

Untersuchungen zur Funktion einer Lipxygenase in der induzierten Resistenz bei Reis

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Diplom-Biologin Frauke Zabbai
aus Eschweiler / Rhld.

Berichter:

Universitätsprofessor Dr. A.J. Slusarenko
Universitätsprofessor Dr. H.J. Grambow

Tag der mündlichen Prüfung: 05.03.2004

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online
verfügbar.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Schaffrath, U.; Zabbai, F. and Dudler, R. (2000)

Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. Eur. J. Biochem. 267, 5935-5942

1	Einleitung	1
1.1	Resistenz von Pflanzen gegen Mikroorganismen	4
1.1.1	Formen der Resistenz von Pflanzen gegen phytopathogene Organismen	5
1.1.1.1	Nicht-Wirt-Resistenz	5
1.1.1.2	Wirt-Resistenz	6
1.1.2	Aktive oder induzierbare Abwehrmechanismen	9
1.1.3	Modell der Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr	13
1.1.4	Resistenzmechanismen in Reispflanzen	15
1.1.5	Induzierte Resistenz (IR)	17
1.1.5.1	SAR und LAR (Salicylsäure-abhängiger Signalweg)	17
1.1.5.2	Die ISR (Salicylsäure-unabhängiger Signalweg)	24
1.2	Lipoxygenasen	24
1.2.1	Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg	26
1.2.2	Physiologische Rolle von Produkten des LOX-Stoffwechselwegs	29
1.3	Ziel der Arbeit	32
2	Material und Methoden	34
2.1	Biologisches Material	34
2.1.1	Anzucht der Versuchspflanzen	34
2.1.1.1	Reis	34
2.1.1.2	Radies	34
2.1.1.3	Gerste	35
2.1.2	Anzucht und Lagerung von Bakterien, sowie verwendete Plasmide und Sonden	35
2.1.2.1	Anzucht von Bakterien	35
2.1.2.2	Plasmide	37
2.1.2.3	Sonden	38
2.1.2.4	Glycerinkulturen	39
2.1.3	Chemische Resistenzinduktoren	39
2.1.4	Applikation von 13(S)-HOT	39
2.1.5	Chemikalien	40
2.2	Molekularbiologische Methoden	40
2.2.1	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	40
2.2.1.1	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> (Minipräp)	40
2.2.1.2	Plasmid-DNA-Maxipräparation aus <i>E. coli</i>	41

2.2.1.3	Isolation von Plasmid-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	42
2.2.2	Isolation genomischer DNA aus Reis	42
2.2.3	Restriktion von DNA	44
2.2.3.1	Restriktion von Plasmid-DNA	44
2.2.3.2	Restriktion genomischer DNA	44
2.2.4	Agarosegelelektrophorese von DNA	45
2.2.5	Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel	46
2.2.6	Auffüllen von überhängenden DNA-Enden	46
2.2.6.1	Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase	46
2.2.6.2	Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase	47
2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase	47
2.2.8	Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA	48
2.2.9	Ligation von DNA-Fragmenten	48
2.2.10	Präparation transformationskompetenter <i>E. coli</i> Zellen	48
2.2.11	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	49
2.2.12	Transformation von superkompetenten <i>E. coli</i> TOP 10 F'-Zellen	50
2.2.13	Präparation kompetenter <i>Agrobacterium</i> -Zellen für die Transformation mittels Elektroporation	50
2.2.14	Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mittels Elektroporation	51
2.2.15	Triparentale Konjugation	51
2.2.16	RNA-Isolation	52
2.2.16.1	Extraktion von RNA aus Reis und Gerste	52
2.2.16.2	Präparation von RNA mit der „hot phenol“-Methode	53
2.2.16.3	PolyA ⁺ -RNA-Isolation aus Gesamt-RNA	54
2.2.17	Agarosegelelektrophorese von RNA	55
2.2.18	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	56
2.2.19	Blotting von Nukleinsäuren	56
2.2.19.1	Northernblot	56
2.2.19.2	Southernblot	57
2.2.20	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	59
2.2.21	Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Exposition der Northern- und Southernblots (radioaktiv)	60
2.2.22	Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschrirte bei Verwendung von Dig-markierten Sonden	61
2.2.23	Immunodetektion von Dig-markierten Sonden	62
2.2.24	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR	62

2.2.25 Sequenzierung	63
2.2.26 Transiente Transformation von Pflanzen mit <i>Agrobacterium</i>	64
2.3 Biochemische Methoden	65
2.3.1 Proteinextraktion	65
2.3.1.1 Proteinextraktion aus <i>E. coli</i>	65
2.3.1.2 Proteinextraktion aus Reisblättern	66
2.3.2 LOX-Messung der Proteinextrakte aus <i>E. coli</i> oder Reisblättern	66
2.3.3 Polarographische Messung der Lipoxygenaseaktivität	67
2.3.4 Bestimmung der Positionsspezifität der LOX	68
2.3.5 Expression eines RCI1-GST-Fusionsproteins in <i>E. coli</i> BL21 unter Verwendung des Vektors pGEX4T-3	69
2.3.6 Aufreinigung eines rekombinanten Peptids aus einem GST-Fusionsprotein durch Expression in <i>E. coli</i> BL21 unter Verwendung des Vektors pGEX4T-3	72
2.3.7 SDS-PAGE	73
2.3.8 Bestimmung des Proteingehaltes	76
2.3.9 Silberfärbung von Proteingelen	77
2.3.10 Coomassie-Färbung	77
2.3.11 Westernblotting von Proteinen	78
2.3.11.1 Tankblotting	78
2.3.11.2 Semidry-Blotting	79
2.3.12 Ponceau S-Färbung von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran	79
2.3.13 Immunodetektion von Proteinen auf Westernblots	80
2.3.14 Aufreinigung von IgG-Antikörpern mittels Protein A-Agarose	81
2.3.15 Mikroskopische Analysen	82
2.3.15.1 Konfokale Lasermikroskopie	82
2.3.15.2 Lichtmikroskopie von Blattmaterial nach GUS-Färbung	82
3 Ergebnisse	84
3.1 Positions- und Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins	84
3.1.1 Herstellung eines Konstruktes für die Expression des rekombinanten RCI1-Proteins in <i>E. coli</i>	84
3.1.2 Spezifische Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten RCI1-Proteins	85
3.1.3 Positionsspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins	87
3.1.4 Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins	88

3.2	Southernanalyse von <i>RCI1</i>	89
3.3	Cytolokalisation von <i>RCI1</i>	91
3.3.1	Herstellung eines Konstruktes zur Aufklärung der Cytolokalisation von <i>RCI1</i>	91
3.3.2	Untersuchung der Cytolokalisation von <i>RCI1</i>	93
3.4	Überexpression der Lipoxxygenase <i>RCI1</i> in Reisblättern mittels transienter Transformation durch <i>A. tumefaciens</i>	96
3.4.1	Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Lipoxxygenase <i>RCI1</i> in Reisblättern	97
3.4.2	Test des Konstruktes zur Überexpression der Lipoxxygenase <i>RCI1</i> in Reisblättern (Test der Transformationsmethode)	98
3.4.3	Überexpression der Lipoxxygenase <i>RCI1</i> in Reisblättern durch transiente Transformation mit <i>A. tumefaciens</i>	100
3.4.3.1	Northernanalysen unter Verwendung von RNA der lokalen (infiltrierten) Blätter	100
3.4.3.2	Northernanalysen zum Vergleich der Expressionsmuster in transient transformierten infiltrierten („lokalen“) und angrenzenden („systemischen“) Blattbereichen	103
3.4.4	Messung der Lipoxxygenaseaktivität nach Überexpression von <i>RCI1</i> in Reisblättern	106
3.5	Analyse einer Deletionsmutante von <i>RCI1</i> bezüglich ihrer katalytischen Domäne (<i>RCI1katDel</i>)	108
3.5.1	Herstellung eines Konstruktes zur Expression des rekombinanten Proteins der Deletionsmutante <i>RCI1katDel</i> in <i>E. coli</i>	109
3.5.2	Messung der Lipoxxygenaseaktivität des rekombinanten Proteins <i>RCI1katDel</i>	112
3.5.3	Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Deletionsmutante <i>RCI1katDel</i> in Reisblättern	113
3.5.4	Überexpression der Deletionsmutante <i>RCI1katDel</i> in Reisblättern durch transiente Transformation mit <i>A. tumefaciens</i>	115
3.5.5	Elimination von Plasmid-DNA aus den RNA-Proben nach transienter Transformation von Reisblättern mit <i>RCI1</i>	118
3.6	Analyse einer Deletionsmutante von <i>RCI1</i> bezüglich des chloroplastidären Transitsignalpeptids (<i>RCI1cpTPDel</i>)	121
3.6.1	Herstellung eines Konstruktes zur Expression eines rekombinanten Proteins mit einer Deletion im Transitpeptid von <i>RCI1</i> (<i>RCI1cpTPDel</i>) in <i>E. coli</i>	122

3.6.2	Messung der Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten Proteins RCI1cpTPDel	124
3.6.3	Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Deletionsmutante <i>RCI1cpTPDel</i> in Reisblättern	125
3.6.4	Transformation von Reisblättern mit einem Konstrukt zur konstitutiven Expression der Deletionsmutante <i>RCI1cpTPDel</i>	129
3.6.5	Klonierung des Deletionskonstruktes <i>RCI1cpTPDel</i> in einen binären Vektor zur Untersuchung der Cytolokalisation	130
3.6.5.1	Konstrukt <i>RCI1cpTPDel:GFP</i> in pCambia 1302	130
3.6.5.2	Konstrukt <i>RCI1cpTPDel:GFP</i> in pCambia 1301	131
3.7	Ergebnisse der Applikation von 13(S)-HOT an Reispflanzen	133
3.8	Stabile Transformation von Reispflanzen mit einem RCI1-Überexpressionskonstrukt	135
3.8.1	Konstrukt zur Herstellung stabiler Reistransformanten bezüglich einer Überexpression von <i>RCI1</i>	135
3.8.2	Herstellung stabiler Reistransformanten bezüglich einer Überexpression von <i>RCI1</i>	136
3.9	Herstellung von Antikörpern gegen RCI1	137
3.9.1	Konstrukt zur Expression einer <i>RCI1:GST</i> -Fusion in <i>E. coli</i> BL21	139
3.9.2	Expression des <i>RCI1:GST</i> -Fusionsproteins in <i>E. coli</i> BL21	140
3.9.3	Aufreinigung des Antikörperserums mit Protein A-Agarose und Test des gereinigten Serums	141
4	Diskussion	144
4.1	Charakterisierung der Lipoxygenase RCI1	145
4.1.1	Regiospezifität von RCI1	146
4.1.2	Substratspezifität von RCI1	148
4.1.3	Phylogenetische Analyse von Lipoxygenasen	150
4.1.4	Subzelluläre Lokalisation von RCI1	153
4.2	Mögliche Funktionen der Lipoxygenase RCI1	155
4.2.1	Auswirkungen der Transformation von Reis mit verschiedenen RCI1-Konstrukten	158
4.2.1.1	Die Infiltration von <i>A. tumefaciens</i> -Suspensionen bewirkt die Akkumulation von Gentranskripten und die Steigerung der Lipoxygenaseaktivität in Reisblättern	158

4.2.1.2	Die Lipoxygenase RCI1 hat eine Auswirkung auf die Induktion der PR1-Transkription	162
4.2.2	Weitere denkbare Funktionen der Lipoxygenase RCI1	165
4.3	Zusammenfassung der Analyse der Lipoxygenase RCI1	168
5	Zusammenfassung	169
6	Summary	171
7	Literatur	173

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
A. dest.	entionisiertes Wasser
AOS	Allenoxidsynthase
APS	Amoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
Avr	Avirulenzgen
BC	<i>back cross</i> , Rückkreuzungslinie
BCI	"barley chemically induced"
BSA	"bovine serum albumine", Rinderserum-Albumin
BTH	Benzo(1,2,3)thiadiazol-7-carbothionsäure-S-methylester, Bion [®]
CAD	Cinnamylalkohol-Dehydrogenase
CaMV	<i>Cauliflower Mosaik Virus</i>
cDNA	"complementary" DNA
<i>Cht</i>	Chitinase
Ci	Curie
cv.	Kultivar
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosin-triphosphat
DCINA	2,6-Dichloro-isonikotinsäure
dCTP	Desoxycytidin-triphosphat
DEPC	Diethylpyrrocarbonat
DES	Divinylether-Synthase
dGTP	Desoxyguanosin-triphosphat
DIG	Digoxygenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-triphosphat
dpi	"days post inoculation", Tage nach Infiltration
dTTP	Desoxythymidin-triphosphat
EAS	Epoxyalkohol-Synthase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
f.sp.	<i>forma specialis</i>
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
GFP	"green fluorescent protein", grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion S-Transferase
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
13(S)-HOT	13(S)-Hydroxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
9-HPOD	9-Hydroperoxy-10(E),11(Z)-octadecadiensäure
13-HPOD	13-Hydroperoxy-9(Z),10(E)-octadecadiensäure
9-HPOT	9-Hydroperoxy-10(E),12(Z),15(Z)-octadecatriensäure
13-HPOT	13-Hydroperoxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure
hpi	"hour(s) post inoculation", Tage nach Inokulation
HPL	Hydroperoxid-Lyase
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie

HR	Hypersensitive Reaktion
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IR	Induzierte Resistenz
ISR	"induced systemic resistance"
JA	Jasmonat
kb	Kilobasenpaare
LOX	Lipoxygenase
M	molar
MCS	"multiple cloning site"
mRNA	messenger RNA
MOPS	4-Morpholino-propansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
OPDA	12-oxo Phytodiensäure
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCD	"programmed cell death", programmierter Zelltod
PCR	"polymerase chain reaction", Polymerase-Kettenreaktion
POX	Peroxygenase
ppm	parts per million
PR	"pathogenesis related"
PUFA	"polyunsaturated fatty acid", mehrfach ungesättigte Fettsäure
RCI	"rice chemically induced"
RIP	ribosomeninaktivierendes Protein
Rir	"rice induced resistance"
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	"reactive oxygen species", reaktive Sauerstoffspezies
rpm	"rounds per minute", Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAR	"systemic acquired resistance"
SDS	"sodium-dodecylsulfate", Natrium-dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sp-HPLC	"straight phase" HPLC
SSC	"sodium-salt-citrate" (Natriumchlorid und -citrat)
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N',N', N', N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TMV	Tabakmosaikvirus
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxy-polyethoxyethanol
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-monolaurat
u	unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
v/v	Volumenanteile
W	Watt
WCI	"wheat chemically induced"
WG	"wetable granulate", Formulierung
w/v	Gewichtsanteile

1 Einleitung

Pflanzen stellen die größte und wichtigste Gruppe der autotrophen Lebensformen dar. Sie sind mit Ausnahme autotropher Bakterien die einzigen Organismen, welche in der Lage sind, die Energie der Sonne durch die Photosynthese in für andere Organismen biologisch nutzbare Energie umzuwandeln.

Da Pflanzen im Gegensatz zu den meisten Tieren standortgebunden sind, müssen sie sich mit einer Vielzahl von Umweltbedingungen auseinandersetzen. Diese Umweltbedingungen werden sowohl durch abiotische als auch durch biotische Faktoren bestimmt. Hierbei wirken auf die Pflanzen diverse exogene Reize, welche zum Teil Stressreaktionen auslösen können. Als Stress bezeichnet man hierbei ein Reaktionsgeschehen, welches einsetzt, wenn ein Organismus so weit von seinen optimalen Lebensbedingungen entfernt ist, dass sich sein physiologischer Zustand nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verändert. Larcher (1987) wies die Gültigkeit dieses Stresskonzepts für Pflanzen nach.

Abb. 1.1 zeigt eine Zusammenstellung biotischer und abiotischer Faktoren, denen eine Pflanze ausgesetzt sein kann.

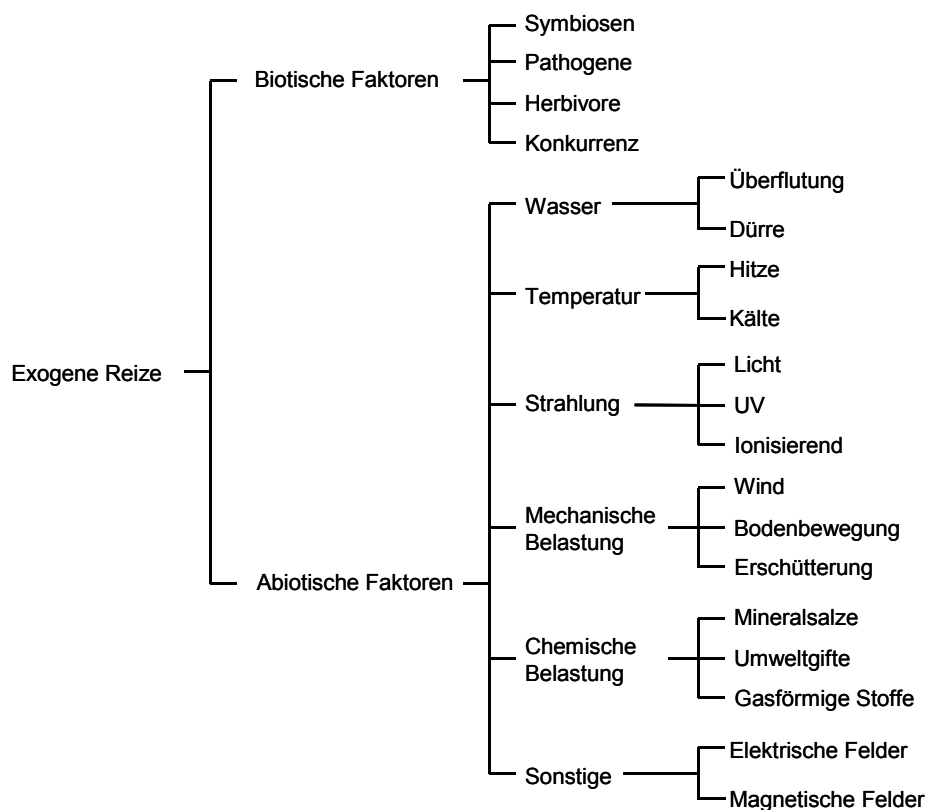


Abb. 1.1: Exogene Reize auf eine Pflanze (verändert nach Levitt, 1980)

Pflanzen haben eine Vielzahl von Mechanismen entwickelt, um ihre Toleranz gegen abiotische Stressfaktoren zu erhöhen. Dies kann zum einen durch physikalische Adaption oder durch interaktive molekulare und zelluläre Änderungen geschehen, welche nach dem Auftreten des Stresses beginnen (Knight and Knight, 2001).

Der erste Schritt bei der Einleitung solcher molekularen Antworten ist die Perzeption des Stressfaktors und die Weiterleitung der Information über eine Signaltransduktionskaskade, was dann zu physiologischen Änderungen und/oder Expression bestimmter Gene führen kann. In *Arabidopsis* wurde zum Beispiel AtHK1, eine Transmembran-Histidinkinase als putativer Osmosensor identifiziert (Urao et al., 1999). Dieser wird als erste Komponente der Signaltransduktionswege angesehen, welche die Trockenstress-induzierte Genexpression in *Arabidopsis thaliana* regulieren.

Eine frühe Reaktion in der Antwort auf abiotische, umweltbedingte Stressfaktoren ist die Erhöhung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration (Sanders et al., 1999). Hierbei scheint die Kinetik, Höhe und zelluläre Quelle der durch den Reiz induzierten Änderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration Informationen über die Art des Stimulus zu beinhalten (McAinsh and Hetherington, 1998).

Die Änderungen der Calciumkonzentration können über Calcium-regulierte Effektorproteine viele Prozesse steuern. Sogenannte Calciumsensoren sind zum Beispiel Calmodulin, Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPKs) und Ca^{2+} -regulierte Phosphatasen (Knight and Knight, 2001). Calmodulin spielt in *Arabidopsis* eine Rolle in der Antwort auf Kälte und mechanische Reize (Braam and Davis, 1990) und in Tabakpflanzen bei oxidativem Stress (Harding et al., 1997). In Reis wurde gezeigt, dass Kälte und Salzstress eine Akkumulation von Transkripten der Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinase OsCDPK7 bewirken. Allerdings erhöht eine Überexpression von OsCDPK7 die Expression von Salz- und Trockenstress-induzierten Genen, aber nicht von Kälte-induzierten Genen. OsCDPK7 scheint daher spezifisch für die Antwort auf Salz- und Trockenstress zu sein (Saijo et al., 2000). In *Arabidopsis* wurde SOS3, eine Ca^{2+} -regulierte Phosphatase identifiziert, welche spezifisch in die Antwort auf Salzstress involviert ist (Liu and Zhu, 1998).

Weiterhin wurde gezeigt, dass sogenannte MAPK („mitogen activated protein kinase“)-Kaskaden, welche in allen Eukaryoten konservierte Signalwege sind, durch eine Vielzahl abiotischer Stressreize aktiviert werden können (Zwerverger and Hirt, 2001). Hierbei phosphoryliert eine MAPK Kinase Kinase (MAPKKK) eine MAPK Kinase (MAPKK), welche dann wiederum eine MAPK phosphorylieren kann. In *Arabidopsis* sind drei Haupttypen von MAPKKK bekannt: CTR1, ANP1-3 und die AtMEKK-Klasse. AtMEKK1 wird als Antwort auf abiotische Stressfaktoren exprimiert (Mizoguchi et al., 1996). Innerhalb der Signaltransduktion über eine MAPK-Kaskade

ermöglicht wahrscheinlich eine bestimmte Kombination von MAPKKK-MAPKK-MAPK-Komplexen eine reizspezifische Antwort zum Beispiel auf bestimmte abiotische Stressfaktoren (Knight and Knight, 2001).

An der Induktion der Expression stressabhängiger Gene sind zudem Transkriptionsfaktoren beteiligt. So werden in *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren der Klasse *DREB1* (*CBF1*) und *DREB2* durch niedrige Temperaturen oder Salz- und Trockenstress induziert. Diese binden an bestimmte *cis*-aktive Elemente, die in den Promotoren vieler Kälte- oder Trockenstress-regulierter Gene vorhanden sind (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1994; Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998).

Ein wichtiger biotischer Stressfaktor im Leben der Pflanzen, auf den in den folgenden Kapiteln genauer eingegangen werden soll, ist der Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen. Während totes pflanzliches Material von zahlreichen Mikroorganismen, sogenannten Saprophyten, als Nahrungsquelle verwendet werden kann, haben nur wenige Mikroorganismen im Laufe der Evolution die Fähigkeit zu perthotropher oder biotropher Lebensweise erlangt und sind in der Lage, lebende Pflanzen zu besiedeln (Isaac, 1992).

Die Vertebraten besitzen zur Abwehr von Pathogenen ein komplexes Immunsystem mit einer Vielzahl spezialisierter Zelltypen für Pathogenerkennung oder Ausführung von Abwehrreaktionen, welche durch das Blutkreislaufsystem an den Infektionsort transportiert werden können. Obwohl Pflanzen aufgrund des fehlenden Blutkreislaufsystems kein mit den Vertebraten vergleichbares Immunsystem besitzen, sind sie dennoch nicht schutzlos dem Angriff potentieller Pathogene ausgeliefert. Allerdings muss bei ihnen jede Zelle in der Lage sein, Abwehrmaßnahmen auszuführen. Trotzdem kommt es durch Pflanzenkrankheiten häufig zu hohen Ernteaussfällen verbunden mit bedeutendem wirtschaftlichen Schaden. Trotz intensiver Pflanzenschutzmaßnahmen liegen die Ernteverluste bei den Nahrungspflanzen in den letzten 20 Jahren bei etwa 50% (Oerke und Dehne, 1997), daher besteht ein unverminderter Bedarf an neuen Pflanzenschutzstrategien, für deren Entwicklung die genaue Kenntnis physiologischer und biochemischer Vorgänge von Wirt-Parasit-Interaktionen und ihrer genetischen Grundlagen Voraussetzung ist.

Im integrierten Pflanzenschutz zum Beispiel, bei dem mittels einer Kombination von Verfahren versucht wird, den Befall mit Schadorganismen unterhalb einer wirtschaftlich relevanten Schwelle zu halten, spielt die Aufklärung resistenzsteigernder Mechanismen eine große Rolle. Im Gegensatz zum klassischen Pflanzenschutz mit Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel soll hier durch biologische, pflanzenzüchterische sowie anbau- und kulturtechnische Maßnahmen die Anwendung chemischer Pflanzenschutzmittel auf ein notwendiges Maß

herabgesetzt werden. Eine neue Perspektive eröffnet sich für den integrierten Pflanzenschutz durch die Aufklärung von Mechanismen der induzierten Resistenz in Pflanzen. Hierbei handelt es sich um eine Aktivierung pflanzeigener Abwehrmechanismen durch Einsatz resistenzinduzierender Komponenten, was zu einer Resistenz der Pflanze gegen ein breites Spektrum an Pathogenen führt (Kessmann et al., 1994).

Die Aufklärung von Resistenzmechanismen, insbesondere auch die molekularen Prozesse in der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen, sind eine zentrale Frage, mit der sich die moderne Phytopathologie beschäftigt. Eine Kenntnis der an der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligten Gene, Genprodukte und vor allem ihrer genauen Funktion kann in einem weiteren Schritt auch die Herstellung von Nutzpflanzen mit Resistenzen ermöglichen, welche mit Hilfe gentechnologischer Methoden in der Pflanze etabliert werden (Strittmacher and Wegener, 1993).

1.1 Resistenz von Pflanzen gegen Mikroorganismen

Wechselbeziehungen zwischen einer Pflanze und einem Mikroorganismus (Virus, Bakterium, Pilz) können in kompatible (verträgliche) und inkompatible (unverträgliche) Interaktionen unterschieden werden. Bei der Kompatibilität wird der Mikroorganismus als virulentes Pathogen bezeichnet, das die Pflanze, den Wirt, erfolgreich besiedeln und sich auf oder in ihr vermehren kann. Hierbei wird der Wirt geschädigt. Ein Sonderfall kompatibler Interaktion ist die Toleranz, die dadurch gekennzeichnet ist, dass die Pflanze trotz massiven Befalls durch das Pathogen keine starken Krankheitssymptome und keine deutlichen Ertrags- oder Biomasseverluste zeigt (Agrios, 1997; Schlösser 1997a).

Der Regelfall in der Beziehung zwischen Pflanze und Mikroorganismus ist allerdings die Basisresistenz (Heath, 1987). Hier führen passive aber auch unspezifische induzierte Abwehrmechanismen der Pflanze dazu, dass ihre Besiedlung durch einen Mikroorganismus verhindert wird (Heath, 1974). Durch evolutionäre Veränderungen kann es einem Pathogen gelingen, diese Abwehrmechanismen zu überwinden. Man spricht dann von Basiskompatibilität. Diese kann durch die Entwicklung Rassen-Sorten-spezifischer Mechanismen von Seiten der Pflanze wieder zu einer inkompatiblen Interaktion umgekehrt werden.

1.1.1 Formen der Resistenz von Pflanzen gegen phytopathogene Organismen

1.1.1.1 Nicht-Wirt-Resistenz

Die meisten potentiellen Pathogene können eine bestimmte Pflanze nicht besiedeln oder sich auf ihr vermehren. Dieser Zustand wird als Nicht-Wirt-Resistenz bezeichnet. Diese Form der Resistenz ist eine meist durch viele genetische Faktoren, das heißt polygen oder multigen, determinierte Resistenz, bei der alle Genotypen einer Pflanzenart gegenüber allen Genotypen eines potentiellen Pathogens resistent sind (Heath, 1991). Die Nicht-Wirt-Resistenz kann durch ihren häufig polygenen Charakter nur schwer gebrochen werden. Sie ist relativ stabil gegenüber Änderungen in der Population der Pathogene, es sei denn der physiologische Zustand des potentiellen Wirts ändert sich aufgrund wechselnder Umweltbedingungen (Schlösser, 1997a). Allerdings ist auch zu bedenken, dass diese Nicht-Wirt-Resistenz letztendlich durch alle Wirtspathogene gebrochen worden ist.

Ein Grund für die Nicht-Wirt-Resistenz kann darin liegen, dass die Pflanze dem Mikroorganismus nicht die nötigen Überlebensvoraussetzungen bietet, die er aufgrund seiner Physiologie oder seiner Umweltansprüche benötigt. Weiterhin kann die Pflanze über eine Reihe konstitutiver Abwehrmechanismen, wie mechanische Barrieren und biochemische Komponenten verfügen, welche Basisresistenz bedingen, oder es können unspezifische induzierte Abwehrmechanismen zu dieser Resistenz führen (Schlösser, 1997a; b). Die konstitutive, passive Abwehr bedarf keines Erkennens des Pathogens durch die Pflanze und basiert zum Beispiel auf Oberflächenbeschaffenheiten der Pflanze, welche ein Eindringen des potentiellen Pathogens verhindern oder dessen Entwicklung hemmen. Ursachen hierfür können unter anderem Dicke und Zusammensetzung der Kutikula, Haare, Anzahl und Struktur der Stomata, sowie das Fehlen bestimmter topographischer und chemischer Reize für die Entwicklung des Pathogens sein (Agrios, 1997; Schlösser, 1997a). Zum Teil können auch konstitutiv vorhandene Inhaltsstoffe der pflanzlichen Zelle zur Pathogenabwehr beitragen (Callow, 1984). In diesem Zusammenhang sind Metabolite des Sekundärstoffwechsels, wie zum Beispiel Senföle, Saponine und Phenole zu nennen, aber auch komplexe Moleküle wie Enzyminhibitoren (z. B. Proteaseinhibitoren), kohlenhydratbindende Lektine, Glukanasen, Chitinasen, RIPs (ribosomeninaktivierende Proteine), Defensine und Snakins (Proteine mit direkter antimikrobieller Wirkung in Speicher- bzw. generativem Gewebe) zu nennen (Stirpe et al., 1992; Broekaert et al., 1995; Osbourn, 1996; Agrios 1997; Schlösser 1997a; Segura et al., 1999; Heath, 2000).

In neueren Untersuchungen zeigt sich, dass die Aktivierung unspezifischer Abwehrmechanismen innerhalb der Nicht-Wirt-Resistenz durch die Erkennung von Nicht-Wirt-Avirulenz-Genprodukten des Mikroorganismus seitens der Pflanze erfolgen kann (Heath, 2001). Der Mechanismus dieser Induktion ist ähnlich der Erkennung eines Elicitors durch die Pflanze innerhalb der rassenspezifischen Resistenz und beinhaltet ähnliche Gen-für-Gen-Interaktionen (s. 1.1.1.2). So ist zum Beispiel die Nicht-Wirt-Resistenz in *Nicotiana benthamiana* gegen das Nicht-Wirt-Pathogen *Phytophthora infestans* abhängig vom Vorhandensein eines zelltod-auslösenden Proteins des Pathogens (Kamoun et al., 1998). Oft aber wird die Nicht-Wirt-Resistenz nicht durch eine einzelne Komponente, sondern durch eine ganze Reihe an Faktoren ausgelöst, oder sie basiert wie beschrieben auf konstitutiven Abwehrmechanismen der Pflanze. Heath (2001) spekuliert, dass die Nicht-Wirt-Resistenz von Pflanzen gegen Pathogene von evolutionär nicht sehr eng verwandten Wirten aufgrund schlechterer Anpassung des Mikroorganismus eher die Folge einer effektiven nichtspezifischen Abwehr sein könnte, als die Folge eines spezifischen Erkennungsprozesses. Je besser ein Nicht-Wirt-Pathogen an die Nicht-Wirt-Pflanze adaptiert ist, zum Beispiel wenn es sich um ein Pathogen einer eng verwandten Pflanzenspezies handelt, desto wahrscheinlicher ist es, dass die Nicht-Wirt-Resistenz auf Gen-für-Gen-Interaktionen beruht.

1.1.1.2 Wirt-Resistenz

Bei der Wirt-Resistenz wird zwischen horizontaler (quantitativer) und vertikaler (qualitativer) Resistenz unterschieden (van der Plank, 1984; Heath, 2000).

horizontale Resistenz

Bei der horizontalen Resistenz, die wie die Nicht-Wirt-Resistenz unter komplexer genetischer Kontrolle steht, ist ein Genotyp einer Pflanzenart gegenüber einigen, wenn nicht allen Rassen eines Pathogens resistent. Diese Art der Resistenz ist rassenunspezifisch und dauerhaft, aber meist unvollständig. Sie umfasst zum Beispiel die altersbedingte oder organspezifische Resistenz, über deren Wirkmechanismen noch wenig bekannt ist (Schlösser, 1997a).

vertikale Resistenz

Der Hypothese von Heath (1991) zufolge wird angenommen, dass durch Koevolution von Wirt und Pathogen zuvor wirksame Mechanismen der Basisresistenz von einigen Mikroorganismen mit Hilfe von Pathogenitätsfaktoren durchbrochen werden konnten, wodurch eine sogenannte Basiskompatibilität entstand. So entwickelten sich

Pathogenpopulationen mit Genotypen unterschiedlicher, sich überschneidender Wirtsspezifitäten. Durch die Pathogene wurde ein hoher Selektionsdruck auf die Wirtspopulation ausgeübt. Letztendlich kam es durch Erkennungs- und Abwehrmechanismen von Seiten der Pflanzen zur Bildung verschiedener Pathogenrassen mit sich nicht überschneidenden Wirtsspektren. Dieser Zustand wird als vertikale Resistenz bezeichnet, bei der ein bestimmter Wirtsgenotyp vollständige Resistenz gegenüber einer Teilpopulation des Pathogens, einer Rasse, besitzt. Diese vertikale Resistenz ist also Rassen-Sorten-spezifisch (Ellingboe, 1981) und lässt sich mit der Gen-für-Gen-Hypothese von Flor beschreiben (Flor, 1956 und 1971). Hierbei existiert zu jedem resistenzvermittelnden Wirtsgen (Resistenzgen) auf Seiten des Pathogens ein korrespondierendes Avirulenzgen, welches ursprünglich meist keinen Einfluss auf Virulenz oder Avirulenz des Pathogens hatte. Man geht davon aus, dass in einer anfälligen Pflanze bei vorhandener Basiskompatibilität ein Gen zum Resistenzgen werden kann, indem sein Genprodukt mit einem Avirulenzgenprodukt des Pathogens direkt oder indirekt interagiert (Heath, 1991). Man kann sich den Ablauf einer inkompatiblen Interaktion als Erkennungsreaktion zwischen einem Rezeptor als Produkt des Resistenzgens (*R*) und einem spezifischen Elicitor als Produkt des Avirulenzgens (*Avr*) vorstellen. Diese Erkennung löst über Signaltransduktionskaskaden Abwehrreaktionen der Pflanze aus (de Wit, 1997; Sommsich and Hahlbrock, 1998). Mutiert eines der beteiligten Gene, was zu einer Veränderung des jeweiligen Genproduktes führt, so ist die Elicitor-Rezeptor-Bindung gestört und die Interaktion wird kompatibel. Die Allele für Rezeptor und Avirulenzgenprodukt werden in der Regel dominant vererbt und wirken in komplementärer Kombination (de Wit, 1992; Hammond-Kosack and Jones, 1997). Abbildung 1.2 zeigt die Kombinationen von Avirulenz- und Resistenzgenen, sowie die daraus resultierende Interaktion zwischen Pathogen und Wirt.

Neuerdings wird für *R*-Genprodukte auch eine "Wächterfunktion" postuliert, bei der sie die Interaktion zwischen Avirulenzfaktoren eines Pathogens und Zielproteinen des Wirtsorganismus detektieren (Dangl and Jones, 2001; Hammond-Kosack and Parker, 2003).

Die vertikale Resistenz einer Pflanzensorte gegen eine Pathogenrasse ist jeweils durch ein einzelnes Gen (monogene Resistenz) oder selten durch einige wenige Gene (oligogene Resistenz) bedingt (Agrios, 1997; de Wit and Joosten, 1999). Die zumeist monogene Vererbung macht diese Form der Resistenz zu einem interessanten Züchtungsziel. Allerdings ist die Wirksamkeit von Resistenzgenen meist auf einen Zeitraum zwischen drei und zehn Jahren bis zum Auftreten eines Resistenzbruchs begrenzt (Schlösser, 1997a).

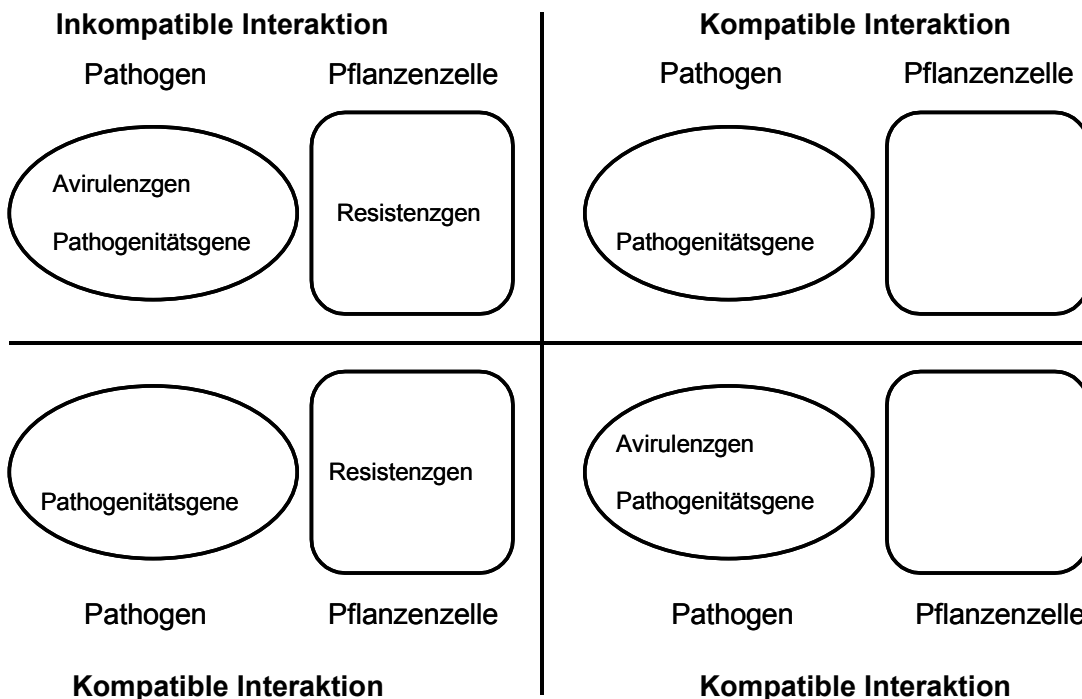


Abb. 1.2: Kombinationen von Avirulenz- und Resistenzgenen, sowie die daraus resultierende Interaktion zwischen Pathogen und Wirt (verändert nach Staskawicz et al., 1995)

Das Vorhandensein von Resistenzgenen in Pflanzen wurde für viele Pathosysteme, zum Beispiel für Tomate/*Fulvia* [syn. *Cladosporium*] *fulvum*, Tomate/*Pseudomonas syringae*, Reis/*Magnaporthe grisea* oder *A. thaliana*/*Pseudomonas syringae* gezeigt. Die tatsächliche Bindung von Rezeptor und Elicitor wurde allerdings erst in neuerer Zeit für die Systeme Tomate (Pto) - *P. syringae* (Avr-Pto), und *Arabidopsis* (RPS2) – *P. syringae* (Avr-RPT2) (Bonas and van den Ackerveken, 1999; de Wit and Joosten, 1999; Leister and Katagiri, 2000; Cohn et al., 2001) gezeigt. Die Bindung von Reis (Pi-ta) – *M. grisea* (Avr-Pi-ta) stellt in dieser Reihe eine Ausnahme dar, da es sich bei *M. grisea* um ein pilzliches Pathogen handelt (Jia et al., 2000).

Zu den in Folge der Pathogenerkennung induzierten Abwehrmechanismen der Pflanze gehören Modifikationen der pflanzlichen Zellwände, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies („oxidative burst“), die Bildung von Phytoalexinen und PR- („pathogenesis-related“-) Proteinen, die hypersensitive Reaktion (HR) und letztendlich die Aktivierung von Abwehrmechanismen gegen nachfolgende Infektionen (induzierte Resistenz, IR; s. Kapitel 1.1.5). Auf lokaler Ebene erfolgt die Induktion der Abwehrmechanismen innerhalb weniger Minuten bis Stunden nach Kontakt mit dem Pathogen, während die Etablierung der systemischen Resistenz mehrere Stunden bis Tage dauert. Die aktiven Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen Pathogenbefall werden im Folgenden genauer beschrieben.

1.1.2 Aktive oder induzierbare Abwehrmechanismen

Unter induzierter Abwehr versteht man physikalische oder biochemische Mechanismen, welche in der Pflanze erst nach Kontakt mit einem Mikroorganismus aktiviert werden. Potentielle Elicitoren für die Induktion der Abwehrmechanismen sind vom Pathogen sekretierte Substanzen (Glykoproteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren oder Peptide) sowie Abbauprodukte der Oberfläche des Erregers oder der pflanzlichen Zelle, welche durch Einwirkung von Enzymen des Wirts oder des Pathogens entstehen (Blumwald, 1998; Somssich and Hahlbrock, 1998). Diese Elicitoren können sowohl rassenunspezifisch als auch rassenspezifisch sein und daher zu horizontaler oder vertikaler (resistenzgenvermittelter) Resistenz führen (Heath, 2000). Es wird postuliert, dass die Erkennung eines Elicitors durch Bindung an einen membrangebundenen oder cytosolischen Rezeptor der Pflanze über eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung der Abwehrmechanismen führt (Scheel, 1998).

Zur induzierten Abwehr der Pflanze gehören Modifikationen der pflanzlichen Zellwand, welche den mechanischen Einwirkungen und der Aktivität hydrolytischer Enzyme von Seiten des Pathogens standhalten und somit dessen Eindringen verhindern oder verzögern. Dies wird zum Beispiel durch Ablagerungen von Zellwandbestandteilen, insbesondere von Kallose (poly- β -1,3-Glukan), Lignin, Suberin und basischen, hydroxyprolinreichen Glykoproteinen, erreicht, wobei diese Substanzen zur weiteren Stabilisierung zum Teil polymerisiert oder miteinander vernetzt werden (Hammerschmidt, 1984; Brisson et al., 1994; Bestwick et al., 1995; Wojtaszek et al., 1995; Hammond-Kosack and Jones, 1996; Agrios, 1997). Der sehr früh in die Wirt-Parasit-Interaktion eingreifende Mechanismus der Bildung eng begrenzter Zellwandappositionen (Papillen) zwischen der Zellwand und dem Plasmalemma unterhalb der Penetrationsstelle des Pathogens (Bestwick et al., 1997) verhindert oder verzögert vor allem das Eindringen pilzlicher Hyphen in die pflanzliche Zelle (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Agrios, 1997).

Eine weitere Komponente der Pathogenabwehr in Pflanzen ist der "oxidative burst". Als „oxidative burst“ wird die schnelle und transiente Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), wie z.B. Superoxidanionen, Hydroxylradikalen oder Wasserstoffperoxid, als Antwort auf biotische und abiotische Reize bezeichnet. Er ist charakteristisch für die frühe pflanzliche Resistenzantwort nach einem Pathogenbefall oder nach Elicitierung (Lamb and Dixon, 1997).

Für die Bildung der ROS in der Pathogenabwehr werden zwei mögliche Hypothesen diskutiert:

1. eine Reduktion von Sauerstoff durch ein Plasmamembran-gebundenes NADPH-Oxidase-System
2. eine pH-abhängige H_2O_2 -Produktion durch apoplastische Peroxidasen (Wojtaszek, 1997; Blumwald et al., 1998; Scheel, 1998; Somssich and Hahlbrock, 1998).

Die Bildung der ROS während des "oxidative burst" könnte nach neueren Untersuchungen mechanistisch ähnlich dem respiratorischen "burst" menschlicher Phagozyten ablaufen, welcher durch eine NADPH-Oxidase katalysiert wird. In Pflanzen sind in neuerer Zeit Homologe zu zwei Komponenten des menschlichen NADPH-Oxidase-Komplexes (gp91^{phox} und Rac) kloniert worden (McDowell and Dangl, 2000; Nürnberger and Scheel, 2001). So sind in *Arabidopsis* acht gp91-Homologe isoliert worden (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) und in Reis sind bis jetzt drei Rac-Homologe (*OsRac1-3*) identifiziert worden (Kawasaki et al., 1999).

Es gibt mehrere Möglichkeiten für eine Funktion, welche ROS in der Resistenzantwort bei dikotylen Pflanzen haben können. So können ROS zum Beispiel eine direkte antimikrobielle Wirkung haben. Peng und Kuc (1992) zeigten in Tabak die antifungale Wirkung von H_2O_2 . ROS können zudem an der oxidativen Quervernetzung von Strukturproteinen in der pflanzlichen Zellwand (Bradley et al., 1992; Brisson et al., 1994) und an der Polymerisation von Lignin (Olson und Warner, 1993) beteiligt sein. Superoxidanionen können die Bildung nekrotischer Läsionen in einer *Arabidopsis*-Mutante initiieren (Jabs et al., 1996). In Petersiliezellkulturen sind ROS an der Signaltransduktionskaskade der Wirt-Parasit-Interaktion nach Elicitor-Applikation beteiligt (Nürnberger et al., 1994). In transgenen Kartoffeln, welche eine H_2O_2 -generierende Glukoseoxidase exprimieren, konnte die Induktion der Phytoalexinakkumulation und die Expression von Abwehrgenen gezeigt werden (Wu et al., 1995; Wu et al., 1997). Weiterhin können ROS in die Auslösung des hypersensitiven Zelltods involviert sein (Levine et al., 1994; Lamb and Dixon, 1997). Allerdings wird in weiteren Untersuchungen gezeigt, dass ROS alleine nicht in der Lage sind, den hypersensitiven Zelltod in Pflanzen auszulösen (Baker and Orlandi, 1995). Glazener et al. (1996) zeigten, dass der "oxidative burst" in Zellkulturen als Antwort auf avirulente Bakterien nicht ausreicht, um HR auszulösen. ROS scheinen auch an der Signaltransduktionskaskade der induzierten Resistenz beteiligt zu sein (Bi et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995).

In Monokotyledonen ist die Rolle der ROS weit schlechter untersucht. So scheinen ROS aber zum Beispiel in die Resistenz von Gerste gegen Mehltau involviert zu sein

(El-Zahabi et al., 1995; Zhang et al., 1995; Hückelhoven et al., 2000). Weiterhin zeigen transgene Reislinien, welche ein aktives OsRac1-Derivat konstitutiv exprimieren, sowohl erhöhte ROS- als auch Phytoalexinlevel, entwickeln Symptome des programmierten Zelltods und zeigen erhöhte Resistenz gegen pilzliche und bakterielle Reispfadogene. Bei Expression eines dominant-negativen OsRac1-Derivats hingegen ist die elicitorstimulierte ROS-Produktion und der pathogeninduzierte Zelltod in den transgenen Reispflanzen supprimiert (Kawasaki et al., 1999; Ono et al., 2001).

Die hypersensitive Reaktion (HR)/der hypersensitive Zelltod ist eine aktive Abwehrreaktion, bei der der Tod einer Wirtszelle innerhalb von ein paar Stunden nach Pathogenangriff auftritt (Agrios, 1997). Es handelt sich hierbei um einen aktiven Vorgang, der die Biosyntheseleistung der Pflanze erfordert, daher wird sie als eine Form des programmierten Zelltods („programmed cell death“, PCD) betrachtet (Greenberg, 1996). Als physiologische Merkmale der HR in Pflanzen sind Zellwandmodifikationen, Membranschädigungen, Elektrolytverlust, Lipidperoxidation, Induktion von Enzymen, Dekompartimentierung, Degeneration der DNA, Bildung apoptotischer Vesikel und schließlich das Kollabieren der Zellen zu nennen (Slusarenko et al., 1991; Dangl et al., 1996; Slusarenko, 1996).

Durch die HR wird biotrophen Schaderregern, die zur Ernährung auf lebende Wirtszellen angewiesen sind, die Nahrungsgrundlage entzogen (Heath, 1980; Hammond-Kosack and Jones, 1996), ihre Rolle bei der Abwehr hemibiotropher Pathogene ist hingegen nicht ganz klar, da diese auch tote Pflanzenzellen als Nahrungsquelle nutzen können. Möglicherweise könnte aber eine mit der HR einhergehende Dekompartimentierung der Wirtszellen zu einer Freisetzung antimikrobieller Substanzen aus der Vakuole führen (Osbourn, 1996). Auf diese Weise könnte es zu einer Akkumulation von Phytoalexinen (siehe nächsten Abschnitt) bis zu inhibitorisch wirksamen Konzentrationen kommen, da diese ansonsten in intakten Zellen rasch metabolisiert werden (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

Phytoalexine sind antimikrobielle, lipophile, niedermolekulare Substanzen verschiedener Stoffklassen, welche in Pflanzenzellen nach Pathogenbefall akkumulieren (Paxton, 1981; Hammond-Kosack and Jones, 1996). Diese Akkumulation erfolgt oft sehr nahe an der Infektionsstelle (Dixon, 1986; Ebel, 1986). Häufig zeigt sich eine Korrelation zwischen Synthese der Phytoalexine und der Resistenz der Pflanze gegen Pathogene (Bennet and Wallsgrove, 1994; Schlösser, 1997a). Transgene Tabakpflanzen zum Beispiel, welche konstitutiv eine Stilbensynthase exprimieren und somit einen hohen Level des ansonsten nicht in

Tabak vorkommenden Phytoalexins Resveratrol aufweisen, zeigen eine erhöhte Resistenz gegen den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* (Hain et al., 1993).

In vielen Pathosystemen wurde die Aktivierung von pflanzlichen Genen beschrieben, deren korrespondierende Transkripte und Genprodukte kurze Zeit nach Pathogenkontakt nachweisbar sind. Diese während der Pathogenese akkumulierenden Proteine werden als „pathogenesis related“ - (PR-) Proteine bezeichnet. Die gängige Definition der PR-Proteine umfasst intra- und extrazelluläre Proteine, welche in pflanzlichen Geweben oder Zellkulturen nach Pathogenangriff oder Elicitorbehandlung akkumulieren (Bowles, 1990).

PR-Proteine sind im Allgemeinen kleine säurestabile und gegen Proteasen relativ unempfindliche Proteine. Sie sind häufig durch stark basische oder saure isoelektrische Punkte charakterisiert (Elstner et al., 1996). Die basischen PR-Proteine sind in der Vakuole lokalisiert und besitzen häufig effektivere antifungale Aktivität als die sauren PR-Proteine, welche von den Pflanzenzellen sekretiert werden (Hammond-Kosack and Jones, 1996). Dies konnten Sela-Buurlage et al. (1993) zunächst für Chitinasen und β -1,3-Glukanasen aus Tabak zeigen.

Die PR-Proteine werden heute in 17 Familien (PR1-17) unterteilt (Collinge et al., 2001; Christensen et al., 2002). Die Funktion der zur PR1-Familie gehörenden Proteine ist nicht geklärt (van Loon and van Strien, 1999). Andere Klassen der PR-Familien beinhalten Enzyme mit lytischer Aktivität, wie Glukanasen (PR2), Chitinasen (PR3, PR8, PR11) oder Endoproteasen (PR7), welche antimikrobielle Wirkung besitzen. Weiterhin gibt es Chitin-bindende Proteine (PR4), Thaumatin-ähnliche Proteine (PR5), Proteaseinhibitoren (PR6), Lignin-bildende Peroxidasen (PR9), RIPs (PR10), Defensine (PR12), Thionine (PR13), Lipid-Transfer-Proteine (PR14), Oxalatoxidasen (PR15), Oxalatoxidase-ähnliche Proteine (PR16) und Proteasen (PR17).

Die konstitutive Expression von einigen PR-Proteinen in transgenen Pflanzen führt zu einer erhöhten Resistenz gegen Pathogene (Broglie et al., 1991). So bewirkt die Überexpression von Osmotin in Kartoffeln eine Reduktion von Krankheitssymptomen (Lui et al., 1994) und transgene Tabakpflanzen, welche ein Thionin überexprimieren, sind verstärkt resistent gegen bakterielle Pathogene (Carmona et al., 1993). Weiterhin zeigen transgene Tabakpflanzen, welche eine Chitinase, eine β -1,3-Glukanase beziehungsweise ein RIP aus Gerste exprimieren, erhöhte Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* (Jach et al., 1995).

Wenn mehrere PR-Proteine konstitutiv exprimiert werden, kann man einen synergistischen Effekt auf die Resistenz der Pflanze gegen Pathogene feststellen. So konnte in transgenen Tabakpflanzen mit konstitutiver Koexpression einer Chitinase und einer Glukanase ein verstärkter Schutz vor pilzlichen Infektionen festgestellt

werden (Zhu et al., 1994). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die koordinierte Aktivität vieler PR-Proteine für die Ausprägung der Resistenz wichtig ist.

1.1.3 Modell der Signaltransduktion bei der Pathogenabwehr

Signaltransduktionskaskaden stellen die Verbindung zwischen Erkennung des Pathogens durch die Pflanze und der Resistenzantwort dar. Rezeptorvermittelte Änderungen in der Ionenpermeabilität der Plasmamembran scheinen hierbei ein frühes Element der Signaltransduktion zu sein (Nürnberger and Scheel, 2001).

Nach Bindung eines Elicitors an einen Rezeptor kommt es demnach zunächst zur Aktivierung von Ionenkanälen in der Membran der Pflanzenzellen, was Ionenströme (Ca^{2+} - und H^{+} -Einfluss, K^{+} - und Cl^{-} -Ausfluss) zur Folge hat (Jabs et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Blatt et al., 1999; Lee et al., 2001). In Tabak-Schließzellen, welche das *Cf-9*-Gen aus Tomate exprimieren, wurden nach Behandlung mit dem Elicitor AVR9 die Aktivierung eines K^{+} -Ausstromkanals und die Inaktivierung eines K^{+} -Einstromkanals festgestellt (Blatt et al., 1999). Weiterhin können Elicitor-responsive Ca^{2+} -Kanäle einen Einstrom von Calciumionen vermitteln (Gelli et al., 1997; Zimmermann et al., 1997), wodurch der cytosolische Ca^{2+} -Spiegel transient ansteigt. Dies wurde zum Beispiel für Petersilie (Blume et al., 2000) oder Sojabohne (Mithöfer et al., 1999) gezeigt.

In transgenen Tabakzellen, welche das *Cf-9*-Gen aus Tomate exprimieren, wurde eine Calcium-abhängige Proteinkinase (CDPK) als eines der ersten Ziele des cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels identifiziert. Behandlung mit dem AVR9-Elicitor rief eine Calcium-abhängige, schnelle Phosphorylation und Aktivierung dieser CDPK hervor (Romeis et al., 2000). Das Ziel der CDPKs in Pflanzen ist zur Zeit noch nicht identifiziert (Nürnberger and Scheel, 2001).

Auch Calmodulin könnte ein Ziel des hohen cytosolischen Ca^{2+} -Spiegels sein. In Sojabohnen wird eine Ca^{2+} -abhängige, schnelle Akkumulation von zwei spezifischen Calmodulin-Isoformen und ihren Transkripten nach Pathogeninfektion und Elicitorbehandlung induziert (Heo et al., 1999). Konstitutive Expression jeder dieser zwei Isoformen in Tabak bewirkte die Bildung spontaner Läsionen, konstitutive Expression von *PR*-Genen und erhöhte Resistenz gegen Oomyceten, Bakterien und Viren.

Ein weiterer Mechanismus, der durch die transient erhöhten Calciumkonzentrationen im Cytosol ausgelöst wird, ist der "oxidative burst" (s. 1.2). Wie beschrieben könnte

die extrazelluläre Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch ein NADPH-Oxidase-System erfolgen. In Pflanzen sind zur Zeit, wie beschrieben, Homologe zu zwei Untereinheiten eines Phagozyten-NADPH-Oxidase-Systems bekannt, nämlich zur katalytischen Untereinheit gp91 und zu Rac. Alle zur Zeit isolierten gp91-Homologe aus Pflanzen besitzen ein EF-Hand-Motiv, was auf Ca^{2+} -Regulation hindeutet (Nürnberger and Scheel, 2001). ROS scheinen essentielle sekundäre Signalmoleküle für die Aktivierung von Mechanismen der Pathogenabwehr zu sein (Nürnberger and Scheel, 2001).

Auch MAPK-Kaskaden können in die Signaltransduktion involviert sein, welche zur Aktivierung der Abwehrmechanismen führt (Zwerger and Hirt, 2001). So wird in Petersiliezellen die MAPK ERMK translationell und post-translationell durch den Elicitor Pep 13 induziert (Ligterink et al., 1997). Die Translokation der MAPK in den Kern legt die Vermutung nahe, dass sie an der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt sein könnte.

Viele verschiedene Pathogen- und Stress-Signale induzieren die Transkription oder die Kinaseaktivität der Tabak-MAPKs WIPK und SIPK. So wird die Kinaseaktivität von SIPK zum Beispiel durch Infektion mit TMV oder durch pathogene Signale induziert (Hoyos et al., 1998; Zhang and Klessig, 1998; Romeis et al., 1999). Die Aktivierung von WIPK korreliert entweder mit der Akkumulation des Transkript- oder des Proteinlevels, abhängig vom Stimulus (Zwerger and Hirt, 2001). Eine putative upstream-Komponente, eine MAPKK, welche WIPK and SIPK aktivieren könnte, wird in *NtMEK2* gesehen (Yang et al., 2001). Überexpression einer konstitutiv aktiven *NtMEK2*-Mutante führt zur Aktivierung von Abwehrgenen und induziert einen HR-ähnlichen Zelltod.

Weitere Elemente von Signalkaskaden pflanzlicher Abwehr können auch G-Proteine (GTP-bindende Proteine) und Phospholipasen, sowie Signalmoleküle wie zum Beispiel Jasmonat, Ethylen und Salicylsäure sein (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

Abbildung 1.3 zeigt ein vereinfachtes Modell der an der Signaltransduktion, welche zur Aktivierung der Abwehrmechanismen von Pflanzen gegen Pathogene führt, beteiligten Komponenten.

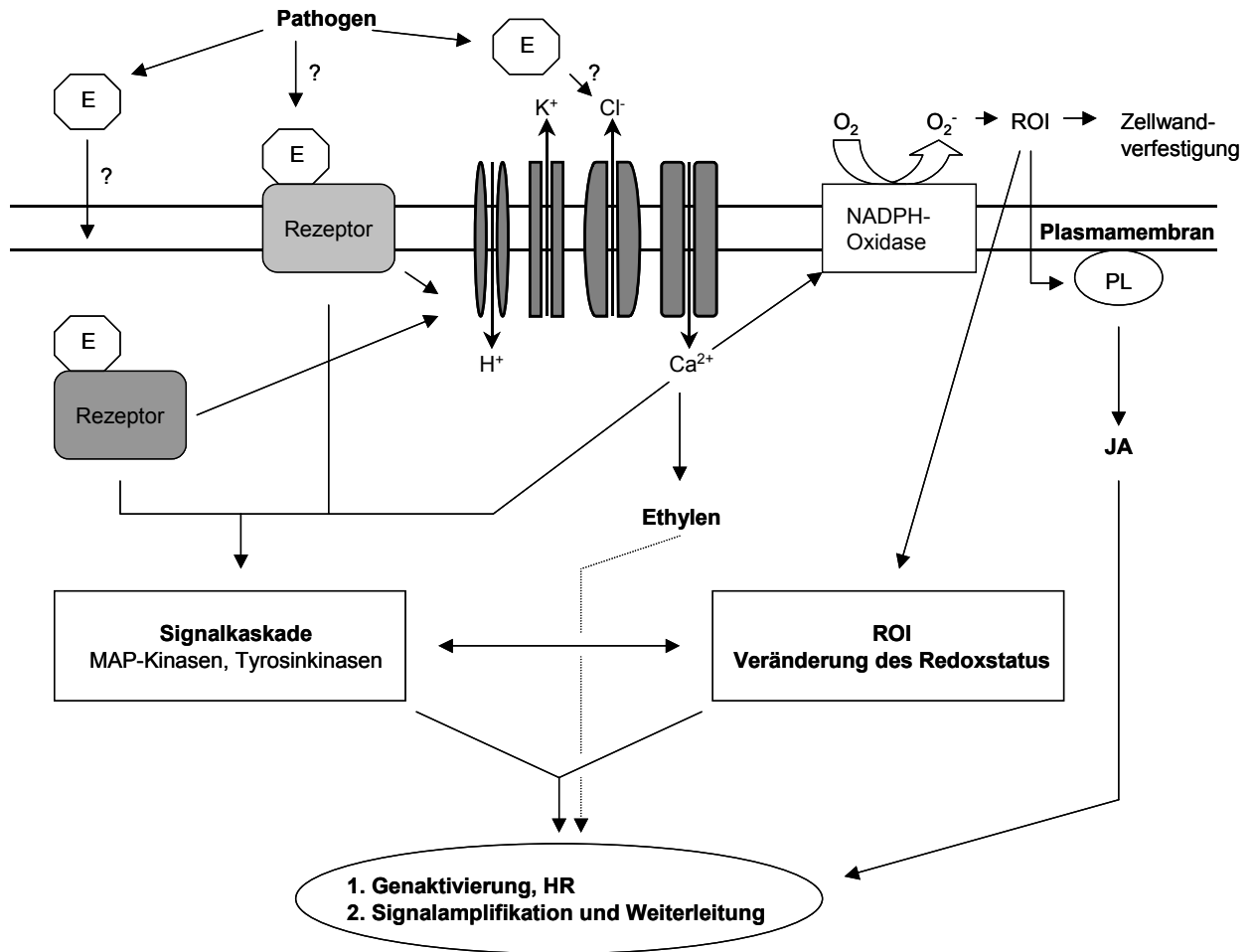


Abb. 1.3: Modell der an der Signaltransduktion zur Pathogenabwehr beteiligten Komponenten (E): Elicitor, (HR): hypersensitive Reaktion, (JA): Jasmonsäure, (PL): Phospholipase, (ROI): reaktive Sauerstoffintermediate (verändert nach Hammond-Kosack and Jones, 1996)

1.1.4 Resistenzmechanismen in Reispflanzen

Reispflanzen besitzen verschiedene Mechanismen, um Pathogene abzuwehren. Als präformierter Resistenzmechanismus, der vor allem gegen *M. grisea* wirksam ist, ist hier vor allem die Ablagerung hoher Mengen Kieselsäure in die Zellwände zu nennen, deren Stabilität dadurch erhöht wird (Suzuki, 1965).

In Reispflanzen existieren weiterhin aktive Abwehrmechanismen gegen Pathogene. So korreliert zum Beispiel die Inhibition des Pathogens in der Interaktion von Reis mit dem Pilz *M. grisea* mit einer induzierten Lignifizierung (Thieron, 1993). Diese basiert auf einer frühen Aktivierung wichtiger Enzyme der Ligninbiosynthese, wie zum Beispiel der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), der Cinnamylalkohol-

Dehydrogenase (CAD) sowie der Peroxidase. In kompatibler Interaktion erfolgt diese Aktivierung zu einem späteren Zeitpunkt. Dieser Sachverhalt zeigt, dass die Geschwindigkeit der Induktion von Abwehrreaktionen wichtig für die Etablierung einer Resistenz sein kann, das heißt, je schneller die Pflanze in der Lage ist, den Angriff eines Pathogens zu erkennen und effektive Abwehrreaktionen einzuleiten, desto resistenter ist sie gegen dieses Pathogen. Für eine effektive Abwehr von *M. grisea* in Reis ist demnach offenbar die schnelle Induktion der Ligninbiosynthese notwendig.

Smith und Métraux (1991) konnten in Reis nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* systemische Resistenz gegen eine folgende Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *M. grisea* („challenge inoculation“) zeigen. Lokal ließ sich hierbei ein Anstieg der Aktivitäten der Enzyme PAL, CAD, Peroxidase, β -1,3-Glukanase und Chitinase beobachten. Ein systemischer Anstieg der Enzymaktivitäten ließ sich jedoch nicht nachweisen. Es konnte also keine Korrelation zwischen der beobachteten systemischen Resistenz und den Aktivitäten dieser Enzyme nach der „challenge inoculation“ gezeigt werden.

Nach Inokulation von Reis mit *M. grisea* kann weiterhin ein Aktivitätsanstieg der PR-Proteine β -1,3-Glukanase und Chitinase beobachtet werden (Schaffrath, 1994). In Reis sind heute eine Reihe PR-Gene, wie zum Beispiel Chitinasen der PR3-Familie (Zhu and Lamb, 1991; Anuratha et al., 1996; Xu et al., 1996; Kim et al., 1998), eine Glukanase der PR2-Familie (Simmons et al., 1992), ein Gen für ein Thaumatin-ähnliches Protein (Reimann and Dudler, 1993; Velazhahan et al., 1998), Peroxidasen der PR9-Gruppe (Chittoor et al., 1997), Proteine der PR1-Gruppe (Agrawal et al., 2000) oder der PR10-Gruppe (McGee et al., 2001) charakterisiert. Transgene Reispflanzen, welche eine Chitinase oder eine Chitinase in Kombination mit einer Glukanase konstitutiv stark exprimieren, zeigen eine erhöhte Resistenz gegen pilzliche Pathogene, wie zum Beispiel *M. grisea* (Lin et al., 1995; Nishizawa et al., 1999).

Eine weitere Möglichkeit der Abwehr von Pathogenen liegt in der Bildung von Phytoalexinen. In Reis beschrieben wurden zwei Typen von Phytoalexinen, zum einen Diterpene, wie zum Beispiel Momilactone (Kato et al., 1973; Matsuyama, 1983) und Oryzaalexine (Kono et al., 1985; Kodama et al., 1992a; Kato et al., 1993; Tamogami et al., 1993), zum anderen das phenolische Phytoalexin Sakuranetin (Kodama et al., 1992b). Auch wird die Akkumulation antimikrobieller Fettsäurederivate aus dem Lipoxxygenase-Stoffwechselweg beschrieben (Ohta et al., 1991). Die Inhibition von Lipoxxygenase mit Nordihydroguajarsäure hemmt in

Reispflanzen nicht nur die Bildung von antimikrobiellen Fettsäurehydroperoxiden, sondern auch von Phytoalexinen der Momilactonklasse (Wen Xin Li et al., 1991).

1.1.5 Induzierte Resistenz (IR)

Wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben besitzen Pflanzen vielfache Möglichkeiten, Pathogene aktiv abzuwehren. Für den Pflanzenschutz wäre es daher eine ideale Methode, diese pflanzeneigenen Abwehrmechanismen gegen Pathogene zu aktivieren. Es wurde schon anfangs dieses Jahrhunderts von Ray und Beauverie beobachtet, dass die Behandlung von Pflanzen mit schwach virulenten Pathogenrassen vor einer später folgenden Infektion mit einer virulenten Rasse des Pathogens schützt (Ray, 1901; Kessmann et al., 1994).

Von Chester (1933) wurde aufgrund solcher Beobachtungen der Begriff „erworbene Immunität“ eingeführt. Heute spricht man wegen des bei Pflanzen, im Vergleich zu Tieren, fehlenden Immunsystems von „induzierter Resistenz“ (IR).

Die induzierte Resistenz wirkt gegen ein breites Spektrum an Pathogenen (Kessmann et al., 1994; Sticher, 1997) und kann sowohl auf Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen basieren, als auch auf der erhöhten Bereitschaft der Pflanze, schneller und stärker auf einen Pathogenbefall zu reagieren. Dieser Zustand erhöhter Abwehrbereitschaft wird als Sensibilisierung („sensitizing“) oder „priming“ bezeichnet (Conrath et al., 2001). Die IR kann mehrere Tage bis zu Monaten andauern und wirkt gegen verschiedenste Pathogene (Schneider et al., 1996). Als Auslöser der IR kommen sowohl Induktoren biotischen als auch chemischen Ursprungs in Frage. Die biologische Resistenzinduktion bei Pflanzen kann entweder durch virulente oder avirulente Formen eines Pathogens oder auch durch nichtpathogene Rhizobakterien (ISR, induzierte systemische Resistenz; s. 1.5.1.2) ausgelöst werden.

1.1.5.1 SAR und LAR (Salicylsäure-abhängiger Signalweg)

Ross (1961) unterschied bei Pflanzen eine systemisch auftretende Resistenz („systemic acquired resistance“, systemische erworbene Resistenz, SAR) von einer lokal auftretenden Resistenz („local acquired resistance“, lokale erworbene Resistenz, LAR). Er hatte beobachtet, dass die Inokulation eines einzelnen Tabakblattes mit TMV (Tabak Mosaik Virus) nicht nur lokal zur Resistenz des

behandelten Blattes, sondern auch systemisch zur Resistenz nicht behandelter, distaler Pflanzenteile gegen eine nachfolgende Infektion mit TMV führt.

Die meisten Erkenntnisse über die Mechanismen der LAR und SAR wurden bisher in dikotylen Pflanzen gewonnen. So korreliert hier mit dem Auftreten der IR die Expression bestimmter Gene, sogenannter SAR-Gene (Ward et al., 1991; Sticher et al., 1997). Einige der SAR-Genprodukte scheinen eine direkte antimikrobielle Wirkung gegen Pathogene zu besitzen, andere gehören zum Beispiel zu den PR-Proteinen (Ryals et al., 1994). Das Set der aktivierten SAR-Gene variiert unter den Pflanzenspezies stark (Ryals et al., 1994). So ist für das Tabak/TMV-Pathosystem zum Beispiel die Expression von neun SAR-Genfamilien nachgewiesen (Ward et al., 1991; Alexander et al., 1992). Zu den Genprodukten dieser Genfamilien gehören saure Formen des PR1-Proteins, β -1,3-Glukanasen, Chitinasen, ein Thaumatin-ähnliches Protein, ein Hevein-ähnliches Protein, ein basisches PR1-Protein, eine basische Proteinfamilie und das SAR8.2. Für *Arabidopsis* ist die Expression eines Gensets ähnlich dem von Tabak, nämlich *PR1*, *PR2* und *PR5*, gezeigt worden (Uknes et al., 1992). Für Gurke dagegen wurde die Expression eines Gensets, welches sich von dem bei Tabak und *Arabidopsis* unterscheidet, nachgewiesen (Métraux et al., 1989; Ryals et al., 1994). Hier ist zum Beispiel die in Tabak und *Arabidopsis* stark aktivierte saure Form von PR1 nur schwach induziert.

Die Signaltransduktion, welche zur Ausbildung der SAR führt, ist Gegenstand intensiver Untersuchungen. Aufgrund der Akkumulation von Salicylsäure (SA) in lokalen und auch in systemischen Bereichen von Pflanzen, die SAR zeigen, wurde SA lange Zeit als das translozierte Signal angesehen. So wurde für eine Reihe dikotyler Pflanzen, wie Tabak, *Arabidopsis* und Gurke die Akkumulation von Salicylsäure (SA) nach Inokulation mit nekrotisierenden Pathogenen in den behandelten Blättern beschrieben (Malamy et al., 1990; Rasmussen et al., 1991; Uknes et al., 1993). Diese korreliert auch mit der Induktion der SAR-Gene (Malamy et al., 1990; Uknes et al., 1993). Die exogene Behandlung von Tabakblättern mit Salicylsäure bewirkt ebenfalls die Expression der SAR-Gene (Ward et al., 1991). Einen weiteren wichtigen Hinweis, dass SA an der Signaltransduktion, welche zur Ausprägung der SAR führt, beteiligt ist, lieferten die Experimente von Gaffney et al. (1993). Sie stellten transgene Tabaklinien mit dem *nahG*-Gen her, welches für eine Salicylat-Hydroxylase aus *Pseudomonas putida* codiert, die Salicylsäure zu Katechol abbaut. Die transgenen Tabakpflanzen, welche das *nahG*-Gen exprimieren, sind nicht in der Lage, SA zu akkumulieren und zeigen keine SAR-Genexpression. Andererseits zeigen transgene Tabakpflanzen, welche eine erhöhte SA-Biosynthese aufweisen (CSA, „constitutive SA biosynthesis“) auch eine konstitutive Expression

von SAR-Genen und eine erhöhte Resistenz gegen Viren und Pilze (Verbene et al., 2000).

Andere Ergebnisse scheinen jedoch trotz allem gegen SA als transloziertes Signal zu sprechen, welches die SAR in distalen Pflanzenbereichen auslöst. So konnten Rasmussen et al. (1991) zeigen, dass die Entnahme eines Gurkenblattes nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* und vor einer lokal detektierbaren SA-Akkumulation die systemische Expression der SAR-Gene nicht beeinflusst. Pfropfungsversuche mit Wildtyp-Tabakpflanzen und transgenen *NahG*-Tabakpflanzen (Vernooij et al., 1994) bestätigten diese Beobachtung. Die transgenen *NahG*-Wurzelstöcke können in aufgepfropften Wildtyp-Pflanzenteilen die SAR induzieren. Andererseits sind aber *NahG*-Pflanzenstöcke unabhängig vom verwendeten Wurzelstock nicht in der Lage, SAR auszubilden. Diese Experimente zeigen, dass SA hier zwar ein notwendiges Element für die Signaltransduktion und für die Expression der SAR-Gene darstellt, aber nicht das translozierte Signal ist, obwohl sie im Phloem über weite Strecken transportiert werden kann. Weiterhin ist durch diese Ergebnisse auch gezeigt, dass die Synthese des systemischen Signals wahrscheinlich unabhängig von einer SA-Akkumulation erfolgt. Es wurde aufgrund solcher Ergebnisse ein anderes primäres systemisches Signal als SA für die SAR postuliert, welches bis heute noch nicht identifiziert ist.

In Abbildung 1.4 ist ein vereinfachtes Model für die Signaltransduktionskette, welche zur SAR führt, gezeigt.

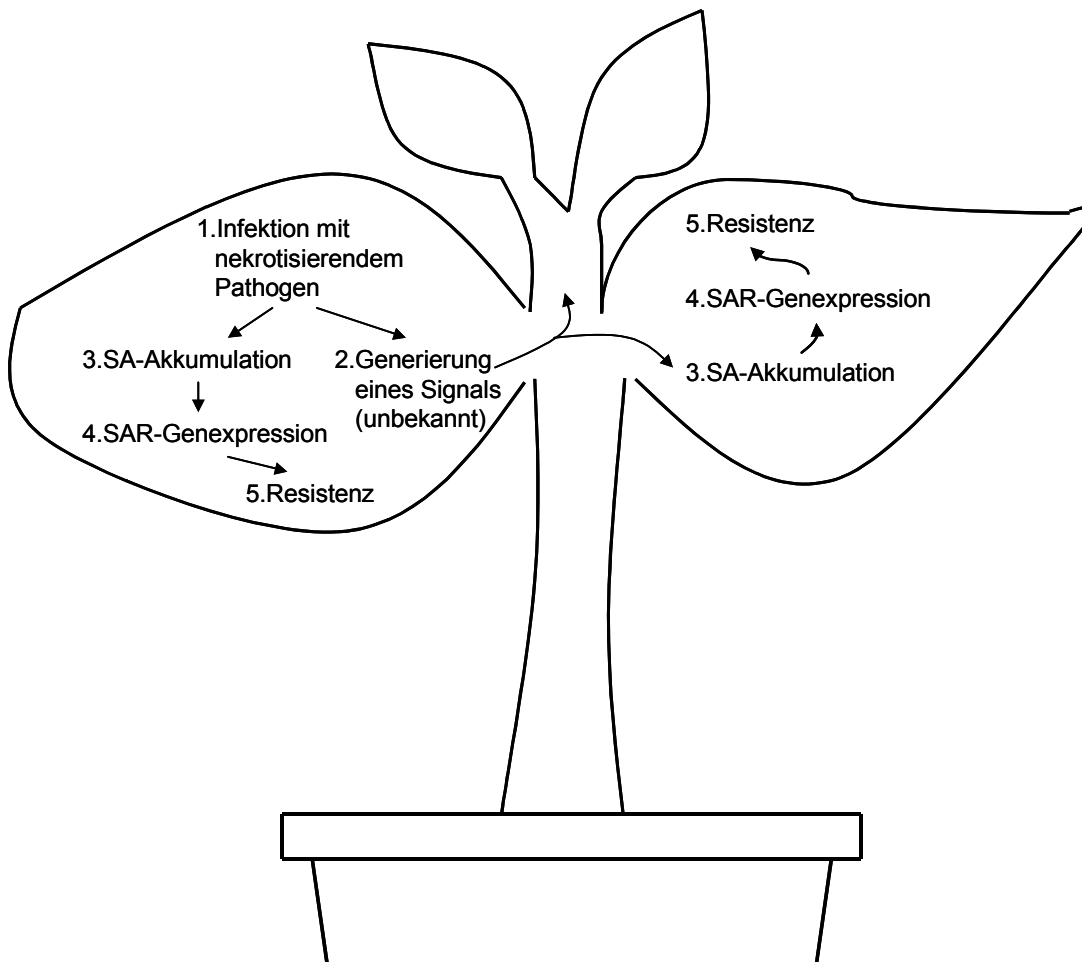


Abb. 1.4: Einfaches Modell für die SAR-Signaltransduktion (nach Ryals et al., 1994).

1. Ein nekrotisierendes Pathogen infiziert auf dem lokalen Blatt. 2. Dies ruft die Generierung eines noch unbekannten Signals hervor, welches sich systemisch in der Pflanze verbreitet. 3. In den Blättern erfolgt eine SA-Akkumulation, welche 4. die anschließende SAR-Genexpression hervorruft und 5. zur Ausprägung der Resistenz führt. (SA): Salicylsäure, (SAR): "systemic acquired resistance"

Die genaue Funktion der Salicylsäure innerhalb des SA-abhängigen Signalweges der IR ist letztlich noch nicht vollständig geklärt (Sticher et al., 1997).

Von Chen und Klessig (1991) wurde ein SA-bindendes Protein gefunden und als Katalase identifiziert. Katalasen katalysieren die Disproportionierung von H_2O_2 zu Wasser und molekularem Sauerstoff. Da SA in der Lage ist, die Katalaseaktivität zumindest teilweise zu blockieren, kann es infolge dessen zu einer Akkumulation von Wasserstoffperoxid kommen. Es wurde daher zunächst angenommen, dass H_2O_2 als „second messenger“ Abwehrreaktionen, beziehungsweise die SAR-Reaktionen, induziert (Sanchez-Casas and Klessig, 1994). Neuenschwander et al. (1995) hingegen konnten zeigen, dass H_2O_2 keinesfalls als "second messenger" von SA anzusehen ist, da zum Beispiel in *NahG*-Tabakpflanzen nach H_2O_2 -Applikation keine Akkumulation von *PR1*-Transkripten erfolgt. Eine Applikation von H_2O_2 in Wildtyp-

Pflanzen führt hingegen zu einer Akkumulation von SA (Leon et al., 1995). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass H_2O_2 *PR1* über die Akkumulation von SA induzieren könnte (Sticher et al., 1997). Es gibt Berichte darüber, dass SA an einige weitere Proteine, welche Hämgruppen enthalten, binden und diese inhibieren kann (reviewed in Sticher et al., 1997). Andere Quellen berichten zum Beispiel auch über SA als Inhibitor eines Schrittes innerhalb der Jasmonatbiosynthese, über ihre mögliche Rolle beim induzierten Zelltod oder über ihre direkten antimikrobiellen Eigenschaften (reviewed in Sticher et al., 1997).

Im Signalweg der SAR wurde das regulatorische Protein NPR1 („non-expresser of *PR1*“) durch mutationsanalytische Untersuchungen in *Arabidopsis* identifiziert. Durch eine Anzahl an rezessiven, allelischen Mutationen, wie zum Beispiel *sal1* („salicylic acid insensitive“) oder *nim1* („non-inducible immunity“), wurde NPR1 als positiver Regulator der SAR bestätigt. In den entsprechenden Mutanten ist weder durch biologische noch durch chemische Induktoren Resistenz oder die Expression von SAR-Genen auslösbar (Dong et al., 1991; Parker et al., 1993; Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995; Ryals et al., 1996). Zwei Mutanten des *Npr1*-Locus, nämlich *npr1-2* und *npr1-3*, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegen virulente und avirulente Rassen von *Peronospora parasitica* (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995; Glazebrook et al., 1996). Für das NPR1-Protein wurde unter anderem eine Interaktion mit bZIP-Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* gezeigt (Zhang et al., 1999).

Nahezu alle Erkenntnisse über die IR sind in dikotylen Pflanzen gewonnen worden und lassen sich nicht ohne weiteres auf monokotyle Pflanzen übertragen. In vielen monokotylen Pflanzen konnte bis heute oftmals nur eine LAR nachgewiesen werden. Allerdings berichteten Smith und Métraux (1991) von SAR in Reis gegen *M. grisea*, welche durch Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* erzeugt wurde. Auch in Monokotyledonen kommt es im Zuge der IR zur Expression spezifischer Gene. So wurden in Weizen vier *Wir* („wheat induced resistance“) -Gene identifiziert, welche nach Infektion mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) exprimiert werden und deren Expression mit dem Resistenzstatus gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) korreliert (Schweizer et al., 1989). Die Expression von *Rir* („rice induced resistance“) -Genen nach Inokulation mit *P. syringae* pv. *syringae* wurde in Reispflanzen beschrieben (Mauch et al., 1998; Wäspi et al., 1998; Schaffrath et al., 2000a). *Rir1a* ist ein Glycin- und Prolin-reiches Protein, welches aus Reiszellen sekretiert wird. Es könnte sich hierbei um ein Strukturprotein, entsprechend hydroxyprolinreichen Glykoproteinen, handeln, welches in der Zellwand zu Quervernetzungen führt (Mauch et al., 1998).

Transgener Reis mit *Rir1b*-Überexpression zeigt erhöhte Resistenz gegen *M. grisea* (Schaffrath et al., 2000a).

Die Rolle der SA bei der Etablierung der IR in Reis wird kontrovers diskutiert (Song and Goodman, 2001), da Reispflanzen normalerweise einen hohen Gehalt an SA in Blättern und Spross, aber niedrige SA-Gehalte in Wurzeln oder Suspensionskulturzellen, besitzen (Chen et al., 1997). Es konnte allerdings eine Korrelation zwischen SA-Konzentrationen in Blättern und der Resistenz gegen *M. grisea* bei verschiedenen Reissorten beobachtet werden (Silverman et al., 1995; Sakamoto et al., 1999). Trotz allem steigt der SA-Gehalt in Reispflanzen nach Inokulation mit dem Nicht-Wirt-Pathogen *P. syringae* pv. *syringae* oder den Pathogenen *M. grisea* bzw. *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* nicht an (Silverman et al., 1995). Es ist aufgrund dieser Hinweise sehr wahrscheinlich, dass SA nicht der limitierende Faktor in der Signalkaskade zur Aktivierung der Abwehr in Reispflanzen ist (Song and Goodman, 2001).

Allerdings wurde auch in Monokotyledonen eine Bedeutung von NPR1 als Komponente der Signalkaskade nachgewiesen. So zeigen transgene Reispflanzen, welche konstitutiv das *Npr1*-Gen aus *Arabidopsis* exprimieren, eine erhöhte Resistenz gegen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Song and Goodman, 2001). Weiterhin sind aus Reis zwei *Npr1*-Homologe, sowie Homologe zu NPR1-Interaktionspartnern, darunter vier bZIP-Transkriptionsfaktoren, isoliert worden (Chern et al., 2001). Es ist daher möglich, dass in Reispflanzen ein, der SA-abhängigen Signaltransduktionskaskade ähnlicher, Signalweg existiert (Song and Goodman, 2001).

Chemisch induzierte Resistenz

Neben den biologischen Resistenzinduktoren gibt es auch eine Reihe chemischer Substanzen, die Resistenz induzieren können. Ein solcher chemischer Induktor muss dabei nach Kessmann et al. (1994) und Schneider et al. (1996) folgende Kriterien erfüllen:

1. weder der Induktor noch seine Metaboliten sollten direkte antimikrobielle Aktivität gegen Pathogene besitzen
2. durch Applikation des Induktors kommt es zu einer andauernden Aktivierung pflanzlicher Abwehrmechanismen, welche zumindest zu einer partiellen Resistenz führen
3. die Substanz sollte einen Schutz gegen ein breites Spektrum an Pathogenen vermitteln

Im Folgenden sollen als Beispiele drei chemische Resistenzinduktoren genauer beschrieben werden.

Der Induktor Probenazol (Oryzemat™; 3-Allyloxy-1,2-benzisothiazol-1,1-dioxid) zeigt *in vitro* kaum antifungale Aktivität, verhindert jedoch *in planta* eine Infektion von Reis mit dem heterothallischen Ascomyceten *M. grisea*, dem Auslöser der Krankheit „rice blast“. Er wird nach Wurzelapplikation schnell von der Pflanze aufgenommen und dort über den Stoffwechselweg von Allyl-o-sulfamoylbenzoat und 1,2-Benzisothiazol-3-on-1,1-dioxid schließlich zum N-β-D-Glucopyranosid des 1,2-Benzisothiazol-3-on-1,1-dioxid metabolisiert. Diese Metabolite zeigen keine höhere antifungale Aktivität als Probenazol selbst (Sekizawa and Mase, 1980). Die Resistenz von Reis gegen „rice blast“ nach Behandlung mit Probenazol beruht vielmehr auf Aktivierung der pflanzeneigenen Abwehr nach der Resistenzinduktorgabe (Watanabe et al., 1979; Thieron, 1993).

Der Resistenzinduktor DCINA (2,6-Dichloro-isonikotinsäure) besitzt *in vitro* keine hemmende Wirkung auf das Wachstum von Pathogenen (Métraux et al., 1991). Mit DCINA behandelte Pflanzen exprimieren die SAR-Gene, ohne dass es zu einer Akkumulation von Salicylsäure (SA) kommt. Ebenso kann DCINA Resistenz in transgenen Tabakpflanzen, welche das *NahG*-Gen exprimieren, induzieren. DCINA wird daher als funktionales Analog der SA diskutiert (Vernooij et al., 1995; Ryals et al., 1996).

BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothiolsäure S-methylester) ist ein Induktor, der wie DCINA SAR-Gene induziert, ohne dass es zu einer Akkumulation von Salicylsäure kommt (Görlach et al., 1996). BTH kann in transgenen *A. thaliana*- und Tabakpflanzen, die das *NahG*-Gen exprimieren, Resistenz induzieren (Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996). Daher scheint BTH wie DCINA „downstream“ der SA zu wirken.

BTH und DCINA gelten als Resistenzinduktoren sowohl für dikotyle wie auch für monokotyle Pflanzen (Görlach et al., 1996; Sticher et al., 1997). Die systemische Induktion der Resistenz kann bei den beschriebenen Induktoren möglicherweise auf ihrer eigenen Systemizität in den Pflanzen beruhen.

Für dikotyle Pflanzen konnte gezeigt werden, dass chemische Resistenzinduktoren sowohl eine Resistenz gegen das gleiche Spektrum an Pathogenen, als auch die Induktion des gleichen Gensets wie bei Induktion der SAR durch biologische Induktoren bewirken (Ward et al., 1991; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996).

In Weizen und Gerste wurde jeweils ein Set an Genen identifiziert, welches nach

Applikation von chemischen Resistenzinduktoren induziert wird (Görlach et al., 1996; Beßer et al., 2000). Das Spektrum dieser Gene ist sehr weit gefächert. Allerdings ist ihre Bedeutung für die IR noch nicht ganz geklärt. In Weizen wurden nach Applikation von BTH, DCINA oder SA fünf *WCI* („wheat chemically induced“) -Gene identifiziert (Görlach et al., 1996). Unter den Genprodukten dieser Gene befindet sich eine Lipxygenase (*WCI2*), eine Cysteinproteinase (*WCI4*) und drei Proteine unbekannter Funktion (*WCI1*, *WCI3* und *WCI5*). Das *WCI3*-Genprodukt weist am C-terminalen Ende eine hohe Homologie zu dem Protein SalT aus Reis auf, welches wahrscheinlich als Osmoprotektor bei Salz- und Trockenstress dient (Claes et al., 1990). Beßer et al. (2000) identifizierten mittels suppressiver Subtraktionshybridisierung neun Gene aus Gerste, deren korrespondierende Transkripte nach Behandlung mit DCINA akkumulieren. Diese neun *BCI* („barley chemically induced“) -Gene codieren für eine Lipxygenase (*BCI1*), ein Thionin (*BCI2*), eine saure Phosphatase (*BCI3*), ein Ca^{2+} -bindendes EF-Hand-Protein (*BCI4*), einen Serinproteinase-Inhibitor (*BCI7*), eine Fettsäuredesaturase (*BCI8*), eine Apyrase (*BCI9*) und zwei Proteine unbekannter Funktion (*BCI5* und *BCI6*). Überexpression von *BCI4* führt in nichtinduzierten, anfälligen Gerstenpflanzen zu einer Reduktion der Penetrationseffizienz des echten Mehltaus (Beßer, 2001). In Reis ist die Akkumulation von Transkripten des Lipxygenasegens *RCI1* („rice chemically induced“) nach Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren gezeigt worden (Schaffrath et al., 2000b).

1.1.5.2 Die ISR (Salicylsäure-unabhängiger Signalweg)

Durch Rhizobakterien (zumeist Pseudomonaden) kann ebenfalls systemische Resistenz gegen Blattpathogene ausgelöst werden. Diese wird als induzierte systemische Resistenz (ISR) bezeichnet (van Loon et al., 1998). Die Signalkaskade der ISR läuft über einen SA-unabhängigen Weg und wird durch Jasmonat und Ethylen reguliert (van Wees et al., 2000). Mit NPR1 ist in *Arabidopsis* allerdings ein gemeinsames Element der ISR- und SAR-Signalkaskade identifiziert worden (Cao et al., 1997).

1.2 Lipxygenasen

Lipxygenasen (LOX) sind ubiquitäre, im Tier- und Pflanzenreich weitverbreitete, nicht-Häm-Eisen-haltige Dioxygenasen (Siedow, 1991). Sie katalysieren die Oxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren mit *cis*, *cis*-1,4-Pentadienstruktur, wobei

es zur Bildung von Fettsäurehydroperoxiden mit *Z,E*-konjugierten Dienen kommt. Die hauptsächlichen Substrate pflanzlicher Lipoxygenasen stellen Linol- und Linolensäure dar, während das Hauptsubstrat der tierischen Lipoxygenasen die in Pflanzen nicht vorhandene Arachidonsäure ist (reviewed in Rosahl, 1995).

Die oben beschriebene Lipoxygenase-katalysierte Reaktion wird auch als Primärreaktion des LOX-Stoffwechselweges bezeichnet. Sie ist am Beispiel des Substrates Linolsäure in Abb.1.5 dargestellt.

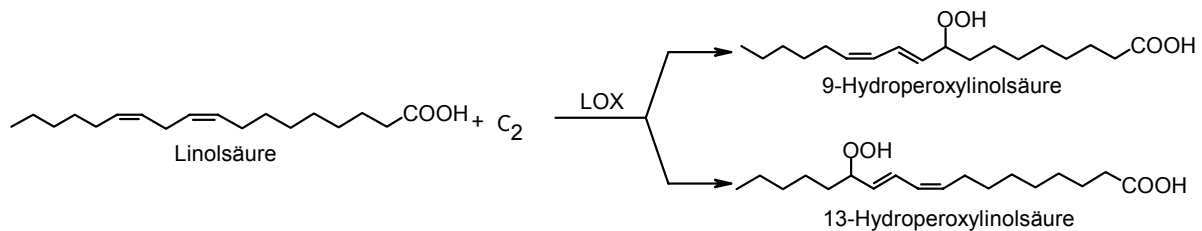


Abb. 1.5: Lipoxygenase-katalysierte Reaktionen mit Linolsäure als Substrat (in Anlehnung an Siedow, 1991)

Die Reaktion erfolgt in mehreren Schritten:

1. Entfernung eines H-Atoms vom doppelt allylen Kohlenstoffatom. Hierdurch entsteht ein Fettsäureradikal.
 2. Konjugation der Doppelbindungen mit einer *trans*-Isomerisation der verschobenen Doppelbindung. Diese geht mit einem Rearrangement ungepaarter Elektronen einher.
 3. Insertion von molekularem Sauerstoff.
 4. Anlagerung eines Protons an das Hydroperoxyanion.
- (verändert nach Kühn et al., 1986)

Anhand ihres pH-Optimums können die pflanzlichen Lipoxygenase-Isoenzyme in zwei Klassen unterteilt werden:

1. pH-Optimum um 9,0 (Typ 1)
 2. pH-Optimum um 7,0 (Typ 2)
- (Siedow, 1991; Slusarenko, 1996)

Diese ältere Klassifizierung wird in neuerer Zeit durch eine weitere abgelöst. In dieser werden die Lipoxygenasen nach dem Vorhandensein einer N-terminalen Transitpeptid-Sequenz, welche die Proteine in den Chloroplasten dirigiert, unterschieden (Shibata et al., 1994; Shibata and Axelrod, 1995). Hierbei werden

Lipoxygenasen, welche keine N-terminale Extension beinhalten, als *LOX1* bezeichnet. Lipoxygenasen dieser Familie besitzen untereinander hohe Sequenzhomologie. In die zweite Familie, die als *LOX2* bezeichnet wird, fallen Lipoxygenasen, welche ein N-terminales Chloroplasten-Targeting-Peptid besitzen (Feussner and Wasternack, 2002). Beide Lipoxygenasefamilien besitzen nur geringe Homologie bezüglich ihrer Proteinsequenz.

Lipoxygenasen können zusätzlich bezüglich ihrer Positionsspezifität bei der Oxygenierung von Linolsäure klassifiziert werden. Je nach bevorzugtem Ort der Oxygenierung spricht man von 9- bzw. 13-Lipoxygenasen (s. auch Abb. 1.5).

1.2.1 Der Lipoxygenase-Stoffwechselweg

Die Produkte der Lipoxygenase-Primärreaktion können über verschiedene Wege weiter metabolisiert werden (s. Abb. 1.6). Zur Zeit sind vier Hauptwege für die Sekundärreaktionen im LOX-Weg bekannt (Blée, 1998b; Feussner et al., 2001; Feussner and Wasternack, 2002).

Der Peroxygenase (POX)-Weg (Hydroperoxid-Isomerase-Weg)

Innerhalb dieses Stoffwechselwegs werden Fettsäurehydroperoxide durch intramolekularen Sauerstofftransfer zu ungesättigten Epoxy- oder Dihydrodiol-Fettsäurederivaten konvertiert (Hamberg 1995; Blée, 1998a). Der Weg beinhaltet zwei Enzyme: eine Peroxygenase, welche hier eine Hydroperoxid-abhängige Epoxidation der Fettsäurehydroperoxide katalysiert und eine Epoxid-Lyase, welche die Hydrierung der gebildeten Epoxide katalysiert.

Der Allenoxidsynthase (AOS)-Weg (Hydroperoxid-Dehydratase-Weg)

Im AOS-Weg werden aus 13-Hydroperoxyfettsäuren instabile Allenoxide gebildet, welche entweder durch nichtenzymatische Hydrolyse zu α - und γ -Ketolen konvertieren (Gardner, 1991), oder durch eine Allenoxidcyclase zu (9S,13S) 12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) metabolisiert werden (Hamberg, 1988; Ziegler et al., 2000; Feussner and Wasternack, 2002). Diese kann durch eine 12-oxo-Phytodienoat-10,11-Reduktase reduziert werden. Das entstehende Produkt kann durch drei β -Oxidationen in Jasmonsäure umgewandelt werden (Vick and Zimmermann, 1983).

Der Hydroperoxid-Lyase (HPL)-Weg (Hydroperoxid-Isomerase-Weg)

Im HPL-Weg erfolgt die oxidative Spaltung des Hydrocarbon-Rückgrats der Fettsäurehydroperoxide, wodurch kurzkettige Aldehyde (C_6 - oder C_9 -) und die

korrespondierenden C₁₂- oder C₉-ω-Oxosäuren entstehen (Zimmermann and Vick, 1970; Matsui, 1998).

Der Divinylether-Synthase (DES)-Weg

Im DES-Weg kommt es zur Bildung von Divinylethern, wie Colnel- oder Colnelensäure (Grechkin, 1998).

Weitere mögliche Reaktionen im Fettsäurehydroperoxid-Metabolismus

Neben den beschriebenen vier Hauptwegen gibt es noch weitere mögliche Reaktionen im Fettsäurehydroperoxid-Stoffwechsel:

- die Hydroperoxidase-Reaktion der Lipoxygenase: Unter speziellen Bedingungen, wie geringem Sauerstoffpartialdruck, können Lipoxygenasen die homolytische Spaltung der O-O-Bindung katalysieren, wodurch Alkoxyradikale entstehen. Diese können sich zu Ketodienen rearrangieren (Kühn et al., 1991).
- die Epoxyalkohol-Synthase (EAS)-Reaktion: Es erfolgt die Bildung von Epoxyhydroxyfettsäuren durch intramolekulares Rearrangement von Hydro(pero)xyfettsäuren, katalysiert durch die EAS (Hamberg, 1999). Dieser Weg wurde bisher nur in Solanaceen detektiert (Feussner and Wasternack, 2002)
- der Reduktase-Weg: Hier findet die POX-unabhängige Reduktion von Hydro(pero)oxy-Fettsäuren zu den korrespondierenden Hydroxyderivaten statt. Der Mechanismus dieser Reduktion ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Feussner and Wasternack, 2002).

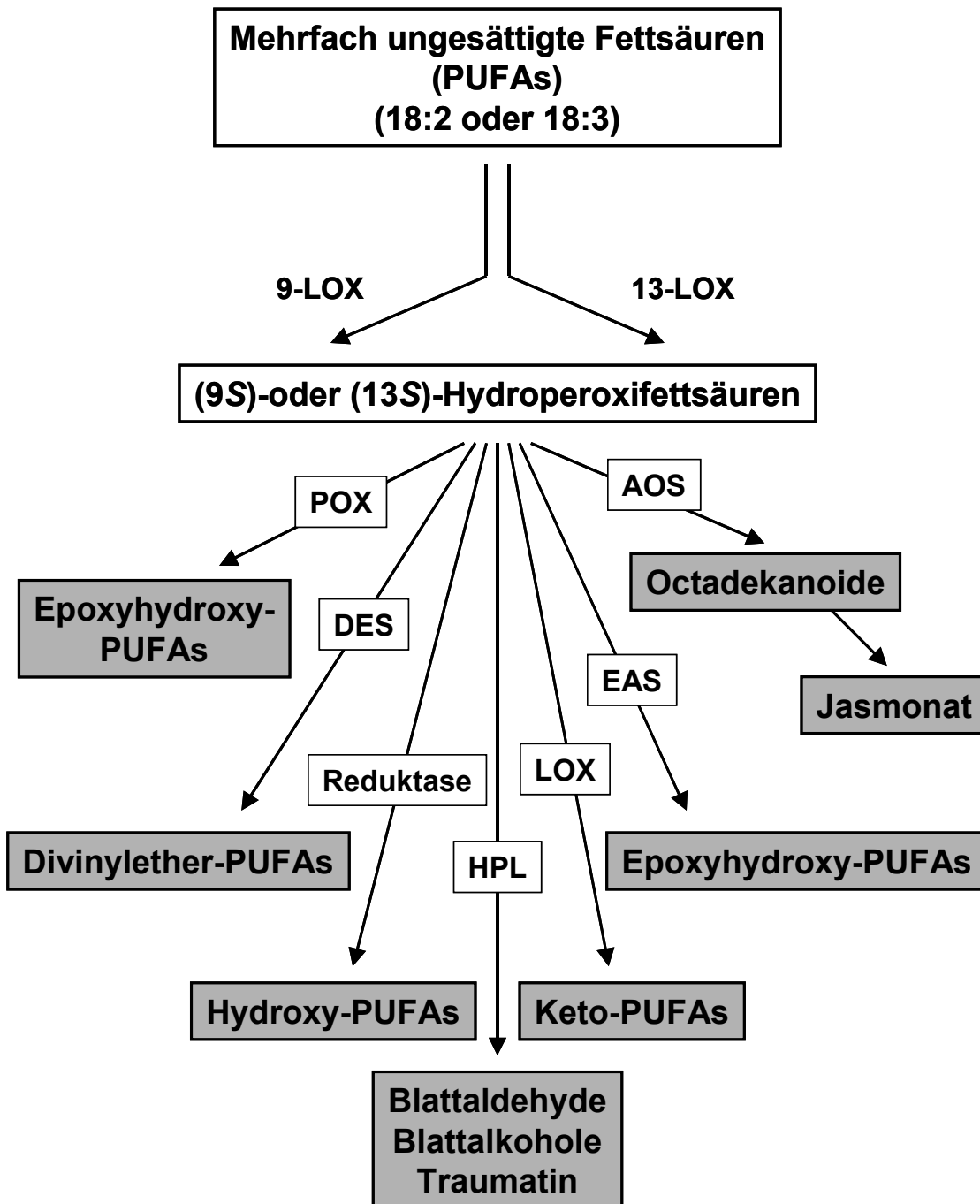


Abb. 1.6: Lipxygenase-Stoffwechselweg (in Anlehnung an Feussner and Wasternack, 2002)
 9- und 13-Hydroperoxyfettsäurederivate aus der Lipxygenase-Primärreaktion können als Substrate in verschiedene Zweige des Lipxygenase-Stoffwechselwegs einfließen. (AOS): Allenoxid-Synthase, (DES): Divinylether-Synthase, (EAS): Epoxyalkohol-Synthase, (HPL): Hydroperoxid- Lyase, (LOX): Lipxygenase, (POX): Peroxygenase, (PUFAs): „polyunsaturated fatty acids“, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, (18:2 bzw. 18:3): doppelt bzw. dreifach ungesättigte C₁₈-Fettsäuren

1.2.2 Physiologische Rolle von Produkten des LOX-Stoffwechselwegs

Lipoxygenasen sind an einer Vielzahl von Vorgängen in Pflanzen beteiligt. Diskutiert wird vor allem ihre Bedeutung während des Wachstums, der Entwicklung, der Seneszenz, der Wundantwort und der Pathogenabwehr (Hildebrand et al., 1988; Rosahl, 1996).

Wachstum und Entwicklung

Lipoxygenase-Enzyme sind in den Samen vieler Pflanzen vorhanden, und/oder ihre Expression wird während der Keimung induziert (Siedow, 1991; Rosahl, 1996). Dies wurde zum Beispiel für Reis (Ohta et al., 1986), Sojabohne (Altschuler et al., 1989) oder *Arabidopsis* (Melan et al., 1994) gezeigt.

Die Rolle der Lipoxygenase in der Samenentwicklung ist bis jetzt nicht ganz klar (Rosahl, 1996; Porta and Rocha-Sosa, 2002). So konnte in einer transgenen Soja-Linie, welche keines der drei in den Samen der Pflanze enthaltenen Lipoxygenase-Isoenzyme mehr besitzt, keinerlei Effekt auf die Samenkeimung beobachtet werden (Pfeiffer et al., 1992; Wang et al., 1999). Dies führte zu der Vermutung, dass diese Lipoxygenasen als vegetative Speicherproteine dienen. Hypothesen zufolge könnten Lipoxygenasen innerhalb von Wachstum und Entwicklung des Keimlings an der Zerstörung zellulärer Membranen und dadurch an der Freisetzung und der Ermöglichung des Transports von Speicherverbindungen zum Embryo beteiligt sein (Hildebrand, 1989; Rosahl, 1996).

In *A. thaliana*-Keimlingen wurde eine Lipoxygenase vor allem in den Epidermiszellen von Kotyledonen nachgewiesen (Melan et al., 1994). Es wird eine Beteiligung dieser LOX am Schutz des Keimlings vor Pathogenen durch Synthese antimikrobieller Substanzen oder alternativ die Beteiligung am Wachstum und an der Zellstreckung der Epidermiszellen durch regulatorische Produkte aus dem LOX-Stoffwechsel diskutiert.

Einige LOX-Spezies dienen auch als temporäre N-Speicherproteine während des vegetativen Wachstums (Grimes et al., 1993). In Kartoffeln wird die Beteiligung von Lipoxygenasen an der Knollenbildung diskutiert. Antisense *POTLX1* -Pflanzen mit erniedrigter LOX-Aktivität zeigen eine Reduktion in der Knollenbildung (Kolomiets et al., 2001).

Seneszenz

Alterung und Seneszenz pflanzlicher Gewebe geht mit einem Verlust der Membranintegrität einher. Es kommt unter anderem zur Peroxidation und Freisetzung von Membranlipiden (Palyath and Droillard, 1992). Hierbei erfolgt die

Peroxidation entweder unter Beteiligung freier Radikale oder durch Lipoxygenaseaktivität (Thompson et al., 1987). Lynch und Thompson (1984) wiesen in seneszierenden Bohnenkotyledonen eine Korrelation zwischen einer Erhöhung der Konzentration von Superoxidanionradikalen und einem Anstieg der Lipoxygenaseaktivität nach. Durch einen LOX-Inhibitor konnte eine Reduktion der LOX-Aktivität und der Bildung von Superoxidanionen erzielt werden. Auch ist die Bildung dieser Radikale vom Vorhandensein von Linolsäure abhängig. Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Lipoxygenasen an der Produktion von Superoxidanionen, welche während der Seneszenz zur Membrandegradation führen können.

Wirklich geklärt ist die Beteiligung von Lipoxygenasen an der Peroxidation der Membranlipide noch nicht. In seneszierendem Gewebe kommt es eher zu einer Abnahme der Gesamt-Lipoxygenaseaktivität (Siedow, 1991). Es wird aber die Aktivierung einer membranassoziierten Lipoxygenaseisoform diskutiert, welche für die Lipidperoxidation verantwortlich sein könnte (Rosahl, 1996). In Soja (Maccarone et al., 1994) und Tomate (Regdel et al., 1994) wurden membranassoziierte Lipoxygenasen gefunden, welche Membranlipide oxidieren können.

Verwundung

Pflanzen reagieren auf Verwundung mit einer Reihe an Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel Induktion von Abwehrgenen, Synthese antimikrobieller Substanzen und Initiierung von Mechanismen der Wundheilung. Als Komponenten, welche in die Wundantwort der Pflanze involviert sind, wurden unter anderem Substanzen aus dem LOX-Weg identifiziert (Rosahl, 1996; Porta and Rocha-Sosa, 2002).

Traumatinsäure, welche aus 13-Hydroperoxylinolensäure synthetisiert wird, kann die Zellteilung an der Verwundungsstelle beschleunigen (English et al., 1939; reviewed in Rosahl, 1996). Später wurde als aktive Substanz Traumatol angenommen (Zimmerman and Coudron, 1979). Der Anstieg der Konzentration dieses ω -Ketofettsäurederivats in einigen Pflanzenspezies nach Verwundung und seine Auswirkung auf die Zellteilung an der Verwundungsstelle legen den Verdacht nahe, dass es sich bei Traumatol um ein Signal für die Wundheilung handeln könnte (Rosahl, 1996).

Ein weiteres Produkt des LOX-Wegs, welches in die Antwort der Pflanze auf Verwundung involviert ist, ist die Jasmonsäure. Ein Anstieg des Jasmonsäurespiegels kann wenige Stunden oder manchmal auch Minuten nach Verwundung beobachtet werden (Albrecht et al., 1993). Dies wurde zum Beispiel für Sojahypocotyl gezeigt (Creelman et al., 1992).

Jasmonsäure wird wie das Traumatol aus der 13-Hydroperoxylinolensäure synthetisiert (Vick and Zimmerman, 1983) und spielt eine Rolle als

Wachstumsregulator mit vielen verschiedenen physiologischen Aktivitäten (reviewed in Sembdner and Parthier, 1993). Der transiente Jasmonsäurespiegel steht im Zusammenhang mit der Transkriptakkumulation wundinduzierter Gene. Allerdings setzt die Geschwindigkeit der Jasmonsäurebildung eine konstitutive Expression der beteiligten Gene, wie zum Beispiel der Lipoxygenase, voraus (Rosahl, 1996). Die vielfach beobachtete Steigerung der LOX-Aktivität und Akkumulation von LOX-Transkripten (Bell and Mullet, 1991; Royo et al., 1996) nach Verwundung findet fast immer spät statt und kann daher nicht der Grund für die schnelle *de novo* Synthese der Jasmonsäure sein (Rosahl, 1996).

Pathogenabwehr

Die Induktion von LOX-Genen während der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen wurde für viele Spezies beschrieben (Porta and Rocha-Sosa, 2002).

Die Rolle der Lipoxygenasen in der Pathogenabwehr ist abhängig von der Synthese einer Vielzahl verschiedener Verbindungen mit Signalfunktion (Creelman and Mullet, 1997; Parchmann et al., 1997) oder antimikrobieller Wirkung (Croft et al., 1993; Weber et al., 1999).

In inkompatibler Interaktion von Bohne mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* erfolgt der Anstieg der LOX-Aktivität schneller und stärker als in kompatibler Interaktion (Slusarenko et al., 1991). Rancé et al. (1998) konnten zeigen, dass Tabakpflanzen, welche ein antisense *LOX1*-Konstrukt exprimieren, im Gegensatz zu den Wildtyppflanzen, suszeptibel gegenüber der *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* Rasse 0 sind. Dies gilt als Hinweis, dass LOX eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Resistenz gegen Pathogene spielt. Hierfür existieren zwei mögliche Erklärungen: zum einen könnte es sein, dass einige Metaboliten aus dem LOX-Weg mit antimikrobieller Wirkung nicht mehr synthetisiert werden, zum anderen sind auch einige Produkte des LOX-Metabolismus notwendig, um die HR zu induzieren (Porta and Rocha-Sosa, 2002).

Die HR ist unter anderem durch einen Verlust der Membranintegrität gekennzeichnet, welche mit der Generierung von Lipidperoxiden und reaktiven Sauerstoffspezies einhergeht. Rustérucci et al. (1999) konnten zeigen, dass mit dem Elicitor Cryptogein infiltrierte Tabakblätter eine starke Induktion chloroplastidärer Lipidperoxidation, abhängig vom 9-LOX-Metabolismus, aufwiesen. Ebenso kommt es zu einer Akkumulation von *LOX1*-mRNA nach Cryptogeinbehandlung. Das Auftreten der Blattnekrosen korreliert mit dem Level der Fettsäureperoxidation und kann durch Linol- und Linolensäurebehandlung zusammen mit Methyljasmonat als Induktor für die 9-LOX-Aktivität hervorgerufen werden (Rustérucci et al., 1999). Für die Entwicklung der HR nach Cryptogeinbehandlung scheint die Aktivität von zwei LOX-Spezies notwendig zu sein: eine 13-LOX für die Synthese von Jasmonat und eine 9-

LOX für die Peroxidation der Fettsäuren, welche zur Membranschädigung und schließlich zum Zelltod führt (Porta and Rocha-Sosa, 2002). In Linsenwurzelpoplasten kann Wasserstoffperoxid den Zelltod induzieren und zu einer Steigerung der LOX-Aktivität führen (Maccarone et al., 2000). LOX-Inhibitoren können die Protoplasten gegen Zelltod schützen. Außerdem induzieren 9- und 13-HPOT in diesem System den Zelltod.

Ein weiterer Aspekt der Rolle der Lipoxygenase bei der Pathogenabwehr betrifft die Produktion von antimikrobiellen Substanzen und Regulatormolekülen. Sowohl die Primärprodukte der Lipoxygenase, als auch die flüchtigen Aldehyde, welche aus diesen gebildet werden, besitzen fungizide Wirkung (Ohta et al., 1990; Croft et al., 1993; Ricker and Bostock, 1994; Blée, 1998b). Die aus der 13-Hydroperoxylinolensäure gebildete Jasmonsäure reguliert das Wachstum und als Signalmolekül, entwicklungs- und stressabhängig, die Expression bestimmter Gene (Wasternack et al., 1998). Auch besitzt die Jasmonsäure in Reis eine fungizide Wirkung (Neto et al., 1991), was auf die Inhibition pilzlicher Differenzierungsprozesse und nicht auf direkt toxische Wirkung zurückzuführen ist (Schweizer et al., 1993). In Reis inhibiert 9-Hydroxylinolensäure das Wachstum von *M. grisea* (Ohta et al., 1990) und nach Infektion kommt es in den Reispflanzen zur Akkumulation von fungitoxischen Oxylipinen aus 9- und 13-Hydroperoxylinolsäure. 9- und 13-Hydroperoxylinolsäure können auch die Keimung von *Phytophthora capsici*-Sporen inhibieren (Ricker and Bostock, 1994). In Bohne wurde nach Inokulation mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* die Synthese flüchtiger antimikrobieller Substanzen, wie zum Beispiel *trans*-2-Hexenal, aus dem LOX-Stoffwechsel gezeigt (Croft et al., 1993). In Sojabohnen wurden Hinweise darauf gefunden, dass Produkte des LOX-Stoffwechsels in die Resistenz gegen *Aspergillus flavus* involviert sind (Doehlert et al., 1993).

1.3 Ziel der Arbeit

Nach Behandlung von Reis mit chemischen Resistenzinduktoren erfolgt auf Proteinebene eine Steigerung der LOX-Aktivität (Schaffrath, 1994).

Die vollständige cDNA der Lipoxygenase *RC11* (EMBL, Accession-Nr. AJ270938), deren Transkripte in Reispflanzen nach Behandlung mit den chemischen Resistenzinduktoren DCINA, BTH und Probenazol akkumulieren, wurde isoliert (Zabbai, 1999; Schaffrath et al., 2000b). Nach einer neueren Nomenklatur wird *RC11* auch als *LOX2:Os:2* bezeichnet (Feussner and Wasternack, 2002). Die cDNA von *RC11* hat eine Gesamtlänge von 3031 bp. Das offene Leseraster erstreckt sich über 2769 bp und codiert für 922 Aminosäuren. Sequenzvergleiche zeigen die höchste

Homologie von *RCI1* zu der *LOX 2:Hv:1* aus Gerste (Vörös et al., 1998). So besteht im Nukleotidsequenzvergleich zwischen den beiden *LOX*-cDNAs eine 71 % Identität in einem Bereich von 2700 bp. Es besteht eine Korrelation zwischen der Akkumulation der Transkripte von *RCI1* und dem Auftreten von Resistenz der Pflanzen nach Behandlung mit Resistenzinduktoren. Eine Beteiligung von *RCI1* an der Ausprägung des Phänotyps der induzierten Resistenz in Reispflanzen scheint daher möglich.

Das in *E. coli* exprimierte rekombinante RCI1-Protein besitzt Lipxygenaseaktivität (Rademacher, 1999). Das pH-Optimum für die von RCI1 katalysierte Reaktion beträgt pH 8,8 und der Umsatz von Linolsäure durch das rekombinante RCI1-Protein ergibt ein Produktverhältnis von 91 % 13-HPOT zu 9 % 9-HPOT (Schaffrath et al., 2000b).

Ziel dieser Arbeit ist die weitere molekulare Charakterisierung der Lipxygenase RCI1. Weiterhin soll ihre funktionale Rolle in der chemisch induzierten Resistenz von Reispflanzen untersucht werden:

1. Für die biochemische Charakterisierung sollte zunächst zur Vervollständigung der bisherigen Ergebnisse die Produktspezifität von RCI1 in Bezug auf das Substrat Linolensäure bestimmt werden. Weiterhin wurden Versuche zur Substratspezifität des Proteins durchgeführt.
Für die molekulare Charakterisierung sollte eine Southernanalyse erfolgen.
2. Über die Herstellung einer GFP-Fusion mit einem putativen N-terminalen Chloroplasten-Transitpeptid von RCI1 sollte die Bestimmung der Cytolokalisation der Lipxygenase erfolgen.
3. Um die mögliche Rolle von RCI1 in der chemisch induzierten Resistenz von Reispflanzen zu untersuchen, sollte eine Überexpression von *RCI1* in Reispflanzen durch Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* erfolgen.
4. Es sollte untersucht werden, inwieweit die chloroplastidäre Lokalisation von RCI1 für die physiologische Funktion notwendig ist.

2 Material und Methoden

2.1 Biologisches Material

2.1.1 Anzucht der Versuchspflanzen

2.1.1.1 Reis

Zur Anzucht der Reiskultivare wurden Plastiktöpfe (BHT 5x5x4,5 cm³) mit Pikiererde (P-Erde, Einheitserde, Balster AG, Fröndenberg, Deutschland) bis zum Rand gefüllt. Danach wurde die Erde leicht festgedrückt und ca. 15 Samen in die Topfmitte gegeben. Diese wurden dann mit Pikiererde bedeckt. Die Töpfe wurden von oben gleichmäßig befeuchtet und in ein Tablett 2 cm hoch in Wasser gestellt. Das Tablett wurde 7 Tage unter einer Haube belassen. Am siebten Tag nach der Aussaat erfolgte eine Eisendüngung mit 10 ml einer 10 mM Eisen-EDTA-Lösung pro Topf. Die Anzucht fand in einer Phytokammer mit einer 15-stündigen Photoperiode bei einer Temperatur von 24 °C und einer relativen Luftfeuchte von 75 % statt. Während der Dunkelperiode betrug die Temperatur 23 °C und die relative Luftfeuchte 80 %. In dieser Arbeit fand das Reiskultivar Kusabue Verwendung, welches freundlicherweise von der Bayer AG, Geschäftsbereich Pflanzenschutz, Pflanzenschutzzentrum Monheim, Deutschland zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.1.2 Radies

Zur Anzucht der Radieskultivare wurden Plastiktöpfe (BHT 7x7x8 cm³) mit 2er-Erde (Einheitserde, Balster AG, Fröndenberg, Deutschland) bis zum Rand gefüllt. Hierbei wurde die Erde leicht festgedrückt. In jeweils fünf etwa 0,5 cm tiefe Pflanzlöcher pro Topf wurde je ein Radiessamen gelegt und das Substrat darüber leicht festgedrückt. Die Erde wurde gleichmäßig befeuchtet und die Pflanzen wurden in Wachstumsschränken (Modell MLR-350, Sanyo, Bad Nenndorf, Deutschland) bei einer 12-stündigen Photoperiode und bei einer Temperatur von 17 °C herangezogen. In dieser Arbeit fand das Radieskultivar Solar Verwendung, welches freundlicherweise von der Firma Sluis en Groot, Kleve, Deutschland zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.1.3 Gerste

Zur Anzucht wurden Gerstenkörner der Sorte Ingrid *Mlo* sowie der Rückkreuzungslinie BCIngrid *m/o5*, die freundlicherweise vom MPIZ Köln zur Verfügung gestellt wurden, in einer Petrischale mit angefeuchtetem Filterpapier zum Vorkeimen ausgelegt. Die ausgekeimten Körner wurden am nächsten Tag zu je fünf Stück in Plastiktöpfe (BHT 8x8x8,5 cm³), die mit gesiebter ED73-Erde (Balster-AG, Fröndenberg, Deutschland) gefüllt waren, ausgelegt und mit einer dünnen Schicht des Substrats bedeckt. Die Erde wurde gleichmäßig angefeuchtet. Die Anzucht fand in einer Phytokammer bei einer 16-stündigen Photoperiode statt. Die Temperatur betrug 18 °C und die relative Luftfeuchte 65 %.

2.1.2 Anzucht und Lagerung von Bakterien, sowie verwendete Plasmide und Sonden

2.1.2.1 Anzucht von Bakterien

E. coli wurden in LB- und *A. tumefaciens* in YEB-Medium angezogen. Agar-Platten wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agar zu den genannten Medien hergestellt. Die Medien wurden für 20 Minuten bei 120 °C autoklaviert und nach Bedarf anschließend Antibiotika zugegeben.

LB-Medium

1,0 % (w/v) Trypton
0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt
1,0 % (w/v) NaCl
in A. dest., pH 7,0

YEB-Medium

0,5 % (w/v) Saccharose
0,5 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Fleischextrakt
0,1 % (w/v) Hefeextrakt
2 mM MgSO₄
in A. dest., pH 7,2

Tab. 2.1: Eingesetzte Antibiotikakonzentrationen für die positive und negative Selektion der Bakterien

Antibiotikum	Konzentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin	100	-
Rifampicin	-	50
Kanamycin	50	50
Tetracyclin	12,5	-

Um einzelne Klone zu erhalten, wurden Bakteriensuspensionen auf Agar-Platten ausgestrichen und im Brutschrank inkubiert (*E. coli* bei 37 °C und *A. tumefaciens* bei 28 °C).

Bakterienflüssigkulturen wurden in Reagenzgläsern mit 3 ml Medium oder in Erlenmeyerkolben (Kulturvolumen 1/10 bis max. 1/5 des Gefäßvolumens) bei 220 rpm und den oben genannten Temperaturen angezogen. Die Inkubationszeiten betrugen für *E. coli* 14-16 h, die für *A. tumefaciens* 24-36 h.

Die Lagerung der Bakterien erfolgte entweder bei 4 °C auf Agarplatten oder bei -70 °C als Glycerinkultur.

Tab. 2.2: Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i>		
DH5 α	Φ 80d/ <i>lacZ</i> Δ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ , <i>m_K</i> ⁺), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169	Woodcock et al. (1989), Raleigh et al. (1989)
S17-1	RP4-2 (Tc::Mu) (Km::Tn7) Tp-Sm Pro res ⁻ mod ⁺	Simon et al. (1983)
BL21	<i>hsdS</i> , <i>gal</i> (λ clts857, <i>ind1</i> , Sam7, <i>nin5</i> , <i>lac</i> UV5-T7 gene1)	Studier and Moffat (1986)

Stamm	Genotyp	Referenz
TOP 10 F'	F' (<i>lac</i> I ^F Tn10(Tet ^R)), <i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsd</i> RMS- <i>mcr</i> BC), Φ 80 <i>lac</i> Z Δ M15 Δ <i>lac</i> x74, <i>deo</i> R, <i>rec</i> A1, <i>ara</i> D139 Δ (<i>ara-leu</i>) 7697, <i>gal</i> U, <i>gal</i> K, <i>rps</i> L, <i>end</i> A1, <i>nup</i> G	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
M15	pREP4, Kan ^R	Villarejo and Zabin (1974)
<i>A. tumefaciens</i>		
LBA 4404	pAL4404, Rif ^R	Hoekema et al. (1983)

2.1.2.2 Plasmide

Tab. 2.3: Plasmide

Plasmid	Referenz / Herkunft
pBlueskript II SK+	Short et al. (1988); Stratagene, Heidelberg, Deutschland
pGEM T easy	Promega, Mannheim, Deutschland
pCambia 1301 bzw. 1302	Cambia, Canberra, Australien
pBK CMV	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
pGex4T3	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
pDS56/RBSII, <i>Sph</i> I bzw. <i>Nco</i> I	Stüber et al. (1990)
pROB 5	Dalton et al. (1995)

2.1.2.3 Sonden

Tab. 2.4: Beschreibung der verwendeten Sonden

Name	Größe in bp	Vektor	Beschreibung
<i>3'-RC11</i>	~ 700	pGEM T easy	PCR-Fragment aus 3'-Ende der chemisch induzierten LOX <i>RC11</i> aus Reis (KI5, Dr. Ulrich Schaffrath)
<i>5'-RC11</i>	~1340	pBK CMV	<i>EcoRI/HindIII</i> -Restriktionsfragment vom 5'-Ende der cDNA der chemisch induzierten LOX <i>RC11</i> aus Reis
<i>OsPR1a</i> (<i>PR1</i>)	~500	pGEM T easy	PCR-Fragment ; Acc.Nr.: U89895
<i>Non-T-DNA</i>	5928 bp	pCambia 1301	<i>Sph I / Sac I</i> – Fragment von pCambia 1301
<i>Gus</i>	2050 bp	pCambia 1301	<i>Nco I / BstE II</i> – Fragment von pCambia 1301
<i>Cht1</i>	~ 595 bp	pGEM T easy	PCR-Fragment (1628-2223 bp); Acc.Nr.: D16221 ; Nishizawa et al. (1993)
<i>Rir1a</i> (<i>Rir1</i>)	~ 600 bp	pGEM T easy	Mauch et al. (1998)
<i>HvPr1b</i>		pBlueskript	Bryngelsson et al. (1994)

2.1.2.4 Glycerinkulturen

Zur längeren Lagerung von Bakterienkulturen (z. B. Transformanten) wurden 750 µl einer Flüssigkultur mit 250 µl autoklaviertem Glycerin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf dem Vortex gemischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Glycerinstocks erfolgte bei -70 °C. Von diesen Stocks konnten jederzeit Agarplatten angeimpft werden.

2.1.3 Chemische Resistenzinduktoren

In den Versuchen wurde hauptsächlich der Resistenzinduktor BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazol-7-carbothiolsäure S-methylester, Bion®, s. Abb. 2.1) verwendet.

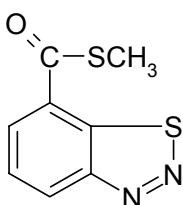


Abb. 2.1: Formel von BTH

Der Resistenzinduktor BTH lag als Formulierung in benetzbarem Pulver mit 50 % (w/w) Wirkstoffkonzentration vor und wurde in A. dest. gelöst. Die Suspension wurde mittels Druckluft gleichmäßig auf die Pflanzen aufgesprüht. Als Kontrolle diente die Leerformulierung (benetzbares Pulver), ebenfalls in A. dest. gelöst. In der Regel betrug die für die Versuche eingesetzten Wirkstoffkonzentrationen von BTH 250 ppm.

2.1.4 Applikation von 13(S)-HOT

Der erste Schritt der enzymatischen Lipidperoxidation in Pflanzen ist die Lipoxygenase-katalysierte Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linol- oder Linolensäure am C-9- (9-LOX) oder am C-13-Atom (13-LOX) (Feussner and Wasternack, 1998). Die entstehenden mehrfach ungesättigten Hydroperoxyfettsäuren können durch unterschiedliche Reaktionen innerhalb des LOX-Stoffwechselwegs konvertiert werden (Blee, 1998). Durch Peroxygenase (POX) oder Reduktase kommt es im Falle der 13-Hydroperoxyfettsäuren zur Bildung von 13(S)-HOT (13(S)-Hydroxy-9(Z),11(E),15(Z)-octadecatriensäure). Das Flotieren von

Blattfragmenten auf einer 10 μM 13(S)-HOT-Lösung führt bei Gerste zur Akkumulation von *PR1b*-Transkripten (Weichert et al., 1999).

Die in dieser Arbeit verwendete 13(S)-HOT wurde von der Firma Larodan Fine Chemicals, Malmö, Schweden bezogen. Die Substanz lag gelöst in 100 % (w/v) EtOH vor. Für die Versuche wurden Lösungen mit 10, 25 und 50 μM 13(S)-HOT eingesetzt. Hierfür wurde jeweils eine entsprechende Menge der Stammlösung mit A. bidest. gemischt. Als Kontrolle diente ein äquivalentes Volumen 100 % (w/v) EtOH in A. bidest.. Die Lösungen wurden entweder mittels einer Zange und aufgesetzter Spritze („hagborg device“) in 7 Tage alte Gersten- (s. 2.1.1.3) bzw. 12 Tage alte Reisblätter (s. 2.1.1.1) infiltriert oder es wurden etwa 5 cm lange Blattfragmente auf den Lösungen flotiert, wobei zu den Ansätzen mit Reis 0,01 % (v/v) Tween 20 in die Lösung gegeben wurde. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte die Entnahme von Proben für die RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1). Die Proben wurden bis zur Verarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.1.5 Chemikalien

Alle nicht im einzelnen aufgeführten Chemikalien wurden von Boehringer, Mannheim; GIBCO BRL, Karlsruhe; Merck, Darmstadt; PeqLab, Erlangen; Promega, Mannheim; Serva, Heidelberg und Sigma-Aldrich, Deisenhofen mit analytischem Reinheitsgrad bezogen.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

2.2.1.1 Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* (Minipräp)

Zur Isolation von Plasmiden aus *E. coli* wurde eine Methode, basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Anlehnung an Birnboim and Doly (1979), durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen von 1,5 ml einer Übernachtskultur für 5 Minuten bei 8000 rpm in einer Tischzentrifuge (Typ 5415 C, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) pelletiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 100 μl GTE-Lösung resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden 200 μl Lysis-Puffer hinzugegeben und die Suspension durch Invertieren

gemischt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 150 µl KAc/HAc-Lösung neutralisiert. Es wurde 5-20 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der entstandene weiße Niederschlag durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge sedimentiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren durch Zugabe eines Volumen Isopropanol. Die DNA wurde durch eine Zentrifugation bei 14000 rpm und 4 °C für 20 Minuten in einer kühlbaren Tischzentrifuge (Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) pelletiert, das Pellet mit 70 % (v/v) EtOH (eiskalt) gewaschen und in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen.

GTE-Lösung

Glucose	50	mM
Tris-HCl, pH 8,0	25	mM
EDTA, pH 8,0	10	mM
in A. bidest.		

Lysis-Puffer

NaOH	0,2	N
SDS	1	% (w/v)
in A. bidest.		

KAc/HAc-Lösung

Kaliumacetat	5	M
Essigsäure	3	M
in A. bidest.		

2.2.1.2 Plasmid-DNA-Maxipräparation aus *E. coli*

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurde das Jetstar Plasmid Maxiprep Kit von Genomed, Bad Oeynhausen, Deutschland verwendet. Der Zellaufschluss erfolgte bei dieser Methode ebenfalls mittels alkalischer Lyse. Nach der Neutralisation wurde das Lysat über eine Säule gegeben, wobei die Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Anionenaustauschermatrix band. Anschließende Waschschritte entfernten Verunreinigungen wie z. B. RNA von der Säule. Die Plasmid-DNA konnte dann unter Niedrigsalzbedingungen von der Säule eluiert und mit 0,7 Volumeneinheiten Isopropanol gefällt werden. Die Plasmid-DNA wurde nach Sedimentation und Waschen in 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 gelöst (Lagerung bei -20 °C).

2.2.1.3 Isolation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens*

Bei der Isolation von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* wurden 30 ml YEB-Medium in einem 300 ml Erlenmeyerkolben mit *Agrobacterium* aus einer 3 ml-Vorkultur beimpft und über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 3500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) geerntet und das Pellet in 200 µl GTE-Lösung (s. 2.2.1.1) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur. Dann wurden 400 µl Lysis-Puffer (s. 2.2.1.1) hinzugegeben und die Suspension durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde für 5 Minuten auf Eis inkubiert und mit 300 µl KAc/HAc-Lösung (s. 2.2.1.1) versetzt. Es wurde 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der entstandene weiße Niederschlag durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Typ 5415 C, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) sedimentiert und der Überstand vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol. Die Nukleinsäuren wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation in einer kühlbaren Tischzentrifuge (Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) bei 4 °C und 14000 rpm pelletiert, das Pellet einmal in eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und in 400 µl RTE-Lösung aufgenommen. Zum Abbau der RNA wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Extraktion mit einer Volumeneinheit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 14000 rpm. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAcetat, pH 5,2 und einem Volumen Isopropanol für mindestens 10 Minuten auf Eis gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugieren für 15 Minuten bei 4 °C pelletiert, das Pellet mit 70 % (v/v) EtOH (eiskalt) gewaschen und in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen.

2.2.2 Isolation genomischer DNA aus Reis

Genomische DNA aus Reis wurde nach einer Modifikation der CTAB-Methode von Murray and Thompson (1980) extrahiert. Bei dieser Methode werden Proteine durch Extraktion mit Chloroform aus dem Ansatz entfernt. Kohlenhydrate können durch die relativ spezifische Fällung der DNA als CTAB-DNA-Komplex (bei Erniedrigung der Salzkonzentration) eliminiert werden.

Für die Extraktion wurden etwa zehn Reisblätter in flüssigem Stickstoff gemörsernt und das Pulver in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 µl EB-

Puffer wurde der Ansatz mit einem Kunststoffpotter homogenisiert. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei 56 °C im Wasserbad. Der Ansatz wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und Proteine mit 800 µl CO extrahiert. Dann wurde 5 Minuten bei 14000 rpm in einer Tischzentrifuge (Typ 5415 C, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) zentrifugiert, die obere, wässrige Phase in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 80 µl CTAB-Stocklösung versetzt. Es folgte eine erneute Extraktion mit 800 µl CO und anschließende Zentrifugation. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Fällung des DNA-CTAB-Komplex erfolgte durch Zugabe von 1 ml PB-Puffer und Inkubation für mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur. Der Komplex wurde durch eine 5-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert und das Pellet anschließend in 400 µl 1 M NaCl mit 2 µl RNase A (10 mg ml⁻¹) gelöst. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C zum Verdau der RNA fand die Fällung der DNA durch Zugabe von 1 ml 100 % (w/v) EtOH bei -20 °C über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde die DNA 10 Minuten bei 14000 rpm in einer kühlbaren Tischzentrifuge (Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und anschließend in 50 µl 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 aufgenommen (Lagerung bei -20 °C). Die Überprüfung der Integrität der DNA erfolgte mittels Elektrophorese in einem 0,8 % (w/v) Agarosegel (s. 2.2.4).

Elutionspuffer EB

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
NaCl	700	mM
EDTA	10	mM
CTAB	1	% (w/v)
in A. bidest., autoklaviert, vor Gebrauch		
wurde 1 % β-Mercaptoethanol zugegeben		

Präzipitationspuffer PB

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
EDTA	10	mM
CTAB	1	% (w/v)
in A. bidest., autoklaviert		

CO

Chloroform:Octanol	24:1	(v/v)
--------------------	------	-------

CTAB-Stocklösung

NaCl	700	mM
CTAB	10	% (w/v)
in A. bidest., autoklaviert		

2.2.3 Restriktion von DNA

2.2.3.1 Restriktion von Plasmid-DNA

DNA lässt sich mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen sequenzspezifisch schneiden.

Restriktionsansatz

Plasmid-DNA	1-2 µg
10xRestriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym(e)	5 units
A. bidest.	ad 20 µl

Der Ansatz wurde 1 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Für präparative Ansätze wurden etwa 20 µg Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 µl verdaut (Volumen des Wassers, des Puffers und der Enzyme entsprechend erhöht).

2.2.3.2 Restriktion genomischer DNA

Genomische DNA kann ebenso wie Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen geschnitten werden. Hierbei entstehen unterschiedlich große Fragmente, die sich durch eine Elektrophorese auftrennen lassen.

Restriktionsansatz

genomische DNA	10 µg
10xRestriktionspuffer	3 µl
Restriktionsenzym	60 units
A. bidest.	ad 30 µl

Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym optimalen Temperatur (meist 37 °C) über Nacht.

2.2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

DNA-Fragmente können entsprechend ihrer Größe in einer Agarosematrix im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die durch das Zucker-Phosphat-Gerüst im basischen Milieu negativ geladene DNA wandert dabei in Richtung Anode. Detaillierte Informationen zur Methode wurden aus Sambrook et al. (1989) entnommen.

Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,7-2 % (w/v) Agarosegele hergestellt (s. Tab. 2.5). Hierzu wurde die jeweilige Menge Agarose in 1xTBE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und nach Abkühlung auf 65 °C mit 1 µg ml⁻¹ Ethidiumbromid versetzt. Das Gel wurde blasenfrei in die vorbereitete Gelkassette gegossen und nach dem Erstarren in die Elektrophoresekammer mit 1xTBE-Lösung als Laufpuffer eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden 5 µl Probe mit 1 µl Ladungspuffer versetzt. Dieser enthielt Sucrose zur Erhöhung der Dichte der Lösung, sowie zwei Farbmarker (s. u.). Die Bromphenolblau-Bande lief bei der Elektrophorese etwa auf der Höhe eines 300 bp-Fragmentes und die Xylencyanol-Bande auf Höhe eines 4 kb-Fragmentes. Die Auftrennung erfolgte, bis die Bromphenolblau-Bande etwa 2/3 des Gels durchlaufen hatte. Das Gel wurde nach dem Lauf in UV-Durchlicht ($\lambda=302$ nm, 2UVTMTransilluminator, UVP) mittels eines Polaroid-MP4+-Systems (Kema, Polaroid Corporation, Cambridge, USA) und unter Verwendung eines Polaroid Polaplan-Films fotografiert. Die DNA-Banden wurden dabei durch die Fluoreszenz des in die DNA-Stränge interkalierenden Ethidiumbromids sichtbar. Die Größe der Fragmente konnte durch Vergleich mit den Laufstrecken von Fragmenten bekannter Größe eines Längenmarkers (z.B.: 1 kb ladder, MBI; 100 bp ladder plus, MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) bestimmt werden.

Tab. 2.5: Wahl der Agarosekonzentration nach Größe der aufzutrennenden Fragmente

Agarosekonzentration in % (w/v)	Größe der aufzutrennenden Fragmente
0,7	1 - 30 kb
1,0	0,5 - 10 kb
1,2	0,4 - 7 kb
1,5	0,2 - 3 kb
2,0	0,05- 2 kb

10xTBE-Puffer

Borsäure	5,0 % (w/v)
EDTA (freie Säure)	0,58 % (w/v)
Tris	10,8 % (w/v)

in A. dest., auf pH 8,3 (mit Borsäurekristallen) eingestellt, autoklaviert

6xDNA-Ladungspuffer

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Xylencyanol	0,25 % (w/v)
Sucrose	40 % (w/v)

in A. bidest., Lagerung bei 4 °C

Ethidiumbromid-Stocklösung

Ethidiumbromid	10 mg ml ⁻¹
----------------	------------------------

in A. bidest., Lagerung lichtgeschützt bei 4 °C

2.2.5 Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland. Hierbei wurde zunächst das Stück Agarose mit dem gewünschten Fragment mittels eines Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten. Die Spaltung der Agarosepolymere erfolgte durch Inkubation in einem Natriumiodid-haltigen Puffer. Bei einer anschließenden Zentrifugation band die DNA an eine Silicamembran (Bedingungen: hohe Konzentration chaotroper Salze, pH >7,5) und konnte nach einigen Waschschritten schließlich mit 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert werden.

2.2.6 Auffüllen von überhängenden DNA-Enden**2.2.6.1 Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der Klenow-Polymerase**

Damit DNA-Fragmente mit glatten und überhängenden Enden ligiert werden konnten, mussten zunächst die Überhänge aufgefüllt werden. Die Klenow-Polymerase ist in der Lage, 5'-überstehende Einzelstrangenden in 5'-3'-Richtung in Gegenwart einer geeigneten Konzentration freier Nukleotide aufzufüllen. Zur Auffüllreaktion wurden etwa 100 ng DNA mit 40 µM Desoxyribonukleotiden und einer

Unit Klenow-Polymerase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) pro μg DNA versetzt und in einem Endvolumen von 50 μl für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Als Puffer diente 1xY⁺-Tango-Puffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), der bereits 0,1 mg ml⁻¹ BSA enthält. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 75 °C.

2.2.6.2 Herstellung glatter DNA-Enden mit Hilfe der T4 DNA-Polymerase

Die T4 DNA-Polymerase ist in der Lage, sowohl 3'- als auch 5'-überstehende Einzelstrangenden in Gegenwart einer geeigneten Konzentration freier Nukleotide aufzufüllen. Zur Auffüllreaktion wurden ca. 100 ng DNA mit 100 μM Desoxyribonukleotiden und 5 Units T4 DNA-Polymerase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pro μg DNA in 1xT4 DNA-Polymerasepuffer bei einem Endvolumen von 20 μl für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung des Enzyms für 10 Minuten bei 75 °C.

2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten durch alkalische Phosphatase

Vektoren wurden vor der Ligation mit DNA-Fragmenten an den 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase (CIAP) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Hierzu wurde die Vektor-DNA in 1xPhosphatasepuffer mit 0,01 Units alkalischer Phosphatase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) pro pmol Fragmentenden versetzt. Das Volumen des Ansatzes betrug 100 μl . Dann wurde für 15 Minuten bei 37 °C und für 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach nochmaliger Zugabe von 0,005 Units alkalischer Phosphatase pro pmol Fragmentenden wurden die Inkubationsschritte wiederholt. In direktem Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 μl 5 M EDTA, pH 8,0 und Hitzeinaktivierung des Enzyms für 20 Minuten bei 75 °C gestoppt. Vor dem Einsatz in eine Ligrationsreaktion wurde der Ansatz einer zweimaligen Phenol/Chloroform-Extraktion sowie einer EtOH/Acetatfällung (s. 2.2.8) unterworfen.

2.2.8 Phenol/Chloroform-Extraktion von DNA

Die Extraktion von Proteinen aus einer Lösung erfolgte durch Zugabe von einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1). Die Ansätze wurden auf dem Vortex gemischt und dann zur Phasentrennung für 5 Minuten bei 14000 rpm bei Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge (Typ 5415 C Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal mit einem Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Nach der Zentrifugation zur Trennung der Phasen wurde der wässrige Überstand wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA konnte mittels EtOH/Acetatfällung präzipitiert werden. Hierzu wurde der Ansatz mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,6 und 2 Volumen 100 % (v/v) EtOH versetzt und mindestens 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 14000 rpm und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einer kühlbaren Tischzentrifuge (5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) pelletiert. Das resultierende Pellet wurde mit eiskaltem 70 % (v/v) EtOH gewaschen und anschließend in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 oder A. bidest. gelöst.

2.2.9 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen erfolgten meist in einem Gesamtvolumen von 10 μl . Die vorbereitete Vektor- und Insert-DNA wurde mit einer Unit T4-DNA-Ligase sowie mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer gemischt und über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Das Verhältnis von Vektor zu Fragment richtete sich jeweils nach der vorliegenden Reaktion, d.h. nach der Ligation glatter oder überstehender Enden und nach der Größe des Vektors bzw. des Fragments. Im Allgemeinen wurde in den Reaktionsansätzen ein Verhältnis von 3:1 zwischen Fragment- und Vektorenden eingesetzt.

2.2.10 Präparation transformationskompetenter *E. coli*-Zellen

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Damit Plasmid-DNA von *E. coli*-Zellen aufgenommen werden kann, müssen die Zellen erst transformationskompetent gemacht werden. Dies kann auf chemischem Wege über die Behandlung mit CaCl_2 und Schwermetallsalzen erfolgen. Der genaue Mechanismus der Wirkung des CaCl_2 ist jedoch noch unbekannt. Die Herstellung

kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Hanahan (1983).

Für die Präparation wurden 200 ml 2xTY-Medium mit 1 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 auf dem Schüttler inkubiert. Nach dem Abkühlen der Bakteriensuspension auf Eis und dem Aliquotieren in 15 ml-Portionen folgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 3000 rpm und 4 °C (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) zur Sedimentation der Bakterien. Die Pellets wurden anschließend in 7,5 ml eiskaltem TFB I-Puffer aufgenommen, 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut 10 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Zum Abschluss wurden die Bakterien in je 4 ml eiskaltem TFB II-Puffer resuspendiert, 10 Minuten auf Eis inkubiert und in 200- μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren (Lagerung bei –70 °C).

TFB I-Puffer

RbCl	100	mM
MnCl ₂	45	mM
Kaliumacetat	35	mM
CaCl ₂	10	mM
LiCl	0,5	mM
Glycerin	15	% (v/v)
in A. dest., auf pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure		

TFB II-Puffer

MOPS	10	mM
CaCl ₂	75	mM
PbCl ₂	10	mM
Glycerin	15	% (v/v)
in A. dest., auf pH 7,0 mit 0,1 M NaOH		

2xTY-Medium

Trypton	1,6	% (w/v)
Hefeextrakt	1,0	% (w/v)
NaCl	0,5	% (w/v)
in A. dest., auf pH 7,0 mit 5 N NaOH, autoklaviert		

2.2.11 Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Im Jahr 1970 machten Mandel und Higa die Beobachtung, dass *E. coli*-Zellen nach Behandlung mit einer eiskalten CaCl₂-Lösung und einem Hitzeschock DNA des λ -Bakteriophagen aus dem Medium aufnehmen können. Weitere Verfeinerungen der Methode haben die Effizienz der Transfektion/Transformation von Bakterienzellen mit

freier DNA, z.B. Plasmid-DNA, stark erhöht. Erfolgreich transformierte Bakterien können anhand einer durch das Plasmid vermittelten Resistenz auf antibiotikahaltigen Medien selektiert werden.

Für die Transformation wurden etwa 0,5 µg Plasmid-DNA zu einem Aliquot der auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen (siehe 2.2.10) gegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für genau 90 s bei 42 °C im Wasserbad. Der Ansatz wurde für 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Je 20 µl bzw. 5 µl des Transformationsansatzes wurden mit 150 µl 2xTY- oder LB-Medium auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und die Bakterien bei 37 °C über Nacht wachsen gelassen. Die Kolonien der Transformanten konnten mit einem sterilen Zahnstocher für eine folgende Plasmidpräparation (s. 2.2.1) in antibiotikahaltige Flüssigmedien übertragen werden.

2.2.12 Transformation von superkompetenten *E. coli* TOP 10 F'-Zellen

Für kritische Transformationen wurden superkompetente TOP 10 F'-Zellen der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) wie vom Hersteller beschrieben transformiert.

2.2.13 Präparation kompetenter *Agrobacterium*-Zellen für die Transformation mittels Elektroporation

Für die Präparation nach einer Methode von Mc Cormac et al. (1998) wurde eine 50 ml-Kultur von *A. tumefaciens* bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 bei 28 °C und 220 rpm auf dem Schüttler herangezogen. Die Kultur wurde in ein 50 ml-Falcongefäß überführt, auf Eis inkubiert und bei 4000 rpm für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Dann wurden die Zellen dreimal mit eiskaltem 10 % (v/v) Glycerol gewaschen und das finale Pellet in 0,01 bis 0,02 Volumen 10 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden in Aliquots von 40 µl in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.2.14 Transformation von *A. tumefaciens* mittels Elektroporation

Die Transformation von Bakterien mittels Elektroporation basiert auf einer von Dower et al. (1988) und Taketo (1988) entwickelten Methode für die Transformation von *E. coli*. Diese Methode wurde anschließend auch auf weitere Bakterienstämme übertragen (Fiedler and Wirth, 1988).

Für die Transformation der elektrokompetenten *A. tumefaciens*-Zellen (s. 2.2.13) wurde etwa 1 µg Plasmid-DNA mit einem Volumen von weniger als 10 µl mit einem Aliquot der Zellpräparation vermischt und in einer eisgekühlten 0,1 cm-Küvette mittels eines BioRad Micro Pulser mit 22 KV cm⁻¹ elektroporiert. Die Zellen wurden unmittelbar in 1,0 ml YEB-Medium aufgenommen, zur Regeneration für 3 h bei 28 °C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert und auf YEB-Agar, supplementiert mit entsprechenden Antibiotika, selektioniert.

2.2.15 Triparentale Konjugation

Zum Transfer von Plasmid-DNA von *E. coli* auf *A. tumefaciens* mittels triparentaler Konjugation wurde je eine 3 ml-Übernachtskultur von *A. tumefaciens* LBA4404 (YEB-Medium mit Rifampicin), *E. coli* DH5α mit dem zu transformierenden Vektor (LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum) und *E. coli* S17-1 (LB-Medium) herangezogen. Die Zellen von jeweils 1,5 ml Kultursuspension wurden durch Zentrifugation bei 5000 rpm in einer Tischzentrifuge (Typ 5415 C, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) geerntet und die Pellets in Medium ohne Antibiotika bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 2,0 resuspendiert. Je 0,5 ml der Suspensionen wurden anschließend zusammengegeben und gemischt. Von dem Gemisch wurden 200 µl auf eine YEB-Platte ohne Antibiotika plattiert und bei 28 °C inkubiert. Nach einem bzw. zwei Tagen wurde mit einem Drigalskispatel auf eine Selektionsplatte (YEB mit 50 µg ml⁻¹ Rifampicin und Antibiotikum zur Selektion auf den entsprechenden Vektor) überimpft. Die Platte wurde einige Tage bei 28 °C inkubiert. Die entstandenen Klone wurden mittels Plasmidpräparation (s. 2.2.1.3) überprüft.

werden. Hierdurch zerfällt DEPC unter Abspaltung von CO_2 und kann somit der RNA nicht mehr schaden.

2.2.16.2 Präparation von RNA mit der „hot phenol“-Methode

Zur Gewinnung von Gesamt-RNA, die als Ausgangsmaterial zur Isolierung von poly(A)⁺-RNA diente, wurde die „hot phenol“-Methode angewendet, mit der hochreine RNA aus relativ großen Probenmengen isoliert werden kann.

Hierzu wurde das Blattmaterial durch Mörsern mit flüssigem Stickstoff zu feinem Pulver verarbeitet, in ein 15 ml-Falcongefäß überführt und mit 8 ml der auf 85 °C erhitzten Phenol/NETS-Lösung versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension für 5 Minuten bei 4 °C und 500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) zentrifugiert, die obere wässrige Phase in ein frisches Zentrifugengefäß überführt, mit 1,5 Volumen Phenol versetzt, 30 s auf dem Vortex gemischt und zur Phasentrennung erneut zentrifugiert. Die Nukleinsäuren im wässrigen Überstand wurden für 1 h bei –20 °C durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2 Volumen 100 % (v/v) Ethanol präzipitiert. Nach Sedimentation durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 10 000 rpm (J-21C, Rotor JA-20, Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland) wurde das Pellet in 2 ml A. bidest. (DEPC) aufgenommen und aus dieser Lösung die Gesamt-RNA durch Zugabe von 1 Volumen 5 M LiCl bei 4 °C über Nacht gefällt. Nun wurde die RNA erneut durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 4 °C und 14 000 rpm pelletiert, in 550 µl A. bidest. (DEPC) gelöst und photometrisch die Konzentration (s. 2.2.18) bestimmt. Zur Erhöhung des Reinheitsgrades wurde ein drittes Mal mit 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2 Volumen 100 % (v/v) Ethanol präzipitiert. Nach Sedimentation (15 Minuten, 4 °C, 14 000 rpm; Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) wurde die RNA mit eiskaltem 70 % (v/v) Ethanol, hergestellt mit A. bidest. (DEPC), gewaschen und anschließend in A. bidest. (DEPC) aufgenommen, wobei die Konzentration auf 2 µg µl⁻¹ eingestellt wurde. (Lagerung bei –70 °C).

2x NETS

NaCl	0,2	M
EDTA	2	mM
Tris-HCl (pH 7,5)	0,02	mM
SDS	1	% (w/v)
in A. dest.		

Phenol/NETS-Lösung

äquilibriertes Phenol und 2x NETS wurden im Verhältnis 1:1 (v/v) miteinander vermischt. Beim Erwärmen mischen sich die Phasen.

äquilibriertes Phenol

1x gewaschen mit 1 M Tris-HCl, pH 8,0

2x gewaschen mit 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0

Lagerung überschichtet mit 0,1 M Tris-HCl,
pH 8,0 bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ oder für kurze Zeit bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.2.16.3 PolyA⁺-RNA-Isolation aus Gesamt-RNA

Für einige Versuche wurde aus der Gesamt-RNA eines Ansatzes aufgereinigte PolyA⁺-RNA bzw. mRNA benötigt. Zur Aufreinigung wurden die Trennsysteme zweier Hersteller (Dynabeads[®] von Dynal, Hamburg, Deutschland und M-PVA OdT2 Magnetbeads von Chemagen, Baesweiler, Deutschland) nach deren Angaben verwendet. Die beiden Systemen zugrunde liegende Methode wurde 1994 von Aasheim et al. beschrieben.

Dem Verfahren liegt folgendes Prinzip zugrunde: an der Oberfläche von magnetischen Kugeln (beads) befinden sich kovalent gebunden kurze Ketten aus 25 bzw. 30 Desoxythymidin-Molekülen. Aufgrund ihres 3'-PolyA-Schwanzes kann die mRNA im Unterschied zu den übrigen RNA-Komponenten mit diesen Oligo-(dT)-Molekülen hybridisieren. Während ein Magnet die Kugeln mit der daran gebundenen mRNA zurückhält, können die übrigen ungebundenen RNA-Moleküle ausgewaschen werden. Danach wird die mRNA unter Niedrigsalzbedingungen und bei hoher Temperatur von den Kugeln eluiert.

Bei jedem Extraktionsschritt wurden 100 µg Gesamt-RNA eingesetzt, wobei die beads mehrfach zur Isolation der mRNA aus derselben Gesamt-RNA-Fraktion wiederverwendet worden sind.

Um die Konzentration der PolyA⁺-RNA zu erhöhen, wurden die Eluate der Extraktionsrunden vereinigt, photometrisch die Konzentration (s. 2.2.18) bestimmt und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat, pH 5,2 und 2 Volumen 100 % (v/v) Ethanol ü.N. bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ präzipitiert. Nach Sedimentation durch Zentrifugation für 60 Minuten bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 14 000 rpm (Tischzentrifuge Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland) wurden die pelletierten Nukleinsäuren mit eiskaltem 70 % (v/v) EtOH (DEPC) gewaschen und anschließend in A. bidest. (DEPC) aufgenommen, wobei die Konzentration auf $0,25\text{ }\mu\text{g }\mu\text{l}^{-1}$ eingestellt wurde. (Lagerung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.2.17 Agarosegelelektrophorese von RNA

RNA kann ebenso wie DNA in einem Agarosegel nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Wegen ihrer ausgeprägten Sekundärstruktur ist es allerdings notwendig, sie zunächst zu denaturieren. Die Auftrennung erfolgt unter denaturierenden Bedingungen in einem Formaldehyd-Agarosegel. Das Formaldehyd hemmt auch eventuell vorhandene RNasen. Detaillierte Informationen zur Methode wurden aus Sambrook et al. (1989) entnommen.

Für ein 100 ml Gel wurde 1,5 g Agarose in 85 ml A. dest. und 10 ml 10xMOPS-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und nach Abkühlung auf 65 °C mit 5,4 ml Formaldehyd versetzt. Das Gel wurde blasenfrei in die vorbereitete Gelkassette gegossen und nach dem Erstarren in die Elektrophoresekammer mit 1xMOPS als Laufpuffer eingesetzt.

Es wurden jeweils 10 µg RNA (mit DEPC-behandeltem A. bidest. auf gleiches Volumen eingestellt) mit dem 1,5-fachen Volumen RNA-Ladungspuffer versetzt, für 2 Minuten bei 100 °C im Heizblock denaturiert und auf Eis abgekühlt. Diese Proben wurden dann in die Probentaschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung fand bei einer Spannung von 80-90 V statt, bis der Farbmärker etwa 2/3 der Gellänge durchlaufen hatte. Einige Minuten nach Beginn der Auftrennung erfolgte die Entfernung der deutlich sichtbaren, zur Kathode laufenden Ethidiumbromidbanden mit einem Skalpell. Das Gel wurde nach dem Lauf in UV-Durchlicht ($\lambda=302\text{nm}$, UV-Transilluminator) mittels eines Polaroid-MP4+-Systems (Kema, Polaroid Corporation, Cambridge, USA) und unter Verwendung eines Polaroid Polaplan-Films fotografiert. Die Integrität der RNA konnte hierbei anhand der gut sichtbaren rRNA-Banden überprüft werden.

10xMOPS-Puffer

MOPS	200	mM
Natriumacetat	50	mM
EDTA	10	mM
in A. dest. auf pH 7,0 mit 1 N NaOH eingestellt		

RNA-Ladungspuffer (1,5 ml)

Formamid	720	µl
10xMOPS	160	µl
Formaldehyd 37 %	260	µl
steriles A. dest.	100	µl
Ethidiumbromid	100	µl
(10 mg/ml)		
steriles Glycerin	80	µl
Bromphenolblau	80	µl
(gesättigt)		
Lagerung bei -20 °C		

2.2.18 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei $\lambda=260$ nm. Außerdem konnte aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 nm die Reinheit der Nukleinsäuren ermittelt werden, da Proteine bei 280 nm ein Absorptionsmaximum zeigen. Je höher der Quotient, desto reiner die DNA oder RNA.

Berechnungsgrundlagen:

DNA

$A_{260\text{nm}}=1$ entspricht $[\text{dsDNA}]=50 \mu\text{g ml}^{-1}$

RNA

$A_{260\text{nm}}=1$ entspricht $[\text{RNA}]=40 \mu\text{g ml}^{-1}$

Je 1 μl DNA wurden in 200 μl A. bidest. verdünnt (RNA: 1 μl in 250 μl A. bidest.) und photometrisch gemessen. Die Konzentrationen der Ausgangslösungen in $\mu\text{g ml}^{-1}$ ergaben sich aus folgenden Formeln:

$$[\text{dsDNA}] = \frac{\text{gemessene } A_{260} \times 50 \mu\text{g ml}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

$$[\text{RNA}] = \frac{\text{gemessene } A_{260} \times 40 \mu\text{g ml}^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{1000}$$

2.2.19 Blotting von Nukleinsäuren

2.2.19.1 Northernblot

Die RNA wurde im Anschluss an die Elektrophorese (s. 2.2.17) mittels Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran (GeneScreen Plus, NEN™ Life Science Products, Köln, Deutschland) übertragen.

Zuerst wurde als Docht ein mit Blottingpuffer befeuchteter Streifen Blottingpapier (Gel-Blotting-Papier, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) auf einen in einem Pufferreservoir stehenden Kasten gelegt. Auf diesen Dochtstreifen wurden drei ebenfalls befeuchtete Stücke Blottingpapier luftblasenfrei aufgelegt. Das Gel wurde

mit der Oberseite nach unten aufgelegt, und die feuchte Membran wurde ebenfalls luftblasenfrei auf das Gel gebracht. Es folgten drei weitere Lagen feuchtes Blottingpapier und schließlich ein Stapel trockenes Saugpapier. Obenauf lag ein etwa 1 kg schweres Gewicht auf einer Glasplatte (zur besseren Gewichtsverteilung; Aufbau siehe Abb. 2.2). Als Blottingpuffer diente ein 25 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6,4. Der Kapillarblot erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Die RNA wurde nach kurzem Antrocknen der Membran durch UV-Crosslinking (Ultraviolett Crosslinker, Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland) kovalent an diese gebunden. Die Membran wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

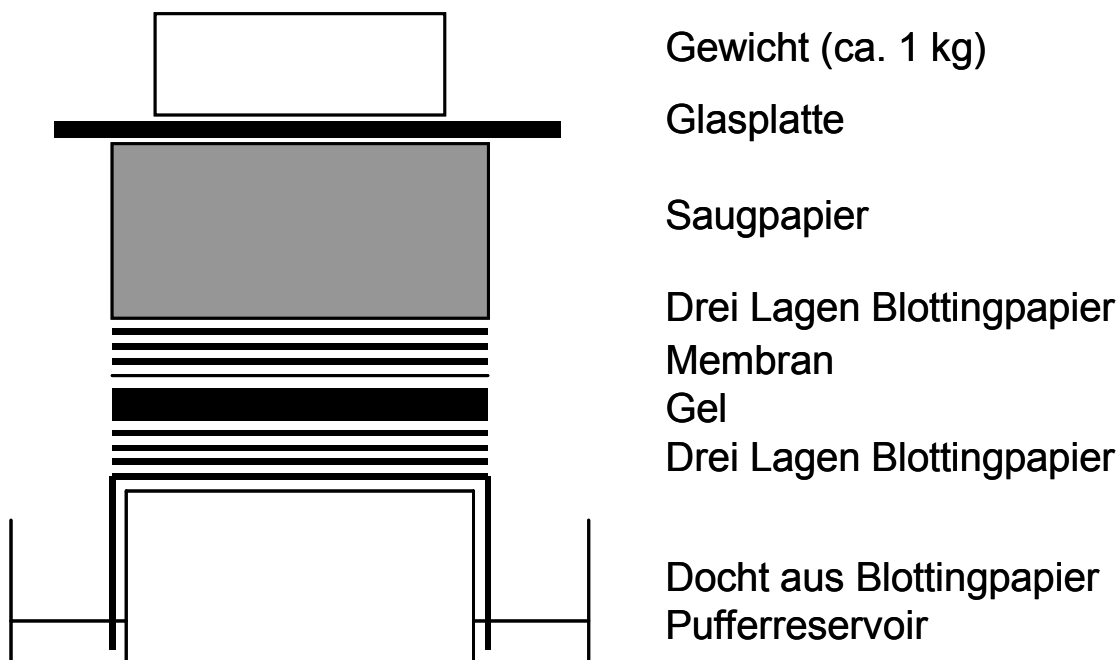


Abb. 2.2: Aufbau der Blotting-Apparatur

2.2.19.2 Southernblot

Für die Immobilisierung von elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennter DNA auf einer Nylonmembran wurde eine 1975 von Southern beschriebene Methode angewandt. Im Gegensatz zur RNA musste die DNA nach der Elektrophorese (s. 2.2.4) vor dem Blot auf eine Nylonmembran erst zu Einzelsträngen denaturiert werden, um eine spätere Hybridisierung mit einer Sonde zu ermöglichen. Außerdem können DNA-Fragmente >20 kb nicht durch den Flüssigkeitsstrom beim Kapillarblot transportiert werden. Durch eine Behandlung des Gels mit 250 mM HCl wurde die DNA daher zunächst depurinert, so dass es nach der Inkubation im alkalischen

Denaturierungspuffer zu Strangbrüchen und somit zur Fragmentverkürzung kam. Für die Southernanalyse wurde die verdaute DNA (s. 2.2.3.2) mit einer entsprechenden Menge DNA-Ladungspuffer versetzt und auf einem 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt (s. 2.2.4). Als Längenmarker diente ein λ /*Hind* III-Marker, als Kontrolle für die Hybridisierung der Gensonde mit der Ziel-DNA wurden 10 pg linearisierter Plasmid-DNA mit der cDNA des zu untersuchenden Gens aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel fotografiert und die Laufstrecken der Markerfragmente wurden notiert. Zur Depurinierung der DNA erfolgte eine 10-minütige Inkubation des Gels in 250 mM HCl auf dem Schüttler bis zur Gelbfärbung des Bromphenolblau-Markers. Dann wurde das Gel für 30 Minuten in Denaturierungspuffer und schließlich zweimal für 15 Minuten in Neutralisierungspuffer geschüttelt (pH des Puffers musste im Anschluss an die Prozedur unter pH 8,5 liegen). Die DNA wurde anschließend mittels Kapillarblot (s. 2.2.19.1) auf eine positiv geladene Nylonmembran (GeneScreen Plus, NEN™ Life Science Products, Köln, Deutschland) geblottet. Als Blotting-Puffer diente hier 20xSSC.

Denaturierungspuffer

NaOH	0,5 M
NaCl	1,5 M
in A. dest., autoklaviert	

Neutralisierungspuffer

Tris-HCl, pH 7,2	0,5 M
NaCl	1,5 M
EDTA	1 mM
in A. dest., autoklaviert	

Herstellung des λ /*Hind* III-Markers

λ -DNA (0,25 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	100 μl
10xRestriktionspuffer	50 μl
<i>Hind</i> III	10 μl
A. bidest. (steril)	340 μl
37 °C, über Nacht, dann 100 μl DNA-Ladungspuffer hinzugeben, Lagerung bei 4 °C, eingesetzt wurden 20 μl /Spur	

Fragmentgrößen des λ /*Hind* III-Markers

23130 bp
9416 bp
6557 bp
4361 bp
2322 bp
2027 bp
514 bp

20xSSC

Natriumcitrat 0,3 M
NaCl 3 M
in A. dest., pH 7,6, autoklaviert

2.2.20 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Northern- und Southernblots (s. 2.2.19.1 und 2.2.19.2) konnten mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert werden. Dabei kam es bei Northernblots zu DNA-RNA-Hybridisierungen und bei Southernblots zu DNA-DNA-Hybridisierungen (die radioaktiv markierte DNA-Sonde lagerte sich an komplementäre DNA- bzw. RNA-Sequenzen der geblohteten Nukleinsäuren). Nach der Entfernung unspezifisch gebundener Sonden-DNA durch Waschschrirte konnte zur Auswertung ein Röntgenfilm aufgelegt werden.

Zur Markierung der Sonden-DNA wurde das DecaLabel™DNA Labelling Kit von MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland und [α -³²P]-dCTP mit einer Konzentration von 3000 $\mu\text{Ci mmol}^{-1}$ der Firma Hartman Analytik, Braunschweig, Deutschland verwendet. Das DecaLabel™DNA Labelling Kit basiert auf der Methode der „random-primed synthesis“. Bei der Reaktion fungieren Decanukleotide als Primer für die Polymerasereaktion, bei der der komplementäre DNA-Strang vom 3'-Ende des Primers aus mit Hilfe der großen Untereinheit der DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment, exo⁻) synthetisiert wird. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers angesetzt, es wurde zum Teil mit einem halben Volumen des Reaktionsansatzes gearbeitet. Die Reaktionsansätze wurden vor Verwendung durch Zugabe von A. dest. auf ein Volumen von 330 μl gebracht. Von dieser Verdünnung wurden nach Hitzedenaturierung der Sonden-DNA 100-150 μl für die Hybridisierung eingesetzt.

Um die Einbaurate radioaktiver Nukleotide zu bestimmen, erfolgte gegebenenfalls eine Trennung der Sonden von nicht eingebauten Nukleotiden über NICK®-Columns (Sephadex® G-50, DNA Grade, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland). Hierzu wurde der unverdünnte Reaktionsansatz zusammen mit 400 μl TE-Puffer auf die vorher mit 1-2 ml TE-Puffer äquiliбриerte Säule gegeben. Dann folgte die Elution der großen Fragmente mit 400 μl TE-Puffer. Anschließend konnte man über vergleichende Messung der Säule und des Eluats (Sonde) mit einem β -Counter die Einbaurate der radioaktiven Nukleotide abschätzen.

2.2.21 Prähybridisierung, Hybridisierung, Waschen und Exposition der Northern- und Southernblots (radioaktiv)

Vor der eigentlichen Hybridisierung erfolgte eine Prähybridisierung der Northern- und Southernblots (s. 2.2.19.1 und 2.2.19.2), bei der unspezifische Bindungsstellen auf der Membran mit nicht markierter DNA, z. B. Heringssperma-DNA, abgesättigt wurden.

Für die Hybridisierung und die Waschschritte gilt: je höher die Temperatur bzw. je niedriger der Salzgehalt eines Waschpuffers, desto stringenter sind die Bedingungen. Wenn nicht anders angegeben, wurde wie folgt vorgegangen:

Die Membranen wurden mit der Nukleinsäureseite nach oben in Hybridisierungsröhren mit 10 ml Hybridisierungslösung und 100 µl denaturierter Heringssperma-DNA/10 ml Lösung für mindestens 30 Minuten meist bei 68 °C im Rotationsofen (Hybridization Oven/Shaker, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) prähybridisiert. Bei Hybridisierungstemperaturen unter 60 °C wurde als Hybridisierungslösung 5xDenhardts, verdünnt aus 50xDenhardts mit 6xSSC, 1 % (w/v) SDS, verwendet. Nach der Prähybridisierung wurden 100-150 µl der radioaktiv markierten Sonde zum Ansatz hinzugegeben, welche zuvor für 5 Minuten bei 100 °C im Wasserbad denaturiert und auf Eis abgekühlt wurde.

Die Hybridisierung erfolgte bei der für die entsprechende Sonde optimalen Temperatur (meist 68 °C) über Nacht im Rotationsofen. Am nächsten Tag wurden die Membranen bei der Hybridisierungstemperatur zweimal für etwa 30 sec mit 6xSSC, 1 % (w/v) SDS, zweimal für 30 Minuten mit 2xSSC, 0,1 % (w/v) SDS, einmal für 30 Minuten mit 0,2xSSC, 0,1 % (w/v) SDS, sowie einmal für 30 sec bei Raumtemperatur mit 0,2xSSC zur Entfernung des SDS, gewaschen. Anschließend wurden die Membranen in Saranfolie eingepackt und in eine Bleikassette zwischen zwei Verstärkungs-Screens (Intensifying Screens, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) gelegt. Ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) wurde zwischen die Verstärkungs-Screens auf die Membranoberseiten gelegt. Die Exposition erfolgte bei -70 °C.

Bereits hybridisierte Blots konnten mit einer weiteren Sonde zu einem anderen Zeitpunkt erneut hybridisiert werden. Zur Entfernung der alten Sonden-DNA wurden diese für einige Minuten in 0,1 % (w/v) SDS gekocht. Mit Hilfe des β -Counters wurde die erfolgreiche Ablösung der radioaktiv markierten Sonden von der Membran überprüft. Die Lagerung der Membranen (verpackt in Saranfolie) erfolgte bis zur Wiederverwendung bei -20 °C.

Hybridisierungslösung

Dextransulfat	9	% (w/v)
NaCl	1	M
SDS	0,8	% (w/v)
in A. dest., bis zur Homogenität auf 65 °C erhitzt, portioniert, Lagerung bei –20 °C		

Heringssperma-DNA

Heringssperma-DNA	10	mg ml ⁻¹
-------------------	----	---------------------

Waschlösungen

6xSSC, 1 % (w/v) SDS
2xSSC, 0,1 % (w/v) SDS
0,2xSSC, 0,1 % (w/v) SDS
0,2xSSC
hergestellt aus 20xSSC –Stammlösung und 10 % (w/v) SDS-Stammlösung

50xDenhardts

Ficoll	1,0	% (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	1,0	% (w/v)
Rinderserumalbumin	1,0	% (w/v)
sterilfiltriert, portioniert und bei –20 °C gelagert		

2.2.22 Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschschrte bei Verwendung von Dig-markierten Sonden

Für die Hybridisierung der Gersten-RNA wurde eine nicht-radioaktiv gelabelte *HvPR1b*-Sonde verwendet. Die Sondenmarkierung fand hierbei mittels des Dig- Labelling-Systems (Roche, Mannheim, Deutschland) statt, welches auf dem Einbau Digoxigenin-markierter Nukleotide in die Sequenz der Sonden-RNA basiert. Die auf diese Weise markierte Sonde *HvPR1b* wurde mir freundlicherweise von Dr. Birgit Jarosch (Institut für Pflanzenphysiologie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

Zur Hybridisierung wurden die Membranen mit der Nukleinsäureseite nach oben in die Hybridisierungsröhre eingeführt, je 5 ml Dig-Easy-Hyb-Hybridisierungspuffer hinzugegeben und mindestens 1 h bei 68 °C im Rotationsofen prähybridisiert. Anschließend wurden 5 µl der für 5 Minuten bei 100 °C denaturierten Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü.N. bei 68 °C im Rotationsofen. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sondenmoleküle wurden die Membranen zweimal kurz in 2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gespült und dreimal unter Schütteln für je 20 Minuten mit 0,2 xSSC, 0,1 % (w/v) SDS bei Hybridisierungstemperatur gewaschen. Um die Effizienz des Waschens zu erhöhen, fanden alle Waschschrte in einer Schale statt, in der die Membranen frei im Waschpuffer flotieren konnten.

2.2.23 Immunodetektion von Dig-markierten Sonden

Die nun folgenden, der Immunodetektion dienenden Schritte wurden alle bei Raumtemperatur und unter Schütteln ausgeführt. Zunächst wurden die Membranen 1 Minute in 1x Waschpuffer äquilibriert. Freie Bindungsstellen auf der Membran wurden durch 60-minütige Inkubation in 1x Blocking-Reagenz abgesättigt. Dieser Lösung wurde der gegen Digoxigenin gerichtete Antikörper (anti-Digoxigenin-AP Fab Fragments, Roche, Mannheim, Deutschland) im Verhältnis 1 : 10 000 zugesetzt und die Membranen für eine weitere Stunde darin inkubiert. Um überschüssige Antikörpermoleküle auszuwaschen, wurden die Membranen anschließend dreimal für 20 Minuten mit 1x Waschpuffer mit 0,3 % Tween 20 gewaschen.

Zur Äquilibration wurden die Membranen bis zur Zugabe des Substrats in 1x Substratpuffer gelagert. Die Membranen wurden auf eine hitzeunbeständige Overheadfolie gelegt, mit etwa 1 ml Detektionslösung beträufelt, eine zweite Folie wurde aufgelegt und die Membran luftblasenfrei mit einem Folienschweißgerät eingeschweißt. Die Detektion erfolgte durch Exposition eines Röntgenfilms für etwa 15 Minuten bei 37 °C. Der Nachweis der gebundenen Sonde erfolgt über die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die an den oben beschriebenen Antikörper gekoppelt ist und bei der Umsetzung des Substrats zu Lichtemission führt.

10x Waschpuffer

Maleinsäure	1	M
NaCl	1,5	M
in A. dest., pH-Wert mit NaOH-Plättchen		
und 1-10 N NaOH auf 7,0 eingestellt,		
autoklaviert		

10x Substratpuffer

Tris	1	M
NaCl	1,5	M
in A. dest., pH-Wert mit 4 N HCl auf		
9,5 eingestellt, autoklaviert		

10x Blockingreagenz

Blockingpulver	10	% (w/v)
in 1x Waschpuffer, autoklaviert		

Detektionsreagenz

CPD-Star-ready to use

2.2.24 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die PCR („Polymerase Chain Reaction“) basiert auf den Protokollen von Saiki et al. (1985), Mullis et al. (1986) und Mullis and Faloona (1987). Mit Hilfe dieser Methode

ist es möglich, von Abschnitten bekannter Basenabfolge flankierte DNA-Fragmente selektiv zu amplifizieren. Die PCR ist eine dreistufige thermozyklische Reaktion und beginnt mit einem Denaturierungsschritt, bei dem durch hohe Temperatur die beiden Stränge der DNA-Doppelhelix des sogenannten „Templates“ voneinander getrennt werden. Im anschließenden Anlagerungsschritt wird die Temperatur soweit gesenkt, dass kurze Oligonukleotide (Primer) mit den entstandenen Einzelsträngen des Templates hybridisieren können. Die Anlagerungstemperaturen hängen von den verwendeten Oligonukleotiden ab. Um möglichst stringente Bedingungen für eine Hybridisierung zu erreichen, wurde für den Anlagerungsschritt in der Regel eine Temperatur etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur (T_m) der jeweiligen Primer verwendet. Diese Schmelztemperatur ist abhängig von Länge und GC-Gehalt der Oligonukleotide. Zusätzlich beeinflusst auch die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen, welche als Cofaktoren der Taq-Polymerase dienen, die Spezifität der Amplifikationsreaktion. Die Taq-Polymerase ist ohne eine gewisse Menge freien Magnesiums im Reaktionsansatz inaktiv. Wählt man aber eine zu hohe Magnesiumkonzentration, so führt dies zur vermehrten Bildung unspezifischer Nebenprodukte in der Reaktion, was damit begründet wird, dass die Erhöhung der Magnesiumkonzentration zu einer Erniedrigung der Schmelztemperatur sowohl des DNA-Doppelstranges als auch des Primer-Template-Komplexes führt.

Die Primer sind im Allgemeinen so gestaltet, dass ihre Basensequenz komplementär zu den flankierenden Abschnitten der zu amplifizierenden DNA ist, sowie ihre freien 3'-OH-Enden in die Richtung des zu amplifizierenden DNA-Fragments zeigen. Die 3'-OH-Enden liefern den Startpunkt für die Taq-Polymerase, die im nachfolgenden Syntheseschritt unter Anlagerung freier dNTPs die DNA zu einem Doppelstrang vervollständigt. Die Temperatur des Syntheseschritts liegt bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der verwendeten Taq-Polymerase. Durch Wiederholung dieser drei Schritte - Denaturierung, Anlagerung und Synthese - wird das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment exponentiell vermehrt.

2.2.25 Sequenzierung

Sequenzierarbeiten wurden durch die Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland durchgeführt.

2.2.26 Transiente Transformation von Pflanzen mit *Agrobacterium*

Für die transiente Transformation von Blättern oder Blattfragmenten unterschiedlicher Pflanzenspezies wurde eine Methode in Anlehnung an den von Kapila et al. (1997) beschriebenen Ansatz zur transienten Transformation von intakten Blättern angewandt.

Für den Assay wurde zunächst eine 3 ml-Übernachtskultur des Agrobakterien-Stammes LBA 4404 mit einem entsprechenden Vektor in YEB-Medium mit Antibiotika bei 28 °C auf dem Schüttler angezogen. Am nächsten Tag wurde mit 2 ml aus dieser Vorkultur die Hauptkultur (500 ml Erlenmeyerkolben: 50 ml YEB-Medium mit Antibiotika, sowie 20 µg ml⁻¹ Acetosyringon, pH 5,8 mit MES [Endkonzentration 10 mM]) angeimpft. Diese wurde über Nacht bei 28 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 3500 rpm (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland). Das Bakterienpellet wurde in Infiltrationsmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 2,0 resuspendiert. Diese Suspension wurde vor der Infiltration für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert.

Das Pflanzenmaterial (Blätter von Reis, Radieschen und *Arabidopsis thaliana*) wurde für etwa eine Stunde in 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,2 mit 0,05 % (v/v) Silwet L-77 gewaschen. Blattstücke wurden anschließend in einem Exsikkator unter Vakuum mit der Agrobakterienlösung infiltriert und dann in Petrischalen mit angefeuchtetem Filterpapier auf sterile Zahnstocher oder auf Kinetin-Wasser-Agar ausgelegt.

Intakte Reisblätter konnten an der Pflanze mit Hilfe einer Zange („hagborg device“) und intakte Radieschenblätter durch vorsichtiges Einspritzen der Suspension mit einer an der Blattunterseite aufgesetzten Spritze ohne Kanüle infiltriert werden.

Infiltrationsmedium

M&S-Salze	
Saccharose	2 % (w/v)
Acetosyringon	400 µg ml ⁻¹
MES, pH 5,8	10 mM
in A. dest.	

Kinetinstammlösung

5 mg Kinetin in 100 µl 1N NaOH vorlösen
 +1900 µl A. bidest.
 Lagerung bei -20 °C

Kinetin-Wasser-Agar

Agar 10 g l⁻¹
in A.dest., autoklaviert
Kinetin 1 mg l⁻¹
nach Abkühlung auf 65 °C aus
Kinetinstammlösung zugefügt

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinextraktion

2.3.1.1 Proteinextraktion aus *E. coli*

Für die biochemischen Analysen des RC11-Proteins wurde die *RC11*-cDNA, bzw. entsprechende Deletionskonstrukte von *RC11*, in den bakteriellen Expressionsvektor pDS 56/RBSII, *SphI* (Stüber et al., 1990) hinter einen IPTG (Isopropylthiogalactosid)-induzierbaren Promotor aus dem *lac*-Operon kloniert. Dieser Vektor wurde in kompetente *E. coli* M15-Zellen (s. 2.2.10) transformiert (s. 2.2.11) welche das Repressorplasmid pREP 4 enthalten, auf dem der Repressor für das *lac*-Operon codiert ist. Der Repressor wirkt in *trans*, das heißt, dass das Genprodukt des Repressorgens seine Wirkung an einem räumlich getrennten Ort im Genom entfalten kann (diffusionsfähiger Faktor). Der Repressor verhindert bis zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe die Expression des Targetproteins. Nach Zugabe von IPTG wird der Repressor inaktiv, somit wird die Expression des Zielproteins induziert.

Für die Expression wurden jeweils zwei 250 ml-Kulturen mit *E. coli* M15-Zellen, welche die zu untersuchenden Konstrukte im Expressionsvektor pDS 56/RBS II, *SphI* enthielten, in LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika bei 37 °C und 220 rpm auf einem Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,8 angezogen. Danach erfolgte die Induktion der Expression des rekombinanten Proteins in jeweils einem der Parallelansätze durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration, aus 100 mM IPTG-Stammlösung). Die Ansätze wurden über Nacht bei 19 °C und 220 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Dann wurden die Kulturen in 250 ml-Zentrifugengefäße überführt und bei 16 °C und 3500 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Die resultierenden Pellets wurden in je 5 ml 0,5 M Na-Phosphat Puffer pH 7,0 resuspendiert, in ein 50 ml-Falcongefäß überführt und mit 500 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in 0,5 M Na-Phosphat Puffer, pH 7,0) versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation zum Zellaufschluss für 30 Minuten auf Eis. Danach wurde die Suspension auf Eis für

6x10 Sekunden mit 40 Watt Leistung bei einer Pulsdauer 0,5 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Nadelschwingsonde, Labsonic U, B.Braun Diessel Biotech, Hildesheim, Deutschland). Die Proben wurden in 50 ml-Zentrifugegefäße gegeben und bei 10000 g und 4 °C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand konnte abgezogen und als Enzymextrakt verwendet werden.

2.3.1.2 Proteinextraktion aus Reisblättern

Pro Behandlung wurden drei Parallelproben aus je zwei Reisblättern (4 cm lang) genommen. Diese konnten in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Verarbeitung bei -70 °C gelagert werden. Die Aufarbeitung erfolgte auf Eis, dabei wurden die Blätter zunächst in 1 ml 0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,5 mit Quarz und 20 mg Polyvinylpolypyrrolidon (Phenolfänger, Sigma, Darmstadt, Deutschland) gemörsert und in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt. Der Mörser wurde mit einem weiteren ml 0,1 M KH_2PO_4 , pH 7,5 ausgespült, und die Flüssigkeit wurde ebenfalls in das Reaktionsgefäß gegeben. Dann folgte eine Zentrifugation für 8 min bei 14000 rpm und 4 °C (Tischzentrifuge Typ 5417 R, Eppendorf, Oldenburg, Deutschland). Vom Überstand wurde sofort 1 ml in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und bei der photometrischen Messung als Enzymlösung eingesetzt.

2.3.2 LOX-Messung der Proteinextrakte aus *E. coli* oder Reisblättern

Lipoxygenasen katalysieren die Bildung von Fettsäurehydroperoxiden aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie z. B. Linolsäure. Die entstehenden Fettsäurehydroperoxide besitzen ein konjugiertes Doppelbindungssystem, welches Licht der Wellenlänge 234 nm (UV-Bereich) absorbiert. Die Extinktionsänderung im Vergleich zum Substrat kann spektrophotometrisch gemessen werden. Der molare Extinktionskoeffizient der Fettsäurehydroperoxide beträgt $2,5 \times 10^7 \text{ cm}^2 \text{ mol}^{-1}$ (Kühn et al., 1985). Die photometrische Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität basiert auf einer Methode von Axelrod et al. (1981).

Für die Messung der LOX-Enzymaktivität aus Bakterienextrakten wurden Halbmikroquarzküvetten mit 5-20 μl Enzymextrakt (der lineare Bereich der Extinktionsänderung musste empirisch ermittelt werden) beschickt. Danach wurden 1000 μl 100 mM Tris-HCl Puffer pH 8,8 (temperiert auf 30 °C) zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 μl Linolsäure-Substratlösung gestartet. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 8-10 Minuten bei 234 nm in einem auf

30 °C temperierten 6-fach-Küvettenwechsler (Dioden-Array-Photometer DU 7500, Beckman).

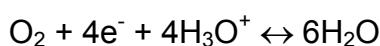
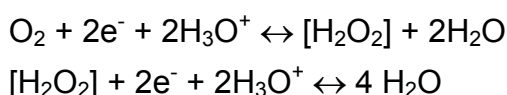
Linolsäuresubstratlösung

Linolsäure	0,08	% (v/v)
Tween 20	0,15	% (v/v)
Na ₂ HPO ₄ , pH 9,0	0,05	M
pH 9,0 mit NaOH eingestellt, aliquotiert und mit N ₂ begast		

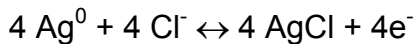
2.3.3 Polarographische Messung der Lipoxygenaseaktivität

Für die polarographische Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität wurde eine Methode in Anlehnung an Grossmann and Zakut (1979) verwendet. Lipoxygenasen können mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit *cis*, *cis*-1,4-Pentadienstruktur oxidieren, wobei sowohl freie Fettsäuren als auch in Membranlipiden veresterte Fettsäuren (Brash et al., 1987; Maccarone et al., 1994) je nach Lipoxygenasespezies als Substrate dienen können.

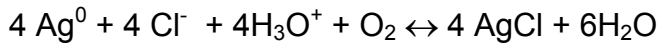
Die Messungen zur Substratspezifität der Lipoxygenase RCI1 wurde mittels einer Sauerstoffelektrode (Rank Brothers, Cambridge, England) durchgeführt. Das Messprinzip beruht darauf, dass bei der Lipoxygenase-katalysierten Fettsäureoxidation molekularer Sauerstoff in das jeweilige Substrat eingebaut wird. Die bei Umsatz des Substrates im Messansatz abnehmende Sauerstoffkonzentration kann mit Hilfe der Sauerstoffelektrode verfolgt werden. Die Elektrode besteht aus einer Platinkathode und zwei Silberanoden. Diese drei Einheiten tauchen in einen Tropfen einer halbgesättigten KCl-Elektrolytlösung und sind durch eine Teflonmembran von der Probenlösung in der Messkammer der Elektrode getrennt. Diese wirkt selektierend, molekularer Sauerstoff kann die Membran durchdringen und gelangt so an die Platinkathode. Wenn ein Polarisationspotential von 0,8 V anliegt, reagiert der Sauerstoff wie folgt an der Kathode:



An der Anode läuft folgende Reaktion ab:



Die Gesamtreaktion lautet somit:



Der Stromfluss ist damit der Diffusion des Sauerstoffs durch die Teflonmembran proportional und hängt von der Temperatur der Membran, sowie dem Partialdruck des Sauerstoffs in der Messkammer ab. Zur Aufzeichnung der Messung war an die Elektrode ein Zweikanalschreiber (LKB 2210, Pharmacia) angeschlossen.

Für die Messung wurde die Elektrode zunächst geeicht wie bei Vander (1990) beschrieben. Dann wurde 1 ml luftgesättigter Messpuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,8) mit 10 - 100 µl Substratlösung und 0,5 nkat rekombinantem RC1 1-Protein bei 30 °C in der Probenkammer inkubiert. Die Aktivität von RC1 wurde wie bei Bohland (1997) beschrieben errechnet. Als Substrat diente folgende Lösung:

Phosphatidylcholindilinoeoyllösung

Phosphatidylcholindilinoeoyl (Sigma) 10 % (w/v)
in MeOH

ggf. zum Erhalt unterschiedlicher Micellen mit 0,1 % (w/v) SDS oder 100 µM Deoxycholin versetzt

ggf. 3x30 sec mit Ultraschall (Labsonic U, B.Braun Diessel Biotech, Hildesheim, Deutschland) behandelt

2.3.4 Bestimmung der Positionsspezifität der LOX

Die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreiteten Lipoxygenasen gehören zur Familie der nicht-Häm-Eisen-haltigen Dioxygenasen, welche die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit *cis,cis*-1,4-Pentadienstruktur katalysieren. Die typischen Substrate in Höheren Pflanzen sind Linol- und Linolensäure. Hierbei kommt es letztendlich zur Bildung von ungesättigten Fettsäurehydroperoxiden (Hildebrand, 1989). Pflanzliche Lipoxygenasen können unter anderem bezüglich ihrer Positionsspezifität bei der Oxygenierung von Linolsäure klassifiziert werden. Je nach Ort der Oxygenierung spricht man hier von 9- oder 13-Lipoxygenasen (s. Abb. 2.3). Abhängig von der Positionsspezifität des LOX-Enzyms werden unterschiedliche

Vorstufen in verschiedene Endprodukte, wie zum Beispiel Jasmonsäure, metabolisiert.

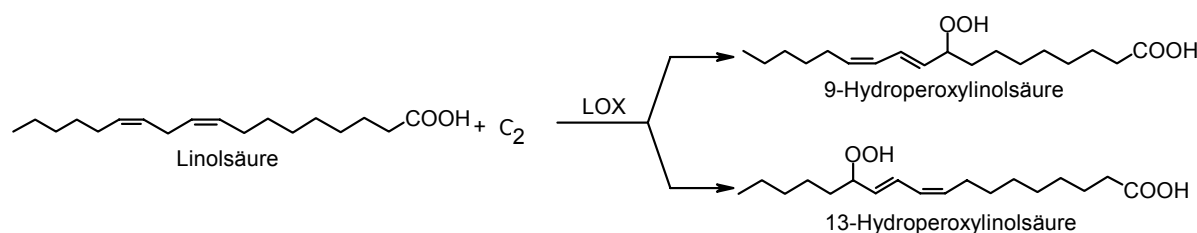


Abb. 2.3: Mögliche von Lipoxygenasen katalysierte Reaktionen mit Linolsäure als Substrat (in Anlehnung an Siedow, 1991)

Für die Analyse der Positionsspezifität der Lipoxygenase wurden 10 μ l Linolensäure bzw. 300 μ l Linolensäure-Substratlösung mit 10 μ l EtOH und 20 μ l A. bidest. gemischt. Hierzu wurde sauerstoffgesättigter 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,8 bis zu einem Gesamtvolumen von 2 ml gegeben. Durch die Zugabe von je 100 μ l LOX-aktiver Fraktion (Enzymextrakt) wurde die Reaktion gestartet. In einen als Autokatalyse bezeichneten Ansatz wurden zur Kontrolle statt des Enzymextraktes 100 μ l Tris-HCl-Puffer gegeben. Die Umsetzungsreaktion erfolgte für 20 Minuten bei 30 °C unter Rühren im Wasserbad. Anschließend wurden die Produkte durch 2-minütiges Ausschütteln mit jeweils 1 ml Chloroform extrahiert. Vor der HPLC-Analyse wurde die Chloroformphase noch mit 1 ml A. bidest. gewaschen.

Die Analyse der Produkte erfolgte durch sp-HPLC über eine Kieselgel-Säule (Suprasphere-Si, 4 μ m Partikelgröße, 4,6x 125 mm, CS-Chromatographie Service, Langerwehe, Deutschland) auf einer Milton Roy-Anlage (CM4000/SM4000, Milton Roy, Ivyland, USA). Die Elutionbedingungen waren isokratisch bei einer Flussrate von 1 ml min^{-1} (Laufmittel : n-Hexan/ Isopropanol/ Acetonitril/ Eisessig im Verhältnis 98,3/1,5/0,1/0,1). Das Laufmittel wurde vor Beginn ca. 10 Minuten mit Helium begast.

2.3.5 Expression eines RCI1-GST-Fusionsproteins in *E. coli* BL21 unter Verwendung des Vektors pGEX4T-3

Das Glutathion S-Transferase (GST)-System ist ein integriertes System zur Expression, Aufreinigung und Detektion von Fusionsproteinen in *E. coli*. Der hier verwendete pGEX-Vektor (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) erlaubt eine induzierbare starke Expression von Genen oder Genfragmenten in Fusion mit dem *Schistosoma japonicum* GST. Die so erhaltenen Fusionsproteine können nach Aufreinigung zur Immunisierung von Tieren, das heißt zur Herstellung von Antikörpern gegen das Fusionsprotein, verwendet werden. In dieser Arbeit wurde

eine Fusion aus GST und dem für die Aminosäuren 205 bis 262 codierenden Bereich von *RC11* hergestellt (s. 3.9). Das aufgereinigte Fusionsprotein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens und folgende Antiserengewinnung durch die Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland verwendet.

Zur Expression des GST-Fusionsproteins in *E. coli* BL21 wurden 500 ml LB-Medium mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin bei 37°C und 220 rpm auf einem Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,7-0,9 angezogen. Nach Entnahme von 0,5 ml der Kultur als Kontrolle wurden zur Induktion der Expression des Fusionsproteins 1 mM IPTG (Endkonzentration) zugesetzt. Die Bakterien des Kontrollaliquots wurden pelletiert und das Pellet anschließend in 15 μl SDS-Probenpuffer (s. 2.3.7) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Expressionskultur wurde für eine weitere Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis gesetzt und eine weitere Kontrolle wie beschrieben entnommen. Die Zellen der Expressionskultur wurden durch eine Zentrifugation für 10 Minuten und 4000 rpm bei 4°C (J-21C, Rotor JA-14, Beckman, München, Deutschland) geerntet. Das Pellet wurde auf Eis in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und im Eisbad zum Zellaufschluss für 4 Minuten bei 40 Watt und einer Pulsdauer von 0,5 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Labsonic U, Braun Diessel Biotech, Hildesheim, Deutschland). Die Zelltrümmer wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C und 18000 rpm (J-21C, Rotor JA-20, Beckman, München, Deutschland) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 μl als Kontrolle abgenommen, mit 10 μl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wurde zu 600 μl 50 %- Glutathion Sepharose 4B-beads (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gegeben. Diese wurden wie folgt vorbereitet: 530 μl 75 %- Glutathion Sepharose-beads wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) pelletiert, einmal mit 4 ml kaltem 1xTBS (s. 2.3.12) gewaschen und anschließend in 400 μl kaltem 1xTBS aufgenommen. Die Inkubation des Bakterienlysates mit den Glutathion Sepharose-beads zur Bindung des Fusionsproteins erfolgte über Nacht bei 8°C in einem e/o/e-Inkubator. Dann wurden die beads durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C separiert. Vom Überstand wurden 15 μl als Kontrolle entnommen, mit 5 μl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die beads wurden zweimal mit je 25 ml Lysispuffer gewaschen, in 25 ml Lysispuffer aufgenommen und auf eine $0,8 \times 4$ cm Polyprep Chromatographiesäule (BioRad, München, Deutschland) gegeben. Danach wurden die beads auf der Säule einmal mit 40 ml Puffer B gewaschen, wobei restlicher Puffer durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C von der Säule entfernt wurde. Anschließend wurde die Auslassöffnung der Säule mit einem Stopfen verschlossen und die beads wurden für 10 Minuten bei Raumtemperatur mit Glutathionpuffer bedeckt inkubiert. Das Eluat

wurde durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4 °C geerntet. Es wurde 1 µl des Eluats als Kontrolle entnommen, mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Elutionsschritte wurden wie beschrieben wiederholt, wobei die Eluate nicht zusammengegeben wurden. Die Kontrollen wurden mittels SDS-PAGE (s. 2.3.7) und anschließender Coomassie-Färbung (s. 2.3.10) analysiert. Der Proteingehalt des Eluats wurde bestimmt (s. 2.3.8). Aliquots des Eluats wurden zur Immunisierung eines Kaninchens an die Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland geschickt.

Lysispuffer

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
NaCl	300	mM
DTT	1	mM
EDTA	1	mM
Triton X-100	1	% (v/v)
Pepstatin A	5	µg ml ⁻¹
Leustatin	5	µg ml ⁻¹
in A. dest., Proteaseinhibitoren vor Gebrauch frisch zugesetzt		

Pepstatin A-Stammlösung

Pepstatin A	5	mg ml ⁻¹
in MeOH, aliquotieren,		
Lagerung bei 4 °C		

IPTG-Stammlösung

IPTG	100	mM
in A. dest., sterilfiltrieren, aliquotieren,		
Lagerung bei -20 °C		

Leustatin-Stammlösung

Leustatin	5	mg ml ⁻¹
in A. bidest., aliquotieren,		
Lagerung bei -20 °C		

Glutathionpuffer

Glutathion (red.)	10	mM
Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
in A. dest.		

Puffer B

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
NaCl	150	mM
in A. dest.		

2.3.6 Aufreinigung eines rekombinanten Peptids aus einem GST-Fusionsprotein durch Expression in *E. coli* BL21 unter Verwendung des Vektors pGEX4T-3

Es musste überprüft werden, ob das durch Immunisierung von Kaninchen mit dem Fusionsprotein erhaltene Antikörperserum (s. 2.3.5) auch gegen das anfusionierte Peptid oder nur gegen den GST- Anteil des Fusionsproteins gerichtet ist. Hierzu konnte nach Expression des Fusionsproteins das RCI1-Peptid vom GST-Anteil durch Thrombinverdau abgetrennt werden. In einer Westernanalyse (s. 2.3.11 bis 2.3.13) war es dann möglich, die Erkennung des Peptids durch die Antikörper zu testen.

Zur Aufreinigung des Peptids wurden 500 ml LB-Medium mit $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin bei 37°C und 220 rpm auf einem Schüttler bis zu einer OD_{600} von 0,7-0,9 angezogen. Nach Entnahme von 0,5 ml der Kultur als Kontrolle wurden zur Induktion der Expression des Fusionsproteins 1mM IPTG (Endkonzentration) zugesetzt. Die Bakterien des Kontrollaliquots wurden pelletiert und das Pellet anschließend in 15 μl SDS-Probenpuffer (s.2.3.7) aufgenommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Expressionskultur wurde für eine weitere Stunde bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf Eis gesetzt und eine weitere Kontrolle wie beschrieben entnommen. Die Zellen der Expressionskultur wurden durch eine Zentrifugation für 10 Minuten und 4000 rpm bei 4°C (J-21C, Rotor JA-14, Beckman, München, Deutschland) geerntet. Das Pellet wurde auf Eis in 10 ml Lysispuffer resuspendiert und im Eisbad zum Zellaufschluss für 4 Minuten bei 40 Watt und einer Pulsdauer von 0,5 Sekunden mit Ultraschall behandelt (Labsonic U, Braun Diessel Biotech, Hildesheim, Deutschland). Die Zelltrümmer wurden anschließend für 30 Minuten bei 4°C und 18000 rpm (J-21C, Rotor JA-20, Beckman, München, Deutschland) abzentrifugiert. Vom Überstand wurden 5 μl als Kontrolle abgenommen, mit 10 μl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der restliche Überstand wurde zu 600 μl 50 %-Glutathion Sepharose 4B-beads (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) gegeben. Diese wurden wie folgt vorbereitet: 530 μl 75 %- Glutathion Sepharose-beads wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C (Megafuge 1.0R, Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland) pelletiert, einmal mit 4 ml kaltem 1xTBS (s. 2.3.12) gewaschen und anschließend in 400 μl kaltem 1xTBS aufgenommen. Die Inkubation des Bakterienlysates mit den Glutathion Sepharose-beads zur Bindung des Fusionsproteins erfolgte über Nacht bei 8°C in einem e/o/e-Inkubator. Dann wurden die beads durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 1500 rpm und 4°C separiert. Vom Überstand wurden 15 μl als Kontrolle entnommen, mit 5 μl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die beads wurden dreimal mit je 25 ml Lysispuffer und dreimal mit je 15 ml

Puffer B⁺ gewaschen. Dann wurden sie in 0,5 ml Puffer B⁺ aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgte eine Inkubation mit 10 U Thrombin bei 8 °C über Nacht in einem e/o/e-Inkubator zur Spaltung des Peptids vom GST. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 3000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es wurde 1 µl des Überstands als Kontrolle entnommen, mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C gelagert. Die Kontrollen wurden mittels SDS-PAGE (2.3.7) und anschließender Coomassie-Färbung (s.2.3.10) analysiert.

Puffer B⁺

Tris-HCl, pH 8,0	50	mM
NaCl	150	mM
CaCl ₂	2,5	mM

2.3.7 SDS-PAGE

Die Methode der SDS-PAGE erlaubt eine Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Durch Erhitzung unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen werden Sekundärstrukturen der Proteinmoleküle aufgehoben. Es erfolgt eine Beladung der linearisierten Moleküle mit dem Detergenz SDS, woraus eine der Molekülgröße proportionale negative Ladung der Polypeptidketten resultiert. Diese können dann elektrophoretisch in einer Gelmatrix aufgetrennt werden, da sie in Richtung der positiven Elektrode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit der unterschiedlich langen Peptidketten wird dabei von der Dichte der Gelmatrix beeinflusst. Bei dieser Methode finden Polyacrylamid-Gele Verwendung. Polyacrylamid besteht aus den beiden Monomeren Acrylamid und N-N-Methylen-bisacrylamid, die durch einen Radikalkettenmechanismus miteinander vernetzt werden. Durch das Verhältnis von Acrylamid zu N-N-Methylenbisacrylamid, welches als Quervernetzer fungiert, kann die Porengröße des Gels eingestellt werden. Die Vernetzungsreaktion wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (APS), welches in wässriger Lösung freie Radikale bildet, gestartet und durch Zusatz von TEMED katalysiert.

Tab 2.6 : Separationsbereiche von SDS-Gelen in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration (nach Sambrook et al., 1989)

Acrylamid-Konzentration im Trenngel [%]	Separationsbereich [kDa]
15,0	12 -43
12,0	15 -50
10,0	16 -68
7,5	36 -94
5,0	57-212

Für die SDS-PAGE wurde das Mini PROTEAN II-System von BioRad, München, Deutschland verwendet. Die Gelkassetten wurden nach gründlicher Reinigung staubfrei nach Herstellerangaben zusammengebaut. Dann wurde die Trenngellösung in der gewünschten Konzentration vorbereitet. Hierzu wurden die entsprechenden Volumina an Acrylamid-/Bisacrylymid-Stammlösung, Trenngelpuffer, SDS-Stammlösung, A. bidest. und TEMED gemischt. Die Mischung wurde für zwei Minuten unter Vakuum entgast und anschließend zum Start der Polymerisationsreaktion mit APS-Lösung versetzt. Die Trenngellösung wurde sofort blasenfrei bis zur gewünschten Höhe in die Gelkassette gefüllt und vorsichtig mit A. bidest. überschichtet. Die Polymerisation erfolgte für etwa zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde das Überschichtungswasser entfernt, die Sammelgellösung entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise vorbereitet und in die Gelkassette gegossen. Nach Einsetzen des Kamms erfolgte die Polymerisation des Sammelgels für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Gelkassette wurde anschließend in die Elektrophoresekammer eingesetzt, die Kammer mit gekühltem 1xElektrophoresepuffer gefüllt und der Kamm gezogen.

Zur Vorbereitung der Proben wurden diese mit A. bidest. auf gleiche Volumina eingestellt, mit einem entsprechenden Volumen 5xProbenpuffer (Endkonzentration 1x) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C in einem Heizblock denaturiert. Nach Abkühlung auf Eis und kurzer Zentrifugation zur Rückführung des Kondensats konnten die Proben in die mit 1xElektrophoresepuffer gespülten Taschen des Gels pipettiert werden. Als Größenmarker diente der Prestained SDS-PAGE Broad Range Standard von BioRad, München, Deutschland. Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei 200 V bis zur gewünschten Stärke. Danach konnten die Gele entweder für ein Westernblotting (s. 2.3.11) oder eine Färbung (s. 2.3.9 und 2.3.10) verwendet werden.

Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösung

40 %, gebrauchsfertig (Rothiphorese Gel 29:1, Art.Nr. A515.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
in A. dest.

Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
in A. dest.

SDS-Stammlösung

10 % (w/v) SDS
in A. dest.

Ammoniumpersulfatlösung

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
in A. dest.

5xElektrodenpuffer

Tris-HCl	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,1	% (w/v)

in A. dest.

5xProbenpuffer

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,2	ml
50 % (v/v) Glycerin	5,0	ml
10 % (w/v) SDS	2,0	ml
1 % (w/v) Bromphenolblau	1,0	ml
β-Mercaptoethanol	0,5	ml
A. bidest.	0,3	ml

Tab. 2.7: Zusammensetzung des Trenngels

Konzentration des Trenngels [%]	15	12	10	7,5
A. bidest.	5,400 ml	6,520 ml	7,275 ml	8,205 ml
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung	5,610 ml	4,490 ml	3,735 ml	2,805 ml
Trenngelpuffer	3,750 ml	3,750 ml	3,750 ml	3,750 ml
SDS-Stammlösung	0,150 ml	0,150 ml	0,150 ml	0,150 ml
Ammoniumpersulfatlösung	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml
TEMED	0,015 ml	0,015 ml	0,015 ml	0,015 ml

Tab. 2.8: Zusammensetzung des Sammelgels

Sammelgel 4 %	
A. bidest.	4,71 ml
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung	0,75 ml
Sammelgelpuffer	1,875 ml
SDS-Stammlösung	0,075 ml
Ammoniumpersulfatlösung	0,075 ml
TEMED	0,015 ml

2.3.8 Bestimmung des Proteingehaltes

Der Proteingehalt der Proben wurde mit Hilfe eines Protein-Assays von BioRad, München, Deutschland photometrisch bestimmt. Die Methode basiert darauf, dass sich das Absorptionsmaximum des Säurefarbstoffs Coomassie-Brilliantblau G250 in Anwesenheit von Proteinen und in saurem Milieu von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die Stabilisierung des Farbstoffs in der unprotonierten, anionischen Sulfonatform durch Bildung von Komplexen mit kationischen oder nichtpolaren, hydrophoben Seitenketten einiger Aminosäuren. Wichtig sind vor allem Wechselwirkungen mit Arginin. Der Assay wurde 1976 von M.M. Bradford veröffentlicht.

Zur Messung wurden 20 µl Enzymlösung mit 1 ml Reagenz (hergestellt aus Fertigreagenz durch 1:5-Verdünnung mit A. dest.) versetzt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 595 nm. Als Standard diente eine BSA-Eichreihe (0,2-1 mg ml⁻¹).

2.3.9 Silberfärbung von Proteingelen

Mit Hilfe der Silberfärbung können je nach Protokoll Proteinmengen von weniger als 100 pg Protein pro Bande in Acrylamidgelen nachgewiesen werden. Die Färbung basiert auf der Komplexbildung des Ag^+ -Ions mit Glutaminsäure-, Asparaginsäure- und Cysteinresten von Proteinen. Durch alkalisches Formaldehyd und Thiosulfat erfolgt dann die Reduktion des Ag^+ zu dunklem Ag.

Zur Färbung von SDS-Gelen wurde das Silver Staining Kit Protein Plus One™ (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Lösungen wurden nach Herstellervorschrift angesetzt und alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur auf einer Laborwippe durchgeführt.

Das Gel wurde zunächst für 30 Minuten in Fixierlösung (40 % (v/v) EtOH, 10 % (v/v) Eisessig) inkubiert und danach für 30 Minuten in Sensibilisierungslösung (30 % (v/v) EtOH, 0,125 % (v/v) Glutardialdehyd, 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat, 500 mM Natriumacetat) auf die Färbung vorbereitet. Diese erfolgte, nach dreimaligem Waschen des Gels für 5 Minuten mit A. bidest., für etwa 20 Minuten in Färbelösung (0,25 % (w/v) Silbernitrat, 0,015 % (v/v) Formaldehyd). Danach wurde zweimal für 5 Minuten mit A. bidest. gewaschen und die Färbung 2 bis 5 Minuten in Entwicklerlösung (300 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) bis zur gewünschten Intensität entwickelt. Die Entwicklung wurde durch 10-minütige Inkubation in Stopplösung (40 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) beendet, das Gel dreimal für 5 Minuten mit A. bidest. gewaschen und zum Schluss in Konservierungslösung (30 % (v/v) EtOH, 4 % (v/v) Glycerin) gelagert.

2.3.10 Coomassie-Färbung

Coomassie-Brilliantblau ist ein seit den 60er Jahren häufig verwendeter Farbstoff, um Proteine in Polyacrylamidgelen anzufärben. Es handelt sich hierbei um einen Triphenylmethanfarbstoff, der ursprünglich zur Färbung von Wolle und Seide verwendet wurde (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Nachweisempfindlichkeit dieser Färbemethode liegt bei etwa 100 ng bis 1 µg, bei einigen optimierten Protokollen auch bei bis zu 30 ng Protein, abhängig vom Farbstoffbindevermögen. Gleichzeitig mit der Färbung erfolgt durch die in der Färbelösung vorhandene Essigsäure eine Fixierung der Proteine .

Für die Färbung wurden die Gele zunächst 30 Minuten bei Raumtemperatur auf einer Wippe in Färbelösung inkubiert und anschließend für etwa 1-2 Stunden in Entfärbelösung entfärbt.

Färbelösung**Entfärbelösung**

Coomassie-Brilliant-Blue R-250	0,05 % (w/v)	Eisessig	10 % (v/v)
Eisessig	10 % (v/v)	Ethanol	40 % (v/v)
Ethanol	40 % (v/v)	A. bidest.	50 % (v/v)
A. bidest. gefiltert	50 % (v/v)		

2.3.11 Westernblotting von Proteinen

Die Trivialbezeichnung Westernblotting ist auf den Namen des Erfinders der Blottingtechnik für DNA zurückzuführen. In Anlehnung an dessen Namen, Southern, wurde zunächst das Blotting von RNA als Northernblotting und später das Proteinblotting als Westernblotting bezeichnet. Die Methode wurde 1979 von Towbin et al. eingeführt. Bei dieser Technik werden die zuvor in einem Gel aufgetrennten Proteine entweder über Kapillarttransfer oder über Elektrottransfer auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert, um bestimmte Proteine mittels Immunodetektion (s. 2.3.13) in den Proben nachweisen zu können.

Zum Westernblotting wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Elektrottransfermethoden angewandt. Bei beiden Methoden werden die Proteine durch Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung der Anode aus dem Gel auf eine Nitrozellulose-Trägermembran transferiert.

2.3.11.1 Tankblotting

Hierzu wurde das Mini PROTEAN II-System von BioRad, München, Deutschland verwendet. Das zu blottende Gel wurde im Anschluss an die Auftrennung zunächst 15 Minuten in Tankblotting-Puffer äquilibriert. Dann wurde die Apparatur entsprechend den Herstellerangaben zusammengesetzt. Hierbei war darauf zu achten, dass die einzelnen ebenfalls in Tankblotting-Puffer äquilibrierten Lagen des sogenannten Blotsandwichs luftblasenfrei übereinander gelegt wurden. Der Blotsandwich war aus einer Lage Filterpapier (Gel-Blotting-Papiere, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland), dem Gel, der Nitrozellulosemembran (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 µm, BioRad, München Deutschland) und einer weiteren Lage Saugpapier aufgebaut. Die Blottingkammer wurde mit kaltem Tankblotting-Puffer gefüllt und während des Laufs durch ein in die Kammer eingesetztes Kühlaggregat weitergekühlt. Der Transfer erfolgte für etwa 1,5 Stunden bei 100 V. Die Proteine

wurden anschließend zur Kontrolle auf der Membran mit Ponceau S (s. 2.3.12) gefärbt.

Tankblotting-Puffer

Tris	25	mM
Glycin	192	mM
MeOH	20	% (v/v)

in A. dest., pH ca. 8,3

2.3.11.2 Semidry-Blotting

Für das Semidry-Blotting wurde die Apparatur Multiphor II (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verwendet. Zwischen die Elektrodenplatten wurde ein luftblasenfreier sogenannter Blotsandwich aus drei Lagen Filterpapier (Gel-Blotting-Papiere, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland), Membran (Trans-Blot Transfer Medium, 0,45 μm , BioRad, München, Deutschland), Gel und drei weiteren Lagen Filterpapier gelegt. Sowohl Saugpapier als auch die Nitrozellulosemembran wurden zuvor in Transferpuffer äquilibriert. Der Transfer erfolgte für etwa 1,25 Stunden bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm^2 Membran. Die Proteine wurden anschließend zur Kontrolle auf der Membran mit Ponceau S (s. 2.3.12) gefärbt.

Transferpuffer

Tris	15,6	mM
Glycin	120	mM
MeOH	20	% (v/v)

in A. dest., pH ca. 8,3

2.3.12 Ponceau S-Färbung von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Westernblots konnten zur Kontrolle des Proteintransfers mit Ponceau S angefärbt werden. Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran etwa zwei Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und anschließend bis zum gewünschten Ergebnis in A. dest. entfärbt. Die Färbung konnte mittels Inkubation des Blots in 1xTBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20 (TBS-T) von der Membran heruntergewaschen werden.

Ponceau S-Lösung

Ponceau S 0,2 % (w/v)
TCA 3 % (w/v)
in A. dest.

5xTBS

Tris 20 mM
NaCl 137 mM
HCl 1 mM
in A. dest., pH 7,6

TBS-T

1xTBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
in A. dest.

2.3.13 Immunodetektion von Proteinen auf Westernblots

Antikörper werden in tierischen Organismen als Antwort auf die Anwesenheit einer fremden Substanz, einem sogenannten Antigen gebildet. Eine bestimmte Zeit nach Injektion eines Antigens in ein Tier erfolgt die Bildung von Antikörpern der IgG-Klasse, die spezifisch mit dem Antigen reagieren und aus dem Serum des Tieres isoliert werden können. Dabei besitzt jeder Antikörper eine spezifische Affinität zu einer bestimmten Region des Antigens. Diese Region bezeichnet man als Epitop (Lottspeich and Zorbas, 1998). Die Antikörper-Epitop-Interaktion kann für den hochsensiblen und spezifischen Nachweis eines bestimmten Proteins genutzt werden, welches über Westernblotting auf einer Membran immobilisiert worden ist. Diesen Prozess nennt man Immunodetektion. Hierbei bindet ein Antikörper (primärer Antikörper) spezifisch an das gesuchte Protein auf der Membran. Dieser primäre Antikörper wird sehr oft durch Immunisierung von Maus oder Hase gewonnen. Der Nachweis der Lokalisation des gebundenen primären Antikörpers auf der Membran, und somit auch des Zielproteins, erfolgt mit Hilfe eines sekundären Antikörpers. Dieser sekundäre Antikörper erkennt und bindet an alle IgGs einer Tierspezies. Man verwendet hier einen sekundären Antikörper, der gegen die Spezies gerichtet ist, aus der der primäre Antikörper gewonnen wurde. An diesen sekundären Antikörper ist bei einem Immunodetektionsansatz ein Reporter gekoppelt, welcher die Detektion des Antikörperkomplexes erlaubt. Als Reporter in einem solchen sogenannten Antikörperkonjugat können zum Beispiel die alkalische Phosphatase oder die Peroxidase dienen. Der Nachweis des Antikörperkomplexes auf der Membran erfolgt durch die lokale Umsetzung eines Substrates durch die Reporterenzyme. Hierbei

kommt es entweder zu einer Farbreaktion oder zu Chemilumineszenz, welche mittels eines Röntgenfilms detektiert werden kann.

Für die Immunodetektion wurden die Westernblots zunächst zweimal für 10 Minuten mit TBS-T (s. 2.3.12) gewaschen. Dann erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Blockingpuffer für etwa eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde der Blot dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und anschließend der primäre Antikörper in 10 ml Antikörperpuffer (Verdünnung des AK 1:1000 bis 1:3000) hinzugegeben. Die Bindung des primären Antikörpers erfolgte bei 8 °C über Nacht im Kühlraum. Dann wurde die Membran dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Das sekundäre Antikörperkonjugat wurde 1:10000 in 10 ml Antikörperpuffer verdünnt und die Membran zur Bindung des Konjugats für eine Stunde bei Raumtemperatur in dieser Lösung inkubiert. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf einer Laborwippe. In dieser Arbeit wurden einzig Peroxidasekonjugate des sekundären Antikörpers zur Immunodetektion eingesetzt. Diese wurden auf der Membran nach vier weiteren 10-minütigen Waschschritten mit TBS-T mit Hilfe des ECLTM-Detektionskits (Amersham Pharmacia, Freiburg, Deutschland) über die entstehende Chemilumineszenz (Exposition eines Röntgenfilms) nachgewiesen. Hierbei wurde wie vom Hersteller empfohlen vorgegangen.

Blockingpuffer

BSA 3 % (w/v)
in TBS-T

Antikörperpuffer

Milchpulver 5 % (w/v)
entfettet, in TBS-T (s. 2.3.12)

2.3.14 Aufreinigung von IgG-Antikörpern mittels Protein A-Agarose

Zur Aufreinigung der IgG-Fraktion aus dem Endblutungsserum der Immunisierung eines Kaninchens (bezogen von der Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland) mit dem GST-RC11-Fusionspeptid (s. 2.3.5) wurden die Protein A-Agarose-beads in einem Volumen Puffer A aufgenommen, auf eine 0,8x4 cm Polyprep Chromatographiesäule (BioRad, München, Deutschland) gegeben und mit 20 ml kaltem Puffer A gewaschen. Die Säule mit den beads wurde hierzu auf eine Saugflasche gestellt und der Puffer durch Anlegen eines leichten Vakuums entfernt. Die beads wurden anschließend in 5 ml des Endblutungsserums suspendiert und für etwa 1 Stunde bei 4 °C in einem e/o/e-Inkubator inkubiert. Danach wurden die beads wie zuvor beschrieben auf der Säule geerntet und wiederum mit 20 ml Puffer A gewaschen.

Die beads wurden in 2 ml Puffer B resuspendiert in zwei 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und für 15 Minuten bei 4 °C in einem e/o/e-Inkubator inkubiert. Die Ernte des Eluats erfolgte mittels einer Chromatographiesäule auf einem Saugfinger. Die so gereinigte IgG-Fraktion wurde mit NaOH neutralisiert und konnte bei 4 °C bzw. -20 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

Protein A-Agarose

Sigma, Taufkirchen, Deutschland, P-7786

Puffer A

NaH₂PO₄ 0,02 M

NaCl 0,15 M

in A. dest., pH 8,0 mit NaOH

Puffer B

NaH₂PO₄ 0,2 M

Citronensäure 0,1 M

pH 3,0; 1:1 mit A. dest.

2.3.15 Mikroskopische Analysen

2.3.15.1 Konfokale Lasermikroskopie

Die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine in transient transformierten Pflanzen wurde zwei Tage nach Transformation mit Hilfe von konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Hierbei wurde das Leica-TCS confocal laser scanning microscope mit einem x100 PLAPO Ölimmersionsobjektiv (Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland) verwendet. Es wurden folgende Parameter gewählt: die Anregungswellenlängen lagen bei 476/488 nm, die Detektion der GFP-Emission erfolgte bei 515-552 nm und die Detektion der Chlorophyll-Autofluoreszenz erfolgte bei 673-695 nm. Die GFP-Fluoreszenz und die Chlorophyll-Autofluoreszenz wurden simultan über unabhängige Zweikanal-detektion aufgezeichnet.

2.3.15.2 Lichtmikroskopie von Blattmaterial nach GUS-Färbung

Für die GUS-Aktivitätsfärbung zur Kontrolle der Transformation mit pCambia 1301-Konstrukten, wurden die infiltrierten Blätter zu unterschiedlichen Zeitpunkten unter

leichtem Vakuum im Exsikkator mit der GUS-Färbelösung infiltriert und über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert.

Es folgte eine Entfärbung der Blätter in 70 % (v/v) EtOH bei 65 °C im Wärmeschrank, wobei das EtOH mehrmals gewechselt wurde. Die entfärbten Blätter wurden bis zur mikroskopischen Auswertung in 50 % (v/v) Glycerin gelagert. Die Blätter konnten dann mittels Durchlichtmikroskopie an einem Leica DM RBE Mikroskop (Leica Microsystems, Mannheim, Deutschland) analysiert werden. Fotos wurden mit dem integrierten Photoautomat Leica MPS28 und einem Kodak Ektachrome 64T Professional-Diafilm gemacht.

GUS-Färbelösung

Na-Phosphat	100	mM
Na-EDTA	10	mM
Triton X-100	0,1	% (v/v)
K-Ferrocyanid (II)	5	mM
K-Ferricyanid (III)	5	mM
X-Gluc in DMFA	1	mM

in A. bidest., Filtration durch Sterilfilter

Lagerung bei –20 °C

3 Ergebnisse

3.1 Positions- und Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins

3.1.1 Herstellung eines Konstruktes für die Expression des rekombinanten RCI1-Proteins in *E. coli*

In dieser Arbeit wurden zunächst weitere Versuche zur Charakterisierung des RCI1-Proteins durchgeführt. Daher soll hier zunächst die Klonierung des zur Verfügung stehenden Expressionskonstruktes für das rekombinante RCI1-Protein (Rademacher, 1999; s. auch 1.7) zusammengefasst werden.

Zur Herstellung des Konstruktes wurde der Expressionsvektor pDS56/RBSII, *SphI* (Stüber et al., 1990) zur Zerstörung der, bei der Klonierung störenden, vektorinternen *PstI*-Schnittstelle einer *PstI*-Restriktion (s. 2.2.3.1) unterworfen. Die entstehenden überhängenden Enden wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase (vgl. 2.2.6.1) aufgefüllt und der Vektor anschließend religiert (s. 2.2.9). Der resultierende Vektor wurde pDS56/RBSII, *SphI* –*PstI* bezeichnet.

Mittels PCR wurde eine *SphI*-Schnittstelle in den Translationsstart der *RCI1* cDNA inseriert. Die Sequenzen der hierzu verwendeten Primer sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.

Tab. 3.1: Sequenzen der zur Klonierung des Expressionskonstruktes von *RCI1* verwendeten Primer (*SphI*-Schnittstelle mit ATG-Startcodon unterstrichen)

Primername	Sequenz
LOX_ <i>SphI</i> -5	5'-GTCAG <u>GCATGCT</u> CACGGCCAG-3'
LOX_ <i>XhoI</i> -3	5'-CATTGACGACCTCCGACAAG-3'

Abb. 3.1 zeigt die Klonierungsstrategie. Die Länge des PCR-Fragments betrug 149 bp. Nach der Amplifikation wurde das Fragment einer *SphI/XhoI*-Restriktion (s. Abb. 3.1/A) unterworfen. Dieses Fragment wurde anschließend zusammen mit einem *XhoI/BamHI*-Fragment der *RCI1* cDNA (s. Abb. 3.1/B) in den mit *SphI/BamHI* geöffneten Vektor pDS56/RBSII, *SphI* –*PstI* ligiert. In dem so entstandenen Konstrukt fehlte der C-terminale Bereich der *RCI1* cDNA (s. Abb. 3.1/C). Daher wurde das Konstrukt *PstI/SalI* (s. Abb. 3.1/D) geschnitten und ein *PstI/XhoI*-Fragment der *RCI1* cDNA (s. Abb. 3.1/E) einligiert, um das Konstrukt zu vervollständigen.

Das Expressionskonstrukt wurde in *E. coli* M15-Zellen transformiert (s. 2.2.11). Die gesuchten Bakterienklone konnten mittels einer durch den Vektor pDS56/RBSII, *SphI* vermittelten Ampicillinresistenz selektioniert werden.

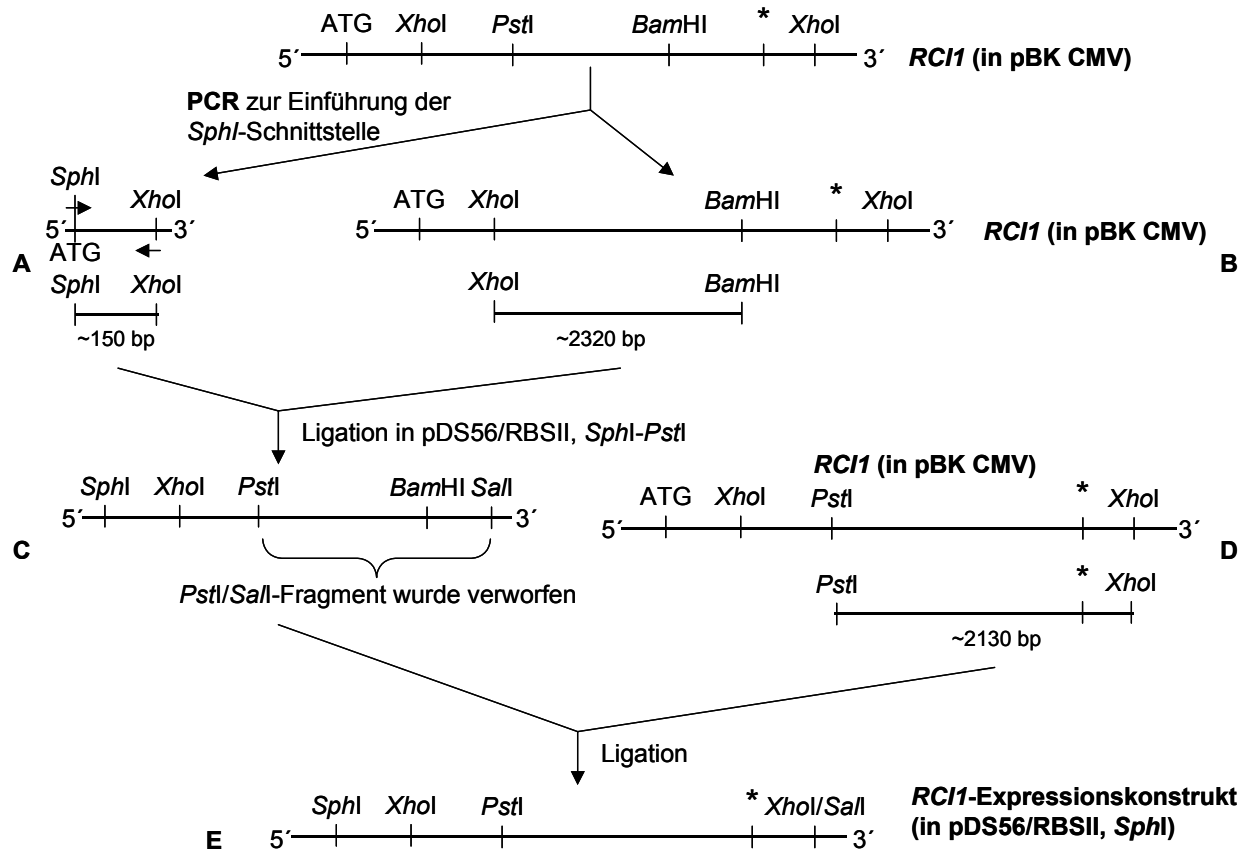


Abb. 3.1: Klonierungsstrategie: Expressionskonstrukt für rekombinantes RC11-Protein
(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*BamHI*), (*SalI*), (*SphI*), (*PstI*) und (*XhoI*):
Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; →: Primer LOX_5phI-3 (s. Tab.
3.1); ←: Primer LOX_XhoI-3 (s. Tab. 3.1); (A-E): Klonierungsschritte (Erklärung im Text)

3.1.2 Spezifische Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten RC11-Proteins

Die spezifische Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten RC11-Proteins aus Überexpression von *RC11* in *E. coli* M15 (Herstellung des Konstruktes s. 3.1.1) wurde vor Verwendung des Extraktes für weitere Versuche, wie Bestimmung der Positionsspezifität (s. 3.1.3) oder der Substratspezifität (s. 3.1.4), getestet.

Hierzu erfolgte die Extraktion des rekombinanten RC11-Proteins wie in Kapitel 2.3.1.2 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. Das Konstrukt steht im Expressionsvektor unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren

Promotors. Die Expression des rekombinanten Proteins wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Als Kontrolle dienten Extrakte aus M15-Zellen ohne Expressionskonstrukt jeweils ohne und mit IPTG-Zugabe, sowie von M15-Zellen mit Expressionskonstrukt ohne Induktion der Expression von *RCI1*, das heißt ohne IPTG-Zugabe.

In Abb. 3.2 ist ein typisches Ergebnis der Bestimmung der spezifischen LOX-Aktivität des RCI1-Proteins im Vergleich zu den verschiedenen Kontrollansätzen dargestellt.

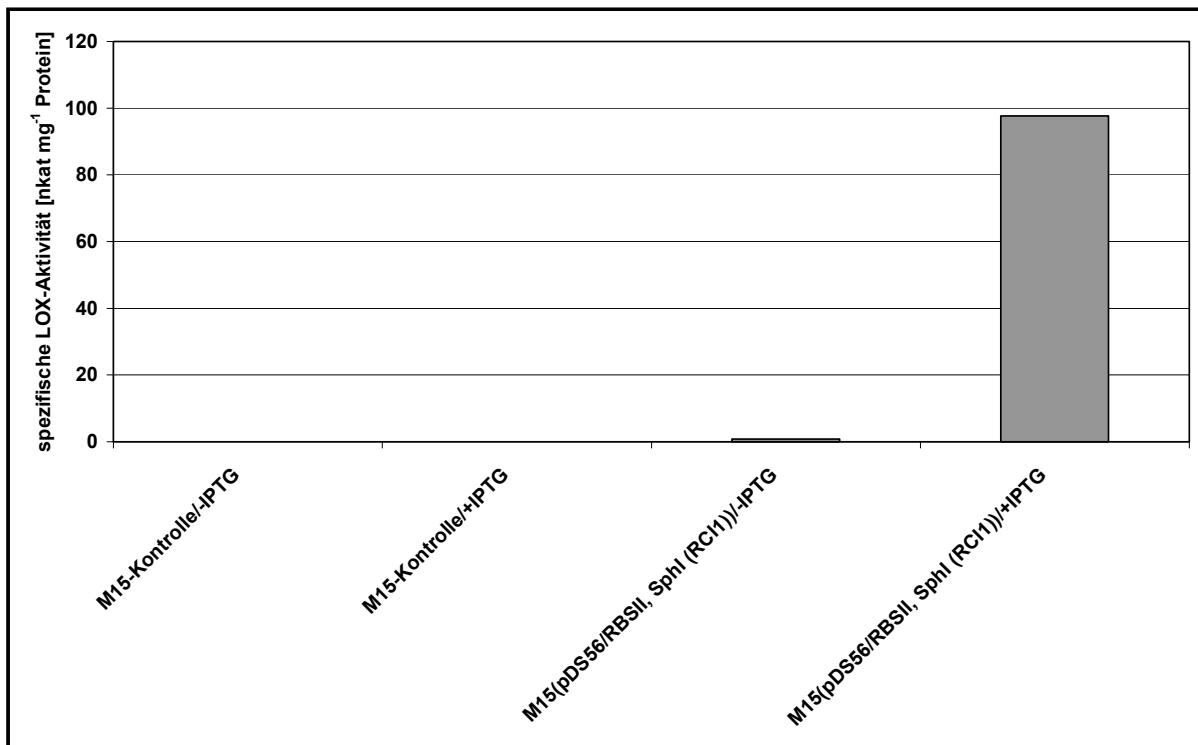


Abb. 3.2: Spezifische Lipoxygenaseaktivitäten in bakteriellen Proteinextrakten

Die Extraktion der Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.2 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der zweimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

(M15-Kontrolle/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen ohne Expressionskonstrukt ohne IPTG-Zugabe; (M15-Kontrolle/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen ohne Expressionskonstrukt nach IPTG-Zugabe; (M15(pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*)) ohne IPTG-Zugabe; (M15(pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*)) nach IPTG-Zugabe

Der Enzymextrakt aus bakterieller Überexpression von RCI1 hatte eine Lipoxygenaseaktivität von 97,6 nkat mg⁻¹ Protein, diese lag damit etwa um den Faktor 120 höher als im Extrakt aus M15-Zellen mit Expressionskonstrukt ohne Zugabe von IPTG, welches eine spezifische LOX-Aktivität von 0,8 nkat mg⁻¹ Protein aufwies. Bei den Kontrollen mit M15-Zellen ohne den Expressionsvektor war weder

im Ansatz ohne IPTG noch im Ansatz mit IPTG eine messbare LOX-Aktivität zu detektieren.

Die geringe Enzymaktivität im Extrakt aus M15-Zellen mit Expressionskonstrukt ohne Zugabe von IPTG ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der *lac*-Promotor „leaky“ ist, das heißt, dass eine leichte Expression des rekombinanten Proteins auch ohne Induktion der Expression mit IPTG erfolgen konnte. In den beiden Kontrollansätzen mit Extrakten aus M15-Zellen ohne Expressionskonstrukt war keine LOX-Aktivität zu detektieren.

3.1.3 Positionsspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins

Pflanzliche Lipoxygenasen kann man je nach ihrer Regiospezifität bei der Oxygenierung der Substrate Linol- und Linolensäure in 9- und 13-LOX-Spezies unterteilen (Siedow, 1991).

Die Bestimmung der Positionsspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins in Bezug auf das Substrat Linolsäure erfolgte im Rahmen der Staatsexamensarbeit von Imke Rademacher (1999), die Bestimmung in Bezug auf das Substrat Linolensäure erfolgte im Rahmen dieser Arbeit.

Die Extraktion des rekombinanten RCI1-Proteins fand wie in Kapitel 2.3.1.1 und die Messung der Regiospezifität mittels HPLC-Analyse wie unter 2.3.4 beschrieben statt.

Tab. 3.2: Regiospezifität des rekombinanten RCI1-Proteins

Substrat	Produkt	
	9-HPOT bzw. 9-HPOD [%]	13-HPOT bzw. 13-HPOD [%]
Linolsäure (Rademacher, 1999)	9	91
α -Linolensäure	1	99

Die Lipoxygenase RCI1 katalysierte bevorzugt die Bildung von 13-Hydroperoxy-octadecatriensäure (13-HPOT) aus dem Substrat Linolsäure bzw. 13-Hydroperoxy-octadecadiensäure (13-HPOD) aus dem Substrat α -Linolensäure (s. Tab. 3.2).

Die Zuordnung von RCI1 in die Klasse der 13-Lipoxygenasen (13-LOX) konnte nach Analyse des Linolensäureumsatzes bestätigt werden.

3.1.4 Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins

Für einige Lipxygenasen können neben freien Fettsäuren auch in Membranlipiden veresterte Fettsäuren als Substrate dienen (Brash et al., 1987; Maccarone et al., 1994).

Die Versuche zur Bestimmung der Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins (Extraktion s. 2.3.1.1) fanden wie unter 2.3.3 beschrieben mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (Rank Brothers, Cambridge, England) statt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tab. 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Substratspezifität des rekombinanten RCI1-Proteins
Der Maximalwert der Aktivitätsbestimmung bei Verwendung von Linolsäure als Substrat wurde gleich 100% gesetzt (Erklärung im Text)

Substrat	Bemerkung	Umsatz [%]
Linolsäure	-	100,0
Phosphatidylcholin-dilinoleoyl	ohne Ultraschallbehandlung	4,6
Phosphatidylcholin-dilinoleoyl	mit Ultraschallbehandlung	5,7

Durch die Sauerstoffelektrode wurde der O_2 -Verbrauch in Prozent pro Zeiteinheit ($\% O_2 \text{ min}^{-1}$) bestimmt. Hierbei entspricht $1 \% O_2 \text{ min}^{-1}$ einem Verbrauch von $2,36 \text{ nmol } O_2 \text{ min}^{-1}$. Ein mol O_2 -Verbrauch pro Sekunde entspricht hierbei 1 kat Enzymaktivität der Lipxygenase, da pro mol verbrauchtem O_2 ein mol Substrat umgesetzt wird. Die höchste Umsatzrate konnte bei Verwendung von Linolsäure als Substrat gemessen werden und entsprach einer berechneten Enzymaktivität von 0,688 nkat. Dieser Wert wurde auf 100 % gesetzt. Bei dem Substrat Phosphatidylcholin-dilinoleoyl wurde eine um den Faktor 20 geringere Lipidperoxidation beobachtet. Die Behandlung der Phosphatidylcholin-dilinoleoyl-Substratlösung mit Ultraschall (s. 2.3.3) führte zu keiner Steigerung des Umsatzes, ebenso wie die Zugabe von Detergenzien wie SDS oder Deoxycholin (Daten nicht gezeigt).

Das bevorzugte Substrat von RCI1 scheinen somit freie Fettsäuren darzustellen.

3.2 Southernanalyse von *RC11*

Um zu überprüfen, ob eine *RC11*-spezifische Sonde unter stringenten Bedingungen nur mit einem oder mit mehreren Genen im Reisgenom hybridisiert, wurde eine Southernanalyse (s. 2.2.19.2) durchgeführt. Hierzu wurde genomische DNA aus Reis extrahiert (s.2.2.2). Dann folgte die Restriktion (Kapitel 2.2.3.2) von je 20 µg DNA mit den Enzymen *Bsp120I* (Bs), *EcoRI* (Ec), *HindIII* (Hi), *KpnI* (Kp), *PvuII* (Pv), *Sall* (Sa), *SmaI* (Sm), *XbaI* (Xb) und *XhoI* (Xh). Die Ansätze wurden mittels Elektrophorese in einem 0,8 % (w/v) Agarosegel aufgetrennt und anschließend auf eine positiv geladene Nylonmembran gebロットet (s. 2.2.19.2). Der Blot wurde mit dem in Kapitel 2.1.2.3 beschriebenen *EcoRI/HindIII*-Fragment vom 5'-Ende der *RC11* cDNA, welches eine genspezifische Sonde liefern sollte, hybridisiert. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 3.3 dargestellt.

Die Enzyme *Bsp120I*, *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PvuII*, *Sall*, *SmaI* und *XbaI* schneiden die *RC11* cDNA nicht im Bereich der Sondensequenz. Auf dem Autoradiogramm ist nach Restriktion der DNA mit *Bsp120I*, *HindIII* und *SmaI* jeweils ein Fragment zu erkennen. Dies würde dafür sprechen, dass die *RC11*-Sonde nur mit einem Gen innerhalb des Reisgenoms hybridisiert. Nach Restriktion mit *EcoRI*, *PvuII*, *Sall* und *XbaI* werden jedoch zwei Fragmente detektiert. Dieses Ergebnis könnte als Indiz für die Existenz von mindestens zwei verwandten Genen im Reisgenom gewertet werden, die unter den gewählten stringenten Bedingungen mit der *RC11*-Sonde hybridisieren. Allerdings könnten auch Schnittstellen für diese Enzyme in potentiellen Intronbereichen der genomischen Sequenz liegen, die bisher nicht bekannt sind. Falls diese Annahme zutrifft, ließen sich die zwei Fragmente auch bei Hybridisierung der Sonde mit einem einzelnen Gen erklären. Nach Restriktion der DNA mit *KpnI* sind drei Fragmente zu erkennen. Auch diese Fragmente können durch potentielle Schnittstellen in Intronsequenzen hervorgerufen werden.

Da bei der Restriktion der DNA mit *Bsp120I*, *HindIII* und *SmaI* allerdings nur ein einziges Fragment zu erkennen ist und bei der Restriktion mit *XhoI*, welches in der Sondensequenz eine einzelne Schnittstelle besitzt, auch nur die erwarteten zwei Fragmente gefunden werden können, spricht die Summe der Ergebnisse dafür, dass die *RC11*-Sonde unter den gewählten stringenten Bedingungen nur mit einem einzigen Gen im Reisgenom hybridisiert.

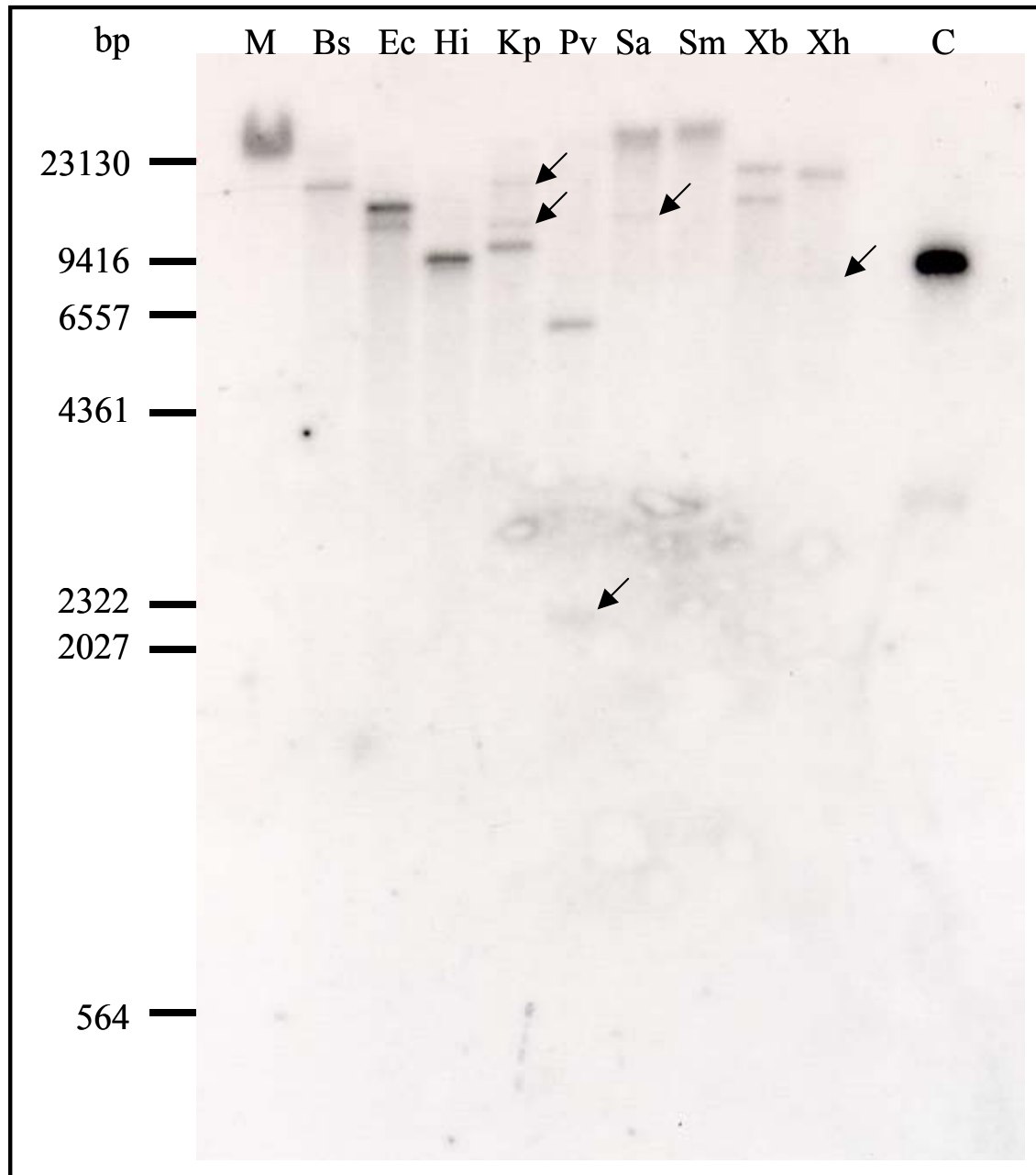


Abb. 3.3: Autoradiogramm der Southernanalyse genomischer DNA aus Reis
 Restriktion von je 20 µg genomischer DNA aus Reis mit den Enzymen *Bsp*120I (Bs), *Eco*RI (Ec), *Hind*III (Hi), *Kpn*I (Kp), *Pvu*II (Pv), *Sal*I (Sa), *Sma*I (Sm), *Xba*I (Xb) und *Xho*I (Xh). In der rechten Spur (C) sind 20 pg Plasmid-DNA von pBK CMV (*RC1*), linearisiert mit *Eco*RI, als Kontrolle aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in einem 0,8 % (w/v) Agarosegel. Als Sonde wurde ein *Eco*RI/*Hind*III-Fragment vom nicht konservierten 5'-Ende der *RC1* cDNA verwendet. Die Ziffern am linken Rand entsprechen den Fragmentgrößen eines Markers in Basenpaaren.

3.3 Cytolokalisation von RCI1

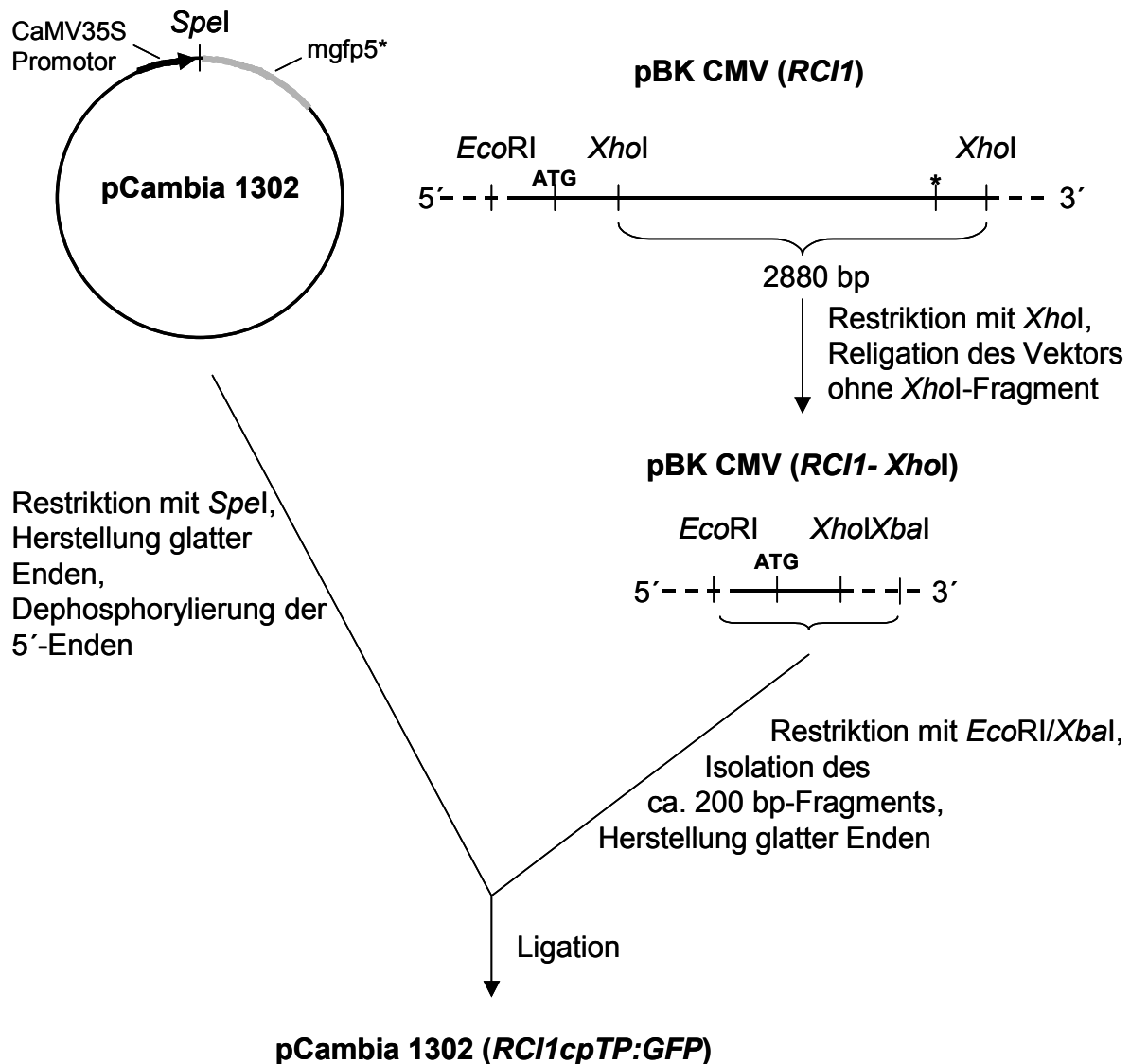
3.3.1 Herstellung eines Konstruktes zur Aufklärung der Cytolokalisation von RCI1

Mittels des Programms targetP (Emanuelsson et al., 2000) können Vorhersagen darüber getroffen werden, ob Peptidsequenzen für die Direktion eines Proteins an einen bestimmten Ort der Zelle verantwortlich sind, d.h. ob es sich um Transit- oder Signalpeptide handelt. So können zum Beispiel Signalpeptide für den Transport eines Proteins in die Chloroplasten oder die Mitochondrien erkannt werden. Auf diese Weise wurde für die Sequenz der LOX RCI1 eine hohe Wahrscheinlichkeit ($p=0,801$) dafür ermittelt, dass der N-Terminus ein Transitsignalpeptid (AS1-AS36/38) für die Direktion des Proteins in die Chloroplasten beinhaltet. Um zu untersuchen, ob es sich bei der N-terminalen Extension tatsächlich um ein funktionales Transitsignalpeptid handelt, sollte eine GFP („green fluorescent protein“)-Fusion mit dem für die ersten 36 Aminosäuren codierenden Bereich der *RCI1* cDNA im Vektor pCambia 1302 (s. 2.1.2.2) hergestellt werden. Abb. 3.4 gibt die Klonierungsstrategie wieder.

Zunächst wurde aus dem Konstrukt pBK CMV (*RCI1*), welches die cDNA von *RCI1* beinhaltet, ein *XhoI*-Fragment deletiert. *XhoI* besitzt in pBK CMV (*RCI1*) eine Erkennungssequenz nach Position 149 im codogenen Strang der *RCI1* cDNA und in der MCS („multiple cloning site“) des Vektors. Nach der Deletion des *XhoI*-Fragments wurde das Konstrukt religiert. Der resultierende Vektor wurde als pBK CMV (*RCI1*-*XhoI*) bezeichnet. Aus diesem wurde mittels *EcoRI* und *XbaI*, welche beide in der MCS des pBK CMV (s. 2.1.2.2) liegen, ein 155 bp-Fragment geschnitten, welches für die Sequenz codiert, die das putative Signalpeptid von RCI1 beinhaltet. Die überhängenden Enden dieses Fragments wurden auf glatte Enden aufgefüllt (s. 2.2.6). Der Vektor pCambia 1302 wurde mit *SpeI* geöffnet und die entstehenden überhängenden Enden auf glatte Enden aufgefüllt. Nach Dephosphorylierung der 5'-Enden (s. 2.2.7) wurde das *EcoRI/XbaI*-Fragment von *RCI1* einligiert. Das entstehende Konstrukt für die Expression der Reportergenfusion wurde durch Restriktionsanalyse in Bezug auf die korrekte Orientierung überprüft und sequenziert (Sequenzierungsprimer s. Tab. 3.4), da die Sequenzen des Signalpeptids und von GFP im selben Leseraster vorliegen müssen. Anschließend wurde das Konstrukt durch triparentale Konjugation (s. 2.2.15) in den *A. tumefaciens*-Stamm LBA 4404 (s.2.1.2.1) transformiert.

Tab. 3.4: Primer für die Sequenzierung des Konstruktes pCambia 1302 (*RC1cpTP:GFP*)

Primername	Sequenz
Camb1	5'-ATTTCATTTGGAGAGAACACGG-3'

**Abb. 3.4:** Herstellung der Fusion aus dem putativen chloroplastidären Transitsignalpeptid von RC1 und GFP in pCambia 1302

(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*EcoRI*), (*SpeI*), (*XbaI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (*mgfp5**): Sequenz des Reportergens *GFP* (weitere Erklärung im Text)

3.3.2 Untersuchung der Cytolokalisation von RCI1

Zur Analyse der Cytolokalisation des RCI1-Proteins wurden Rosetten 14 Tage alter *A. thaliana* Pflanzen des Ökotyps Ws (Wassiljewskija) wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben mit *A. tumefaciens* LBA 4404, welche das Konstrukt pCambia 1302 (*RCI1cpTP::GFP*) für die Expression der Reporterfusion (s. 3.4.1) enthielten, infiziert (s. Abb. 3.5). Zur Kontrolle wurden *A. thaliana*-Rosetten mit dem *A. tumefaciens* LBA 4404-Wildtyp infiziert (s. Abb. 3.6).

Die Auswertung des Versuchs erfolgte zwei Tage nach Infiltration mittels konfokaler Lasermikroskopie wie in Kapitel 2.3.15.1 beschrieben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Signalverstärkung zum Ausschluss falsch-positiver Signale auf dem Detektionskanal für die GFP-Emission bei Ansatz und Kontrolle gleich war.

Mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie konnte nach Transformation von *A. thaliana*-Blättern mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-*Hyg^R*+*RCI1*)) gezeigt werden, dass die GFP-Emission der Reporterfusion eindeutig mit der Chlorophyll-Autofluoreszenz kolokalisiert war (s. Abb. 3.5). Das Fusionsprotein, bestehend aus den N-terminalen 36 Aminosäuren von RCI1 und GFP, wurde also innerhalb der Chloroplasten detektiert. In der Kontrolle konnte bei identischer Einstellung des konfokalen Mikroskops, bezüglich des Detektionsbereichs und der Signalverstärkung, gezeigt werden, dass die als GFP-Emission detektierten Signale bei 515-552 nm keine Artefakte, entstanden durch die Behandlung der Pflanzen während des Versuchs oder durch die Analysemethode, sein konnten (Ergebnisse dargestellt in Abb. 3.6).

1.: pCambia 1302 (*RCI1cpTP:GFP*)

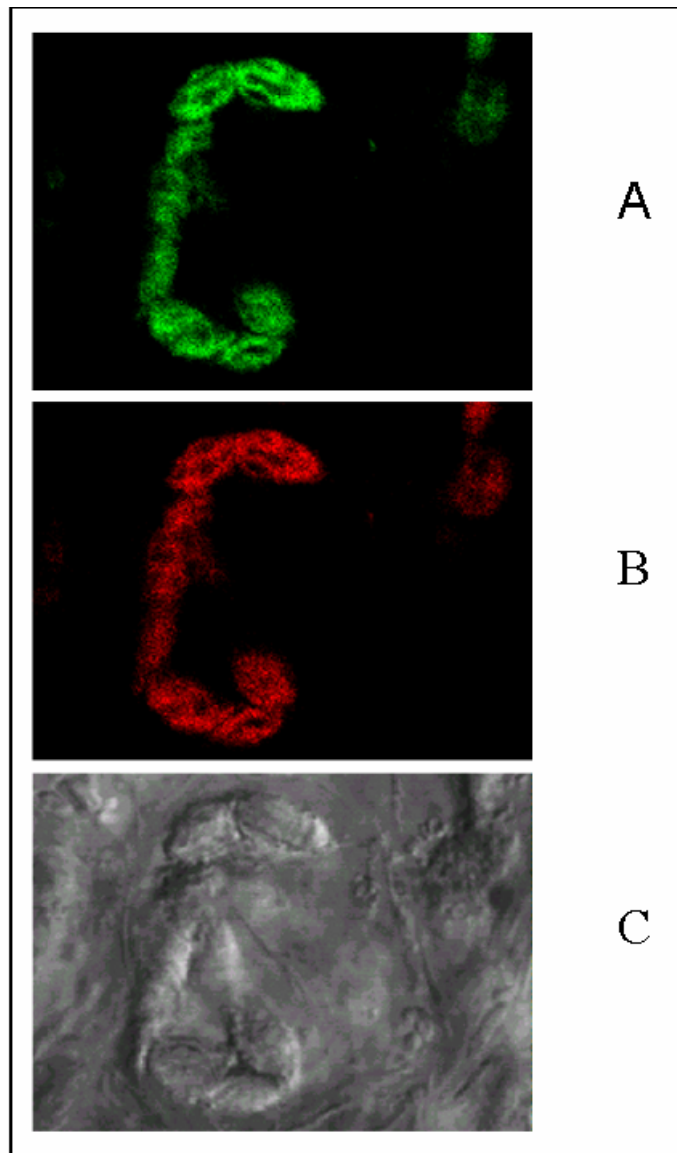


Abb. 3.5: Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie zur Analyse der Cytolokalisation von RCI1 (1.) : Infiltration mit LBA 4404 (pCambia 1302 (*RCI1cpTP:GFP*)) (A): Detektion der GFP-Emission bei 515-552 nm, (B): Detektion der Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 673-695 nm, (C): Differential-Interferenzkontrast Durchlichtbild

2.: Kontrolle

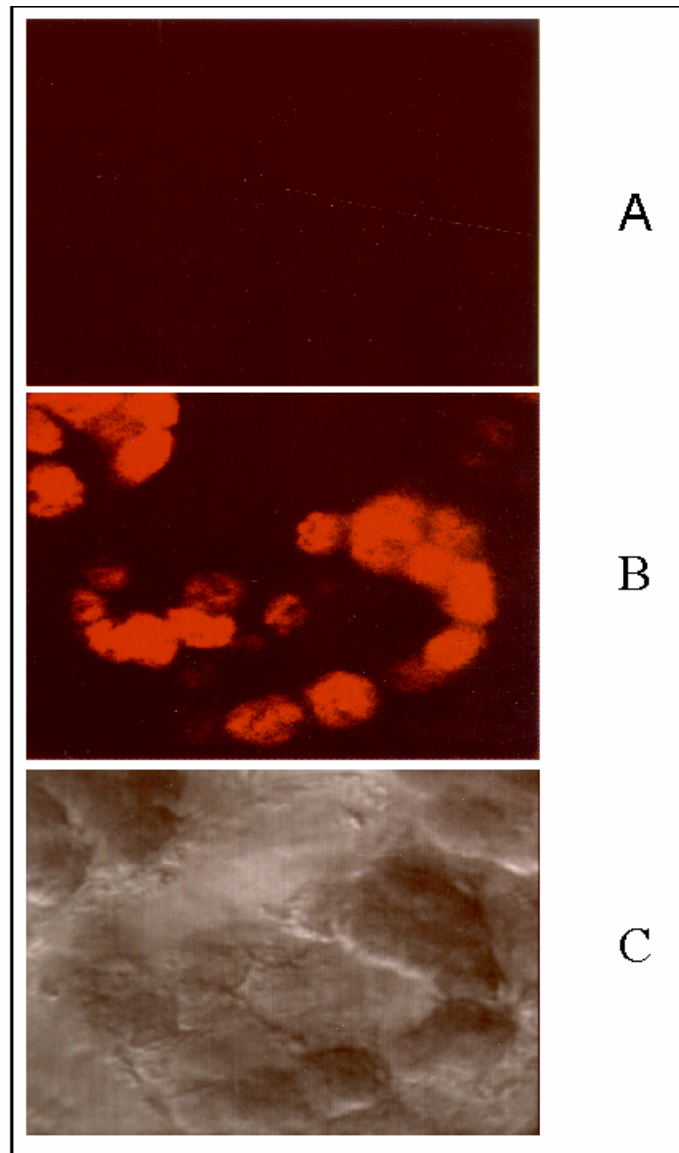


Abb. 3.6: Ergebnisse der konfokalen Lasermikroskopie zur Analyse der Cytolokalisation von RCI1 (2.): Infiltration mit LBA 4404 ohne pCambia 1302 (*RCI1cpTP:GFP*)
(A): Detektion der GFP-Emission bei 515-552 nm, (B): Detektion der Chlorophyll-Autofluoreszenz bei 673-695 nm, (C): Differential-Interferenzkontrast Durchlichtbild

3.4 Überexpression der Lipoxygenase *RCI1* in Reisblättern mittels transienter Transformation durch *A. tumefaciens*

Für die Lipoxygenasen werden unterschiedliche Wirkungsmöglichkeiten innerhalb der Ausbildung der Resistenzreaktionen diskutiert. Zum einen ist hier eine mögliche Mitwirkung von Lipoxygenasen an Membranschädigung während der HR zu nennen, zum anderen entstehen im LOX-Stoffwechselweg diverse antimikrobielle Produkte. Weiterhin wird angenommen, dass Moleküle aus dem LOX-Weg als Signal in die Transduktion der Resistenzantwort von Pflanzen involviert sind (reviewed in Rosahl, 1996).

Die Transkripte von *RCI1* akkumulieren in Reis nach Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren wie BTH. Diese Erhöhung der Transkriptionsrate erfolgt etwa 12 Stunden nach Applikation des Induktors (Schaffrath et al., 2000b). Um die mögliche Funktion der Lipoxygenase *RCI1* bei der Ausprägung des Phänotyps der induzierten Resistenz zu untersuchen, sollte die cDNA unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors in Reispflanzen überexprimiert werden. Dazu wurde im binären Vektor pCambia 1301 (s. 2.1.2.2 und Abb. 3.7) ein Konstrukt mit der vollständigen cDNA von *RCI1* hergestellt (s. 3.4.1). Dieses diente der Überexpression von *RCI1* in Reisblättern (s. 3.4.3 und 3.4.5) durch transiente Transformation mittels *A. tumefaciens* (s. 2.2.26).

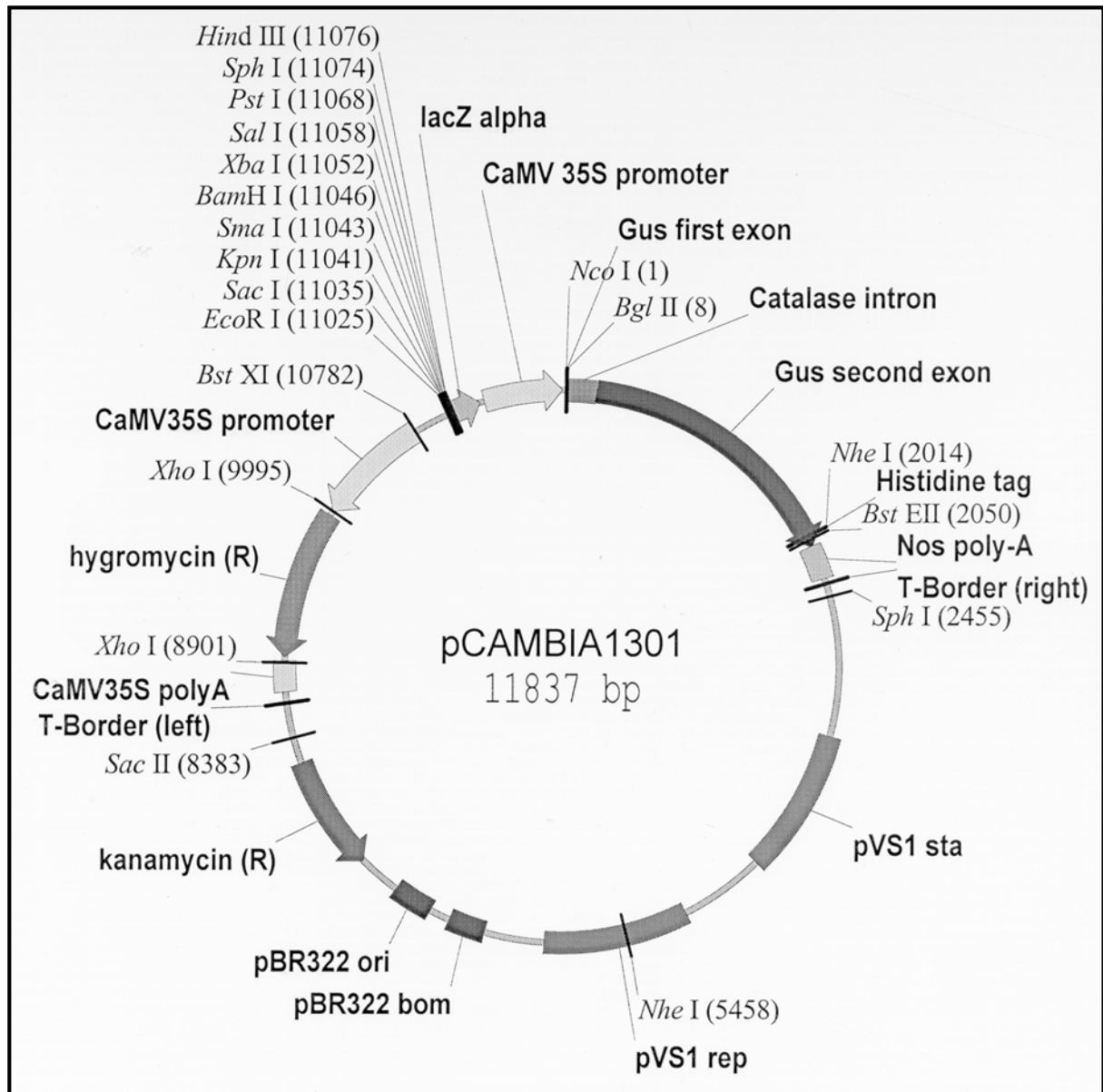


Abb. 3.7: Vektorkarte von pCambia 1301

Bei dem Konstrukt pCambia 1301 ($-Hyg^R/RC11$) wurde das Hygromycinresistenzvermittelnde Gen aus dem Vektor deletiert und an dieser Stelle die *RC11* cDNA inseriert.

3.4.1 Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Lipxygenase *RC11* in Reisblättern

Für die Klonierung des Konstruktes wurde aus dem Vektor pCambia 1301 durch *Xho*I-Restriktion das Hygromycinresistenzgen eliminiert (Zwischenstufe: pCambia 1301 ($-Hyg^R$)). Die überhängenden Enden wurden auf glatte Enden aufgefüllt (s. 2.2.6) und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.7). Die komplette *RC11* cDNA wurde aus dem Vektor pBK CMV mittels *Eco*RI/*Xba*I-Restriktion isoliert, die

überhängenden Enden ebenfalls auf glatte Enden aufgefüllt und das resultierende Fragment wurde in den vorbereiteten pCambia 1301 ($-Hyg^R$) kloniert.

Die Strategie zur Herstellung des Konstruktes ist noch einmal in Abb. 3.8 dargestellt. Die korrekte Orientierung der *RCI1* cDNA in Bezug auf den CaMV35S-Promotor wurde mittels Restriktionsanalysen überprüft und anschließend wurde das Konstrukt durch triparentale Konjugation (s. 2.2.15) in den *A. tumefaciens*-Stamm LBA 4404 (s. 2.1.2.1) transformiert.

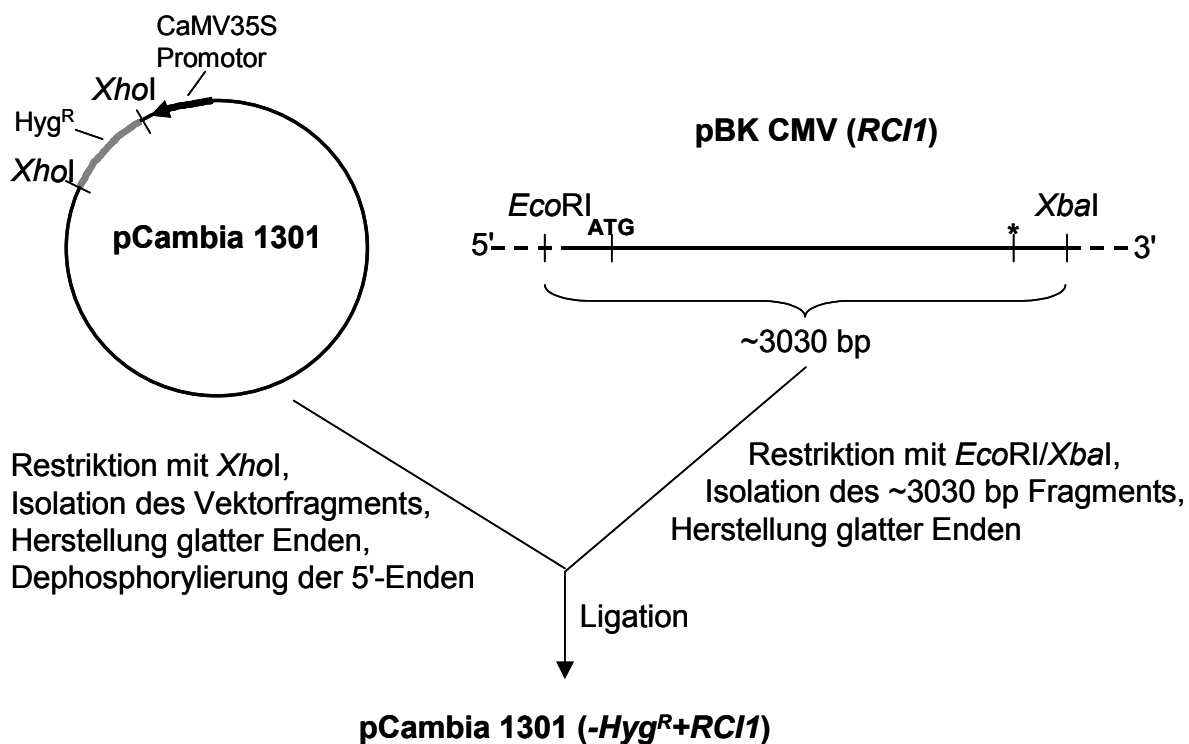


Abb. 3.8: Herstellung des Konstruktes pCambia 1301 ($-Hyg^R+RCI1$) für Überexpression von *RCI1* in Reisblättern durch transiente Transformation (ATG): Startcodon; (*): Stoppcodon; (*EcoRI*), (*XbaI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (Hyg^R): Sequenz des Hygromycinresistenzgens (weitere Erklärung im Text)

3.4.2 Test des Konstruktes zur Überexpression der Lipoxygenase *RCI1* in Reisblättern (Test der Transformationsmethode)

Da *RCI1*, wie in Kapitel 3.3 gezeigt, in den Chloroplasten lokalisiert ist, musste für die nachfolgenden Versuche eine Transformationsmethode gewählt werden, bei der möglichst viele chloroplastenhaltige Mesophyllzellen erreicht werden. Dies war

wichtig, da in den folgenden Versuchen zur Überexpression von *RCI1* in Reisblättern (s. 3.4.3) das RCI1-Protein in seine korrekte physiologische Umgebung transferiert werden sollte. Für die *A. tumefaciens*-vermittelte Transformation des Reiskultivars Kusabue mit pCambia 1301 (*-Hyg^R+RCI1*) (s. 3.4.1) wurde daher der Transformationserfolg zunächst mittels GUS-Färbung unter dem Mikroskop ausgewertet (s. 2.3.15.2).

Es wurden sowohl Blattfragmente von 12 Tage alten Kusabuepflanzen (Vakuuminfiltration), als auch intakte Blätter (Zangeninfiltration) wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (*-Hyg^R+RCI1*)) infiltriert. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 3.9 dargestellt.

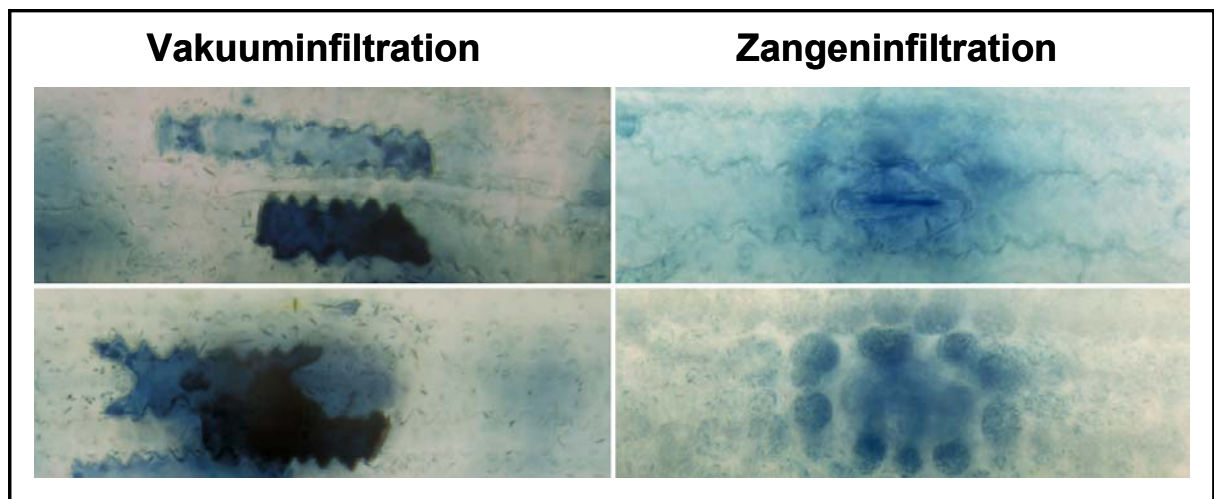


Abb. 3.9: GUS-Färbung von transformierten Zellen in Reisblättern des Kultivars Kusabue nach Infiltration mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (*-Hyg^R+RCI1*))
 linke Seite: auf die Epidermis fokussiert
 rechte Seite: oben auf ein Stoma in der Epidermis, unten auf die direkt unter der Spaltöffnung befindlichen Mesophyllzellen der substomatären Höhle fokussiert

Bei der mikroskopischen Auswertung (s. Abb. 3.9) der Präparate aus den Versuchen zur Transformation von Reisblattfragmenten mittels Vakuum konnte man erkennen, dass eine GUS-Färbung hier auch in den Epidermiszellen zu finden war. Bei Transformation durch Infiltration mit der Zange kam es hingegen vornehmlich zu einer Akkumulation von GUS-gefärbten Zellen im Mesophyll jeweils unterhalb der Stomata.

Da das RCI1-Protein unter physiologischen Bedingungen im Chloroplasten lokalisiert ist (s. 3.3) und Epidermiszellen keine Chloroplasten besitzen, wurde für die Versuche zur Überexpression von *RCI1* in Reisblättern (s. 3.4.3) aufgrund dieser Ergebnisse

die Zangeninfiltration angewendet. Dadurch sollten vermehrt Mesophyllzellen transformiert werden, in denen ein Transport des RCI1-Proteins in die Chloroplasten, also die physiologisch korrekte Umgebung, erfolgen kann.

3.4.3 Überexpression der Lipxygenase *RCI1* in Reisblättern durch transiente Transformation mit *A. tumefaciens*

3.4.3.1 Northernanalysen unter Verwendung von RNA der lokalen (infiltrierten) Blätter

Für erste Untersuchungen zur möglichen Rolle der Lipxygenase RCI1 in der chemisch induzierten Resistenz von Reispflanzen wurden intakte Blätter von 12 Tage alten Kusabuepflanzen wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit Infiltrationsmedium, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301), also Bakterien mit dem leeren Ausgangsvektor als Kontrollansatz, und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)), also Bakterien mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt, infiltriert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die infiltrierten Bereiche als Proben für die anschließende RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1) und Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) geerntet.

Abb. 3.10 zeigt Autoradiogramme einer solchen Northernanalyse. Die RNA-Proben wurden mit verschiedenen Sonden hybridisiert.

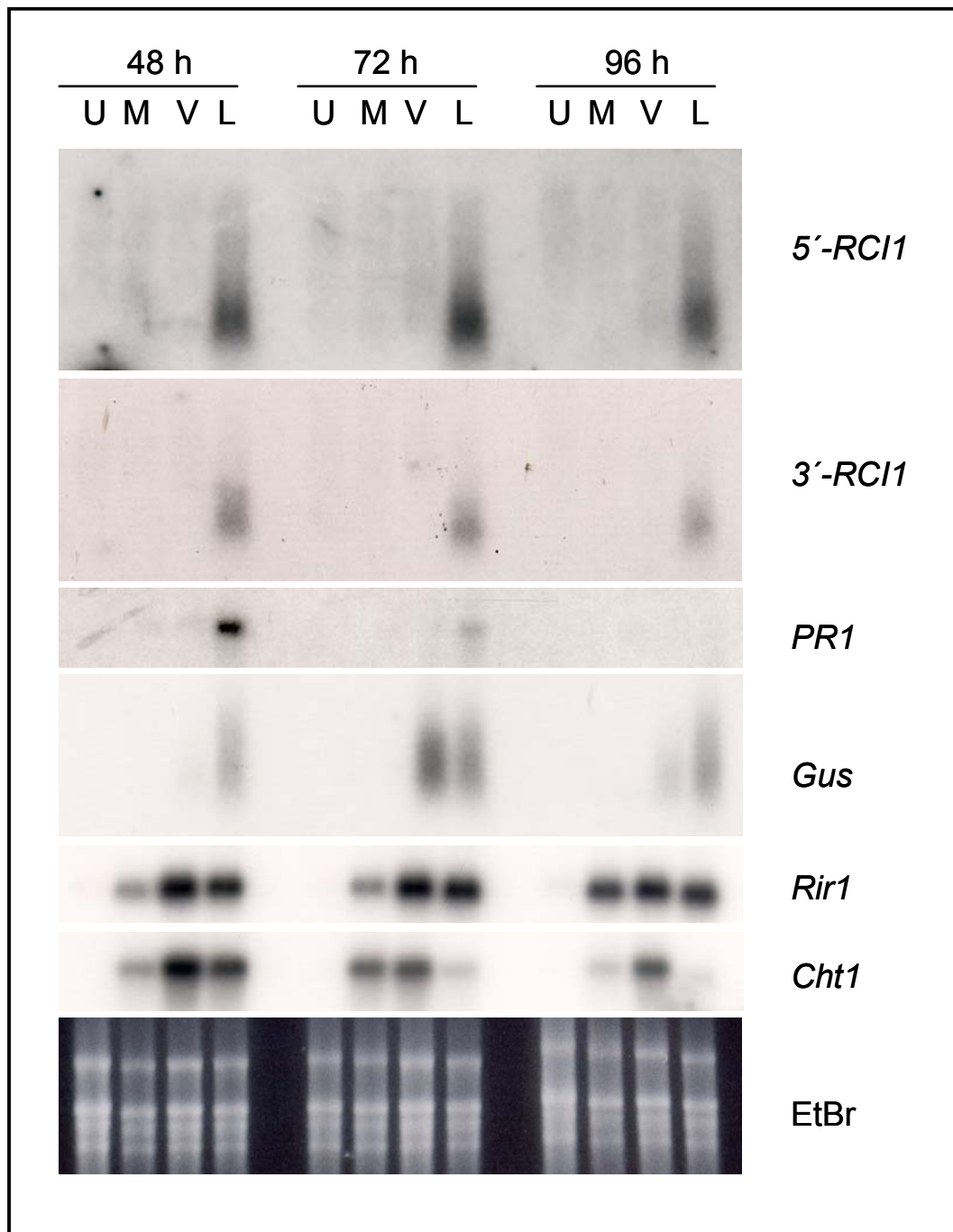


Abb. 3.10: Autoradiogramme der Northernanalysen von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue

Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus unbehandelten Pflanzen (U), mit Medium (M), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) (L) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Infiltration isoliert. Verwendete Sonden 5'- und 3'-RCI1, PR1, Gus, Rir1 und Cht1 (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist exemplarisch das Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Alle für diese Northernanalyse verwendeten Gele wiesen äquivalente Ladung auf. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der dreimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

Auf den Autoradiogrammen waren nach Hybridisierung mit der Sonde *Rir1* (aus der *Rir1a*-cDNA; „*rice induced resistance-gene1*“; Mauch et al., 1998) in allen Proben aus infiltriertem Blattmaterial, also in mediuminfiltrierten Proben ebenso wie in mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301)-Kontrollansatz und mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*))-Expressionsansatz infiltrierten Proben, 48, 72 und 96 h nach Behandlung Signale zu erkennen. Die Intensität der Signale schien in den ersten 48 bzw. 72h nach Infiltration in den Proben aus der Mediumkontrolle etwas geringer als in den beiden *Agrobakterien*-Ansätzen, hingegen war 96 h nach Behandlung in allen drei Ansätzen eine nahezu äquivalente Transkriptakkumulation zu detektieren. In den unbehandelten Kontrollen war keinerlei Akkumulation von *Rir1*-Transkripten zu erkennen.

Auf dem Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Sonde *Cht1* (Chitinase aus Reis; Nishizawa et al., 1993) war in den mediuminfiltrierten Kontrollen eine leichte Akkumulation von *Cht1*-Transkripten mit einem Maximum zum Zeitpunkt 72 h nach Infiltration zu sehen. 96 h nach Infiltration war diese nur noch sehr schwach. Nach Infiltration mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301)-Kontrollansatz und dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*))-Expressionsansatz erfolgt jeweils eine starke Akkumulation von *Cht1*-Transkripten, die dann 72 und 96 h nach Infiltration rasch abnimmt. In den unbehandelten Kontrollen war keinerlei Akkumulation von *Cht1*-Transkripten zu erkennen.

Bei Verwendung der zwei *RCI1*-Sonden waren auf den Autoradiogrammen Hybridisierungssignale über den Bereich von etwa 4000 bis 300 b zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 h nach Infiltration in den Proben aus mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) infiltriertem Blattmaterial zu erkennen. Das Hauptsignal lag bei einer Größe von etwa 300-400 b und damit deutlich unterhalb der für *RCI1* erwarteten Größe von etwa 3000 b.

Ähnliche Beobachtungen konnte man auch nach der Hybridisierung mit der *Gus*-Sonde machen. Hierbei erhielt man nach Transformation mit dem Kontrollvektor pCambia 1301 (72 und 96 h nach Infiltration) und dem Expressionskonstrukt pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*) auf den Autoradiogrammen ähnliche Banden wie nach Hybridisierung mit den *RCI1*-Sonden (48, 72 und 96 h nach Infiltration). Die Signale waren 48 und 96 h nach Infiltration in den Proben mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt stärker als in denen mit pCambia 1301.

Bei Verwendung der Sonde *PR1* zeigte sich eine Akkumulation von *PR1*-Transkripten nur in Proben, die mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) infiltriert wurden (48 und 72 h nach Infiltration).

Diese Ergebnisse zeigen, dass schon die Infiltration von Medium oder Bakterien eine Akkumulation von *Cht1*- und *Rir1*-Transkripten bewirkt.

RCI1-spezifische Signale zeigten sich nur bei Proben, welche mit *A. tumefaciens*

LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) infiltriert wurden. Auch *Gus*-spezifische Signale waren nur in Proben zu detektieren, welche mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) infiltriert wurden. Beide Vektoren tragen das *Gus*-Gen. Ob es sich bei den erhaltenen *RCI1*-spezifischen Signalen und *Gus*-spezifischen Signalen um den Nachweis von Transkripten der entsprechenden Transgene handelt, soll an anderer Stelle untersucht werden (s. 3.5.5).

PR1-spezifische Transkripte akkumulieren nur nach Transformation mit der *RCI1*-cDNA unter Kontrolle des CaMV35S-Promotors. In den Kontrollansätzen mit Medium bzw. nach Transformation mit dem unveränderten binären Vektor pCambia 1301 wird *PR1* nicht verstärkt transkribiert. Es ist daher anzunehmen, dass die Bildung des *RCI1*-Proteins die *PR1*-Transkription induziert hat.

3.4.3.2 Northernanalysen zum Vergleich der Expressionsmuster in transient transformierten infiltrierten („lokalen“) und angrenzenden („systemischen“) Blattbereichen

Es sollte nun untersucht werden, ob die Überexpression von *RCI1* die Akkumulation von *PR1*-Transkripten in Reisblättern nur im lokalen Infiltrationsbereich bewirken kann, oder ob ein systemisches Signal auch zu einer Akkumulation von *PR1*-Transkripten in weiter von der Infiltrationstelle entfernten Blattabschnitten führt.

Es wurden daher intakte Blätter von 12 Tage alten Kusabuepflanzen wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit Infiltrationsmedium, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) infiltriert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden sowohl die infiltrierten Bereiche als auch die Bereiche 1 cm oberhalb der Infiltrationsstelle als Proben für die anschließende RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1) und Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) geerntet. Abb. 3.11 zeigt die Autoradiogramme einer solchen Northernanalyse zum Vergleich der Expressionsmuster in den unterschiedlichen Proben.

Die Transkripte von *Rir1* akkumulierten in allen Proben aus infiltriertem Blattmaterial, also in mediuminfiltrierten Proben ebenso wie in mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301)-Kontrollansatz und mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1))-Expressionsansatz infiltrierten Proben, 48 und 72 h nach Behandlung. Die Akkumulation der *Rir1*-Transkripte schien allerdings in den Ansätzen mit *Agrobacterium* stärker als in den Medium-infiltrierten Proben.

Cht1-Transkripte waren in Proben aus Blattmaterial 48 h nach Infiltration mit

A. tumefaciens zu detektieren.

Rir1-Transkripte schienen im Gegensatz zu *Cht1*-Transkripten auch in Proben aus dem nicht direkt infiltrierten („systemischen“) Blattmaterial (48 und 72 h nach Behandlung) zu akkumulieren.

Bei Verwendung der *RCI1*-Sonde waren Hybridisierungssignale über den Bereich von etwa 4000 bis 300 b zu den Zeitpunkten 48 und 72 h nach Infiltration in den Proben aus mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) infiltrierten Blattmaterial zu erkennen. In Proben aus dem nicht direkt infiltrierten („systemischen“) Blattmaterial konnten diese Signale nicht detektiert werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Hybridisierung mit der *Gus*-Sonde beobachtet. Hierbei erhielt man Banden nach Transformation mit pCambia 1301 (72 h nach Infiltration) und pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*) (48 und 72 h nach Infiltration) lediglich in Proben aus dem direkt infiltrierten („lokalen“) Blattbereich. In den Proben nach Infiltration von Bakterien mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt waren die *Gus*-spezifischen Signale deutlich stärker als in der nach Infiltration von Bakterien mit pCambia 1301.

Bei Verwendung der Sonde *PR1* konnte eine Akkumulation von *PR1*-spezifischen Transkripten nur in den Proben, die mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt transformiert worden waren, innerhalb der infiltrierten Blattbereiche festgestellt werden. In Proben aus nicht infiltrierten Blattbereichen war keine Akkumulation von *PR1*-Transkripten zu detektieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Infiltration von Medium oder Bakterien allein eine Akkumulation von *Cht1*- und *Rir1*-Transkripten in den infiltrierten Blattbereichen bewirken konnte. Ebenso konnten diese Behandlungen die Akkumulation von *Rir1*-Transkripten in Proben aus dem nicht direkt infiltrierten („systemischen“) Blattmaterial induzieren.

RCI1-spezifische Signale zeigten sich nur bei Proben aus direkt infiltriertem Blattmaterial, welches mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) infiltriert wurde. Es kommt also durch Transformation mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt nicht zur Generierung eines Signals, welches die Expression des pflanzeneigenen *RCI1* in angrenzendem Gewebe induziert. Auch *Gus*-spezifische Signale waren nur in Proben zu detektieren, welche mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) infiltriert wurden. Beide Vektoren tragen das *Gus*-Gen.

Ob es sich bei den erhaltenen *RCI1*-spezifischen Signalen und *Gus*-spezifischen Signalen um den Nachweis von Transkripten der entsprechenden Transgene handelt, soll an anderer Stelle untersucht werden (s. 3.5.5).

Für die Induktion der Akkumulation von *PR1*-Transkripten war auch nach diesen

Ergebnissen eine Infiltration mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg^R*+*RCI1*))-Expressionsansatz notwendig. Diese Akkumulation könnte, wie schon in Kapitel 3.4.3.1 beschrieben, auf die Transformation mit *RCI1* unter Kontrolle eines konstitutiven Promotors zurückzuführen sein. Dies führt aber nicht zur Akkumulation *PR1*-spezifischer Transkripte in Proben aus angrenzenden („systemischen“) Blattbereichen.

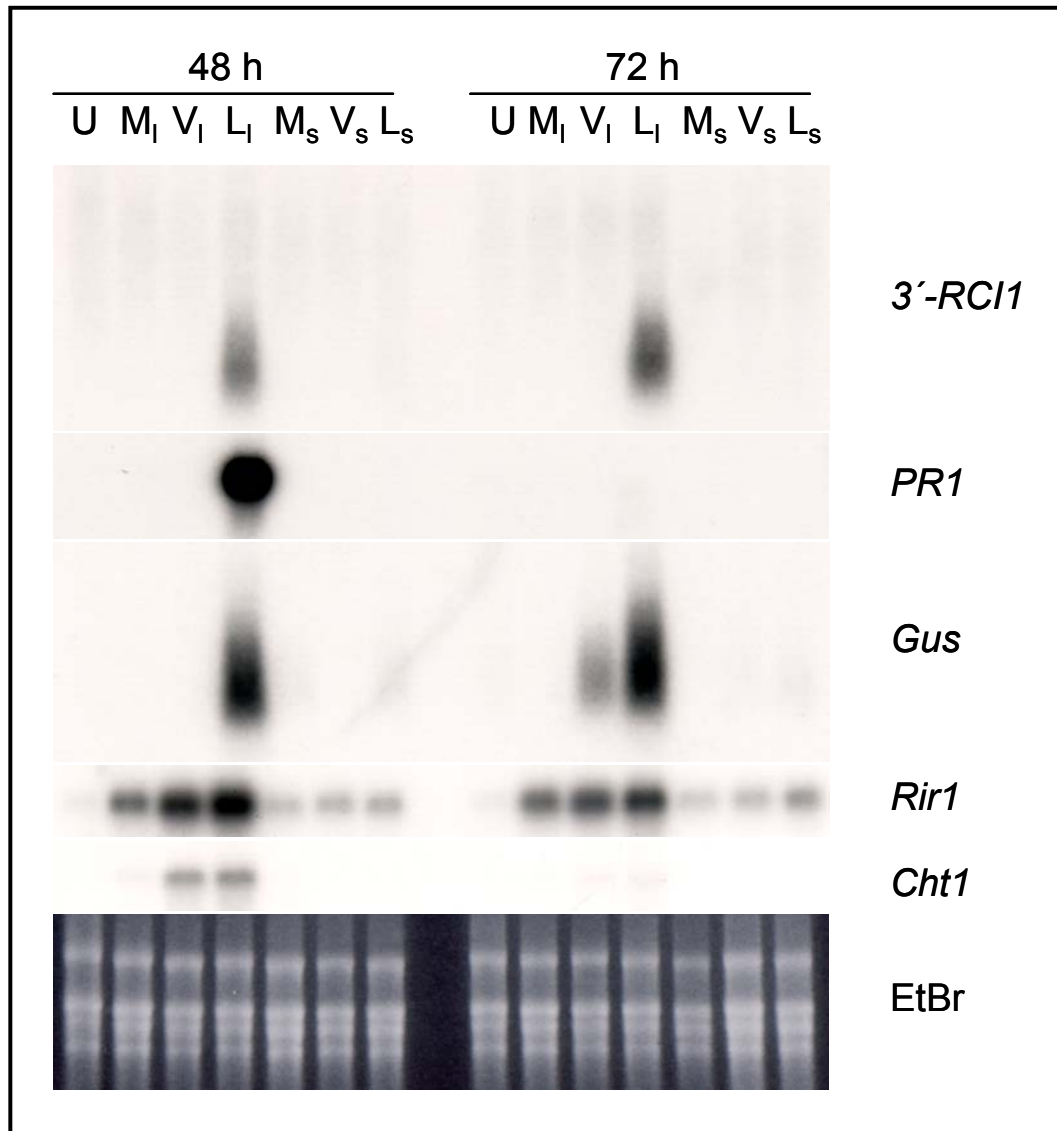


Abb. 3.11: Autoradiogramme einer Northernanalyse von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue
Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus unbehandelten Pflanzen (U), mit Medium (M), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg^R*+*RCI1*)) (L) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Infiltration isoliert. Die Indices bezeichnen Proben aus dem lokalen, d.h. infiltrierten Bereich des Blattes (l) oder einem Bereich 1 cm oberhalb der Infiltrationsstelle (s). Verwendete Sonden 3'-*RCI1*, *PR1*, *Gus*, *Rir1* und *Cht1* (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist exemplarisch das Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten

1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Alle für diese Northernanalyse verwendeten Gele wiesen äquivalente Ladung auf. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der dreimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

3.4.4 Messung der Lipxygenaseaktivität nach Überexpression von RCI1 in Reisblättern

Es sollte untersucht werden, ob eine transiente Überexpression von *RCI1* in Reisblättern nach Infiltration mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*)) (Konstrukt s. 3.4.1) zu einer nachweisbaren Erhöhung der LOX-Aktivität führt.

Hierzu wurden intakte Blätter von 12 Tage alten Kusabuepflanzen wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit Infiltrationsmedium, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*)) infiltriert. Dann erfolgte die Extraktion der Proteine aus 72 hpi geernteten Blättern (s. 2.3.1.2) und die Messung der Lipxygenaseaktivität (s. 2.3.2). In Abb. 3.12 ist die Bestimmung der spezifischen LOX-Aktivität der Extrakte zu sehen.

Die spezifische LOX-Aktivität in unbehandelten Reispflanzen betrug im dargestellten Versuch 0,045 nkat mg⁻¹ Protein, in den mit Medium infiltrierten Blättern 0,078 nkat mg⁻¹ Protein, in den mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301) infiltrierten Blättern 0,567 nkat mg⁻¹ Protein und in den mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*)) infiltrierten Blättern 0,595 nkat mg⁻¹ Protein.

Es kam sowohl in Blättern, welche mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*)) als auch in den mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301) infiltrierten Reisblättern zu einer Steigerung der gemessenen LOX-Aktivität im Vergleich zu unbehandelten oder mit Medium infiltrierten Blättern. Diese Steigerung der Enzymaktivität beruhte höchstwahrscheinlich auf einer Reaktion der Pflanze auf die Infektion mit *Agrobacterium tumefaciens*, während die Infiltration alleine (s. Kontrolle mit Medium) nur eine leichte Steigerung der Enzymaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hervorrief.

Es ist möglich, dass durch die Infektion mit *A. tumefaciens* bestimmte LOX-Isoenzyme in den Reispflanzen aktiviert werden, die zur Steigerung der Enzymaktivität nach Infiltration mit *A. tumefaciens* LBA 4404 beitragen. Diese Aktivitäten maskieren eine eventuelle, auf Transformation mit *RCI1* unter Kontrolle

eines konstitutiven Promotors basierende Erhöhung der Lipoxygenaseaktivität in den entsprechenden Proben.

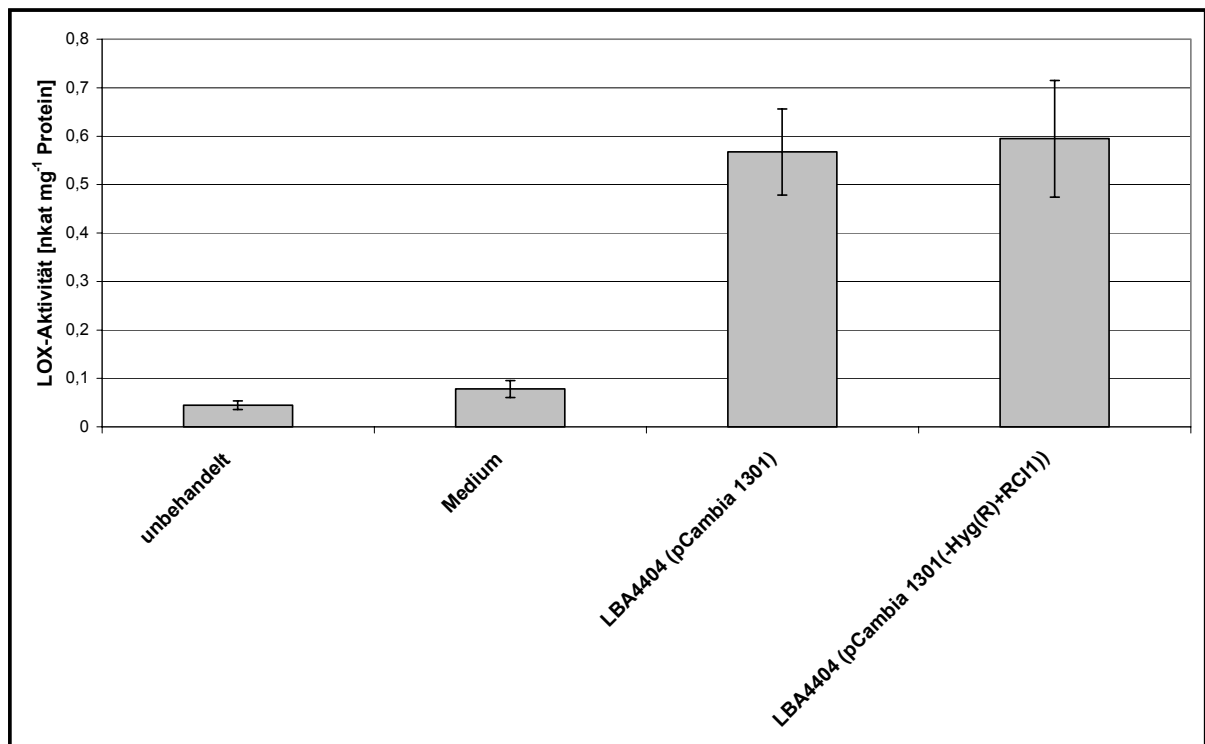


Abb. 3.12 : Spezifische Lipoxygenaseaktivitäten in Proteinextrakten aus transient transformierten Reispflanzen

Die Extraktion der Proteine aus 72 hpi geernteten Blättern erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.2 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der dreimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

(unbehandelt): unbehandelte Kontrollpflanzen; (Medium): mit Infiltrationsmedium infiltrierte Pflanzen; (LBA 4404 (pCambia 1301)): mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301) infiltrierte Pflanzen; (LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg(R)+RCI1))): mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) infiltrierte Pflanzen.

eine einzelne konservierte Aminosäure eine Abweichung zu den konservierten Resten in L-1. Das K-526 aus L-1 ist in RCI1 durch R-603 (unterstrichen) ersetzt. Die nummerierten Reste sind im aktiven Zentrum des Proteins.

Steczko et al. (1992) haben Mutanten von der Soja-Lipoxygenase L-1 hergestellt, in denen jeder der sechs konservierten Histidinreste einzeln entweder durch Glutamin oder Serin ausgetauscht wurde. Diese Mutanten wurden als rekombinante Proteine in *E. coli* BL21 exprimiert. Mutanten in Bezug auf H-499, H-504, H-690 besaßen keinerlei katalytische Aktivität mehr, während die Mutanten in Bezug auf H-494, H-517 und H-531 (siehe Abb. 3.13) nur noch 20 % der Aktivität des Wildtypproteins besaßen. Die Mutante H-522 hatte nur 1 % der ursprünglichen Aktivität von L-1. Bindungsstudien mit ^{59}Fe zeigten, dass H-499, H-504 und H-690 essentiell für die Bindung des Eisenatoms sind (Steczko and Axelrod, 1992). Die Histidinreste H-499, H-504 und H-690 von L-1 entsprechen den Resten H-576, H-581 und H-765 von RCI1 (s. Abb. 3.13).

Im Folgenden wird nun die Klonierung eines Konstruktes beschrieben, welches zu einer Deletion der Proteinsequenz von RCI1 zwischen AS 525 und AS 670 führt.

Die cDNA von *RCI1* besitzt an Position 1634 und 2069 der Nukleinsäuresequenz eine *PvuI*-Schnittstelle. Das Fragment von 435 bp zwischen den beiden Schnittstellen umfasst den Bereich von RCI1, welcher für H-571, H-576, H-581, H-599 und H-608 (entsprechend H-494, H-499, H-504, H-522 und H-531 von L-1) codiert.

Zur Herstellung einer Mutante von *RCI1* mit einer Deletion in der katalytischen Domäne („*RCI1katDel*“) wurde das 435 bp große *PvuI*-Fragment aus der cDNA deletiert (siehe Beschreibungen zur Herstellung der Konstrukte: 3.5.1 und 3.5.3).

Der Verlust der enzymatischen Aktivität des Deletionskonstruktes sollte anhand von Aktivitätsmessungen des rekombinanten Proteins verifiziert werden. *RCI1katDel* wurde dazu zur Expression in *E. coli* in den Vektor pDS56/RBSII, *SphI* kloniert (s. 3.5.1). Außerdem wurde die Mutante zur Überexpression in Reisblättern (s. 3.5.4) in den binären Vektor pCambia 1301 inseriert (s. 3.5.3).

3.5.1 Herstellung eines Konstruktes zur Expression des rekombinanten Proteins der Deletionsmutante *RCI1katDel* in *E. coli*

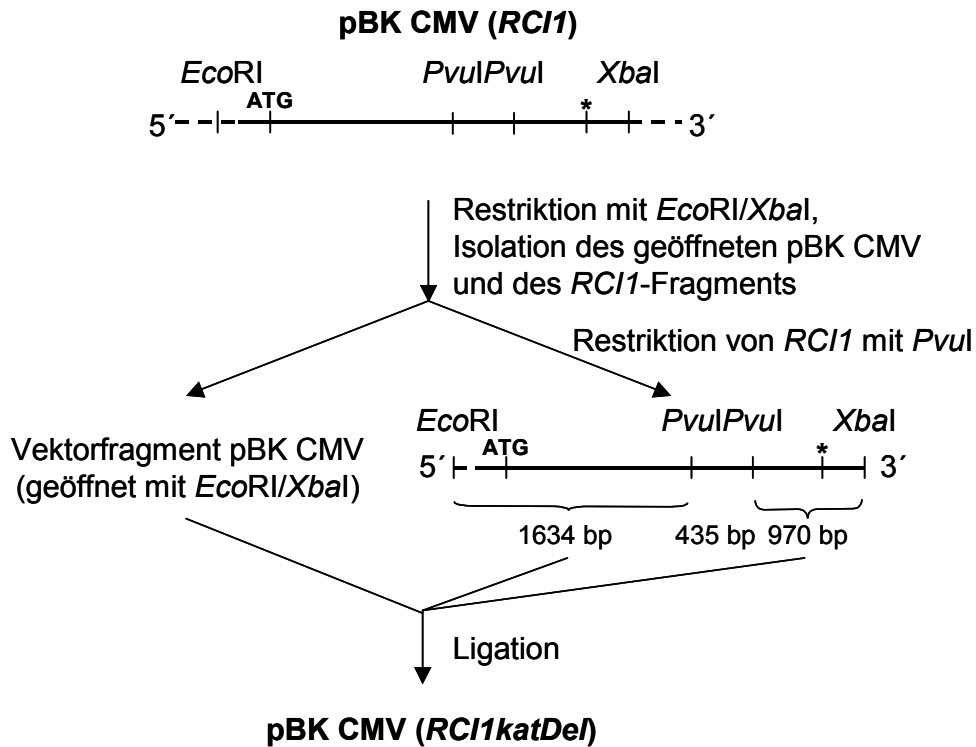
Für die Klonierung eines Konstruktes zur Expression des rekombinanten Proteins der Deletionsmutante *RCI1katDel* in *E. coli*-Zellen wurde zunächst ein Subklon der

Mutante in pBK CMV hergestellt.

Hierzu wurde pBK CMV (*RCI1*) einer Restriktion mit *EcoRI/XbaI* unterworfen. Das Vektorfragment und das *RCI1*-Fragment wurden isoliert. Das etwa 3040 bp große *RCI1*-Fragment wurde mit *PvuI* verdaut. Es entstanden drei verschieden große Fragmente: das 1634 bp-Fragment und das 970 bp-Fragment wurden in das Vektorfragment von pBK CMV aus der *EcoRI/XbaI*-Restriktion ligiert, das 435 bp-Fragment, welches die für das katalytische Zentrum von RCI1 codierende Sequenz enthielt, wurde verworfen. Das aus der Ligation hervorgegangene Konstrukt wurde pBK CMV (*RCI1katDel*) bezeichnet. Abb. 3.14/A gibt die Klonierung dieses Subklons wieder.

Zur Herstellung des Expressionskonstruktes für das rekombinante RCI1katDel-Protein wurde aus dem Expressionskonstrukt für das rekombinante RCI1-Protein (pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*); s. 3.1.1) mit *PstI/Bsp120I* ein 1824 bp-Fragment aus der *RCI1* cDNA gegen das 1399 bp-Fragment aus dem Subklon pBK CMV (*RCI1katDel*) ausgetauscht. Diesem fehlt der für die katalytische Domäne von RCI1 codierende Bereich. Die Strategie ist in Abb. 3.14/B skizziert. Das Konstrukt wurde in *E. coli* M15-Zellen transformiert (s. 2.2.11).

A



B

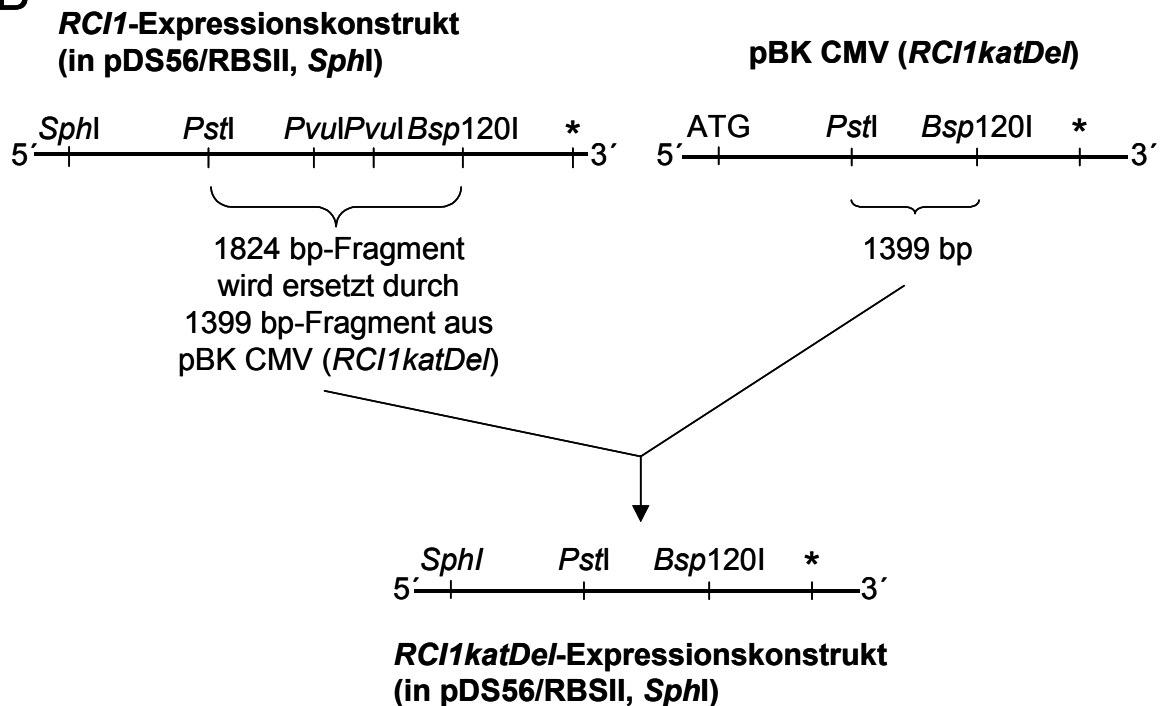


Abb. 3.14: Herstellung eines Konstruktes zur Expression des rekombinanten Proteins der Deletionsmutante *RCI1katDel* in *E. coli*

(A): Herstellung des Subklons von *RCI1katDel* in pBK CMV

(B): Herstellung von pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1katDel*)

(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*Bsp120I*), (*EcoRI*), (*PstI*), (*PvuI*), (*SphI*) und (*XbaI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme (Erklärungen im Text)

3.5.2 Messung der Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten Proteins RCI1katDel

Um zu verifizieren, dass das veränderte Protein keine Enzymaktivität mehr besitzt, wurde die spezifische Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten RCI1katDel-Proteins aus der Überexpression von *RCI1katDel* in *E. coli* (Herstellung des Konstruktes s. 3.5.1) im Vergleich zur Enzymaktivität des rekombinanten RCI1-Proteins bestimmt.

Hierzu erfolgte die Extraktion der rekombinanten RCI1- und RCI1katDel-Proteine wie in Kapitel 2.3.1.1 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. In Abb. 3.15 ist die Bestimmung der spezifischen LOX-Aktivität der Extrakte nach bakterieller Überexpression von RCI1 in *E. coli*-Zellen, verglichen mit der Enzymaktivität des rekombinanten RCI1katDel-Proteins aus den entsprechenden Bakterienextrakten, gezeigt. Als Kontrollen wurden Extrakte aus Kulturen der jeweiligen Ansätze ohne Induktion der Proteinexpression durch IPTG hergestellt.

Der Enzymextrakt aus bakterieller Überexpression von RCI1 besitzt in diesem Versuch eine Lipoxygenaseaktivität von $66,5 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (nach Zugabe von IPTG zur Induktion der Expression) bzw. $6,6 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (ohne IPTG). Die Extrakte aus der Überexpression des rekombinanten RCI1katDel-Proteins wiesen hingegen Aktivitäten von $1,6 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (mit IPTG-Induktion) bzw. $3,2 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (ohne IPTG) auf. Damit ist die Lipoxygenaseaktivität des RCI1-Proteins um 20 bis 30 mal höher als die des rekombinanten RCI1katDel-Proteins. Die Aktivität im nicht mit IPTG induzierten Ansatz mit dem *RCI1*-Konstrukt stammt wohl daher, dass der IPTG-induzierbare Promotor „leaky“ ist und es auch ohne IPTG zu einer geringen Expression von RCI1 in dem entsprechenden Ansatz kommt. Die gemessene Enzymaktivität dieser geringen RCI1-Proteinkonzentration liegt immer noch deutlich über der in den RCIkatDel-Extrakten.

RCI1katDel besitzt also keine Lipoxygenaseaktivität. Somit handelt es sich bei RCI1katDel um ein nicht mehr aktives Enzym.

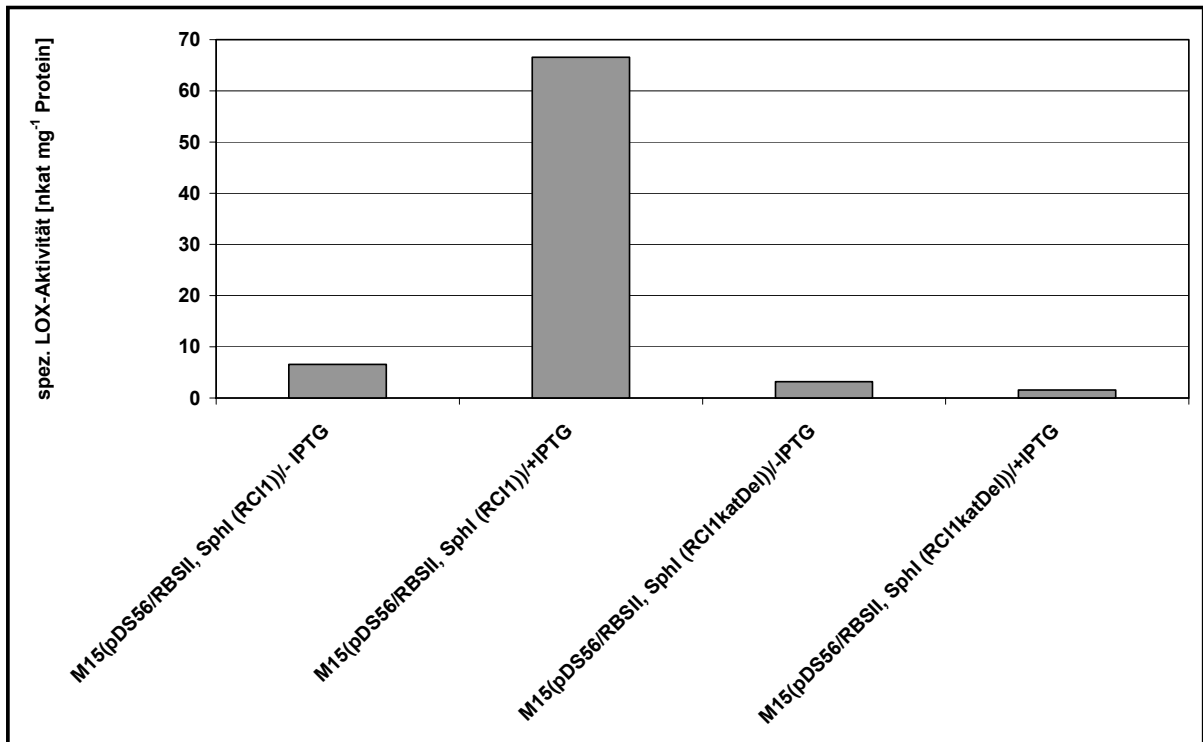


Abb. 3.15 : Spezifische Lipoxygenaseaktivitäten in bakteriellen Proteinextrakten

Die Extraktion der rekombinanten RCI1- und RCI1katDel-Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.1 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der dreimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

(M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1)) ohne IPTG-Zugabe;

(M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1)) nach IPTG-Zugabe;

(M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1katDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel)) ohne IPTG-Zugabe;

(M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1katDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel)) nach IPTG-Zugabe. (weitere Erklärung im Text)

3.5.3 Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Deletionsmutante *RCI1katDel* in Reisblättern

Zur Herstellung des Konstruktes für die Überexpression von *RCI1katDel* in Reisblättern wurde aus dem Subklon pBK CMV (*RCI1katDel*) (s. Abb. 3.16/A und vergl. Kapitel 3.5.1) mit *EcoRI/XbaI* das Deletionskonstrukt herausgeschnitten und die überhängenden Enden auf glatte Enden aufgefüllt (s. 2.2.6).

Aus dem Vektor pCambia 1301 (s. auch Kapitel 3.5.1) wurde mittels *Xho*I das Hygromycinresistenzgen herausgeschnitten (s. Abb. 3.16/B), die überhängenden Enden wurden aufgefüllt und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.7). Dann erfolgte die Ligation des *Eco*RI/*Xba*I-Fragments von *RCI1katDel* in das Vektorfragment. Die korrekte Orientierung von *RCI1katDel* in Bezug auf den CaMV35S-Promotor wurde mittels Restriktionsanalyse kontrolliert. Das resultierende Konstrukt wurde als pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1katDel*) bezeichnet und durch Elektroporation (s. 2.2.14) in *A. tumefaciens* LBA4404 transformiert.

3.5.4 Überexpression der Deletionsmutante *RCI1katDel* in Reisblättern durch transiente Transformation mit *A. tumefaciens*

Für die Untersuchungen der Auswirkung einer Überexpression der Mutante *RCI1katDel* von *RCI1* in Reisblättern wurden intakte Blätter von 12 Tage alten Kusbuepflanzen wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit Infiltrationsmedium, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301), *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*)) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1katDel*)) infiltriert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die infiltrierten Bereiche als Proben für die anschließende RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1) und Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) geerntet.

Abb. 3.17 zeigt die Autoradiogramme von solchen Northernanalysen zum Vergleich der Expressionsmuster verschiedener Sonden in den unterschiedlichen Proben.

Auf den Autoradiogrammen war zu sehen, dass nach Hybridisierung mit der Sonde *Cht1* in allen Proben aus infiltriertem Blattmaterial, also in mediuminfiltrierten Proben ebenso wie in mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301)-Kontrollansatz, mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1*))-Expressionsansatz und dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+*RCI1katDel*))-Expressionsansatz infiltrierten Proben, 48 h nach Behandlung eine Akkumulation *Cht1*-spezifischer Transkripte zu erkennen waren. Die Akkumulation dieser Transkripte war nach Mediuminfiltration allerdings schwächer als in den anderen Ansätzen. Außerdem nahm die Intensität der Transkriptakkumulation in allen beschriebenen Proben 72 h nach Infiltration stark ab und war 96 h nach Infiltration nur noch schwach zu detektieren. In den unbehandelten Kontrollen war keinerlei Akkumulation von *Cht1*-Transkripten zu erkennen.

Auf dem Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Sonde *Rir1* war in den mediuminfiltrierten Kontrollen eine schwache Akkumulation von *Rir1*-Transkripten mit

einem Maximum zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 h nach Infiltration zu sehen. 96 h nach Infiltration war diese allerdings nur sehr schwach zu detektieren. Nach Infiltration mit dem *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301)-Kontrollansatz, *RCI1*-Expressionsansatz und dem *RCI1katDel*-Expressionsansatz erfolgte jeweils eine starke Akkumulation von *Rir1*-Transkripten nach 72 h, die dann 96 h nach Infiltration leicht abnahm. Die stärkste Akkumulation von *Rir1*-spezifischen Transkripten war in den Proben 48 und 72 h nach Infiltration mit dem CaMV35S:*RCI1*-Expressionskonstrukt detektierbar. In den unbehandelten Kontrollen war keinerlei Akkumulation von *Rir1*-Transkripten zu erkennen.

Bei Verwendung der beiden *RCI1*-Sonden waren wiederum Hybridisierungssignale über den Bereich von etwa 4000 bis 300 b zu den Zeitpunkten 48, 72 und 96 h nach Infiltration in den mit dem CaMV35S:*RCI1*-Expressionskonstrukt und den mit dem CaMV35S:*RCI1katDel*-Expressionskonstrukt infiltrierten Proben zu erkennen.

Ähnliche Ergebnisse wurden nach der Hybridisierung mit der *Gus*-Sonde beobachtet. Hierbei erhielt man nach Transformation mit pCambia 1301 (72 h und 96 h nach Infiltration), pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*) (48, 72 und 96 h nach Infiltration) und pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1katDel*) (72 und 96 h nach Infiltration) entsprechende Banden. In den Proben nach Infiltration von Bakterien mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt waren die *Gus*-spezifischen Signale deutlich stärker als in denen nach Infiltration von Bakterien mit pCambia 1301 oder pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1katDel*).

Eine Akkumulation *PR1*-spezifischer Transkripte konnte nur in den Proben festgestellt werden, die mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt transformiert worden waren. Die Transformation mit pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1katDel*) führte hingegen nicht zu einer Akkumulation *PR1*-spezifischer Transkripte.

In Kapitel 3.5.2 wurde gezeigt, dass das rekombinante *RCI1katDel*-Protein keine Lipxygenaseaktivität mehr besitzt. Der Verlust an enzymatischer Aktivität korreliert mit der fehlenden Induktion der *PR1*-Expression.

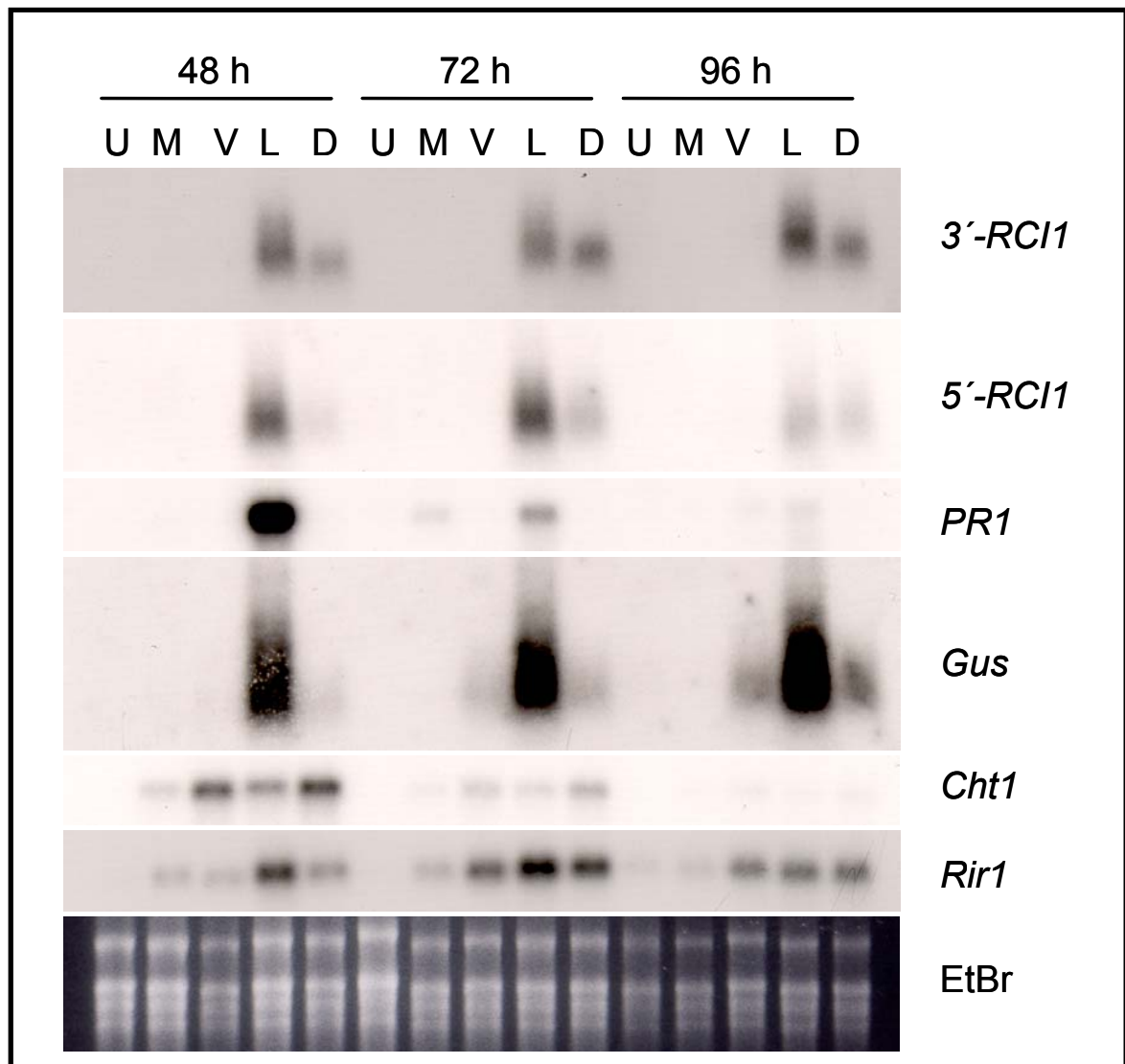


Abb. 3.17: Autoradiogramme einer Northernanalyse von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue

Gesamt-RNA (10 µg/Spur) stammt aus unbehandelten Pflanzen (U), mit Medium (M), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V), *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-HygR+RCI1)) (L) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-HygR+RCI1katDel)) (D) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Infiltration. Verwendete Sonden 5'- und 3'-RCI1, PR1, Gus, Rir1 und Cht1 (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist exemplarisch das Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Alle für diese Northernanalyse verwendeten Gele wiesen äquivalente Ladung auf. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der dreimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

3.5.5 Elimination von Plasmid-DNA aus den RNA-Proben nach transienter Transformation von Reisblättern mit *RC1*

In den unter Kapitel 3.4.3 und 3.5.4 beschriebenen Versuchen wurde versucht, *RC1*- und *Gus*-spezifische Transkripte der Transgene nach transienter Transformation nachzuweisen. Da die detektierten Fragmentgrößen in der Northernanalyse nicht mit der Größe der erwarteten RNA-Transkripte übereinstimmte, sollte zunächst untersucht werden, ob es sich hierbei um versuchsbedingt in den RNA-Proben zurückbleibende Plasmid-DNA der jeweilig infiltrierten Konstrukte handeln könnte. Um dies zu testen wurde eine Sonde aus einem Bereich von pCambia 1301 hergestellt (*Non-T-DNA*, s. 2.1.2.3), welcher aus dem nicht innerhalb der T-DNA liegenden Bereich des Plasmids stammt und somit bei der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation nicht in die Pflanzenzellen transferiert wird. Abb. 3.18 zeigt ein Autoradiogramm einer Northernanalyse nach Verwendung mit der beschriebenen Sonde.

In allen mit einem pCambia-Konstrukt transformierten Proben ist auf dem Autoradiogramm ein Hybridisierungssignal mit der *Non-T-DNA*-Sonde zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den erhaltenen Signalen um Plasmid-DNA aus *Agrobacterium* handeln könnte.

Da die in dieser Northernanalyse nachgewiesene Hybridisierung zwischen der Sonde und dem transformierten Plasmid erfolgte, ist sehr wahrscheinlich anzunehmen, dass auch die Hybridisierungssignale zwischen den LOX-spezifischen Sonden und den aus transformierten Pflanzen gewonnenen Nukleinsäuren auf Plasmid-Sonden-Hybride zurückzuführen sind und nicht mRNA-Transkripte der T-DNA nachweisen. Zur weiteren Klärung dieser Fragestellung wurde mRNA aus transformiertem Pflanzenmaterial extrahiert. Dies hat zum einen den Vorteil, dass eine weitere Anreicherung der mRNA erfolgt, hierdurch könnten dann auch gering exprimierte Gene nachgewiesen werden, und zum anderen sollte dadurch die Plasmid-DNA sicher aus den Proben entfernt werden.

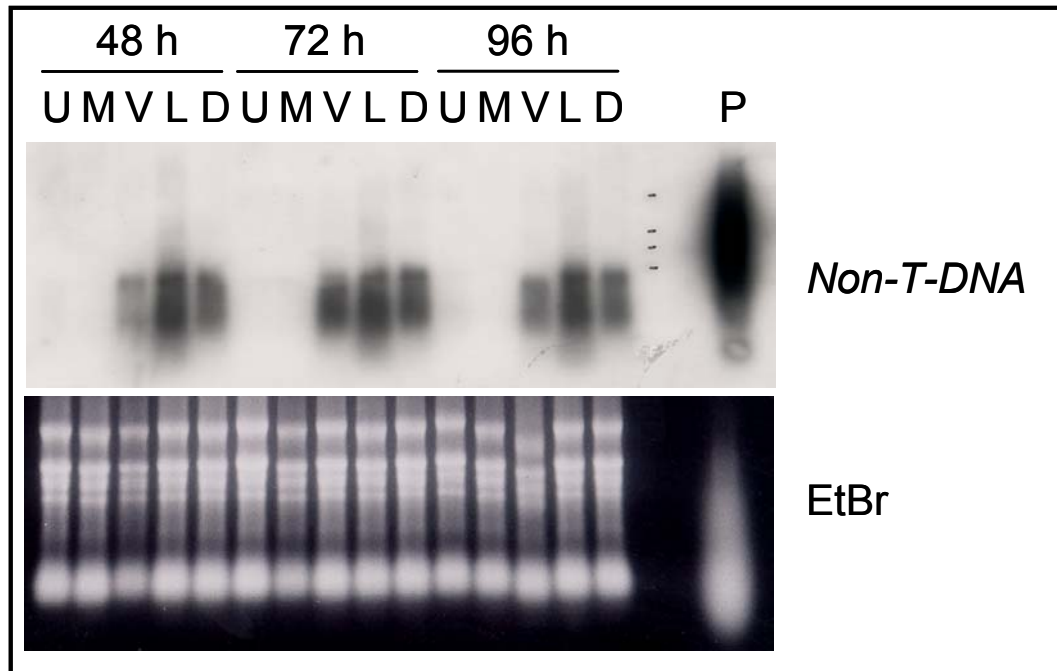


Abb. 3.18: Autoradiogramm einer Northernanalyse von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue
Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus unbehandelten Pflanzen (U), mit Medium (M), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V), *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) (L) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1katDel)) (D) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h, 72 h und 96 h nach Infiltration isoliert. Als Kontrolle wurde 0,1 µg Plasmid-DNA von pCambia 1301 aufgetragen (P). Verwendete Sonde Non-T-DNA (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist exemplarisch das Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Alle für diese Northernanalyse verwendeten Gele wiesen äquivalente Ladung auf. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der zweimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

Es wurden hierzu intakte Blätter von 12 Tage alten Kusabuepflanzen wie in Kapitel 2.2.27 beschrieben mit Infiltrationsmedium, *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301), *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1katDel)) infiltriert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (48 und 72 h nach Infiltration) wurden die infiltrierten Bereiche als Proben für die anschließende RNA-Extraktion (s. 2.2.16.2), Aufreinigung der PolyA⁺-RNA (s. 2.2.16.3) und Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) geerntet. Dafür wurden die Proben einer Behandlung, welche zu den beiden unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet wurden, miteinander vereinigt. Abb. 3.19 zeigt die zugehörigen Autoradiogramme.

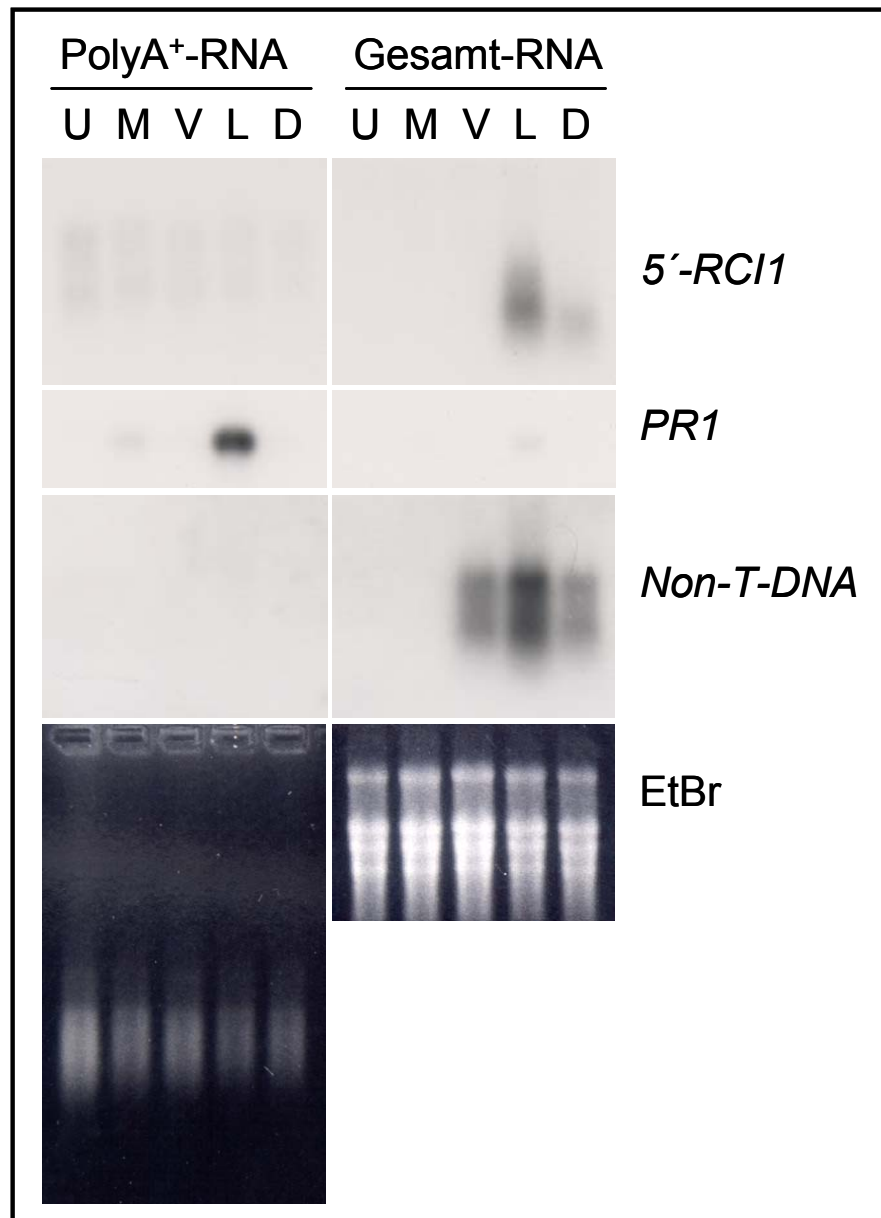


Abb. 3.19: Autoradiogramme einer Northernanalyse von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue

PolyA⁺- (1 µg/Spur) bzw. Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus unbehandelten Pflanzen (U), mit Medium (M), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V), *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1)) (L) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1katDel)) (D) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h (Proben wurden gepoolt) nach Infiltration isoliert. Verwendete Sonden 5'-RCI1, PR1 und Non-T-DNA (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist exemplarisch das Foto eines Ethidiumbromid-gefärbten 1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Alle für diese Northernanalyse verwendeten Gele wiesen äquivalente Ladung auf. Der Versuch wurde nicht nochmals durchgeführt.

Während in der Gesamt-RNA nach Hybridisierung mit der RCI1-Sonde in den mit pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1) und pCambia 1301 (-Hyg^R+RCI1katDel), bzw. nach

Hybridisierung mit der *Non-T-DNA*-Sonde in allen mit pCambia 1301-Konstrukten transformierten Proben deutlich die beschriebenen Hybridisierungssignale zu erkennen waren, konnten diese nach Aufreinigung der PolyA⁺-RNA eliminiert werden. Daher ist anzunehmen, dass es sich hierbei, wie angenommen, um Hybridisierungs-Signale durch Plasmid-DNA in den RNA-Proben handelte.

Gleichzeitig war trotz der durch die Aufreinigung bedingten Aufkonzentration der mRNA keinerlei Akkumulation von *RCI1*-Transkripten nach Transformation pCambia 1301 (*-Hyg^R+RCI1*) zu detektieren.

Bei Hybridisierung mit der *PR1*-Sonde war in diesem Versuch nur ein schwaches Hybridisierungssignal exklusiv im mit pCambia 1301 (*-Hyg^R+RCI1*) transformierten Ansatz zu detektieren, welches jedoch nach Aufreinigung der PolyA⁺-RNA deutlich verstärkt wurde, das heißt, die Anreicherung der Transkripte durch die Methode war erfolgreich. Es scheint nach diesen Ergebnissen also wirklich das Vorhandensein des vollständigen, funktionalen *RCI1*-Klons für die Induktion der *PR1*-Expression notwendig zu sein. Allerdings konnten keine Transgen-Transkripte detektiert werden.

3.6 Analyse einer Deletionsmutante von *RCI1* bezüglich des chloroplastidären Transitsignalpeptids (*RCI1cpTPDel*)

Um festzustellen, ob die chloroplastidäre Lokalisation von *RCI1* für die Induktion der Expression von *PR1* notwendig ist, sollte eine Mutante von *RCI1* („*RCI1cpTPDel*“) hergestellt werden, die zwar noch LOX-Aktivität besitzt, aber die aufgrund einer Deletion des N-terminalen Signalpeptids (s. 3.3) nicht mehr in die Chloroplasten transferiert werden kann.

Diese Mutante musste sowohl in den bakteriellen Überexpressionsvektor pDS56/RBSII, *SphI* kloniert werden (s. 3.6.1), um die Aktivität des rekombinanten *RCI1cpTPDel*-Proteins zu verifizieren (s. 3.6.2), als auch in den binären Vektor pCambia 1301 (s. 3.6.3) zur Überexpression des Konstruktes in Reisblättern (s. 3.6.4). Abschließend sollte durch eine Reporterfusion aus *RCI1cpTPDel* und GFP (s. 3.6.5) nachgewiesen werden, dass das Protein nicht in die Chloroplasten transferiert wird.

3.6.1 Herstellung eines Konstruktes zur Expression eines rekombinanten Proteins mit einer Deletion im Transitpeptid von *RCI1* (*RCI1cpTPDel*) in *E. coli*

Für die Klonierung eines Konstruktes zur Expression des rekombinanten Proteins der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* in *E. coli*-Zellen wurde mittels PCR (s. 2.2.24) eine *SphI*-Schnittstelle in Position 130-136 bp der *RCI1* cDNA inseriert (s. Abb. 3.20/A und B). Hierdurch wurde eine Deletion der ersten 25 Aminosäuren im Vergleich zu *RCI1* erreicht. Der Reverseprimer fügt eine *SalI*-Schnittstelle am Ende des PCR-Fragments ein. Die Länge des PCR-Fragmentes betrug 330 bp. Die Sequenzen der hierzu verwendeten Primer sind in Tab. 3.5 und die Reaktionsparameter sind in Tab. 3.6 aufgeführt.

Tab. 3.5 : Sequenzen der zur Klonierung und Sequenzierung des Expressionskonstruktes von *RCI1cpTPDel* verwendeten Primer

Primername	Sequenz
cp-Del for/ <i>SphI</i>	5'-TTCCTTCTGCATGCAGCC-3'
cp-Del rev	5'-CCATCCATGTCGACGTACC-3'
RCIcpDelseq	5'-ATGTACACCTCGCTGCTG-3'

Tab. 3.6 : Parameter der zur Klonierung des Expressionskonstruktes von *RCI1cpTPDel* durchgeführten PCR

Reaktionsansatz (Endkonzentrationen)		Programm	
pBK CMV (<i>RCI1</i>)	0,5 µg	1. 94 °C	5 min
cp-Del for/ <i>SphI</i>	100 pmol	2. 94 °C	30 s
cp-Del rev	100 pmol	3. 45 °C	1 min
MgCl ₂	2,0 mM	4. 72 °C	1 min
dNTPs	0,2 mM	5. 94 °C	30 s
10xReaktionspuffer	5 µl	6. 54 °C	1 min
<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 u	7. 72 °C	1 min
A. bidest.	ad 50 µl	8. goto 5., 29x	
		9. 72 °C	5 min
		10. 4 °C	

Weiterhin wurde der Expressionsvektor pDS56/RBSII, *SphI* (Stüber et al., 1990) zur Zerstörung der bei der Klonierung störenden vektorinternen *XhoI*-Schnittstelle einer *XhoI*-Restriktion (s. 2.2.3.1) unterworfen. Die entstehenden überhängenden Enden

wurden mit Hilfe der Klenow-Polymerase (vgl. 2.2.6.1) aufgefüllt und der Vektor anschließend religiert (s. 2.2.9). Der resultierende Vektor wurde pDS56/RBSII, *SphI* –*XhoI* bezeichnet.

PCR-Fragment und pDS56/RBSII, *SphI* –*XhoI* wurden mit *SphI*/*Sall* verdaut und zusammenligiert (s. 2.2.9). Hieraus resultierte eine Zwischenstufe von *RCI1cpTPDel* in pDS56/RBSII, *SphI* –*XhoI* (s. Abb. 3.20/C). Aus der *RCI1*-cDNA wurde ein 2870 bp großes *XhoI*-Fragment isoliert (s. Abb. 3.20/D) und in die mit *XhoI*/*Sall* geöffnete Zwischenstufe von pDS56/RBSII, *SphI* –*XhoI* (*RCI1cpTPDel*) ligiert (s. Abb. 3.20/E). Die korrekte Orientierung des *XhoI*-Fragments in pDS56/RBSII, *SphI* –*XhoI* (*RCI1cpTPDel*) wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft. Ebenso wurde das PCR-Fragment und dessen Übergang in die *RCI1*-Sequenz mittels Sequenzierung (Sequenzierprimer s. Tab. 3.5) auf Korrektheit des Leserasters untersucht.

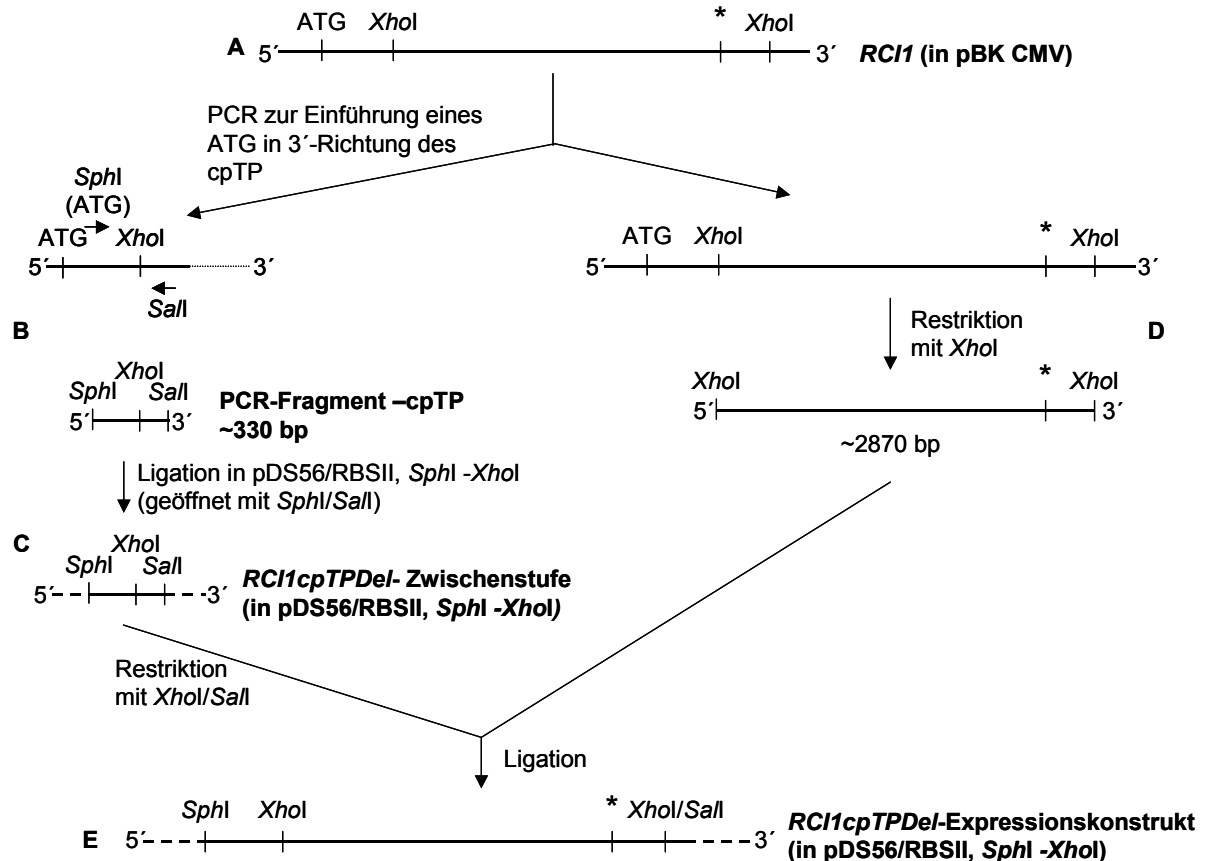


Abb. 3.20: Klonierungsstrategie: Expressionskonstrukt für das rekombinante *RCI1cpTPDel*-Protein (ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*Sall*), (*SphI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; →: Primer cp-Del for/*SphI* (s. Tab. 3.5); ←: Primer cp-Del rev (s. Tab. 3.5); (A-E): Klonierungsschritte (Erklärung im Text)

3.6.2 Messung der Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten Proteins RCI1cpTPDel

Um zu verifizieren, dass RCI1cpTPDel noch Enzymaktivität besitzt, sollte die spezifische Lipoxygenaseaktivität des rekombinanten RCI1cpTPDel-Proteins aus Überexpression von *RCI1cpTPDel* in *E. coli* (Herstellung des Konstruktes s. 3.6.1) im Vergleich zu den Enzymaktivitäten des rekombinanten RCI1-Proteins und der Deletionsmutante RCI1katDel bestimmt werden. Hierzu erfolgte die Extraktion der rekombinanten RCI1-, RCI1katDel- und RCI1cpTPDel-Proteine wie in Kapitel 2.3.1.1 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben.

In Abb. 3.21 ist die Bestimmung der spezifischen LOX-Aktivität der Extrakte nach bakterieller Überexpression von RCI1 („M15(pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*))/+IPTG“) im Vergleich zu der des rekombinanten RCI1katDel-Proteins („M15(pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1katDel*))/+IPTG“) sowie der des RCI1cpTPDel-Proteins („M15(pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1cpTPDel*))/+IPTG“) gezeigt. Als Kontrollen wurden Extrakte aus Kulturen der jeweiligen Ansätze ohne Induktion der Proteinexpression durch IPTG hergestellt und die LOX-Aktivität bestimmt.

Der Enzymextrakt aus bakterieller Überexpression von RCI1 besaß eine Lipoxygenaseaktivität von $12,3 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (nach Zugabe von IPTG zur Induktion der Expression) bzw. $0,9 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (ohne IPTG). Die Extrakte aus der Überexpression des rekombinanten RCI1cpTPDel-Proteins wiesen Aktivitäten von $6,2 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (mit IPTG-Induktion) bzw. $0,8 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (ohne IPTG) auf. Die Extrakte aus der Überexpression des rekombinanten RCI1katDel-Proteins wiesen hingegen Aktivitäten von $0,2 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (mit IPTG-Induktion) bzw. $0,4 \text{ nkat mg}^{-1}$ Protein (ohne IPTG) auf.

RCI1cpTPDel besaß demnach etwa 50 % der Aktivität des unveränderten RCI1-Proteins.

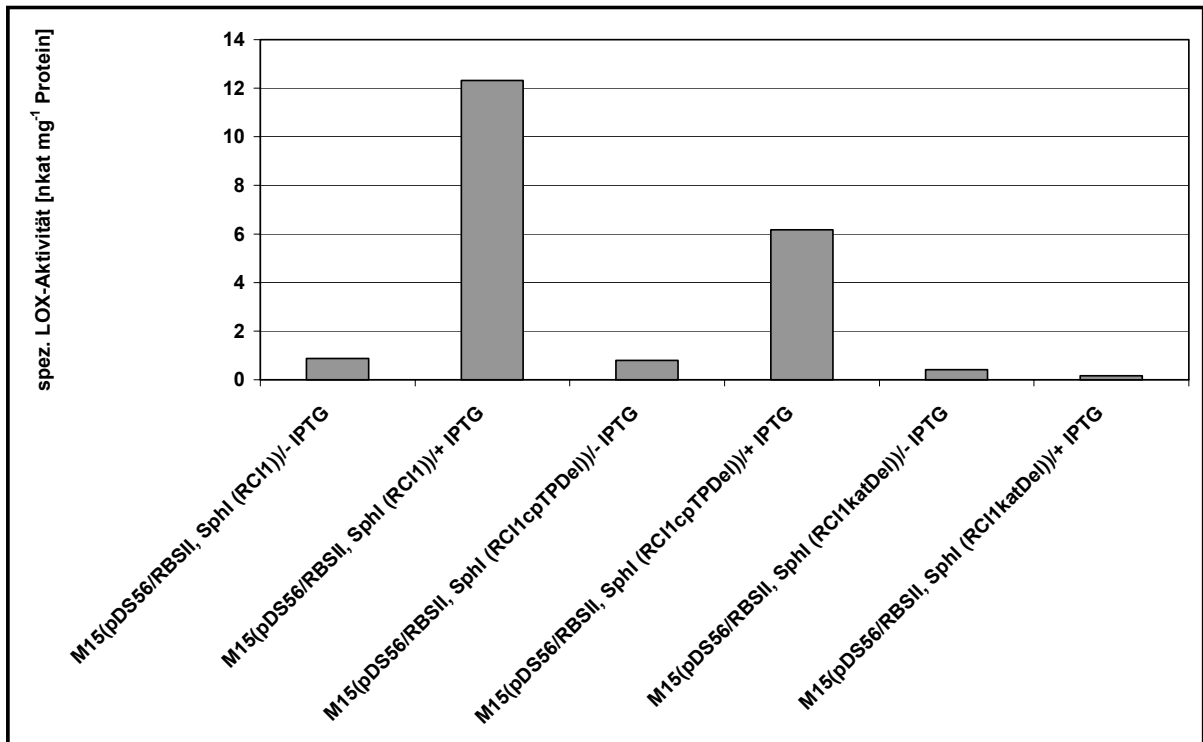


Abb. 3.21 : Spezifische Lipoxygenaseaktivitäten in bakteriellen Proteinextrakten

Die Extraktion der rekombinanten RCI1-, RCI1katDel- und RCI1cpTPDel-Proteine erfolgte wie in Kapitel 2.3.1.1 und die Messung der Lipoxygenaseaktivität wie unter 2.3.2 beschrieben. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der zweimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

(M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1)) ohne IPTG-Zugabe;
 (M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1)) nach IPTG-Zugabe;
 (M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1cpTPDel))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1cpTPDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1cpTPDel)) ohne IPTG-Zugabe;
 (M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1cpTPDel))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1cpTPDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1cpTPDel)) nach IPTG-Zugabe;
 (M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel))/-IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1katDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel)) ohne IPTG-Zugabe;
 (M15(pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel))/+IPTG): *E. coli* M15-Zellen mit dem RCI1katDel-Expressionskonstrukt (pDS56/RBSII, SphI (RCI1katDel)) nach IPTG-Zugabe. (Erklärung im Text)

3.6.3 Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* in Reisblättern

Für die Klonierung eines Konstruktes im Vektor pCambia 1301 zur Überexpression der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* in Reisblättern wurde mittels PCR (s. 2.2.24)

eine *NcoI*-Schnittstelle an Position 130-136 bp der *RCI1* cDNA inseriert (s. Abb. 3.22/A und B). Hierdurch wurde eine Deletion der ersten 25 Aminosäuren im Vergleich zu *RCI1* erreicht. Der Reverseprimer fügte eine *SalI*-Schnittstelle am Ende des PCR-Fragments ein. Die Länge des PCR-Fragmentes betrug 330 bp. Die Sequenzen der hierzu verwendeten Primer sind in Tab. 3.7 und die Reaktionsparameter sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.7 : Sequenzen der zur Klonierung des Konstruktes für die Überexpression von *RCI1cpTPDel* verwendeten Primer

Primernamenz	Sequenz
cp-Del for	5'-TTCCTTCTCCATGGAGCC-3'
cp-Del rev	5'-CCATCCATGTGCGACGTACC-3'

Tab. 3.8: Parameter der zur Klonierung des Konstruktes für die Überexpression von *RCI1cpTPDel* durchgeführten PCR

Reaktionsansatz (Endkonzentrationen)		Programm	
pBK CMV (<i>RCI1</i>)	0,5 µg	1. 94 °C	5 min
cp-Del for	100 pmol	2. 94 °C	30 s
cp-Del rev	100 pmol	3. 45 °C	1 min
MgCl ₂	2,0 mM	4. 72 °C	1 min
dNTPs	0,2 mM	5. 94 °C	30 s
10xReaktionspuffer	5 µl	6. 54 °C	1 min
<i>Taq</i> -Polymerase	2,5 u	7. 72 °C	1 min
A. bidest.	ad 50 µl	8. goto 5., 29x	
		9. 72 °C	5 min
		10. 4 °C	

Das PCR-Fragment wurde in pGEM T easy (s. 2.1.2.2) kloniert und die Orientierung des Fragments wurde durch Restriktionsanalyse kontrolliert (s. Abb. 3.22/C). Es wurde mit dem Konstrukt weitergearbeitet, bei dem die vektorinterne *SalI*-Schnittstelle in 5'-Richtung von der *NcoI*-Schnittstelle des PCR-Fragments und die vektorinterne *NcoI*-Schnittstelle in 3'-Richtung von der *SalI*-Schnittstelle des Fragments lag. Diese Vorstufe wurde anschließend mit *XhoI* geöffnet und aus der *RCI1*-cDNA wurde ein 2870 bp großes *XhoI*-Fragment eingefügt (s. Abb. 3.22/D). Die resultierende Zwischenstufe wurde als „Subklon pGEM T easy (*RCI1cpTPDel*)“ (s. Abb. 3.22/E) bezeichnet. Das Konstrukt wurde zur Kontrolle des PCR-Fragments unter Verwendung der Primer M13 Reverse und *RCIcpDelseq* (s. Tab. 3.5) sequenziert.

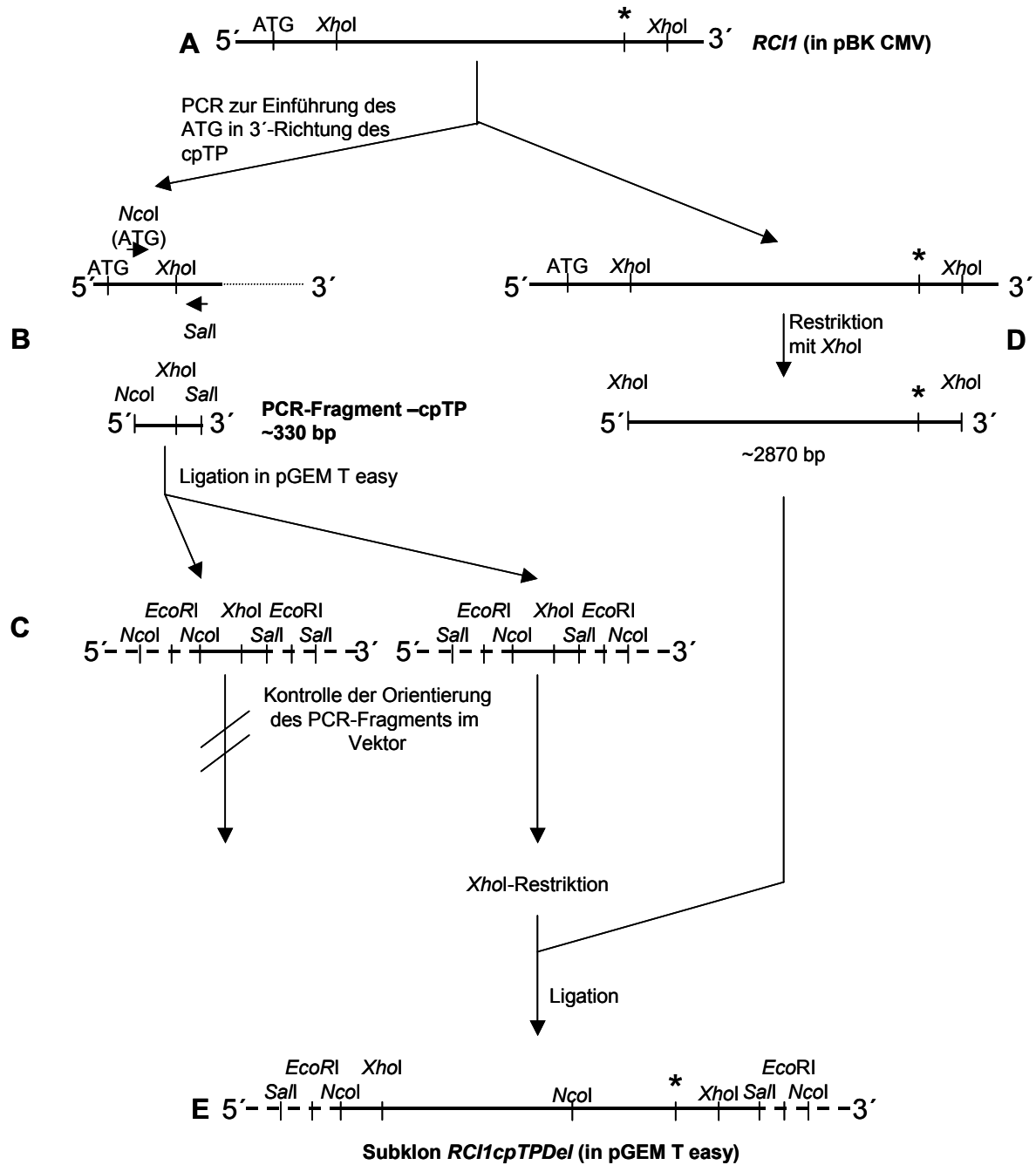


Abb. 3.22 : Herstellung des Subklons von *RCI1cpTPDel* in pGEM T easy für die Klonierung des Konstruktes in pCambia 1301 zur Überexpression von *RCI1cpTPDel* in Reisblättern und der GFP-Fusion von *RCI1cpTPDel* in pCambia 1302 (s. 3.6.5.1)
 (ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*EcoRI*), (*NcoI*), (*SalI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; →: Primer cp-Del for (s. Tab. 3.7); ←: Primer cp-Del rev (s. Tab. 3.7); (A-E): Klonierungsschritte (Erklärung im Text)

In Abb. 3.23 ist die weitere Vorgehensweise zur Klonierung von pCambia 1301 (-*Hyg^R*+*RCI1cpTPDel*) dargestellt.

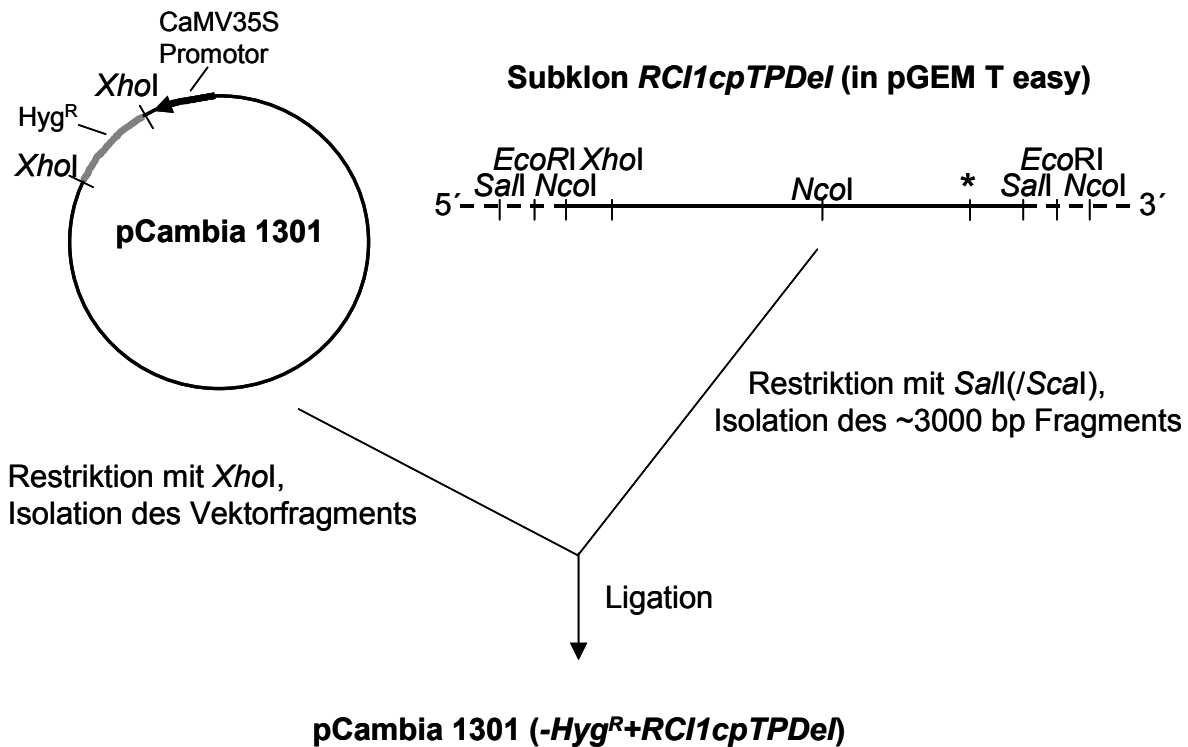


Abb. 3.23: Herstellung eines Konstruktes zur Überexpression der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* in Reispflanzen
(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*EcoRI*), (*NcoI*), (*SalI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (*Hyg^R*): Sequenz des Hygromycinresistenzgens (Erklärung im Text)

Aus dem oben beschriebenen Subklon in pGEM T easy (s. Abb. 3.22) wurde das *RCI1cpTPDel*-Konstrukt mit *SalI* isoliert. *Scal* wurde eingesetzt, um das Vektorfragment zu spalten, damit es im Agarosegel vom gleich großen *RCI1cpTPDel*-Fragment getrennt werden konnte. Gleichzeitig wurde aus pCambia 1301 mit *XhoI* die für die Hygromycinresistenz codierende Region deletiert und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.7). Danach wurde das *RCI1cpTPDel*-Fragment einligiert. Die Orientierung des Fragments in Bezug auf den CaMV35S-Promotor wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Das resultierende Konstrukt pCambia 1301 (-*Hyg^R*+*RCI1cpTPDel*) wurde durch Elektroporation (s. 2.2.14) in *A. tumefaciens* LBA4404 transformiert.

3.6.4 Transformation von Reisblättern mit einem Konstrukt zur Überexpression der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel*

Für die Untersuchungen der Auswirkung einer transienten Überexpression des Konstruktes *RCI1cpTPDel* von *RCI1* in Reisblättern wurden intakte Blätter von 12 Tage alten Kusabuepflanzen wie in Kapitel 2.2.26 beschrieben mit *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301), *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) und *A. tumefaciens* LBA 4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1cpTPDel*)) infiltriert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die infiltrierten Bereiche als Proben für die anschließende RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1) und Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) geerntet. Abb. 3.24 zeigt die Kinetik der *PR1*-Expression in den unterschiedlichen Proben.

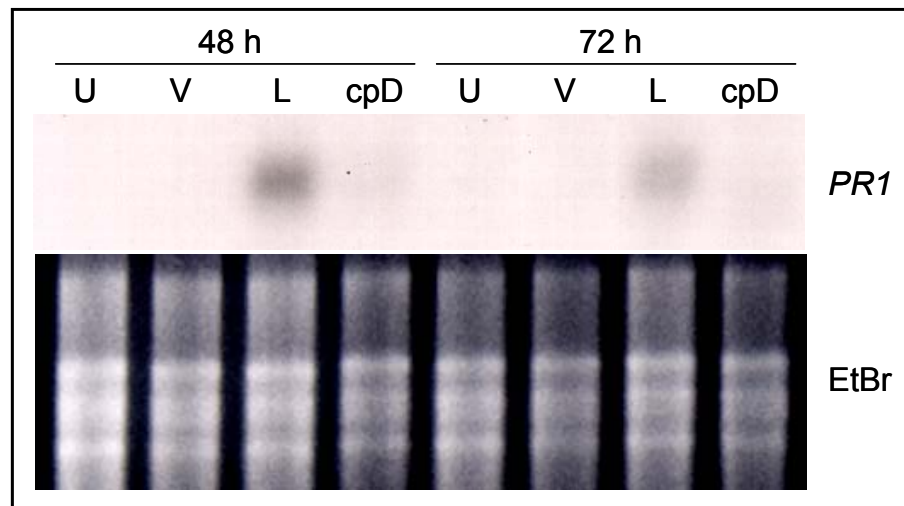


Abb. 3.24: Autoradiogramm einer Northernanalyse von RNA aus infiltrierten Reispflanzen der Sorte Kusabue

Gesamt-RNA (10 µg/Spur) wurde aus unbehandelten Pflanzen (U), mit *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301) (V), *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1*)) (L) oder *A. tumefaciens* LBA4404 (pCambia 1301 (-*Hyg*^R+*RCI1cpTPDel*)) (cpD) infiltrierten Pflanzen zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h nach Infiltration isoliert. Verwendete Sonde *PR1* (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist das Foto des Ethidiumbromid-gefärbten 1,2 % (w/v) Agarosegels gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, der zweimal mit identischem Ergebnis wiederholt wurde.

Auf dem Autoradiogramm konnte man erkennen, dass es lediglich in den mit dem CaMV35S:*RCI1*-Konstrukt transformierten Blattfragmenten sowohl 48 als auch 72 h nach Infiltration zu einer Akkumulation von *PR1*-Transkripten kam. In den mit dem *cpTPDel*-Konstrukt von *RCI1* transformierten Blattfragmenten konnte keinerlei Induktion der *PR1*-Expression festgestellt werden.

Das Vorhandensein des Signalpeptids am N-Terminus von *RCI1* scheint also für die

Induktion der *PR1*-Expression in Reisblättern notwendig zu sein.

3.6.5 Klonierung des Deletionskonstruktes *RCI1cpTPDel* in einen binären Vektor zur Untersuchung der Cytolokalisation

Damit die Lokalisation des *RCI1cpTPDel*-Proteins innerhalb der pflanzlichen Zelle verifiziert werden kann, sollten GFP-Fusionen des Konstruktes in binären Vektoren hergestellt werden. Diese sind fertiggestellt und stehen für weiterführende Arbeiten zur Verfügung. In den Kapiteln 3.6.5.1 und 3.6.5.2 wird die Herstellung zweier Konstrukte beschrieben.

3.6.5.1 Konstrukt *RCI1cpTPDel:GFP* in pCambia 1302

Für die Klonierung eines Konstruktes im Vektor pCambia 1302 zur Analyse der Cytolokalisation der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* wurde zunächst vom gleichen Subklon wie in Kapitel 3.6.3 beschrieben ausgegangen. Abb. 3.22 in Kapitel 3.6.3 zeigt die Vorgehensweise bei der Herstellung des Subklons (zur genauen Beschreibung s. 3.6.3).

In Abb. 3.25 ist die weitere Vorgehensweise für die Klonierung der GFP-Fusion von *RCI1cpTPDel* in pCambia 1302 dargestellt. Der Vektor pCambia 1302 wurde mit *NcoI* geöffnet und ein 1865 bp großes Fragment mit dem N-Terminus des Konstruktes *RCI1cpTPDel* aus dem Subklon in pGEM T easy wurde einligiert. Die Orientierung des *NcoI*-Fragmentes wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Das resultierende Konstrukt wurde als pCambia 1302 (*RCI1cpTPDel:GFP*) bezeichnet und durch Elektroporation (s. 2.2.14) in *A. tumefaciens* LBA4404 transformiert.

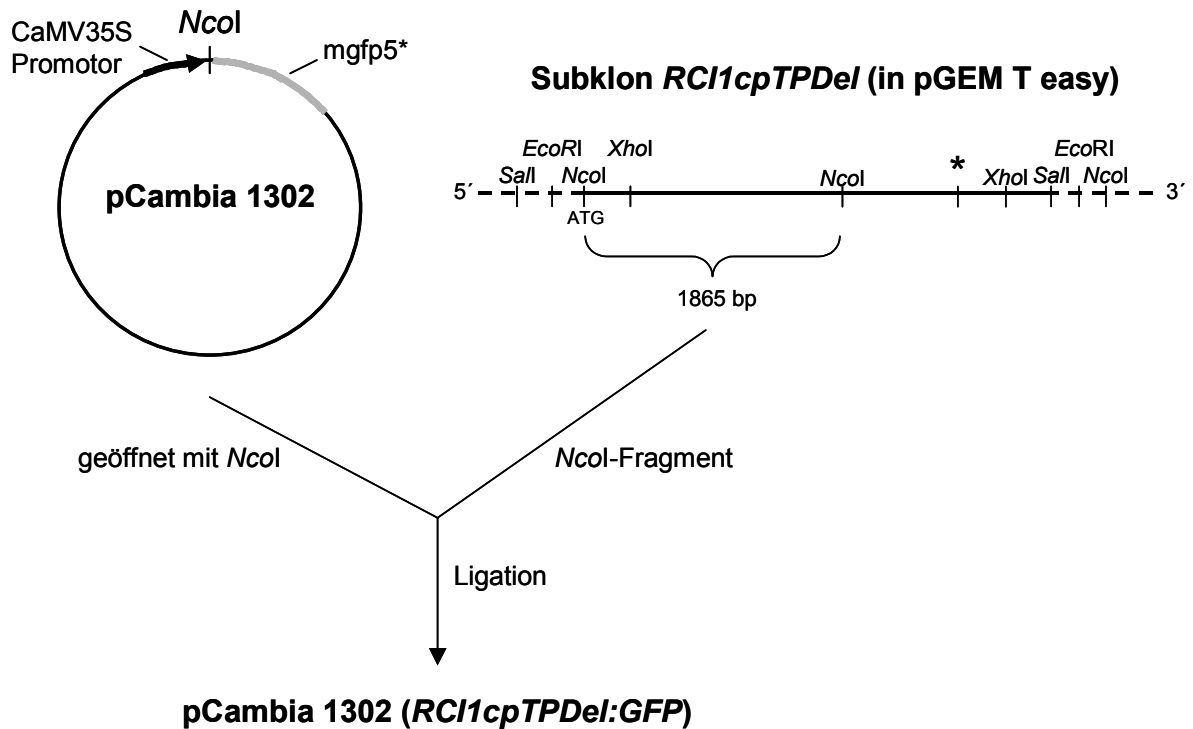


Abb. 3.25: Herstellung der GFP-Fusion von *RCI1cpTPDel* in pCambia 1302
 (ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*EcoRI*), (*NcoI*), (*SalI*) und (*XhoI*): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (mgfp5*): Sequenz des Reportergens *GFP* (Erklärung im Text)

3.6.5.2 Konstrukt *RCI1cpTPDel:GFP* in pCambia 1301

Zur Analyse der Cytolokalisation der Deletionsmutante *RCI1cpTPDel* wurde noch ein zweites Konstrukt in pCambia 1301 hergestellt (s. Abb. 3.26 und Abb. 3.27).

Hierfür wurde aus pCambia 1302 mittels *NcoI/NheI*-Restriktion ein etwa 1000 bp großes Fragment isoliert, welches fast die gesamte GFP-codierende Sequenz enthielt (bis auf die letzten 29 bp, welche fast ausschließlich für ein Histidin-Tag codieren). Aus dem Konstrukt für die Expression von *RCI1cpTPDel* in *E. coli* (pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1cpTPDel*), s. 3.6.1) wurde mit *SphI/NcoI* der N-terminale Bereich von *RCI1cpTPDel* isoliert. Beide Fragmente wurden in den *SphI/SpeI* geöffneten Vektor pGEM T easy kloniert (Subklon, s. Abb. 3.26).

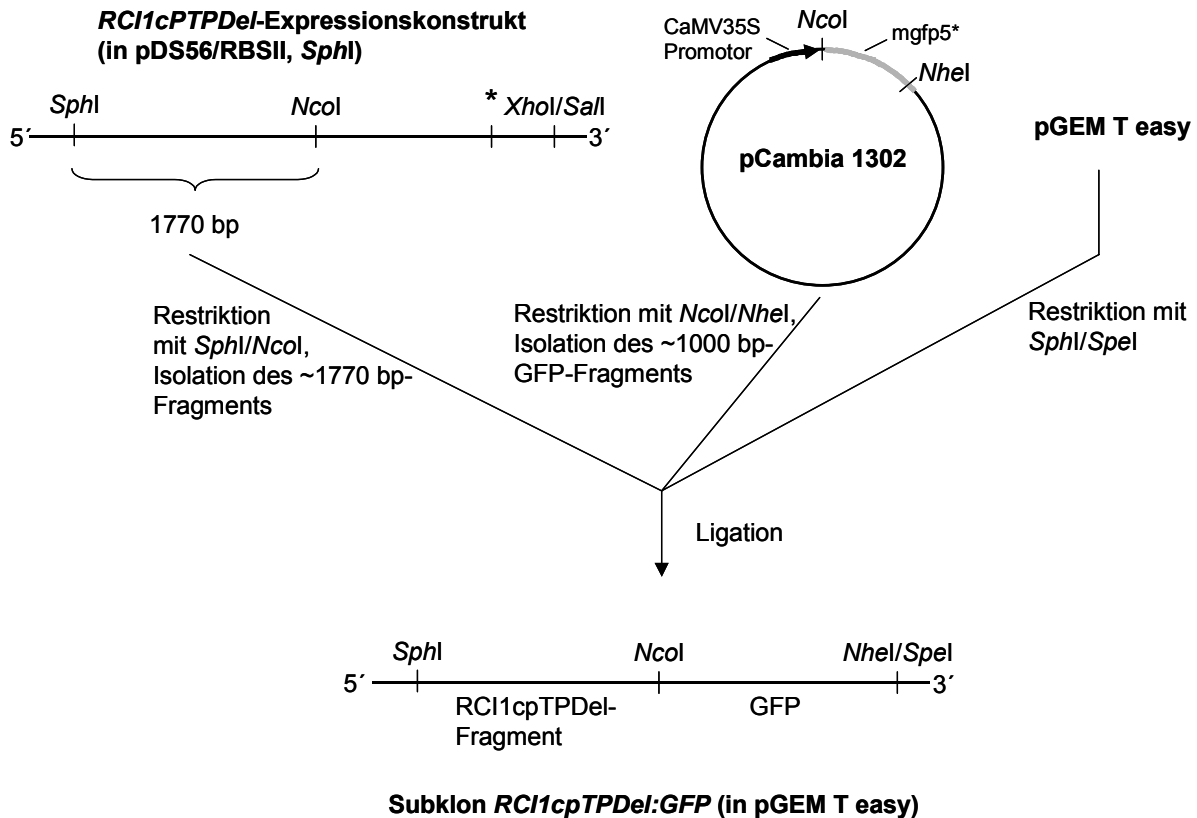


Abb. 3.26 : Herstellung des Subklons von *RC11cpTPDel* in pGEM T easy für die Klonierung der GFP-Fusion in pCambia 1301
(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (NcoI), (NheI), (SalI), (SphI) und (XhoI): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (mgfp5*): Sequenz des Reportergens GFP (Erklärung im Text)

Aus diesem Subklon wurde das *RC11cpTPDel:GFP*-Konstrukt mit *SphI/EcoRI* isoliert und die überstehenden Enden wurden auf glatte Enden (s. 2.2.6) aufgefüllt (s. Abb. 3.27). Gleichzeitig wurde aus pCambia 1301 mit *XhoI* die für die Hygromycinresistenz codierende Region deletiert, die überhängenden Enden wurden aufgefüllt und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.7). Danach wurde das *RC11cpTPDel:GFP*-Fragment einligiert. Hierdurch entstand ein neues Stopcodon, welches das fehlende der ursprünglichen GFP-Sequenz innerhalb des Konstrukts ersetzte. Die Orientierung des Fragments in Bezug auf den CaMV35S-Promotor wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Das resultierende Konstrukt wurde als pCambia 1301 (-Hyg^R+*RC11cpTPDel:GFP*) bezeichnet und durch Elektroporation (s. 2.2.14) in *A. tumefaciens* LBA4404 transformiert.

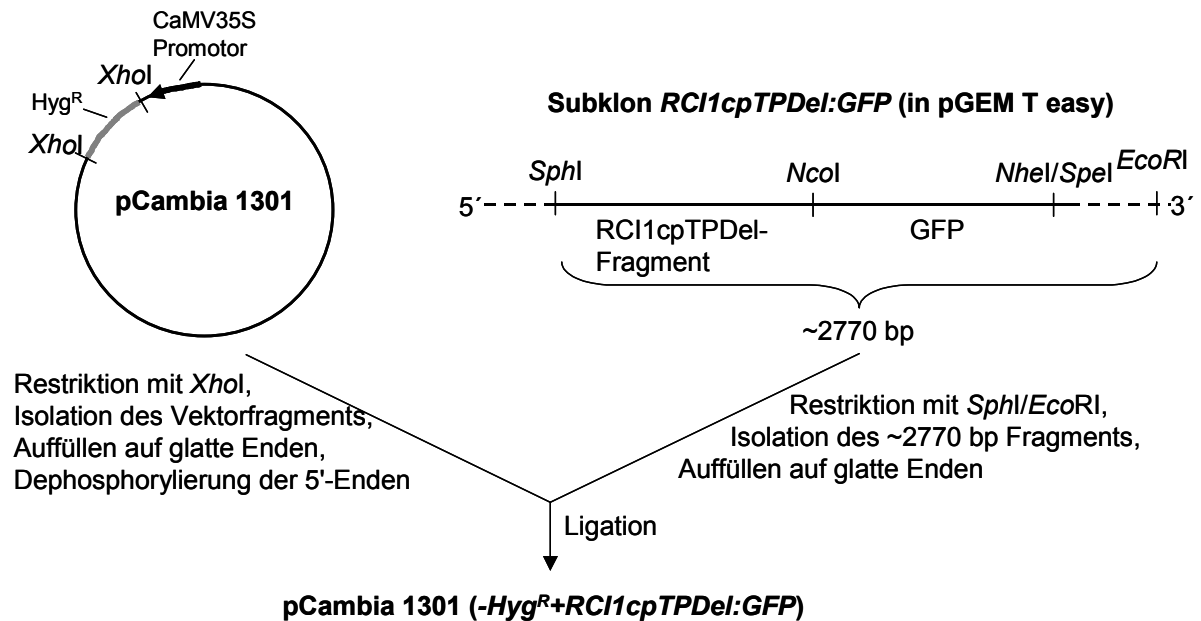


Abb. 3.27 : Herstellung der GFP-Fusion von *RCI1cpTPDel* in pCambia 1301
(ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (EcoRI), (NcoI), (NheI), (SphI) und (XhoI):
Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (Hyg^R): Sequenz des
Hygromycinresistenzgens (Erklärung im Text)

3.7 Ergebnisse der Applikation von 13(S)-HOT an Reispflanzen

In den Transformationsexperimenten zur Überexpression des vollständigen *RCI1*-Klons in Reisblättern (s. 3.4.3, 3.5.4, 3.5.5 und 3.6.4) kommt es zu einer Akkumulation von *PR1*-Transkripten. Wie schon in Kapitel 2.1.4 erwähnt, können die in der Lipxygenase-Reaktion entstandenen mehrfach ungesättigten Hydroperoxyfettsäuren, wie zum Beispiel 13-HPOT, durch unterschiedliche Reaktionen innerhalb des LOX-Stoffwechselwegs weiter metabolisiert werden (Blee, 1998). In Gerste konnte gezeigt werden, dass über den Peroxygenase- (POX-) oder Reduktaseweg entstehende 13(S)-HOT nach Flotieren von Blattfragmenten auf einer 10 µM Lösung die Akkumulation von *PR1b*-Transkripten nach 48 h induzieren (Weichert et al., 1999).

Es sollte nun überprüft werden, ob ein Glied in der Signalkette zur Induktion der *PR1*-Expression die aus dem LOX-Weg stammenden 13(S)-HOT sein könnten.

Hierzu wurden Reisblattfragmente wie unter 2.1.4 beschrieben in Petrischalen auf den entsprechenden Lösungen floriert und zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für die RNA-Extraktion (s. 2.2.16.1) und anschließende Northernanalyse (s. 2.2.19.1, 2.2.20 und 2.2.21) entnommen.

In ersten Versuchen wurden Reisblattfragmente in einer 10 μ M 13(S)-HOT-Lösung flotierte. Dies führte jedoch nicht zu einer reproduzierbaren *PR1*-Expression. Auch die Infiltration, also einmalige Gabe, von 13-(S)-HOT-Lösungen unterschiedlicher Konzentrationen mit Hilfe einer Zange in intakte Reisblätter oder Gerstenpflanzen (s. 2.1.1.3) führte zu keiner Akkumulation von *PR1*- bzw. *HvPR1b*-Transkripten (Daten nicht gezeigt).

Es wurden daraufhin höhere Substanzkonzentrationen im Flotationsansatz für Reis getestet. Abb. 3.28 zeigt ein Autoradiogramm des Northernblots.

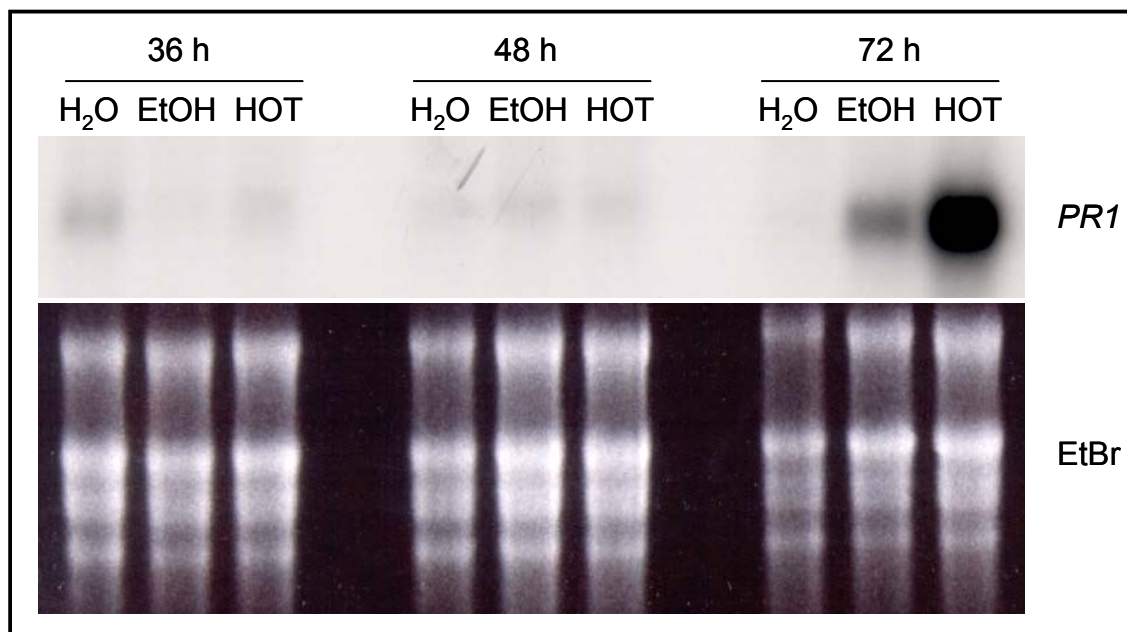


Abb. 3.28: Autoradiogramm der Northernanalyse von RNA aus Blattfragmenten der Reissorte Kusabue

Gesamt-RNA (10 μ g/Spur) wurde aus Blattfragmenten isoliert, die in A. dest. (H₂O), in A. dest. mit EtOH (EtOH) oder in A. dest. mit 25 μ M 13(S)-HOT (HOT) flotierte wurden. Die Proben wurden zu den Zeitpunkten 36 h, 48 h und 72 h nach Applikation geerntet. Verwendete Sonde *PR1* (s. 2.1.2.3). Als Ladungskontrolle (EtBr) ist ein mit Ethidiumbromid gefärbtes 1,2 % (w/v) Agarosegel gezeigt. Der Versuch wurde einmal durchgeführt.

Die Applikation von 13 (S)-HOT bewirkt nach 72 h eine deutliche Akkumulation der *PR1*-spezifischen Transkripte. In den Kontrollen zeigt sich, dass weder die ethanolhaltige Kontrolle noch das Flotieren an sich ausreichend sind, um zu einer vergleichbar starken *PR1*-Expression zu führen.

3.8 Stabile Transformation von Reispflanzen mit einem *RCI1*-Überexpressionskonstrukt

Zur kausalen Analyse des Einflusses von *RCI1* auf die Ausprägung der chemisch induzierten Resistenz in Reis ist die Herstellung stabil transformierter Pflanzenlinien, welche *RCI1* entweder überexprimieren oder ein *RCI1*-antisense Konstrukt tragen, notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konstrukt der *RCI1*-cDNA im Vektor pROB 5 (s. 2.1.2.2) hergestellt, welches zur Herstellung von *RCI1*-Überexpressionslinien verwendet werden sollte (s. 3.8.1).

Die Transformation von Reiskalli, sowie Selektion und Regeneration der Transformanten wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Elisabetta Lupotto, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo, Italien durchgeführt.

3.8.1 Konstrukt zur Herstellung stabiler Reistransformanten bezüglich einer Überexpression von *RCI1*

Für das Konstrukt zur Herstellung stabiler *RCI1*-Überexpressionslinien (s. Abb. 3.29) wurde aus dem Vektor pROB 5 mit *Bam*HI die für Hygromycinresistenz codierende Region deletiert. Die überstehenden Enden wurden auf glatte Enden (s. 2.2.6) aufgefüllt und die 5'-Enden dephosphoryliert (s. 2.2.7). Gleichzeitig wurde aus pBK CMV (*RCI1*) mit *Eco*RI/*Xba*I die *RCI1*-cDNA isoliert und die überhängenden Enden aufgefüllt. Danach wurde das *RCI1*-Fragment in den vorbereiteten Vektor einligiert. Die Orientierung des Fragments in Bezug auf den CaMV35S-Promotor wurde durch Restriktionsanalyse überprüft. Das resultierende Konstrukt wurde als pROB 5 (-*Hyg*^R+*RCI1*) bezeichnet.

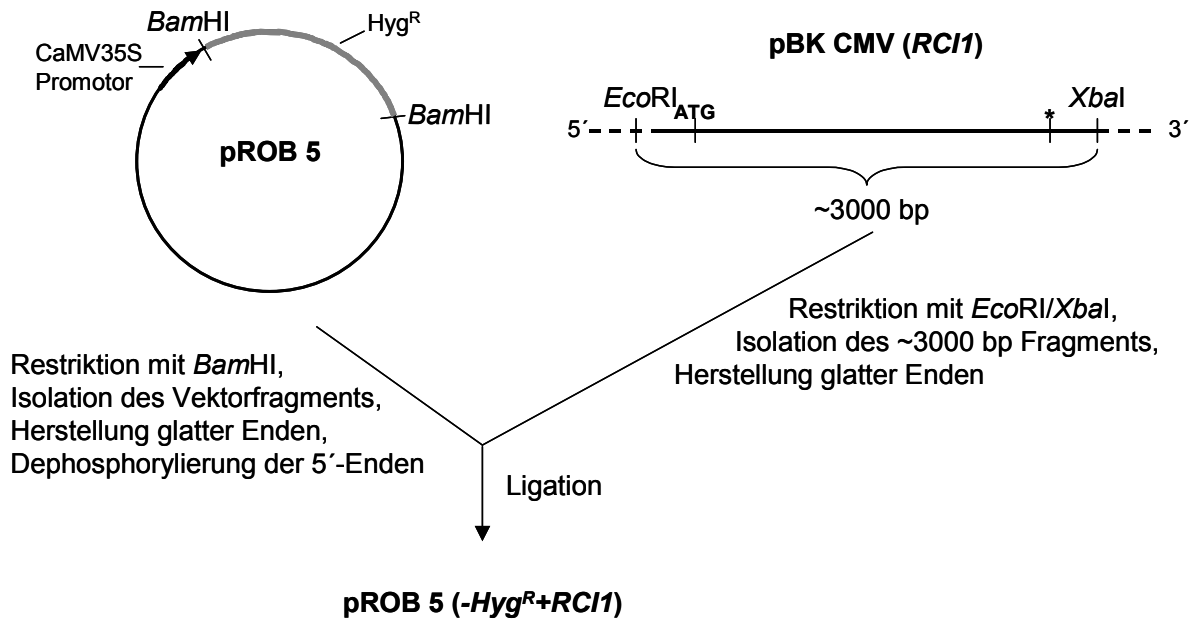


Abb. 3.29: Strategie zur Klonierung eines Konstruktes für die Herstellung stabiler Überexpressionstransformanten von *RC11*
 (ATG): Startcodon; (*): Stopcodon; (*Bam*HI), (*Eco*RI) und (*Xba*I): Schnittstellen der entsprechenden Restriktionsenzyme; (*Hyg*^R): Sequenz des Hygromycinresistenzgens (weitere Erklärung im Text)

3.8.2 Herstellung stabiler Reistransformanten bezüglich einer Überexpression von *RC11*

In der Arbeitsgruppe von Elisabetta Lupotto in Bergamo (s. 3.8) wurden sechs unabhängige Transformationsexperimente durch Partikelbombardement von Reisembryonen des Kultivars Selenio durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 100 Reisembryonen mit dem Konstrukt pROB 5 (-*Hyg*^R+*RC11*) und dem unveränderten pROB 5 kobombardiert. Es erfolgte die Regeneration und anschließende Selektion der transformierten Embryonen durch Hygromycin nach Standardprotokollen.

Aus den sechs Versuchen mit 600 Embryos konnten insgesamt 52 Pflanzen regeneriert werden. Dies entsprach einem Anteil von 8,7 %. Die regenerierten Pflanzen der Elterngeneration T₀ sollten in einem ersten Schritt durch PCR mit genspezifischen Primern für die Hygromycinphosphotransferase, welche die Hygromycinresistenz vermittelt, auf Vorhandensein des Resistenzmarkers untersucht werden. Dann sollte mittels PCR mit einem Primer aus dem CaMV35S-Promotor und einem genspezifischen Primer aus der Sequenz von *RC11* das Vorhandensein des *RC11*-Transformationskonstruktes verifiziert werden. Aus den positiven T₀-Pflanzen

dieser beiden Kontrollen sollten dann über Southernanalyse mit einer spezifischen *RCI1*-Sonde diejenigen ermittelt werden, welche 1-3 Kopien von *RCI1* tragen. Von diesen sollten schließlich die T₁-Samen geerntet werden.

Es stellte sich bei der PCR-Kontrolle heraus, dass keine der regenerierten Pflanzen das *RCI1*-Konstrukt trug. Es fiel allerdings auf, dass eine große Anzahl Embryonen nach der Transformation nekrotisch wurden und nicht regeneriert werden konnten (persönliche Mitteilung durch Elisabetta Lupotto), d.h. alle positiv selektierten Pflanzen besaßen nur ein Plasmid für Hygromycinresistenz und Embryonen, die beide Konstrukte enthielten, waren möglicherweise lethal.

3.9 Herstellung von Antikörpern gegen RCI1

Für Untersuchungen auf Proteinebene ist es notwendig, spezifische Antikörper gegen RCI1 zu haben. Daher wurde ein Konstrukt für die Expression eines Fusionsproteins in *E. coli* hergestellt, welches zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden sollte.

Wie in Kapitel 2.3.6 beschrieben, ist das Glutathion S-Transferase (GST)-System ein integriertes System zur Expression, Aufreinigung und Detektion von Fusionsproteinen in *E. coli*. Der pGEX-Vektor (Pharmacia Biotech) erlaubt eine induzierbare starke Expression von Genen oder Genfragmenten in Fusion mit dem *Schistosoma japonicum* GST. GST ist ein 26 kDa Protein, welches in *E. coli* mit enzymatischer Aktivität exprimiert werden kann.

Die bei dieser Methode entstehenden Fusionsproteine können mit Hilfe von Affinitätschromatographie unter Verwendung von Glutathion Sepharose 4B-beads aus dem Bakterienlysats aufgereinigt werden. Bei Bedarf kann das GST über einen einfachen Proteaseverdau aus der Fusion abgespalten werden. Das Fusionsprotein kann für unterschiedliche Anwendungen eingesetzt werden, wie zum Beispiel hier eine Fusion aus einem Peptidfragment von RCI1 und dem GST-Protein zur Erzeugung von Antikörpern. Wichtige Kriterien für die Immunogenität von Proteinen sind unter anderem folgende:

- Das Immunogen sollte eine große chemische Differenz zum immunisierten Individuum (evolutionäre Distanz) besitzen.
- Das Protein sollte über 5-10 kDa groß sein (etwa 30 Aminosäuren lang), kleinere Peptide müssen an stark immunogene Träger gekoppelt werden, da sie alleine nicht immunogen sind.

- Das Immunogen sollte eine gewisse Komplexität besitzen.
- Die Art der Seitenketten beeinflusst immunogene Potenz der Epitope. Stark epitopbestimmend sind polare, geladene Aminosäuren wie Glutaminsäure, Asparaginsäure, Lysin und Arginin, sowie solche mit großen Seitenketten oder Ringen, wie Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan.
- Die immunogenen Abschnitte müssen für die Erkennung frei zugänglich auf der Oberfläche des Moleküls liegen.
- Ein hoher Antigenindex wird begünstigt durch hohe Oberflächenwahrscheinlichkeit, niedrigen Hydrophobizitäts-Index, hohen Flexibilitäts-Index, geringe β -Strukturwahrscheinlichkeit und häufiges Auftreten von Glycin und Prolin, welche zu Turns in der Peptidkette führen.

(Lottspeich and Zorbas, 1998)

Diese Kriterien sind für die Wahl des Peptidfragments von RCI1 für die Herstellung einer GST-Fusion wie folgt umgesetzt worden:

- Der immunisierte Organismus war ein Kaninchen und besitzt daher eine sehr große evolutionäre Distanz zum Immunogen aus Reis.
- Das verwendete Peptid aus RCI hatte eine Länge von 58 Aminosäuren (s. 3.9.1) und wurde zusätzlich an GST gekoppelt.
- Es besaß viele der genannten epitopbestimmenden Aminosäuren und zusätzlich viele Glycin- und Prolinreste, welche zu Turns in der Peptidkette führen.
- Für die Herstellung eines Antikörpers gegen RCI1 wurde mit Hilfe von Hydrophobizitäts-Plots (Kyte and Doolittle, 1982 und Goldman et al., reviewed in Engelman et al., 1986) ein relativ hydrophiler Bereich des RCI1-Proteins zwischen den Aminosäuren 230 bis 320 ermittelt.

In Abb. 3.30 sind die Hydrophobizitäts-Plots nach Kyte and Doolittle (1982) und Goldman et al. (reviewed in Engelman et al., 1986) dargestellt. Die Zahlen am oberen Strahl bezeichnen die Aminosäuren in der Sequenz von RCI1. Beim "Kyte and Doolittle"-Plot (in der Abbildung schwarz dargestellt) stellt die Kurve den durchschnittlichen Wert eines für die Aminosäurereste spezifischen Hydrophobizitätsindex innerhalb eines Intervalls von 9 Aminosäuren statt. Wenn die Kurve im oberen Bereich des Diagramms liegt, dann handelt es sich um eine eher hydrophobe Region des Proteins, wenn sie im unteren Bereich liegt, dann handelt es sich bei dem Bereich um eine eher hydrophile Region.

Der Plot nach Goldman, Engelman and Steitz (GES, in der Abbildung grün dargestellt) dient der Identifikation nichtpolarer Intermembranhelices und wird aus dem durchschnittlichen für die Aminosäurereste spezifischen Hydrophobizitätswert

(GES-Wert) innerhalb eines Intervalls von 20 Aminosäuren berechnet. Liegt diese Kurve im oberen Bereich des Diagramms, dann handelt es sich um einen hydrophoben Bereich, ansonsten handelt es sich um einen hydrophilen Bereich des Proteins.

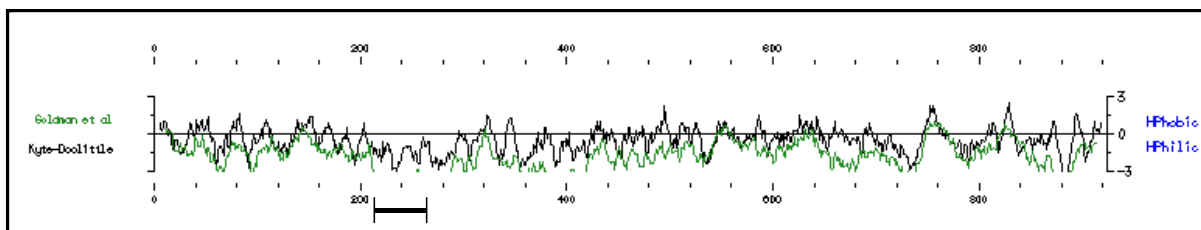


Abb. 3.30: Hydrophobizitäts-Plots nach Kyte and Doolittle (schwarz) bzw. Goldman et al. (grün) von RCI
Der für das Fusionspeptid verwendete Bereich ist durch den schwarzen Balken markiert. (Erklärung im Text)

3.9.1 Konstrukt zur Expression einer *RCI1:GST*-Fusion in *E. coli* BL21

Durch PCR mit spezifischen Primern (s. Tab. 3.9 und Tab. 3.10) sollte aufgrund der Ergebnisse des Hydrophobizitäts-Plots der Bereich zwischen ca. 670 und 920 bp (codierend für AS 205 bis 287) der cDNA von *RCI1* amplifiziert werden.

Hierbei wurde durch Primer in das 5'-Ende des Amplifikats eine *EcoRI*-Schnittstelle und in das 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle eingefügt. Über diese Schnittstellen wurde das *RCI1*-Fragment schließlich in den Vektor pGEX4T-3 inkloniert. Dieses Konstrukt wurde zur Kontrolle sequenziert. Es zeigte sich, dass es durch eine vorzeitige Beendigung der PCR-Amplifikation zur Bildung eines verkürzten, nur für 58 Aminosäuren (AS 205 bis 262) codierenden Fragments gekommen war. Da das Konstrukt, welches als pGEX4T-3 (*RCI1*_{AS 205-62}) bezeichnet wurde, bis auf diese Verkürzung korrekt war, wurde es zur Expression des Fusionsproteins in den *E. coli*-Stamm BL21 (s.2.1.2.1) transformiert.

Tab. 3.9: Sequenzen der zur Klonierung der *RCI1:GST*-Fusion verwendeten Primer

Primername	Sequenz
AKGEX2for	5'-TAAGAATTCGTACCTCCCGTCTCAGACGC-3'
AKGEX2rev	5'-TAACTCGAGACGACGGGTCTGTCCTGCAG-3'

Tab. 3.10: Parameter der zur Klonierung der *RCI1:GST*-Fusion durchgeführten PCR

Reaktionsansatz		Programm	
pBK CMV (<i>RCI1</i>)	0,5 µg	1. 94 °C	5 min
AKGEX2for	100 pmol	2. 94 °C	1 min
AKGEX2rev	100 pmol	3. 46 °C	1 min
MgCl ₂	2,0 mM	4. 72 °C	30 s
dNTPs	0,2 mM	5. goto 2., 1x	
10xReaktionspuffer	5 µl	6. 94 °C	30 s
<i>Pwo</i> -Polymerase	2,5 u	7. 63 °C	1 min
A. bidest.	ad 50 µl	8. 72 °C	30 s
		9. goto 6., 34x	
		10. 72 °C	5 min
		11. 4 °C	

3.9.2 Expression des *RCI1:GST*-Fusionsproteins in *E. coli* BL21

Aus den *E. coli* BL21-Zellen mit dem Konstrukt pGEX4T-3 (*RCI1*_{AS 205-62}) (s. 3.9.1) wurde wie in Kapitel 2.3.5 beschrieben das rekombinante Fusionspeptid nach Expression in *E. coli* aufgereinigt.

In Abb. 3.31 ist ein Coomassie-gefärbtes SDS-Gel (s. 2.3.7 und 2.3.10) der verschiedenen Fraktionen aus der Extraktion dargestellt.

Auf dem Coomassie-gefärbten Gel kann man in den Fraktionen nach Induktion der Expression des rekombinanten Fusionsproteins aus *RCI1* und *GST* mit IPTG (Spur 2 und 3) das Auftreten einer deutlichen Proteinbande bei etwa 33 kDa im Vergleich zur Fraktion aus nicht IPTG-induzierten Bakterien (Spur 1) erkennen. Bei dieser handelt es sich wahrscheinlich um das *GST:RCI1*-Fusionspeptid.

Nach Inkubation mit den Glutathion Sepharose 4B-beads ist diese Proteinbande im Bakterienlysate deutlich schwächer (Spur 4), da das rekombinante Fusionspeptid an die Glutathion Sepharose 4B-beads gebunden hat und so aus dem Lysat entfernt worden ist. Das rekombinante Fusionsprotein lässt sich in den drei aufeinanderfolgenden bead-Eluaten (Spuren 5-7) als eine deutliche Proteinbande in entsprechender Größe erkennen. Das heißt, es konnte durch den Glutathionpuffer erfolgreich von den beads eluiert werden.

In allen drei Extrakten wurde wie in 2.3.8 beschrieben der Proteingehalt bestimmt.

Anschließend wurde ein Aliquot von 800 µg Protein in Glutathionpuffer (s. 2.3.5) zur Immunisierung eines Kaninchens an die Firma SeqLab in Göttingen geschickt.

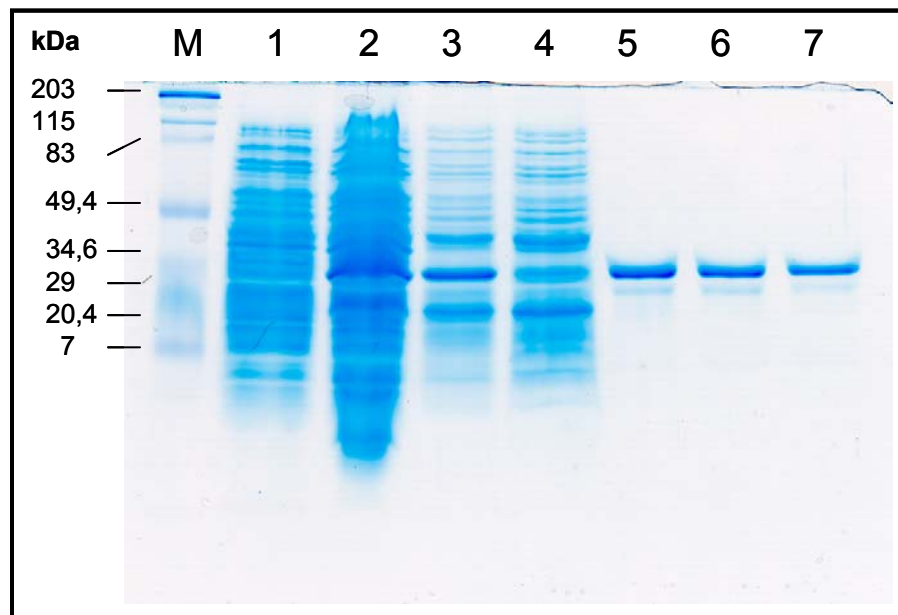


Abb. 3.31: 12 % SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) nach Expression des *RC11:GST*-Fusionsproteins in *E. coli* BL21
(M) BioRad prestained SDS standard (broad range), (1): Lysat aus nicht mit IPTG induzierten BL21 pGEX4T-3 (*RC11*_{AS 205-62}), (2): Lysat aus IPTG-induzierten BL21 pGEX4T-3 (*RC11*_{AS 205-62}), (3): Lysat aus IPTG-induzierten BL21 pGEX4T-3 (*RC11*_{AS 205-62}) nach Ultraschall, (4): Überstand des Lysats aus IPTG-induzierten BL21 pGEX4T-3 (*RC11*_{AS 205-62}) (nach bead-Inkubation), (5): erstes Eluat von den Glutathion Sepharose 4B-beads, (6): zweites Eluat von den Glutathion Sepharose 4B-beads und (7): drittes Eluat von den Glutathion Sepharose 4B-beads

3.9.3 Aufreinigung des Antikörperserums mit Protein A-Agarose und Test des gereinigten Serums

Das von SeqLab erhaltene Endblutungsserum mit den primären Antikörpern (anti-RC11-IgGs) wurde mittels Westernanalyse getestet. Hierzu wurden 15 % SDS-Gele wie in Kapitel 2.3.7 hergestellt. Aufgetragen wurden jeweils Proteinextrakte (s. 2.3.1.2) aus Reispflanzen der Sorte Kusabue ohne und 48 h nach Behandlung mit BTH (s. 2.1.3), Extrakt aus M15 (pDS56/RBSII, *SphI* (*RC11*)) nach Induktion der RC11-Expression mit IPTG (s. 3.2.1 und 2.3.1.1), Proteinextrakt aus der Fraktion des GST-Fusionsproteins (s. 2.3.5), Proteinextrakt aus der Peptid-Fraktion nach Abspaltung des RC11-Peptids vom GST-Anteil des Fusionsproteins (s. 2.3.6) und der GST-Fraktion nach Abspaltung vom RC11-Peptid (s. 2.3.5).

Ein Gel wurde im Anschluss mit Coomassie gefärbt (s. 2.3.10, Abb. 3.32/A), während die anderen geblottet (s. 2.3.11) und der Erfolg des Blottings durch Ponceau S-Färbung (s. 2.3.12, Abb. 3.32/B) überprüft wurden. Dann wurde unter Verwendung des Enblutungsserums als primäre Antikörperfraktion und eines anti-rabbit-Peroxidasekonjugates als sekundäre Antikörperfraktion die Immunodetektion (s. 2.3.13) von RCI1 auf dem Westernblot untersucht.

Bei der Westernanalyse zeigten sich zahlreiche Banden in den Extrakten der verschiedenen Proben (s. Abb. 3.32/C). Im Pflanzenextrakt aus Kusabue nach Behandlung mit BTH sollte sich in der Westernanalyse im Optimalfall bei Vergleich mit der unbehandelten Kontrolle eine Proteinbande des RCI1-Proteins bei etwa 103 kDa zu detektieren sein. Ebenso sollte eine solche Bande in der Probe aus Bakterienlysat der M15-Zellen mit dem Konstrukt pDS56/RBSII, *SphI* (*RCI1*), welche das rekombinante RCI1-Protein exprimieren, zu sehen sein. Leider ist in diesen Proben aber eine Vielzahl von Proteinbanden, welche mit den Antikörpern aus dem Endblutungsserum reagieren, zu detektieren. Die gesuchten Proteinbanden lassen sich nicht erkennen. Aus diesen Gründen wurde in einem weiteren Schritt eine Aufreinigung der IgGs aus dem Endblutungsserum vorgenommen. Diese lassen sich aufgrund ihrer Affinität zu Protein A aus dem Serum aufreinigen (s. 2.3.14). Dieser Schritt sollte zu einer höheren Spezifität der primären anti-RCI1-Antikörperfraktion führen.

In Abb. 3.32/D kann man erkennen, dass diese Aufreinigung zu einer Anreicherung bestimmter Antikörper im Vergleich zum ungereinigten Endblutungsserum führt. Insbesondere in den Pflanzenextrakten wurden durch das aufgereinigte Serum weniger Banden detektiert. Leider lässt sich trotz Anreicherung der IgG-Antikörper die 103 kDa-RCI1-Bande weder im Pflanzen- (Spur 2) noch im Bakterienextrakt (Spur 3) eindeutig erkennen. Es ließ sich aber zeigen, dass mittels der Antikörperfraktion sowohl das ungefähr 33 kDa große Fusionsprotein aus dem RCI1-Peptid mit GST (Spur 4) als auch das etwa 7 kDa große RCI1-Peptid (Spur 5) und der etwa 26 kDa große GST-Anteil des Fusionsproteins (Spur 6) detektiert werden konnten.

Für weitere Versuche ist es sinnvoll, die Immunodetektion weiter zu optimieren. Dies könnte zum Beispiel durch eine Antigen-Affinitäts-Chromatographie erzielt werden.

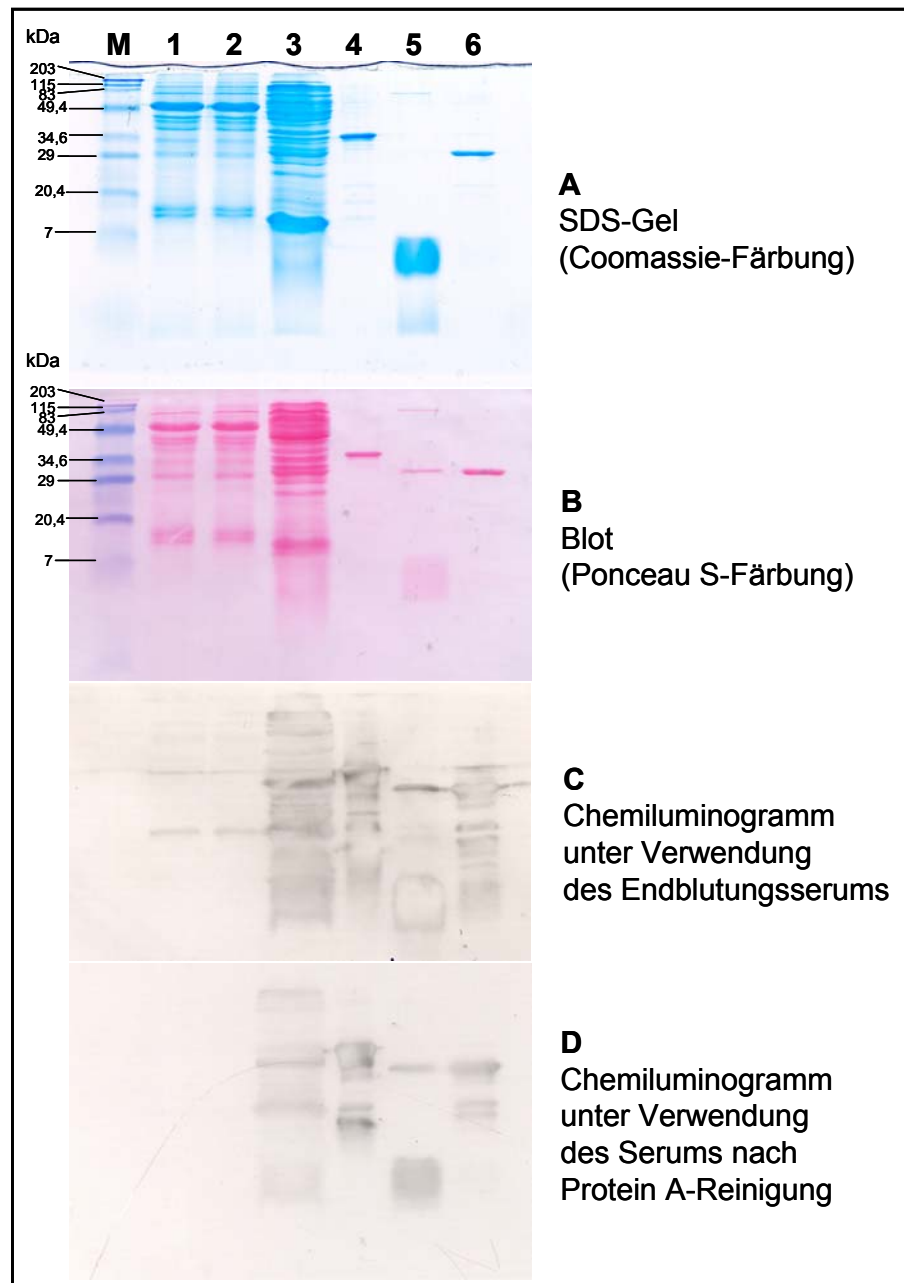


Abb. 3.32: Ergebnisse der Westernanalyse eines 15 % igen SDS-PAGE der Protein A-Aufreinigung des Kaninchen-Endblutungsserums gegen RCI1
(M): BIORAD prestained SDS standard, broad range, (1): Extrakt Kusabue Kontrolle, (2): Extrakt Kusabue 250 ppm BTH (48 h), (3): Extrakt M15 (pDS56/RBSII, *SphI* (RCI1)), (4): Fraktion des GST-Fusionsproteins, (5): Peptid-Fraktion und (6): GST-Fraktion

4 Diskussion

Die Untersuchung von Mechanismen der induzierten Resistenz ist ein sehr wichtiger Aspekt der modernen phytopathologischen Forschung.

Die induzierte Resistenz (IR) wurde zunächst an Pflanzen beobachtet, welche nach Abwehr eines nekrotisierenden Pathogens gegen eine nachfolgende Infektion mit einem virulenten Pathogen resistent wurden. Diese Resistenz kann sich auf ein einzelnes Blatt beschränken (LAR) oder systemisch auf die ganze Pflanze übergreifen (SAR). Die IR kann auch durch Behandlung der Pflanze mit bestimmten chemischen Substanzen, sogenannten Resistenzinduktoren, welche selbst nicht antimikrobiell wirken, induziert werden (Chester, 1933; Kessman et al., 1994) und wirkt gegen ein breites Spektrum an Mikroorganismen.

Nach dem Auslösen der IR, aber vor Inokulation mit einem virulenten Pathogen, werden Gene aktiviert, die zum Beispiel für Chitinasen und β -1,3-Glucanasen codieren. Somit sind diese an der Pathogenabwehr beteiligten Hydrolasen schon vorhanden, wenn eine Pathogenattacke erfolgt (Slusarenko, 1996). Einige lokale Abwehrmechanismen, wie Lignifizierung oder Phytoalexinakkumulation, treten nicht systemisch in den Pflanzen auf, werden aber im Falle der Infektion mit einem Pathogen deutlich schneller ausgebildet. Die Pflanze wird in der IR also in einen „sensiblen“ Zustand versetzt, bei dem es zu einem schnelleren Auslösen der Abwehr nach Infektion kommt (Slusarenko, 1996; Conrath, 2001). Hierdurch kann eine normalerweise kompatible Interaktion zu einer inkompatiblen Interaktion werden (Uknes et al., 1992; Mauch-Mani and Slusarenko, 1994).

Die Lipoxygenase ist ein Enzym, welches ebenfalls in der IR in Pflanzen akkumuliert. Dies wurde zum Beispiel für Gurke gezeigt (Avdiushko et al., 1993). In Reis wird die Lipoxygenase als Marker für die IR diskutiert (Kessman et al., 1994). In Reispflanzen erfolgt eine Steigerung der LOX-Aktivität nach Behandlung mit den Resistenzinduktoren 2,2-Dichlor-3,3-dimethylcarboxylsäure (DCP), DCINA, Probenazol (Schaffrath, 1994) und BTH (Schaffrath et al., 2000b), sowie nach Injektion eines Elicitors aus *M. grisea* (Schaffrath, 1994). Weiterhin kommt es nach Behandlung von Reis mit chemischen Resistenzinduktoren zur Akkumulation von Transkripten der Lipoxygenase *RCI1*. Auch in anderen Monokotyledonen erfolgt die Akkumulation von Lipoxygenase-spezifischen Transkripten in der chemisch induzierten Resistenz. So wurde in Gerste nach Behandlung mit DCINA die Lipoxygenase *BCI1* identifiziert (Vörös et al., 1996; Beßer et al., 2000) und Görlach et al. (1996) isolierten in Weizen nach Applikation von BTH, DCINA oder SA die Lipoxygenase *WC12*.

Die Rolle von Lipoxygenasen in der induzierten Resistenz ist allerdings noch unklar. Generell wird eine Beteiligung der Lipoxygenasen während der Pathogenabwehr an der Produktion antimikrobieller Substanzen oder von Signalmolekülen, sowie bei der Membrandegradation während der HR diskutiert (Slusarenko, 1996). Lipoxygenasen könnten demnach an einer zentralen Stelle der Signalkette stehen, welche zur Resistenzausprägung führt.

In dieser Arbeit soll neben der biochemischen und molekularen Charakterisierung der Lipoxygenase RCI1 aus Reis auch ihre mögliche Funktion in der induzierten Resistenz analysiert werden.

4.1 Charakterisierung der Lipoxygenase RCI1

Für die Aufklärung der physiologischen Funktion von RCI1 war es zunächst notwendig, das Enzym in Bezug auf seine biochemischen und molekularen Eigenschaften genauer zu charakterisieren.

Es werden daher zunächst sowohl die Regiospezifität der RCI1-katalysierten Umsetzung freier ungesättigter Fettsäuren diskutiert, als auch die Versuche zur Analyse der Substratspezifität, welche klären sollten, ob RCI1 auch in Lipiden veresterte Fettsäuren als Substrat akzeptiert. Für diese Untersuchungen wurde in dieser Arbeit auf das in *E. coli* exprimierte rekombinante RCI1-Protein zurückgegriffen (s. 3.1).

Weiterhin wird die Stellung der Lipoxygenase RCI1 innerhalb einer Gruppe ausgewählter pflanzlicher Lipoxygenasen mittels phylogenetischer Analyse gezeigt, woraus sich Rückschlüsse auf molekulare Charakteristika, wie zum Beispiel die Cytolokalisation des Proteins, machen lassen. Die auf diesem Weg über Sequenzdaten erhaltene Hypothese über die mögliche Lokalisation von RCI1 konnte im Weiteren durch Ergebnisse aus Untersuchungen eines Fusionsproteins aus einem putativen Signalpeptid von RCI1 und GFP gestützt werden.

4.1.1 Regiospezifität von RCI1

Pflanzliche Lipoxygenasen sind multifunktionale Enzyme und können drei verschiedene Reaktionstypen katalysieren:

1. Dioxygenierung von Fettsäuren → Dioxygenase-Reaktion (Hamberg and Samuelsson, 1967)
2. sekundäre Konversion von Hydroperoxyfettsäuren → Hydroperoxidase-Reaktion (Kühn et al., 1991)
3. Bildung von Epoxy-Leukotrienen → Leukotrien-Synthase-Reaktion (Shimizu et al., 1984)

Unter physiologischen Bedingungen ist allerdings die erste Reaktion in Pflanzen die häufigste. Die aus dieser Reaktion resultierenden möglichen Regioisomere der Hydroperoxyfettsäuren könnte durch zwei unabhängige Schritte der Katalyse verursacht werden (Hamberg and Samuelsson, 1967).

1. Durch die Selektivität der Wasserstoffabstraktion: in α -Linolensäure ist dies sowohl an C-11 und/oder an C-14 möglich, aber Vergleiche pflanzlicher Lipoxygenasen und Studien mit „site-directed mutagenesis“ haben gezeigt, dass in Linol- oder Linolensäure nur eine doppelt-allyle Methylengruppe an C-11 genutzt wird (Feussner and Kühn, 2000).
2. Selektivität durch den Ort der Sauerstoffinsertion über das Rearrangement des intermediären Fettsäureradikals. Wenn Wasserstoff an C-11 abstrahiert wird, kann der molekulare Sauerstoff an Position [+2] oder [-2] eingeführt werden, was zu einer Dioxygenierung an C-13 oder C-9 führt (s. Abb. 4.1).

Als Hauptprodukte bei der RCI1-Reaktion mit freien Fettsäuren entstanden bevorzugt 13-Hydroperoxyfettsäuren (s. 3.1.3). Bei den beiden verwendeten Substraten, Linol- und Linolensäure, betrug der Anteil an 13-Hydroperoxyfettsäurederivaten jeweils 91 bzw. 99 % der gebildeten Primärprodukte.

Aus den Primärprodukten können über unterschiedliche sekundäre Stoffwechselwege (s. 1.2.1) diverse physiologisch wirksame Substanzen gebildet werden.

So ist die 13-Hydroperoxy-octadecatriensäure zum Beispiel die Ausgangssubstanz zur Bildung von Jasmonat und Traumatin (Creelman and Mullet, 1997).

Schweizer et al. (1997) konnten in Reis nach Behandlung mit dem Resistenzinduktor DCINA einen Anstieg des endogenen Jasmonatgehalts feststellen, der mit einem

Anstieg der LOX-Aktivität korreliert. Die durch Resistenzinduktoren ebenfalls induzierbare 13-Lipoxygenase RCI1 könnte daher durchaus eine Funktion bei der Jasmonatsynthese besitzen. Jasmonat ist in eine Vielzahl physiologischer Vorgänge verwickelt, wie Blattseneszenz, Regulation des Wachstums und als Signalmolekül in die Expression bestimmter Gene der Wund- und Resistenzantwort der Pflanze (Sembdner and Parthier, 1993; Wasternack et al., 1998)

Aus dem Lipoxygenaseweg stammen auch zahlreiche antimikrobielle Substanzen. Ricker and Bostock (1994) fanden heraus, dass sowohl 9- als auch 13-Hydroperoxylinolsäure die Keimung der Cystosporen von *Phytophthora capsici* inhibieren kann. Auch können 9- und 13-Hydroperoxy-octadecadiensäure sowie 9- und 13-Hydroxy-octadecadiensäure die Keimschlauch- und Appressorienbildung von *M. grisea* inhibieren (Ohta et al., 1990; 1991). Andere Metabolite des Lipoxygenasewegs sind ungesättigte Aldehyde und ihre oxidierten und reduzierten Derivate. Antibakterielle Wirkung wurde zum Beispiel für niedrige Konzentrationen von *trans*-2-Hexenal und höhere Konzentrationen von *cis*-3-Hexenol aus der Hydroperoxid-Lyase-Kaskade nachgewiesen (Croft et al., 1993). Diese flüchtigen Substanzen gehen auf die Aktivität einer 13-Lipoxygenase zurück und werden in inkompatibler Interaktion von Bohne mit *P. syringae* pv. *phaseolicola* in großer Menge gebildet. Ihre Bildung korreliert mit einem Rückgang des Bakterienwachstums. Doehlert et al. (1993) konnten in Sojabohne ein Hexenal als wirksame Substanz gegen *Aspergillus flavus* identifizieren. Vough and Gardner (1993) zeigten allerdings, dass Nonenale aus dem 9-LOX-Metabolismus im Allgemeinen eine größere toxische Wirkung besitzen als die Hexenale, die Abkömmlinge der 13-Hydroperoxy-linolensäure sind. Nonenale sind weniger flüchtig und haben eine längere Verweildauer in der Pflanze, sie können daher über einen längeren Zeitraum ihre Wirkung ausüben (Blée, 1998b).

Für die Lipoxygenase RCI1 ist nicht gezeigt, ob eine ihrer physiologischen Funktionen die Bildung von Vorstufen antimikrobieller Substanzen ist.

Die Möglichkeiten der weiteren Metabolisierung der primären Reaktionsprodukte von Lipoxygenasen sind vielfältig. Einige Hydroxy- und Epoxyfettsäurederivate können, wie das schon beschriebene Jasmonat, als endogene Signalmoleküle dienen (Blée, 1998b). Studien über das Metabolitprofil oxidierter mehrfach ungesättigter Fettsäuren, auch Oxilipine genannt, nach Verwundung, Trockenstress oder nach Behandlung mit chemischen Substanzen deuten darauf hin, dass eine individuelle Oxilipinsignatur, zusammen mit Veränderungen der Genaktivität und der Gewebespezifität korrespondierender Enzyme, ein Element sein könnte, welches

der Pflanze eine spezifische Reaktion auf Umweltreize erlaubt (Feussner and Wasternack, 2002).

Welche Substanzen im Falle der Lipoxygenase RCI1 als Sekundärmetabolite mit physiologischer Wirkung oder als Signalsubstanzen eine Rolle in der chemisch induzierten Resistenz bei Reis spielen könnten, wird im Folgenden noch ausführlicher diskutiert.

4.1.2 Substratspezifität von RCI1

Die meisten Lipoxygenasen bevorzugen freie Fettsäuren als Substrat (Siedow, 1991). Manche 13-Lipoxygenasen können aber neben freien Fettsäuren auch veresterte Fettsäuren oxidieren (Brash et al., 1987; Kühn et al., 1990; van Aarle, 1993; Maccarone et al., 1994). Bei der Umsetzung veresterter Fettsäuren liegt das pH-Optimum der Lipoxygenase-katalysierten Reaktion zumeist im basischen Bereich bei pH 8,5 (Brash et al., 1987; 1993; Maccarone et al., 1994).

Bevorzugtes Substrat der 13-Lipoxygenase RCI1 scheinen nach den bisher erhaltenen Ergebnissen aber lediglich freie ungesättigte Fettsäuren zu sein. Das pH-Optimum für die RCI1-katalysierte Reaktion liegt hierbei im basischen Bereich bei pH 8,8 (Rademacher, 1999; Schaffrath et al., 2000b).

Für die LOX1 aus Sojabohne und eine Lipoxygenase aus Gurkenwurzeln konnte gezeigt werden, dass sie in Phospholipiden veresterte, ungesättigte Fettsäuren oxygenieren können (Brash et al., 1987; Matsui et al., 1998). In diesem Zusammenhang wird die Beteiligung der Lipoxygenasen an der Permeabilisierung von Membranen diskutiert. Möglicherweise könnte die Veränderung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Membran durch Modifikation der Fettsäurereste den Fluss von Assimilaten oder Ionen erleichtern (Serhan et al., 1981; Hildebrand, 1989). Für weitere 13-Lipoxygenasen, wie etwa die Lipidkörper-LOX aus Gurke (Feussner et al., 1998), eine 13-LOX aus Gerstenkeimlingen (Holtman et al., 1997) und die LOX d (vix d) aus Sojablättern (Fuller et al., 2001) wurde der Umsatz von ungesättigten Fettsäuren beschrieben, welche in neutralen Lipiden, wie zum Beispiel Triglyceriden, verestert sind. Für diese Lipoxygenasen wird eine Bedeutung im Triglycerid-Katabolismus diskutiert (Feussner et al., 2001). Für RCI1 kann wahrscheinlich aufgrund der Substratspezifität eine direkte Beteiligung an der Permeabilisierung von Membranen oder am Triglycerid-Katabolismus ausgeschlossen werden.

Die von RCI1 als Substrat bevorzugten freien ungesättigten Fettsäuren müssen der Lipoxygenase zur Verfügung gestellt werden, was entweder durch Freisetzung ungesättigter Fettsäuren aus Membranlipiden mittels Phospholipasen oder durch Neusynthese ungesättigter Fettsäuren mit Hilfe von Desaturasen geschehen kann.

In Pflanzen können freie Fettsäuren durch die Aktivität von Phospholipase A₁ und A₂, sowie von Phospholipase D in Zusammenarbeit mit einer unspezifischen Lipidacylhydrolase, aus den Membranlipiden freigesetzt werden (Munnik et al., 1998; Pappan and Wang, 1999). Lee et al. (1997) konnten in verwundeten Tomatenblättern eine Akkumulation von Produkten der Phospholipase A- oder Phospholipase D-Aktivität feststellen. In Soja- (Chandra et al., 1996) oder Tabakzellkulturen (Roy et al., 1995), sowie in Reis (Sekizawa et al., 1990; Young et al., 1996) ist eine schnelle Induktion von Phospholipase A- oder Phospholipase D-Aktivität nach Elicitorbehandlung oder Inokulation gezeigt worden. Auch in Weizen konnte nach Inokulation mit *P. graminis* fsp. *tritici* bzw. nach Elicitierung eine Verstärkung konstitutiver Phospholipase A- und Phospholipase D-Aktivitäten, sowie der Lipidacylhydrolase-Aktivität detektiert werden (Loers, 1999). Die Aktivitäten dieser Enzyme stiegen auch nach Behandlung von Weizenblättern mit Methyljasmonat, einem flüchtigen Derivat der Jasmonsäure. Da RCI1 ebenfalls durch die exogene Applikation von Jasmonat induziert wird, wäre es möglich, dass die Bereitstellung von freien Fettsäuren in Reis für dieses Enzym ebenfalls durch Erhöhung von Phospholipase A- und Phospholipase D-/Lipidacylhydrolase-Aktivitäten erfolgt. Außerdem kommt es bei Pflanzen allgemein als unspezifische Stressreaktion, zum Beispiel bei Verwundung, zur Freisetzung sehr aktiver Lipidacylhydrolasen ins Cytosol (Huang et al., 1993), was zur vermehrten Bildung freier Fettsäuren führen kann. Vorstellbar wäre eine ähnliche Reaktion bei Applikation von Resistenzinduktoren. Das kürzlich charakterisierte *OsPI-PLC1*-Gen, codierend für eine Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C aus Reis (Song and Goodman, 2002), das durch BTH-Applikation induziert wird, kommt aufgrund seiner Reaktionsspezifitäten nicht als Quelle freier Fettsäuren als Substrat für RCI1 in Frage. Das Genprodukt hydrolysiert Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃), welche Funktionen als "second messenger" besitzen (Munnik et al., 1998).

Die Desaturierung von Ölsäure zu Linol- oder Linolensäure erfolgt entweder in den Chloroplasten oder im Endoplasmatischen Retikulum (Wang and Hildebrand, 1988). Eine Elicitorbehandlung bewirkt in Petersilie die Akkumulation von Desaturase-spezifischen Transkripten (Kirsch et al., 1997) und in *A. thaliana* ruft Verwundung eine Änderung der Expression von einem Desaturase-Gen hervor (Nishiuchi et al., 1997). In Gerste wurde mit *BCI8* unter den DCINA-induzierten Genen auch eine

Fettsäuredesaturase identifiziert (Beßer et al., 2000). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass es in Reis ebenfalls zur Induktion eines noch nicht identifizierten Desaturase-Gens nach Applikation von chemischen Resistenzinduktoren kommen könnte, dessen Genprodukt an der Bereitstellung ungesättigter Fettsäuren als Substrat für die Lipoxxygenase RCI1 beteiligt ist.

Letztendlich ist bis jetzt nicht bekannt, auf welchem Weg die Bereitstellung der freien, mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Substrat für die Lipoxxygenase RCI1 innerhalb der chemisch induzierten Resistenz bei Reis erfolgt.

4.1.3 Phylogenetische Analyse von Lipoxxygenasen

Durch die steigende Menge an Sequenzinformationen ist es möglich, phylogenetische Analysen von Multigenfamilien durchzuführen. Hierdurch können auch einige biochemische Eigenschaften von Proteinen vorhergesagt und Spekulationen über deren eventuelle physiologische Rolle gemacht werden (Feussner and Wasternack, 2002). In Abb. 4.1 ist ein phylogenetischer Baum für ausgewählte Lipoxxygenasen dargestellt.

Bei den Lipoxxygenasen bilden alle Typ1- und Typ2-, ebenso wie 9- und 13-Lipoxxygenasen individuelle Gruppen in getrennten Ästen eines phylogenetischen Stammbaums (Feussner and Wasternack, 2002). Unter den Typ1-Lipoxxygenasen sind diejenigen Lipoxxygenasen zusammengefasst, welche kein Transitpeptid besitzen und welche eine hohe Sequenzhomologie (>75%) untereinander besitzen. Typ2-Lipoxxygenasen besitzen ein putatives chloroplastidäres Transitpeptid als N-terminale Extension. Diese Lipoxxygenasen zeigen untereinander eine geringe Sequenzhomologie (~35%). Alle bisher bekannten Typ2-Lipoxxygenasen gehören zu den 13-Lipoxxygenasen (Feussner and Wasternack, 2002). In den Subgruppen gibt es weiterhin eine Trennung zwischen Lipoxxygenasen aus Monokotyledonen und Dikotyledonen. Von diesen „Regeln“ gibt es nur wenige Ausnahmen: so werden zum Beispiel einige Lipid-bevorzugende 13-Lipoxxygenasen, LOX1:Hv:3, LOX1:Cs:1 und LOX1:Cs:3, in die 9-LOX-Familie eingeordnet (Doderer et al., 1992; Feussner et al., 1998; Matsui et al., 1998). Diese Diskrepanz zur Norm könnte an einer Verschiebung der Regiospezifität bei den genannten Isoenzymen liegen. Normalerweise liegt bei 13-Lipoxxygenasen die Bildung von 13-Hydroperoxyfettsäuren gegenüber den 9-Hydroperoxyfettsäuren bei >95%. Bei den drei oben genannten Lipoxxygenasen liegt das Verhältnis aber zwischen 75 und 90%, womit sie vielleicht nicht zu den klassischen 13-Lipoxxygenasen gezählt werden dürfen (Hughes et al., 2001;

Feussner and Wasternack, 2002). Interessant ist auch, dass Typ1 9-Lipoxygenasen enger mit den Typ2 13-Lipoxygenasen als mit den Typ1 13-Lipoxygenasen verwandt zu sein scheinen (Feussner and Wasternack, 2002).

Die phylogenetische Analyse lässt sich im Allgemeinen gut zur Vorhersage der chloroplastidären Lokalisation oder der Regiospezifität von Lipoxygenasen verwenden, wohingegen zur Vorhersage der Substratspezifität zusätzlich zu den Sequenzdaten weitere biochemische Informationen benötigt werden (Feussner and Wasternack, 2002).

Die Lipoxygenase *RCI1* (LOX2:Os:2) befindet sich innerhalb des phylogenetischen Baums (s. Abb. 4.1) in einer Subgruppe mit der *LOX2:Hv:1* aus Gerste, deren Expression nach Behandlung mit Methyljasmonat und Salicylsäure induziert wird. Im Gegensatz dazu führt ein Anstieg des endogenen Jasmonatgehalts, der zum Beispiel durch osmotischen Stress nach Flotation von Blattsegmenten auf einer 1 M Sorbitollösung erfolgt, nicht zur Induktion dieser LOX (Vörös et al., 1998). Auch die Akkumulation *RCI1*-spezifischer Transkripte kann in Reis zwar durch exogene Applikation von Jasmonat induziert werden, aber nicht durch einen Anstieg des endogenen Jasmonatspiegels nach Verwundung (Schaffrath et al., 2000b).

Unterschiede in der Induzierbarkeit von Genen durch exogenes und endogenes Jasmonat werden häufig beobachtet. Diese können vielleicht auf eine unterschiedliche Verfügbarkeit der Substanz im Gewebe, auf ebenfalls induzierte inhibierende Signale oder das Fehlen weiterer fördernder Signale zurückgeführt werden. Weiterhin wurde die Existenz unterschiedlicher Rezeptoren für die Perzeption endogenen und exogenen Jasmonats diskutiert (Löbler and Lee, 1998). Vielleicht ist diese Genaktivierung aber auch nur als Stressantwort auf die artifizielle Applikation von Jasmonat zu sehen, die zu Seneszenz-ähnlichen Reaktionen führen kann (Wasternack, 1994).

Sowohl *RCI1* als auch *LOX2:Hv:1* besitzen das für die Typ2-Lipoxygenasen typische chloroplastidäre Transit-Signalpeptid als N-terminale Extension. Während für *RCI1* durch Southernanalyse die Existenz eines weiteren eng verwandten Lipoxygenase-Gens in Reispflanzen nahezu ausgeschlossen werden konnte (s. 3.2), scheint es in Gerste möglicherweise ein weiteres mit *LOX2:Hv:1* eng verwandtes Gen zu geben (Vörös et al., 1998). Für die *LOX2:Hv:1* wird in der Literatur eine Beteiligung bei der Jasmonat-Biosynthese, oder bei der Degradation von Bestandteilen der Chloroplastenmembranen während der Ausbildung eines Seneszenz-Phänotyps nach Jasmonat-Applikation diskutiert (Feussner and Wasternack, 1998; Vörös et al., 1998).

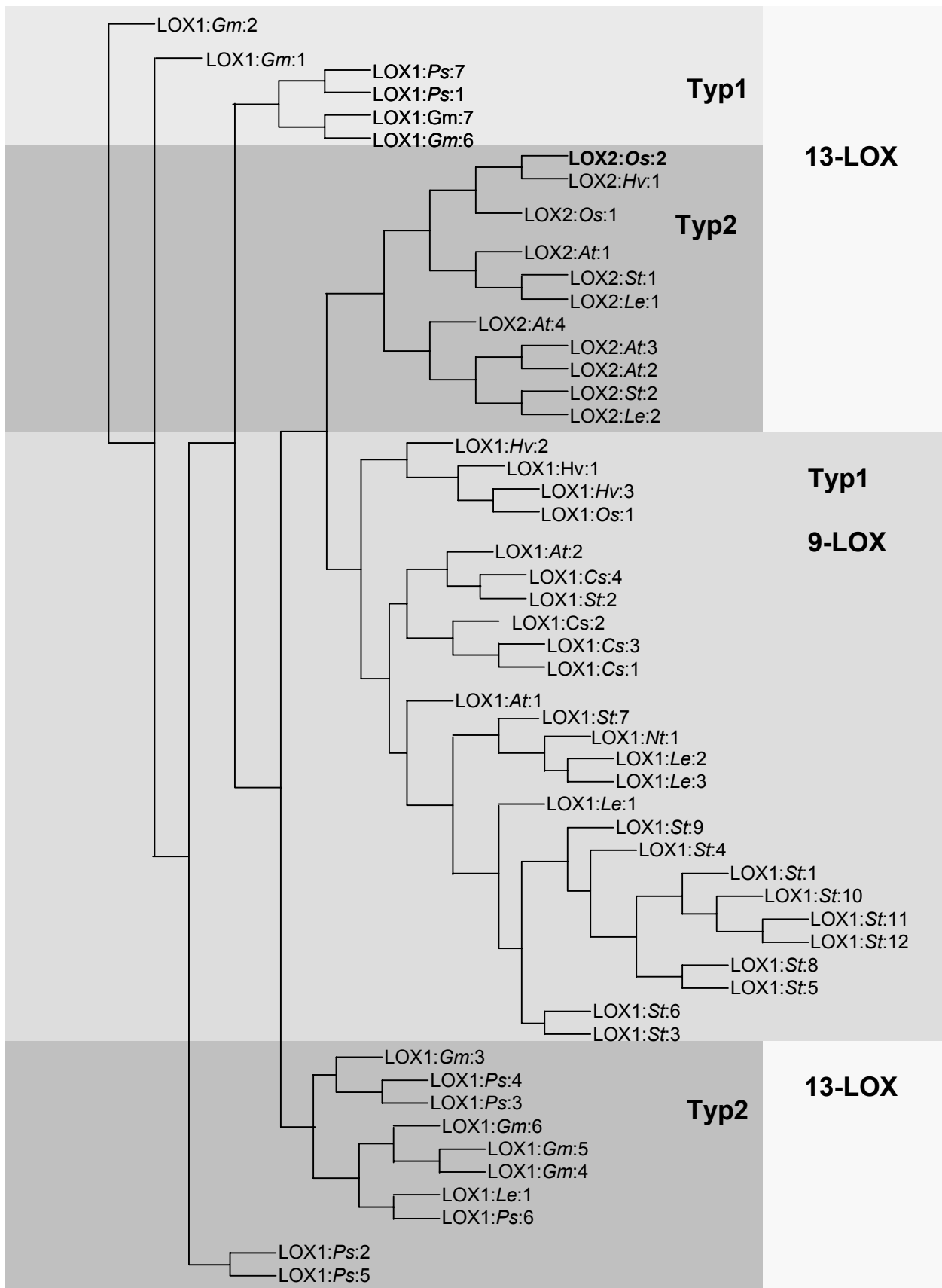


Abb. 4.1: Phylogenetischer Stammbaum ausgesuchter pflanzlicher Lipoxygenasen. Die dargestellten Proteine sind unter den folgenden Acc.-Nummern in der Genbank eingetragen: *Arabidopsis thaliana* – LOX1:At:1 (AtLOX1, Q06327), LOX2:At:1 (AtLOX2,

P38418), LOX2:At:2 (AtLOX3, AAF79461), LOX2:At:3 (AtLOX4, AAF21176), LOX1:At:2 (AtLOX5, CAC19365), LOX2:At:4 (AtLOX6, AAG52309); *Cucumis sativa* – LOX1:Cs:1 (AAC61785), LOX1:Cs:2 (CsULOX, AAA79186), LOX1:Cs:3 (CsLBLOX, CAA63483), LOX1:Cs:4 (CAB83038); *Glycine max* – LOX1:Gm:1 (Soybean LOX1, AAA33986), LOX1:Gm:2 (Soybean LOX2, AAA33987), LOX1:Gm:3 (Soybean LOX3, CAA31664), LOX1:Gm:4 (Soybean vlxa, BAA03101), LOX1:Gm:5 (soybean vlxb, AAB67732), LOX1:Gm:6 (Soybean vlxc, AAA96817), LOX1:Gm:7 (Soybean vlxd, S13381), LOX1:Gm:8 (Soybean vlxe, AAC49159); *Hordeum vulgare* – LOX1:Hv:1 (HvLOXA, Barley LOXA, AAA64893), LOX1:Hv:2 (HvLOXB, Barley LOXB, AAB60715), LOX1:Hv:3 (HvLOXC, Barley LOXC, AAB70865), LOX2:Hv:1 (HvLOX1, AAC12951); *Lycopersicon esculentum* – LOX1:Le:1 (tomLOXA, P38415), LOX1:Le:2 (tomLOXB, P38416), LOX1:Le:3 (tomLOXtox, AAG21691), LOX2:Le:1 (tomLOXC, AAB65766), LOX2:Le:2 (tomLOXD, AAB65767); *Nicotiana tabacum* – LOX1:Nt:1 (NtLOX, S57964); *Oryza sativa* – LOX1:Os:1 (CAA45738), LOX2:Os:1 (ORYSALOX, BAA03102), **LOX2:Os:2 (OsLOX, RCI1, CAC01439)**, *Pisum sativum* – LOX1:Ps:1 (AAB71759), LOX1:Ps:2 (CAA55318), LOX1:Ps:3 (CAA55319), LOX1:Ps:4 (Pea LOX, CAA30666), LOX1:Ps:5 (Pea LOX2, CAA34906), LOX1:Ps:6 (Pea LOXG, CAA53730), LOX1:Ps:7 (CAC04380); *Solanum tuberosum* – LOX1:St:1 (SOLTULOX1, S44940), LOX1:St:2 (STLOX, AAD09202), LOX1:St:3 (StLOX1, S73865), LOX1:St:4 (CAA64766), LOX1:St:5 (CAA64765), LOX1:St:6 (POTLX-2, AAB67860), LOX1:St:7 (POTLX-3, AAB67865), LOX1:St:8 (POTLX-1, AAB67858), LOX1:St:9 (AAD04258), LOX1:St:10 (pLOX2, AAB81595), LOX1:St:11 (pLOX1, AAB81594), LOX1:St:12 (CAB65460), LOX2:St:1 (StLOXH1, CAA65268), LOX2:St:2 (StLOXH3, CAA65269) - (in Anlehnung an Feussner und Wasternack, 2002)

In die gleiche Subgruppe des phylogenetischen Baums wie RCI1 und LOX2:Hv:1 kann auch eine Lipoxygenase aus Weizen eingeordnet werden (in Abbildung 4.1 nicht gezeigt), deren Transkripte nach Inokulation mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, dem echten Mehltau der Gerste, akkumulieren (Grambow und Seiler, unveröffentlicht). Auffällig ist, dass die genannten Lipoxygenasen dieser Subgruppe alle aus den Gramineen stammen. Dies könnte auf eine Beteiligung dieser Enzyme an einer für diese Pflanzengruppe spezifischen Reizantwort hindeuten. Möglich wäre eine spezielle Funktion dieser Lipoxygenasen innerhalb der induzierten Resistenz bei Gramineen, da sie entweder nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren, wie zum Beispiel Salicylsäure und BTH, oder im Fall der Weizen-LOX nach biologischer Resistenzinduktion mit einem Nicht-Wirt-Pathogen in der Pflanze akkumulieren.

4.1.4 Subzelluläre Lokalisation von RCI1

Die intrazelluläre Lokalisation von bestimmten Lipoxygenase-Isoenzymen erlaubt unter Umständen Aussagen über deren physiologische Funktion (Feussner and Wasternack, 2002).

Lipoxygenasen können in verschiedenen Kompartimenten der pflanzlichen Zellen lokalisiert sein. So wurden im Tomatenpericarp sowohl lösliche als auch Membran-assoziierte Isoformen beschrieben (Droillard et al., 1993). In Sojabohnen wurde ebenfalls eine mit der Plasmamembran assoziierte Lipoxygenase nachgewiesen (Macrí et al., 1994). Wardale und Lambert (1980) zeigten das Vorhandensein von Lipoxygenasen in Vakuolen von Gurkenfrüchten und Tranbarger et al. (1991) in Vakuolen bei Sojabohnen. In Gurke wird eine Lipidkörperlipoxygenase sehr früh während der Keimung exprimiert (Höhne et al., 1996). In *Arabidopsis* wurde eine Chloroplasten-Lipoxygenase identifiziert, welche für die wundinduzierte Jasmonatsynthese benötigt wird und in Gerste wurde eine Methyljasmonat-induzierte chloroplastidäre Lipoxygenase gefunden (Vörös et al., 1998). Die meisten bekannten chloroplastidären Lipoxygenasen befinden sich im Stroma (Feussner und Wasternack, 2002). Allerdings ist zum Beispiel in Spinat Lipoxygenaseaktivität in der „envelope“-Fraktion aus Chloroplasten lokalisiert (Blée and Joyard, 1996).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass es bei den unterschiedlichen Lipoxygenase-Isoformen, durch ihre spezifische Lokalisation zusammen mit der Kinetik ihrer Aktivität, zu einer Steuerung der Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäurederivate kommt. Diese Primärmetabolite können dann wiederum in die unterschiedlichen Sekundärreaktionen des Lipoxygenasestoffwechsels (s. 1.6.1) einfließen.

Die Lipoxygenase RCI1 ist, wie in Kapitel 4.1.3 beschrieben, eine Typ2-Lipoxygenase und besitzt ein putatives N-terminales Transitpeptid zur Direktion des Proteins in die Chloroplasten. Mittels konfokaler Lasermikroskopie konnte die Lokalisation eines Fusionsproteins aus dem putativen Transitpeptid von RCI1 und GFP in den Chloroplasten verifiziert werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass RCI1, ebenso wie die eng verwandte LOX2:*Hv*:1 aus Gerste (s. 4.1.3), in den Chloroplasten lokalisiert ist.

Die genaue Sublokalisierung von RCI1 innerhalb des Chloroplasten ist nicht klar. Allerdings befinden sich die meisten chloroplastidären Lipoxygenasen im Stroma. Da RCI1 ein pH-Optimum von 8,8 besitzt (Rademacher, 1999; Schaffrath et al., 2000b), kann das Enzym somit unter den physiologischen Bedingungen im Stroma der Chloroplasten aktiv sein, wenn während der Photosynthese der pH-Wert im Stroma von 7 auf 8 ansteigt. Dies unterscheidet RCI1 von anderen bisher bekannten chloroplastidären Lipoxygenasen, wie RLL2 aus Reis oder Lox2:*Hv*:1 aus Gerste. Diese besitzen pH-Optima zwischen 5 und 7, was auf eine geringe Aktivität dieser Lipoxygenasen unter den, während der Photosynthese vorliegenden, Bedingungen im Stroma schließen lässt.

Die Aufklärung der Sublokalisierung von RCI1 in Chloroplasten ist zur Klärung der genannten Zusammenhänge sehr interessant. Es wäre daher von Vorteil, wenn RCI1-spezifische Antikörper (anti-RCI1-IgGs) für eine Westernanalyse verschiedener Chloroplastenfraktionen zur Verfügung stehen würden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher versucht, Antikörper gegen ein Fusionsprotein aus GST und einem Peptidfragment von RCI1 herzustellen (s. 3.9). Das Endblutungsserum zeigte dabei kaum Spezifität und es kam zu Kreuzreaktionen mit einer großen Anzahl an Proteinen aus Pflanzen- und Bakterienextrakten (s. 3.9.3). Die daraufhin durchgeführte Anreicherung der IgG-Antikörper aus dem Endblutungsserum mit Hilfe von Protein A-Agarose führte zwar dazu, dass insbesondere in den Pflanzenextrakten weniger Banden detektiert wurden, also die Spezifität des Serums erhöht wurde, aber trotz Anreicherung der IgG-Antikörper konnte die erwartete 103 kDa-RCI1-Bande weder in Extrakten aus BTH-behandelten Reispflanzen noch im Extrakt aus *RCI1* exprimierenden *E. coli* M15-Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Es konnte mit Hilfe der gereinigten Antikörperfraktion allerdings das etwa 33 kDa große Fusionsprotein aus dem RCI1-Peptid und GST, das etwa 7 kDa große RCI1-Peptid und der 26 kDa große GST-Anteil des Fusionsproteins detektiert werden. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Antikörper primär gegen den GST-Anteil des Fusionsproteins gerichtet sind. Für weitere Versuche wäre es sinnvoll, die Spezifität der Antikörperfraktion weiter zu erhöhen. Dies könnte zum Beispiel durch Anreicherung RCI1-spezifischer Antikörper mittels einer Affinitätssäule mit dem gebundenen Antigen erfolgen.

4.2 Mögliche Funktionen der Lipxygenase RCI1

Für eine Reihe dikotyledoner Pflanzen, wie *Arabidopsis*, Gurke oder Tabak ist die Expression von SAR-Genen nach Inokulation mit einem nekrotisierenden Pathogen oder Behandlung mit einem Resistenzinduktor beschrieben worden (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996). Die Transkriptakkumulation der SAR-Gene korreliert mit dem Auftreten der IR, weshalb für diese Gene eine Rolle bei deren Etablierung postuliert wird. Einige SAR-Gene gehören zu den *PR*-Genen (s. 1.2). Die Expression einiger dieser *PR*-Gene in transgenen Pflanzen bewirkt eine erhöhte Resistenz der Pflanzen gegen bestimmte Pathogene (Broglie et al., 1991; Alexander et al., 1993; Logemann et al., 1994; Jach et al., 1995). Während in Dikotyledonen durch chemische Resistenzinduktoren dasselbe Genset aktiviert wird wie bei biologischer Resistenzinduktion (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992; Friedrich et al., 1996; Lawton et al., 1996), differieren in Monokotyledonen die während der biologisch induzierten Resistenz und der

chemisch induzierten Resistenz aktivierten Gensets (Schweizer et al., 1989; Görlach et al., 1996; Mauch et al., 1998; Wäspi et al., 1998; Schaffrath et al., 2000a; 2000b).

Um die mögliche Funktion der Lipoxygenase RCI1, bzw. ihrer Metabolite, im Rahmen der Signaltransduktionskaskade der IR in Reis zu analysieren, wurde untersucht, ob die transiente Überexpression von RCI1 in Reisblättern die Transkription bestimmter Gene induzieren kann. Es wurden in dieser Arbeit zum einen das *Cht1*-Gen, codierend für eine Chitinase, als Marker für allgemeine Abwehrreaktionen, das *Rir1*-Gen als Beispiel für ein durch biologische Resistenzinduktoren aktivierbares Gen aus Reis und *PR1*, welches im Allgemeinen als Markergen für die IR gilt, gewählt.

Obwohl die genaue biochemische Funktion von PR1-Proteinen nicht bekannt ist, konnte für einige eine antifungale Wirkung detektiert werden (Alexander et al., 1993; Niderman et al., 1995; Rauscher et al., 1999). Dies könnte auf eine direkte Beteiligung der PR1-Genprodukte an der Pathogenabwehr hindeuten. Die Akkumulation von *PR1*-Transkripten wird zwar in Mono- und Dikotyledonen als molekularer Marker nach Applikation von Resistenzinduktoren diskutiert, es ist allerdings auch möglich, dass die Akkumulation einiger *PR*-Gentranskripte ein eher sekundärer Effekt der Resistenzantwort der Pflanze ist, bzw. sekundär durch Vernetzung von Signaltransduktionswegen ausgelöst wird.

In den 90er Jahren konnte durch die Analyse von Mutanten, hauptsächlich von *A. thaliana*, gezeigt werden, dass die Signaltransduktionswege, welche zur Induktion aktiver Abwehrmechanismen innerhalb der horizontalen, vertikalen oder der induzierten Resistenz führen, miteinander verbunden sein können und sich teilweise überschneiden. Es besteht ein regelrechtes Signaltransduktionsnetzwerk, in das Signalmoleküle, wie Jasmonat, Ethylen oder SA involviert sind (van Loon et al., 1998; Dong, 1998; Glazebrook, 1999).

In Dikotyledonen gibt es viele Hinweise auf eine Überlappung unterschiedlicher Signalwege. So zeigt sich, dass für die Induktion von Abwehrmechanismen SA-abhängige und –unabhängige Wege existieren, die zwar zur Aktivierung unterschiedlicher Gensets führen, aber trotzdem gemeinsame Elemente, wie zum Beispiel das regulatorische NPR1-Protein besitzen (Ryals et al., 1996; Vidal et al., 1997; Vignutelli et al., 1998). SA-unabhängige Wege können hierbei mit einem Anstieg des endogenen Jasmonatgehalts und der Produktion von Ethylen verbunden sein. So kann durch Behandlung mit Ethylen oder Jasmonat die Expression von Thionin- und Defensin-Genen induziert werden (Terras et al., 1995; Epple et al., 1997), während SA keinen Effekt auf deren Expression hat, sondern eine Expression von *PR*-Genen bewirkt. Die Infektion von *Arabidopsis* mit einem nekrotisierenden Pathogen führt zu einer Erhöhung des endogenen Jasmonatspiegels und zu einer Aktivierung von Defensin- und Thionin-Genen, sowie von SA-induzierbaren *PR*-

Genen (Epple et al., 1995). Hierbei wird die *PR*-Genexpression durch Applikation von Jasmonat verstärkt, was auf einen synergistischen Effekt zwischen dem Defensin/Thionin-Weg und dem SA-abhängigen Weg der SAR hindeutet. Obwohl es meist recht schwer ist, in Dikotyledonen gemachte Beobachtungen auf Monokotyledonen zu übertragen, konnten Schweizer et al. (1997) in Reis einen synergistischen Effekt zwischen Behandlung mit dem Resistenzinduktor DCINA, welcher ein funktionales Analogon von SA darstellt (Ryals et al., 1996), und Jasmonat beobachten. Die Applikation von Jasmonat bewirkte in den DCINA-induzierten Pflanzen die Verstärkung der Expression von Genen, welche an sich nicht durch Jasmonat aktiviert werden können. Auch führte die Jasmonatbehandlung zu einer Erhöhung der Resistenz, induziert durch eine schwach konzentrierte DCINA-Applikation, obwohl Jasmonatbehandlung alleine in Reis keine Resistenz induzieren kann (Schweizer et al., 1997).

Eine antagonistische Wirkung von Signalsubstanzen ist in einigen Systemen ebenfalls zu beobachten. So kommt es in Tomate durch SA zur Inhibition der Synthese von Proteinaseinhibitoren nach Induktion mit Systemin oder Jasmonat (Doares et al., 1995) und in verwundeten Tomatenblättern konnte durch Aspirin, einem funktionalen SA-Homolog, die Expression von Wundgenen durch Blockierung der Jasmonat-Biosynthese unterdrückt werden (Peña-Cortés et al., 1993).

Es konnte, wie beschrieben, noch ein weiterer zur IR führender, aber SA-unabhängiger Signalweg gefunden werden. Diese als ISR („induced systemic resistance“) bezeichnete Resistenz wird durch nicht-pathogene Rhizobakterien induziert (van Loon, 1998; Pieterse et al., 1998). In diesem Signaltransduktionsweg, der sich vom Defensin/Thionin-Weg und von der Wundantwort unterscheidet, wirken ebenfalls Jasmonat und Ethylen als Effektormoleküle (Pieterse and van Loon, 1999). SAR und ISR können simultan induziert werden, wodurch der Schutz der Pflanze gegen diverse Pathogene erhöht werden kann (van Wees et al., 2000). Es wird postuliert, dass das in beiden Wegen benötigte NPR1-Protein auf eine unbekannte Weise spezifische Antworten einleiten kann (Pieterse et al., 2002; Hammond-Kosak and Parker, 2003).

Dies alles deutet darauf hin, dass eine Pflanze in der Lage ist, sich an diverse Stimuli durch ein koordiniertes Netzwerk von Signalwegen zu adaptieren, in welchen niedermolekulare Substanzen wie Jasmonat, SA und Ethylen neben diversen Proteinen eine Rolle bei der Aktivierung unterschiedlicher und zum Teil überlappender Gensets spielen (Pieterse and van Loon, 1999).

In neuerer Zeit wurden am Beispiel von Gerste zusätzlich Hinweise gefunden, dass SA-Applikation eine spezifische Oxilipin-Signatur von Produkten aus dem

Octadecanoid-Weg in der Pflanze hervorrufen kann und es hierdurch zur Induktion von Gentranskription kommen kann (Weichert et al., 1999).

Für die Lipoxygenase RCI1 kommt aufgrund ihrer Reaktionsspezifitäten eine Rolle bei der Biosynthese des Pflanzenhormons Jasmonat in Betracht, welches besonders in den SA-unabhängigen Signaltransduktionswegen der IR eine Rolle spielt, bzw. im SA-abhängigen Signalweg der SAR synergistische oder antagonistische Effekte besitzen könnte. Weiterhin kommt für RCI1 auch eine Funktion bei der Synthese anderer Oxilipin-Signalmoleküle aus dem Octadecanoid-Weg in Frage. In den folgenden Kapiteln soll dies ausführlicher diskutiert werden.

4.2.1 Auswirkungen der Transformation von Reis mit verschiedenen RCI1-Konstrukten

Eine mögliche Funktion der Lipoxygenase RCI1 ist, wie beschrieben, die Bereitstellung von Signalmolekülen oder deren Vorstufen aus dem Octadecanoid-Weg, welche an der Etablierung der IR und unter Umständen an der Induktion der Transkription spezifischer Gene beteiligt sein könnten.

Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurde in dieser Arbeit ein Ansatz gewählt, bei dem Reisblätter mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* mit unterschiedlichen RCI1-Konstrukten unter Kontrolle des konstitutiven CaMV35S-Promotors transient transformiert wurden. Die Akkumulation bestimmter Transkripte (*PR1*, *Chl1*, *Rir1*) in den transformierten Blattfragmenten wurde anschließend untersucht.

Weiterhin wurden die RCI1-Konstrukte genutzt, um rekombinante Proteine in *E. coli* M15-Zellen zu exprimieren und deren Lipoxygenaseaktivität zu untersuchen.

4.2.1.1 Die Infiltration von *A. tumefaciens*-Suspensionen bewirkt die Akkumulation von Gentranskripten und die Steigerung der Lipoxygenaseaktivität in Reisblättern

Das Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* ist ein häufig genutztes Werkzeug, um Fremd-DNA in das pflanzliche Genom zu integrieren. Hier sollen zunächst kurz einige Prozesse bei der Infektion einer Pflanze mit *A. tumefaciens* dargestellt werden. Während der Infektion mit *A. tumefaciens* wird ein Stück DNA, die sogenannte T-DNA (Transfer-DNA), die sich auf dem Ti-Plasmid („tumor-inducing plasmid“) befindet, in die Pflanzenzelle übertragen. Dieses Plasmid wird lediglich in

einem sehr geringen Prozentsatz der natürlichen Bodenpopulation von *A. tumefaciens* gefunden (Zupan and Zambryski, 1995). Die T-DNA wird von 25 bp „direct repeats“ flankiert. Diese Grenzen („borders“) sind die einzigen *cis*-Elemente, welche für die Steuerung der Prozessierung der T-DNA notwendig sind. Jede beliebige DNA-Sequenz zwischen den beiden Bordern wird in die Pflanzenzelle transferiert. Die T-DNA codiert selbst keine Produkte, die ihren Transfer vermitteln, sondern trägt beim Wildtyp-Bakterium die Informationen für die Synthese der pflanzlichen Wachstumshormone Auxin und Cytokinin und für Enzyme zur Synthese neuer Aminosäure-Derivate, der Opine, die unter natürlichen Bedingungen nicht in den Pflanzen gebildet werden (Zupan and Zambryski, 1995). Die Prozessierung und der Transfer der T-DNA werden durch die in der *vir* (virulence)-Region des Ti-Plasmids codierten Faktoren vermittelt (Stachel and Nester, 1986). Diese *vir*-Gene werden nur exprimiert, wenn eine verwundete Pflanzenzelle als Infektionsziel vorhanden ist.

Auf der Basis dieses natürlichen Systems ist eine Vielzahl an künstlichen Transformationsvektoren entwickelt worden, welche breite Anwendung in der Molekularbiologie finden (Fraley et al., 1986). Die Nutzung dieser Vektoren erlaubt den Transfer von Fremd-DNA in Pflanzenchromosomen bei nur geringem Rearrangement und in geringen Kopienzahlen (Klee et al., 1987; Hamilton et al., 1996). Die Fremd-DNA wird zur Transformation der Pflanze anstelle der eliminierten Wildtyp-T-DNA zwischen die T-Border des Vektors kloniert. Der Transfer funktioniert auch dann, wenn die *vir*-Gene auf einem separaten Replikon lokalisiert sind (Hoekema et al., 1983). In einem sogenannten binären System fungiert ein verändertes Ti-Plasmid als Helfer und beinhaltet die *vir*-Gene und ein zweiter Vektor (binärer Vektor) trägt die artifizielle T-DNA bestehend aus der Fremd-DNA und einem Selektionsmarker. Der hier verwendete *A. tumefaciens*-Stamm LBA 4404 trägt das Helferplasmid pAL4404, welches durch Elimination der T-DNA-Region aus pTiAch5 entstanden ist (Hoekema et al., 1983). Das Ti-Plasmid pTiAch5 stammt aus dem *A. tumefaciens*-Originalisolat Ach5 und gehört zum Octopin-Typ. Als binäre Vektoren wurden unterschiedliche Derivate von pCambia (Cambia, Canberra, Australien) genutzt.

Die Prozesse, welche bei der Transformation von Pflanzen mittels *A. tumefaciens* zum Beispiel beim Transfer des T-Komplexes bzw. der Integration der T-DNA in der Wirtszelle ablaufen, sind weitgehend unbekannt.

Innerhalb des Infektionsmechanismus gibt es allerdings einige Schritte, bei denen pflanzliche Faktoren möglicherweise eine Rolle spielen:

1. bei der Anlagerung der Bakterien an die Pflanzenzellen-Oberfläche
 2. beim Transfer des T-Komplexes durch die pflanzliche Zellwand und Zellmembran
 3. beim Transport des T-Komplexes in den Kern
 4. bei der Integration der T-DNA in das pflanzliche Genom
- (Gelvin, 2000)

Hinweise auf die Notwendigkeit pflanzlicher Faktoren für die Transformation gibt es einige. So wurde eine *Arabidopsis*-Mutante isoliert, welche resistent gegen Transformation mit *A. tumefaciens* ist (Nam et al., 1999). Weiterhin bewirkt die Behandlung mit Phytohormonen in *Arabidopsis* eine Erhöhung der Transformations-Suszeptibilität (Chateau et al., 2000) und über „yeast two-hybrid“-Untersuchungen konnte die Interaktion einiger pflanzlicher Proteine mit *vir*-Proteinen gezeigt werden. So interagiert zum Beispiel das VIP1 aus *Arabidopsis* mit VirE2 (Tzfira et al., 2001) und für Cyclophiline konnte eine Interaktion mit VirD2 gezeigt werden (Deng et al., 1998). Auch führt die Infektion mit *A. tumefaciens* in Tabakzellkulturen zu einer differentiellen Expression bestimmter Gene (Veena et al., 2003).

In den in dieser Arbeit durchgeführten Transformationsexperimenten wurde die Akkumulation ausgewählter Transkripte mittels Northernanalyse untersucht (s. 3.4.3, 3.5.4, 3.5.5 und 3.6.4). An dieser Stelle soll zunächst die Akkumulation von *Rir1*- und *Cht1*-Transkripten in Reisblättern nach Infiltration von *A. tumefaciens*-Suspensionen diskutiert werden. Die cDNA von *Rir1a* codiert für ein Protein, welches nach Inokulation mit *P. syringae* pv. *syringae* aus Reiszellen sekretiert wird (Mauch et al., 1998). Transkripte von *Cht1*, einer Chitinase aus Reis, akkumulieren nach Behandlung mit SA, Verwundung, UV-Licht oder biotischen Elicitoren (Nishizawa et al., 1993).

Bei Hybridisierung mit der *Cht1*-Sonde zeigten sich in den entsprechenden Versuchen (s. 3.4.3 und 3.5.4), dass die Methode der Infiltration an sich bereits zu einer schwachen Akkumulation von *Cht1*-Transkripten in Reisblättern führte. Weiterhin führte die Infiltration von *Agrobacterium*, unabhängig vom Konstrukt, welches es beinhaltet, zu einer starken Induktion der *Cht1*-Transkription. In Blättern, die mit einer *A. tumefaciens*-Suspension infiltriert wurden, war 48 h nach Infiltration eine starke Transkriptionsinduktion von *Cht1* zu detektieren, welche zu späteren Zeitpunkten nach Infiltration deutlich schwächer wurde oder ganz verschwand. Die Transformation mit dem Konstrukt zur Überexpression der *RCI1* cDNA hatte hierbei keinerlei zusätzliche Auswirkungen auf die Akkumulation von *Cht1*-Transkripten. Die Induktion der *Cht1*-Transkription war jeweils auf die Infiltrationsstelle begrenzt.

Diese Daten korrelieren mit den Ergebnissen, welche Veena et al. (2003) für die Expression eines Sets von Genen in Tabakzellkulturen nach Kultivierung mit *A. tumefaciens* gefunden haben. Sie konnten zeigen, dass in diesem System eine Induktion diverser Abwehr-spezifischer Gene (zum Beispiel eine β -1,3-Glucanase oder *Sar8.2*) zu frühen Zeitpunkten (3-6 h) der Infektion erfolgte, welche allerdings 30-36 h nach der Infektion abnahm. Sie postulierten, dass diese Abwehrgene, welche als Reaktion der Pflanze auf die Infektion aktiviert werden, in deren weiterem Verlauf supprimiert werden. Die transiente Akkumulation von *Cht1*-spezifischen Transkripten deutet darauf hin, dass *Cht1* in das beschriebene Genset eingeordnet werden kann, zumal seine Transkription durch biotische Elicitoren auslösbar ist (Nishizawa et al., 1993).

Bei Hybridisierung mit der *Rir1*-Sonde führte wiederum die Methode der Infiltration an sich schon zu einer schwachen Akkumulation von Sonden-spezifischen Transkripten. Die Infektion mit Agrobakterien führte zu einer starken Akkumulation von *Rir1*-Transkripten, unabhängig vom Konstrukt, welches sie beinhalteten. Allerdings ist *Rir1* aufgrund seiner Transkriptionskinetik nicht in das gleiche Genset wie *Cht1* einzuordnen, da die Transkripte auch zu späten Zeitpunkten noch deutlich nachzuweisen waren. Die *Rir1*-Transkription zeigt somit eher eine Kinetik wie die der Gene, für die Veena et al. (2003) eine Bedeutung im Transformationsprozess postuliert haben. Hierzu gehören vor allem Gene, deren Produkte bei Zellwachstum oder T-DNA-Integration eine Rolle spielen (zum Beispiel Histone, Extensine und ribosomale Proteine). *Rir1a* könnte als mögliches Strukturprotein, welches im Zellwandkompartiment von Reis lokalisiert ist (Mauch et al., 1998), durchaus eine Funktion innerhalb der Transformationsprozesse mit *A. tumefaciens* besitzen. Zu spekulieren wäre über eine Funktion beim Transfer des T-Komplexes durch die pflanzliche Zellwand (vgl. Gelvin, 2000).

Ähnliches wie für die Akkumulation *Rir1*- und *Cht1*-spezifischer Transkripte konnte auch für die in Reisblättern gemessene Lipoxygenaseaktivität nach Infiltration festgestellt werden (s. 3.4.4). Die Infiltration von *A. tumefaciens* führte unabhängig vom Konstrukt, welches sie beinhalteten, zu einer Erhöhung der Lipoxygenaseaktivität in Reisblättern. Die Transformation mit dem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* bewirkte keine messbare weitere Auswirkung auf die Steigerung der Enzymaktivität. Möglich ist eine "Maskierung" der Erhöhung der LOX-Aktivität nach Überexpression von *RCI1* durch eine starke Aktivierung anderer LOX-Isoenzyme nach Infektion mit *A. tumefaciens*.

4.2.1.2 Die Lipxygenase *RCI1* hat eine Auswirkung auf die Induktion der *PR1*-Transkription

Im Gegensatz zur Akkumulation von *Cht1*- oder *Rir1*-Transkripten (s. 4.2.2) ist die Akkumulation von *PR1*-Transkripten auf die Blätter beschränkt, welche mit dem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* transformiert wurden (s. 3.4.3, 3.5.4, 3.5.5 und 3.6.4). Die stärkste Akkumulation von *PR1* war jeweils 48 h nach Infiltration zu detektieren. Die Induktion der Transkription von *PR1* erfolgte weder durch die Infiltrationsmethode noch allgemein durch Infektion mit *A. tumefaciens*. *PR1* kann somit in keine der beiden von Veena et al. (2003) beschriebenen Klassen der Gene eingeordnet werden, deren Expression in der Pflanze durch die Infektion mit *A. tumefaciens* induziert werden können.

Die Transformation mit dem Konstrukt für ein im katalytischen Zentrum deletiertes *RCI1*-Protein (*RCI1katDel*) bewirkt hingegen keine detektierbare Akkumulation *PR1*-spezifischer Transkripte (s. 3.5.4). Daher ist es zur Transkriptionsinduktion notwendig, dass das verwendete Konstrukt für ein enzymatisch aktives *RCI1*-Protein codiert.

Während das rekombinante Protein aus vollständiger Expression von *RCI1* in *E. coli* M15 im photometrischen Messansatz starke Lipxygenaseaktivität (s. 3.1.2, 3.5.2, 3.6.2) zeigte, konnte für das rekombinante Protein aus Expression eines Konstruktes mit einer Deletion im katalytischen Zentrum (*RCI1katDel*, s. 3.5.2, 3.6.2) keine signifikante Lipxygenaseaktivität detektiert werden.

Allerdings war es nicht möglich, eine Akkumulation von *RCI1*-Transkripten in den transformierten Blättern zu zeigen. Alle mit einer *RCI1*-spezifischen Sonde erhaltenen Hybridisierungssignale aus Gesamt-RNA-Proben (s. 3.4.3, 3.5.4 und 3.5.5) gingen auf Reste von DNA des Transformationskonstruktes zurück, welche aber durch Isolation und Anreicherung der PolyA⁺-mRNA aus den Ansätzen eliminiert werden konnten (s. 3.5.5). Aber auch nach der hierdurch ebenfalls bedingten Anreicherung der mRNA konnte in keinem Ansatz eine Akkumulation von Transgen-Transkripten beobachtet werden. Weiterhin war es bisher nicht möglich, das *RCI1*-Protein in Pflanzenextrakten über Westernanalyse nachzuweisen. Trotzdem besteht eine eindeutige Korrelation zwischen der Transformation von Reisblättern mit dem Konstrukt zur Überexpression der *RCI1* cDNA und der Akkumulation von *PR1*-Transkripten, da eindeutig gezeigt wurde, dass die Transformation mit einem Konstrukt, welches für ein vollständiges, funktionales *RCI1*-Protein codiert, für die Induktion der *PR1*-Transkription notwendig ist. Somit ist indirekt der kausale Zusammenhang zwischen *RCI1*-Expression und *PR1*-Transkription gezeigt.

Bei Transformation mit einem *RCI1*-Konstrukt, welches in Bezug auf die für das chloroplasidäre Transitpeptid codierende Sequenz deletiert ist, zeigt sich keine erkennbare *PR1*-Transkriptakkumulation (s. 3.6.4), obwohl für das entsprechende rekombinante Protein aus Expression in *E. coli* Lipoxxygenaseaktivität gezeigt wurde (s. 3.6.2 und 4.2.1). Es ist nun zu spekulieren, ob für die Induktion der Genexpression von *PR1* die Lokalisation des Transgens in den Chloroplasten notwendig ist. Hierzu wäre es sinnvoll, die Lokalisation des *RCI1cpTPDel*-Proteins aufzuklären. Dafür stehen die in Kapitel 3.6.5 beschriebenen *RCI1cpTPDel-GFP*-Fusionen zur Verfügung. Ein Grund für die fehlende Induktion der *PR1*-Transkription bei Transformation mit dem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1cpTPDel* kann darin begründet sein, dass das rekombinante *RCI1cpTPDel*-Protein in unabhängigen Versuchen eine deutlich reduzierte Lipoxxygenaseaktivität (nur 50-60 %) im Vergleich zum vollständigen rekombinanten *RCI1*-Protein zeigte (s. 3.6.2 und 4.2.1). Vielleicht reicht die Enzymaktivität des korrespondierenden Proteins nicht für die Induktion der *PR1*-Transkription aus. Allerdings ist auch der Grund für die reduzierte LOX-Aktivität des rekombinanten *RCI1cpTPDel*-Proteins noch unklar. Vielleicht hat die Deletion des Transitpeptids Auswirkungen auf die Faltung des Proteins und somit auf die Struktur des aktiven Zentrums, was zu einer geringeren Affinität des Enzyms zum Substrat führt. Ein anderer Grund für die geringere Aktivität in den bakteriellen Extrakten wäre unter Umständen auch eine geringere Expressionsrate dieses Konstruktes in *E. coli*, hervorgerufen durch Toxizität des Produktes für den Expressionsorganismus oder aber eine schlechtere Aufreinigung des Proteins durch die Bildung von "inclusion bodies". Wäre eine der beiden letztgenannten Möglichkeiten der Grund für die geringere Enzymaktivität, dann könnte das *RCI1cpTPDel*-Konstrukt im Transformationsansatz durchaus zu einer vergleichbaren Expression führen, wie das entsprechende *RCI1*-Konstrukt. Dies könnte dann als Hinweis gewertet werden, dass eine Lokalisation von *RCI1* im Chloroplasten für die Induktion der *PR1*-Transkription notwendig ist.

Im Anschluss an diese Beobachtungen stellt sich die Frage nach dem Mechanismus für die Induktion der *PR1*-Transkription nach Überexpression von *RCI1* in Reisblättern.

In Gerste konnte gezeigt werden, dass nach Applikation von SA oder Jasmonat die 13-Lipoxxygenase LOX2:*Hv*:1 (*BCI1*) transkriptionell aktiviert wird (Vörös et al., 1998). Weiterhin löst die Applikation von SA in Gerste die Induktion der *HvPR1b*-Expression aus (Weichert et al., 1999), aber nicht die Bildung von Jasmonat über den AOS-Weg (Hause et al., 1999). Auch Kogel et al. (1995) konnten in Gerste keine Änderung des endogenen Jasmonatspiegels nach chemischer Resistenzinduktion feststellen, obwohl LOX2:*Hv*:1 akkumuliert (Beßer et al., 2000). Dies deutet darauf hin, dass

diese Lipoxygenase in Gerste nicht an der Bereitstellung von Metaboliten für die Jasmonatbiosynthese beteiligt ist. Weiterhin konnten Weichert et al. (1999) anhand des Oxilipin-Profil zeigen dass SA-Applikation in Gerste ebenfalls nicht zur Akkumulation von Produkten des DES- oder HPL-Weges führt. Allerdings konnte die Akkumulation von 13(S)-HOT über den Reduktaseweg festgestellt werden (vgl. 1.6.1). Diese 13(S)-HOT sind ebenso wie SA in der Lage, bei exogener Applikation die Akkumulation von *PR1b*-Transkripten in Gerste zu bewirken. Es wurde daher geschlossen, dass die Aktivierung der *PR1b*-Transkription in Gerste nach Applikation von SA über eine Lipoxygenase-abhängige Akkumulation der 13(S)-HOT, wahrscheinlich ausgehend von LOX2:*Hv*:1, bzw. über deren Metabolite, erfolgt.

In Reis wird die *RCI1*-Transkription nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren, wie zum Beispiel BTH, welches wie DCINA als Wirkungsanalogon von SA angesehen wird (Ryals et al., 1996), aktiviert (Schaffrath et al., 2000b). In dieser Arbeit konnte eine Korrelation zwischen der Transformation von Reis mit einem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* und der Akkumulation von *PR1*-(*OsPR1a*-) Transkripten gezeigt werden. Ferner konnte in Reis die Aktivierung der *PR1*-Transkription nach Applikation von 13(S)-HOT detektiert werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass die *PR1*-Genexpression nach Transformation mit *RCI1*, wie für *HvPR1b* in Gerste gezeigt, via 13(S)-HOT aus dem Reduktaseweg des Lipoxygenase-Stoffwechsels induziert werden könnte. Dass *RCI1* und LOX2:*Hv*:1 bei der phylogenetischen Analyse in derselben Subgruppe zu finden sind, stützt diese Hypothese ebenfalls.

Allerdings passen die ermittelten Kinetiken für die Genaktivierung von *PR1* nach Transformation und nach 13(S)-HOT-Applikation nicht ganz in ein Schema, da eine Akkumulation korrespondierender Transkripte schon 48 h nach Transformation aber erst 72 h nach Applikation der 13(S)-HOT erfolgt. Die Aufnahme der 13(S)-HOT erfolgt lediglich passiv durch Aufsaugen der Lösung, bzw. Diffusion in die Blattfragmente, während bei der Transformation aktiv in den Interzellularraum infiltriert wird. Dies könnte solche zeitlichen Unterschiede erklären.

In Reis kommt es nach Applikation von DCINA, welche einen ähnlichen Wirkmechanismus wie BTH besitzt und ebenfalls zur Akkumulation von *RCI1*-Transkripten führt (Schaffrath et al., 2000b), neben der Expression von *PR1* auch zur Erhöhung des endogenen Jasmonatspiegels (Schweizer et al., 1997). Auch kann die exogene Applikation von Jasmonat die Akkumulation von *PR1*-Transkripten in Reis bewirken. Es ist also nicht ganz klar, ob in Reis nicht doch die ebenfalls 13-Lipoxygenase-abhängige Bildung von Jasmonat die Genaktivierung von *PR1* nach Transformation mit dem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* bewirkt. Hier

wäre dann eine mögliche Bedeutung für *RCI1* bei der Bereitstellung von 13-Hydroperoxylinolensäure als Vorstufen für die Jasmonatsynthese zu sehen. Jasmonat besitzt nicht nur einen Einfluss auf die Expression von spezifischen, in die Abwehr involvierter Gene unter Kontrolle SA-unabhängiger Signalwege, sondern kann durch die Vernetzung verschiedener Signaltransduktionskaskaden auch synergistische bzw. antagonistische Einflüsse auf Prozesse des SA-abhängigen Signalwegs der SAR haben (vgl. 4.2). Die Expression von PR-Proteinen gilt im Allgemeinen als SA-abhängig, da in Reisblättern jedoch konstitutiv hohe SA-Gehalte vorliegen (Chen et al., 1997), könnte die Expression von *PR1* auf einen synergistischen Effekt von SA und Jasmonat zurückzuführen sein.

Ob die durch Transformation mit dem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* ausgelöste Akkumulation von *PR1*-Transkripten eine essentielle Rolle in der IR von Reis spielt, kann hiermit nicht geklärt werden. Ansonsten könnte für *RCI1* auch eine Beteiligung an der Signalkette einer stressabhängigen Reaktion der Pflanze postuliert werden.

Schweizer et al. (1997) konnten in Reis keine Expression von *PR1* nach Behandlung mit geringen Konzentrationen des Resistenzinduktors DCINA feststellen, obwohl diese in der Lage waren, in den Pflanzen Resistenz zu induzieren. *PR1*-Expression kann also in Reis nicht unbedingt als Marker für die IR gesehen werden. Schweizer et al. (1997) postulierten, dass die Genprodukte, welche erst bei einer hohen Konzentration an DCINA akkumulieren, eher als Marker für den hierdurch ausgelösten Stress durch die mögliche Phytotoxizität der eingesetzten Induktorkonzentrationen dienen könnten.

4.2.2 Weitere denkbare Funktionen der Lipxygenase *RCI1*

In den vorangegangenen Kapiteln wurde für die Lipxygenase *RCI1* zum einen die mögliche Beteiligung an der Produktion antimikrobieller Metabolite oder aber an der Produktion von Signalsubstanzen diskutiert. Es muss allerdings auch über eine Rolle in der hypersensitiven Reaktion nachgedacht werden.

Der hypersensitive Zelltod in Pflanzen ist genetisch determiniert, was ein Indiz dafür ist, dass es sich bei der HR um eine Form des programmierten Zelltods handelt (Heath, 1998). Unter anderem kommt es in der HR zu einer Zerstörung von Membranen, die mit der Produktion von Hydroperoxiden mehrfach ungesättigter Fettsäuren korreliert (van Ginkel and Sevanian, 1997). Diese Hydroperoxidation ist mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) verknüpft (Porter et al., 1995; Mittler et al., 1996; Rustérucci et al., 1996). Auch kann die Inhibition der ROS-

Produktion, bzw. das Abfangen der ROS, sowohl die Lipidperoxidation, als auch den hypersensitiven Zelltod supprimieren (Doke and Ohashi, 1988).

Eine alternative Hypothese zur Membranschädigung sieht Lipoxygenaseprodukte als mögliche Quelle für die Peroxidation von Membranlipiden (Brash, 1999). Die durch Lipoxygenasen produzierten Fettsäurehydroperoxide können hierbei durch Interaktion mit Übergangsmetallen zu Radikalen umgewandelt werden, welche extrem membranzerstörend wirken (Grechkin, 1998). In Bohnen konnte ein Zusammenhang zwischen der Steigerung der Lipoxygenaseaktivität und der Peroxidation von Membranlipiden gezeigt werden (Croft et al., 1990). Rustérucci et al. (1999) demonstrierten, dass ein 9-LOX-abhängiger Lipidperoxidationsweg während der HR in Tabakblättern nach Behandlung mit dem Elicitor Cryptogein aktiviert wird. Sie konnten außerdem zeigen, dass diese 9-LOX freie Fettsäuren als Substrat nutzt und lieferten Hinweise, dass die entstehenden ungesättigten Fettsäurehydroperoxide an der Bildung nekrotischer Gewebeläsionen beteiligt sind. Jalloul et al. (2002) konnten in Baumwolle bei inkompatibler Interaktion mit *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* eine Korrelation zwischen der Produktion von 9(S)-Fettsäurehydroperoxiden durch eine induzierte 9-LOX und dem hypersensitiven Zelltod zeigen. In Linsenwurzelprotoplasten können 9- und 13-HPOT den Zelltod induzieren (Maccarone et al., 2000).

Die 13-LOX RCI1 kann an Membranschädigungen während der HR lediglich indirekt durch die Lipoxygenaseprodukte beteiligt sein, da die vorliegenden Daten zeigen, dass RCI1 intakte Membranlipide nicht direkt peroxidieren kann.

Eine weitere mögliche Rolle von Lipoxygenasen in der pflanzlichen Resistenz könnte auch in einer Beteiligung an Lignifizierungsreaktionen liegen. Bei der Pathogenabwehr kommt es unter anderem auch zur Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels, welche an der Synthese von Ligninbausteinen mitwirken können (Kombrink and Somssich, 1995). Bei Reis zum Beispiel konnte Thieron (1993) eine Korrelation zwischen der Inhibition des Pathogens in der Interaktion mit dem Pilz *M. grisea* und einer induzierten Lignifizierung zeigen, welche auf einer frühen Aktivierung wichtiger Enzyme der Ligninbiosynthese basiert. Die Polymerisierung der Ligninbausteine erfolgt durch Katalyse einer Peroxidase (Campa, 1991). Für diese Reaktion ist ein Elektronenakzeptor notwendig. Diese Funktion wird im Allgemeinen dem Wasserstoffperoxid zugeschrieben (Bolwell, 1996; Barceló, 1997), welches im Rahmen des "oxidativen burst" gebildet wird (Lamb and Dixon, 1997). Allerdings konnte Loers (1999) zeigen, dass auch die Primärprodukte der LOX-Reaktion, die Hydroperoxyfettsäuren, als Elektronenakzeptoren in der Peroxidase-katalysierten Polymerisierungsreaktion fungieren können. Aufgrund der

zeitlichen und räumlichen Gegebenheiten der Induktion der H_2O_2 - und Hydroperoxyfettsäurebildung in Weizenblättern nach Injektion eines Elicitors aus *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* postulierte sie für dieses System die Beteiligung von H_2O_2 an der Induktion der HR, der Signaltransduktion und der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen und für die Lipidhydroperoxide eine Rolle bei der im Cytosol ablaufenden Polymerisierung von monomeren aromatischen Substanzen zu späteren Zeitpunkten der Pathogenabwehr, wobei letztendlich die Polymerisierung des gesamten Zellinhalts, gleichbedeutend mit dem Zelltod (bzw. der HR) ist. Die Lignifizierung ist nicht auf inkompatible Interaktionen in Gen-für-Gen-Systemen beschränkt, sondern wird auch in der Nicht-Wirt-Resistenz und der IR beobachtet (Sticher et al., 1997).

Rein spekulativ könnte die durch chemische Resistenzinduktoren aktivierte Transkription der Lipoxygenase *RC11* im Zuge des von Conrath et al. (2001) beschriebenen "priming" innerhalb der IR notwendig für die Bereitstellung von Lipidhydroperoxiden als Elektronenakzeptoren für die beschriebenen Polymerisierungsreaktionen sein.

Einen Hinweis, dass *RC11* bei der Etablierung einer HR und/oder des Zelltods involviert sein könnte, geben die Versuche zur Herstellung stabiler CaMV35S:*RC11*-Reislinien. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung von *RC11*-Überexpressionslinien die *RC11* cDNA unter Kontrolle des konstitutiven CaMV35S - Promotors in den Vektor pROB 5 kloniert. Die Co-Transformation von Reiskalli mit diesem Konstrukt und einem Plasmid mit dem Hygromycinresistenzgen als Selektionsmarker, sowie Selektion und Regeneration der Transformanten wurde freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Elisabetta Lupotto, Istituto Sperimentale per la Cerealicoltura, Bergamo, Italien durchgeführt (s. 3.8).

Es stellte sich bei der PCR-Kontrolle der regenerierten Pflanzen heraus, dass keine einzige das *RC11*-Konstrukt trug. Es fiel allerdings auf, dass eine große Anzahl Embryonen nach der Transformation nekrotisch wurden und nicht regeneriert werden konnten (persönliche Mitteilung durch Elisabetta Lupotto). Wahrscheinlich besaßen alle positiv selektierten Pflanzen nur das Plasmid für Hygromycinresistenz und Embryonen, die beide Konstrukte trugen, waren möglicherweise lethal. Es ist daher möglich, dass eine konstitutive Expression von *RC11* in den transformierten Reisembryonen zum Zelltod führen kann, also eine HR-ähnliche Reaktion ausgelöst wurde.

Es wäre zur Klärung dieser Frage interessant, die *RC11* cDNA unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors zu stellen und mit diesem Konstrukt erneut Reiskalli zu transformieren. Als induzierbare Promotoren stehen zum Beispiel der bakterielle

Tetracyclin-Promotor oder auch Steroid-induzierbare Promotoren zur Verfügung (Gatz and Lenk, 1998).

4.3 Zusammenfassung der Analyse der Lipxygenase RCI1

- Unter stringenten Bedingungen hybridisiert nur ein Gen im Reisgenom mit einer *RCI1*-spezifischen Sonde.
- RCI1 ist eine Typ2-LOX und im Chloroplasten lokalisiert.
- RCI1 ist eine 13-Lipxygenase.
- RCI1 benötigt freie Fettsäuren als Substrat.
- Die transiente Transformation von Reisblättern mit einem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* führt zur Akkumulation von *PR1*-Transkripten.
- Die Applikation von 13(S)-HOT induziert in Reis ebenfalls die *PR1*-Transkription.
- RCI1 ist möglicherweise in die Induktion des hypersensitiven Zelltods involviert.

5 Zusammenfassung

Durch synthetische Funktionsanaloga der Salicylsäure, wie zum Beispiel BTH, kann das Phänomen der systemisch induzierten Resistenz (SAR) in Pflanzen ausgelöst werden. Die Pflanzen erhalten hierbei einen lang anhaltenden Schutz gegenüber einem breiten Spektrum an Pathogenen. Allerdings wird die systemische Ausbreitung des Phänomens durch die systemische Verbreitung des Induktors in der Pflanze bestimmt. Die Mechanismen, welche der chemisch induzierten Resistenz in Getreide zugrunde liegen, sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die Behandlung von Monokotyledonen mit chemischen Resistenzinduktoren führt zur Expression von Genen mit teilweise unbekannter Funktion. Einige von ihnen sind spezifisch in der chemisch induzierten Resistenz exprimiert und werden deshalb als Markergene für diese angesehen.

In einer molekularbiologischen Analyse der chemisch induzierten Resistenz bei Reis wurde mit Hilfe einer cDNA Bank eine cDNA identifiziert, deren korrespondierende Transkripte nach Applikation chemischer Resistenzinduktoren, aber nicht nach Infektion, akkumulieren. Hierbei handelt es sich um die *RCI1*-cDNA ("rice chemically induced cDNA1"), deren Genprodukt eine Lipxygenase darstellt. Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Akkumulation der Transkripte von *RCI1* und dem Auftreten von Resistenz der Pflanzen nach Behandlung mit Resistenzinduktoren. Eine Beteiligung von *RCI1* an der Ausprägung des Phänotyps der induzierten Resistenz in Reispflanzen scheint daher möglich.

Bei der biochemischen Charakterisierung von *RCI1* wurde zur Vervollständigung bisheriger Ergebnisse deren Produktspezifität in Bezug auf das Substrat Linolensäure bestimmt. Hierbei konnte die Zuordnung von *RCI1* in die Klasse der 13-Lipxygenasen (13-LOX) bestätigt werden. Weiterhin wurden als wahrscheinliche Substrate von *RCI1* freie Fettsäuren identifiziert.

Durch eine Southernanalyse wurde gezeigt, dass im Genom von Reis unter stringenten Bedingungen nur ein einziges Gen mit einer *RCI1*-Sonde hybridisiert.

Die subzelluläre Lokalisation eines Fusionsproteins aus dem putativen N-terminalen Transitpeptid von *RCI1* mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) als Reporter wurde nach Überexpression in den Chloroplasten nachgewiesen.

Im Weiteren wurde die mögliche Funktion von *RCI1* in der chemisch induzierten Resistenz bei Reispflanzen untersucht. Ein transienter Assay zur Überexpression von *RCI1* in Reisblättern führte zur Akkumulation von *PR1*-Transkripten in den transformierten Blattbereichen. Die Transformation mit einem Konstrukt von *RCI1*, welches für ein in der katalytischen Domäne deletiertes Protein codiert, induzierte die *PR1*-Transkription nicht. Dies zeigt, dass die enzymatische Aktivität von *RCI1* für die Induktion der *PR1*-Transkription in diesem Assay unabdingbar war.

Die Transformation mit einem Konstrukt zur Überexpression von *RCI1* ohne ein N-terminales chloroplastidäres Transitpeptid konnte ebenfalls keine *PR1*-Transkription induzieren. Da das korrespondierende rekombinante Protein dieses Konstruktes eine reduzierte Lipxygenaseaktivität besitzt, konnte nicht zweifelsfrei geklärt werden, ob die Expression von *RCI1* am physiologisch korrekten Ort, den Chloroplasten, erfolgen muss, um die *PR1*-Transkriptakkumulation zu induzieren.

Die Akkumulation von *PR1*-Transkripten konnte auch durch die Applikation von 13(S)-HOT, einem Oxylin aus dem Lipxygenasestoffwechsel, induziert werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Rolle von *RCI1* als Komponente der Signaltransduktion bei der Etablierung der IR in Reis sein.

6 Summary

The phenomenon of systemic acquired resistance (SAR) can be induced by the application of chemical substances like BTH, which is considered as a functional analogue of salicylic acid. Acquired resistance in plants leads to a long-lasting protection against a broad range of pathogens. However, in case of chemically-induced resistance the systemic propagation of protection observed may be due to the systemic spread of the inducing agent itself. The details of how chemically-induced crop plants respond to pathogens is not well understood. Treatment of monocotyledonous plants with chemical resistance inducers leads to expression of several genes some with unknown function. Some of them are referred to as "marker-genes" because of their expression during the onset of the chemically induced resistance response.

A cDNA was cloned, whose corresponding transcripts accumulated after treatment of rice plants with chemical resistance inducers but not after infection. This cDNA was referred to as *RCI1* ("rice chemically induced cDNA1") and it encodes a lipooxygenase. A strong correlation was demonstrated in rice between the accumulation of *RCI1*-transcripts and the occurrence of resistance after treatment with chemical inducers. *RCI1* might orchestrate the onset of this type of resistance.

Biochemical analysis was carried out to investigate the positional specificity of the *RCI1*-lipooxygenase. Finally, the classification of *RCI1* as a member of the 13-LOX family was confirmed. Free fatty acids were identified as the preferred substrate for *RCI1*.

In the genome of rice plants only a single gene seems to hybridise with an *RCI1*-probe under stringent conditions as shown by Southern analysis.

Overexpression of a fusion-protein, consisting of a putative N-terminal transitpeptide of *RCI1* and the green fluorescent protein (GFP) as a reporter, was localised subcellularly in chloroplasts.

Furthermore, *RCI1* was overexpressed in rice leaves to investigate the possible function of *RCI1* in chemically-induced resistance of rice. In this transient assay *RCI1*-overexpression led to the accumulation of *PR1*-specific transcripts. Transformation with an *RCI1*-construct encoding for an enzyme with a deletion in the catalytical domain did not show any accumulation of *PR1*-specific transcripts. Therefore, it was concluded that enzymatic activity of *RCI1* is necessary for the induction of *PR1*-transcription.

The transformation of rice leaves with a construct for overexpression of *RCI1* without the N-terminal chloroplast targeting signal also failed to induce *PR1*-transcription. However, the corresponding recombinant protein showed reduced lipooxygenase

activity. Therefore, it remains uncertain whether *RC1*-expression in the chloroplasts is necessary for the induction of *PR1*-transcription.

In addition 13(S)-HOT, an oxylipin from the lipoxygenase pathway was shown to induce accumulation of *PR1*-transcripts. These results may indicate that *RC1* is a component of the signaltransduction pathway of the chemically-induced acquired resistance response in rice.

7 Literatur

- Aasheim, H.C.; Deggerdal, A.; Smeland, E.B. and Hornes, E.A.** (1994)
A simple subtraction method for the isolation of cell-specific genes using magnetic monodisperse polymer particles. *BioTechniques* 16(4), 716-721
- Agrawal, G.K.; Jwa, N.S. and Rakwal, R.** (2000)
A novel rice (*Oryza sativa* L.) acidic *PR1* gene highly responsive to cut, phytohormones and protein phosphatase inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 274, 157-165
- Agrios, G.N.** (1997)
Plant Pathology. 4. ed., Academic Press, San Diego London Boston New York Sydney Tokyo Toronto
- Albrecht, T.; Kehlen, A.; Stahl, K.; Knöfel, H.D.; Sembdner, G. and Weiler, E.W.** (1993)
Quantification of rapid, transient increases in jasmonic acid in wounded plants using a monoclonal antibody. *Planta* 191, 86-94
- Alexander, D.; Stinson, J.; Pear, J.; Glascock, C.; Ward, E.; Goodman, R.M. and Ryals, J.** (1992)
A new multigen family inducible by tobacco mosaic virus or salicylic acid in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5, 513-515
- Alexander, D.; Goodman, R.M.; Gut Rella, M.; Glascock, C.; Weymann, K.; Friedrich, L.; Maddox, D.; Ahl-Goy, P.; Luntz, T.; Ward, E. and Ryals, J.** (1993)
Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 7327-7332
- Altschuler, M.; Grayburn, W.S.; Collins, G.B. and Hildebrand, D.F.** (1989)
Developmental expression of lipoxygenases in soybeans. *Plant Sci.* 63, 151-158
- Anuratha, C.S.; Zen, K.-C.; Cole, K.C.; Mew, T. and Muthukrishnan, S.** (1996)
Induction of chitinase and β -1,3-glucanase in *Rhizoctonia solani*-infected rice plants: isolation of an infection-related chitinase cDNA clone. *Physiol. Plant.* 97, 38-46
- Avdiushko, S.A.; Ye, X.S.; Hildebrand, D.F. and Kuc, J.** (1993)
Induction of lipoxygenase in immunized cucumber plants. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42, 83-95
- Axelrod, B.; Cheesgrough, T.M. and Laakso, S.** (1981)
Lipoxygenase from soybeans. *Meth. Enzymol.* 71 (C), 441-451
- Baker, C.J. and Orlandi, E.W.** (1995)
Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33, 299-321
- Barceló, A.R.** (1997)
Lignification in plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.* 176, 87-132
- Bell, E. and Mullet, J.E.** (1991)
Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water deficit, wounding and methyl jasmonate. *Mol. Gen. Genet.* 230, 1133-1137
- Bennet, R.N. and Wallsgrove, R.M.** (1994)
Translating review No. 72. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* 127, 617-633
- Beßer, K.; Jarosch, B.; Langen, G. and Kogel, K.H.** (2000)
Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Mol. Plant Pathol.* 1, 277-286
- Beßer, K.** (2001)
Chemisch induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste-Echter Gerstenmehltau: Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene der Gerste. Dissertation, JLU Gießen
- Bestwick, C.S.; Bennet, M.H.R. and Mansfield, J.W.** (1995)
Hrp mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* induces cell wall alterations but not membrane damage leading to the hypersensitive reaction in lettuce. *Plant Physiol.* 108, 503-516
- Bestwick, C.S.; Brown, I.R.; Bennet, M.H.R. and Mansfield, J.W.** (1997)
Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant Cell* 9, 209-221
- Bi, J.-M.; Kenton, P.; Mur, L.; Darby, R. and Draper, J.** (1995)
Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J.* 8, 235-246
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acid Res.* 7, 1513-1523

- Blatt, M.R.; Grabov, A.; Brearley, J.; Hammond-Kosack, K. and Jones, J.D.G.** (1999)
K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J.* 19, 453-462
- Blée, E. and Joyard, J.** (1996)
Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Physiol.* 110, 445-454
- Blée, E.** (1998a)
Biosynthesis of phytooxylipins : the Peroxygenase Pathway. *Fett/Lipid* 100, 121-127
- Blée, E.** (1998b)
Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog. Lipid Res.* 37, 33-72
- Blume, B.; Nürnberger, T.; Nass, N. and Scheel, D.** (2000)
Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12, 1425-1440
- Blumwald, E.** (1998)
Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3, 342-346
- Bohland, C.** (1997). Lipoxygenase aus Weizen - Elicitorwirkung, partielle Reinigung und biochemische Charakterisierung, Dissertation, RWTH Aachen
- Bolwell, G.P.** (1996)
The origin of the oxidative burst in plants. *Biochem. Soc. Transact.* 24, 437-442
- Bonas, U. and van den Ackerveken, G.** (1999)
Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 94-98
- Bowles, D.J.** (1990)
Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59, 873-907
- Braam, J. and Davis, R.W.** (1990)
Rain-, wind- and touch-induced expression of calmodulin and calmodulin-related genes in *Arabidopsis*. *Cell* 60, 357-364
- Bradford, M.M.** (1976)
A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of utilizing the principle protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-245
- Bradley, D.J.; Kjellbom, P. and Lamb, C.J.** (1992)
Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70, 21-30
- Brash, A.R.; Ingram, C.D. and Harris, T.M.** (1987)
Analysis of a specific oxygenation reaction of soybean lipoxygenase-1 with fatty acids esterified in phospholipids. *Biochemistry* 26, 5465-5471
- Brash, A.** (1999)
Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis and acquisition of substrate. *J. Biol. Chem.* 274, 23679-23682
- Brisson, L.F.; Tenhaken, R. and Lamb, C.J.** (1994)
Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712
- Broekaert, W.F.; Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A. and Osborn, R.W.** (1995)
Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.*, 108, 1353-1358
- Broglie, K.; Chet, I.; Holliday, M.; Cressman, R.; Biddle, P.; Knowlton, S.; Mauvais, C.J. and Broglie, R.** (1991)
Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197
- Bryngelsson, T.; Sommerknudsen, J.; Gregersen, P.L.; Collinge, D.B.; Ek, B. and Thordal-Christensen, H.** (1994)
Characterization and Molecular-Cloning of Basic PR-1-Type Pathogenesis-Related Proteins from Barley. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 267-275
- Callow, J.A.** (1984)
Cellular and molecular recognition between higher plants and fungal pathogens. In: *Encyclopedia of plant physiology, New Series Vol. 17, Cellular interactions*, Pirson, A. and Zimmermann, M.H. (eds.), Springer Verlag, pp 212-237

- Campa, A.** (1991)
Biological role of plant peroxidases: Known and potential function. In: Peroxidases in chemistry and biology, Vol. II, Everse, J.; Everse, K.E. and Grisham, M.B. (eds.), CRC Press, Boca Raton, pp 25-50
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Gordon, A.S. and Dong, X.** (1994)
Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6, 1583-1592
- Cao, H.; Glazebrook, J.; Clarke, J.D.; Volko, S. and Dong X.** (1997)
The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88, 57-63
- Carmona, M.J.; Molina, A.; Fernandez, J.A.; Lopez-Fando, J.J. and Garcia-Olmedo, F.** (1993)
Expression of the α -thionin gene from barley in tobacco confers enhanced resistance to bacterial pathogens. *Plant J.* 3, 457-462
- Chandra, S. ; Heinsteins, P.F. and Low, P.S.** (1996)
Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. *Plant Physiol.* 110, 976-986
- Chateau, S.; Sangwan, R.S. and Sangwan-Norreel, B.S.** (2000)
Competence of *Arabidopsis thaliana* genotypes and mutants for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer: role of phytohormones. *J. Exp. Bot.* 51, 1961-1968
- Chen, Z.X. and Klessig, D.F.** (1991)
Identification of a soluble salicylic acid-binding protein that may function in signal transduction in the plant disease response. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 88, 8179-8183
- Chen, Z.; Iyer, S.; Caplan, A.; Klessig, D. and Fan, B.** (1997)
Differential accumulation of salicylic acid and salicylic acid-sensitive catalase in different rice tissues. *Plant Physiol.* 114, 193-201
- Chern, M.-S.; Fitzgerald, H.A.; Yadav, R.C.; Canlas, P.E.; Dong, X. and Ronald, P.C.** (2001)
Evidence for a disease resistance pathway in rice similar to the *NPR1*-mediated signalling pathway in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27, 101-114
- Chester, K.S.** (1933)
The problem of acquired physiological immunity in plants. *Q. Rev. Biol.* 8, 275-324
- Chittoor, J.M.; Leach, J.E. and White, F.F.** (1997)
Differential induction of a peroxidase gene family during infection of rice by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 861-871
- Claes, B.; Dekeyser, R.; Villarroel, R.; van den Bulcke, M.; Bauw, G.; van Montagu, M. and Caplan, A.** (1990)
Characterization of a rice gene showing organ-specific expression in response to salt stress and drought. *Plant Cell* 2, 19-27
- Cohn, J.; Sessa, G. and Martin, G.B.** (2001)
Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 55-62
- Collinge, D.B.; Gregersen, P.L. and Thordal-Christensen, H.** (2001)
The nature and role of defence response genes in cereals. The powdery mildew: A comprehensive treatise. R.R. Belanger and W.R. Bushnell (eds.), APS Press, St. Paul, Minnesota, USA
- Conrath, U.; Thulke, O.; Katz, V.; Schwindling, S. and Kohler, A.** (2001)
Priming as a mechanism in induced systemic resistance in plants. *Eur. J. Plant Pathol.* 107, 113-119
- Creelman, R.A.; Tierney, M.L. and Mullet, J.E.** (1992)
Jasmonic acid/ methyljasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89, 4938-4941
- Creelman, R.A. and Mullet, J.E.** (1997)
Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355-381
- Christensen, A.B.; Cho, B.H.; Naesby, M.; Gregersen, P.L.; Brandt, J.; Madriz-Ordenana, K.; Collinge, D.B. and Thordal-Christensen, H.** (2002)
The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis related proteins. *Mol. Plant Pathol.* 3, 135-144
- Croft, K.P.C.; Voisey, C.R. and Slusarenko A.J.** (1990)
Mechanisms of hypersensitive cell collapse: correlation of increased lipoxygenase activity with membrane damage in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) inoculated with an avirulent race of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 49-62

- Croft, K.P.C.; Jüttner, F. and Slusarenko A.J.** (1993)
Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Plant Physiol. 101, 13-24
- Dalton, S.J.; Bettany, A.J.E; Timms, E. and Morris, P.** (1995)
The effect of selection pressure on transformation frequency and copy number in transgenic plants of tall fescue (*Festuca-Arundinacea* Schreb). Plant Sci. 108 (1), 63-70
- Dangl, J.L. ; Dietrich, R.A. and Richberg, M.H.** (1996)
Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. Plant Cell 8, 173-1807
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G.** (2001)
Plant pathogens and integrated defence responses to infection. Nature 411, 826-833
- Delaney, T.P.; Friedrich, L. and Ryals, J.A.** (1995)
Arabidopsis signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6602-6606
- Deng, W.; Chen, L.; Wood, D.W.; Metcalfe, T.; Liang, X.; Gordon, M.P.; Comai, L. and Nester, E.W.** (1998)
Agrobacterium VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7040-7045
- de Wit, P.J.G.M.** (1992)
Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 30, 391-418
- de Wit, P.J.G.M.** (1997)
Pathogen avirulence and plant resistance: a key role for recognition. Trends Plant Sci. 2, 452-458
- de Wit, P.J.G.M. and Joosten, M.H.A.J.** (1999)
Avirulence and resistance genes in the *Cladosporium fulvum* – tomato interaction. Curr. Opin. Microbiol. 2, 368-373
- Dixon, R.A.** (1986)
The phytoalexin response : Elicitation, signalling and control of the host gene expression. Biol. Rev. 61, 239-291
- Doares, E.H.; Narvaez-Vasquez, J.; Conconi, A. and Ryan, C.A.** (1995)
Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. Plant Physiol. 108, 1741-1746
- Doderer, A.; Kokkelink, I.; Van der Veen, S.; Valk, B.E.; Schram, A.W. and Douma, A.C.** (1992)
Purification and characterization of two lipoxygenase isoenzymes from germinating barley. Biochim. Biophys. Acta 1120, 97-104
- Doehlert, D.C.; Wicklow, D.T. and Gardner, H.W.** (1993)
Evidence implicating the lipoxygenase pathway in providing resistance to soybeans against *Aspergillus flavus*. Phytopathology, 83, 1473-1477
- Doke, N. and Ohashi, Y.** (1988)
Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. Physiol. Mol. Plant Pathol. 32, 163-175
- Dong, X.; Mindinos, M.; Davis, K.R. and Ausubel, F.M.** (1991)
Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* and by a cloned avirulence gene. Plant Cell 3, 61-72
- Dong, X.** (1998)
SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1, 316-232
- Dower, W.J.; Miller, J.F. and Ragsdale, C.W.** (1988)
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Research 16, 6127
- Droillard, M.J.; Rouet-Mayer, M.A.; Bureau, J.M. and Laurière, C.** (1993)
Membrane-associated and soluble lipoxygenase isoforms in tomato pericarp. Characterization and involvement in membrane alterations. Plant Physiol. 103, 1211-1219
- Ebel, J.** (1986)
Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. Annu. Rev. Phytopath. 24, 235-264
- Ellingboe, A.H.** (1981)
Changing concepts in host-pathogen genetics. Annu. Rev. Phytopath. 19, 125-143

- Elstner, E.F.; Oßwald, W. and Schneider, I.** (1996)
Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford
- El-Zahabi, H.M., Gullner, G. and Kiraly, Z.** (1995)
Effects of powdery mildew infection in barley on the ascorbate-glutathion cycle and other antioxidants in different host-pathogen interactions. *Phytopathology* 85, 1225-1230
- Emanuelsson, O.; Nielsen, H.; Brunak, S. and Von Heijne, G.** (2000)
Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* 300, 1005-1016
- Engelman, D.M.; Steitz, T.A. and Goldman, A.** (1986)
Identifying nonpolar transbilayer helices in amino-acid-sequences of membrane-proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 321-353
- English, J.; Bonner, J. and Haagen-Smit, A.J.** (1939)
Structure and synthesis of a plant wound hormone. *Science* 90, 329
- Epple, P.; Apel, K. and Bohlmann, H.** (1995)
An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiol.* 109, 1225-1230
- Epple, P.; Apel, K. and Bohlmann, H.** (1997)
Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of *Arabidopsis* against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9, 509-520
- Feussner, I. and Wasternack, C.** (1998)
Lipoxygenase catalyzed oxygenation of lipids. *Fett/Lipid* 100, 146-152
- Feussner, I.; Bachmann, A.; Höhne, M. and Kindl, H.** (1998)
All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase *in vitro*. *FEBS Lett.* 431, 433-436
- Feussner, I. and Kühn, H.** (2000)
Application of lipoxygenases and related enzymes for the preparation of oxygenated lipids. In: *Enzymes in Lipid Modification*, Bornscheuer, U.T. (ed.), Wiley, Weinheim, pp 309-336
- Feussner, I.; Kühn, H. and Wasternack, C.** (2001)
The lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci.* 6, 262-267
- Feussner, I. and Wasternack, C.** (2002)
The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53, 275-297
- Fiedler, S. and Wirth, R.** (1988)
Transformation of bacteria with plasmid DNA by electroporation. *Anal. Biochem.* 170, 38
- Flor, H.H.** (1956)
The complementary genetic systems in flax and flax rust. *Adv. Gen.* 8, 29-54
- Flor, H.H.** (1971)
Current status of the gene-for-gene-concept. *Annu. Rev. Phytopath.* 9, 275-296
- Fraley, R.T.; Rogers, S.G. and Horsh, R.B.** (1986)
Genetic transformation in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 4, 1-46
- Friedrich, L.; Lawton, K.; Ruess, W.; Masner, P.; Specker, N.; Gut Rella, M.; Meier, B.; Dincher, S.; Staub, T.; Uknes, S.; Métraux, J.-P.; Kessmann, H. and Ryals, J.** (1996)
A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10, 61-70.
- Fuller, M.A.; Weichert, H.; Fischer, A.M.; Feussner, I. and Grimes, H.D.** (2001)
Activity of soybean lipoxygenase isoforms against esterified fatty acids indicates functional specificity. *Arch. Biochem. Biophys.* 388, 146-154
- Gaffney, T.; Friedrich, L.; Vernooij, B.; Negrotto, D.; Nye, G.; Uknes, S.; Ward, E.; Kessmann, H. and Ryals, J.** (1993)
Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261, 754-756
- Gardner, H.W.** (1989)
Soybean lipoxygenase-1 enzymatically forms both 9(S)- and 13(S)-hydroperoxides from linoleic acid by a pH-dependent mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1001, 274-281
- Gardner, H.W.** (1991)
Recent investigations into lipoxygenase pathway of plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 221-239
- Gatz, C. and Lenk, I.** (1998)
Promotors that respond to chemical inducers. *Trends Plant Sci.* 3 (9), 352-358

- Gelli, A.; Higgins, V.J. and Blumwald, E.** (1997)
Activation of plant plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* 113, 269-279
- Gelvin, S.** (2000)
Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 223-256
- Gillmor, S.A.; Villasenor, A.; Fletterick, R.; Sigal, E. and Browner, M.F.** (1998)
The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat. Struct. Biol.* 4, 1003-1009
- Glazebrook, J.; Rogers, E.E. and Ausubel, F.M.** (1996)
Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143, 973-982
- Glazebrook, J.** (1999)
Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 280-286
- Glazener, J.A.; Orlandi, E.W. and Baker, J.C.** (1996)
The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* 110, 759-763
- Görlach, J.; Vohlrath, S.; Knauf-Beiter, G.; Hengy, G.; Beckhove, U.; Kogel, K.-H.; Oostendorp, M.; Staub, T.; Ward, E. and Kessmann, H.** (1996)
Benzothiadiazol, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8, 629-643.
- Grechkin, A.** (1998)
Recent development in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog. Lipid Res.* 37, 317-352
- Greenberg, J.T.** (1996)
Programmed cell death: A way of life for plants. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, 12094-12097
- Grimes, H.D.; Tranbarger, T.J. and Franceschi, V.R.** (1993)
Expression and accumulation patterns of nitrogen-responsive lipoxygenase in soybeans. *Plant Physiol.* 103, 457-466
- Grossmann, S. and Zakut, R.** (1979)
Determination of the activity of lipoxygenase (lipoxidase). *Meth. Biochem. Anal.* 25, 303-329
- Hain, R.; Reif, H.; Krause, E.; Langebartels, R.; Kindl, H.; Vornam, B.; Wiese, W.; Schmelzer, E.; Schreier, P.H.; Stocker, R.H. and Stenzel, K.** (1993)
Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156
- Hamberg, M. and Samuelsson, B.** (1967)
On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.* 242, 5329-5235
- Hamberg, M.** (1988)
Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid: Identification of an allene oxide cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156, 543-550
- Hamberg, M.** (1995)
Hydroperoxide isomerases. *J. Lipid Mediat. Cell Signal.* 12, 283-292
- Hamberg, M.** (1999)
An epoxy alcohol synthase pathway in higher plants: Biosynthesis of antifungal trihydroxy oxylipins in leaves of potato. *Lipids* 34, 1131-1142
- Hamilton, C.M.; Frary, A.; Lewis, C. and Tanksley, S.D.** (1996)
Stable transformation of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9975-9979
- Hammerschmidt, R.** (1984)
Rapid deposition of lignin in potato tuber tissue as a response to fungi non-pathogenic on potato. *Physiol. Plant Pathol.* 24, 33-42
- Hammond-Kosak, K.E. and Jones, J.D.G.** (1996)
Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791
- Hammond-Kosak, K.E. and Jones, J.D.G.** (1997)
Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 575-607
- Hammond-Kosak, K.E. and Parker, J.E.** (2003)
Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr. Opin. Biotech.* 14, 177-193

- Hanahan, D.** (1983)
Plasmid screening at high colony density. *Meth. Enzymol.* 100, 333
- Harding, S.A.; Oh, S.H. and Roberts, D.M.** (1997)
Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J.* 16, 1137-1144
- Hause, B.; Vörös, K.; Kogel, K.H.; Besser, K. and Wasternack, C.** (1999)
A jasmonate responsive lipoxygenase of barley leaves is induced by plant activators but not by pathogens. *J. Plant Physiol.* 154, 459-462
- Heath, M.C.** (1974)
Light and electron microscopic studies of the interaction of host and nonhost plants with cowpea rust – *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *Physiol. Plant Pathol.* 4, 403-414
- Heath, M.C.** (1980)
A generalized concept of host-parasite specificity. *Phytopathology* 71, 1121-1123
- Heath, M.C.** (1987)
Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Can. J. Plant Pathol.* 9, 389-397
- Heath, M.C.** (1991)
The role of gene-for-gene interactions in the determination of host species specificity. *Phytopathology* 81, 127-130
- Heath, M.C.** (1998)
Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 117-124
- Heath, M.C.** (2000)
Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 315-319
- Heath, M.C.** (2001)
Nonhost resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 58, 53-54
- Heo, W.D.; Lee, S.H.; Kim, M.C.; Kim, J.C.; Chung, W.S.; Chun, H.J.; Lee, K.J.; Park, C.Y.; Park, H.C.; Choi, J.Y. and Cho, M.J.** (1999)
Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 766-771
- Hildebrand, D.F.; Hamilton-Kemp, T.R.; Legg, C.S. and Bookjans, G.** (1988)
Plant lipoxygenases: Occurrence, properties and possible functions. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* 7, 201-219
- Hildebrand, D.F.** (1989)
Lipoxygenases. *Physiol. Plant.* 76, 249-253
- Hoekema, A.; Hirsch, P.R.; Hooykaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A.** (1983)
A binary vector strategy based on separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180
- Höhne, M.; Nellen, A.; Schwennesen, K. and Kindl, H.** (1996)
Lipidbody lipoxygenase characterized by protein fragmentation, cDNA sequence and very early expression of the enzyme during germination of cucumber seeds. *Eur. J. Biochem.* 241, 6-11
- Holtman, W.L.; Vredenburg-Heistek, J.C.; Schmitt, N.F. and Feussner, I.** (1997)
Lipoxygenase-2 oxygenates storage lipids in embryos of germinating barley. *Eur. J. Biochem.* 248, 452-458
- Hornung, E.; Walther, M.; Kühn, H. and Feussner, I.** (1999)
Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 4192-4197
- Hoyos, M.E.; Zhang, S.; Johal, G.S.; Klessig, D.F.; Hirt, H.; Pike, S.M. and Novacky, A.J.** (1998)
Is harpin-activated protein kinase related to salicylic acid- or fungal elicitor-induced kinases? *Plant Physiol. (Suppl.)*, 46-47
- Huang, A.H.C.** (1993)
Lipases. In: *Lipid metabolism in plants*, Moore, T.S. (ed.), CRC Press, Boca Raton, pp 473-503
- Hückelhoven, R.; Trujillo, M. and Kogel, K.-H.** (2000)
Mutations in *Ror1* and *Ror2* genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in *mlo*-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Mol. Plant Pathol.* 1, 287-292

- Hughes, R.K.; West, S.I.; Hornostaj, A.R.; Lawson, D.M.; Fairhurst, S.A.; Sanchez, R.O.; Hough, P.; Robinson, B.H. and Casey, R.** (2001)
Probing a novel potato lipoxygenase with dual positional specificity reveals determinants of substrate binding and requirements for a surface hydrophobic loop and has implications for the role of lipoxygenases in tubers. *Biochem. J.* 353, 345-355
- Isaac, S.** (1992)
Fungal plant interactions. Chapman and Hall, London
- Jabs, T.; Dietrich, R.A. and Dangel, J.L.** (1996)
Initiation of runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant by extracellular superoxide. *Science* 273, 1853-1856
- Jabs, T.; Collinge, C.; Tschöpe, M.; Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1997)
Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4800-4805
- Jach, G.; Görnhardt, B.; Mundy, J.; Logemann, J.; Pinsdorf, E.; Leah, R.; Schell, J. and Maas, C.** (1995)
Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* 8, 97-109
- Jalloul, A.; Montillet, J.L.; Assigbetsé, K.; Agnel, J.P.; Delannoy, E.; Triantaphylidés, C.; Daniel, J.F.; Marmey, P.; Geiger, J.P. and Nicole, M.** (2002)
Lipid peroxidation in cotton: *Xanthomonas* interactions and the role of lipoxygenases during hypersensitive reaction. *Plant J.* 32, 1-12
- Jia, Y.; McAdams, S.A.; Bryan, G.T.; Hershey, H.P. and Valent, B.** (2000)
Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 19 (15), 4004-4015
- Kamoun, S.; van West, P.; Vleeshouwers, V.G.A.A.; de Groot, K.E. and Govers, F.** (1998)
Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* 10, 1413-1425
- Kapila, J.; De Rycke, R.; Van Montagu, M. and Angenon, G.** (1997)
An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Sci.* 122, 101-108
- Kato, H.; Kodama, O. and Akatsuka, T.** (1993)
Oryzaalexin E, a diterpene phytoalexin from UV-irradiated leaves. *Phytochemistry* 33, 79-81
- Kato, T.; Kabuto, C.; Sasaki, N.; Tsunagawa, M.; Aizawa, H. and Fujita, K.** (1973)
Momilactones, growth inhibitors from rice, *Oryza sativa* L. *Tetrahedron Lett.* 24, 3861-3864
- Kawasaki, T.; Henmi, K.; Ono, E.; Hatakeyama, S.; Iwano, M.; Satoh, H. and Shimamoto, K.** (1999)
The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 10922-10926
- Kessmann, H.; Staub, T.; Hofmann, C.; Maetzke, T.; Herzog, J.; Ward, E.; Uknes, S. and Ryals, J.** (1994)
Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopath.* 32, 349-359.
- Kim, C.Y.; Gal, S.W.; Choe, M.S.; Jeong, S.Y.; Lee, S.H.; Choi, Y.J., Han, C.D.; Kang, K.Y. and Cho, M.J.** (1998)
A new class II rice chitinase, *Rcht2*, whose induction by fungal elicitor is abolished by protein phosphatase 1 and 2A inhibitor. *Plant Mol. Biol.* 37, 523-534
- Kirsch, C.; Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1997)
Rapid and transient induction of a parsley microsomal $\Delta 12$ fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol.* 115, 283-289
- Klee, H.J.; Horsh, R. and Rogers, S.** (1987)
Agrobacterium-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38, 467-486
- Knight, H. and Knight, M.R.** (2001)
Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6 (6), 262-267
- Kodama, O.; Li, W.X.; Tamogami, S. and Akatsuka, T.** (1992)
Oryzaalexin S, a novel stemarane-type diterpene rice phytoalexin. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 1002-1003
- Kodama, O.; Miyakawa, J.; Akatsuka, T. and Kiyosawa, S.** (1992)
Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry* 31, 3807-3809

- Kogel, K.H.; Beckhove, U.; Dreschers, J.; Münch, S. and Rommé, Y. (1994)**
Acquired resistance in barley. The resistance mechanisms induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiol.* 109, 1269-1277
- Kogel, K.H.; Ortel, B.; Jarosch, B.; Atzorn, R.; Schiffer, R. and Wasternack, C. (1995)**
Resistance in barley against powdery mildew (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) is not associated with enhanced levels of endogenous jasmonates. *Eur. J. Plant Pathol.* 101, 319-332
- Kolomiets, M.V.; Hannapel, D.J.; Chen, H.; Tymeson, M. and Gladon, R.J. (2001)**
Lipoxygenase is involved in the control of potato tuber development. *Plant Cell* 13, 613-626
- Kombrink, E. and Somssich, I.E. (1995)**
Defense response of plants to Pathogens. *Adv. Bot. Res.* 21, 2-30
- Kono, Y.S.; Takeuchi, S.; Kodama, O.; Sekido, H. and Akatsuka, T. (1985)**
Novel phytoalexins (oryzaalexins A, B and C) isolated from rice leaves infected with *Pyricularia oryzae*. Part II: Structural studies of oryzaalexins. *Agric. Biol. Chem.* 49, 1695-1701
- Kühn, H.; Heydeck, D.; Wiesener, R. and Schewe, T. (1985)**
The positional specificity of wheat lipoxygenase; the carboxylic group as a signal for the recognition of the site of hydrogen removal. *Biochim. Biophys. Acta* 830, 25-29
- Kühn, H.; Schewe, T. and Rapoport, S.M. (1986)**
The stereochemistry of the reactions of lipoxygenases and their metabolites. Proposed nomenclature of lipoxygenases and related enzymes. *Adv. Enzymol.* 58, 273-311
- Kühn, H.; Belkner, J.; Wiesner, R. and Brash, A.R. (1990)**
Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 265, 18351-18361
- Kühn, H.; Wiesner, R.; Rathmann, J. and Schewe, T. (1991)**
Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids* 4, 9-14
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982)**
A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105-132
- Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997)**
The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Pathol.* 48, 251-275
- Larcher, W. (1987)**
Stress bei Pflanzen. *Naturwissenschaften* 74, 158-167
- Lawton, K.A.; Friedrich, L.; Hunt, M.; Weymann, K.; Delaney, T.; Kessmann, H.; Staub, T. and Ryals J. (1996)**
Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10, 71-82
- Lee, J.; Klessig, D.F. and Nürnberger, T. (2001)**
A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene, HIN1, independent of extracellular calcium but dependent on MAPK activity. *Plant Cell* 13, 1079-1093
- Lee, S.; Suh, S.; Kim, S.; Crain, R.C.; Kwak, J.M.; Nam, H.G. and Lee, Y. (1997)**
Systemic evaluation of phosphatidic acid and lysophospholipid levels in wounded plants. *Plant J.* 12, 547-556
- Leister, R.T. and Katagiri, F. (2000)**
A resistance gene product of the nucleotide binding site-leucine rich repeats class can form a complex with bacterial avirulence proteins *in vivo*. *Plant J.* 22 (4), 345-354
- Leon, J.; Lawton, M.A. & Raskin, E. (1995)**
Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 108, 1673-1678
- Levine, A.; Tenhaken, R.; Dixon, R. and Lamb, C. (1994)**
H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593
- Levitt, J. (1980)**
Responses of plants to environmental stresses. Vol.I, Academic Press, New York
- Ligterink, W.; Kroj, T.; zur Nieden, U.; Hirt, H. and Scheel, D. (1997)**
Receptor mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276, 2054-2057
- Lin, W.; Anuratha, C.S.; Datta, K.; Potrykus, I.; Muthukrishnan, S. and Datta, S.K. (1995)**
Genetic engineering of rice for resistance to sheath blight. *Biotechnology* 13, 686-691

- Liu, Q.; Kasuga, M.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Miura, S.; Yamaguchi-Sekizawa, K. and Shinozaki, K.** (1998)
Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1391-1406
- Liu, J. and Zhu, J.-K.** (1998)
A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280, 1943-1945
- Löbber, M. and Lee, J.** (1998)
Jasmonate signalling in barley. *Trends Plant Sci.* 3 (1), 8-9
- Loers, G.** (1999)
Zur Funktion von Lipoxygenasen und Phospholipasen bei der Hypersensitivitätsreaktion von Weizen. Dissertation, RWTH Aachen
- Logemann, J.; Melchers, L.S.; Tigelaar, H.; Sela-Buurlage, M.B.; Ponstein, A.S.; van Roeckel, J.S.C.; Bres-Vloemans, S.A.; Dekker, I.; Cornelissen, B.J.C., van den Elzen, P.J.M. and Jongedijk, E.** (1994)
Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances *Fusarium* resistance in transgenic tomato plants. *J. Cell Biochem.* 18, 88
- Lottspeich, F. und Zorbas, H.** (eds.) (1998)
Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag
- Lui, D.; Raghothama, K.G.; Hasegawa, P.M. and Bressan, R.A.** (1994)
Osmotin overexpression in potatoe delays development of disease symptoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7802-7806
- Lynch, D.V. and Thompson, J.E.** (1984)
Lipoxygenase-mediated production of superoxide anion in senescing plant tissue. *FEBS Lett.* 173, 251-254
- Maccarone, M.; Van Aarle, P.G.M.; Veldink, G.A. and Vliegthart, J.F.G.** (1994)
In vitro oxygenation of soybean biomembranes by lipoxygenase-2. *Biochim. Biophys. Acta* 1190, 164-169
- Maccarone, M.; Van Zadelhoff, G.; Veldink, G.A.; Vliegthart, J.F.G. and Finazzi-Agrò, A.** (2000)
Early activation of lipoxygenase in lentil (*lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *Eur. J. Biochem.* 267, 5078-5084
- Macrí, F.; Braidot, E.; Petrusa, E. and Vianello, A.** (1994)
Lipoxygenase activity is associated to isolated soybean plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1215, 109-114
- Malamy, J.; Carr, J.P.; Klessig, D.F. and Raskin, I.** (1990).
Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250, 1002-1004
- Mandel, M. and Higa, A.** (1970)
Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159
- Matsui, K.** (1998)
Properties and structures of fatty acid hydroperoxide lyase. *Belg. J. Bot.* 131, 50-62
- Matsui, K.; Nishioka, M.; Ikeyoshi, M.; Matsumura, Y.; Mori, T. and Kajiwar, T.** (1998)
Cucumber root lipoxygenase can act on acyl groups in phosphatidylcholine. *Biochim. Biophys. Acta* 1390, 8-20
- Matsuyama, N.** (1983)
On the detection of momilactones A and B in healthy and blast infected rice leaves by GLC. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 49, 200-205
- Mauch-Mani, B. and Slusarenko, A.J.** (1994)
Systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana* induced by a predisposing infection with a pathogenic isolate of *Fusarium oxysporum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 378-383
- Mauch, F.; Reimann, C.; Freydl, E.; Schaffrath, U. and Dudler, R.** (1998)
Characterization of the rice pathogen-related protein Rir 1a and regulation of the corresponding gene. *Plant Mol. Biol.* 38 (4), 577-86
- McAinsh, M.R. and Hetherington, A.M.** (1998)
Encoding specificity in Ca^{2+} signalling systems. *Trends Plant Sci.*, 3, 32-36
- Mc Cormac, A.C.; Elliott, M.C. and Chen, D.F.** (1998)
A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Mol. Biotechnol.* 9, 155-159
- McDowell, J.M. and Dangl, J.L.** (2000)
Signal transduction in plant immune response. *Trends Biol. Sci.* 25, 79-82

- McGee, J.D.; Hamer, J.E. and Hodges, T.K.** (2001)
Characterization of a PR-10 pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. Mol. Plant Microbe Interact. 14, 877-886
- Melan, M.A.; Enriquez, A.L.D. and Peterman, T.K.** (1994)
The *LOX1* gene of *Arabidopsis* is temporally and spatially regulated in germinating seedlings. Plant Physiol. 105, 385-393
- Métraux, J.-P.; Burkhart, W.; Moyer, M.; Dincher, S.; Middlesteadt, W.; Williams, S.; Payne, G.; Carnes, M. and Ryals, J.** (1989)
Isolation of a complementary DNA encoding a chitinase with structural homology to a bifunctional lysozym/chitinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86, 896-900
- Métraux, J.-P.; Ahl-Goy, P.; Staub, T.; Speich, J.; Steinemann, A.; Ryals, J. and Ward, E.** (1991)
Induced systemic resistance in cucumber in response to 2,6-dichloro-isonicotinic acid and pathogens. In: Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions, Vol.1, Hennecke, H. and Verma, D.P.S. (eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands
- Mithöfer, A.; Ebel, J.; Bhagwat, A.A.; Boller, T. and Neuhaus-Url, G.** (1999)
Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. Planta 207, 566-574
- Mittler, R.; Shulaev, V.; Seskar, M. and Lam, E.** (1996)
Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. Plant Cell 8, 1991-2001
- Mizoguchi, T.; Irie, K.; Hiriya, T. Hayashida, N.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Matsumoto, K. and Shinozaki, K.** (1996)
A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 765-769
- Mullis, K.B.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.K.; Horn, G.T. and Erlich, H.A.** (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 263
- Mullis, K.B. and Faloona, F.** (1987)
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol. 155, 335
- Munnik, T.; Irvine, R.F. and Musgrave, A.** (1998)
Phospholipid signalling in plants. Biochim. Biophys. Acta, 1389, 222-272
- Murray, M.G. and Thompson, W.F.** (1980)
Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 8 (19), 4321-4325
- Nam, J.; Mysore, K.S.; Zheng, C.; Knue, M.K.; Matthysse, A.G. and Gelvin, S.B.** (1999)
Identification of T-DNA tagged *Arabidopsis* mutants that are resistant to transformation by *Agrobacterium*. Mol. Gen. Genet. 261, 429-438
- Neto, G.C.; Kono, Y.; Hyakutake, H.; Watanabe, M.; Suzuki, Y. and Sakurai, A.** (1991)
Isolation and identification of (-)-jasmonic acid from wild rice, *Oryza officinalis*, as an antifungal substance. Agric. Biol. Chem. 55, 3097-3098
- Neuenschwander, U.; Vernooij, B.; Friedrich, L.; Uknes, S.; Kessmann, H. and Ryals, S.** (1995)
Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? Plant J. 8, 227-233
- Niderman, T.; Genetet, I.; Bruyère, T.; Gees, R.; Stinzi, A.; Legrand, M.; Fritig, B. and Möisinger, E.** (1995)
Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal; isolation and characterization of three 14-kilodalton proteins of tomato and a basic PR-1 protein of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. Plant Physiol. 108, 17-27
- Nishiuchi, T.; Hamada, T.; Kodama, H. and Iba, K.** (1997)
Wounding changes the spatial expression pattern of the *Arabidopsis* plastid ω -3 fatty acid desaturase gene (*FAD7*) through different signal transduction pathways. Plant Cell 9, 1701-1712
- Nishizawa, Y.; Kishimoto, N.; Saito, A. and Hibi, T.** (1993)
Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. Mol. Gen. Genet. 241 (1-2), 1-10
- Nishizawa, Y.; Nishio, Z.; Nakazono, K.; Soma, M.; Nakajima, E.; Ugaki, M. and Hibi, T.** (1999)
Enhanced resistance to blast (*Magnaporthe grisea*) in transgenic japonica rice by constitutive expression of rice chitinase. Theor. Appl. Gen. 99, 383-390

- Nürnberg, T.; Nennstiel, D.; Jabs, T.; Sacks, W.R.; Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994)
High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460
- Nürnberg, T. and Scheel, D.** (2001)
Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci.* 6 (8), 372-379
- Oerke, E.C. and Dehne, H.W.** (1997)
Global crop production and the efficacy of crop protection-current situation and future trends. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 203-215
- Ohta, H.; Ida, S.; Mikami, B. and Morita, Y.** (1986)
Purification and characterization of rice lipoxygenase component 3 from embryos. *Agric. Biol. Chem.* 50, 3165-3171
- Ohta, H.; Shida, K.; Peng, Y.-L.; Furusawa, I.; Shishiyama, J.; Aibara, S. and Morita, Y.** (1990)
The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. *Plant Cell Physiol.* 31, 1117-1122
- Ohta, H.; Shida, K.; Peng, Y.-L.; Furusawa, I.; Shishiyama, J.; Aibara, S. & Morita, Y.** (1991)
A lipoxygenase pathway is activated in rice after infection with the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Physiol.* 97, 94-98
- Olson, P.D. and Warner, J.E.** (1993)
Hydrogen peroxide and lignification. *Plant J.* 4, 887-892
- Ono, E.; Wong, H.L.; Kawasaki, T.; Hasegawa, M.; Kodama, O. and Shimamoto, K.** (2001)
Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 759-764
- Osborn, A.E.** (1996)
Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831
- Palyath, G. and Droillard, M.J.** (1992)
The mechanism of membrane deterioration and disassembly during senescence. *Plant Physiol. Biochem.* 30, 789-812
- Pappan, K. and Wang, X.** (1999)
Molecular and biochemical properties and physiological roles of phospholipase D. *Biochim. Biophys. Acta* 1439, 151-166
- Parchmann, S.; Gundlach, H. and Mueller, M.J.** (1997)
Induction of 12-oxo-phytodienoic acid in wounded plants and elicited plant cell cultures. *Plant Physiol.* 115, 1057-1064
- Parker, J.E.; Szab, V.; Staskawicz, B.; Lister, C.; Dean, C.; Daniels, M.J. and Jones, J.D.G.** (1993)
Phenotypic characterization and molecular mapping of the *Arabidopsis thaliana* locus RPP5, determining disease resistance to *Peronospora parasitica*. *Plant J.* 4, 821-831
- Paxton, J.D.** (1981)
Phytoalexins - a working definition. *Phytopathol. Z.* 101, 106-109
- Peña-Cortés, H.; Albrecht, T.; Prat, S.; Weiler, E.W. and Willmitzer, L.** (1993)
Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* 191, 123-128
- Peng, M. and Kuc, J.** (1992)
Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82, 696-699
- Pfeiffer, T.W., Hildebrand, D.F. and TeKrony, D.M.** (1992)
Agronomic performance of soybean lipoxygenase isolines. *Crop Sci.* 32, 357-362
- Pistorius, E.K. and Axelrod, B.** (1974)
Iron, an essential component of lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 249, 3183-3186
- Pieterse, C.M.J.; van Wees, S.C.M.; van Pelt, J.A.; Knoester, M.; Laan, R.; Gerrits, H.; Weisbeek, P.-J. and van Loon, L.C.** (1998)
A novel signalling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10, 1571-1580
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C.** (1999)
Salicylic acid –independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4, 52-58
- Pieterse, C.M.J.; van Wees, S.C.M.; van Pelt and van Loon, L.C.** (2002)
Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 4, 535-544

- Porta, H. and Rocha-Sosa, M.** (2002)
Plant lipoxygenases. Physiological and molecular features. *Plant Physiol.* 130, 15-21
- Porter, N.A.; Caldwell, S.A. and Mills, K.A.** (1995)
Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* 30, 277-290
- Rademacher, I.** (1999)
Versuche zur Expression einer pflanzlichen Lipoxygenase in *E. coli*. Staatsexamensarbeit, RWTH Aachen
- Raleigh, E.A.; Lech, K. and Brent, R.** (1989)
Current protocols in molecular biology. Ausubel, F.M. (ed.), Publishing Associates and Wiley Interscience; New York
- Rancé, I.; Fournier, J. and Esperré-Tougayé, M.T.** (1998)
The incompatible interaction between *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* race 0 and tobacco is suppressed in transgenic plants expressing antisense lipoxygenase sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6554-6559
- Rasmussen, J.B.; Hammerschmidt, R. and Zook, M.N.** (1991)
Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347
- Rauscher, M.; Ádám, A.L.; Wirtz, S.; Guggenheim, R.; Mendgen, K. and Deising, H.B.** (1999)
PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *Plant J.* 19, 625-633
- Ray, J.** (1901)
Les maladies cryptogamiques des végétaux. *Rev. Gen. Bot.* 13, 145-151
- Reimann, C. and Dudler, R.** (1993)
cDNA cloning and sequence analysis of a pathogen-induced thaumatin-like protein from rice (*Oryza sativa*). *Plant Physiol.* 101, 1113-1114
- Regdel, D.; Schewe, T. and Kühn, H.** (1994)
Tomato fruit lipoxygenase: Isolation, partial purification, characterization, and interaction with biological membranes. *Biochemistry (Moscow)* 59, 581-586
- Ricker, K.E. and Bostock, R.M.** (1994)
Eicosanoids in the *Phytophthora infestans*-potato interaction: Lipoxygenase metabolism of arachidonic acid and biological activities of selected lipoxygenase products. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 44, 65-80
- Romeis, T.; Piedras, P.; Zhang, S.; Klessig, D.F.; Hirt, H. and Jones, J.D.** (1999)
Rapid Avr9- and Cf9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-287
- Romeis, T.; Piedras, P. and Jones, J.D.G.** (2000)
Resistance gene dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* 12, 803-815
- Rosahl, S.** (1996)
Lipoxygenase in plants – their role in development and stress response. *Z. Naturforsch.* 51c, 123-138
- Ross, F.A.** (1961)
Systemic acquired resistance induced by localized virus infection in plants. *Virology* 14, 340-358
- Roy, S.; Pouénat, M.L.; Caumont, C.; Cariven, C.; Prévost, M.C. and Esquerré-Tugayé, M.T.** (1995)
Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Sci.* 107, 17-25
- Royo, J.; Vancanneyt, G.; Pérez, A.G.; Sanz, C.; Störmann, K.; Rosahl, S. and Sánchez-Serrano, J.J.** (1996)
Characterization of three potato lipoxygenases with distinct enzymatic activities and different organ-specific and wound-regulated expression patterns. *J. Biol. Chem.* 271, 21012-21019
- Rustérucci, C.; Blein, J.-P.; Stallaert, V.; Ducruet, J.-M.; Pugin, A. and Ricci, P.** (1996)
Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis, and phytoalexin production by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol.* 111, 885-891
- Rustérucci, C.; Montillet, J.-L.; Agnel, J.-P.; Battesti, C.; Alonso, B.; Knoll, A.; Bessoule, J.-J.; Etienne, P.; Suty, L.; Blein, J.-P. and Triantaphylidés, C.** (1999)
Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogin of tobacco leaves. *J. Biol. Chem.* 274, 36446-36455

- Ryals, J.; Uknes, S. and Ward, E. (1994)**
Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104, 1109-1112
- Ryals, J.A.; Neuenschwander, U.H.; Willits, M.G.; Molina, A.; Steiner, H.-Y. and Hunt, M.D. (1996)**
Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819
- Saijo, Y.; Hata, S.; Kyozeuka, J.; Shimamoto, K. and Izui, K. (2000)**
Over-expression of a single Ca^{2+} -dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23, 319-327
- Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. and Arnheim, N. (1985)**
Enzymatic amplification of β -globin sequences and restriction site analysis for diagnostics of sickle cell anemia. *Science* 230, 1350
- Sakamoto, K.; Tada, Y.; Yokozeki, Y.; Akagi, H.; Hayashi, H.; Fujimura, T. and Ichikawa, N. (1999)**
Chemical induction of disease resistance in rice is correlated with the expression of a gene encoding a nucleotide binding site and leucine-rich repeats. *Plant Mol. Biol.* 40, 847-855
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)**
Molecular cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory
- Sanchez-Casas, P. and Klessig, D.F. (1994)**
A salicylic-acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.* 106, 1675-1679
- Sanders, D.; Brownlee, C. and Harper, J.F. (1999)**
Communicating with calcium. *Plant Cell* 11, 691-706
- Schaffrath, U. (1994).**
Erkennung und Resistenz im Pathosystem Reis/*Pyricularia oryzae*. Chitinasen als Resistenzfaktoren in Reis. Resistenzinduktion in Reis. Dissertation, RWTH Aachen
- Schaffrath, U.; Mauch, F.; Freydl, E.; Schweizer, P. and Dudler, R. (2000a)**
Constitutive expression of the defence-related RIR 1b gene in transgenic rice plants confers enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Plant Mol. Biol.* 43 (1), 59-66
- Schaffrath, U.; Zabbai, F. and Dudler, R. (2000b)**
Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipooxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur. J. Biochem.* 267, 5935-5942
- Scheel, D. (1998)**
Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310
- Schlösser, E. (1997a)**
Allgemeine Phytopathologie.2. Ausgabe, Thieme Verlag, Stuttgart
- Schlösser, E. (1997b)**
Performed structural and chemical barriers. In: Resistance of crop plants against fungi, Hartleb, H., Heitefuß, R., Hoppe, H.H. (eds.), Gustav Fischer Verlag, Jena Stuttgart Lübeck Ulm, pp 84-99
- Schneider, M.; Schweizer, P.; Meuwly, P. and Métraux, J.-P. (1996)**
Systemic acquired resistance in plants. *Intern. Rev. Cytol.* 168, 303-340
- Schweizer, P.; Hunziker, W. and Mössinger, E. (1989)**
cDNA cloning, *in vitro* transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f.sp. *tritici*. *Plant Mol. Biol.* 12, 643-654
- Schweizer, P.; Gees, R. and Mössinger, E. (1993)**
Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Plant Physiol.* 102, 503-511
- Schweizer, P.; Buchala, A. and Métraux, J.-P. (1997)**
Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiol.* 115, 61-70
- Segura, A.; Moreno, M.; Madueño, F.; Molina, A. and García-Olmedo, F. (1999)**
Snakin-1, a peptide from potato that is active against pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact.* 12 (1), 16-23
- Sekizawa, Y. and Mase, S. (1980)**
Recent progress in studies on non-fungicidal controlling agent, probenazole, with reference to the induced resistance mechanism of rice plants. *Rev. Plant Protec. Res.* 13, 114-121
- Sekizawa, Y.; Haga, M. and Kanoh, H. (1990)**
 α -linolenate releasing enzyme, phospholipase A2 of rice blade infected by blast fungus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 56, 561-562

- Sela-Buurlage, M.B.; Ponstein, A.S.; Bres-Vloemans, S.A.; Melchers, L.S.; van den Elzen, P.J.M. and Conelissen, B.J.C.** (1993)
Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β 1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiol.* 101, 857-863
- Sembdner, G. and Parthier, B.** (1993)
The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 569-589
- Serhan, C.; Anderson, P.; Goodman, E.; Dunham, P. and Weissman, G.** (1981)
Phosphatidate and oxidized fatty acids are calcium ionophores. *J. Biol. Chem.* 256, 2736-2741
- Shibata, D.; Slusarenko, A.; Casey, R.; Hildebrand, D. and Bell, E.** (1994)
Lipoxygenases. *Plant Mol. Biol. Rep.* 12, Supplement: Nomenclature of plant genes, S41-S42
- Shibata, D. and Axelrod, B.** (1995)
Plant lipoxygenases. *J. Lipid Med. Cell Sign.* 12, 213-228
- Shimizu, T.; Radmark, O. and Samuelsson, B.** (1984)
Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyses leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 689-693
- Short, J.M.; Fernandez, M.; Sorge, J.A. and Huse, W.D.** (1988)
 λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nucleic Acids Res.* 16, 7583-7600
- Siedow, J.N.** (1991)
Plant lipoxygenase: Structure and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145-188
- Silverman, P.; Sesar, M.; Kanter, D.; Schweizer, P.; Métraux, J.-P. and Raskin, I.** (1995)
Salicylic acid in rice: Biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108, 633-639
- Simmons, C.R.; Litts, J.C.; Huang, N. and Rodriguez, R.L.** (1992)
Structure of a rice beta-glucanase gene regulated by ethylene, cytokinin, wounding, salicylic acid and fungal elicitors. *Plant Mol. Biol.* 18, 33-45
- Simon, R.; Priefer, U. and Pühler, A.** (1983)
Vector plasmids for *in vivo* and *in vitro* manipulation of gram-negative bacteria. In: *Molecular Genetics of the Bacteria-Plant Interaction*; Pühler, A. (ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 98-106
- Slusarenko, A.J.; Croft, K.P.C. and Voisey, C.R.** (1991)
Biochemical molecular events in the hypersensitive response of bean to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. In: *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe: Biochemistry and molecular biology of plant-pathogen interactions*, Smith, C.J. (ed.), Calendon Press, Oxford, pp 127-143
- Slusarenko, A.J.** (1996)
The role of lipoxygenase in plant resistance to infection. In: *Lipoxygenase and lipoxygenase pathway enzymes*. Piazza, G.J. (ed.), AOCS Press, Champaign, IL, pp 176-197
- Sloane, D.L.; Leung, R.; Barnett, J.; Craik, C.S. and Sigal, E.** (1995)
Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Eng.* 8, 275-282
- Smith, J.A. and Métraux, J.-P.** (1991)
Pseudomonas syringae pv. *syringae* induces systemic resistance to *Pyricularia oryzae* in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 451-461
- Somssich, I.E. and Hahlbrock, K.** (1998)
Pathogen defense in plants-aparadigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90
- Song, F. and Goodman, R.M.** (2001)
Molecular biology of disease resistance in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 1-11
- Song, F. and Goodman, R.M.** (2002)
Molecular cloning and characterization of a rice phosphoinositide-specific phospholipase C gene, *OsPI-PLC1*, that is activated in systemic acquired resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 61, 31-40
- Southern, E.M.** (1975)
Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98 (3), 503-517
- Stachel, S.E. and Nester, E.W.** (1986)
The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J.* 5, 1445-1454
- Staskawicz, B.J.; Ausubel, F.M.; Baker, B.J.; Ellis, J.G. and Jones J.D.G.** (1995)
Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268, 661-667

- Steczko, J. and Axelrod, B.** (1992)
Identification of the iron-binding histidine residues in soybean lipoxygenase L-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 186, 686-689
- Steczko, J.; Donoho, G.A.; Clemens, J.C.; Dixon, J.E. and Axelrod, B.** (1992)
Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: Functional consequence of their replacement. *Biochemistry* 31, 4053-4057
- Sticher, L.; Mauch-Mani, B. and Métraux, J.-P.** (1997)
Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35, 235-270
- Stirpe, F.; Barbieri, L.; Battelli, M.G.; Soria, M. and Lippi, D.A.** (1992)
Ribosome inactivating proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology* 10, 405-412
- Stockinger, E.J.; Gilmour, S.J. and Thomashow, M.F.** (1997)
Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a *cis*-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 1035-1040
- Strittmacher, G. and Wegener, D.** (1993)
Genetic engineering of disease and pest resistance in plants: Present state of the art. *Z. Naturforsch.* 48c, 673-688
- Stüber, D.; Matile, H. and Garotta, G.** (1990)
System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: Application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis. *Immunol. Meth.*, Vol. IV, 121-152
- Studier, F.W. and Moffatt, B.A.** (1986)
Use of bacteriophage-T7 RNA-polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* 189 (1), 113-130
- Suzuki, N.** (1965)
Nature of resistance to blast. In: *The rice blast disease*. The International Rice Research Institute (eds.), The John Hopkins Press, Baltimore Maryland, pp 277-302
- Tamogami, S.; Mitani, M.; Kodama, O. and Akatsuka, T.** (1993)
Oryalexin S structure: A new stemarane-type rice plant phytoalexin and its biogenesis. *Tetrahedron Lett.* 49, 2025-2032
- Taketo, A.** (1988)
Sensitivity of *Escherichia coli* to viral nucleic acid. 17. DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation. *Biochim. Biophys. Acta* 949, 318
- Terras, F.R.; Eggermont, K.; Kovaleva, V.; Raikhel, N.V.; Osborn, R.W.; Kester, A.; Rees, S.B.; Torrekens, S.; van Leuven, F.; Vanderleyden, J.; Cammue, B.P.A. and Broekaert, W.F.** (1995)
Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. *Plant Cell* 7, 573-588
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000)
Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815
- Thieron, M.** (1993)
Die Resistenz von Reis gegen *Pyricularia oryzae*. Dissertation, RWTH Aachen
- Thompson, J.E.; Legge, R.L. and Barber, R.F.** (1987)
The role of free radicals in senescence and wounding. *New. Phytol.* 105, 317-344
- Towbin, H.; Staehelin, T. and Gordon, J.** (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- Tranbarger, T.J.; Franceschi, V.R.; Hildebrand, D.F. and Grimes, H.D.** (1991)
The soybean 94-kilodalton vegetative storage protein is a lipoxygenase that is localized in paraveinal mesophyll cell vacuoles. *Plant Cell* 3, 973-987
- Tzfira, T.; Vaidya, M. and Citovsky, V.** (2001)
VIP1 an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE⁺ nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *EMBO J.* 20, 3596-3607
- Uknes, S.; Mauch-Mani, B.; Moyer, M.; Potter, S.; Williams, S.; Dincher, S.; Chandler, D.; Slusarenko, A.; Ward, E. and Ryals, J.** (1992)
Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4, 645-656

- Uknes, S.; Winter, A.; Delaney, T.; Vernooij, B.; Morse, A.; Friedrich, L.; Nye, G.; Ward, E. and Ryals, J.** (1993)
Biological induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*. Mol. Plant Microbe Interact. 6, 692-698
- Urao, T.; Yakubov, B.; Satoh, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, M.; Hirayama, T. and Shinozaki, K.** (1999)
A transmembrane hybrid-type histidin kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. Plant Cell 11, 1743-1754
- van Aarle, P.** (1993)
Purification and characterization of a lipoxygenase from ungerminated barley. PhDthesis, Utrecht University
- Vander, P.** (1990)
Untersuchungen zur Veränderung der Photosyntheserate an Weizen nach Infektion mit *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. Diplomarbeit, RWTH Aachen
- van der Planck, J.E.** (1984)
Disease resistance in plants. 2. ed., Academic Press, Orlando, USA
- van Ginkel, G. and Sevanian, A.** (1997)
Lipid peroxidation-induced membrane structural alterations. Meth. Enzymol. 233, 273-288
- van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M. and Pieterse, C.M.J.** (1998)
Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36, 453-483
- van Loon, L.C. and van Strien, E.A.** (1999)
The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55, 85-97
- van Wees, S.C.; de Swart, E.A.; van Pelt, J.A.; van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.** (2000)
Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 8711-8717
- Veena, H.J.; Doerge, R.W. and Gelvin, S.B.** (2003)
Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. Plant J. 35, 219-236
- Velazhahan, R.; Chen-Cole, K.; Anuratha, C.S. and Muthukrishnan, S.** (1998)
Induction of thaumatin-like proteins (TLPs) in *Rhizoctonia solani* infected rice and characterization of two new cDNA clones. Physiol. Plant. 102, 21-28
- Verbene, M.C.; Verpoorte, R.; Bol, J.F.; Mercado-Blanco, J. and Lindthorst, H.J.** (2000)
Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. Nat. Biotechnol. 18, 779-783
- Vernooij, B.; Friedrich, L.; Morse, A.; Reist, R.; Kolditz-Jawhar, R.; Ward, E.; Uknes, S.; Kessmann, H. and Ryals, J.** (1994)
Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. Plant Cell 6, 959-965
- Vernooij, B.; Friedrich, L.; Ahl Goy, P.; Staub, T.; Kessmann, H. and Ryals, J.** (1995)
2,6-Dichlorisonicotinic acid-induced resistance to pathogens without the accumulation of salicylic acid. Mol. Plant Microbe Interact. 8, 228-234
- Vick, B.A. and Zimmermann, D.C.** (1983)
The biosynthesis of jasmonic acid: A physiological role for plant lipoxygenases. Biochem. Biophys. Res. Commun. 111, 470-477
- Vidal, S.; de Leon, I.P.; Denecke, J. and Palva, E.T.** (1997)
Salicylic acid and the plant pathogen *Erwinia carotovora* induce defense genes via antagonistic pathways. Plant J. 11, 115-123
- Vignutelli, A.; Wasternack, C.; Apel, K. and Bohlmann, H.** (1998)
Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. Plant J. 14, 285-295
- Vörös, K.; Feussner, I.; Kühn, H.; Lee, J.; Graner, A.; Löbner, M.; Parthier, B. and Wasternack, C.** (1998)
Characterization of a methyljasmonate-inducible lipoxygenases from barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome) leaves. Eur. J. Biochem. 251, 36-44
- Vough, S.F. and Gardner, H.W.** (1993)
Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic of soybean. J. Chem. Ecol. 19, 2337-2345

- Villarejo, M.R. and Zabin, I.** (1974)
Beta-galactosidase from termination and deletion mutant strains. *J. Bacteriol.* 120, 466-474
- Wang, C.; Croft, K.P.C.; Järlfors, U. and Hildebrand, D.F.** (1999)
Subcellular localization studies indicate that lipoxygenases 1 to 6 are not involved in lipid mobilization during soybean germination. *Plant Physiol.* 120, 227-235
- Wang, X.M. and Hildebrand, D.F.** (1988)
Biosynthesis and regulation of linolenic acid in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 26, 777-792
- Ward, E.R.; Uknes, S.J.; Williams, S.C.; Dincher, S.S.; Wiederhold, D.L.; Alexander, D.C.; Ahl-Goy, P.; Métraux, J.-P. and Ryals, J.A.** (1991)
Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3, 1085-1094
- Wardale, D.A. and Lambert, E.A.** (1980)
Lipoxygenase from cucumberfruit: localization and properties. *Phytochemistry* 9, 1013-1016
- Wäspi, U.; Misteli, B.; Hasslacher, M.; Jandrositz, A.; Kohlwein, S.D.; Schwab, H. and Dudler, R.** (1998)
The defense-related rice gene *Pir7b* encodes an alpha/beta hydrolase fold protein exhibiting esterase activity towards naphthol AS-esters. *Eur. J. Biochem.* 254, 32-37
- Wasternack, C.** (1994)
Jasmonate-inducible alteration of gene expression in barley. *Trends Comparat. Physiol.* 1, 1255-1268
- Wasternack, C.; Miersch, O.; Kramell, R.; Hause, B.; Ward, J.; Beale, M.; Bohland, W.; Parthier, B. and Feussner, I.** (1998)
Jasmonic acid: Biosynthesis, signal transduction, gene expression. *Fett/Lipid* 100, 139-146
- Watanabe, T.; Sekizawa, Y.; Shimura, M.; Suzuki, Y.; Matsumoto, K.; Iwata, M. and Mase, S.** (1979)
Effects of probenazole (Oryzemat[®]) on rice plants with reference to controlling rice blast. *J. Pest. Sci.* 4, 53-59
- Weber, H.; Chételat, A.; Caldelari, D. and Farmer, E.E.** (1999)
Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell* 11, 485-493
- Weichert, H.; Stenzel, I.; Berndt, E.; Wasternack, C. and Feussner, I.** (1999)
Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves-preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS Letters* 464, 133-137
- Wen Xin Li, O.; Kodama, T. and Akatsuka, T.** (1991)
Role of fatty acids in rice phytoalexin production. *Agric. Biol. Chem.* 55, 1041-1047
- Wojtaszek, P.; Trethowan, J. and Bolwell, G.P.** (1995)
Specificity in the immobilisation of cell wall proteins in response to different elicitor molecules in suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol.* 28, 1075-1087
- Wojtaszek, P.** (1997)
Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692
- Woodcock, D.M.; Crowther, P.J.; Doherty, J.; Jefferson, S.; de Cruz, E.; Noyer-Weidner, M.; Smith, S.S.; Michael, M.Z. and Graham, M.W.** (1989)
Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.* 17, 3469-3478
- Wu, G.; Shortt, B.J.; Lawrence, E.B.; Levine, E.B.; Fitzsimmons, K.C. and Shah, D.M.** (1995)
Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell* 7, 1357-1368
- Wu, G.; Shortt, B.J.; Lawrence, E.B.; Leon, J.; Fitzsimmons, K.C.; Levine, E.B.; Raskin, I. and Shah, D.M.** (1997)
Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. *Plant Physiol.* 115, 427-435
- Xu, Y.; Zhu, Q.; Panbangred, W.; Shirasu, K. and Lamb, C.** (1996)
Regulation, expression and function of a new basic chitinase gene in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol. Biol.* 30, 387-401
- Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K.** (1994)
A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to draught, low-temperature, or high-salt-stress. *Plant Cell* 6, 251-264
- Yang, K.Y.; Liu, Y. and Zhang, S.** (2001)
Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 741-746

- Young, S.A.; Wang, X. and Leach, J.E.** (1996)
Changes in the plasma membrane distribution of rice phospholipase D during resistant interaction with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Cell 8, 1079-1090
- Zabai, F.** (1999)
Molekulare Charakterisierung von Lipoxygenase in Reispflanzen nach Behandlung mit chemischen Resistenzinduktoren. Diplomarbeit, RWTH Aachen
- Zhang, S. and Klessig, D.F.** (1998)
Resistance gene N-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 7433-7438
- Zhang, Y.; Fan, W.; Kinkema, M.; Li, X. and Dong, X.** (1999)
Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR1* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 6523-6528
- Zhang, Z.; Collinge, D.B. and Thordal-Christensen, H.** (1995)
Germin-like oxalate oxidase a H₂O₂-producing enzyme accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. Plant J. 8, 139-145
- Zhu, Q. and Lamb, C.J.** (1991)
Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase. Mol. Gen. Genetics 226, 289-296
- Zhu, Q.; Maher, E.A.; Masoud, S.; Dixon, R.A. and Lamb, C.J.** (1994)
Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. Bio/Technology 12, 807-812
- Ziegler, J.; Stenzel, I. Hause, B.; Maucher, H. Hamberg, M.; Grimm, R.; Ganai, M. and Wasternack, C.** (2000)
Molecular cloning of allene oxide cyclase - the enzyme establishing the stereochemistry of octadecanoids and jasmonates. J. Biol. Chem. 257, 19132-19138
- Zimmermann, D.C. and Vick, B.A.** (1970)
Hydroperoxide isomerase. Plant Physiol. 46, 445-453
- Zimmerman, D.C. and Coudron, C.A.** (1979)
Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-*trans*-10-dodecenoic-acid. Plant Physiol. 63, 536-541
- Zimmermann, S.; Nürnbergger, T.; Fracisse, J.M.; Wirtz, W.; Guern, J.; Hedrich, R. and Scheel, D.** (1997)
Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2751-2755
- Zupan, J.R. and Zambryski, P.** (1995)
Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. Plant Physiol. 107, 1041-1047
- Zwerger, K. and Hirt, H.** (2001)
Recent advances in plant MAP kinase signalling. Biol. Chem. 382, 1123-1131

Danksagung

Herrn Prof. Dr. A.J. Slusarenko danke ich herzlich für die Möglichkeit zur Durchführung dieser Arbeit am Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie) der RWTH Aachen und für die Übernahme des Referats.

Bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Grambow bedanke ich mich für das Interesse an meiner Arbeit und für die Bereitschaft, das Co-Referat für diese Arbeit zu übernehmen.

Herrn Dr. U. Schaffrath danke ich für die wissenschaftliche Betreuung, sowie für die genaue Durchsicht dieser Arbeit.

Frau Ulrike Noll bin ich für ihren Zuspruch und die Hilfe bei der Korrektur orthographischer und grammatikalischer Fehler im Manuskript dieser Arbeit dankbar.

Frau Dr. Birgit Jarosch danke ich für die Bereitstellung der *HvPr1b*-Sonde.

Weiterhin sage ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe RiBaLab, sowie allen Mitarbeitern im Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie) der RWTH Aachen, für das tolle Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit Dank.

Ganz besonders danken möchte ich Frau Renate Schubert für ihre Menschlichkeit und ihr offenes Ohr, auch bei nicht-fachlichen Gesprächen.

Ich danke ganz herzlich meinen Eltern für ihre Nervenstärke, sowie die Unterstützung, durch welche mir dieses Studium ermöglicht wurde.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Frauke Zabbai
Geburtstag	16.08.1972
Geburtsort	Eschweiler
Familienstand	ledig

Schulische Ausbildung

1979 - 1983	Besuch der Grundschule Höhenstraße in Stolberg
1983 - 1992	Besuch des Ritzefeld-Gymnasiums in Stolberg Abschluss: Abitur

Hochschulausbildung

1992 - 1993	Maschinenbaustudium an der RWTH Aachen
1993 - 1999	Biologiestudium an der RWTH Aachen
1998 - 1999	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie) der RWTH Aachen
1999 - 2003	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biologie III (Pflanzenphysiologie) der RWTH Aachen und Anfertigung der vorliegenden Dissertation