossene 250 ml-Erlenmeyerkolben. Die AnzuchtKolben wurden vor Gebrauch in einer Laborspülmaschine gereinigt und staubfrei aufbewahrt.

Als Nährmedium diente nach Schenk und Hildebrandt (Schenk und Hildebrandt, 1972) modifiziertes Gamborg B5-Medium (Gamborg *et al.*, 1968):

Gamborg B5 Salze: (Duchefa)	3,14 g
Saccharose:	30 g
myo-Inositol:	1 g
Vitamine-Stammlösung:	1 ml
Hormone-Stammlösung:	0,5 ml
Vitamine-Stammlösung:	mit bid. H ₂ O auf 1 Liter auffüllen, pH 5,5 mit KOH einstellen 250 mg Thiamin 250 mg Nicotinsäure 25 mg Pyridoxin in 50 ml H ₂ O bid. sterilfiltriert
Hormone-Stammlösung:	50 mg 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure 200 mg p-Chlorphenoxyessigsäure 10 mg Kinetin 150 mg NaOH in 50 ml H ₂ O bid. sterilfiltriert

2.3.1.2 Suspensionskultur von *Nicotiana tabacum*

Zum Anlegen einer Suspensionskultur von transgenem Tabak mit einer Fusion des Promotors des Gen PST1 mit dem Gen der β -Glucuronidase (GUS) wurden Blattstücken (1-2 cm²) der entsprechenden Tabaklinie auf kallusinduzierenden LS-Agar gelegt. Nach 3-4 Wochen hatte sich an den Wundrändern Kallusgewebe gebildet. Die Kalli wurden separat wie unter 2.3.2 angegeben kultiviert. Zum Anlegen der Suspensionskultur wurden einige Gramm Kallusgewebe in einem Kolben mit B5/SH-Medium geschüttelt. Nach 2 Wochen hatte sich eine Suspensionskultur gebildet, die analog zu 2.3.1.1 wöchentlich umgesetzt wurde.

Kallusinduzierendes LS (Linsmaier-Skoog)- Medium:	4 g LS-Salze (Duchefa)
	20 g Saccharose
	1 mg Naphtylessigsäure (NAA)
	0,2 mg Kinetin
	auf 1l H ₂ O dest.
	pH 6,0 mit 0,1 M KOH einstellen
	autoklavieren
für Platten:	8 g/l Agar

2.3.2 Kalluskulturen

Kalluskulturen dienen als Reserve für die Weinzellkulturen bzw. als Vorstufe zu Tabak-Suspensionskulturen.

Das Medium entspricht dem für die Suspensionskulturen verwendeten B5/SH-Medium mit dem Zusatz von 1,5 % Agar. Die Kultur erfolgte in Petrischalen von 9 cm Durchmesser bei 24 °C und Dauerbeleuchtung. Beim Überimpfen im vierwöchigen Rhythmus wurde die Agarfläche der neuen Petrischalen mit einem sterilen Skalpell angeraut und eine etwa walnußgroße Kallusmenge auf die Agarfläche aufgedrückt. Die Platten wurden mit Parafilm verschlossen und mit dem Boden nach oben kultiviert.

2.3.3 Kultivierung von Tabakpflanzen

Sterile Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 sowie davon abgeleitete transgene Linien) wurden in einem auf 26 °C temperierten Raum unter Kunstlicht (1500-3000 Lux) mit einer Hell/Dunkel-Periode von 16/8 h in Magenta-Vesseln angezogen. Es wurde das Nährmedium nach Linsmaier-Skoog (Linsmaier und Skoog, 1965) mit Zusatz von 0,8 % Agar benutzt. Zur Vermehrung wurden Sprossspitzen mit 2-3 Blättern abgeschnitten und in LS-Agar gesteckt. Transgene Tabakpflanzen wurden auf LS-Agar mit 75 µg Kanamycin/ml als Selektionsmarker angezogen.

LS-Medium:	4 g LS-Salze (Duchefa) 20 g Saccharose auf 1l H ₂ O dest. pH 6,0 mit 0,1 M KOH einstellen autoklavieren
LS-Agar:	LS-Medium 8 g/l Agar (Roth) autoklavieren
LS-Medium/Kanamycin:	LS-Medium 75mg /l Kanamycin nach Autoklavieren steril zufügen

2.3.4 Anzucht von *Pinus sylvestris*

Samen von *Pinus sylvestris* L. Westdeutsches Bergland (Staatsdarre Wolfgang, Hanau) wurden in sterilem Leitungswasser 24 h vorgequollen und auf feuchtes steriles Vermiculite ausgesät. Die Kultur erfolgte in zylindrischen 2 l-Gläsern unter einem Hell/Dunkel-Wechsel von 12/12 h bei 20 °C.

Die Kultur erfolgte keimarm aber nicht steril, da die Gläser zur Vermeidung von Pilzbefall nicht verschlossen wurden. Zum Wässern wurde autoklaviertes Leitungswasser verwendet.

2.4 Pilzmaterial

2.4.1 Kultur von *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea DSM 877 „teaching strain“ wurde von der DSMZ in Braunschweig bezogen und auf PD-Agar kultiviert. Die Flüssigkultur erfolgte in Fernbach-Kolben mit 200 ml PD-

Flüssigmedium. Alle vier Wochen wurden die Sporen durch Abklopfen auf neue Petrischalen aufgebracht und die Petrischalen mit Parafilm verschlossen im Dunkeln bei 22 °C inkubiert.

PD-Medium: (Potato-Dextrose-Medium)	200 g Kartoffeln wurden in 900 ml Leitungswasser für 20 min gekocht. Die Lösung wurde durch Miracloth filtriert und auf 950 ml aufgefüllt. Nach dem Autoklavieren wurden 20 g Glucose in 50 ml Wasser steril zugegeben.
PD-Agar:	PD-Medium 10 g/l Agar autoklavieren

Zur Gewinnung einer Sporensuspension wurden vier Wochen alte Platten mit *B. cinerea* mit 10 ml LS-Medium überschichtet und mit einem Spatel vorsichtig abgeschabt.

2.5 Arbeiten mit DNA

Alle grundlegenden Arbeitsschritte beim Umgang mit DNA wurden durchgeführt nach Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989).

2.5.1 Extraktion mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol

Zum Entfernen von Proteinen aus Präparationen von Nucleinsäuren mischte man die nucleinsäurehaltige Lösung mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und zentrifugierte zur Phasentrennung 5 min bei 15000*g. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die Extraktion so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr sichtbar war. Die wässrige Phase wurde abschließend mit 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, um Phenolreste zu entfernen. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt.

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol:	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (24/24/1) (v/v/v); TE-gesättigt
Chloroform/Isoamylalkohol:	Chloroform/Isoamylalkohol (24/1) (v/v); TE-gesättigt
TE-Puffer:	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0

2.5.2 Ethanolfällung

Um Nucleinsäuren aus wässrigen Lösungen zu fällen, wurde eine Ethanolfällung durchgeführt.

Herzu wurde die Lösung auf 300 mM Natriumacetat gebracht und mit dem 2,5fachen Volumen an Ethanol versetzt. Nach Inkubation bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ über Nacht wurde die DNA durch Zentrifugation (30 min, 15000*g) gefällt. Die gefällte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, abzentrifugiert und das Pellet in TE-Puffer aufgenommen.

3 M Natriumacetat, pH 5,2

Ethanol 96 %

Ethanol 70 %

2.5.3 Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab (Miniprep)

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab wurden 1 bis 2 ml einer Übernachtskultur des betreffenden Bakterienklons in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und die DNA nach alkalischer Lyse des Bakterienpellets mit dem Qiagen Spin Miniprep KitTM nach Protokoll des Herstellers isoliert.

Als Medium für Bakterienkulturen von *E. coli* diente stets LB-Medium mit den jeweiligen Selektionsmarkern.

LB-Medium:	10 g Bactotrypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl auf 1 l dest. H ₂ O auffüllen autoklavieren
für Platten:	LB-Medium 15 g/l Agar
LB/Amp.	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin
LB/Kana.	LB-Medium 25 µg Kanamycin
LB/Strept.	LB-Medium 50 µg Streptomycin

2.5.4 Präparation von DNA im mittleren und großen Maßstab

Größere Mengen an Plasmid-DNA von 100 µg bis 500 µg wurden mit dem Qiagen Midi Kit™ bzw. dem Qiagen Maxi Kit™ nach dem Protokoll des Herstellers (beide Fa. Qiagen) isoliert.

Es wurden 100 bzw. 200 ml-Übernachtskulturen des betreffenden Bakterienklons abzentrifugiert und die DNA nach alkalischer Lyse des Bakterienpellets durch Anionenaustauschersäulchen aufgereinigt.

2.5.5 Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse oder Präparation von DNA-Fragmenten wurden Agarosegele verwendet.

Elektrodenpuffer	40 mM Tris
1*TAE:	20 mM Natriumacetat
	mit Eisessig auf pH 7,2 einstellen
	1 mM EDTA zugeben
6*Probenpuffer	0,25 % (w/v) Bromphenolblau
	0,25 % Xylencyanol
	15 % Ficoll Typ 400

Die Suspension von Agarose in 1*TAE wurde mehrere Male in einer Mikrowelle kurz aufgekocht und nach Abkühlen auf 60 °C in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen. Nach dem Erstarren und Überschichten mit 1*TAE in einer Flachbett-Elektrophoreseapparatur wurde der Kamm gezogen und die Taschen mit den Proben beschriftet.

Als Elektrodenpuffer wurde 1*TAE verwendet. Die Elektrophorese wurde 2 h bei 80 V durchgeführt und das Gel dann in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt. Nach 20 min Entfärbung in Wasser wurde das Gel in einem UV-Transilluminator betrachtet und fotografiert.

DNA-Längenstandards:

Folgende DNA-Molmarker wurden verwendet (Fa. Boehringer):

MM VII (in kbp): 8,0; 7,1; 6,0; 4,8; 3,5; 2,7; 1,9; 1,85; 1,5; 1,4; 1,14; 1,0; 0,68; 0,49; 0,37

MM X (in kbp): 12,2; 11,2; 10,2; 9,2; 8,1; 7,1; 6,1; 5,1; 4,1; 3,1; 2,0; 1,6; 1,0; 0,52; 0,51; 0,4; 0,34; 0,30; 0,22; 0,20; 0,15; 0,13; 0,08

2.5.6 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von zu klonierenden DNA-Fragmenten benutzt (Saiki *et al.*, 1988). Es wurde nach Innis (Innis *et al.*, 1990) vorgegangen. Die Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion wurde in einem Thermocycler der Fa. Perkin-Elmer, Modell 2400 mit Deckelheizung durchgeführt. Die Deckelheizung erlaubt den Verzicht auf Paraffinöl in den Reaktionsgefäßen. Annealing-Temperaturen für PCR-Primer wurden nach folgender Formel abgeschätzt:

$$T_M = 4 * G/C + 2 * A/T$$

Zur Amplifikation wurde VentTM-Polymerase (New England Biolabs) eingesetzt. Eine typische PCR-Reaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

10 µl 10*Vent Polymerase-Puffer	
4 µl Primer 1	40 pmol
4 µl Primer 2	40 pmol
50-200 ng Template-DNA ad 99µl H ₂ O	
1 µl Vent-Polymerase	2 U

5 min 94 °C	
Primer-Anlagerung :	1 min
Elongation:	2 min/kbp; 72 °C
Denaturierung:	30 s 94 °C

Bei schwierigen Templates wurde eine sog. touchdown-PCR durchgeführt. Hierbei wird die Annealing-Temperatur pro Zyklus um 0,1 °C abgesenkt. Durch die höhere Spezifität der ersten PCR-Produkte erzielt man bessere Spezifität und Ausbeute.

2.5.7 Cycle-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten wurde eine modifizierte Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) verwendet. Hierbei sind die vier Didesoxynucleotide mit jeweils unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt. Dadurch ist die Sequenzierung mit jeweils einem statt vier Reaktionsansätzen pro Sequenz möglich. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgt dann während des Gellaufs durch Anregung mit einem Laser und Messen des emittierten Fluoreszenzlichtes.

Verwendet wurde das „Abi Prism dye terminator cycle sequencing reaction Kit“ der Fa. Perkin-Elmer. Hierbei sind im „Terminator mix“ die farbstoffmarkierten Didesoxynucleotide mit einer Polymerase bereits enthalten. Die Sequenzierung erfolgte in einer asymmetrischen PCR

Sequenzierreaktion:	10 pmol Primer 100-200 ng Plasmid-DNA mit H ₂ O auf 16 µl auffüllen Zugabe von 4 µl Terminator Ready Reaction Mix
----------------------------	---

Folgendes Temperaturprofil wurde für die PCR benutzt:

Denaturierung:	96 °C, 10 s
Annealing:	50 °C, 5 s
Elongation :	60 °C, 4 min
25 Cyclen	
Anschließend Stoppen der Reaktion bei 4 °C	

Nach der Beendigung der Sequenzierreaktion wurde der Ansatz mit Ethanol gefällt, um freie Nukleotide zu entfernen, zentrifugiert (30 min, 4 °C, 15000*g), der Überstand sehr vorsichtig entfernt und das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Entfernen des Überstandes wurde das Pellet getrocknet und in 4 µl Probenpuffer aufgenommen.

Die Probe wurde 2 min bei 95 °C denaturiert und 2 µl auf ein Sequenziergel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte in einem ABI 377-Sequenziergerät der Fa. Perkin-Elmer.

Probenpuffer:	80 % (v/v) Formamid entionisiert 5 mM EDTA, pH 8,0 1 % (w/v) Dextranblau
----------------------	--

2.5.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurden in Quarzküvetten bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Die DNA wurde 1:500 in 1 ml Wasser verdünnt und die Extinktion gemessen.

1 A₂₆₀ entspricht dann

50 µg ds-DNA
33 µg ss-DNA

Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ ist ein Maß für die Reinheit der DNA und sollte bei 1,8-2,0 liegen.

2.5.9 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Qiagen Gel Extraktion KitTM über Schleudersaulchen aufgereinigt.

2.5.10 Extraktion von genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion methylierter DNA aus Wein- und Tabakkulturen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach Lodhi (Lodhi *et al.*, 1994) unter Verwendung des Detergens CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid).

Zur DNA-Extraktion wurden zwei Gramm Zellen unter flüssigem Stickstoff 10 min gemörsert. Nach Untermischen von 250 mg unlöslichem Polyvinylpyrrolidon (Polyclar AT) zur Bindung von Phenolen wurde das gemörserte Material in 20 ml Extraktionspuffer suspendiert und noch 30 min bei 60 °C inkubiert. Nach zwei Extraktionsschritten mit Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v) wurde die wässrige Phase mit 0,5 Volumina 5 M NaCl veretzt. Durch Zugabe von 2 Volumina Ethanol wurde die DNA über Nacht bei -20 °C gefällt.

Das DNA-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und zum Lösen der chromosomalen DNA 24 h bei 4 °C inkubiert.

Lodhi-Extraktionspuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 20 mM EDTA 1,4 M NaCl 2 % CTAB (Cetyltrimethylammoniumbromid) 2 % β-Mercaptoethanol
5 M NaCl	
Chloroform/Isoamylalkohol	Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v) mit TE-Puffer äquilibriert
sonstige Lösungen:	
96 % (v/v) Ethanol	
70 % (v/v) Ethanol	
TE-Puffer	

2.5.11 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen

Der Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte nach Angaben des Herstellers (Fa. Amersham, Fa. NEB) unter Verwendung der mitgelieferten Puffer.

2.5.12 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Geschnittene Vektor-DNA wurde vor Klonierungen mit shrimps alkaline phosphatase (SAP, Fa. Amersham) dephosphoryliert.

10 µg Plasmid-DNA
2 µl 10*SAP-Puffer
Auffüllen mit H₂O auf 18 µl
Zugabe von 2 µl SAP
Inkubation für 45 min bei 37 °C

Nach Beendigung der Reaktion wurde die SAP durch Hitzeinaktivierung (10 min, 68 °C) zerstört. Der Vorteil der SAP gegenüber CIP (calf intestine phosphatase) liegt in der vollständigen Hitzeinaktivierung, so dass der Reaktionsansatz direkt für Ligationen verwendet werden kann.

2.5.13 Ligation von DNA

Ligation von DNA-Fragmenten in geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA erfolgte mit T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers. Die Ligation wurde in einem Volumen von 20 µl bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

2.5.14 Radioaktive Markierung von synthetischen Oligonukleotiden

Synthetische Oligonukleotide wurden mit Polynukleotid-Kinase T4 und [γ -³²P]-ATP radioaktiv markiert

10 pmol Oligonukleotid
2 µl 10*T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer
6 µl [γ -³²P]ATP (20 pmol)
mit H₂O auf 18 µl auffüllen
Zugabe von 2 µl T4-Polynukleotid-Kinase (6 U)

Der Ansatz wurde 30 min bei 37 °C inkubiert und durch Erhitzen auf 65 °C für 5 min gestoppt.

2.5.15 DMS-Behandlung von Suspensionskulturzellen

Zur *in-vivo*-Methylierung von Suspensionskulturen wurden 65 ml-Kulturen von Wein- oder Tabakzellen mit 0,1 % Dimethylsulfat 5 min bei Raumtemperatur und starkem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Zellen abgenutscht, mit einem Liter bid. H₂O gewaschen und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte bei – 80 °C bis zur weiteren Verwendung.

2.5.16 Spaltung von methylierter genomischer DNA

Aus mit Dimethylsulfat behandelten Zellen wurde die DNA nach Lodhi (Lodhi *et al.*, 1994) isoliert. Anschließend wurden 50-75 µg der methylierten genomischen DNA 30 min in 1 M Piperidin im kochenden Wasserbad bei 100 °C inkubiert, die Lösung mehrfach einrotiert und mit bid. H₂O wiederaufgefüllt. Anschließend wurde eine Ethanol-fällung durchgeführt, die DNA photometrisch bestimmt und durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.5.17 *In-vivo*-footprinting

Die Methode des *in-vivo*-footprinting mit LMPCR wurde von Garrity und Wold (Garrity und Wold, 1992) entwickelt. Es wurde nach Müller (Müller *et al.*, 1992) vorgegangen. Für die Erststrangsynthese wurden 5 µl (2 µg) der Piperidin-gespaltenen DNA in einem eiskalten Mikrozentrifugationsgefäß vorgelegt und mit 25 µl Erststrangmix versetzt. Die Lösung wurde bis zur Erststrangsynthese auf Eis aufbewahrt. Die Erststrangsynthese wurde in einem Thermocycler (Perkin-Elmer, Modell 2400) mit folgenden Temperaturprofil durchgeführt:

Denaturierung:	95 °C, 5 min
Annealing:	42-46 °C, 30 min
Erststrangsynthese:	72 °C, 10 min

Lagerung auf Eis bis zur weiteren Verwendung

Nach einer Ethanol-fällung wurde das Pellet in 10 µl TE-Puffer aufgenommen, mit 5 µl Linker-Primer-Mix versetzt, auf 45 µl aufgefüllt und 4 µl T4-DNA-Ligase 10*-Puffer zugegeben. Nach gründlichem Mischen erfolgte Zugabe von 1 µl T4-DNA-Ligase (Amersham) und Ligation bei 16 °C über Nacht.

Der Ligationsansatz wurde mit Ethanol gefällt und in 30 µl Wasser aufgenommen.

Diese Lösung wurde vollständig eingesetzt als Matrize für eine PCR (Gesamtvolumen 100 µl). Die PCR wurde mit dem genspezifischen Primer 2 und dem linkerspezifischen Primer durchgeführt.

Nach 18 Cyclen wurden 6 µl (3 pmol) eines markierten genspezifischen Primer 3 sowie frische VentTM-Polymerase (1 U) zugegeben. Es folgten weitere zwei PCR-Cyclen bei der Annealing-Temperatur des Primer 3.

Nach Ethanol-fällung des Ansatzes wurden die radioaktiven PCR-Fragmente auf einem Gel nach Maxam-Gilbert aufgetrennt, das Gel getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

Erststrangmix:	10 pmol genspezifischer Primer 1 3 µl 10*Vent-Polymerase-Puffer 1 U Vent-Polymerase
Linker-Primer-Mix:	auf 25 µl mit bid. H ₂ O 20 µM Primer LM1 20 µM Primer LM2 250 mM Tris/HCl, pH 7,7
	Die Lösung der Primer wurde 5 min bei 95 °C inkubiert und dann in einem Thermocycler innerhalb einer Stunde von 70 °C auf 20 °C heruntergekühlt. Nach einer weiteren Stunde bei Raumtemperatur wurde die Mischung von 20 °C langsam auf 4 °C abgekühlt, über Nacht bei 4 °C inkubiert und aliquotiert eingefroren.

2.5.18 Gelelektrophorese nach Maxam und Gilbert

Die Analyse der PCR-Produkte aus den *in-vivo*-footprinting-Experimenten erfolgte mit Hilfe eines Sequenziergels nach Maxam-Gilbert (Maxam und Gilbert, 1980).

Die Glasplatten (60*27 cm) wurden mit Wasser, Ethanol und Isopropanol in dieser Reihenfolge sorgfältig entfettet. Die Rückenplatte wurde mit Bindsilan behandelt, die Ohrenplatte mit „GelslickTM“ zur besseren Ablösung vom Gel. Die Glasplatten mit den Spacern wurden zusammengebaut und mit einem Teil der vorbereiteten Acrylamidlösung ein Sockel am unteren Ende der Platten gegossen. Nach der Polymerisation des Sockels wurde das Gel luftblasenfrei gegossen und die glatte Seite eines Haifischzahnkamms als Vorkamm eingesetzt. Das Gel wurde in eine vertikale Elektrophoreseapparatur eingespannt und mit Elektrodenpuffer überschichtet. Der Vorkamm wurde gezogen, umgedreht und mit den Zähnen voran in das Gel eingesetzt, so dass die Zähne maximal 2 mm in das Gel eindringen. Der Zwischenraum zwischen den Zähnen diente dann als Taschen.

Die Taschen wurden sehr sorgfältig mit Elektrodenpuffer gespült. Nach 30 minütigem Vorlauf wurden die Proben aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte dann bei 1,8 kV für 4-7 h.

Im Anschluss wurde die Ohrenplatte vorsichtig abgehoben, das Gel 30 min in Waschlösung gewaschen und 1 h bei 60 °C getrocknet. Im Anschluss erfolgte eine Autoradiographie durch Auflegen eines Röntgenfilms (X-Omat AR, Fa. Kodak).

Ethanol	
Isopropanol	
Gelslick™	
Bindesilan	10 ml Ethanol 300 µl 10 % (v/v) Essigsäure 30 µl 3-Methacryloxypropyltrimethoxysilan
10*TBE	1 M Tris 1 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,3
10*TBE/Harnstoff	50 % (w/v) Harnstoff in 10*TBE
5%-Gel:	15 ml Rotiphorese-Sequenziergelkonzentrat 7,5 ml 10*TBE/Harnstoff 52,5 ml 50% Harnstoff
Elektrophoresepuffer:	Polymerisation mit 30 µl TEMED 300 µl 10 % (v/v) Ammoniumperoxodisulfat 1*TBE
Waschlösung:	10 % (v/v) Essigsäure 10 % (v/v) Ethanol
Probenpuffer:	80 % Formamid entionisiert 50 mM Tris 50 mM Borsäure 1mM EDTA 0,05 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (w/v) Xylencyanol

2.5.19 Ortsspezifische Mutagenese:

Zur ortsspezifischen Mutagenese von Plasmiden wurde das QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit der Fa. Stratagene verwendet. Die Verwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.5.20 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurde das Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983) verwendet.

Zunächst wurden 100 ml LB-Medium (mit 25 µg/ml Kanamycin im Falle von M15[pRep4]-Zellen) mit 1 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C und 225 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und das Bakterienpellet in 15 ml eiskaltem TfbI-Puffer resuspendiert

Die resuspendierten Bakterien wurden 15 min auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml eiskaltem TfbII-Puffer resuspendiert und zu 100 µl-Aliquots in vorgekühlte, sterile Eppendorf-Cups abgefüllt.

Nach Schockfrieren der kompetenten Bakterien in einem Ethanol/Trockeneisbad waren die bei -80 °C gelagerten Bakterien etwa 6 Monate für Klonierungen geeignet.

TfbI:	90 mM Kaliumacetat, mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen 10 mM CaCl ₂ 0,5 mM LiCl 100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 15 % (v/v) Glycerin
--------------	--

sterilfiltriert

Tfb II:	10 mM MOPS mit NaOH auf pH 7,0 einstellen 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin
----------------	--

sterilfiltriert

2.5.21 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation von selbst hergestellten chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen wurden 100 µl-Aliquots auf Eis aufgetaut und mit dem Ligationsansatz gemischt. Der

Transformationsansatz wurde mindestens 1 h auf Eis inkubiert und dann 90 Sekunden in ein auf 42 °C temperiertes Wasserbad transferiert. Nach dem Hitzeschock wurden die Zellen noch 5 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde dann mit sterilem LB-Medium auf 1 ml aufgefüllt und zur Expression der Antibiotika-Resistenz 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Um in jedem Fall Einzelkolonien isolieren zu können, wurde zunächst 100 µl des Transformationsansatzes ausplattiert. Nach Abzentrifugation in einer Tischzentrifuge wurde dann das Pellet mit 90 % der Bakterien resuspendiert und auf eine zweite LB-Platte ausplattiert. DH5α-Zellen sind kommerziell verfügbar. Die Transformation erfolgte genauso wie bei selbst hergestellten kompetenten Zellen, aber es wurden 50 µl-Aliquots verwendet, und als Hitzeschock wurden 90 Sekunden bei 37 °C verwendet.

2.5.21.1 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* LB-A4404

Elektrokompetente Zellen waren kommerziell verfügbar (Fa. Clontech) Als Alternative zur Elektrottransformation wurde auch das „freeze-thaw“-Protokoll verwendet. Dieses Verfahren hat zwar nur sehr geringe Transformationseffizienzen, zeichnet sich aber durch geringen Arbeitsaufwand aus.

Für die Transformation wurde zunächst eine 100 ml-Kultur in einem 1-Liter-Erlenmeyerkolben mit 2 ml einer Übernachtskultur von *A. tumefaciens* LB-A 4404 angeimpft und 6 h bei 30 °C und 250 rpm geschüttelt. Als Medium diente LB/Streptomycin. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet (JA14, 4000*g, 4 °C).

Sämtliche weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt.

Das Bakterienpellet wurde mit 50 ml eiskaltem Tris-Puffer (pH 7,5) gewaschen und erneut durch Zentrifugation wie oben pelletiert. Das so erhaltene gewaschene Bakterienpellet wurde in 1 ml LB-Medium resuspendiert und zur weiteren Transformation auf Eis gelagert.

Für die Transformation wurden 5 µg Plasmid-DNA vorgelegt und mit 200 µl Bakteriensuspension versetzt. Als Plasmide wurden pBI101.3-Vektoren verwendet (Fa. Clontech). Diese sind für Promotor-GUS-Fusionen konzipiert (Jefferson, 1987) Der Transformationsansatz wurde sofort für 5 min in einem Ethanol/Trockeneisbad tiefgefroren und anschließend für 25 min in einem Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium zu jedem Transformationsansatz wurden die Ansätze nochmals 30 min bei 37 °C inkubiert und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur.

Am nächsten Tag wurden 10 % und 90 % jedes Transformationsansatzes auf LB/Kanamycin/Streptomycin-Agarplatten ausplattiert und bis zum Erscheinen von Kolonien bei 28 °C inkubiert. Dies dauerte 2-4 Tage.

Einzelkolonien wurden gepickt und mehrmals auf LB/Kanamycin/Streptomycin-Platten ausgestrichen und auf die richtigen Antibiotikaresistenzen geprüft.

2.5.22 Herstellung transgener Tabakpflanzen

Sterile Sprosspflanzen von Tabak (*Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1) dienten als Ausgangsmaterial zur Transformation. Es wurde ein Protokoll zur Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* nach dem „leaf-disk“-Methode verwendet (Horsch, 1985). Es wurde eine 3 ml-Übernachtskultur von *A. tumefaciens* mit dem jeweiligen pBI-Plasmid in YEB/ Strept./Kana-Medium angelegt (29 °C, 250 rpm). Die Bakterien wurden bei 4000*g abzentrifugiert, mit 2 ml YEB-Medium gewaschen und in wiederum 2 ml YEB-Medium aufgenommen.

Zur Transformation von Tabak wurden 1-2 cm² große Blattstückchen von 4 Wochen alten SR1-Pflanzen auf LS-Platten gelegt, die Blattränder angedrückt und 40-60 µl der Agrobakteriensuspension unter die Blattstückchen pipettiert.

Die Petrischalen wurden zunächst über Nacht bei 25 °C inkubiert, mit Parafilm verschlossen und weitere 3 Tage inkubiert. Die Blattstückchen wurden zur weitgehenden Entfernung der Agrobakterien mindestens dreimal mit LS-Medium gewaschen. Anschließend wurden sie auf LS/BAP/Cef./Kana.-Platten gelegt und leicht eingedrückt. Hierbei erfolgt die Induktion der Sprossbildung durch Benzylaminopurin (BAP). Cefotaxim tötet die Agrobakterien ab, und Kanamycin dient der Selektion auf transformierten Tabak. Die Inkubation erfolgte bei 25 °C und einem 16/8 h Hell/Dunkel-Wechsel. Im Laufe von zwei bis drei Wochen bildeten sich Sprosse, die auf LS/Cef./Kana.-Platten vereinzelt wurden. Nach mehrmaligem Umsetzen konnte das Cefotaxim weggelassen werden.

YEB-Medium:	<p>5 g Fleischextrakt (Difco) 1 g Hefeextrakt (Difco) 5 g Bactotrypton 5 g Saccharose 2 ml 1 M MgSO₄ ad 1 l H₂O pH 7,2 mit KOH einstellen</p> <p>autoklavieren</p>
YEB/Streptomycin/Kanamycin-Medium	<p>YEB-Medium 25 mg/l Streptomycin 50 mg/l Kanamycin</p> <p>beide nach Autoklavieren steril zufügen</p>
LS-Medium:	<p>4 g LS-Salze 20 g Saccharose ad 1 l H₂O pH 6,0 mit KOH einstellen</p>
LS-Platten/Vessel:	<p>LS-Medium 8 g/l Agar</p>
LS-Medium:	<p>4 g LS-Salze 20 g Saccharose ad 1 l H₂O pH 6,0 mit KOH einstellen</p>
LS/BAP/Cef./Kanamycin-Medium:	<p>0,5 mg Benzylaminopurin 500 mg Cefotaxim 75 mg Kanamycin</p> <p>auf 1 l LS-Medium</p>
LS/Cef./Kanamycin-Medium:	<p>500 mg Cefotaxim 75 mg Kanamycin</p> <p>auf 1 l LS-Medium</p>
LS/Kanamycin-Medium:	<p>75 mg Kanamycin</p> <p>auf 1 l LS-Medium</p>
für Platten und Vessels:	<p>8 g/l Agar</p>

2.5.23 Transiente Transformation von Weinprotoplasten

Zum Aktivitätsvergleich von Promotor/GUS-Fusionen diente die transiente Transformation von Weinprotoplasten. Die zu untersuchenden Promotorfragmente wurden in den Vektor pBI221 (Fa. Clontech) kloniert, so dass das Gen für die β -Glucuronidase unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors steht (Jefferson, 1987).

Für die transiente Transformation wurden stets 8 d alte Weinzellen verwendet. Der Inhalt eines 65ml-Kulturkolbens wurde über zwei Lagen Miracloth unter leichtem Wasserstrahlvakuum filtriert und mit 400 ml 0,7 M Mannit gewaschen. Die Zellen wurden dann mit einem sterilen Löffel in 50 ml Puffer A/Enzyme aufgenommen und 1 h bei 25 °C und 116 rpm (Anzuchtbedingungen der Weinzellen) geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in Glaszentrifugenbechern bei 600*g und Raumtemperatur. Das Protoplastenpellet wurde dreimal mit je 20 ml Puffer A gewaschen und erneut abzentrifugiert.

Puffer A	400 mM Mannit 50 mM CaCl ₂ 25 mM Mes/KOH, pH 5,5
Puffer A/Enzyme:	Puffer A 0,6 % (w/v) Cellulase „Onozuka R10“ 0,4 % (w/v) Maceroenzym R10
sonstige Lösungen:	0,7 M Mannit

Zur transienten Transformation wurden 200 μ l der Protoplastensuspension ($6-9 \cdot 10^6$ Zellen/ml) und 200 μ l der 25 %igen PEG-Lösung in einer Petrischale vorgegeben. Zunächst wurden die Protoplasten sehr vorsichtig mit 20 μ l der Plasmid-Lösung (1 μ g/ μ l) gemischt. Dann ließ man den PEG-Tropfen in die Protoplastensuspension hineinlaufen, indem man ihn mit Hilfe einer Pipettenspitze in Kontakt brachte. Durch die Oberflächenspannung und vorsichtiges mechanisches Rühren vermischten sich dann die beiden Tropfen. Nach 20minütiger Inkubation wurden 5 ml Waschlösung an den Rand der Protoplastensuspension pipettiert und danach weitere 10 min bei RT stehen lassen. Danach wurde die Lösung mit einer weithalsigen Pipette in ein 12ml-Zentrifugenröhrchen (JA20.1) überführt, die Petrischale mit 5 ml W5-Medium gespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt (600*g, 5 min, RT) wurden die Protoplastenpellet in 3 ml Puffer A ohne Enzyme aufgenommen und in Schrägstellung 24 h im Dunkeln inkubiert.

25 % PEG:	0,1 M Ca(NO ₃) ₂ 0,45 M Mannit 25 % (w/v) PEG (Polyethylenglykol) 6000 pH 9,0 sterilfiltriert
Waschlösung:	0,275 M Ca(NO ₃) ₂ pH 5,5 sterilfiltriert
W5-Medium:	125 mM CaCl ₂ 155 mM NaCl 5 mM KCl 5 mM Glucose pH 5,6 sterilfiltriert

Das Protoplastenpellet wurde in 250 µl Lysis-Puffer aufgenommen und mindestens 2 min mittels eines Vortex aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation (15 min, 15000*g, 4 °C) und sofortige Abnahme des Überstandes. Mit 10 µl des Überstandes wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt

Der β-Glucuronidase-Test wurde in einem Gesamtvolumen von 1 ml Lysispuffer durchgeführt. Hierzu wurde vom jeweiligen Überstand eine 50 µg entsprechende Menge vorgelegt und mit Lysispuffer auf 500 µl aufgefüllt. Danach wurden 500 µl der MUG-Lösung in Lysispuffer dazugegeben. Für den β-Glucuronidase-Test wurden die Ansätze bei 37 °C inkubiert.

Nach verschiedenen Zeiten (15 und 22 h) wurden 200 µl-Aliquots entnommen und durch Zugabe von 1,8 ml StoppLösung die Reaktion abgestoppt. Die Bestimmung des Produkts 4-MU erfolgte in 3 ml-Fluoreszenzküvetten an einem Fluoreszenzphotometer (Baird-Atomic, Model SF-100). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Vermessen von Referenzlösungen von 4-MU und Erstellen von Eichgeraden. Die Gesamtmenge an 4-MU wurde in pmole gebildetes 4-MU pro Minute pro mg Gesamtprotein umgerechnet.

Lysis-Puffer:	50 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,0 10 mM EDTA 0,1 % (w/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) SDS
MUG-Lösung:	10 mM β-Mercaptoethanol 4 mM 4-MUG (4-Methyl-β-D-Umbelliferylglucuronid) in Lysis-Puffer
Stopp-Lösung:	0,2 M Na ₂ CO ₃

2.5.24 Infektion von *N. tabacum* mit einem viralen Vektor

Zur Infektion von *Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1 mit dem Vektor TXS-GFP wurde nach Baulcombe (Baulcombe *et al.*, 1995) vorgegangen. Das Plasmid TXS-GFP wurde freundlicherweise von Prof. D. Baulcombe zur Verfügung gestellt. Das Plasmid TXS-GFP enthält die cDNA des PVX-Virus hinter dem T7-Promotor. Zwischen dem Gen M3 und dem Gen CP ist das GFP-Gen in die PVX-cDNA eingefügt. Das Plasmid TXS-GFP wurde mit SpeI linearisiert und mit Phenol/Chloroform extrahiert. Nach Ethanol-Fällung wurde die DNA zur *in-vitro*-Translation verwendet.

10 µl 10*Transkriptionspuffer
20 µl NTPs
5 µl m7-GpppG
2 µl RNase-Inhibitor
3 µl T7-Polymerase
auf 100 µl mit DEPC-behandeltem Wasser

Der Ansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die RNA mit Ethanol gefällt. Auf eine DNase-Behandlung wurde verzichtet, da auch die auf dem Plasmid vorliegende cDNA des PVX-Virus infektiös ist. Die DNA wurde in Phosphatpuffer aufgenommen. Blätter von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 wurden mit einer Nadel mechanisch verletzt und die DNA-Lösung auf die verletzten Blätter pipettiert. Die weitere Inkubation erfolgte unter Anzuchtbedingungen.

Zur Prüfung, ob die Infektion des Tabaks erfolgreich verlaufen war, wurden die Pflanzen 7 d nach der Infektion unter UV-Licht (366 nm) neben mit Wasser mock-inokulierten Pflanzen fotografiert. Um geringe Mengen an GFP detektieren zu können, wurden ein Extrakt aus den infizierten und mock-infizierten Blättern hergestellt. Hierzu wurden die Blätter im doppelten Volumen an Aufschlusspuffer mit dem Mörser zerkleinert, über Miracloth filtriert, abzentrifugiert (15000*g, Tischzentrifuge), und der Überstand im Verhältnis 1:10 mit Aufschlusspuffer verdünnt. Von dieser Lösung wurden 2,5 ml auf eine mit Aufschlusspuffer äquilibrierte PD-10-Säule aufgetragen und mit 3,5 ml Aufschlusspuffer eluiert. Das Eluat wurde fluoreszenzphotometrisch vermessen.

Die Extrakte wurden ebenfalls unverdünnt auf ein SDS-Gel nach Laemmli (1970) aufgetragen und elektrophoretisch analysiert. Hierbei wurde auf das Kochen mit SDS-Probenpuffer verzichtet. Die Gele wurden nach der Elektrophorese ungefärbt unter einem UV-Durchlichtschirm bei 306 nm betrachtet.

2.6 Arbeiten mit Proteinen

2.6.1 Aufarbeitung rekombinanter Proteine aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen

Es wurde das System Qiaexpressionist™ der Fa. Qiagen zur Überexpression von Proteinen in *E. coli* verwendet. Der Vektor pQE30 (Fa. Qiagen) wurde für die Expression N-terminaler His₆-Fusionsproteine verwendet.

Zur Überprüfung, ob ein Protein in *E. coli* induzierbar exprimiert wird, wurden unter den gewählten Induktionsbedingungen vor und nach Induktion mit 0,5-1 mM IPTG Proben der Bakteriensuspension genommen. Die Induktion erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5-07. Nach Abzentrifugation wurde das Bakterienpellet direkt in SDS-Probenpuffer für 5 min aufgekocht, abzentrifugiert und ein Aliquot auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

2.6.2 Aufarbeitung rekombinant überexprimierter Pinosylvin-Synthase aus *E. coli* unter nativen Bedingungen

Zur nativen Aufreinigung der His₆-Pinosylvin-Synthase wurden 400 ml LB-Medium mit 3 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* M15[pRep4] mit dem Vektor pQE30/Pinosylvin-Synthase angeimpft. Die Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Nach Induktion mit 1 mM IPTG erfolgte die Expression bei 20 °C und 250 rpm für 4 h. Die Bakterienkultur wurde anschließend abzentrifugiert (JA14, 4000*g, 15 min). Das Bakterienpellet wurde in 1/100 des Anfangsvolumens an Ultraschallpuffer resuspendiert und 30 min auf Eis mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ultraschallbehandlung (6*10 s) aufgeschlossen und 30 min bei 15000*g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer FPLC über eine Ni-NTA-Säule gereinigt.

2.6.3 Aufreinigung über eine Ni²⁺-Chelatsäule

Der Überstand aus 2.6.2 wurde mit Hilfe einer FPLC auf eine Ni-NTA-Säule (Säulenmaterial Fa. Qiagen) gegeben und mit einem Imidazolgradienten von 10 mM bis 250 mM Imidazol eluiert.

Imidazolpuffer A:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 600 mM NaCl 10 mM Imidazol
Imidazolpuffer B:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0 600 mM NaCl 250 mM Imidazol

2.6.4 Aktivitätstest der rekombinanten Stilben-Synthase:

Der Aktivitätstest der Pinosylvin-Synthase wurde in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Hierzu wurden 40 µl der zu untersuchenden Proteinlösung mit 5 µl [2-¹⁴C]-Malonyl-CoA und 5 µl Cinnamoyl-CoA versetzt und 30 min bei 30 °C inkubiert.

40 µl Enzymlösung	
5 µl Cinnamoyl-CoA	1 mM
5 µl [2-¹⁴C]-Malonyl-CoA	2,04 GBq/mmol (740 Bq/µl)
Inkubation für 30 min bei 30 °C	
Zugabe von 10 µl Naringenin (1 mg/ml in Ethylacetat) und 500 µl H ₂ O;	
2*Ausschütteln mit 500 µl Ethylacetat	

Die organische Phase wurde in einer Speed-Vac eingeengt und in 2*20 µl Ethylacetat aufgenommen. Die Lösung wurde als 2 cm breiter Streifen auf eine analytische DC-Platte (20*20 cm, Fluoreszenzindikator 254 nm) aufgetragen
Als Laufmittel zum Entwickeln der DC wurde verwendet:

DC-Laufmittel :	Toluol/Ethylacetat/Aceton (v/v/v): 60/35/5
------------------------	--

Für das Scannen der DC-Platten nach der Chromatographie wurde ein Dünnschichtscanner (Fa. Berthold, LB 2723) verwendet.

2.6.5 Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen rekombinante Pinosylvin-Synthase

Zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums aus Kaninchen gegen die Pinosylvin-Synthase wurden 5 Fraktionen von der Aufreinigung vereinigt und 2 d bei 4 °C gegen 2*2 l 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,9 dialysiert.

Das Dialysat mit 930 µg Pinosylvin-Synthase wurde im Dialyseschlauch in Sephadex G-75 gelegt und bei 4 °C auf 2 ml eingengt. Die so ankonzentrierte Proteinlösung wurde zur Immunisierung an die Fa. BioScience (Göttingen) gesandt.

2.6.6 Proteinfällung

Zum Ankonzentrieren verdünnter wässriger Proteinlösungen wurde mit 1/10 Volumen 72%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) versetzt und 1 h bei 0 °C gefällt. Alternativ wurden die Proben mit 4 Volumen kaltem Aceton versetzt und ÜN bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde 30 min bei 10000*g zentrifugiert.

TCA-Pellets wurden entweder sofort in SDS-Probenpuffer aufgenommen oder vorher zum Entfetten mit Methanol/Chloroform dreimal gewaschen. Bei der direkten Aufnahme in SDS-Probenpuffer wurde mit einigen µl gesättigter Tris-Lösung bis zur Blaufärbung neutralisiert.

TCA-Lösung	72%ige (w/v) TCA-Lösung
Aceton	
Methanol/Chloroform	Methanol/Chloroform 2:1 (v/v)
gesättigte Tris-Lösung	

2.6.7 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurde das Bradford-Reagenz der Fa. Biorad verwendet. Es wurden 200 µl des Reagenz und 790 µl H₂O gemischt und 10 µl der Proteinlösung zugegeben. Die Lösung wurde gründlich gemischt und die A₅₉₅ nach 5 Minuten Inkubationszeit gegen eine Referenz ohne Protein gemessen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA).

2.6.8 SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen im SDS-Gel wurde das System von Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet, bei dem durch einen pH-Sprung vom Sammel- zum Trenngel eine Bandenanschärfung stattfindet. Die Proteine wurden vor dem Auftrag durch Erhitzen auf 100 °C in Probenpuffer für 5 min gelöst.

Sammelgel:	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 4 % (w/v) Acrylamid 0,001 % (v/v) TEMED 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Trenngel:	0,375 M Tris/HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 8-12 % (w/v) Acrylamid 10 % (w/v) Saccharose 0,001 % (v/v) TEMED 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
Probenpuffer:	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8 15 % (v/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 4 % (w/v) β -Mercaptoethanol 0,002 % (w/v) Bromphenolblau
Stammlösungen:	
6* Sammelgelpuffer:	0,625 M Tris/HCl, pH 6,8
3* Trenngelpuffer:	1,125 M Tris/HCl, pH 8,8 30 % (w/v) Saccharose
SDS:	10 % (w/v) SDS
Rotiphorese Gel 30™ (Roth):	30 % Acrylamid/ 0,8 % Bisacrylamid-Lösung
Ammoniumperoxodisulfat:	10 % Ammoniumperoxodisulfat
TEMED:	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Laufpuffer:	25 mM Tris/HCl 192 mM Glycin 0,1 % SDS

In der Regel wurden 10%ige Polyacrylamidgele benutzt. Als Molmarker wurde eine 10 kDa-Leiter mit verstärkter 50kDa-Bande (Fa. Lifetechnologies) verwendet. Dieser enthält folgende Größen (in kDa):

10, 20, 30, 40, **50**, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 200

Für mittlere Gele ließ man die Proben bei 20 mA einlaufen und erhöhte dann die Stromstärke auf 50 mA. Nach der Elektrophorese wurden die Gele entweder auf Nitrocellulose geblottet oder mit Coomassie Blue R-250 gefärbt.

2.6.9 Proteinfärbung mit Coomassie Blue R-250

Färber:	0,25 % (w/v) Coomassie Blue R-250 5 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol vor Gebrauch filtrieren
Entfärber	10 % (v/v) Essigsäure 25 % (v/v) Isopropanol

Das Gel wurde zur Fixierung der Banden kurz in Entfärber geschwenkt und dann 20-30 min in Färbelösung gefärbt. Das Waschen mit Entfärber erfolgte solange, bis der Hintergrund klar war.

2.6.10 Western-Blot

Für die Immunanfärbungen wurden die Proteine nach der SDS-PAGE aus der Gelmatrix mit Hilfe des Halbtrockenblotverfahrens (Kyhse-Anderson, 1984) zunächst auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher-Schuell) geblottet.

Der Blot wurde wie folgt durchgeführt: Auf die Graphit-Anode wurden 6 Filter getränkt in Puffer 1 und 3 Filter getränkt in Puffer 2 gelegt. Darauf wurde die in Puffer 2 getränkte Nitrocellulosemembran und das ebenfalls in Puffer 2 getränkte Gel gelegt. Zwischen Gel und Graphitkathode folgten noch 9 in Puffer 3 getränkte Filter.

Der Blot erfolgte bei 100 mA für 2 h bei einem mittleren Gel.

Die Proteinbanden auf der Nitrocellulose wurden durch kurzes Schwenken in Tintenlösung gefärbt, der Molmarker eingezeichnet und die Membran fotografiert. Die Entfärbung erfolgte durch kurzes Schwenken in 0,2 M NaOH und gründliches Waschen mit Wasser.

P1:	300 mM Tris/HCl, pH 7,4 20 % (v/v) Methanol
P2:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4 20 % (v/v) Methanol
P3:	25 mM Tris/HCl, pH 9,4 20 % (v/v) Methanol 40 mM 6-Aminocapronsäure
Tintenlösung:	0,2 % Tinte Königsblau (Fa. Pelikan) 2 % Essigsäure
Entfärbelösung:	0,2 M NaOH

2.6.11 Immunanfärbungen

Die Immunanfärbungen wurden mit Konjugaten der alkalischen Phosphatase mit Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern (Fa. Biorad) als Zweitantikörper durchgeführt.

Puffer A:	50 mM Tris/HCl, pH 7,2 50 mM NaCl
Block-Puffer:	Puffer A mit 5 % (w/v) BSA
Puffer A/Triton X-100 :	Puffer A mit 0,5 % (v/v) Triton X-100

Die geblottete Nitrocellulose wurde 2 h oder über Nacht mit Block-Puffer behandelt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach erfolgte die Inkubation mit der gewählten Verdünnung des Erstantikörpers in Block-Puffer für 90 min. Die Nitrocellulose wurde dann 15 min mit Puffer A, zweimal 15 min mit Puffer A/TX-100 und noch einmal 15 min mit Puffer A gewaschen. Es folgte die Inkubation der Membran in einer 1:3000-Verdünnung des Sekundärantikörpers in Blockpuffer.

Die Membran wurde dann viermal für 15 min mit Puffer A gewaschen und mit Färbepuffer überschichtet. Nach Sichtbarwerden der Banden wurde die Reaktion mit 1 %iger Essigsäure gestoppt.

Färbepuffer:	100 mM Tris/HCl, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 0,67 % (v/v) NBT (Promega) 0,33 % (v/v) BCIP (Promega)
Stopplösung:	1 % (v/v) Essigsäure

2.6.12 Gel-Shift-Experimente (EMSA)

Für Gel-Shift-Experimente wurden native Polyacrylamidgele verwendet. Zur besseren Ablösung der Gelplatten wurden die Glasplatten vorher mit Gelslick™ behandelt. Es wurde ein EDTA-freier Laufpuffer verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 160 V für 4 h bei 10 °C durchgeführt.

2.6.12.1 Radioaktive Markierung von PCR-Fragmenten am 5'-Ende

Für die radioaktive Markierung wurden PCR-Produkte durch Gelextraktion gereinigt. Anschließend erfolgte die Kinasierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$. Die DNA wurde durch Ethanolfällung von Nukleotiden gereinigt.

Das radioaktive Pellet wurde nach der Ethanolfällung mit 70 %igem Ethanol zur Entfernung nicht eingebauter Radioaktivität gewaschen und kurz zum Trocknen bei 30 °C inkubiert. Die markierte DNA wurde dann in 10 μl Tris/HCl, pH 8,5, aufgenommen und für Gelshiftexperimente verwendet.

Kinasierungsansatz:

500 ng DNA 2 μl T4 PNK 10*Puffer 5 μl $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ad 20 μl H_2O Zugabe von 6 Units T4-PNK
--

2.6.12.2 Gel-Shift-Experimente mit *Vitis*-Gesamtprotein

Für Gel-Shift-Experimente mit *Vitis*-Gesamtprotein wurden 7 d alte Weinzellkulturen abgenutscht und in 1 ml SM-Puffer pro Gramm Frischgewicht aufgenommen. Zum Aufschluss wurde diese Suspension für 6*5 s mit Ultraschall auf Eis behandelt. Es schlossen sich zwei Zentrifugationsschritte an (JA20.1, 10.000 rpm, 15 min; 50 Ti, 30.000 rpm, 30 min). Mit dem Überstand wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Puffer SM:	50 mM NaH_2PO_4 , pH 8,0 300 mM NaCl 5mM β -Mercaptoethanol
-------------------	---

Retardierungsansatz:	30.000 cpm markierte DNA 1-20 µg <i>Vitis</i> -Protein 2 µl 5*Bindungspuffer 2,5 µl 40 % (v/v) Glycerin 1 µl Heringssperma-DNA (1 µg/µl) auf 20 µl H ₂ O
-----------------------------	--

TGOE-Puffer:	25 mM Tris 190 mM Glycin pH 8,3
5*Bindungspuffer:	20 % (v/v) Glycerin 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 300 mM KCl 25 mM MgCl ₂

Der Ansatz wurde 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem 4%igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit einem Geltdrockner getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

Retardierungsgele:	4 % Acrylamid (Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8) in 1*TGOE 5 % (v/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat 0,001 % (v/v) TEMED
---------------------------	--

2.7 Elizitierung von Pflanzenmaterial mit biotischen und abiotischen Faktoren

2.7.1 Behandlung von transgenen Tabakblättern mit Methyljasmonat

Zur Induktion mit Methyljasmonat (Duchefa) wurden Blätter von transgenem Tabak in 50 ml LS-Medium mit 100 µM Methyljasmonat gelegt und 24 h unter den Anzuchtbedingungen inkubiert

2.7.2 Behandlung mit Salizylat

Zur Induktion mit Salizylat wurden abgetrennte Blätter von transgenem Tabak 24 h in LS-Medium mit 2 mM Salizylsäure inkubiert. Zur Injektion von 2 mM Natriumsalizylat in Tabakpflanzen wurde eine Spritze mit Kanüle (0,75 mm Durchmesser) benutzt.

Natriumsalizylat-Lösung	2 mM, pH 6,0
--------------------------------	--------------

2.7.3 Induktion mit UV-Licht

Zur Induktion durch ultraviolettes Licht wurden Blätter von transgenem Tabak 5 oder 10 min bei 254 nm (Universal-UV-Lampe, Fa. Camag, Berlin) aus 15 cm Abstand elizitiert und danach 24 h unter Anzuchtbedingungen auf LS-Medium inkubiert.

2.7.4 Infektion mit *Botrytis cinerea*

Zur Infektion transgenen Tabaks mit *B. cinerea* wurde eine Sporensuspension (2.4.1) auf die Blattoberseite aufpipettiert und die Pflanzen bei 20 °C und einer Hell/Dunkelperiode von 12/12 h in einer Feuchtekammer weiter inkubiert.

2.7.5 Histochemischer Nachweis der GUS-Expression

Zur histochemischen Lokalisation der GUS-Expression wurde das betreffende Pflanzenmaterial 12 h bei 37 °C in X-Gluc-Färbelösung inkubiert. Anschließend wurden die Blätter zur Entfernung von Chlorophyll und Carotinoiden einen Tag in 70 %igem Ethanol und anschließend 2-4 Tage in 96%igem Ethanol aufbewahrt. Ein häufiger Wechsel des Ethanols verminderte das Ausmaß brauner Oxidationsprodukte in den entfärbten Blättern.

Substrat-Stammlösung:	100 mg 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-gluc) in 1 ml DMSO Lagerung bis 6 Monate bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$
Färbe-Puffer:	100 mM NaH_2PO_4 , pH 7,0 10 mM EDTA nach Autoklavieren aus Stammlösungen unmittelbar vor Verwendung zugeben: 0,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0,5 mM $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$
Substrat-Lösung:	50 ml X-Gluc-Puffer 250 μl Substrat-Stammlösung unmittelbar vor Verwendung ansetzen sterilfiltrieren

2.7.6 Applikation von Methyljasmonat auf Kieferkeimlinge

Kieferkeimlinge wurden durch gasförmiges Methyljasmonat eliziert. Hierzu wurden die zur Hälfte mit feuchtem Vermiculite gefüllten 2l-Anzuchtgläser mit einem Deckel verschlossen, an dessen Unterseite zwei Lagen feuchtes Filterpapier angedrückt waren. Auf dieses Filterpapier wurde dann eine 1:10-Verdünnung von Methyljasmonat in Dimethylsulfoxid oder reines Methyljasmonat aufpipettiert. Das Wasser im Filterpapier sollte eine Adsorption des Methyljasmonat an der Cellulose verhindern und die Verdampfung erleichtern. Um eventuelle Einflüsse der Änderung der Luftfeuchtigkeit nach der Abdeckung auf die Expression der Pinosylvin-Synthase auszuschließen, wurden die Kontrollpflanzen ebenfalls abgedeckt.

2.7.7 Applikation von Ethylen auf Kieferkeimlinge

Das Ethylen wurde mit Hilfe einer Injektionsspritze mit Kanüle einer Vorratsflasche mit Septumverschluß entnommen und in einer Endkonzentration von 1:1000 in die seitlich leicht geöffneten Anzuchtbehälter gegeben. Bei der Verdünnung wurde nur der über dem Vermiculite befindliche Luftraum berücksichtigt. Die Anzuchtbehälter wurden sofort verschlossen und weiter unter Anzuchtbedingungen inkubiert.

2.7.8 Elizitierung von Kieferkeimlingen mit UV-Licht

Kieferkeimlinge wurden 15 min mit UV-Licht der Wellenlänge 254 nm aus 15 cm Entfernung bestrahlt. Anschließend wurden die Anzuchtbehälter abgedeckt, um gleiche Bedingungen wie bei der Kontrolle zu haben.

2.8 Aufschluss von Kieferkeimlingen

Für die Proteinextraktion wurden die Kieferkeimlinge (*Pinus sylvestris* L. Westdeutsches Bergland) von Vermiculite befreit, in Leitungswasser gewaschen und die Wurzeln entfernt. Die oberirdischen Pflanzenteile wurden unter N₂(l) gemörsert, in 10 ml Aufschlusspuffer suspendiert und zum besseren Aufschluss 6*5 s mit Ultraschall auf einem Eisbad behandelt. Anschließend wurden die Trümmer abzentrifugiert (30 min, 15.000*g, JA 20.1), der Überstand abgenommen und mit 1/10 Vol. TCA gefällt. Das grüne Pellet wurde so vollständig wie möglich in ein Mikrozentrifugationsgefäß transferiert und mit Methanol/Chloroform entfettet. Hierzu wurde das vom Überstand befreite TCA-Pellet in 200 µl Methanol/Chloroform suspendiert, abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Diese Prozedur wurde dann noch zweimal wiederholt und das Mikrozentrifugationsgefäß mit dem Pellet einige Minuten zum Trocknen in einen Abzug gestellt. Das so entfettete, völlig farblose Pellet wurde durch 5minütiges Kochen in SDS-Probenpuffer gelöst, abzentrifugiert und auf einem SDS-Gel analysiert. Das Gel wurde geblottet und eine Immunanfärbung mit Pinosylvin-Synthase-Antiserum durchgeführt.

Methanol/Chloroform	Methanol/Chloroform (v/v) 2:1
TCA:	72 % (w/v) Trichloressigsäure
Aufschlußpuffer:	10 mM KH ₂ PO ₄ , pH 8,0 3 mM β-Mercaptoethanol

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen an transgenen Tabakpflanzen:

Im Hartholz von Kiefern (*Pinus sylvestris*) ist Pinosylvin ein konstitutiver Bestandteil (Kindl, 1985). Pinosylvin und sein Monomethylether ist des weiteren ein Phytoalexin in Kieferkeimlingen, d. h. , es schützt als postinfektioneller Abwehrstoff vor Pilzinfektionen.

Das Genom von *Pinus sylvestris* enthält mindestens 5 Gene für die Pinosylvin-Synthase, die sich im Promotorbereich stark, im kodierenden Bereich aber nur wenig unterscheiden (Preisig-Müller *et al.*, 1999).

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag auf der Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase. Erste Untersuchungen in Wein- und Tabakprotoplasten wiesen auf den PST1-Promotor als den am stärksten induzierbaren Promotor hin (Brehm *et al.*, 1999).

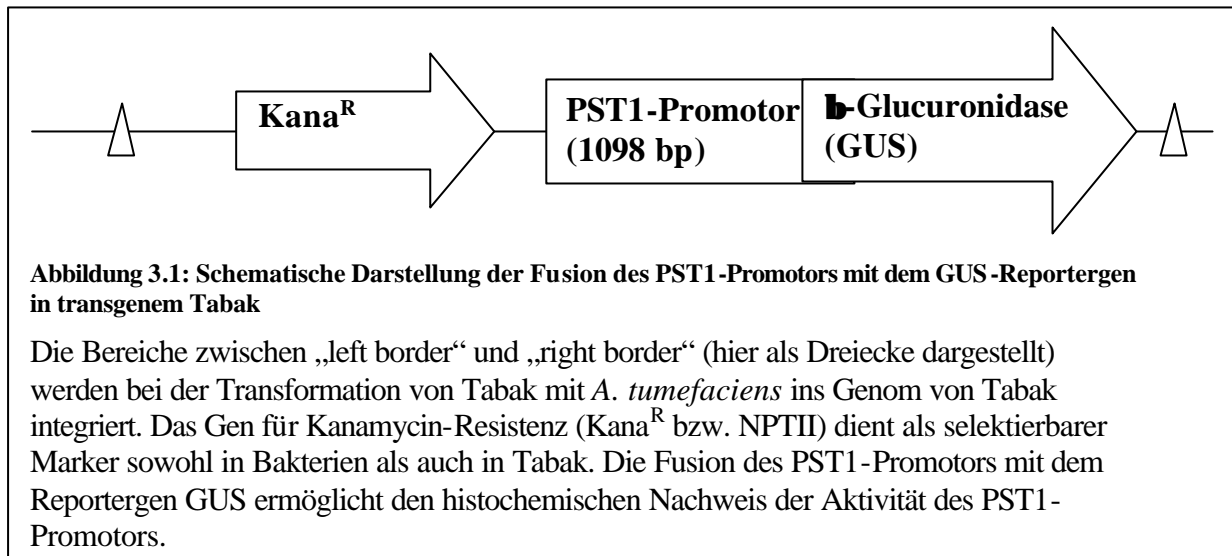
Neben der Eingrenzung der cis-aktivierenden Elemente durch distale Verkürzung des Promotors wurden histochemische β -Glucuronidase- (GUS-) Assay an transgenen Tabakpflanzen mit dem PST1-Promotor vor dem GUS-Gen durchgeführt (Jefferson, 1987).

3.1.1 Induktion durch UV-Licht:

Höhere Pflanzen haben in der Regel keine β -Glucuronidaseaktivität; β -Glucuronidase von *E. coli* (GUS) spaltet im menschlichen Darm die vom Körper zur Entgiftung gebildeten Konjugate der Glucuronsäure, welche dann für *E. coli* als C-Quelle zur Verfügung steht.

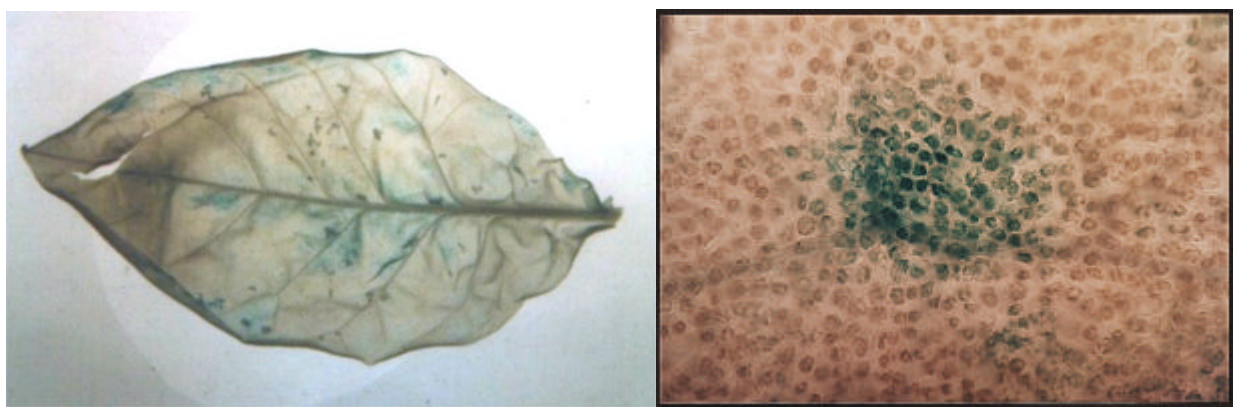
Aufgrund des Fehlens einer verbreiteten β -Glucuronidaseaktivität in Pflanzen werden Promotor-GUS-Fusionen sehr häufig für histochemische Untersuchungen in transgenen Pflanzen eingesetzt (Jefferson *et al.*, 1987).

Es wurden Untersuchungen durchgeführt mit Hilfe transgener Tabaklinien, die eine Fusion des PST1-Promotors aus *Pinus sylvestris* mit dem GUS-Gen im Genom integriert enthielten. Bei Induktion des Promotors wurde somit GUS exprimiert, dessen Enzymaktivität durch histochemische Anfärbung mit der chromogenen Glucuronid X-Gluc nachweisbar ist. In Abbildung 3.1 ist das verwendete Konstrukt dargestellt.



In Kieferkeimlingen führt die Bestrahlung mit UV-Licht zur Induktion der Pinosylvin-Synthase (Schwekendiek *et al.*, 1992). Dasselbe gilt für transgenen Tabak mit einer Fusion des Promotors des Gens PST1 an das GUS-Gen (Preisig-Müller *et al.*, 1999).

Zunächst wurden die histochemischen Anfärbungen nach Induktion mit UV-Licht wiederholt, um die Ergebnisse mit anderen Induktionsbedingungen, z. B. durch Phytohormone, vergleichen zu können. Bestrahlung des transgenen Tabaks mit ultraviolettem Licht (254 nm, 5 min) führte zu lokaler Induktion des PST1-Promotors in kleinen, in der Regel scharf abgegrenzten Blattbereichen (Abb. 3.2). Bei der durch UV-Licht induzierten β -Glucuronidaseaktivität war eine unregelmäßige Verteilung im Blatt festzustellen, die sich auf mikroskopischer Ebene fortsetzte. Einige Blattbereiche sind sehr stark, andere direkt benachbarte hingegen gar nicht gefärbt. Dieses Ergebnis war reproduzierbar. Auch bei Bestrahlung mit UV-Licht für 10 min kam es immer nur in einzelnen Bereichen des Blattes zur Induktion.



A

B

Abbildung 3.2 Induktion des PST1-Promotors durch UV-Licht in transgenem Tabak mit PST1-GUS-Fusion

Blätter einer transgenen Tabaklinie mit der Fusion des Promotors des Gens PST1 an das Reportergen GUS wurden mit UV-Licht bestrahlt (5 min, 254 nm). Im Anschluss an eine 24stündige Inkubation unter Anzuchtbedingungen nach der UV-Bestrahlung wurden die Blätter dann histochemisch gefärbt. Nach Entfernen des Chlorophylls mit Ethanol zeigt Blaufärbung Stellen mit GUS-Aktivität an.

Bild A zeigt die Verteilung der GUS-Aktivität im Blatt. Bild B zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme (Vergrößerung 250fach).

3.1.2 Induktion durch Jasmonat

Es wurde getestet, ob der Promotor PST1 in transgenem Tabak durch das Phytohormon Methyljasmonat induzierbar ist. Hierzu wurden Blätter der Tabaklinie mit dem Reporter gen GUS unter der Kontrolle des Promotors PST1 in LS-Medium mit 100 μM Methyljasmonat für 24 h inkubiert. Die Blätter wurden anschließend histochemisch gefärbt und nach Entfernen des Chlorophylls unter dem Mikroskop photographiert.

In Abbildung 3.3 ist ein typisches Ergebnis gezeigt. Methyljasmonat führte zu einer lokalen Induktion des Promotors PST1 in Tabak, aber nicht zu einer systemischen Induktion.

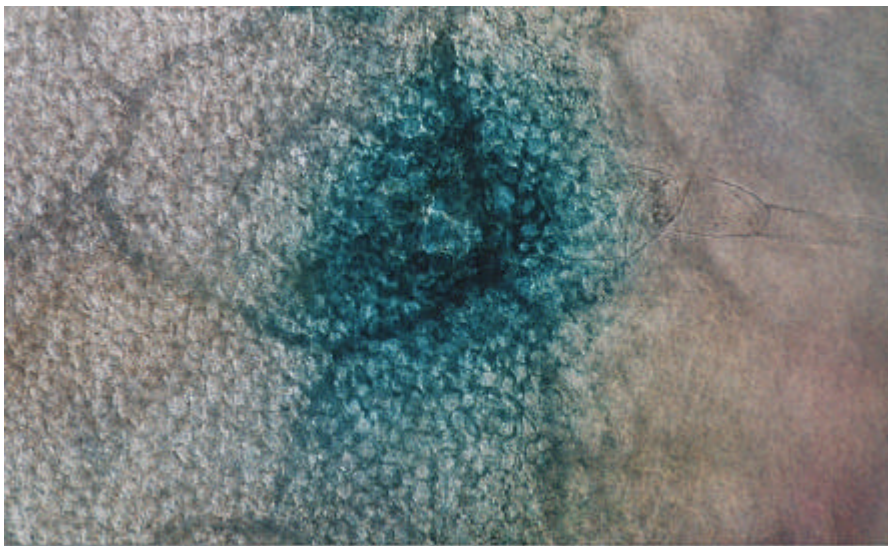


Abbildung 3.3: Induktion des Promotors PST1 durch Methyljasmonat in transgenem Tabak mit einer PST1-Promotor/Reporter gen-Fusion

Die Blätter der transgenen Tabaklinie mit einer Fusion des Promotor PST1 an das Reporter gen GUS wurden 24 h in LS-Medium mit 100 μM Methyljasmonat unter Anzuchtbedingungen inkubiert. Nach histochemischer Färbung wurde das Chlorophyll mit Ethanol entfernt. Anschließend wurden die Blätter unter dem Mikroskop photographiert. Blaufärbung zeigt Bereiche mit β -Glucuronidase-Aktivität an.

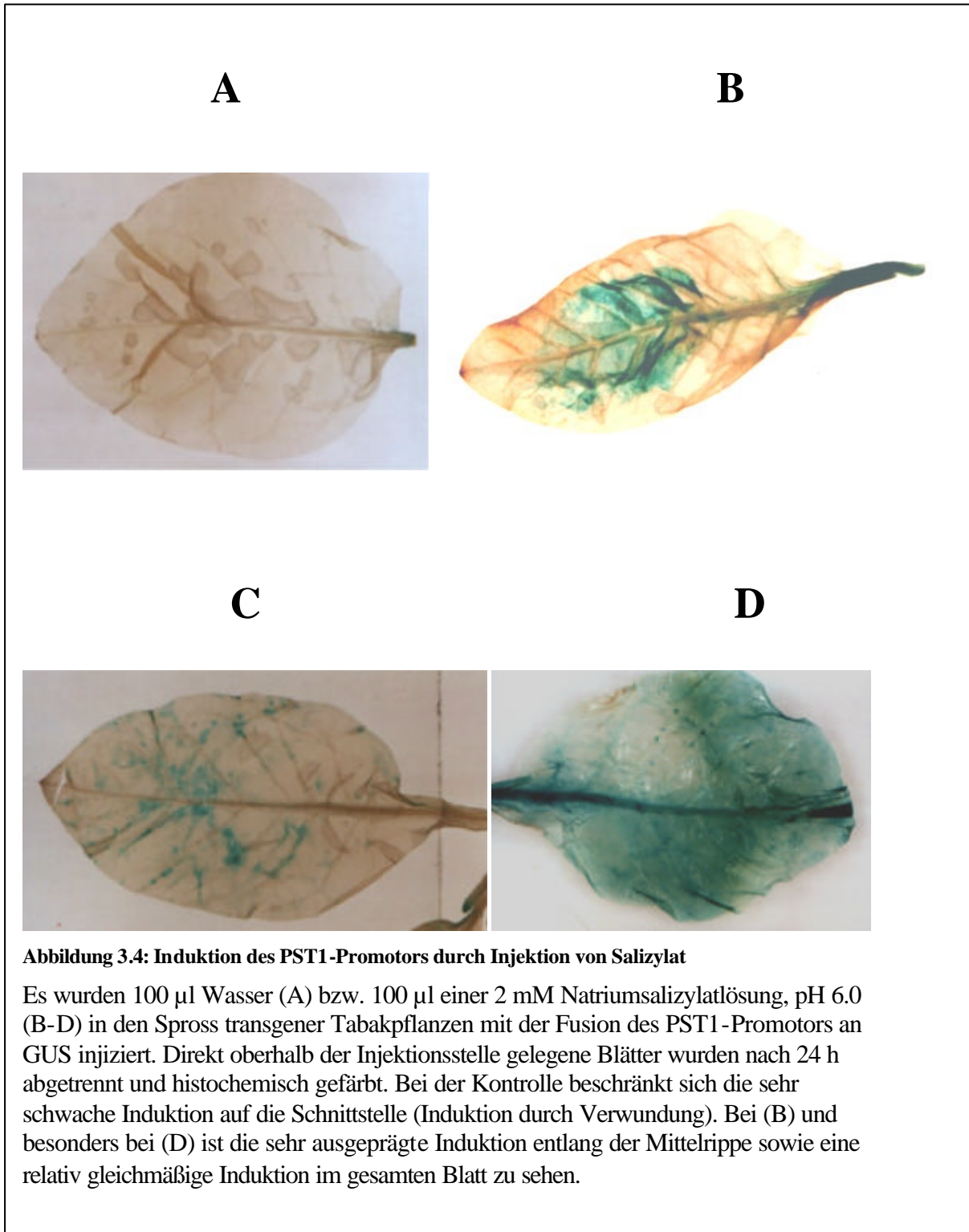
3.1.3 Induktion durch Salizylat

Die Salizylsäure spielt eine wesentliche Rolle bei der Auslösung und Signalweiterleitung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) (Vernooij *et al.*, 1994). Die SAR wird von einem Anstieg der endogenen Salizylsäurekonzentration begleitet. Exogen applizierte Salizylsäure führt zur Expression von für die SAR charakteristischen Genen. Transgene Pflanzen, die eine bakterielle Salizylat-Hydroxylase (NahG) exprimieren und Salizylsäure zu Brenzcatechin abbauen, sind nicht mehr in der Lage, eine systemisch erworbene Resistenz gegen Pathogene zu entwickeln (Friedrich *et al.*, 1995). Um zu testen, welchen Effekt Salizylsäure auf die Induktion des PST1-Promotors hat, wurden die Blätter der transgenen Tabaklinie mit der Fusion des PST1-Promotors an das GUS-Gen zunächst für 24 h in LS-Medium inkubiert, welches 2 mM Salizylat bei pH 6.0 enthielt, und anschließend histochemisch gefärbt. Dabei konnte keine deutliche Induktion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Da Salizylat bei pH 6.0 als Anion vorliegt, war es denkbar, dass nicht genügend große Mengen Salizylsäure in die Blattzellen eindringen konnten. Mögliche Alternativen waren die Applikation von flüchtigem Methylsalizylat (Wintergrünöl) in Gasform, das Anziehen der Pflanzen auf salizylathaltigem Medium oder das direkte Injizieren einer Lösung von Salizylsäure in die Pflanze. Es wurde die direkte Injektion von jeweils 100 µl einer 2 mM Natriumsalizylatlösung, pH 6.0, in den Spross gewählt. Über die Leitbündel oder das Xylem sollte sich die Salizylsäure dann in der Pflanze verteilen können. Nach 24 h wurden die Blätter dann histochemisch gefärbt.

Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.4: Die injizierte Salizylsäure führte zu einer sehr intensiven Induktion des PST1-Promotors, erkennbar an der intensiven Blaufärbung der histochemisch gefärbten Blätter.

Man kann daher davon ausgehen, dass im PST1-Promotor cis-agierende Elemente vorhanden sind, die von Transkriptionsfaktoren des Tabaks erkannt werden, welche während der SAR aktiviert werden. Die exogene Salizylsäure simuliert dabei eine SAR und induziert die stromabwärts von der endogenen Salizylsäure gelegenen Teile der Signalkette.



3.1.4 Versuche zur Induktion durch biotische Faktoren: Infektion mit dem phytopathogenen Pilz *Botrytis cinerea*

Es wurde untersucht, welchen Einfluss die Infektion mit dem pflanzenpathogenen Pilz *Botrytis cinerea* auf die Induktion des PST1-Promotors in transgenen Tabakpflanzen hat. Hierzu wurde eine Sporensuspension von *B. cinerea* hergestellt, indem vier Wochen alte PD-Platten mit darauf gewachsenem Pilz mit 10 ml LS-Medium überschichtet und die Sporen vorsichtig mechanisch gelöst wurden. Diese Lösung wurde zur Infektion von Blättern der transgenen Tabaklinie mit der Fusion des PST1-Promotors an GUS verwendet. Hierzu wurden 20 µl der Sporensuspension auf die Blattoberseite pipettiert und die Blätter in einer Feuchtekammer bei 20 °C und künstlicher Beleuchtung mit einem Tag/Nachtwechsel von 12/12 h inkubiert. Der Saccharosegehalt im LS-Medium erleichterte dem Pilz die Infektion des Tabaks. Sporensuspensionen in Wasser riefen keine Infektion hervor.

Nach 36 h bildeten sich nekrotische Veränderungen, die im Laufe der folgenden 24 h deutlich größer wurden. Demnach wurde der Tabak durch Auftropfen einer Sporensuspension von *B. cinerea* infiziert. Die infizierten Blätter wurden histochemisch mit dem chromogenen GUS-Substrat 5-Bromo-4-Chloro-β-D-Glucuronid (X-Gluc) gefärbt. Nach Entfernen des Chlorophylls wurden die Blätter dann photographiert. Das Ergebnis ist in Abb. 3.5 gezeigt. Es war in der Umgebung der Infektionsstelle keine Induktion des PST1-Promotors erkennbar.

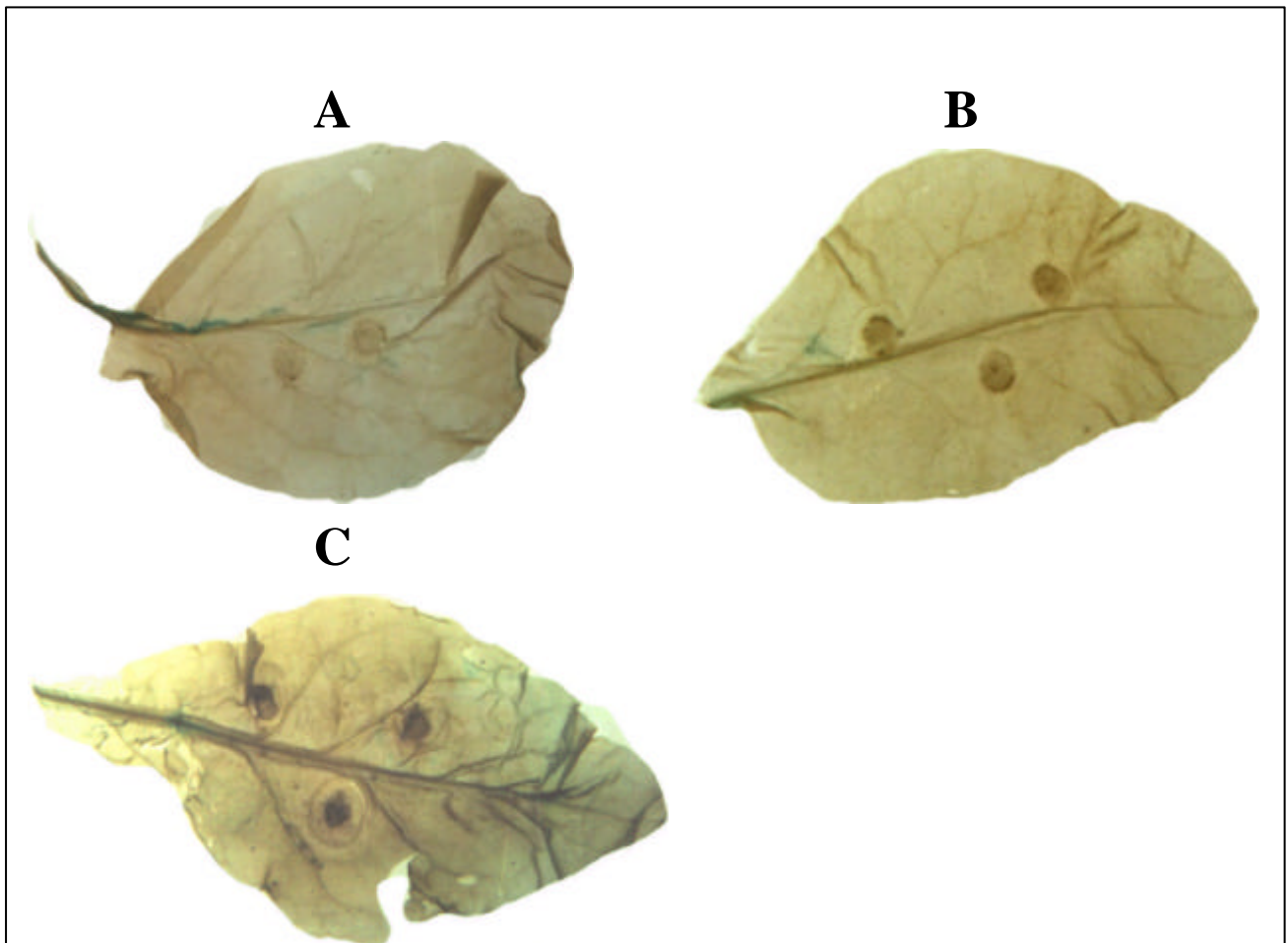


Abbildung 3.5: Effekt durch Infektion mit *Botrytis cinerea* von transgenem Tabak mit PST1-Reportergen-Fusion

Die Infektion von Blättern der transgenen Tabaklinie mit der Fusion des PST1-Promotors an GUS erfolgte mit 20 μ l einer *B. cinerea*-Sporensuspension. Die nachfolgende Inkubation erfolgte in einer Feuchtekammer bei 20 °C und Hell-Dunkelphasen von 12/12 h bei künstlicher Beleuchtung. Der histochemische GUS-Assay wurde 36 h (A, B) bzw. 60 h (C) nach der Infektion durchgeführt. Nach dem histochemischem GUS-Assay wurden die Blätter mit Ethanol von Chlorophyll befreit und photographiert.

Die Infektionsstellen sind als ringförmige, nekrotische Flecken sichtbar.

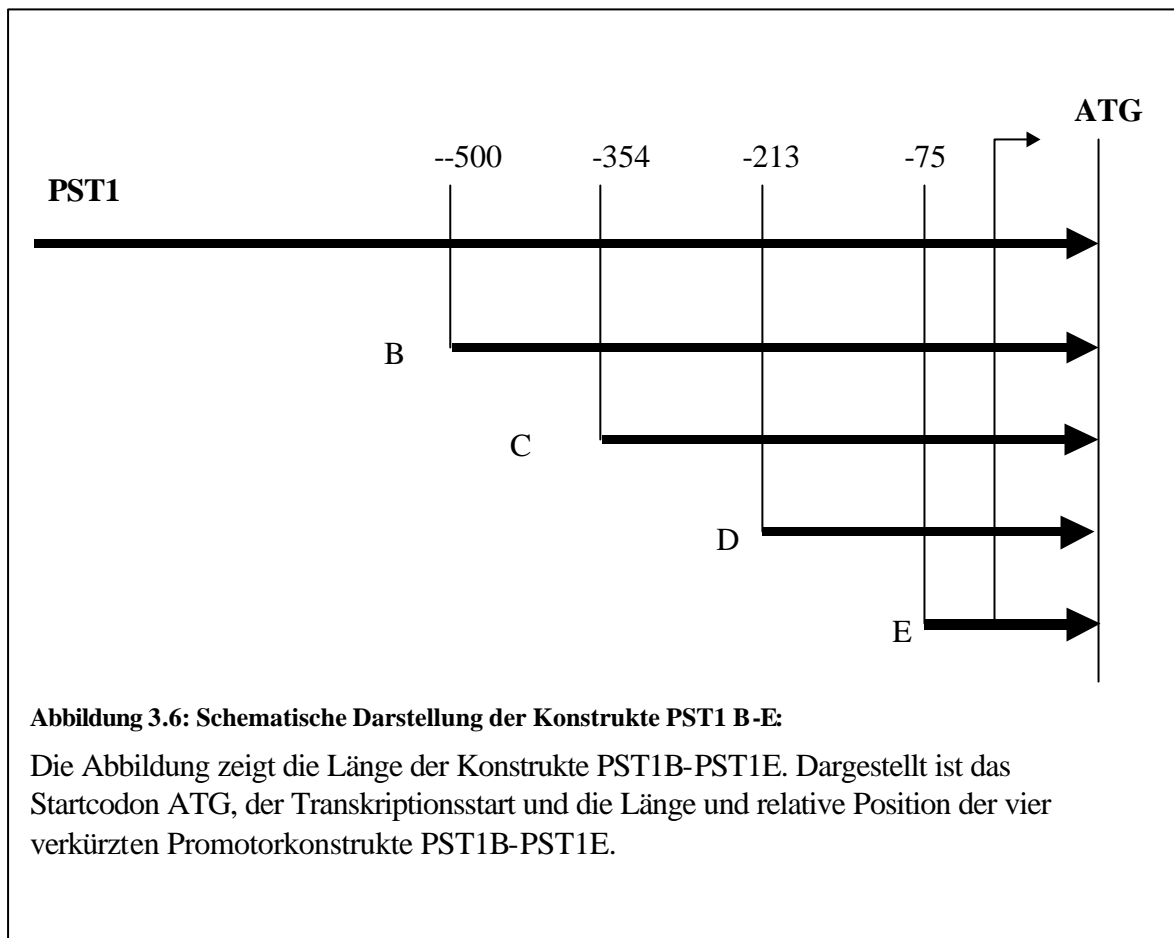
3.2 *Transiente Expression in Weinprotoplasten*

Es stand eine Gen-Bank von *Pinus sylvestris* zur Verfügung, aus der ein 1,1 kbp großer Promotorbereich des PST1-Gen subkloniert und untersucht wurde (Preisig-Müller *et al.*, 1999). Die Frage war, welche cis-agierenden Elemente für die Induzierbarkeit des Promotors verantwortlich sind.

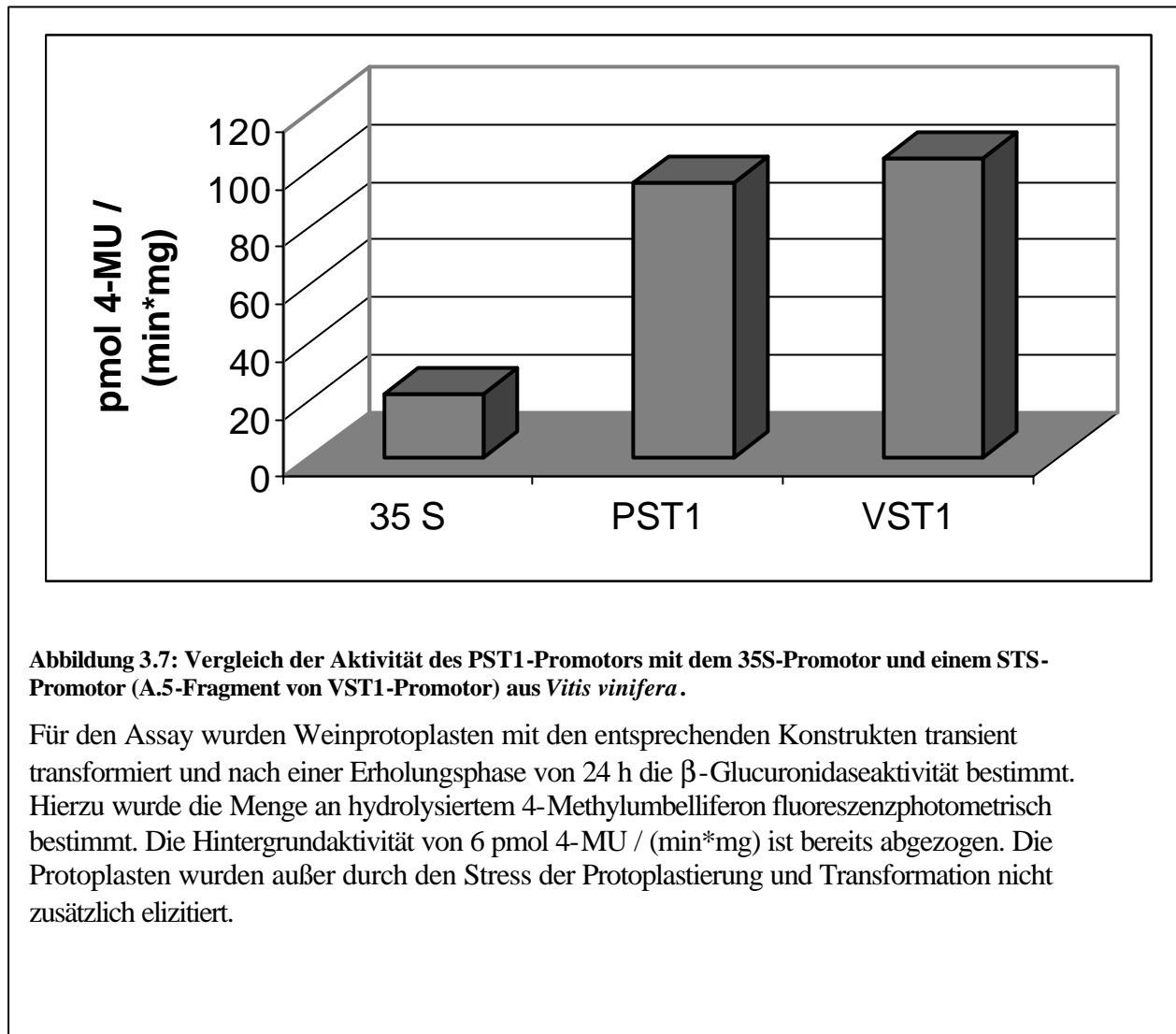
Hierzu wurde die Strategie der Promotorverkürzung vom distalen Ende her gewählt. Hierbei wird der Promotor vom 5'-Ende sukzessive verkürzt und die so entstehenden Fragmente auf ihre Aktivität getestet. Üblicherweise kommt es bei der Deletion eines bestimmten Promotorbereichs zu einem mehr oder weniger drastischen Rückgang der Aktivität bzw. Induzierbarkeit. Auf diese Weise werden cis-agierende Elemente eingegrenzt. Für die Messung der Promotoraktivität standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen die stabile Transformation etwa von Tabak, zum anderen die transiente Expression in geeigneten Zellen. Die transiente Transformation hat den großen Vorteil dass sie schneller ein Ergebnis liefert als die Transformation von Tabak. Außerdem kann die Reporterogenaktivität in transgenen Pflanzen in Abhängigkeit vom Integrationsort des Konstrukts schwanken.

Die transiente Transformation von Weinprotoplasten war im Arbeitskreis etabliert. Als Ausgangsmaterial dienten nicht-embryogene Suspensionskulturen von Weinzellen (*Vitis vinifera* cv. Optima). Diese Zellen werden durch Behandlung mit Cellulasen protoplastiert, und die entstandenen Protoplasten mit den zu untersuchenden Promotor-Reporterfusionen transformiert. Die Transformation findet unter Vermittlung von Polyethylenglykol (PEG) statt. Nach einer Erholungsphase von 24 h wurden die Zellen lysiert, der Proteingehalt bestimmt und ein β -Glucuronidase-Assay durchgeführt. Für den β -Glucuronidase-Assay wurde das fluorogene Substrat 4-Methylumbelliferon- β -D-Glucuronid (MUG) verwendet. Die Aktivität der β -Glucuronidase wurde in pmol 4-Methylumbelliferon (MU) pro Minute und mg Gesamtprotein umgerechnet.

Es wurden zunächst 4 verschiedene Konstrukte mit unterschiedlich langer Deletion im distalen Promotorbereich mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBI221 (Fa. Clontech) über *Bam*HI und *Hind*III kloniert. Der Vektor pBI221 (Fa. Clontech) besitzt das Gen für die β -Glucuronidase hinter dem 35S-Promotor des cauliflower mosaic virus (CaMV; Blumenkohlmosaikvirus). Durch die Klonierung wird der CaMV 35S-Promotor durch das Promotorfragment ersetzt. Der Vektor pBI221 mit dem CaMV 35S-Promotor diente bei den Transformationen als Positivkontrolle. Außerdem wurde bei jeder Transformation ein Plasmid mit der kodierenden Sequenz der β -Glucuronidase ohne Promotor (pBI221 Δ 35S) als Nullkontrolle verwendet. Die Aktivität der Nullkontrolle wurde dann von den übrigen Messwerten abgezogen.



Die Sequenz des PST1-Promotors mit der Lage potentieller cis-agierender Elemente ist in Tabelle 3.1 gezeigt. In Abb. 3.6 sind die verkürzten Promotorkonstrukte PST1B-PST1E hinsichtlich ihrer Länge und Position im Gesamtpromotor abgebildet.



Aus Abbildung 3.7 geht hervor, dass der PST1-Promotor und der VST1-Promotor A.5 bei der transienten Transformation etwa die gleiche Aktivität haben, während der CaMV35S-Promotor um einen Faktor von 4-5 schwächer ist. Bei dem hier zum Vergleich getesteten VST1-Promotor handelt es sich um ein Fragment von 1115 bp Länge. Dieses als A.5-Promotor bezeichnete Fragment wurde von Ilka Brehm (Brehm, 1998) hinsichtlich der Aktivität bei der transienten Expression in Weinprotoplasten bereits untersucht und hier noch einmal zum Vergleich mitverwendet.

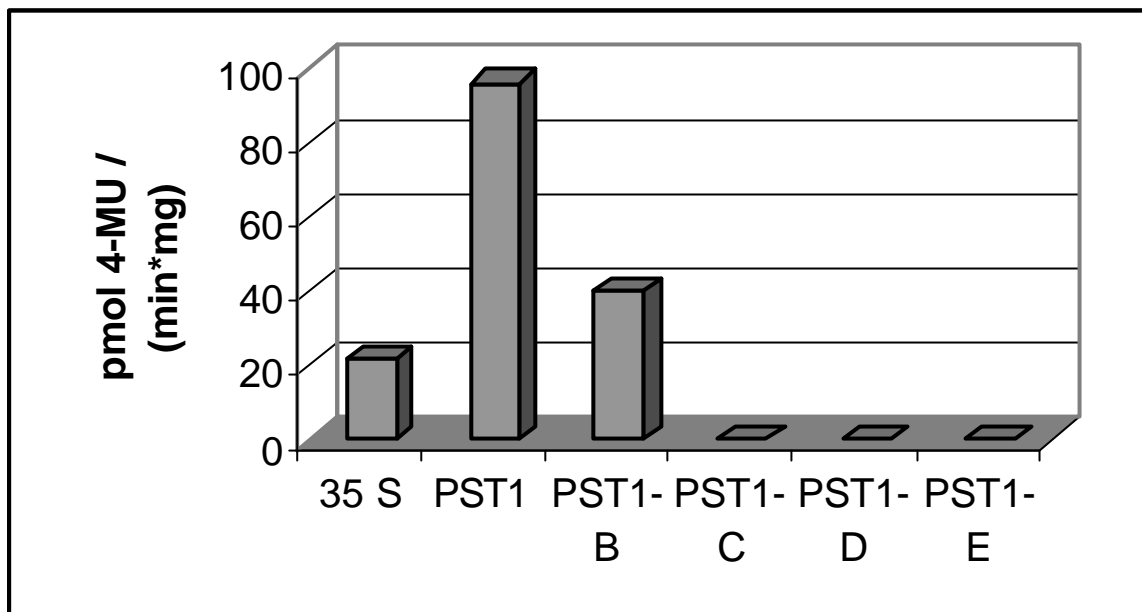
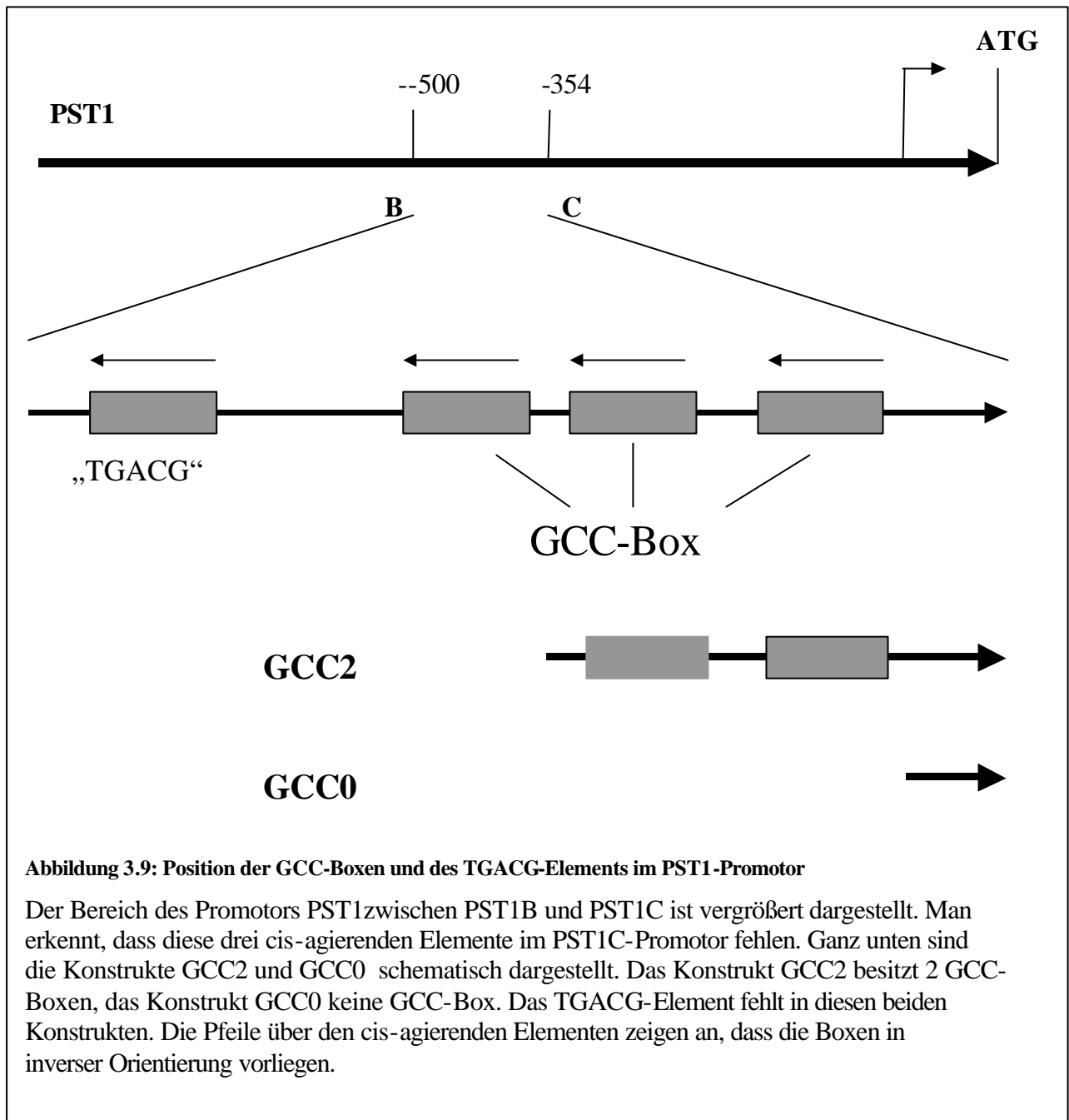


Abbildung 3.8: Vergleich der Aktivität der distal verkürzten Promotorfragmente PST1B bis PST1E mit dem PST1-Promotor bei der transienten Expression in Weinprotoplasten

Die Aktivität der distal verkürzten Promotorkonstrukte PST1B, PST1C, PST1D und PST1E wurde durch transiente Transformation in Weinprotoplasten bestimmt und mit dem PST1-Promotor verglichen. Die Konstrukte PST1C, -D und -E sind vollkommen inaktiv. Das PST1B-Promotorfragment besitzt als einziges Konstrukt noch eine Restaktivität von 40 % des PST1-Promotors.

Die Aktivität des CaMV35S-Promotors diene als Vergleich. Die Aktivität der Nullkontrolle ist bereits abgezogen.

Die Ergebnisse der transienten Transformation mit den verkürzten Konstrukten PST1B, PST1C, PST1D und PST1E sind in Abb. 3.8 gezeigt. Die Konstrukte PST1C, PST1D und PST1E sind vollkommen inaktiv (Abb. 3.8). Das PST1B-Promotorfragment besitzt noch eine Restaktivität von 40 % des PST1-Promotors.



Um den Einfluss der drei GCC-Boxen zu untersuchen, wurden Konstrukte mit 2 GCC-Boxen und ohne intakte GCC-Box konstruiert. Diese Konstrukte liegen also von der Länge her zwischen dem Fragment PST1B und PST1C. Die Konstrukte wurden als GCC2 (2 intakte GCC-Boxen) bzw. GCC0 (keine intakte GCC-Box; die Klonierungsstelle liegt in diesem Konstrukt in der proximalen GCC-Box und führt zu deren Zerstörung) bezeichnet. Diese Konstrukte erwiesen sich bei der transienten Expression als inaktiv (Abb. 3.10). Im letzten Schritt der Promotoranalyse wurde eine dem α -1-Element ähnliche Pentanucleotidsequenz mittels ortsspezifischer Mutagenese deletiert. Es handelt sich dabei um die im PST1B-Konstrukt noch enthaltene Sequenz TGACG. Das Auxin- und

salizylatresponsive Element as-1 setzt sich aus zwei dieser Boxen zusammen. Der so erhaltene PST1(TGACG)-Promotor hatte die volle Länge von 1,1 kbp und war bis auf das Fehlen von 4 Nukleotiden aus der TGACG-Box mit dem PST1-Promotor identisch.

Der so erhaltene Promotor erwies sich in der transienten Transformation als nur geringfügig schwächer als der unmutierte Promotor. Die Deletion der dem as-1-Element ähnelnden Pentanucleotidsequenz auf den Gesamtpromotor hatte nur geringfügigen Einfluss; das Konstrukt PST1 (TGACG) hatte in der transienten Transformation etwa 80 % der Aktivität des PST1-Promotors (Abb. 3.11).

Vergleicht man das verkürzte Promotorfragment PST1B mit dem Konstrukt GCC2, so fehlen in GCC2 neben der dritten GCC-Box auch die Pentanukleotidsequenz TGACG (Abb. 3.9). Dennoch hat PST1B eine hohe Restaktivität von 40 % gegenüber dem PST1-Promotor, während das Konstrukt GCC2 völlig inaktiv ist.

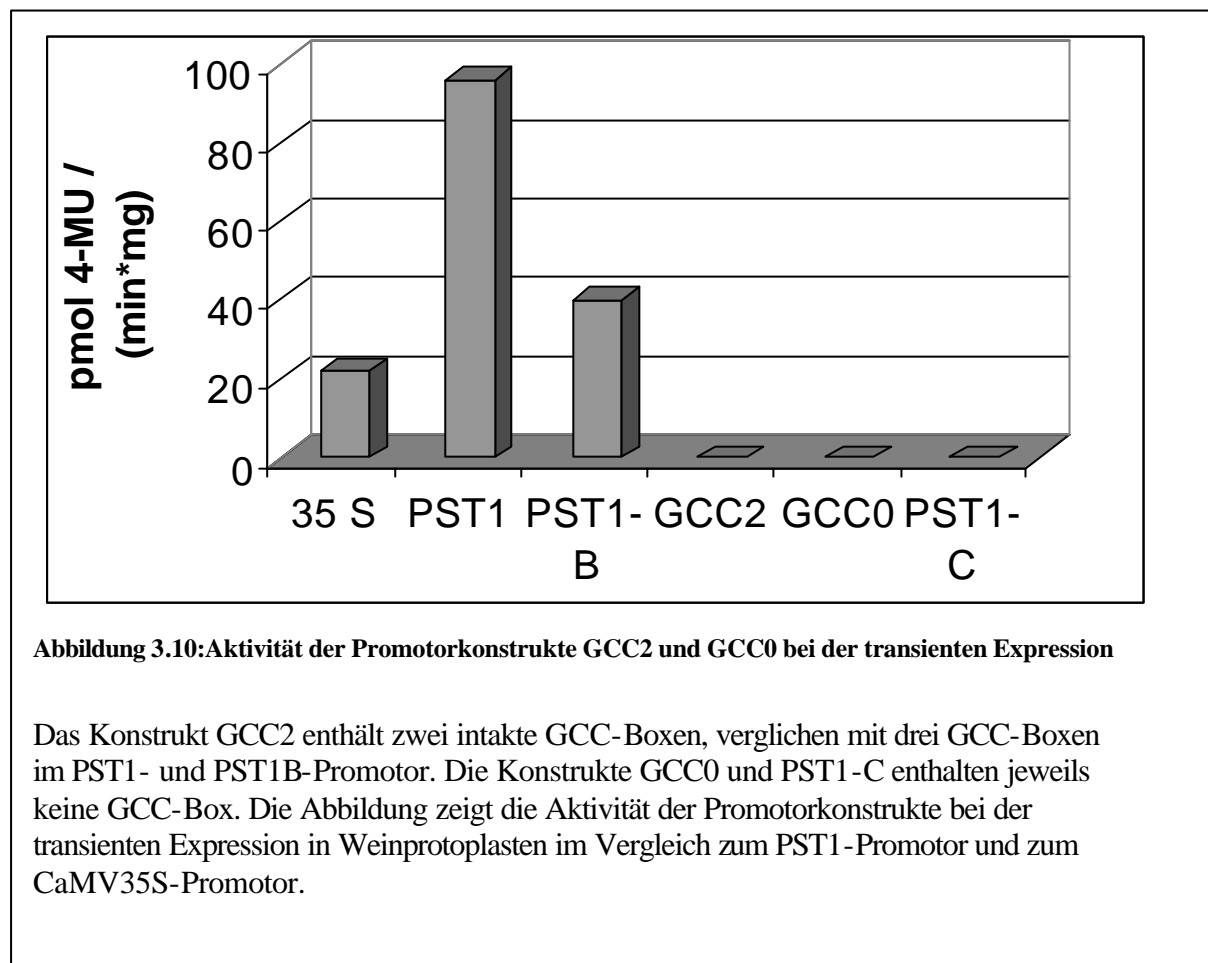
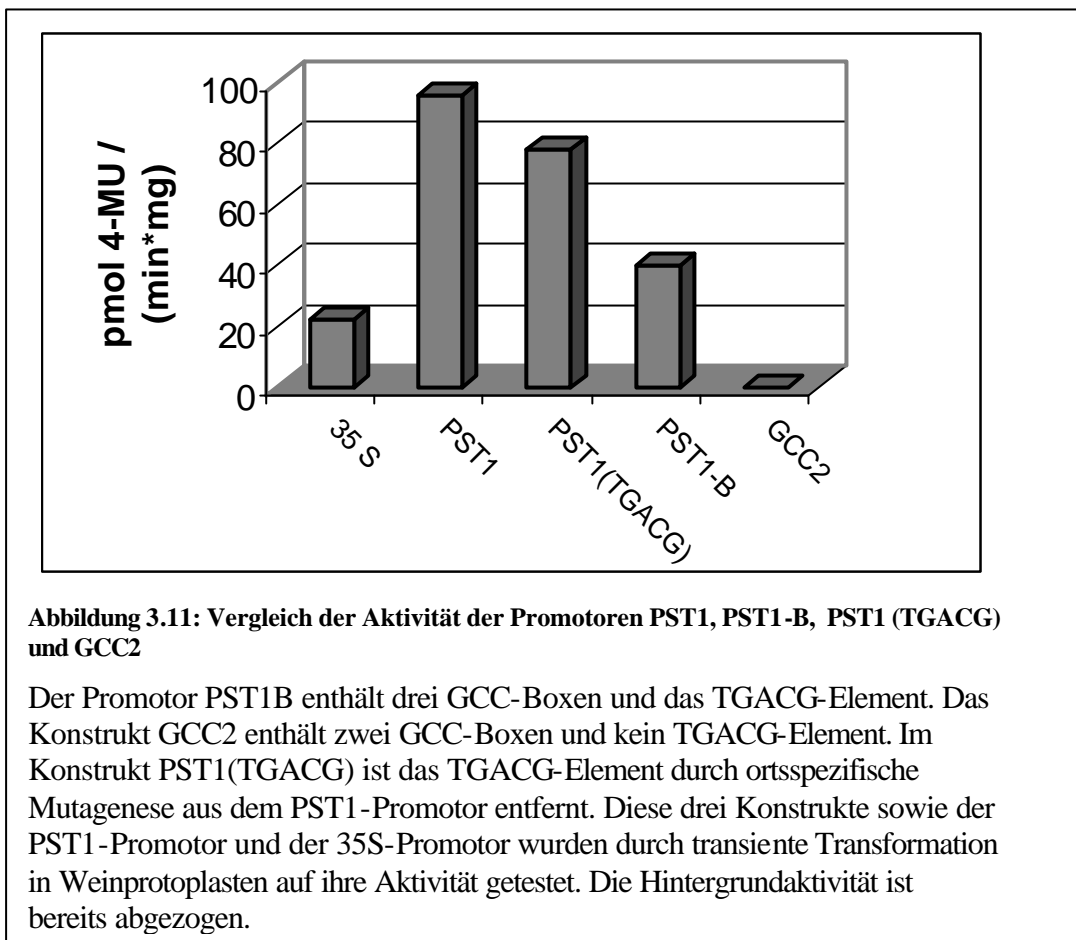


Abbildung 3.10: Aktivität der Promotorkonstrukte GCC2 und GCC0 bei der transienten Expression

Das Konstrukt GCC2 enthält zwei intakte GCC-Boxen, verglichen mit drei GCC-Boxen im PST1- und PST1B-Promotor. Die Konstrukte GCC0 und PST1-C enthalten jeweils keine GCC-Box. Die Abbildung zeigt die Aktivität der Promotorkonstrukte bei der transienten Expression in Weinprotoplasten im Vergleich zum PST1-Promotor und zum CaMV35S-Promotor.



3.3 Versuche zum *in-vivo*-Footprint

Das direkteste Verfahren, eine Promotoranalyse durchzuführen, ist der DNA-Footprint. Im Idealfall liefert er die DNA-Erkennungssequenz der Transkriptionsfaktoren, die unter den gewählten Induktionsbedingungen an den Promotor binden.

Mit einem *in-vitro*-Footprint lässt sich die Bindestelle eines DNA-bindenden Proteins bestimmen, da die Nukleotide der Zielsequenz durch den Kontakt mit dem Protein vor Modifikation oder enzymatischer Spaltung geschützt sind. Dies setzt aber den gereinigten oder zumindest aufgereinigten Transkriptionsfaktor voraus. Eine abgewandelte Methode ist auch *in vivo* durchführbar, da Dimethylsulfat leicht in die Zellen eindringt und ungeschützte DNA unter geeignet gewählten Bedingungen an etwa jedem 100. Guanin methyliert. Die Häufigkeit der Methylierung ergibt sich aus der Verteilung von DMS in den Membranen der Zelle und ist über einen gewissen Konzentrationsbereich an DMS konstant.

Andere Nukleotide als Guanin werden dabei praktisch nicht modifiziert. Die methylierte chromosomale DNA wird dann aus den Zellen isoliert. Durch Behandlung mit Piperidin kommt es zur Spaltung des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA an den Positionen der methylierten Guanine. Im Falle einer Promotoranalyse ist so die Bindestelle eines transaktivierenden Proteins identifizierbar, wenn man das Muster der Methylierung und Spaltung unter induzierten Bedingungen mit dem unter Kontrollbedingungen vergleicht.

Eine methodische Schwierigkeit ist das Sichtbarmachen des gesuchten Spaltmusters in einer großen Menge chromosomaler DNA. Die älteste Technik hierfür ist die Sequenzierung nach Church und Gilbert (Church und Gilbert, 1984), für die das Sequenziergel mit den Spaltstücken geblottet und mit einer geeigneten Sonde hybridisiert wird. Definierte physikalische Enden der DNA wurden vor der Spaltung durch Restriktionsverdau eingeführt. Diese Methode ist sehr aufwendig und langwierig.

Für sehr kleine Genome kommt eine direkte Sequenzierung (bzw. primer extension) in Frage. Dies wurde bei Bakterien und *S. cerevisiae* erfolgreich durchgeführt.

Für große Genome gewinnt die Ligation-vermittelte PCR (LMPCR; ligation mediated PCR) an Bedeutung (Garrity und Wold, 1992). Dabei wird die gespaltene einzelsträngige DNA mit einem genspezifischen Primer (Primer 1) zur doppelsträngigen DNA aufgefüllt. Ein doppelsträngiger Adapter wird an die Spaltstelle ligiert und dient als bekannte Sequenz für eine PCR. Dadurch wird das Signal amplifiziert. Der genspezifische Primer der PCR liegt stromabwärts von Primer 1, um die Spezifität zu erhöhen..

Der letzte Schritt vor der Analyse auf einem Sequenziergel ist die indirekte Markierung der PCR-Produkte durch eine asymmetrische PCR mit einem radioaktiv markierten, genspezifischen Primer. Dieser Primer 3 liegt wiederum stromabwärts von Primer 2, muss aber mit diesem überlappen. Der Grund für die Notwendigkeit der Überlappung ist unbekannt (Müller *et al.*, 1992).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Versuche unternommen, einen *in vivo*-Footprint am PST1-Promotor durchzuführen. Diese Methode funktioniert am besten, wenn Suspensionskulturen verfügbar sind, da dann das Dimethylsulfat alle Zellen gleichmäßig erreicht. Suspensionskulturen von *Pinus sylvestris* waren nicht vorhanden und sind nicht einfach zu etablieren. Daher wurde von der transgenen Tabaklinie mit der PST1-Promotor/GUS-Fusion eine Suspensionskultur angelegt. Da auch diese Suspensionskultur durch Methyljasmonat induziert wurde (Daten nicht gezeigt), konnte ein spezifisches Binden von Transkriptionsfaktoren des Tabaks an den Promotorbereich des eingefügten PST1-Promotors vorausgesetzt werden. Parallel wurde, da die Induzierbarkeit des VST1-Promotors in Weinzellen durch Zellwand von *Botrytis-cinerea* gut bekannt war, die gleichen Versuche gemacht, um die Methode zu testen.

Tabakzellen sowie durch Zellwand von *Botrytis-cinerea* elizitierte Weinzellen wurden durch Behandlung mit 0,1 % Dimethylsulfat methyliert, die DNA isoliert und durch Piperidin gespalten.

Die Größe der Fragmente lag bei etwa 500-700 bp. Nach Ergänzung zum Doppelstrang mit dem Primer LMPCR1 wurde ein asymmetrischer Adaptor an die zum stumpfen Ende einer doppelsträngigen DNA ergänzte Spaltstelle ligiert, die DNA gefällt und in einer PCR amplifiziert. An die 18 Runden der PCR wurden zwei weitere Runden mit radioaktiv markiertem Primer LMPCR3 angefügt. Nach dem Fällen des Ansatzes wurde die DNA auf einem 4%igen Sequenziergel aufgetrennt und das Bandenmuster durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Da auf den Röntgenfilmen jeweils nur unspezifische Signale waren, wurde getestet, ob der letzte Schritt der indirekten Markierung der PCR-Produkte mit dem gewählten, markierten Primer funktioniert. Hierzu wurde chromosomale DNA der transgenen

Tabaksuspensionskultur mit dem PST1-Promotor als Template für eine PCR eingesetzt.

Parallel wurde unter gleichen Bedingungen eine PCR mit Plasmid-DNA durchgeführt. Dieses PCR-Produkt wurde als Modell für die zu markierende Schar von PCR-Produkten verwendet, die entstehen sollten, wenn Ligation und PCR-Amplifikation der Spaltstücke funktioniert.

Die PCR mit der chromosomalen Tabak-DNA ergab nach Analyse mittels Agarose-Elektrophorese keine sichtbaren Produkte. Um geringe Mengen von Produkten zu detektieren, wurde von dem gesamten PCR-Ansatz zwei weitere Runden mit markiertem Primer LMPCR 3 durchgeführt. Als Kontrolle diente die Markierung von 1/100stel des PCR-Produkts mit Plasmid als Template.

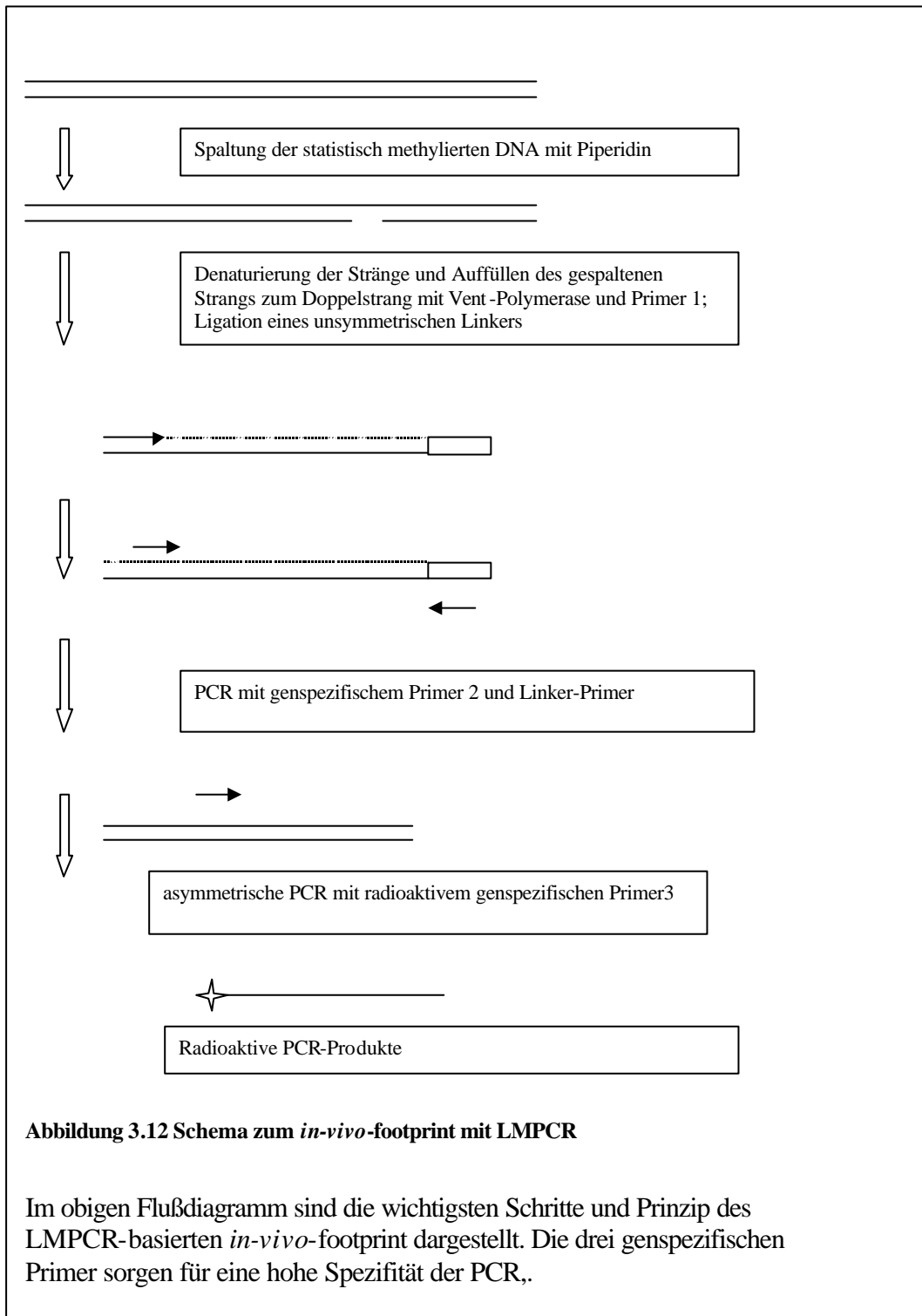


Abbildung 3.12 Schema zum *in-vivo*-footprint mit LMPCR

Im obigen Flußdiagramm sind die wichtigsten Schritte und Prinzip des LMPCR-basierten *in-vivo*-footprint dargestellt. Die drei genspezifischen Primer sorgen für eine hohe Spezifität der PCR,.

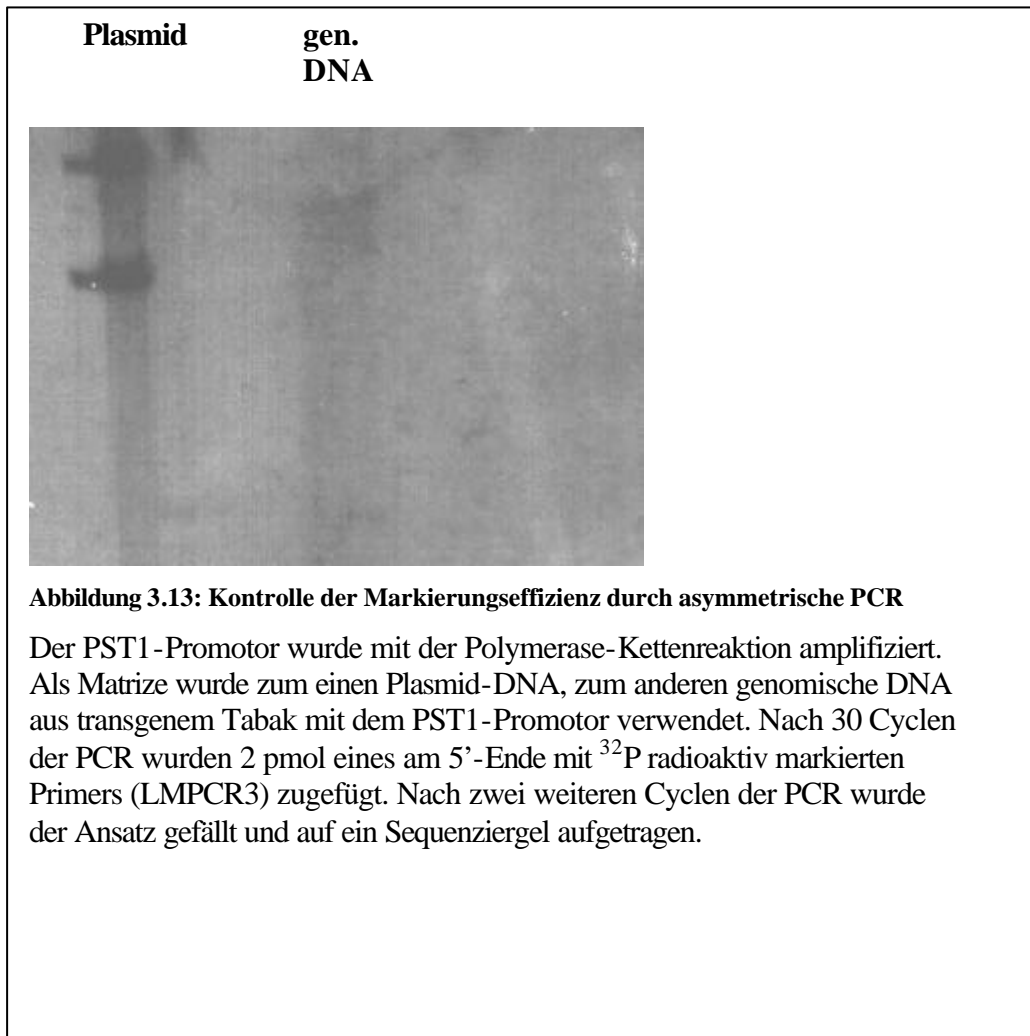


Abb. 3.13 zeigt, dass die Markierung eines fertigen PCR-Produkts sehr gut funktioniert, aus der isolierten chromosomalen DNA aber keine PCR-Amplifikation möglich war. Der wahrscheinlichste Grund hierfür sind die im pflanzlichen Gewebe vorkommenden Polysaccharide. Auch Phenole könnten im Laufe der Aufarbeitung oxidieren und die DNA für enzymatische Methoden blockieren. Um die gespaltene DNA in möglichst sauberer Form zu bekommen, wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen wurden andere Präparationsmethoden für chromosomale DNA ausprobiert (DNeasy Plant Maxi Kit, Fa. Qiagen), zum anderen sollten sich die Fragmente nach der Spaltung mit Piperidin durch kommerziell erhältliche Schleuder- oder Anionenaustauschersäulchen (Fa. Qiagen Tip20) aufreinigen lassen. Obwohl hierzu verschiedene Methoden probiert wurden, konnte keine genügende Reinheit der DNA erzielt werden. Die Methode wurde aufgegeben.

3.4 Versuche zur Infektion von *Nicotiana tabacum* mit einem viralen Vektor

Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, den Einfluss von potentiell an der Signaltransduktion der Induktion des PST1-Promotors beteiligten Proteinen in der intakten Pflanze zu bestimmen. Wenn die Überexpression eines bestimmten Proteins A in transgenem Tabak mit der Fusion des PST1-Promotors an das GUS-Gen zur Induktion des Reportergens GUS führt, so ist eine Beteiligung von Protein A an der Signaltransduktion wahrscheinlich. Der Vorteil eines solchen Systems ist, dass es nicht auf Transkriptionsfaktoren beschränkt ist, sondern auch auf in der Signalkette stromaufwärts liegende regulatorische Proteine anwendbar ist.

Für die Herstellung transgener Pflanzen mit den Vektoren der pBI-Serie benutzt man das Gen für Kanamycin-Resistenz als selektierbaren Marker, d. h., Kanamycin wirkt als Herbizid, das nichttransformierte Tabakzellen abtötet. Es ist daher unmöglich, bereits transgenen Tabak mit denselben Vektoren noch einmal zu transformieren. Da Vektoren mit anderen selektierbaren Markern zu diesem Zeitpunkt kommerziell nicht verfügbar waren, wurde ein viraler Vektor ausprobiert. Für die Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana* wurde das Potato virus X (PVX) erfolgreich verwendet (Chapman *et al.*, 1992). Die Infektion erfolgt durch Inokulieren mechanisch verwundeter Pflanzen mit dem *in-vitro*-Translatat der cDNA des PVX-Virus. Die cDNA liegt auf einem Plasmid vor und ist so genetischen Manipulationen zugänglich; fremde Gene können zwischen eine ClaI und SalI-Schnittstellen eingefügt werden.

Bei dem zu untersuchenden Protein handelte es sich um ein SINA-Homologes aus Wein (*Vitis vinifera*). SINA steht für *seven in absentia* und wurde zunächst in *Drosophila melanogaster* gefunden. In Wein wurden von Ilka Brehm und R. Preissig-Müller zwei cDNAs gefunden, die große Sequenzhomologien zu SINA aus *D. melanogaster* aufweisen (Brehm, 1998).

Um die Rolle von VvSina bei der Pathogenabwehr näher zu untersuchen, sollte es in transgenem Tabak mit dem Reportergen GUS hinter dem PST1-Promotor überexprimiert werden. Da eine erneute Transformation mit einem pBI-Vektor von bereits transgenem Tabak aufgrund der dann fehlenden Selektion auf Kanamycin-Resistenz wie oben dargelegt nicht möglich war, wurde das PVX-Expressionssystem für Tabak ausprobiert. Der Vektor PVX sowie der Vektor TXS-GFP wurde freundlicherweise von Prof. D. Baulcombe zur Verfügung gestellt.

Der Vektor TXS-GFP enthält das GFP (green fluorescent protein)-Gen vor dem Gen des Hüllproteins des PVX-Virus (Baulcombe *et al.*, 1995). Durch Transfektion mit der Plasmid-DNA oder Infektion mit *in vitro* transkribierter RNA lässt sich Tabak infizieren. Es war aber unklar, inwieweit der von uns verwendete Tabak, *Nicotiana tabacum* Petit Havana SR1, sich dafür eignete. Die besten Resultate wurden mit dem PVX-Virus bei *Nicotiana benthamiana* erzielt.

Zur Infektion wurde das mit SpeI linearisierte Plasmid TXS-GFP mit T7-RNA-Polymerase *in vitro* transkribiert und die RNA zur Infektion mechanisch verletzter Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. Petit Havana SR1) verwendet. Diese Pflanzen wurden 3 und 8 Tage nach Infektion unter UV-Licht fotografiert. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.14.

Es war kein Unterschied zwischen mock-inokulierten und infizierten Pflanzen zu erkennen. Beide Pflanzen zeigten starke Autofluoreszenz an den Stellen der mechanischen Verwundung. Dies ist vermutlich auf als Reaktion auf die Verwundung gebildete phenolische Verbindungen zurückzuführen.

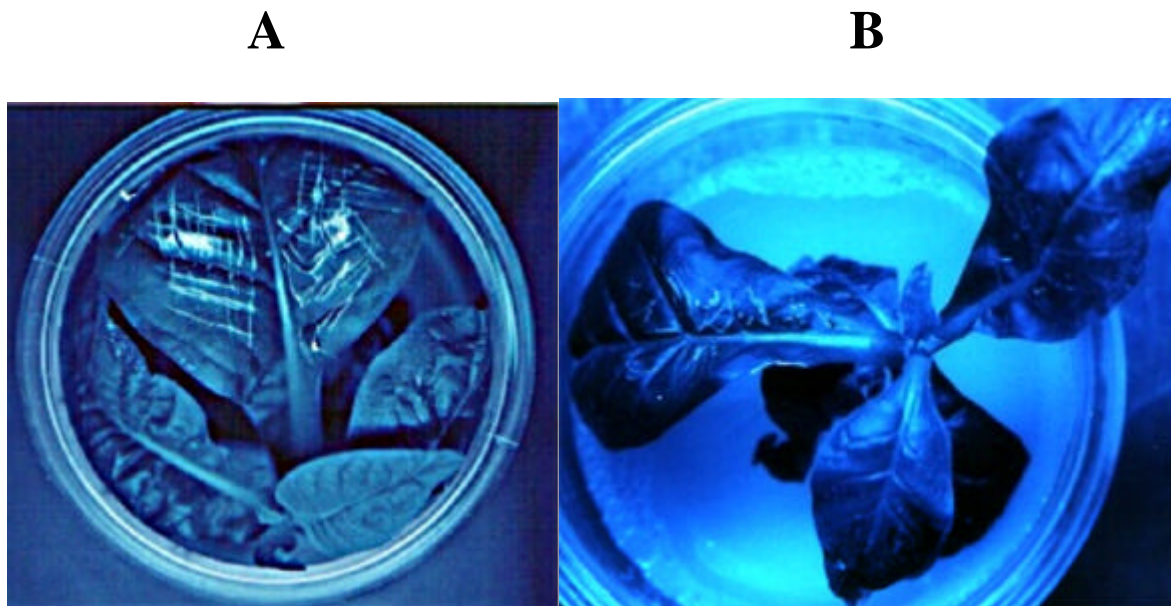


Abbildung 3.14: Infektion von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 mit dem viralen Vektor TXS-GFP

Blätter von *N. tabacum* cv. Petit Havana SR1 wurden mechanisch mit einer Nadel verwundet und entweder mit Wasser mock-infiziert (A), oder mit einem *in-vitro*-Translatat der cDNA eines rekombinanten PVX-Virus mit der eingefügten Sequenz von GFP (TXS-GFP) infiziert.

Die Fotografie unter UV-Licht bei 366 nm erfolgte 8 Tage nach der Inokulation. Sowohl bei der infizierten Pflanze als auch bei der Kontrolle ist eine starke Autofluoreszenz an der Stelle der mechanischen Verwundung sichtbar.

Um geringe Mengen an GFP detektieren zu können, wurde ein Extrakt aus infizierten und mock-infizierten Pflanzen hergestellt, durch Größenausschlusschromatographie von kleinen Molekülen (v.a. Phenole als mutmaßliche Ursache der starken Autofluoreszenz) befreit und fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Dazu wurden je 2,5 ml eines Extrakts von mock-infiziertem und TXS-GFP-infiziertem Tabak auf PD10-Säulchen aufgetragen, mit 3,5 ml Puffer eluiert und im Fluoreszenzphotometer vermessen. Es war kein Unterschied in der Intensität der Fluoreszenz vorhanden.

Um eine eventuell doch erfolgreiche Infektion nachzuweisen, wurden Extrakte der Kontrollpflanze und des infizierten Tabaks mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel unter einem UV-Transilluminator betrachtet. GFP behält seine Fluoreszenz während der Elektrophorese im SDS-Gel, wenn auf das vorherige Aufkochen im SDS-Probenpuffer verzichtet wird (Baulcombe *et al.*, 1995). Da bei der Betrachtung des Gels unter UV-Licht (366 nm) ebenfalls kein Unterschied feststellbar war, wurde dieser Ansatz aufgegeben.

3.5 Bakterielle Überexpression der Pinosylvin-Synthase als His₆-Fusionsprotein und Aufreinigung über eine Chelatsäule

Es stand eine cDNA der Pinosylvin-Synthase aus *Pinus sylvestris* im Vektor pT7T3-18U zur Verfügung (Schwekendiek *et al.*, 1992). Um das Protein rekombinant überexprimieren und zur Gewinnung von Antikörpern effizient aufreinigen zu können, wurden über PCR geeignete Schnittstellen in die cDNA eingefügt und das PCR-Produkt über SphI und PstI in den Vektor pQE30 (Fa. Qiagen) kloniert. Dieser Vektor ist für die Expression von N-terminalen His₆-Fusionsproteinen konzipiert. Die Induktion erfolgt durch Zugabe von IPTG.

Das Plasmid pQE30/Pinosylvin-Synthase wurde in *E. coli* M15[pRep4] transformiert. Für die Expression wurden je 400 ml LB-Medium mit Ampicillin [100 µg/ml] und Kanamycin [25 µg/ml] mit einer Übernachtskultur dieses Klons angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bei 37 °C und 250 rpm angezogen. Nach Zugabe von 1 mM IPTG erfolgte die Expression für 4 h bei 20 °C und 250 rpm. Unter diesen Bedingungen war die Pinosylvin-Synthase löslich. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet und nach Lysozymbehandlung mit Ultraschall aufgeschlossen.

Die Aufreinigung erfolgte in einem Schritt an einer mit einer FPLC gekoppelten Ni-NTA-Säule durch Elution mit einem Imidazolgradienten. Abb. 3.15 zeigt die Aufreinigung.

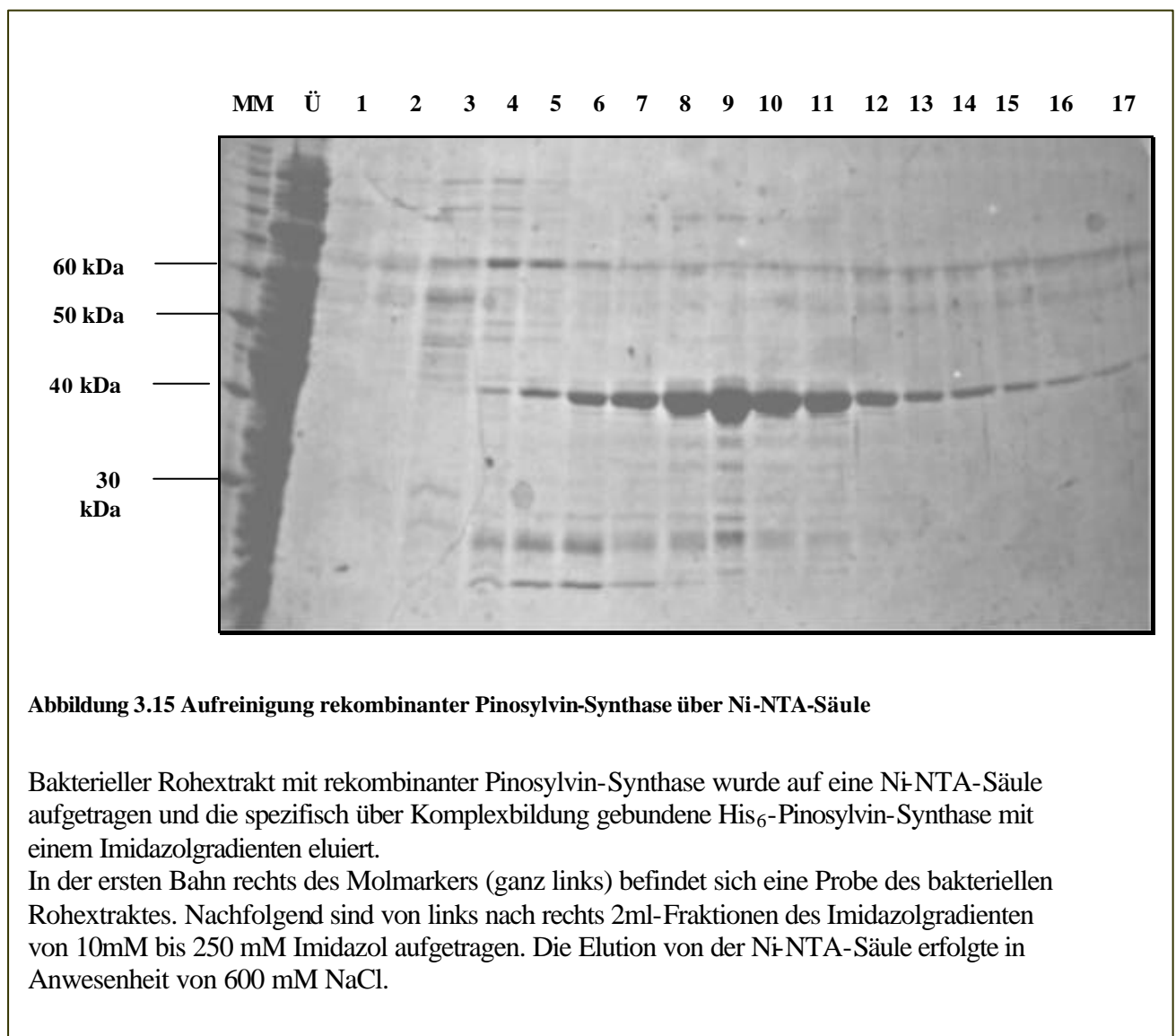


Abbildung 3.15 Aufreinigung rekombinanter Pinosylvin-Synthase über Ni-NTA-Säule

Bakterieller Rohextrakt mit rekombinanter Pinosylvin-Synthase wurde auf eine Ni-NTA-Säule aufgetragen und die spezifisch über Komplexbildung gebundene His₆-Pinosylvin-Synthase mit einem Imidazolgradienten eluiert.

In der ersten Bahn rechts des Molmarkers (ganz links) befindet sich eine Probe des bakteriellen Rohextraktes. Nachfolgend sind von links nach rechts 2ml-Fractionen des Imidazolgradienten von 10mM bis 250 mM Imidazol aufgetragen. Die Elution von der Ni-NTA-Säule erfolgte in Anwesenheit von 600 mM NaCl.

Zur Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Pinosylvin-Synthase wurden 5 Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an Pinosylvin-Synthase gepoolt, 2 d gegen 2*2 l 50 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,9 dialysiert und im Dialyseschlauch durch Einlegen in Sephadex G-75 bei 4 °C auf 2 ml eingengt. Insgesamt 930 µg Protein wurde nach Überprüfung mit SDS-PAGE zur Immunisierung verschickt. Die Immunisierung von Kaninchen gegen die rekombinante Pinosylvin-Synthase erfolgte durch die Fa. BioScience (Göttingen).

3.5.1 Aktivitätstest der rekombinanten Pinosylvin-Synthase

Die rekombinant überexprimierte His₆-Pinosylvin-Synthase wurde in Form des bakteriellen Überstandes auf ihre enzymatische Aktivität getestet. Der frisch aufgeschlossene bakterielle Extrakt zeigte die stärkste Pinosylvin-Synthase-Aktivität, aber auch die ohne Reduktionsmittel aufgereinigte Pinosylvin-Synthase war noch enzymatisch aktiv.

Der Pinosylvin-Synthase-Aktivitätstest wurde nach Gehlert durchgeführt. Es wurden je 40 µl Rohextrakt induzierter Bakterienzellen bzw. eines Eluats der Pinosylvin-Synthase nach Aufreinigung mit der FPLC für den Enzymtest verwendet.

Das Radioaktivitätsprofil der DC zeigt Abb. 3.16. Man erkennt, dass der bakterielle Rohextrakt mit Pinosylvin-Synthase eine grössere enzymatische Aktivität besitzt als 18 µg aufgereinigte Pinosylvin-Synthase.

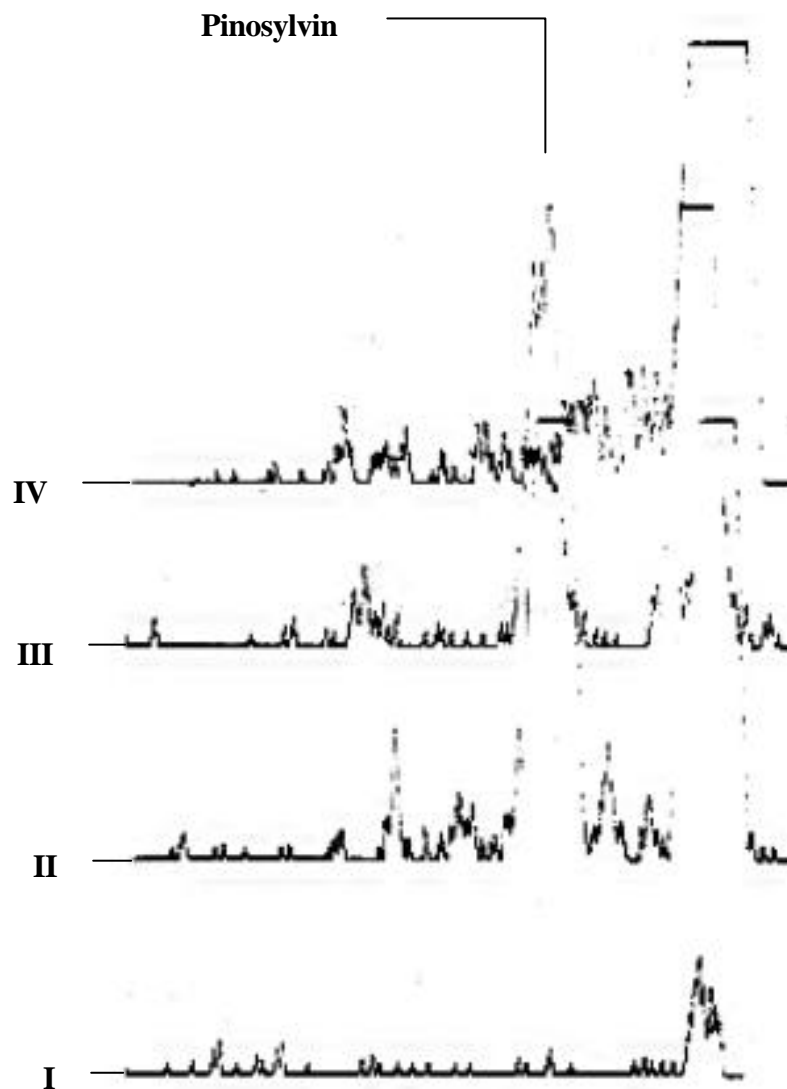


Abbildung 3.16 Radi oaktivitätsprofil eines Dünnschichtchromatogramms mit Pinosylvin-Synthese-Produkten:

Für den Stilben-Synthase-Aktivitätstest wurden je 40 μ l Proteinlösung verwendet und die Reaktionsprodukte auf einer DC aufgetrennt.

Die Spur I ist eine Kontrolle ohne Induktion, die Spur II zeigt Reaktionsprodukte mit bakteriellem Rohextrakt nach Induktion. In der Spur III wurden 18 μ g aufgereinigte Pinosylvin-Synthase für die enzymatische Umsetzung eingesetzt.

Die oberste Spur zeigt die Reaktionsprodukte nach Umsetzung mit Gesamtproteinextrakt aus induzierten *Vitis*-Suspensionskulturzellen.

3.6 Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase in Kiefer-Keimlingen durch UV-Licht und Methyljasmonat

Durch transiente Transformation von Weizellen wurde gezeigt, dass das Konstrukt PST1B noch eine Restaktivität von 40 % im Vergleich zum PST1-Promotor besitzt. Die weitere Deletion um 136 bp führte zum völlig inaktiven Konstrukt PST1C. In diesem Bereich müssen also für die Induzierbarkeit essentielle cis-agierende Elemente liegen. Das Vorliegen dreier GCC-Boxen legt eine Beteiligung von Ethylen an der Induktion des PST1-Gen in Kiefern nahe. Da die Applikation von Ethylen auf transgenen Tabak mit dem PST1-Promotor vor einem Reportergen keine Induktion auslöste, wurde die Einwirkung von Ethylen auf Kieferkeimlinge getestet. Es ist möglich, dass ein Promotor in einem heterologen System ein anderes Induktionsverhalten aufweist als in dem Ursprungsorganismus. Als Kontrolle wurde UV-Bestrahlung gewählt, die bekanntermaßen die Pinosylvin-Synthase in Kieferkeimlingen induziert.

Außerdem wurde noch Methyljasmonat ausprobiert, das ein an der pflanzlichen Abwehrantwort beteiligtes Hormon ist.

In einem Vorversuch (Abb. 3.17) wurde zunächst gezeigt, dass 5 μmol Methyljasmonat in Gasform nach bereits 24 h zu einer Induktion der Pinosylvin-Synthase in Kiefern führt. Nach 48 h war eine sehr starke Induktion der Pinosylvin-Synthase erfolgt. Eine Induktion durch Ethylen (1000ppm) war unter diesen Versuchsbedingungen auch nach 48 h nicht erkennbar. Da die Induktion der Stilben-Synthase durch Ethylen erwartet wurde, wurde der Versuch noch wiederholt. Auch war in diesem Vorversuch nach 24 h keine Induktion durch UV-Bestrahlung (254 nm, 5 min) sichtbar. Für die folgenden Versuche wurde die UV-Bestrahlung (254 nm) statt 5 min auf 15 min erhöht. Die Menge an Methyljasmonat wurde auf 1000 bzw. 100 nmol reduziert. Die Zeitpunkte der Probennahme wurden auf 24, 48 und 72 h ausgedehnt. (Nach der 1. Probennahme erfolgte keine weitere Ethylenzugabe).

Das Ergebnis zeigt Abb. 3.18 und 3.19:

Bereits 100 nmol Methyljasmonat riefen nach 24 h eine Induktion der Stilben-Synthase hervor, die nach 48 h noch andauerte, aber nach 72 h nicht mehr nachweisbar war.

Bei 1000 nmol Methyljasmonat war die Induktion stärker und ebenfalls noch nach 48 h vorhanden; nach 72 h war aber in den Keimlingen kein Protein mehr nachweisbar. Dies mag an hemmenden Effekten des Methyljasmonats liegen.

In Abb. 3.19 ist gezeigt, dass die Pinosylvin-Synthase durch UV-Licht, nicht aber durch Ethylen induzierbar ist. Die Bestrahlung mit UV-Licht führt zu einer raschen Induktion, die mindestens 72 h anhält. Ethylen führt nicht zur Induktion der Pinosylvin-Synthase.

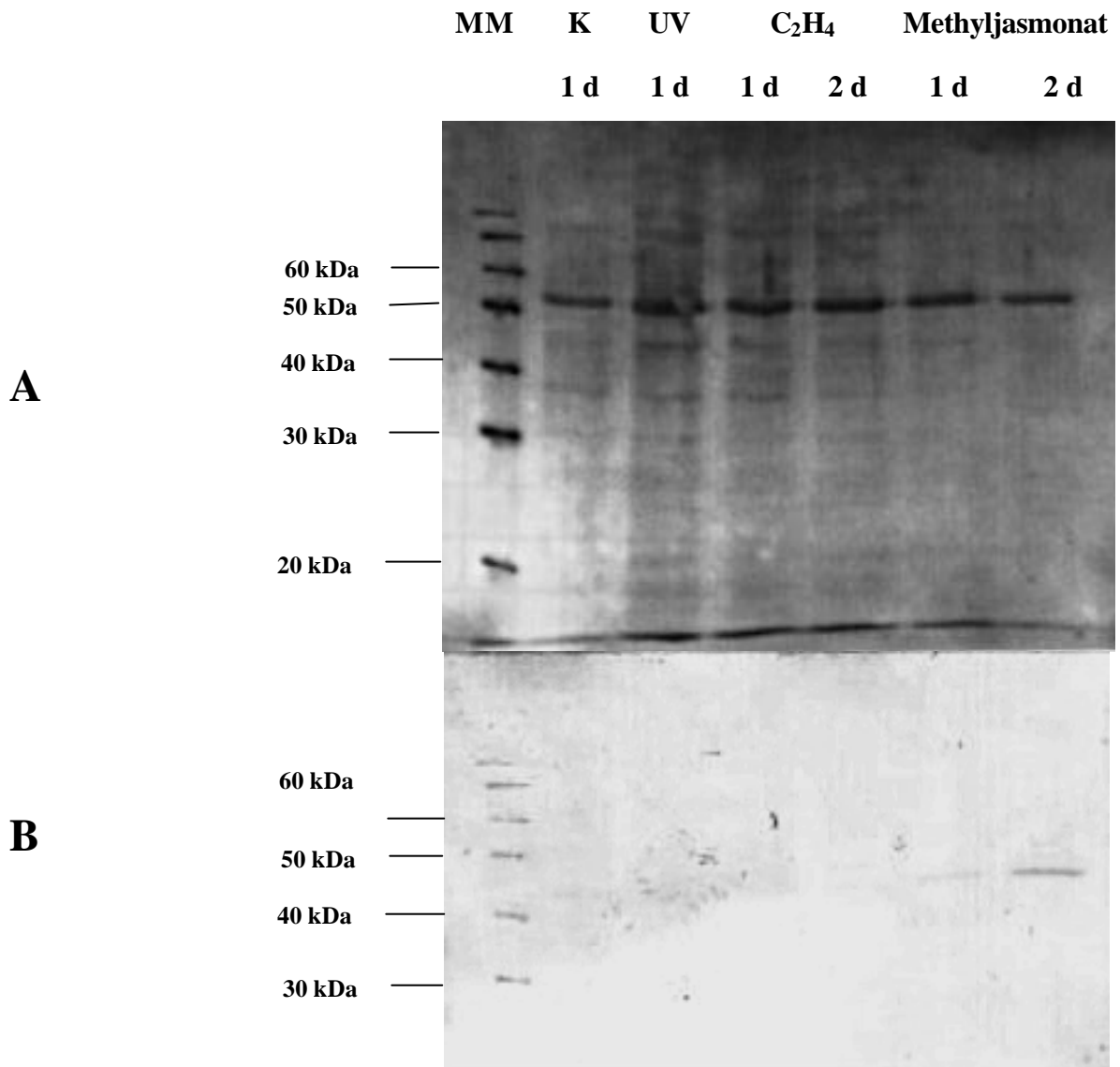
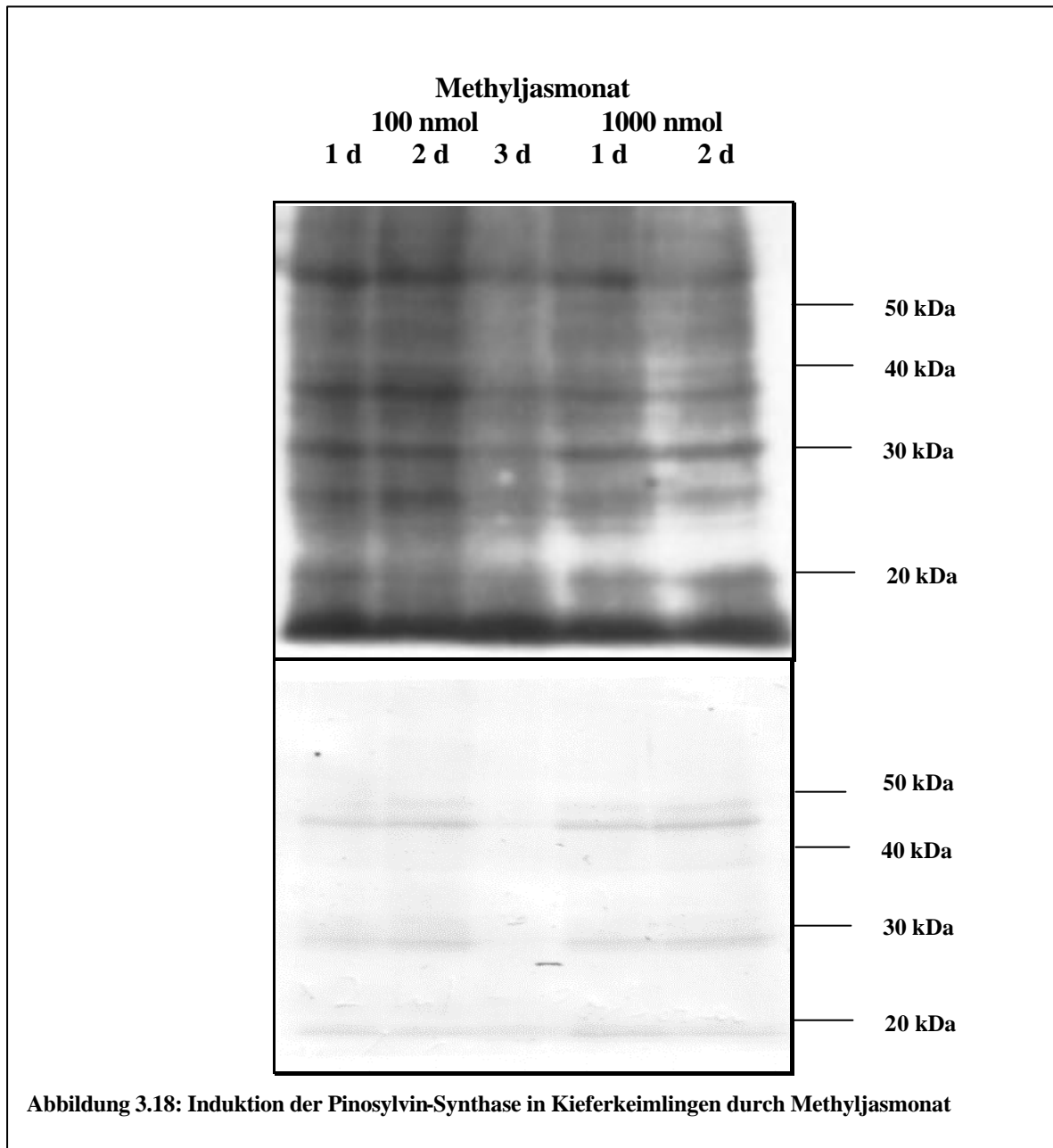


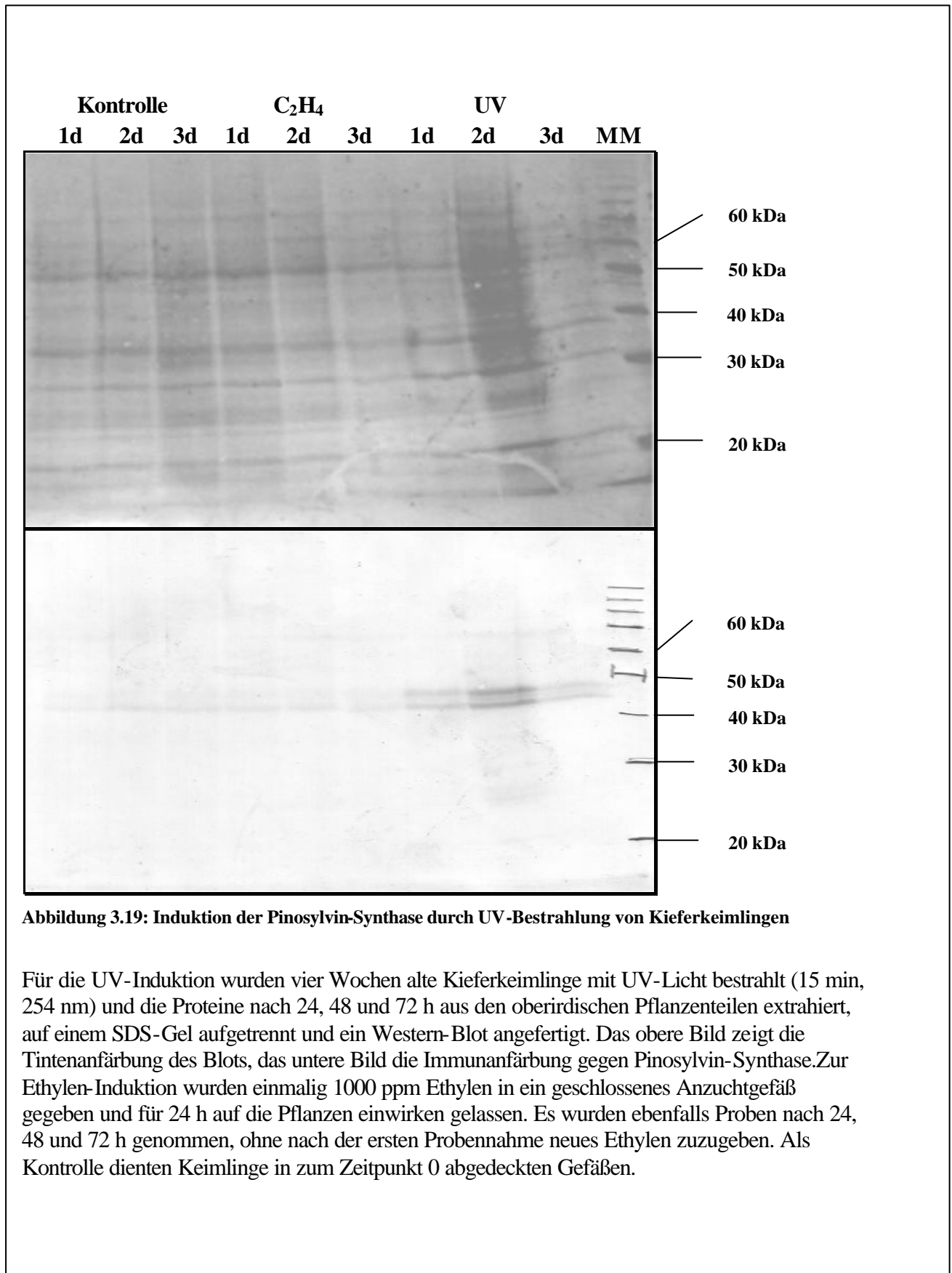
Abbildung 3.17: Induktion der Pinosylvin-Synthase durch Methyljasmonat in Kieferkeimlingen

Kieferkeimlinge wurden ultraviolettem Licht (254 nm), gasförmigem Ethylen (1000 ppm) und Methyljasmonat in Gasform (5 μ mol) ausgesetzt. Nach einem bzw. zwei Tagen wurden die Pflanzen aufgeschlossen, die Proteine isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und ein Western-Blot mit Immunanfärbung durchgeführt. Bild A zeigt die Tintenanfärbung, Bild B die Immunanfärbung gegen Pinosylvin-Synthase. Als Kontrolle (K) dienten Pflanzen, die zum Zeitpunkt Null abgedeckt wurden, um gleiche Bedingungen zu gewährleisten.



Kieferkeimlinge wurden mit gasförmigem Methyljasmonat (100 bzw. 1000 nmol Gesamtmenge) elizitiert und nach 24 h, 48 h und 72 h die Proteine extrahiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western-Blot mit anschließender Immunanfärbung durchgeführt.. Nach 24 h wird die Pinosylvin-Synthase in beiden Versuchsanordnungen induziert.

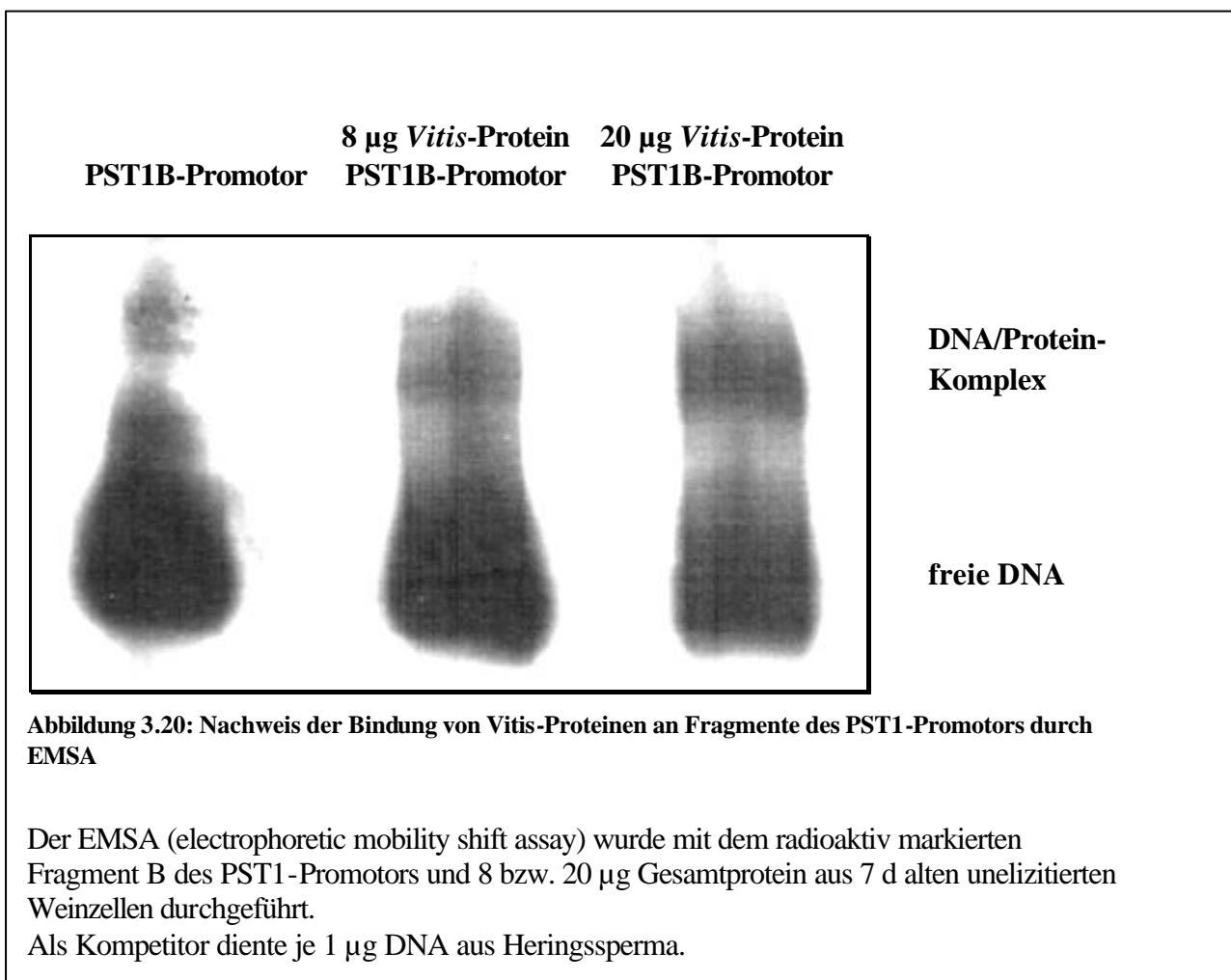
Nach 72 h ist bei Elizitierung mit 100 nmol Methyljasmonat keine Pinosylvin-Synthase mehr zu detektieren.



3.7 Analyse von Promotorelementen durch Gelshift-Experimente

Die Ergebnisse der transienten Transformation von Weinzellen mit distal verkürzten PST1-Promotoren zeigten, dass sich cis-agierende Elemente zwischen den Bereichen -500 und -364 des PST1-Promotors befinden, und dass diese Elemente von Transkriptionsfaktoren in Weinzellen erkannt werden. Um dies mit einer anderen Methode zu bestätigen, wurden Gel-Shift-Experimente (EMSA; electrophoretic mobility shift assay) mit dem Fragment B des PST1-Promotors durchgeführt. Dieses Fragment enthält die drei GCC-Boxen sowie eines der beiden im $\alpha 1$ -Element vorkommenden TGACG-Boxen.

Die Gel-Shift-Experimente mit Gesamtproteinextrakt aus Weinzellen zeigten, dass Proteine aus *Vitis vinifera* spezifisch an das Fragment B des PST1-Promotors binden. Es kam in Anwesenheit von 8 μg Gesamtprotein aus Weinzellen zur Ausbildung eines Protein/DNA-Komplexes mit veränderter elektrophoretischer Mobilität gegenüber der freien DNA. Bei Erhöhung der Proteinmenge auf 20 μg verschob sich das Gleichgewicht weiter auf die Seite des Protein/DNA-Komplex, während die elektrophoretische Mobilität des Protein/DNA-Komplexes konstant blieb. Dies und die Ausbildung des Komplexes in Anwesenheit von unspezifischer Kompetitor-DNA spricht für eine spezifische Bindung von Proteinen aus Weinzellen an die cis-agierenden Elemente des PST1B-Promotors.



Ilka Brehm konnte zeigen, dass *VvSina* 8.3.1 an Fragmente des VST1-Promotor bindet (Brehm, 1998). Um zu klären, ob *VvSina* eine allgemeinere Rolle bei der Induktion anderer Stilbensynthesen oder der Pflanzenabwehr generell zukommt, wurden Gelshiftexperimente mit einem löslichen GST-*VvSina*-Fusionsprotein durchgeführt.

Die cDNA von *VvSina* 8.3.1 wurde von Martina Korfei über *EcoRI* und *SalI* in den Expressionsvektor pGEX 4T-1 (Pharmacia) als GST-Fusionsprotein kloniert. Während rekombinant in *E. coli* überexprimiertes His₆-*VvSina* 8.3.1 völlig unlöslich ist und nur durch denaturierende Aufarbeitung mit 4 % SDS und 4 % β -Mercaptoethanol und nachfolgendes Entfernen des Detergens in Lösung gebracht werden kann, geht von dem Fusionsprotein GST-*VvSina*8.3.1 ein gewisser Prozentsatz in den löslichen Überstand (Abb. 3.21).

Die Aufreinigung erfolgte mittels Bindung an GST-Sepharose und Elution mit Glutathion (Abb. 3.22).

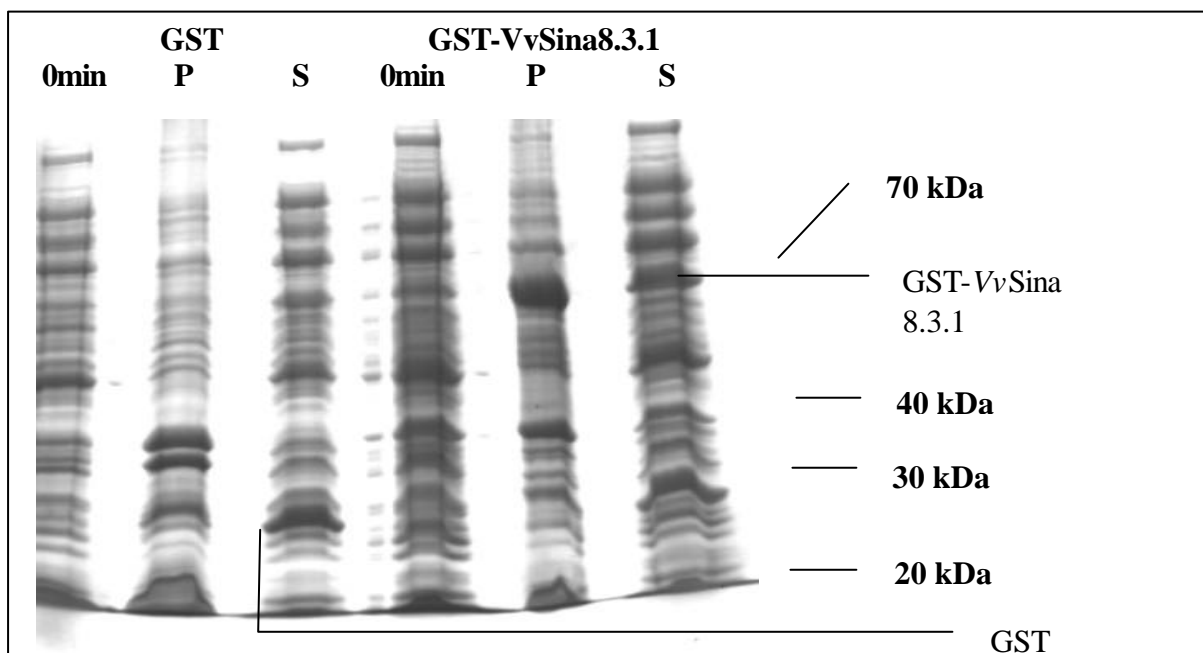
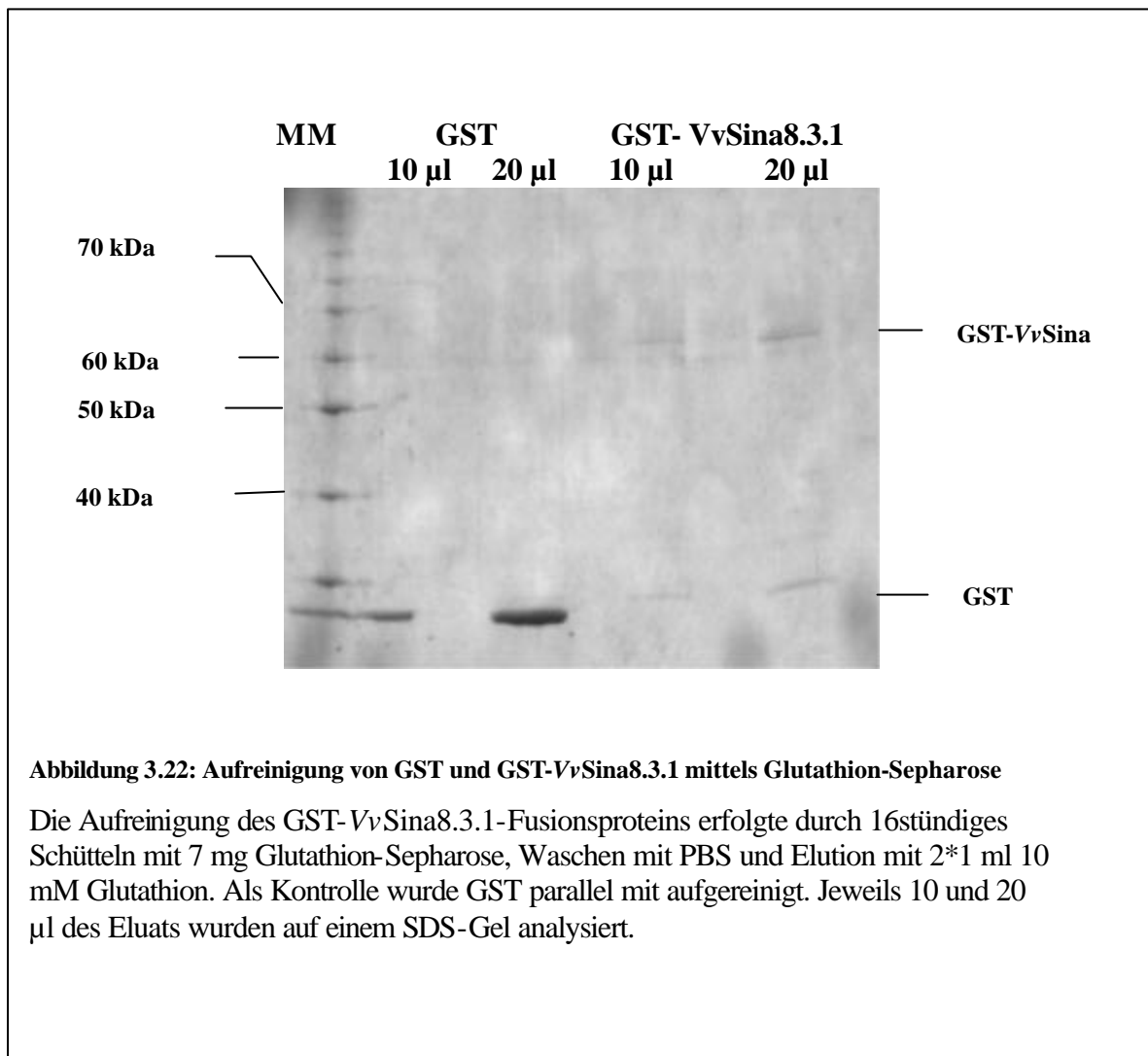


Abbildung 3.21: Expression von GST-*VvSina*8.3.1 als lösliches Fusionsprotein

Glutathion-S-Transferase wurde in *E. coli* M15[pRep4], GST-*VvSina*8.3.1 in *E. coli* BL21 überexprimiert.

Das Proteinmuster vor Induktion mit 0,2 mM IPTG ist jeweils als 0min bezeichnet. Nach 90 min Induktion bei 37 °C wurden die Zellen geerntet und lösliche (Supernatant, S) bzw. unlösliche (Pellet, P) Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Der im Überstand befindliche Teil von GST-*VvSina*8.3.1 ist in der Abbildung gekennzeichnet.



Das aufgereinigte, lösliche Fusionsprotein GST-VvSina 8.3.1 wurde daraufhin getestet, ob es an den PST1B-Promotor bindet. Hierzu wurden Gelshiftexperimente durchgeführt. Es konnte keine Bindung an den PST1B-Promotor nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Da Sina ein RING-Zinkfingermotiv hat (Brehm, 1998), wurde überprüft, ob die Anwesenheit von Zn^{2+} zu einer DNA-Bindung führt. Auch bei Zusatz von 1 mM Zn^{2+} zum Bindungspuffer kam es zu keiner Ausbildung eines DNA-Proteinkomplexes.

4 Diskussion

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit war die Regulation der Pinosylvin-Synthese in Kiefern (*Pinus sylvestris*) im Zusammenhang mit dem Abwehrmechanismus von Pflanzen gegen Pathogene. Die Pinosylvin-Synthase gehört zu den Stilben-Synthasen (Schoeppner und Kindl, 1979). Stilben-Synthasen leiten sich evolutionär von Chalkon-Synthasen ab (Tropf *et al.*, 1994), sind aber im Gegensatz zu diesen auf einige Pflanzengattungen beschränkt. Die Produkte der Stilbensynthasen, Hydroxystilbene, sind ein wirksamer Schutz vor Pilzbefall (Coutos-Thevenot *et al.*, 2001; Hain *et al.*, 1993).

Die Gene für die Pinosylvin-Synthase liegen im Genom von *Pinus sylvestris* als Multigenfamilie (PST1-5) vor mit fast identischem kodierendem Teil und stark voneinander abweichenden Promotoren (Preisig-Müller *et al.*, 1999). Dies legt nahe, dass einige dieser Gene für die konstitutive Einlagerung von Pinosylvin ins Hartholz verantwortlich sein könnten und andere für die induzierbare Synthese des Phytoalexins Pinosylvin in Kieferkeimlingen, etwa nach einem Pilzbefall (Kindl, 1985).

Der Promotor des Gens PST1 wurde aufgrund seiner starken Induzierbarkeit näher untersucht.

4.1 Experimente mit transgenen Tabakpflanzen:

Transgene Tabakpflanzen mit dem PST1-Promotor vor dem GUS-Gen erlaubten, die Expression des PST1-Promotors in Blättern von Tabak unter verschiedenen Bedingungen zu testen. In einzelnen waren dies Bestrahlung mit ultraviolettem Licht von 254 nm Wellenlänge und Behandlung mit den Phytohormonen Salizylat, Methyljasmonat und Ethylen. Diese drei Hormone haben entscheidende Funktionen bei der Pathogenabwehr von Pflanzen (Dong, 1998). Außerdem wurden die Blätter auch mit dem nekrotrophen pathogenen Pilz *Botrytis cinerea* infiziert und anschließend anhand histochemischer Färbung auf Induktion des PST1-Promotors getestet.

Bestrahlung mit UV-Licht

Die Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) führte zur Induktion des PST1-Promotors in transgenem Tabak. Die an der Blaufärbung des Blattes nach histochemischer Färbung erkennbare Induktion der Fusion des PST1-Promotors mit GUS war stets auf kleine, scharf umrandete Blattbereiche beschränkt. Das übrige Blatt blieb farblos. Die Färbung konzentrierte sich oft auf die Leitbündel, war aber nicht auf diese beschränkt. Die Frage war, wieso sich die Induktion bei Bestrahlung des gesamten Blattes auf einzelne Bereiche beschränkte. Da die gesamte Blattfläche mit UV-Licht bestrahlt worden war, musste an der örtlich begrenzten Induktion noch ein weiterer Faktor beteiligt sein. Beispielsweise könnte an bestimmten Stellen im Blatt die Konzentration eines Signalstoffes höher sein als an anderen. Eine synergistische Wirkung von UV-Licht und dem zusätzlichen Faktor würde dann zur lokalen Induktion des PST1-Promotors trotz ganzflächiger UV-Behandlung führen. Bei einem solchen Faktor kann es sich etwa um ein Phytohormon handeln.

Diese Überlegungen führten zur Frage, ob ein exogen appliziertes Phytohormon zu einer – eventuell sogar systemischen – Induktion des PST1-Promotors in transgenem Tabak führen würde.

Exogenes Ethylen induziert den PST1-Promotor in transgenem Tabak nicht

Der PST1-Promotor enthält drei GCC-Boxen, die bei PR-Genen häufig die Ethylen-Induzierbarkeit vermitteln (Kitajima *et al.*, 2000). Ethylen spielt eine Rolle bei der Signaltransduktion der Pathogenabwehr.

Um zu prüfen, ob der PST1-Promotor Ethylen-induzierbar ist, wurden die transgenen Tabakpflanzen einer Konzentration von 1000 ppm Ethylen ausgesetzt und anschließend histochemisch gefärbt. In keinem Fall war eine Induktion des PST1-Promotors zu erkennen.

Induktion durch Methyljasmonat

Methyljasmonat (100 μ M) führte zu ähnlichen Ergebnissen wie UV-Licht. Methyljasmonat führte nicht zu einer systemischen oder großflächigen Induktion des PST1-Promotors in transgenem Tabak, wohl aber zur lokalen Induktion in einzelnen, unregelmäßig verteilten Bereichen des Blattes.

Die Kombination von Jasmonat und Ethylen zeigte keinen über das Jasmonat hinausgehenden Effekt (Daten nicht gezeigt). In der Literatur ist beschrieben, dass bei der Wundantwort oder dem Befall mit einem nekrotrophen Pathogen Ethylen und Jasmonat synergistisch an einem Signaltransduktionsweg wirken, der von dem Signaltransduktionsweg der salizylatabhängigen SAR scharf abgegrenzt ist (Penninckx *et al.*, 1996; Sivasankar *et al.*, 2000). Einige Modelle schlagen vor, dass sich beide Signaltransduktionswege sogar wechselseitig unterdrücken. Der Promotor des Defensins PDF1.2 aus *Arabidopsis thaliana* benötigt beispielsweise die gleichzeitige Anwesenheit von Jasmonat und Ethylen zur Induktion (Penninckx *et al.*, 1998). Dies ist beim PST1-Promotor nicht der Fall.

Induktion durch injiziertes Salizylat

Salizylsäure spielt eine Schlüsselrolle bei der systemisch erworbenen Resistenz (SAR). Die Injektion von 2 mM Salizylat, pH 6,0, führte zur starken und großflächigen Induktion des PST1-Promotors in transgenem Tabak. Damit ist klar, dass Salizylsäure eine wichtige Rolle bei der Induktion des PST1-Promotors spielt. Das Auftreten einer SAR bei Kiefern ist wahrscheinlich, wenn auch noch nicht erwiesen. Die Ergebnisse lassen aber darauf schließen, dass im Falle einer SAR in Kiefern die Induktion des Gens PST1 erfolgt. Die Auslösung der SAR erfolgt nach heutigem Kenntnisstand durch Infektion mit einem biotrophen, inkompatiblen Pathogen (McDowell und Dangl, 2000).

4.1.1 Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea*

Es gelang, transgenen Tabak mit einer Fusion des Promotors PST an GUS mit *Botrytis cinerea* zu infizieren. Nach Inokulation der Blätter mit einer Sporensuspension von *B. cinerea* bildeten sich nach 36 h nekrotische Läsionen, die in weiteren 24 h deutlich größer wurden. Die Infektion führte nicht zur Induktion des PST1-Promotors an den infizierten Stellen. Eine plausible Erklärung ist, dass *B. cinerea* als nekrotrophes Pathogen die Jasmonat/Ethylen vermittelte Abwehrreaktion auslöst, und nicht die von biotrophen Pathogenen ausgelöste SAR. Diese beiden Signalwege stehen in Konkurrenz zueinander (McDowell und Dangl, 2000). Die Infektion mit dem nekrotrophen Pathogen *B. cinerea* löst möglicherweise nicht den zur Aktivierung des PST1-Promotors führenden SAR-Signalweg aus, sondern den Jasmonat/Ethylen-abhängigen Signalweg. Allerdings ist es auch denkbar, dass *B. cinerea* etwa durch ein Phytotoxin die Abwehrreaktion unterdrückt.

4.2 Eingrenzung cis-agierender Elemente durch transiente Expression in Weinprotoplasten

Um cis-agierende Elemente im PST1-Promotor einzugrenzen, wurde der 1098 bp lange PST1-Promotor zunächst vom distalen Ende verkürzt. Die resultierenden Konstrukte PST1B-E wurden mit transienter Transformation in Weinprotoplasten auf ihre Aktivität untersucht. Von den erhaltenen Promotorfragmenten hatte das Konstrukt B noch eine Restaktivität von 40 % gegenüber dem PST1-Promotor. Alle anderen Konstrukte waren inaktiv. Das Fragment B enthält eine Pentanucleotidsequenz TGACG, die als repeat das Auxin- und Salizylat-responsive Element as-1 bildet (Qin *et al.*, 1994). Im PR-1-Promotor wurde diese Pentanucleotidsequenz als für die Salizylat-induzierbare Induktion notwendig identifiziert (Lebel *et al.*, 1998). Dieses Element sowie drei GCC-Boxen sind im inaktiven Konstrukt C nicht vorhanden. Ein Konstrukt ohne TGACG-Element mit zwei anstelle der drei GCC-Boxen (GCC2) war inaktiv. Die Deletion der Pentanucleotidsequenz aus dem PST1-Promotor hatte keinen signifikanten Effekt; die Aktivität betrug immer noch 80 % des PST1-Promotors. Die Funktion der einzelnen Element für die Aktivierung unter den Bedingungen der transienten Expression (d. h., ohne Zugabe von Elizitoren oder exogener Signalstoffe) ist damit schwierig zu beurteilen. Sicher ist, dass die Pentanucleotidsequenz CGTCA im Gesamtpromotor keine wesentliche Funktion hat. Weiter stromaufwärts gelegene Element könnten eine größere Rolle spielen und das TGACG-Element (das man auch als abweichende C-Box auffassen kann) ersetzen. Auf stromaufwärts gelegene cis-agierende Elemente deutet auch der Aktivitätsabfall auf 40 % beim Übergang vom PST1 zum PST1-B Promotor hin. Im PST1B-Promotor kann gleichwohl durch die synergistische Wirkung der drei GCC-Boxen und des TGACG-Elementes eine Restaktivität vorliegen, die das Fragment mit lediglich 2 GCC-Boxen nicht aufweist. Die Interaktion von AtEBP, einem GCC-Box bindenden Protein und bZIP-Proteinen ist bekannt (Buttner and Singh, 1997). Alternativ dazu kann ein weiteres Element eine Rolle spielen. Ein lediglich im PST1-B-Promotor vorhandenes Element ist das 22 bp downstream vom TGACG-Element gelegene Sequenz CCTTTT, die die Erkennungssequenz von Dof1 darstellt (Yanagisawa, 2001).

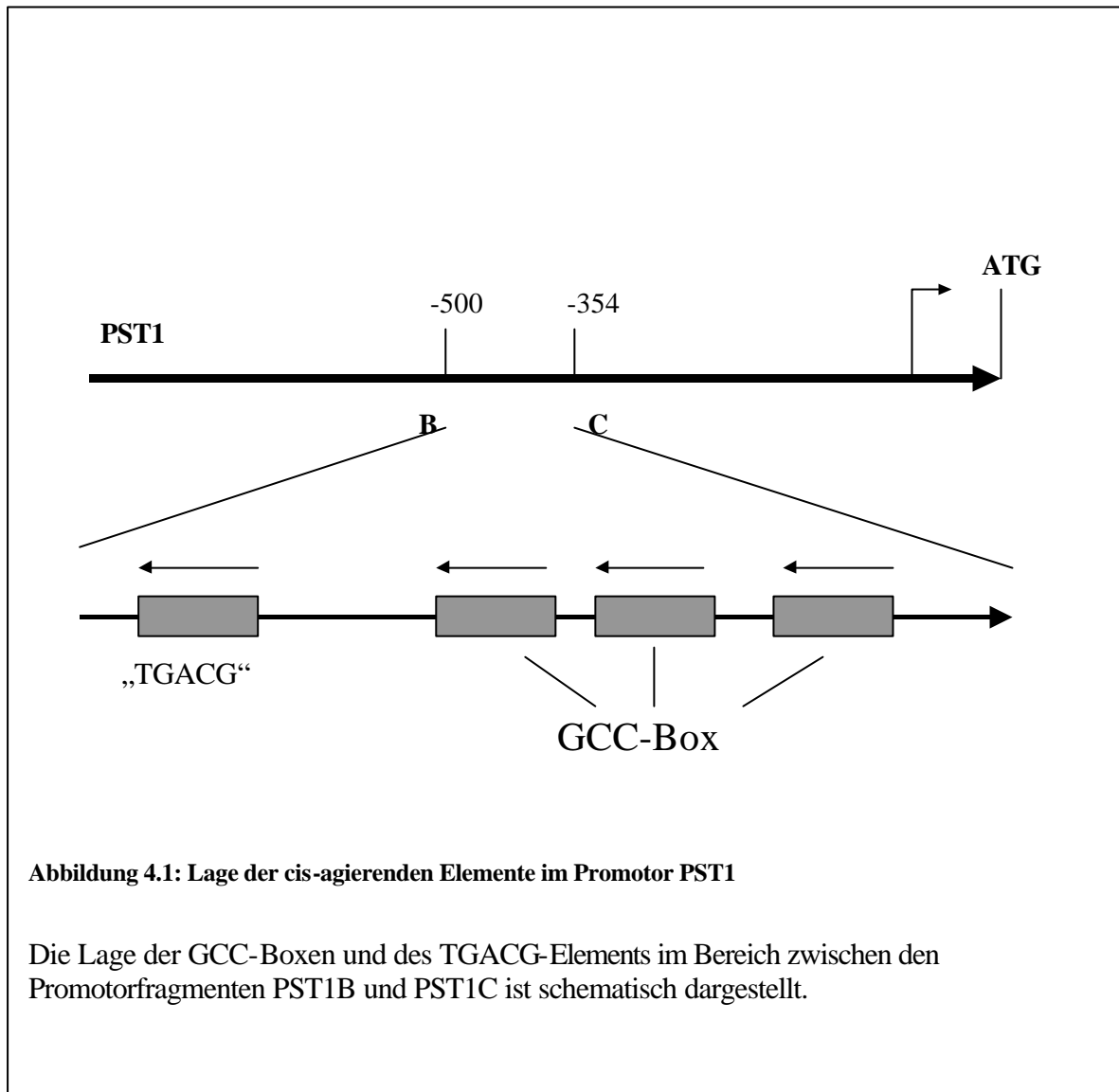


Abbildung 4.1: Lage der cis-agierenden Elemente im Promotor PST1

Die Lage der GCC-Boxen und des TGACG-Elements im Bereich zwischen den Promotorfragmenten PST1B und PST1C ist schematisch dargestellt.

4.3 Induktion des Pinosylvin-Synthase in Kieferkeimlingen

Die Induktion der Pinosylvin-Synthase wurde auch an der Kiefer (*Pinus sylvestris*) untersucht. Hierzu wurden 4 Wochen alte Kieferkeimlinge verwendet. Ein im Rahmen dieser Arbeit gegen rekombinante Pinosylvin-Synthase entwickeltes Antiserum erlaubte den Nachweis der Pinosylvin-Synthase mittels Western-Blot.

Bestrahlung der Kieferkeimlinge mit ultraviolettem Licht führte zur Induktion der Pinosylvin-Synthase auf Proteinebene. Die Zunahme der Pinosylvin-Synthase-Aktivität in Kieferkeimlingen nach UV-Bestrahlung war bereits bekannt (Schwekendiek *et al.*, 1992). Es wurde somit gezeigt, dass dies auf die Zunahme der Menge an Pinosylvin-Synthase in den Kieferkeimlingen nach UV-Bestrahlung zurückzuführen ist.

Die zentrale Fragestellung war, ob exogenes Ethylen zu einer Induktion der Pinosylvin-Synthase in Kiefern führt. Die drei GCC-Boxen legen eine Beteiligung von Ethylen an der Induktion des PST1-Promotors nahe. Es sollte ausgeschlossen werden, dass die Induktion des PST1-Promotors durch exogenes Ethylen aufgrund des heterologen Systems in transgenem Tabak nicht wirksam ist.

Die Versuche an Kieferkeimlingen zeigten, dass Ethylen eindeutig zu keiner Induktion der Pinosylvin-Synthase auf Proteinebene führte. Folglich wird kein einziges der fünf Pinosylvin-Synthase-Gene in Kiefern durch Ethylen induziert, das PST1-Gen eingeschlossen. Die Ergebnisse mit transgenem Tabak wurden somit bestätigt.

Gasförmiges exogenes Methyljasmonat zeigte in dieser Arbeit eine extrem starke Induktion der Pinosylvin-Synthase in den Kieferkeimlingen. Bekannt ist die Induktion der Pinosylvin-Synthase durch UV-Licht (Schwekendiek *et al.*, 1992), Ozon und Verwundung (Chiron *et al.*, 2000) sowie Pilzbefall (Preisig-Müller *et al.*, 1999). In Fichte ist die Chalkon-Synthase durch Jasmonat induzierbar (Richard *et al.*, 2000).

Jasmonsäure und Methyljasmonat wirken sowohl bei der Wundantwort (Insektenfraß) als auch bei Infektionen mit pathogenen Pilzen als Signalstoffe und steuern die pflanzliche Abwehrantwort. Beispielsweise sind Mutanten des Jasmonat-Signalwegs von *Arabidopsis* empfindlicher gegen bestimmte Pathogene (Staswick *et al.*, 1998).

4.4 Gel-Shift-Experimente (EMSA)

Durch einen electrophoretic mobility shift assay (EMSA) konnte nachgewiesen werden, dass bei der transienten Transformation von Weinprotoplasten cis-agierende Elemente des PST1-Promotors bzw. des PST1B-Promotors von Transkriptionsfaktoren aus Wein erkannt worden sind. Die Inkubation von radioaktiv markiertem PST1B-Promotorfragment mit Gesamtprotein aus Weinzellen führte zur Bildung eines DNA/Protein-Komplexes. Dieser zeigte im nativen Polyacrylamidgel eine veränderte elektrophoretische Mobilität. Bei Erhöhung der Gesamtproteinmenge von 8 auf 20 µg verschob sich das Gleichgewicht von der freien DNA auf die Seite des Komplexes, die elektrophoretische Beweglichkeit der gebundenen DNA veränderte sich aber nicht. Dies legt eine definierte Stöchiometrie des Protein/DNA-Komplexes nahe und damit eine spezifische Bindung.

Bei den Proteinen, die an das Promotorelement PST1B gebunden haben, kann es sich beispielsweise um bZIP-Transkriptionsfaktoren aus der Gruppe der TGA-Faktoren handeln. In Pflanzen sind bZIP-Transkriptionsfaktoren weit verbreitet. TGA-Faktoren binden beispielsweise an C-Boxen (de Pater *et al.*, 1996) und die Pentanucleotidsequenz TGACG, die im as-1-Element und im ocs-Element vorkommt (Lam und Lam, 1995).

Das as-1-Element vermittelt salizylat- und Auxin-Induzierbarkeit (Pascuzzi *et al.*, 1998; Qin *et al.*, 1994) sowie Induktion durch Xenobiotika (Johnson *et al.*, 2001). Das as-1-Element wird von Faktoren erkannt, die man ursprünglich aufgrund ihrer gemeinsamen Aktivität zusammenfassend als ASF1 (as-1-binding-factor) bezeichnet hat (Niggeweg *et al.*, 2000). Bei dieser Aktivität handelt es sich tatsächlich um mehrere bZIP-Proteine, die man als TGA-Faktoren bezeichnet (Niggeweg *et al.*, 2000). Lediglich eine Untergruppe agiert mit NPR1/NIM1 (Zhou *et al.*, 2000). Durch diese Interaktion erhöht sich die Bindungsaffinität dieser TGA-Faktoren zu ihrer Zielsequenz. NPR1/NIM1 besitzt eine wichtige Funktion im Signaltransduktionsweg der salizylat-abhängigen SAR (Dong *et al.*, 2001). Gleichzeitig ist es notwendig für die induzierte systemische Resistenz (inducible systemic resistance, ISR (Knoester *et al.*, 1999)). Bei der ISR kommt es beispielsweise bei *Arabidopsis* nach Kontakt mit nicht-pathogenen Rhizobakterien zu einer induzierten Resistenz, die nicht von der Akkumulation von Salizylat abhängt, aber intakte Jasmonat/Ethylen-Signalwege benötigt (Pieterse *et al.*, 1998). NIM1/NPR1 besitzt Ankyrin-Repeats und zeigt Homologie zu I κ B (Ryals *et al.*, 1997). Da das System NF- κ B/I κ B in Abwehrmechanismen von *Drosophila* bis zu Säugetieren eine Rolle spielt, liegt hier möglicherweise ein sehr alter und hochkonservierter Mechanismus der Signaltransduktion von Abwehrreaktionen vor. Der Transport von NPR1/NIM1 in den Zellkern ist notwendig für die Induktion der PR-Proteine (Kinkema *et al.*, 2000).

4.5 Die Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase-Gene im Vergleich mit anderen an der Pathogenabwehr beteiligten Genen

Pflanzen haben durch die Koevolution mit Pathogenen raffinierte Verteidigungsmechanismen entwickelt. Als Konsequenz dieses Prozesses ist Resistenz gegen ein Pathogen die Regel, und Suszeptibilität die Ausnahme.

Die induzierbaren Abwehrmechanismen umfassen drei Prozesse:

- 1: Erkennung des Pathogens
- 2: Auslösung einer Signalkaskade
- 3: Aktivierung von Verteidigungsmechanismen

Daneben gibt es noch eine basale Pathogenabwehr durch mechanische Barrieren (Epidermis). Prohibitine oder Vorstufen toxischer Stoffe, die bei Verwundung durch freigesetzte Enzyme aktiviert werden, tragen ebenfalls zur Pathogenabwehr bei (Harborne, 1995).

Die unmittelbar an der induzierbaren Pathogenabwehr beteiligten Prozesse sind die Expression pilzhemmender Proteine (Thionine, Defensine) (Bohlmann *et al.*, 1998) oder Enzyme, die die pilzliche Zellwand schädigen (Chitinasen und Glucanasen). Letztere sind eine Untergruppe der PR-Proteine und z. T. Ethylen-induzierbar. Die auch PR-Box genannte GCC-Box ist das dafür verantwortliche cis-agierende Element.

Andere PR-Proteine (PR1) sind anerkannte Marker der salizylatabhängigen SAR (Maleck *et al.*, 2000). Die Funktion von PR1 ist aber weitgehend ungeklärt.

Nach dem Phytoalexinkonzept kann die rasche Akkumulation eines Phytoalexins darüber entscheiden, ob es zu einer Infektion kommt oder nicht. Wenn die stressinduzierte Synthese eines Phytoalexins über die Regulation der Transkription der beteiligten Gene erfolgt, müssen sich im Promotorbereich dieser Gene Kontrollelemente befinden, die unter Stressbedingungen von Transkriptionsfaktoren erkannt werden.

Gleichzeitig muss sich ein Signal in der Pflanze ausbreiten, das von der Infektionsstelle entfernte Pflanzenteile auf die Abwehr vorbereitet. Die Fernwirkung von Jasmonat wird über Systemin vermittelt, das Gas Ethylen breitet sich im interzellularen Raum schnell aus. Die Fernwirkung bei der SAR könnte über Salizylat selbst laufen, oder über nitrosyliertes Glutathion.

Im PST1-Promotor befinden sich mindestens zwei unterschiedliche cis-agene Elemente, welche in Verbindung zu Pflanzenabwehr stehen: Die Pentanucleotidsequenz CGTCA sowie drei GCC-Boxen in inverser Orientierung.

Die GCC-Boxen (Konsensussequenz AGCCGCC), auch PR-Boxen genannt, sind die Erkennungssequenz einer auf Pflanzen beschränkten Klasse von Transkriptionsfaktoren (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995). Die Erkennung der Zielsequenz erfolgt über ein β -Faltblatt (Allen *et al.*, 1998). Gemeinsames Kennzeichen dieser Transkriptionsfaktoren ist das Vorhandensein einer ERF-Domäne genannten Aminosäuresequenz von 59 Aminosäuren. Die Erkennung der Zielsequenz und DNA-Bindung erfolgt bei diesen Transkriptionsfaktoren über die ERF (ethylene response factor)-Domäne durch Wechselwirkung mit der großen Furche der DNA (Hao *et al.*, 1998). ERFs selbst binden an die DNA als Monomer, ihre Erkennungssequenzen liegen jedoch fast immer als repeats von drei oder zwei GCC-Boxen in Promotoren vor.

Die Bezeichnung PR-Box geht auf das Vorkommen von GCC-Boxen in den Promotoren von PR-Proteinen zurück. Die stark konservierten PR-Proteine werden als Reaktion auf eine Infektion der Pflanze exprimiert. Einige PRP wurden als Glucanasen und Chitinasen identifiziert, denen eine synergistische Wirkung bei der Auflösung der pilzlichen Zellwand

zugeschrieben wird. Die physiologische Funktion anderer PR-Proteine ist hingegen noch weitgehend unklar (Agrawal *et al.*, 2000).

Die Induzierbarkeit einiger PR-Proteine durch Ethylen konnte auf das Vorhandensein von PR-Boxen zurückgeführt werden. Auch die beteiligten Transkriptionsfaktoren wurden identifiziert, so etwa EREBP aus Tabak. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass PR-Boxen nicht zwangsläufig mit dem Ethylen-Signaltransduktionsweg assoziiert sind. ERF-Domänen finden sich auch anderen Transkriptionsfaktoren, beispielsweise Pti4-6 (Pti steht für Pto-interacting).

Stromaufwärts von den drei GCC-Boxen befindet sich ein Sequenzmotiv CGTCA. Die inverse Schreibweise ist TGACG. Ein repeat dieses Sequenzmotivs bildet das regulatorische Element as-1 (activating sequence 1). Dieses Element findet sich u. a. im CaMV35S-Promotor und in diversen auxin-induzierbaren Promotoren. Auch eine Induzierbarkeit durch Salizylat wird dieser Erkennungssequenz zugeschrieben. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der PST1-Promotor durch Salizylat induzierbar ist. Das Vorhandensein einer Pentanucleotidsequenz, die als repeat das as-1-Element bildet, ist wahrscheinlich das für die Induzierbarkeit durch Salizylat verantwortliche, cis-agene Element im PST1-Promotor, wenn auch statt der zwei Boxen hier nur eine vorliegt. Alternativ kann man diese Box auch als leicht abweichende C-Box auffassen:

PST1:	T	C	A	C	G	T	C	A
C-Box:	T	G	A	C	G	T	C	A

Es ist naheliegend, dass ein Signalweg, der auf Jasmonat anspricht, auch durch Ethylen induziert wird, da beide Hormone normalerweise synergistisch wirken. Üblicherweise unterscheidet man zwei voneinander getrennte Abwehrantworten in Pflanzen. Zum einen den durch mechanische Verwundung, Insektenfraß oder nekrotrophe Pathogene aktivierte Wundantwort, für die Jasmonat und Ethylen benötigt werden und synergistisch wirken. Gut untersucht ist dieser Synergismus etwa bei PDF1.2.

Bei der analogen Übertragung auf die Pinosylvin-Synthase hätte man vermutet, dass Ethylen an der Induktion des PST1-Promotors beteiligt ist. Zumindest ein Pinosylvin-Synthase-Gen in Kieferkeimlingen wird durch Jasmonat induziert. Andererseits wird aber kein einziges der fünf Pinosylvin-Synthase-Gene in Kiefern durch Ethylen induziert. Dies war unerwartet, da in dem für die Induzierbarkeit essentiellen 136 bp-Bereich des PST1-Promotors 3 GCC-Boxen vorkommen, deckt sich aber völlig mit dem Befund, dass das Fragment GCC2 bei der transienten Expression in Weinprotoplasten inaktiv war. Da 2 GCC-Boxen nicht einmal für eine sehr geringe Induzierbarkeit ausreichen, können die GCC-Boxen alleine nicht für die Induzierbarkeit des PST1-Promotors verantwortlich sein.

Sehr hohen Ethylenkonzentrationen führen bei *Arabidopsis*-Keimlingen zur sogenannten „triple response“, einer charakteristischen Fehlentwicklung (Guzman and Ecker, 1990). Eine äußerlich sichtbare Veränderung der Kieferkeimlinge wurde nicht beobachtet und unter diesen Versuchsbedingungen auch nicht erwartet. Es wurde aber auch kein Absinken der Proteinmenge in den aufgeschlossenen Kieferkeimlingen nach Ethylenapplikation beobachtet. Da auch bei geringerer Konzentration von Ethylen (200 ppm) keine Induktion der Pinosylvin-Synthase erkennbar war (Daten nicht gezeigt), können Störungen durch toxische Effekte von Ethylen auf die Kieferkeimlinge ausgeschlossen werden. Es gibt aber auch Fälle, wo Ethylen

als Antagonist von Jasmonat wirkt und die Expression jasmonat-induzierbarer Gene hemmt. Interessanterweise handelt es sich hierbei auch um einen Sekundärmetaboliten (Kahl *et al.*, 2000; Shoji *et al.*, 2000). In kultivierten Tabakzellen erfolgt die Aktivierung eines Promotors für eine Chitinase zwar über GCC-Boxen, Ethylen ist dafür aber nicht notwendig (Yamamoto *et al.*, 1999). Dies ist ein weiterer Fall, wo GCC-Boxen nicht unmittelbar mit dem Ethylen-Signalweg in Verbindung stehen. Auch können ERFs die Transkription negativ regulieren (Fujimoto *et al.*, 2000; Ohta *et al.*, 2000).

Allerdings wurden im Rahmen dieser Arbeit nur die oberirdischen Pflanzenteile untersucht. Es wäre möglich, dass es zu einer Induktion der Pinosylvin-Synthase durch Ethylen in den unterirdischen Pflanzenteilen kommt. Auch könnte Ethylen unter anderen Umweltbedingungen oder in einem anderen Entwicklungs- und Differenzierungsstadium der Pflanze durchaus an der Induktion der Pinosylvin-Synthase beteiligt sein. Die noch zu klärende Frage ist, ob Jasmonat in Kiefern auch den PST1-Promotor induziert, oder ob die Induktion der Pinosylvin-Synthase in Kiefern durch gasförmiges Jasmonat auf ein anderes Gen zurückzuführen ist. Die kodierenden Regionen aller fünf Pinosylvin-Synthase-Gene aus *Pinus sylvestris* sind nahezu identisch. Der in dieser Arbeit gegen aufgereinigte Pinosylvin-Synthase entwickelte polyklonale Antiserum kann daher nicht zwischen der Induktion der fünf vorhandenen Promotoren unterscheiden, weil die Polypeptide jeweils fast identisch sind. Der PST1-Promotor ist in Tabak durch exogenes Jasmonat nur schwach induzierbar. Die Induzierbarkeit der Pinosylvin-Synthase in Kieferkeimlingen durch Methyljasmonat hingegen ist sehr deutlich. Eine mögliche Interpretation ist, dass für die Induktion durch Jasmonat einer der anderen Promotoren in Kiefern verantwortlich ist. Der PST1-Promotor ist andererseits in Tabak durch mechanische Verwundung induzierbar. Neuere Befunde deuten darauf hin, dass auch die Wundantwort nicht in jedem Fall über Jasmonat/Ethylen verläuft (Nishiuchi *et al.*, 1997).

Zusammenfassung

Pinosylvin ist ein Phytoalexin in Kieferkeimlingen. Die Synthese von Pinosylvin wird als Reaktion auf biotischen und abiotischen Stress durch Expression der Pinosylvin-Synthase induziert. Die Regulation erfolgt dabei auf der Ebene der Transkription der Pinosylvin-Synthase-Gene. Die Pinosylvin-Synthase liegt in Kiefern als Multigenfamilie mit stark unterschiedlichen Promotoren vor.

- (1) Im PST1-Promotor wurde durch distale Verkürzung ein für die Induzierbarkeit in Weinprotoplasten essentieller Bereich von 140 bp eingegrenzt. In diesem Bereich befinden sich 3 GCC-Boxen sowie ein TGACG-Element. Promotorfragmente mit zwei GCC-Boxen ohne TGACG-Element waren inaktiv. Die Pentanucleotidsequenz TGACG ist die Erkennungssequenz von Transkriptionsfaktoren, die in anderen Systemen die Induzierbarkeit durch Salizylsäure vermitteln. GCC-Boxen sind cis-agierende Elemente, die von Transkriptionsfaktoren mit ERF-Domänen erkannt werden. Diese können sowohl aktivierenden als auch hemmenden Einfluss auf die Transkription ausüben. In vielen Fällen vermitteln GCC-Boxen die Ethylen-Induzierbarkeit.
- (2) Die cDNA der Pinosylvin-Synthase wurde in einen Expressionsvektor kloniert. Das Enzym wurde rekombinant überexprimiert, gereinigt und für einen Enzymtest verwendet. Ein polyklonales Antiserum gegen die Pinosylvin-Synthase wurde in Kaninchen entwickelt.
- (3) Das Pflanzenhormon Methyljasmonat induziert die Pinosylvin-Synthase in Kieferkeimlingen. Ethylen zeigt keinen Effekt. Somit liegt der sonst übliche Synergismus dieser beiden Pflanzenhormone in bezug auf die Pinosylvin-Synthase nicht vor. Die drei GCC-Boxen im PST1-Promotor stehen nicht im Zusammenhang mit dem Ethylen-Signalweg.
- (4) Die Untersuchung des PST1-Promotors in transgenem Tabak in dieser Arbeit ergab, dass der PST1-Promotor durch Salizylsäure stark induziert wird. Dieser Promotor steht somit in Zusammenhang mit der systemisch erworbenen Resistenz (SAR).

genspezifische Oligonucleotide:

PST1-a	5'-CCGTACCCGGGGATCCAAGCGAAGCC-3'
PST1-b	5'-CATGTGCTGCAGCACGTCACACTCAC-3'
PST1-c	5'-CATATACATTGGCGGCTGCAGAGTCG-3'
PST1-d	5'-CAAAACCCATTCTGCAGTATTG-3'
PST1-e	5'-CAATTGCTGCAGTATTATTATATAATC-3'
GCC0	5'-CCTCATTGGCGGGAAGCTTCACAG-3'
GCC2	5'-CATTGGAAGCTTCACAGTCGATTTC-3'

Für die ortsspezifische Mutagenese zur Deletion der TGACG-Box wurden folgende Primer verwendet:

PST1- Δ as-1 _{for}	5'-GATTCATGTGATATGTCCACTCACTATATTATATTTTCTTCC-3'
PST1- Δ as-1 _{rev}	5'-GGAAGAAAATATAATATAGTGAGTGGACATATCACATGAATC-3'

Primer für *in-vivo*-footprint: Die genspezifischen Primer für den PST1-Promotor sind als LMPCR1-3 bezeichnet:

LMPCR1	5'-CTGTTTCAAAGACCAAGAC-3'
LMPCR2	5'-CTGGGTGGATTTGTAATTACCTC-3'
LMPCR3	5'-GATTTGTAATTACCTCGCAGTGAC-3'
LM1	5'-AGTTACTAGTGAGATCTGAATTC-3'
LM2	5'-GAATTCAGATC-3'

Primer zur Amplifikation der Pinosylvin-Synthase zur Klonierung in pQE30:

Pisy5'	5'-GAGATGGCATGCGTTGATTTTGAAG-3'
Pisy3'	5'-CGGGCTGCAGTAGGAGAGAATAAG3'

Literatur

- Agrawal G.K., Rakwal, R. and Jwa, N.S. (2000)
Rice (*Oryza sativa* L.) OsPR1b gene is phytohormonally regulated
in close interaction with light signals.
Biochem Biophys Res Commun, **278**: 290-8.
- Allen, M.D., Yamasaki, K., Ohme-Takagi, M., Tateno, M. and Suzuki, M. (1998)
A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution
structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA.
Embo J, **17**: 5484-96.
- Alvarez M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998)
Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of
plant immunity.
Cell, **92**: 773-84.
- Baulcombe, D.C., Chapman, S. and Santa Cruz, S. (1995)
Jellyfish green fluorescent protein as a reporter for virus infections.
Plant J, **7**: 1045-1053.
- Beale, M.H. and Ward, J.L. (1998)
Jasmonates: key players in the plant defence.
Nat Prod Rep, **15**: 533-48.
- Becker, J., Kempf, R., Jeblick, W. and Kauss, H. (2000)
Induction of competence for elicitation of defense responses
in cucumber hypocotyls requires proteasome activity.
Plant J, **21**: 311-6.
- Bohlmann, H., Vignutelli, A., Hilpert, B., Miersch, O., Wasternack, C.
and 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**: 281-6.
- Brehm I. (1998)
Untersuchungen zur Regulation des Stilben-Synthase-Gens *VST1* aus *Vitis vinifera*
Dissertation, Marburg.
- Brehm, I., Preisig-Muller, R. and Kindl, H. (1999)
Grapevine protoplasts as a transient expression system for comparison of stilbene synthase
genes containing cGMP-responsive promoter elements.
Z Naturforsch [C], **54**: 220-9.

- Buttner, M. and Singh, K.B. (1997)
Arabidopsis thaliana ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein.
Proc Natl Acad Sci U S A, **94**: 5961-6.
- Chapman, S., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C. (1992)
Potato virus X as a vector for gene expression in plants.
Plant J, **2**: 549-557.
- Chen, Z., Silva, H. and Klessig, D.F. (1993)
Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid.
Science, **262**: 1883-6.
- Chiron, H., Drouet, A., Lieutier, F., Payer, H.D., Ernst, D. and Sandermann, H., Jr. (2000)
Gene induction of stilbene biosynthesis in Scots pine in response to ozone treatment, wounding, and fungal infection.
Plant Physiol, **124**: 865-72.
- Church, G.M., and Gilbert, W. (1984)
Genomic Sequencing.
Proc Nat Acad Sci USA, **81**: 1991-1995.
- Coutos-Thevenot, P., Poinssot, B., Bonomelli, A., Yean, H., Breda, C., Buffard, D., Esnault, R., Hain, R. and Boulay, M. (2001)
In vitro tolerance to Botrytis cinerea of grapevine 41B rootstock in transgenic plants expressing the stilbene synthase Vst1 gene under the control of a pathogen-inducible PR 10 promoter.
J Exp Bot, **52**: 901-10.
- de Pater, S., Pham, K., Memelink, J. and Kijne, J. (1996)
Binding specificity and tissue-specific expression pattern of the Arabidopsis bZIP transcription factor TGA2.
Mol Gen Genet, **250**: 237-9.
- Dong, X. (1998)
SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants.
Curr Opin Plant Biol, **1**: 316-23.
- Dong, X., Li, X., Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M. and Clarke, J. (2001)
Regulation of systemic acquired resistance by NPR1 and its partners.
Novartis Found Symp, **236**: 165-73.

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. and Kauffmann, S. (1999)
Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor.

Plant Physiol, **121**: 163-72.

Durner, J. and Klessig, D.F. (1995)

Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses.

Proc Natl Acad Sci U S A, **92**: 11312-6.

Ecker, J.R. (1995)

The ethylene signal transduction pathway in plants.

Science, **268**: 667-75.

Friedrich, L., Vernooij, B., Gaffney, T., Morse, A. and Ryals, J. (1995)

Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene.

Plant Mol Biol, **29**: 959-68.

Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M. (2000)

Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression.

Plant Cell, **12**: 393-404.

Gamborg, O.L., Miller, R.A. and Ojima, K. (1968)

Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells.

Exptl Cell Res **50**: 151-158.

Garrity P.A and Wold B.J, (1992)

Effects of different DNA polymerases in ligation-mediated PCR : enhanced genomic sequencing and in vivo footprinting.

Proc Natl Acad Sci USA, **89**(2): 1021-25.

Gehlert R. (1992)

Die Stilben-Synthasen: Untersuchungen zum Mechanismus der Katalyse
Dissertation, Marburg

Gu, Y.Q., Yang, C., Thara, V.K., Zhou, J. and Martin, G.B. (2000)

Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase.

Plant Cell, **12**: 771-86.

Guzman, P. and Ecker, J.R. (1990)

Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants.

Plant Cell, **2**: 513-23.

Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schroder, G. and Stocker, R. (1990)
Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in
synthesis of the phytoalexin resveratrol.
Plant Mol Biol, **15**: 325-35.

Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B.,
Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H. and *et al.* (1993)
Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant.
Nature, **361**: 153-6.

Hanahan, D. (1983)
Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids.
J Mol Biol, **136**: 557-580.

Hao, D., Ohme-Takagi, M. and Sarai, A. (1998)
Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of
ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant.
J Biol Chem, **273**: 26857-61.

Harborne, J. B. (1995)
Ökologische Biochemie
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg-Berlin-Oxford

Horsch, R. B., Fraley, R. T., Rogers, S. G., Sanders, P. R., Lloyd, A., and Hoffmann, N.
(1984)
Inheritance of functional foreign genes in plants
Science **223**: 496-498.

Innis, M.A. and Gelfand D.H. (1990)
PCR Protocols
Academic Press, New York.

J.E. Parker and M.J. Coleman. (1997)
Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition.
Trends in Biochem Sci, **22**: 291-296.

Jefferson, R.A. (1987)
Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System.
Plant Molec Biol Reporter, **5**: 387-405.

Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W. (1987)
GUS fusions: β -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher
Plants.
EMBO J, **6**: 3901-3907.

- Johnson, C., Glover, G. and Arias, J. (2001)
Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor.
J Biol Chem, **276**: 172-8.
- Kahl, J., Siemens, D.H., Aerts, R.J., Gabler, R., Kuhnemann, F., Preston, C.A. and Baldwin, I.T. (2000)
Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore.
Planta, **210**: 336-42.
- Kindl H. (1985)
Biosynthesis of stilbenes
in: Biosynthesis and biodegradation of wood components (T. Higuchi, Ed.),
Academic Press, New York, 349-377.
- Kinkema, M., Fan, W. and Dong, X. (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, **12**: 2339-2350.
- Kitajima, S., Koyama, T., Ohme-Takagi, M., Shinshi, H. and Sato, F. (2000) Characterization of gene expression of NsERFs, transcription factors of basic PR genes from *Nicotiana sylvestris*. *Plant Cell Physiol*, **41**, 817-24
- Knoester, M., Pieterse, C.M., Bol, J.F. and Van Loon, L.C. (1999)
Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application.
Mol Plant Microbe Interact, **12**, 720-7.
- Kuc, J. (1995)
Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants
Annu Rev Phytopathol, **33**: 275-297.
- Kyhse-Anderson J. (1984)
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J Biochem Biophys Methods **10**: 203–209.
- Laemmli, U.K. (1970)
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature, **227**: 680-685.
- Lam, E. and Lam, Y.K. (1995) Binding site requirements and differential representation of TGF factors in nuclear ASF-1 activity. *Nucleic Acids Res*, **23**, 3778-85.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. and Ward, E. (1998) Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*.
Plant J, **16**, 223-33.

Linsmaier, E.M. and Skoog, F.(1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures.

Physiologia Plantarum **18**, 100-127.

Lodhi, M. A., Ye, G. N., Weeden, N. F. and Reisch, B. I.. (1994)

A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars, *Vitis* species and *Ampelopsis brevipedunculata*.

Plant Molec Biol Reporter **12**: 25-32.

Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L. and Dietrich, R.A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet*, **26**, 403-10.

McDowell, J.M. and Dangl, J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response.

Trends Biochem Sci, **25**: 79-82.

Melchior, F. (1987)

Diplomarbeit, Marburg

Mueller, P. R., B. Wold, and P. A. Garrity. (1992)

Ligation-mediated PCR for genomic sequencing and footprinting,

In: F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl (ed.), *Current protocols in molecular biology*, vol. 2. John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Müller, K. O. und Börger, H. (1940)

Experimentelle Untersuchungen über die Phytophthora - Resistenz der Kartoffel.

Arbeiten der Biologischen Reichsanstalt Land- und Forstwirtschaft, **23**: 189 – 231.

Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C. and Gatz, C. (2000)

Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid- and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters.

J Biol Chem, **275**: 19897-905.

Nishiuchi, T., Kodama, H., Yanagisawa, S. and Iba, K. (1999)

Wound-induced expression of the FAD7 gene is mediated by different regulatory domains of its promoter in leaves/stems and roots.

Plant Physiol, **121**: 1239-46.

Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. (1995)

Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element.

Plant Cell, **7**: 173-82.

Ohta, M., Ohme-Takagi, M. and Shinshi, H. (2000)

Three ethylene-responsive transcription factors in tobacco with distinct transactivation functions.

Plant J, **22**: 29-38.

- Parker J.E. and Coleman M. J. (1997)
Molecular intimacy between proteins specifying plant-pathogen recognition.
Trend in Biochem Sci, **22**: 291-296.
- Pascuzzi, P., Hamilton, D., Bodily, K. and Arias, J. (1998)
Auxin-induced stress potentiates trans-activation by a conserved plant
basic/leucine-zipper factor.
J Biol Chem, **273**: 26631-7.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx,
G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F. (1996)
Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis
follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**: 2309-23.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. and 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**: 2103-13.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek,
P.J. and van Loon, L.C. (1998)
A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis.
Plant Cell, **10**: 1571-80.
- Preisig-Muller, R., Schwekendiek, A., Brehm, I., Reif, H.J. and Kindl, H. (1999)
Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive
stilbene synthase genes.
Plant Mol Biol, **39**: 221-9.
- Qin, X.F., Holuigue, L., Horvath, D.M. and Chua, N.H. (1994)
Immediate early transcription activation by salicylic acid via the
cauliflower mosaic virus as-1 element.
Plant Cell, **6**: 863-74.
- Richard, S.; Lapointe, G.; Rutledge, R.G. and Séguin, A. (2000)
Induction of chalcone synthase expression in white spruce by wounding and jasmonate.
Plant Cell Physiol, **41**(8): 982-987.
- Rojo, E., Titarenko, E., Leon, J., Berger, S., Vancanneyt, G. and Sanchez-Serrano, J.J. (1998)
Reversible protein phosphorylation regulates jasmonic acid-dependent
and -independent wound signal transduction pathways in Arabidopsis thaliana.
Plant J, **13**: 153-65.
- Ross, A. F. (1961a)
Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts.
Virology, **14**: 329-339.
- Ross, A. F. (1961b)
Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants.
Virology, **14**: 340-358.

- Ruffer, M., Steipe, B. and Zenk, M.H. (1995)
Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase.
FEBS Lett, **377**: 175-80.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P. and Uknes, S. (1997)
The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I kappa B.
Plant Cell, **9**: 425-39.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. G. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich. (1988)
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science, **239**: 487-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989)
Molecular cloning: a laboratory manual.
2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977)
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci USA, **74**: 5463-5467.
- Schenk, R. U. and Hildebrandt, A. C. (1972)
Medium and Techniques for Induction
and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures .
Can J Bot, **50**: 199-204.
- Schoeppner, A. and Kindl, H. (1979)
Stilbene synthase (pinosylvine synthase) and its induction by ultraviolet light.
FEBS Lett, **108**: 349-52.
- Schwekendiek, A., Pfeffer, G. and Kindl, H. (1992)
Pine stilbene synthase cDNA, a tool for probing environmental stress.
FEBS Lett, **301**: 41-4.
- Shoji, T., Nakajima, K. and Hashimoto, T. (2000)
Ethylene suppresses jasmonate-induced gene expression in nicotine biosynthesis.
Plant Cell Physiol, **41**: 1072-6.
- Sivasankar, S., Sheldrick, B. and Rothstein, S.J. (2000)
Expression of allene oxide synthase determines defense gene activation in tomato.
Plant Physiol, **122**: 1335-42.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y. and Lehman, C.C. (1998)
Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus
Pythium irregulare.
Plant J, **15**: 747-54.

- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S.A., Schroder, J. and Schroder, G. (1994)
Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution.
J Mol Evol, **38**: 610-8.
- van Etten, H. D., Matthews, D. E. and Matthews, P. S. (1989)
Phytoalexin detoxification: importance for pathogenicity and practical implications
Annu Rev Phytopathol **27**: 143-164.
- Vernooij, B., Uknes, S., Ward, E. and Ryals, J. (1994)
Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions.
Curr Opin Cell Biol, **6**: 275-9.
- Wiese, W., Vornam, B., Krause, E. and Kindl, H. (1994)
Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment.
Plant Mol Biol, **26**: 667-77.
- Wojtaszek, P. (1997)
Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection.
Biochem J, **322**: 681-92.
- Xu, P., Narasimhan, M.L., Samson, T., Coca, M.A., Huh, G.H., Zhou, J., Martin, G.B., Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A. (1998)
A nitrilase-like protein interacts with GCC box DNA-binding proteins involved in ethylene and defense responses.
Plant Physiol, **118**: 867-74.
- Yamamoto, S., Suzuki, K. and Shinshi, H. (1999)
Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells.
Plant J, **20**: 571-9.
- Yanagisawa, S. (2001)
The transcriptional activation domain of the plant-specific dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells.
Plant Cell Physiol, **42**: 813-22.
- Yu, D., Xie, Z., Chen, C., Fan, B. and Chen, Z. (1999)
Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants.
Plant Mol Biol, **39**: 477-88.
- Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J. and Klessig, D.F. (2000)
NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid.
Mol Plant Microbe Interact, **13**: 191-202

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. H. Kindl in der Zeit von August 1998 bis September 2001

Herrn Prof. Dr. H. Kindl danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die interessante Aufgabenstellung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich bedanken, besonders bei Martina Korfei, Gereon Rogoß, Markus Lubeck und Petra Gnau.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern.