

# Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Fakultät für Biologie



## Mutanten im RES-Oxylipin Signalweg von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Manuel Lange

geboren in Reichenbach i. V.

Würzburg, 2018

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. Susanne Berger

Gutachter: Prof. Dr. Dirk Becker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

**Für meine Eltern**

## Abkürzungsverzeichnis

13-HPOT	13-Hydroperoxyoctadecatriensäure
Abb	Abbildung
ABA	Abscisinsäure
AOC	Allenoxidcyclase
AOS	Allenoxidsynthase
BHT	Buthylhydroxytoluol
BITC	Benzylisothiocyanat
bzw.	beziehungsweise
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
COI1	engl. coronatine-insensitive 1
Col-0	<i>Columbia-0</i> (Wildtyp)
Da	Dalton
<i>dde2</i>	engl. <i>delayed dehiscence 2</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dnOPDA	dinor-12-Oxophytodiensäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethyl diamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
ESI	Elektronenspray-Ionisation
Exp	Experiment
fg	Femtogramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HNE	4-Hydroxy-2E-nonenal
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
Hz	Hertz
i.F.	im Folgenden
JA	Jasmonsäure
JA-Ile	Jasmonsäure-Isoleucin

<i>jar1</i>	engl. <i>jasmonate-resistant 1</i>
JAZ	Jasmonate ZIM-Domäne
<i>jin1</i>	engl. <i>jasmonate insensitive 1</i>
KCl	Kaliumchlorid
KOTE	Ketooctadecatriensäure
LER	<i>Landsberg erecta</i>
log	logarithmisch
LOOH	Fettsäurehydroperoxid
LOX	Lipoxygenase
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
MDA	Melanodialdehyde
Me-JA	Methyl-Jasmonat
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
min	Minute
M-MLV	Moloney Murina Leukemia Virus
mRNA	engl. messenger RNA
MS	Massenspektrometer
MS-Medium	Murashige und Skoog Medium
MW	Mittelwert
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ng	Nanogramm
nmol	Nanomol
OD	optische Dichte
OPDA	12-Oxophytodiensäure
OPR3	OPDA-Reduktase 3
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGA	Prostaglandin A <sub>1</sub>
qPCR	quantitative real time PCR
RES	reaktive elektrophile Spezies
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RNS	reaktive Stickstoff Spezies
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
rpm	Umdrehungen pro Minute

RT	Raumtemperatur
SAG	engl. Senescence associated Genes
sek	Sekunde
SEN	engl Senescence
SSLP	engl. Single Sequence length Polymorphism
SNP	engl. single nucleotide polymorphisms
SQDG	Sulfoquinovosyldiacylglycerol
STABW	Standardabweichung
Tab	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TG	Trockengewicht
TPP	Triphenylphosphan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPLC	Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatographie
V	Volt
v/v	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Jasmonate.....	1
1.1.1	Bedeutung von Jasmonaten für die Pflanze.....	1
1.1.2	Der JA Signalweg .....	3
1.2.	Reaktive elektrophile Spezies (RES).....	3
1.2.1	Enzymatisch produzierte RES .....	4
1.2.2	Nicht enzymatisch produzierte RES.....	5
1.2.3	Negative Auswirkungen von RES auf Zellen .....	6
1.2.4	Lagerung von RES in der Zelle .....	7
1.2.5	Biologische Aktivität in Pflanzen .....	7
1.2.6	Mögliche RES-Oxylipin Signalwege.....	9
1.2.7	Das <i>GST6</i> Gen .....	14
1.3.	Zielsetzung.....	14
2.	Material .....	16
2.1	Chemikalien .....	16
2.2	Kits, Enzyme und Puffer.....	18
2.3	Primer .....	19
2.4	Geräte.....	20
3.	Methoden.....	22
3.1	Herstellung von MS-Medium/ Agar .....	22
3.2	Anzucht und Behandlung von Pflanzen.....	22
3.2.1	Pflanzenmaterial.....	22
3.2.2	Sterilisation von Samen .....	22
3.2.3	Anzucht von Erdpflanzen.....	22
3.2.4	Anzucht von Pflanzen in Flüssigmedium .....	23
3.2.5	Behandlung von Pflanzen in Flüssigkultur.....	23
3.3	Luciferase-Messungen unter der CCD Kamera.....	23
3.3.1	Flüssigpflanzen .....	23
3.3.2	Erdpflanzen/ Pflanzen auf Agar.....	24
3.4	Trockenexperimente .....	24
3.5	DNA-Isolierung .....	24
3.6	PCR.....	25
3.7	Aufreinigung von PCR Produkten mit dem Macherey-Nagel PCR clean up Gel extraction Kit ...	25
3.8	Gelelektrophorese.....	26
3.9	DNA Extraktion aus Agarosegelen mit dem Macherey-Nagel PCR clean up Gel extraction Kit ..	27

3.10 DNA Extraktion aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit.....	27
3.11 RNase Verdau chromosomaler DNA .....	28
3.12 Sequenzierung der GST6 Promotorfragmente.....	28
3.13 RNA Isolation mit Trizol .....	28
3.14 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA am Nanodrop.....	29
3.15 DNase-Verdau .....	29
3.16 cDNA Synthese .....	29
3.17 qPCR .....	30
3.18 RNA Sequenzierung.....	31
3.18.1 Proben Vorbereitung.....	31
3.18.2 Isolierung von mRNA aus gesamt RNA.....	31
3.18.3 mRNA Fragmentierung.....	32
3.18.4 „First- and Second-Strand“ cDNA-Synthese .....	32
3.18.5 End Repair der cDNA .....	33
3.18.6 dA-Tailing der cDNA .....	33
3.18.7 Adapter Ligation .....	33
3.18.8 PCR Anreicherung der Adapter-ligierten cDNA.....	33
3.19 Chlorophyllextraktion aus Pflanzen.....	34
3.20 Quantifizierung der Phytohormone JA, JA-Ile, OPDA, dnOPDA, SA und ABA .....	35
3.20.1 Herstellung des internen Standards.....	35
3.20.2 Phytohormonextraktion .....	35
3.20.3 Quantifizierung von Phytohormonen.....	36
3.21 „untargeted“ Metabolomics .....	37
3.21.1 Bligh and Dyer Extraktion .....	37
3.21.2 „untargeted“ Analyse .....	38
3.22 Messung von Arginin .....	40
3.22.1 Probenaufbereitung .....	40
3.22.2 Arginin Messung.....	41
4. Ergebnisse.....	42
4.1. Selektionierung von Mutanten mit unterschiedlicher Reaktion auf reaktive elektrophile Spezies Oxylipine .....	42
4.1.1 Screen .....	42
4.1.2 Vererbung und Allelismus .....	42
4.2 Überprüfung des GST6 Promotors und der Phytohormonspiegel .....	46
4.2.1 Der <i>GST6</i> Promotor des Luciferase Gens .....	46
4.3. Phänotypischen Analyse.....	48

4.3.1 Samen, Keimung ,Wachstum, Blühen .....	48
4.3.2 Ungerichtete Metabolomanalyse.....	49
4.3.3 Verändert die Mutation die Genexpression? .....	53
4.3.4 Wie reagieren die Mutanten auf andere RES-Oxylipine .....	58
4.3.5 Wie reagieren die Mutanten auf RES .....	61
4.4 Reaktionen auf abiotischen Stress .....	64
4.4.1 Verwundung .....	64
4.4.2 Einfluss von gasförmigen Lösungsmitteln auf Erdpflanzen .....	65
4.4.3 Reaktionen auf Trockenstress .....	66
4.4.4 Salzstress .....	72
4.4.5 Dunkel-induzierte Seneszenz .....	76
4.5 Ansätze zur Identifizierung der Mutation .....	80
4.5.1 <i>nr1</i> : Genkartierung einer Mutante mit reduzierter Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe ...	80
4.5.2 <i>Coe3</i> : Grobkartierung mittels SSLP.....	85
5. Diskussion.....	88
5.1. Die <i>nr1</i> Mutante .....	88
5.2. Die <i>nr2</i> Mutante .....	94
5.3. Die <i>coe3</i> Mutante.....	96
5.4 Das GST6::Luc Reportersystem als Werkzeug im „Forward Genetic Approach“ .....	101
5.5 Fazit und Ausblick.....	103
6. Literaturverzeichnis.....	104
7. Anhang.....	111
7.1 Promotorsequenzen und Alignments .....	111
7.2 Trockenexperimente .....	112
7.3 Keimung auf ABA.....	114
7.4 Gewicht der Keimlinge nach Wachstum auf Mannitol.....	115
7.5 qPCR Daten der getesteten Gene.....	115
7.6 RNA-Sequenzierungs Daten .....	118
7.7 Chlorophyllmessungen nach Dunkelinkubation.....	118

## Zusammenfassung

Reaktive elektrophile Spezies-Oxylipine (RES-Oxylipine) finden sich in Pflanzen- und Tierzellen und zeichnen sich durch eine für sie typische Anordnung von Atomen aus: einer  $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonyl Gruppe. In Pflanzenzellen gehören unter anderem 2-(E)-Hexenal und die Vorstufe der Jasmonsäure 12-Oxophytodiensäure (OPDA) zu den RES-Oxylipinen, in Tierzellen z.B. Prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA). RES-Oxylipine üben Signalfunktionen aus, wie dies in Pflanzenzellen funktioniert ist jedoch noch nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit ist dabei einen möglichen RES-Oxylipin Signalweg aufzuklären und die beteiligten Gene zu identifizieren. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Expressionsrate von bestimmten Genen wie z.B. *GST6* durch RES-Oxylipine spezifisch induziert wird. Zur Untersuchung des RES-Oxylipin Signalweges wurde der *GST6* Promotor vor das Luciferase-Gen fusioniert, um so ein RES-Oxylipin spezifisches Reportersystem zu erhalten. Die Ethylmethansulfonat mutagenisierten Linien wurden auf geänderte Luciferase-Aktivität hin untersucht. Dabei wurden drei Mutanten isoliert, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden. Eine zeigte basal erhöhte Luciferase-Aktivität (constitutive overexpresser 3 = *coe3*) und die anderen beiden erniedrigte Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe (non responsive 1 und 2 = *nr1* und *nr2*). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phänotypen in allen 3 Mutanten rezessiv vererbt werden und die Mutanten nicht zueinander allel sind. Zudem war die veränderte Luciferase-Aktivität nicht durch geänderte Phytohormonspiegel oder durch Mutationen im *GST6* Promotor erklärbar. Auf die Gabe von RES, wie Benzylisothiocyanat oder Sulforaphan, sowie auf endogene RES-Oxylipine, wie OPDA und Hexenal, reagierten die Mutanten auf ähnliche Weise, wie nach PGA Gabe. Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass sich die drei Mutanten stark voneinander unterschieden. Das Transkriptom kontrollbehandelter *coe3* Pflanzen unterschied sich stark von dem der *GST6::LUC* Pflanzen. Die Mutante war trockenstressresistenter zudem war sie sensibler gegenüber NaCl, was jedoch nicht von einer veränderten Reaktion auf Abscisinsäure herrührte. Des Weiteren war der Chlorophyllabbau bei dunkel inkubierten Blättern geringer. Bei der Lokalisierung der Mutation, die noch nicht abgeschlossen ist, konnten Chromosom 2 und 5 als die wahrscheinlichsten Kandidaten ermittelt werden. Weitere Analysen sind nötig um den Bereich weiter eingrenzen zu können. Die Mutante *nr1*, die sich durch verminderte Reaktion auf RES-Oxylipine auszeichnete, zeigte einen kleineren Wuchs und ein deutlich verzögertes Blühen. Außerdem wies die Mutante erhöhte Argininspiegel in ihren Blättern auf. Das Transkriptom unterschied sich sowohl bei kontrollbehandelten, als auch bei PGA behandelten *nr1* Pflanzen massiv von denen der gleichbehandelten Kontrollen. Auch die *nr1* schien trockenstressresistenter zu sein, sie war im Gegensatz zur *coe3* aber robuster gegenüber höheren Konzentrationen an NaCl. Mit Hilfe eines „Next Generation Genome-Mappings“ war es möglich die Mutation am Ende von Chromosom 3 zu

lokalisieren und auf fünf mögliche Gene einzugrenzen. Weitere Untersuchungen müssen nun klären, welches dieser Gene ursächlich für den Phänotyp der geänderten Luciferase-Aktivität ist. Die zweite Mutante mit einer reduzierten Reaktion auf RES-Oxylipine war die *nr2*. Überraschender Weise unterschied sich das Transkriptom kontrollbehandelter *nr2* Pflanzen deutlich stärker von dem der gleichbehandelten *GST6::LUC* Pflanzen, als das nach PGA Gabe der Fall war. Sie reagierte nur mit sehr schwacher Luciferase-Aktivität auf Verwundung und war zudem deutlich sensibler gegenüber Trockenheit. Für eine zukünftige Lokalisation der ursächlichen Mutation wurden entsprechende Kreuzungen durchgeführt aus deren Samen jederzeit mit einer Selektionierung begonnen werden kann. Mit dieser Arbeit konnte ein erster großer Schritt in Richtung Identifikation der, für die geänderte Luciferase-Aktivität, verantwortlichen Mutation gemacht werden, sowie erste Reaktionen der Mutanten auf abiotische Stressfaktoren untersucht werden. Somit ist man der Entdeckung von Signaltransduktionsfaktoren, die RES-Oxylipinabhängig reguliert werden, einen wichtigen Schritt näher gekommen.

## Summary

Reactive electrophilic species oxylipins (RES-oxylipins) can be found in plant and animal cells and contain an  $\alpha,\beta$  unsaturated carbonyl group. In plant cells 2-(E)-hexenal and 12-oxo-phytodienoic acid (OPDA), the precursor of jasmonic acid, belong to the RES-oxylipins, in animal cells prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA). RES-oxylipins play an important role in signal transduction but it is still unknown how this functions in plant cells. In previous publications, it could be shown, that RES-oxylipins induce the expression of certain genes like *GST6* specifically. To further investigate the possibility of a RES-oxylipin pathway the *GST6* promotor was fused to the luciferase gene to get a RES-oxylipin sensitive reporter system. The ethyl methanesulfonate (EMS) mutagenized lines were screened for altered luciferase activity under basal conditions and after treatment with PGA. Three lines were selected for further investigation: one with a constitutive higher luciferase activity (constitutive overexpresser 3 = *coe3*) and two with a reduced luciferase activity after PGA treatment (non responsive 1 and 2 = *nr1* and *nr2*). In this thesis, it could be shown, that the mutation, which is responsible for the altered luciferase activity, is recessive and not allelic to each other. Furthermore, neither altered phytohormone levels nor mutations in the *GST6* promotor are responsible for the changes in the luciferase activity. The response of these mutants to RES, like benzyl isothiocyanate (BITC) or sulforaphane, or endogenous RES-oxylipins, like OPDA or hexenal, is comparable to the response to PGA treatment. Further investigations show huge differences between the mutants. Control treated *coe3* plants had very different transcriptomes compared to the control line. The *coe3* mutant was more resistant to drought stress but more susceptible to salt compared to the control. This was not due to a changed response

to abscisic acid (ABA). Another observed phenotype was the reduced chlorophyll depletion in dark incubated leaves. The localization of the mutation could not be completed within this thesis but chromosome 2 and 5 could be identified as most likely positions. Further investigations on this topic are needed to complete the localization. The *nr1* mutant showed a reduced growth and delayed flowering phenotype and higher arginine levels could be detected in the leaves. The transcriptome exhibited huge differences after both control treatment and PGA treatment compared to the *GST6::LUC*. In drought experiments, the *nr1* was also more resistant but, compared to the *coe3*, also more robust against higher salt concentrations. By next generation genome mapping it was possible to locate the mutation, which was responsible for the changes in luciferase activity after PGA treatment, at the end of chromosome 3. So there are five genes left who might be responsible for the observed phenotypes. Further investigations have to show which one is the one causing the phenotype. The *nr2*, as the third mutant investigated in this thesis showed highest differences to the *GST6::LUC* line after control treatment. It only had weak luciferase activity after wounding and was more susceptible to drought than the control. For further mapping experiments of the mutation in the *nr2* mutant, F2 lines were generated. These are now ready to use to set up a mapping population. With this thesis it was possible to provide a milestone in identification of the mutations responsible for the changes in luciferase activity and in investigation of different abiotic stress responses. Now we are one step closer to discover signal transduction factors which are regulated by RES-oxylipins.

# 1. Einleitung

Phytohormone sind endogen vorkommende organische Verbindungen, die als Signalmoleküle wirken. Sie kommen in allen höheren Pflanzen vor und ermöglichen den Informationsaustausch zwischen den verschiedenen Pflanzengeweben und Zellen. Sie nehmen dabei, unter anderem, Einfluss auf Wachstum und Entwicklung der Pflanze.

## 1.1 Jasmonate

Jasmonsäure (JA) ist eines der wichtigsten und meist erforschten Phytohormone. JA kommt in allen Pflanzen vor (Ahmad et al., 2016), wird aus Derivaten des Fettsäuremetabolismus gebildet und gehört zur Stoffgruppe der Oxylipine. Die Menge an JA in Pflanzen reicht von 0,01 bis 3 ng pro g Frischgewicht. Die Biosynthese von JA wurde erstmals von Vick and Zimmerman 1984 beschrieben und soll auch hier im Folgenden kurz erläutert werden. JA wird aus  $\alpha$ -Linolensäure, welche in den Chloroplasten lokalisiert ist, hergestellt. Die  $\alpha$ -Linolensäure selbst wird durch die Einwirkung von Lipasen aus Lipiden freigesetzt. Bei der Bildung von JA aus  $\alpha$ -Linolensäure wird in einem ersten Schritt, durch die Addition von Sauerstoff, die 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPOT) gebildet. Dieser Vorgang wird durch Lipoxygenasen (Lox) katalysiert. Im nächsten Schritt wird durch die Allenoxidsynthase (AOS) ein instabiles Epoxid gebildet, welches durch die Allenoxidcyclase (AOC) zu 12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgewandelt wird. OPDA wird durch die OPDA-Reduktase 3 (OPR3) reduziert. Das daraus resultierende Produkt wird zur weiteren Synthese zu den Peroxysomen transportiert und unterläuft dort drei  $\beta$ -Oxidationsschritte an deren Ende JA entsteht. Die JA selbst ist jedoch ein Prohormon und stellt nicht das eigentlich biologisch aktive Hormon dar. Die JA kann durch weitere Enzyme wie Jasmonatmethyltransferasen oder Acylamidosenynthetasen (*jar1*) in weitere biologisch aktive Derivate umgewandelt werden. Dabei entstehen unter anderem Methyl-Jasmonat (Me-JA), sowie Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile), welches als einziges bisher bekanntes Derivat am JA-Signalweg beteiligt ist (siehe Review Ahmad et al., 2016).

### 1.1.1 Bedeutung von Jasmonaten für die Pflanze

JA spielt in vielen biologischen Prozessen innerhalb von Pflanzen eine Rolle. Aber nicht nur Me-JA und JA-Ile sind biologisch aktiv, sondern auch Jasmonsäure-Tryptophan, OPDA und dnOPDA. Zu diesen Prozessen gehören Jasmonat-abhängiges Wachstum, Entwicklung, biotische und abiotische

Stresstoleranz, Speicherorganentwicklung, reproduktive Prozesse, Regulierung der Wurzellänge und oxidative Verteidigung. Zu dem spielt JA bei der Interaktion mit anderen Hormonen, wie zum Beispiel Salicylsäure und Abscisinsäure (ABA) eine wichtige Rolle (Avanci et al., 2010; Browse, 2009; Cipollini, 2010; Moreno et al., 2009; Nafie et al., 2011). Neben der Reproduktion wird auch die Stimulation der Keimung in dormanten Samen von JA beeinflusst. Auch die Expression von Genen, die an der Reaktion auf Umweltstresse beteiligt sind, können durch JA beeinflusst werden. Jasmonate spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Schädlingen. Tomaten, die mit JA behandelt wurden, zeigten eine reduzierte Menge an Thripsen, Blattläusen und Flohkäfern, was auf eine gesteigerte Aktivität der Polyphenoloxidasen und Proteinase-Inhibitoren zurückgeführt wurde (Thaler et al., 2001). Auch bei der Verteidigung der Wurzeln gegen die Trauermücken *Bradysia impatiens* zeigten Jasmonate einen signifikanten Einfluss. *Arabidopsis* Pflanzen, die mit Me-JA behandelt wurden, überlebten deutlich länger als unbehandelte Pflanzen (McConn et al., 1997).

Nicht nur bei der Reaktion auf biotische Umwelteinflüsse, sondern auch bei der Reaktion auf abiotische Umwelteinflüsse, spielen Jasmonate eine wichtige Rolle. Dabei nehmen sie häufig Einfluss auf physiologische Antworten deren Wirkdauer deutlich länger ist, als die von den schnelleren, unter biotischem Stress, stattfindenden Reaktionen. Ein Beispiel ist die Inhibierung des Wurzelwachstums durch JA. Verabreicht man es exogen sind die Wurzeln deutlich kürzer als bei der Kontrolle (Liu et al., 2010). An der dafür notwendigen Signalweiterleitung sind Gene wie *COI1*, *JIN1* und *JAR-1* beteiligt, da Mutanten in diesen Genen kein verkürztes Wurzelwachstum aufweisen. Mutanten in den Genen *CEX1*, *CET1*, *CEV1* und *JOE2* hingegen zeigen ein verkürztes Wurzelwachstum ohne externe Applikation von JA, was darauf schließen lässt, dass diese Gene ebenfalls bei der Regulation des Wurzelwachstums von Bedeutung sind (Pauwels et al., 2009). JA und Me-JA sind zudem in der Lage die Keimung von Samen positiv zu beeinflussen. Erhöhte Spiegel an JA führen zu Lipidperoxidation in den Samen, was wiederum zu Membranschäden führt und eine beschleunigte Keimung zur Folge hat (Ranjan and Lewak, 1992). Auch die Seneszenz kann durch JA induziert werden. Bei steigenden JA Spiegeln kommt es durch einen positiven „Feedback-loop“ auch zur Aktivierung von Enzymen, die an der JA-Biosynthese beteiligt sind (AOS und OPR3). Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von Seneszenz assoziierten Genen (*SAG12*, *SAG14*, *SAG15*, *SEN1*, *SEN4*, *SEN5*). Die Entwicklung von Pollen, Längenwachstum der Staubblätter, sowie der Zeitpunkt zu dem der Pollen freigesetzt wird sind ebenfalls durch JA beeinflusst. Die *dde1* Mutante, in *Arabidopsis*, ist nicht in der Lage sich selbst zu befruchten, erst durch Besprühen mit Me-JA kann dies korrigiert werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass 13 Transkriptionsfaktoren an der Staubblattentwicklung beteiligt sind und diese durch JA induziert werden (Mandaokar et al., 2006).

### 1.1.2 Der JA Signalweg

Das biologisch aktive JA-Ile bindet an seinen Rezeptor, das COI1 Protein. Dieser Komplex bindet an die SCF-Ubiquitin-E3 Ligase und formt so einen noch größeren Komplex, welcher nun in seiner aktiven Form vorliegt. Dieser Komplex ubiquitiniert die Jasmonat-ZIM-Domain = JAZ (Co-Rezeptor) Proteine, die dann durch das 26S Proteasom abgebaut werden können. Da die JAZ Proteine als negative Regulatoren wirken, werden durch deren Abbau die Jasmonat responsiven Transkriptionsfaktoren aktiv und können so eine verstärkte Transkription der Jasmonat abhängigen Gene bewirken. Dazu zählen auch die Gene, welche für die Jasmonatbiosynthese selbst nötig sind. Die Jasmonatsynthese wird also durch einen „positiven Feedback-loop“ gesteuert. Die Terminierung der Jasmonat induzierten Genexpression erfolgt durch einen „negativen Feed back loop“. Denn neben den Jasmonatsynthesegenen werden, durch den JA-Signalweg, auch Gene exprimiert die für Transkriptionsrepressoren sowie katabolische Enzyme kodieren (siehe Review Poudel et al., 2016). Es sind bisher 2 Abbauprozesse für JA-Ile beschrieben. Zum einen kann JA-Ile am C<sub>12</sub> Atom oxidiert werden wodurch 12-Hydroxy JA-Ile (12OH-JA-Ile) entsteht. Diese Reaktion wird durch 2 Enzyme aus der Cytochrome P450 Familie katalysiert (Heitz et al., 2012; Koo et al., 2011). Das 12OH-JA-Ile wird dann weiter oxidiert zu Karboxy-Derivaten (Heitz et al., 2012). Die zweite Möglichkeit JA-Ile abzubauen ist die Hydrolyse an der Amidbindung wodurch freies JA und Ile entstehen (Widemann et al., 2013).

Phytohormonsignalwege können auch miteinander verknüpft sein; dies zeigt sich beim Streckungswachstum der Staubfäden wo Auxin und JA beteiligt sind. Mutanten wie die *opr3* und *dad1*, welche eine gestörte JA-Biosynthese besitzen, zeigen deutlich verkürzte Staubfäden, da sie, unter anderem, zwei auxinabhängige Faktoren nicht herstellen können (Wasternack, 2007). Besonders im Fokus der Forschung steht derzeit auch die Interaktion von ABA und JA. Bei externer Applikation von JA kommt es zu einem Anstieg der ABA Konzentration in den Blättern und umgekehrt führt die fehlende Umwandlung von JA zu JA-Ile (in der *jar1* Mutante) zu verringerter ABA Akkumulation. Zudem ist an der ABA vermittelten Genexpression der JA-Transkriptionsfaktor MYC2 beteiligt. Der ABA- und JA-Signalweg scheinen an sehr vielen Punkten mit einander zu wechselwirken. Die genaue Rolle die JA bei der Reaktion auf Trockenstress spielt muss jedoch noch weiter erforscht werden (siehe Review de Ollas and Dodd, 2016).

### 1.2. Reaktive elektrophile Spezies (RES)

RES finden sich in Pflanzenzellen, haben diverse physio-chemische Eigenschaften und sind chemisch reaktiv. Sie zeichnen sich durch eine für sie typische Anordnung von Atomen aus: einer  $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonyl Gruppe. Diese Gruppe nimmt sehr leicht Elektronen auf (elektrophil) und

reagiert daher besonders stark mit einem Elektronen-Donor (nukleophil). Ist einer der Substituenten am  $\beta$  C-Atom ein Wasserstoffatom, kann dieses C-Atom besonders gut mit nukleophilen Atomen reagieren, wie sie zum Beispiel bei Sulfhydrylgruppen (-SH) zu finden sind. Man fasst daher alle Substanzen, die eine  $\alpha,\beta$  ungesättigte Carbonyl Gruppe oder eine andere reaktive elektrophile Gruppe besitzen, als RES zusammen. RES können enzymatisch oder nicht enzymatisch gebildet werden.

Bei der Untersuchung des JA-Signalweges zeigte sich, dass auch das RES-Oxylipin OPDA, eine Vorstufe von JA, eine Signalfunktion innerhalb der Pflanze ausübt. Die *opr3* Mutante, die nicht in der Lage ist OPDA zu JA umzuwandeln, zeigt Reaktionen auf die Applikation von RES-Oxylipinen wie OPDA. Bei Wachstum auf OPDA haltigem Medium sind die Wurzeln der Mutante ebenfalls verkürzt, so wie man es auch bei WT Pflanzen erwarten würde. Dies spricht dafür, dass OPDA eine Rolle bei der Hemmung des Wurzelwachstum spielt ohne in JA umgewandelt zu werden (Mueller et al., 2008). Einen weiteren Hinweis, dass RES-Oxylipine als Signalmoleküle wirken können liefert die *coi1* Mutante. Die *coi1* Mutante, welche kein JA-Ile wahrnehmen kann, zeigt eine erhöhte Resistenz gegen Trockenheit (Harb et al., 2010). Zudem ist die Mutante weniger anfällig gegen nekrotrophe Pilze verglichen mit den Mutanten die garnicht ist in der Lage sind OPDA herstellen zu können (Park et al., 2013). Dies legt die Vermutung nahe, dass es einen COI1 und damit JA unabhängigen Signalweg gibt über den Pflanzen RES-Oxylipine wahrnehmen können.

### 1.2.1 Enzymatisch produzierte RES

Zu den enzymatisch produzierten RES-Oxylipinen gehören unter anderem 2-(E)-Hexenal und OPDA. Deren erhöhte Produktion kann vor allem bei Verwundung, Pathogenbefall und anderen Umweltstressen gemessen werden. Als Quelle für die Synthese von RES-Oxylipinen dienen in Pflanzen meist mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (18:3), Linolsäure (18:2) und Hexadecatriensäure (16:3). Bei der enzymatischen Bildung von RES-Oxylipinen werden aus den oben genannten Fettsäuren Fettsäurehydroperoxide (LOOH), mittels Lipoxygenasen oder Dioxygenasen, gebildet. Diese LOOH's können dabei aus freien Fettsäuren oder veresterten, membrangebundenen Fettsäuren gebildet werden. LOOH's selbst sind ausgesprochen reaktive RES-Oxylipine und werden daher über drei mögliche Wege weiter umgewandelt (Feussner and Wasternack, 2002; Mosblech et al., 2009). Die erste Möglichkeit ist mittels Allenoxidsynthase Jasmonate herzustellen. Dabei werden 2 RES-Oxylipine hergestellt ein Allenoxid, welches jedoch sehr kurzlebig ist, und Cyclopentenon Zwischenstufen, OPDA und dnOPDA. Letztere können sowohl aus freien als auch veresterten Fettsäuren gebildet werden. Bei der zweiten Möglichkeit werden LOOH reduziert, dies sorgt für die Entstehung von Hydroxyfettsäuren und reaktiven Oxofettsäuren. Als dritte Möglichkeit können, die

aus freien Fettsäuren gebildeten LOOH's, mittels Hydroperoxidlyase in 2 Fragmente geschnitten werden. Dabei können bei den aus C18 Fettsäuren entstandenen 9- und 13- Hydroperoxiden durch die Spaltung mit den Lyasen, unter anderem, 3-Z-Hexenal (wird umgewandelt zu 2-E Hexenal) und 12 oxo-9-Z-Dodecenoat entstehen, welches ebenfalls weiter umgewandelt wird.

### 1.2.2 Nicht enzymatisch produzierte RES

Zu diesen RES zählen Malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2E-nonenal (HNE) und Cyclopentenon Phytprostane. Nicht enzymatische RES-Oxylipine werden vor allem unter massivem oxidativem Stress, mittels freier Radikale, gebildet. Dabei reichern sich zuerst membrangebunden LOOH's an und werden reduziert, wodurch größere Mengen an Hydroxyfettsäuren und reaktiven Oxofettsäuren entstehen. Unter dem Einfluss freier Radikale können die LOOH's weiter oxidiert werden und bilden so eine Reihe zyklischer und azyklischer Oxylipine. Durch die Radikal Einwirkung kommt es zur Fragmentierung der oxydierten Lipide, wobei eine Vielzahl an Produkten unter anderem auch das RES-Oxylipin MDA und Hexenal entstehen (Zoeller et al., 2012). All diese Schritte zur Bildung nicht enzymatischer RES-Oxylipine finden dabei in der Membran statt. Diese RES können durch Fragmentierung der Membran oder Lipasen freigesetzt werden (Mueller and Berger, 2009). Das nicht enzymatisch produzierte RES-Oxylipin MDA wird auch in gesunden Pflanzen gebildet aber diese Synthese wird strikt reguliert (Weber et al., 2004). Gerät die Pflanze unter Stress, bei dem auch ROS freigesetzt werden (z.B. Photooxidation), wird auch die Produktion von MDA, durch Lipidperoxidation, stark erhöht (Havaux et al., 2005). Solch verstärkte, nicht enzymatische Fettsäureoxidation tritt auch bei verschiedenen Mutanten auf. Die Vitamin E-2 Mutante (*vte2*), zum Beispiel, besitzt einen Defekt in der Synthese von Tocopherol und dessen Vorläuferprodukten (Sattler et al., 2006). Sie produziert unter normalen Bedingungen große Mengen MDA und Phytprostane, verglichen mit WT Pflanzen. Zudem zeigt sie Schäden an den Kotyledonen von keimenden Samen und ein stark geändertes Transkriptom. Bei einer weiteren Mutanten, der *mosaic death 1 (mod1)*, tritt spontaner Zelltod auf, der auf eine schwache Mutation im Fettsäure Metabolismus zurückzuführen ist. Dabei ist ein Enzym betroffen welches in der Fettsäurebiosynthese  $\alpha,\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen umwandelt. Durch die Mutation ist dieser Prozess beeinträchtigt und die Anhäufung von Elektrophilen kann die Ursache des beobachteten Phänotyp (spontaner Zelltod) sein (Mou et al., 2000).

### 1.2.3 Negative Auswirkungen von RES auf Zellen

#### **Reaktivität von RES**

Um über die Auswirkungen von RES auf Zellen sprechen zu können muss man kurz darauf eingehen, wie RES mit anderen Molekülen reagieren. Die Reaktivität von RES folgt im allgemeinen dem HSAB Konzept („Hard and Soft Acids and Bases“). Als hart werden dabei Moleküle definiert, die eine hohe Ladungsdichte und geringe Polarisierbarkeit aufweisen. Weiche Moleküle hingegen haben eine geringe Ladungsdichte und eine gute Polarisierbarkeit. Das HSAB Konzept beschreibt nun, dass harte Elektrophile bevorzugt mit harten Nucleophilen reagieren und weiche Elektrophile eher weiche Nucleophile bevorzugen (Ayers et al., 2006). Die elektrophile Gruppe in RES-Oxylipinen ( $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonylstruktur) stellt ein schwaches Elektrophil dar und bevorzugt daher schwache Nucleophile wie Cysteinreste in GSH und Proteinen. Diese Reaktion wird allgemein als Michael-Addition bezeichnet.

#### **Negative Auswirkungen von RES**

RES reagieren sehr leicht mit Nucleophilen, in Pflanzenzellen können dies vor allem Proteine und Nucleinsäuren sein. Zudem modifizieren RES sehr leicht das Zytoskelett, da in den Mikrotubuli viele Thiolgruppen vorhanden sind (Mueller and Berger, 2009). Daher wirken sie in größeren Mengen meist toxisch und mutagen auf die betroffenen Zellen ein. Dennoch findet man sie in geringen Konzentrationen auch in Zellen höherer Organismen, die keinem Stress ausgesetzt sind (Mueller, 2004), da sie eben auch eine Signalfunktion in Pflanzen ausüben. Die zellschädigende Wirkung von RES kann auf zwei verschiedenen Wegen zu Stande kommen. Eine Möglichkeit ist die indirekte Schädigung durch Verringerung der Reduktionsmittel einer Zelle. Die Reduzierung der Doppelbindung eines RES kann dabei z.B. durch NADPH-Oxidoreduktasen (Mano et al., 2005), durch Flavin-Mononucleotid abhängige Oxidoreduktasen (Breithaupt et al., 2001) oder durch Aldose/Aldehyd Reduktasen (Oberschall et al., 2000) erfolgen. Letzten Endes werden die entstehenden Zwischenprodukte (Aldehyde) mittels einer Aldehyd Dehydrogenase, unter Verwendung von  $\text{NAD(P)}^+$  zu Carboxylsäure oxidiert. Versucht die Zelle große Mengen RES zu detoxifizieren sorgt der kleiner werdende Pool dieser Reduktionsmittel dafür, dass die Zelle andere Stoffwechselwege nicht mehr ausreichend betreiben kann. Dadurch fehlen wichtige Metabolite und die Zelle nimmt Schaden. Der zweite Mechanismus der zur Zellschädigung führt, ist die direkte Interaktion mit Zellkomponenten bedingt durch die chemische Reaktivität der RES. Die betroffenen Proteine können ihre Funktion nicht mehr erfüllen, nimmt die Anzahl der betroffenen Proteine überhand kommt es zu massiver Zellschädigung (Farmer and Davoine, 2007). Dabei scheint es von der Art des Elektrophils abzuhängen wie stark welcher der beiden Mechanismen zum Tragen kommt.

### 1.2.4 Lagerung von RES in der Zelle

Aufgrund ihrer schädigenden Wirkung auf Zellen können RES nicht frei im Zellinneren vorliegen. Dennoch müssen sie im Fall eines Stresses schnell verfügbar sein und können nicht erst zeit- und energieaufwendig neu synthetisiert werden. Ein interessantes Beispiel, wie die Pflanze dieses Dilemma lösen kann, zeigt das nicht enzymatisch gebildete RES MDA. Überraschender Weise sind die Spiegel an MDA im Zytosol verhältnismäßig hoch (Weber et al., 2004). Dies ist dadurch möglich, dass MDA im neutralen pH-Bereich an seiner Hydroxylgruppe deprotoniert vorliegt und daher nur eine geringe Reaktivität aufweist. Ändert sich der pH-Bereich ins Saure wird die Hydroxylgruppe protoniert und MDA reaktiv. Eine Senkung des pH-Wertes tritt z.B. bei der Apoptose auf (Matsuyama and Reed, 2000), aber auch eine Zerstörung der Zelle, bei der die Vakuole beschädigt wird oder sich das Zytosol mit dem Apoplasten mischt, senkt den pH-Wert. Dieser Mechanismus ermöglicht es Pflanzen im Falle von Stress sehr schnell eine RES abhängige Signalkaskade einzuleiten und so das Überleben der Pflanze zu ermöglichen.

### 1.2.5 Biologische Aktivität in Pflanzen

Da sich der JA-Signalweg und der RES-vermittelte Signalweg in ihrer Geninduktion teilweise überschneiden (Mueller et al., 2008), wundert es nicht, dass sich die RES-Oxylipine den Einfluss auf einige biologische Aktivitäten mit JA teilen. Dazu zählen die Inhibierung des Zellzyklus (Mueller and Berger, 2009) und die Hemmung des Wurzelwachstums (Mueller et al., 2008). Die verschiedenen RES-Oxylipine zeigen eine Vielzahl von Auswirkungen auf Pflanzen, dabei zeigen nicht alle Oxylipine die gleiche Wirkung. Für die RES-Oxylipine OPDA, Traumatin, 9-KOTE, 9- und 13- oxo Octadiensäure, Hexenal und Phytprostane konnte gezeigt werden, dass sie das Wurzelwachstum hemmen (Mirabella et al., 2008; Vellosillo et al., 2007). Auch ein hemmender Effekt auf Pathogene, wie Bakterien und Pilze konnte nachgewiesen werden. So zeigt 2-Hexenal eine Hemmung des Bakterienwachstums und OPDA, sowie 13-KOTE stören das Wachstum von Pilzen (Prost et al., 2005). RES-Oxylipine können für die Pflanzen daher einen sehr positiven Effekt auf das eigene Überleben haben. Einen negativen Effekt haben manche RES-Oxylipine dagegen auf das Photosystem II. Durch RES-Oxylipine wie OPDA, 13-KOTE, Acrolein oder Methyl-vinyl Keton wird das Photosystem schwer geschädigt, was sich in einer reduzierten Chlorophyllfluoreszenz niederschlägt. Aber nicht alle RES-Oxylipine zeigen einen so starken Effekt auf das Photosystem II. 2-Hexenal und 9- und 13- oxo Octadiensäure zeigen nur einen sehr schwachen Effekt, eine Eigenschaft die sie sich mit dem nicht RES JA teilen, dass ebenfalls kaum Auswirkungen auf die Chlorophyllfluoreszenz zeigt (Alméras et al., 2003; Berger et al., 2007). Für die Etablierung dieses Phänotyps könnte also die  $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonylstruktur nötig, aber nicht die

alleinige Voraussetzung sein. Den bisher am besten untersuchten Einfluss auf die biologische Aktivität innerhalb von Pflanzen haben die RES-Oxylipine auf Genexpressionsebene. Hier muss man jedoch beachten, dass unterschiedliche RES-Oxylipine auch unterschiedliche Sets an Genen aktivieren, wobei sich diese Sets auch überschneiden. Zudem wurden noch nicht alle RES-Oxylipine auf ihre Geninduktion hin untersucht.

Die externe Applikation von RES-Oxylipinen sorgt für eine Vielzahl von Transkriptionsänderungen, z.B. bei Zell-Überlebens Genen (Vollenweider et al., 2000), Pathogen assoziierten Genen (Alm ras et al., 2003), an Genen von Trockenstress assoziierten Proteinen, Genen für Hitzeschockproteinen und Zellwandfunktions-assoziierten Genen (Weber et al., 2004). Bei näherer Betrachtung der Transkriptomdaten hat sich gezeigt, dass etliche Gene sowohl durch OPDA und A<sub>1</sub>-Phytoprostane, sowie anderer Phytoprostane induziert werden. Was darauf schließen lässt, dass die große strukturelle Ähnlichkeit der beiden RES-Oxylipine eine sehr ähnliche biologische Antwort hervorruft. Auf der anderen Seite werden auch durch JA sehr viele Gene stärker exprimiert. Jedoch gibt es bei diesen Genen nur sehr wenige, die auch durch RES-Oxylipine induzierbar sind (Loeffler et al., 2005). Bisher hat sich gezeigt, dass nicht enzymatisch gebildete RES-Oxylipine vor allem bei Pathogenbefall gebildet werden und das durch sie beeinflusste Transkriptom nicht durch vorhandenes JA beeinflusst wird. Dennoch scheint JA bei einigen RES-Oxylipin induzierten Reaktionen der Pflanzen eine Rolle zu spielen. Pflanzen ohne die Fähigkeit JA wahrzunehmen reagieren mit höheren Transkriptmengen nach MDA Gabe als Wildtyp Pflanzen. Zudem bleibt anzumerken, dass verschieden RES auch verschiedene Gene aktivieren, was ein mögliches „Fine tuning“ der Stressantwort auf unterschiedliche Reize vermuten lässt (Weber et al., 2004). Eine wichtige Gruppe von Genen, die induziert werden, sind Gene, die für Proteine zur Detoxifizierung kodieren. Zu ihnen gehören Gene die für Cytochrom P450 Enzyme, Glutathione-S-transferasen (GST), Glycosyltransferasen, Oxidoreduktasen und ABC Transporter Proteine kodieren. Da sie für diese Arbeit von besonderem Interesse sind, seien an dieser Stelle die Glutathione-S-transferasen besonders hervorgehoben. Bei diesen konnte eine Induktion unter anderem durch OPDA, Hexenal und Phytoprostanen nachgewiesen werden (Mueller and Berger, 2009).

Es sind aber nicht nur Detoxifizierungsgene, die stärker exprimiert werden, als Reaktion auf RES. Auch Gene, die als Marker Gene für biotischen und abiotischen Stress verwendet werden, zeigen einen deutlichen Anstieg nach der Behandlung mit OPDA, Hexenal, Methyl-vinyl-Ketonen, MDA und Phytoprostanen (Mueller et al., 2008; Taki et al., 2005). An diesem Beispiel zeigt sich sehr schön die bereits oben erwähnten unterschiedlichen Reaktionen auf unterschiedliche RES. So werden durch MDA vor allem Gene für abiotischen Stress induziert, während durch Methyl-vinyl-Ketone eher Gene für biotischen Stress induziert werden (Alm ras et al., 2003; Weber et al., 2004). Auch Gene des

Sekundärmetabolismus werden als Folge von Kontakt mit RES-Oxylipinen stärker exprimiert. Dies ist jedoch auch bei JA der Fall (Mueller and Berger, 2009). So wird angenommen, dass RES von sterbenden Zellen im umliegenden Gewebe in der Lage sind deren Genexpression dahingehend zu verändern, dass diese Verteidigungsmaßnahmen einleiten um besser zu überleben (Vollenweider et al., 2000). Einige RES sind tatsächlich in der Lage Einfluss auf die Produktion von Sekundärmetaboliten nehmen zu können. Mit Phytoprostanen behandelte Pflanzen zeigen einen erhöhten Spiegel an niedermolekularen antimikrobiellen Substanzen (Phytoalexinen) (Loeffler et al., 2005). Auch die Vitamin E-2 Mutante zeigt erhöhte Mengen an Sekundärmetaboliten (hier Camalexin) (Sattler et al., 2006). Tabakzellen reagieren mit der Bildung von Scopoletin nach Exposition mit OPDA oder Phytoprostanen, was es ihnen ermöglicht sich gegen Kupfersulfat zu schützen (Iqbal et al., 2005; Loeffler et al., 2005). RES können Pflanzen auch beim Erkennen von Pathogenen helfen. So sind unter den Virulenzfaktoren, die einige Pflanzenpathogenen verwenden, wie z.B. *Pseudomonas syringae*, ebenfalls RES. Eines davon ist Syringolin A. Werden Pflanzen dieser Substanz ausgesetzt kommt es zur Aktivierung von Genen, die das Überleben der Zelle sicherstellen sollen (Michel et al., 2006).

### 1.2.6 Mögliche RES-Oxylipin Signalwege

Bei der Mitwirkung von RES-Oxylipinen in Signalwegen bleibt anzumerken, dass die RES-Oxylipine als solche zerstört werden können, es aber durch die Interaktion der RES-Oxylipine mit anderen Molekülen zu einer Beeinflussung von zellulären Funktionen kommt, zu denen auch die Expression verschiedener Gene gehört. Die RES-Oxylipine als Signalmolekül können also bei ihrer Singalübermittlung „verloren“ gehen. Dies liefert auch eine Erklärung warum bei einem Stress die Menge an RES gleichbleiben oder sogar sinken kann, anstatt wie bei anderen Signalmolekülen anzusteigen. Ein Beispiel zeigt sich in mit *Botrytis* infizierten Blättern. Hier sinken die MDA Spiegel als Folge der Infektion, was auf eine Interaktion mit dem Pathogen oder den Pflanzenzellen zurückzuführen ist (Muckenschnabel et al., 2002).

Über den RES-Oxylipin Signalweg ist bisher nur sehr wenig bekannt. Da es einige Überlappungen in der Geninduktion zwischen JA und RES-Oxylipinen gibt, eignet sich der bisher recht gut untersuchte JA-Signalweg als Ausgangspunkt für die Suche nach RES-Oxylipinsignalwegen. Wie bereits oben erwähnt stellt COI1 ein wichtiges Molekül im JA-Signalweg dar, da es für die Induktion von JA abhängigen Genen mitverantwortlich ist (Devoto et al., 2005). Will man jetzt klären, ob COI1 auch beim RES-Signalweg eine Rolle spielt kommt man zu sehr unterschiedliche Antworten. Es gibt Gene deren Induktion durch RES-Oxylipine unabhängig von COI1 sind, wie z.B. *ROF1* (Weber et al., 2004). Es gibt aber auch Gene wie *CYP81D11* und *PHO1* deren Induktion nur dann erfolgt, wenn die Pflanze auch den COI1 Regulator

besitzt (Mueller et al., 2008; Ribot et al., 2008). Ob weitere Bestandteile des JA-Signalweges, wie z.B. die JAZ Proteine, ebenfalls eine Rolle bei der Geninduktion durch RES-Oxylipine spielen könnten, muss noch untersucht werden. Eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die dagegen keine Rolle im JA-Signalweg spielen aber sehr wichtig für die Reaktion auf RES-Oxylipine zu sein scheinen, ist die Gruppe der TGA Transkriptionsfaktoren. Schaltet man in einer Arabidopsismutante die TGA Transkriptionsfaktoren 2, 5 und 6 aus, bekommt man 30 % weniger Geninduktion nach OPDA Behandlung und bis zu 60 % weniger nach Phytoprostan A<sub>1</sub> Behandlung (Mueller et al., 2008). Bei diesen Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Leucin Zipper Transkriptionsfaktoren, welche an DNA Motive binden, die ein „activation sequence-1“ (as1) ähnliches Element besitzen, welches durch 2 TGACG Motive charakterisiert wird (Xiang et al., 1997). Interessanter Weise findet sich dieses Element in den Promotoren einiger GST's und spielt auch beim Salicylsäure Signalweg eine wichtige Rolle (Garretón et al., 2002). An dieser Stelle sollte man sich nochmal vor Augen führen, dass der Salicylsäure- und der JA-Signalweg normalerweise 2 Signalwege sind, die sich gegenseitig hemmen. Dies bedeutet höhere Salicylsäurespiegel hemmen den JA-Signalweg und umgekehrt. Mit den RES-Oxylipinen findet sich hier jetzt eine Verbindung die sowohl Teile des SA Signalweges (TGA Faktoren) als auch Teile des JA-Signalweges (COI1) zur Geninduktion zu nutzen scheint.

### **1.2.6.1 Perzeption von RES-Oxylipine**

#### ***Rezeptorunabhängige Perzeption***

Die Perzeption von RES-Oxylipinen ist noch unbekannt. Dennoch gibt es einige Theorien und Überlegungen, wie diese von statten gehen könnte. Die Perzeption könnte zum einen rezeptorunabhängig oder rezeptorabhängig funktionieren. Wenden wir uns zunächst der rezeptorunabhängigen Signalübertragung zu. Dazu muss man sich ins Gedächtnis rufen, dass auch relativ schwache Elektrophile recht schnell an freie Thiolgruppen von reduzierten GSH binden können, ohne zusätzliche Hilfe von Enzymen zu benötigen. Allerdings kann diese Reaktion durch Enzyme, wie die GST's, noch beschleunigt werden. Zudem stellt GSH die Hauptkomponente für Thiolgruppen im Zytosol dar, mit rund 1-5 mM. Wichtig um als Signalweg wirken zu können ist, dass diese Konjugationsreaktion von RES an GSH reversibel ist und das Gleichgewicht zwischen freien RES und GSH gebundenen RES in Abhängigkeit des pH-Wertes verschoben werden kann. Anders verhält es sich mit der kovalenten RES Bindung an Cystein Gruppen von Proteinen, diese sind unter Bedingungen, wie sie in der Zelle herrschen nicht reversibel. Unter physiologischen Bedingungen, sprich bei einem pH-Wert von 7,5 und 1 mM GSH liegen ungefähr 75 % von OPDA in gebundener Form vor (Dueckershoff et al., 2008). Mit der Zeit werden dann die gebundenen RES-Oxylipine (z.B. OPDA) langsam wieder

abgegeben, wodurch wieder ungebundenes GSH freigesetzt werden kann. Würden diese freigesetzten RES-Oxylipine an alle Thiolgruppen mit gleicher Geschwindigkeit binden würde es kaum zu einer Proteinbindung kommen, da GSH in der Zelle in deutlich größeren Mengen vorliegt als das gewünschte Zielprotein. Aber die 3D Struktur von Proteinen sorgt dafür, dass bestimmte Thiolgruppen stärker und vor allem schneller mit elektrophilen wie RES, ROS oder auch RNS reagieren, was eine effiziente und spezifische Proteinmodifikation möglich macht. Die Konjugation von RES an ein Protein führt bei diesem zu einer Veränderung der Struktur was eine Funktionsänderung, erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Proteasomen und letzten Endes Degradation zur Folge haben kann. Proteine, die typischerweise über Thiolgruppen modifiziert werden, sind Proteine des Zellskeletts, Enzyme, die wichtig für den Metabolismus einer Zelle sind (wie z. B. Glycolyse, Photosynthese, Kalvinzyklus, ATP-Synthese), Stress induzierte Proteine, Proteine die an der Biosynthese beteiligt sind und Proteine, die eine Rolle bei der Redox Regulierung spielen (siehe Review Mueller and Berger, 2009). Sie alle stellen damit potentielle Ziele für eine Modifikation durch RES-Oxylipine dar.

### ***Wie der Redox-Signalweg durch RES beeinflusst werden kann***

Es gibt 3 mögliche Mechanismen der Redox-Regulierung. Einer ist die bereits oben beschriebene Interaktion mit GSH. Durch die Bindung der RES-Oxylipine an GSH sinken die GSH-Spiegel von reduziertem GSH in der Zelle. Die zweite Möglichkeit wurde ebenfalls bereits im letzten Kapitel erwähnt. Die direkte Interaktion von Zielproteinen, die besonders sensitiv auf Oxidation reagieren mit dem Elektrophil (RES, ROS oder RNS). Die dritte Möglichkeit ist die Interaktion der Elektrophilen mit kleineren Proteinen. Diese müssen über hoch reaktive Thiolgruppen verfügen und werden so als erstes oxidiert. Diese übertragen den oxidierten Zustand anschließend über Protein-Protein Interaktion auf das eigentliche Zielprotein. Derzeit sind zwei Proteine beschrieben die über hoch reaktive Thiolgruppen verfügen. In Screens nach Thiol-modifizierten Proteinen durch RES, ROS oder RNS tauchen sie immer wieder auf. Es handelt sich dabei um GAPDH und Peroxiredoxine (Winterbourn and Hampton, 2008).

### ***Sensorabhängige Perzeption***

Würde es einen Rezeptor in Pflanzen geben, der auf die Oxidationsfähigkeit der RES-Oxylipine anspricht, so würde dieser auch durch RNS, ROS und andere Thiol-reaktiven Substanzen aktivierbar sein (z.B. GAPDH). Dies hätte zur Folge, dass Pflanzen auf alle diese Stoffe gleich reagieren würden. Das ist jedoch nicht der Fall. Dies zeigt sich durch einen Vergleich der Gene die durch  $H_2O_2$  und  $A_1$ -Phytosteran induziert werden. Es findet sich eine Übereinstimmung in 44 % der Gene. Bei OPDA findet sich nur noch eine Übereinstimmung von 25 %, verglichen mit  $H_2O_2$  (Mueller et al., 2008; Vandenbroucke et al., 2008). Handelt es sich also bei dem RES-Signalweg um einen rezeptorgestützten

Signalweg, muss es also weitere Möglichkeiten für die Pflanze geben diese Signalmoleküle zu unterscheiden. Eine Möglichkeit wäre für jedes RES-Oxylipin ein eigener Rezeptor. Dieser wäre dann allerdings substratspezifisch und würde nur „sein“ RES-Oxylipin erkennen und darauf eine Signalkaskade in Gang setzen. Dies scheint jedoch extrem unwahrscheinlich, da eine Vielzahl an Genen (42 %), die durch Phytoprostan A<sub>1</sub> induzierbar sind, auch durch OPDA induziert werden (Mueller et al., 2008), was nicht auf einen ligandenpezifischen Rezeptor hinweist, sondern eher auf einen Sensor hindeutet, der auf bestimmte chemische Eigenschaften reagiert (z.B.  $\alpha,\beta$  ungesättigte Carbonyl Gruppe). Es muss für die Pflanze daher andere Wege geben RES-Oxylipine von ROS (wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) unterscheiden zu können. Mögliche Eigenschaften der Elektrophile, die eine Unterscheidung ermöglichen könnten, sind Absorptionsrate, Verteilung in den verschiedenen Zellkompartimenten und Metabolismus des Elektrophils durch die Zelle. Besonders wichtig für ein Signalmolekül ist die Absorptionsrate durch die Zelle. Damit kann die Geschwindigkeit der Signalweiterleitung an benachbarte Zellen und Gewebe beeinflusst werden. Um überhaupt, ohne Hilfe eines Transporters, die Zellmembran durchqueren zu können muss die entsprechende Substanz lipophil sein. Zudem werden die meisten RES-Oxylipine in den Plastiden hergestellt und müssen irgendwie ins Zytosol bzw. andere Zellkompartimente gelangen können. RES-Oxylipine sind membrangängig, da ihr logP Wert größer als 0 ist, allerdings unterscheiden sich die RES-Oxylipine in ihrer Lipophilie. Zudem ermöglicht eine hohe Lipophilie auch das Binden an hydrophobe Taschen oder hydrophobe aktive Stellen von Proteinen. Außerdem können sie als Liganden wirken. Auch sind RES-Oxylipine die einzigen Elektrophilen, die Lipophilie aufweisen (Mueller and Berger, 2009). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> z.B. bindet nicht an hydrophobe Stellen von Proteinen. Dies ermöglicht eine Unterscheidung von RES gegenüber ROS und RNS.

Ein RES Interaktionspartner, der mit OPDA in Wechselwirkung tritt und dann für die Aktivierung von OPDA responsiven Genen sorgt, ist Cyp20-3 (Park et al., 2013). Cyp's gehören im Allgemeinen zur Familie der Peptidyl-prolyl-cis-trans Isomerasen. In *Arabidopsis* sind derzeit 29 Cyp's bzw. Cyp-ähnliche Proteine bekannt, die an der transkriptionellen Regulation und Stressadaptation beteiligt sind (Romano et al., 2004). Cyp20-3 ist das einzige bisher bekannt Cyp, welches im Stroma der Chloroplasten lokalisiert ist und dort an der Cystein Biosynthese durch Bindung und Aktivierung von Serin-Acetyltransferase (SAT1) beteiligt ist (Dominguez-Solis et al., 2008; Romano et al., 2004). OPDA selbst wird in Plastiden synthetisiert, zu denen auch die Chloroplasten zählen, wodurch es direkt Zugang zu Cyp20-3 hat (Acosta and Farmer, 2010; Romano et al., 2004; Wirtz and Hell, 2006). Das Enzym SAT1 bildet einen Komplex mit O-Acetylserin(thiol)lyase der als Cystein Synthase-Komplex bezeichnet wird und für die Aufnahme und Reduktion von Schwefel in der Zelle verantwortlich ist (Takahashi et al., 2011; Wirtz and Hell, 2006). Es hat sich gezeigt, dass Cyp20-3 zum Thiol-abhängigen Redox-Regulationsnetzwerk in den Plastiden gehört, dass durch 2-Cystein-Peroxiredoxin gesteuert wird

(Muthuramalingam et al., 2009). Die externe Applikation von OPDA sorgt für eine deutlich verstärkte Cystein Biosynthese (Takahashi et al., 2011), was auch zu einer erhöhten Menge an Thiol-basierten Metaboliten in der Zelle führt (Park et al., 2013). Gleiches wird auch durch Verwundung hervorgerufen, da dabei ebenfalls vermehrt OPDA entsteht. Eine Cyp20-3 KO Mutante zeigt deutliche JA/OPDA insensitive Phänotypen, zu denen gehören: erhöhte Resistenz gegen *Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*, Insensitivität gegenüber OPDA- vermitteltem Wurzelwachstumshemmung und verringerte Expression von OPDA responsiven Genen. Zu diesen Genen gehören: *GLUTAREDOXIN 480 (GRX480)*, *CYTOCHROME P450 (CYP81D11)*, *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 6 (GST6)*, *GST8*, and *HEAT SHOCK PROTEIN 17.6 (HSP17.6)* (Park et al., 2013). Einige dieser Gene besitzen TGA Motive in ihren Promotorregionen (Mueller et al., 2008; Stintzi et al., 2001; Stotz et al., 2013; Taki et al., 2005), was wiederum auf die Bedeutung der TGA Transkriptionsfaktoren im RES-Oxylipin Signalweg hinweist. Park et al liefern eine Hypothese, wie mittels OPDA und Cyp20-3 eine Signalkaskade in *Arabidopsis* aussehen könnte. Unter normalen Bedingungen ist Cyp20-3 an 2-Cystein-Peroxiredoxin gebunden. Unter Stresseinwirkung kommt es zur vermehrten Bildung von OPDA welches an Cyp20-3 bindet und es so von 2-Cystein-Peroxiredoxin löst. Das freie OPDA/Cyp20-3 aktiviert nun SAT1, welches wiederum an O-Acetylserin(thiol)lyase bindet und so den Cystein-Synthase-Komplex formt. Dies alles führt zum Aufbau eines zellulären Reduktionspotentials welches den Konformationszustand von 2-Cystein-Peroxiredoxin dahingehend ändert, dass es wieder Cyp20-3 bindet und so das Signal terminiert, während OPDA durch andere zelluläre Prozesse umgewandelt wird.

Ein weiteres Beispiel wie RES-Oxylipine als Liganden wirken können zeigt sich im Tierreich. Der Transkriptionsfaktor NRF2 wird in tierischen Zellen von KEAP1 gebunden und ubiquitiniert, was zu seiner Degradation führt. Das abgebaute NRF2 wird als Ausgleich ständig neu gebildet, was dazu führt, dass ständig eine geringe Menge freies NRF2 vorliegt. Bei oxidativem Stress wird durch ROS oder RES das KEAP1 modifiziert und dadurch selbst degradiert. NRF2 kann so nicht mehr abgebaut werden und gelangt in den Zellkern, wo es an sogenannte ARE „Responseelemente“ bindet und so die Expression von Detoxifizierungsgenen initialisiert (Nguyen et al., 2009). NRF2 Homologe gibt es nicht in *Arabidopsis*, doch gehört es zu den Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren zu denen auch die TGA Transkriptionsfaktoren gehören, die man in *Arabidopsis* findet. Es gibt auch Gene die dem *KEAP1* Gen ähneln, doch ob deren Proteine in *Arabidopsis* am RES-Oxylipin Signalweg beteiligt sind, ist nicht bekannt (Farmer and Davoine, 2007). Betrachtet man das Transkriptom nach der Behandlung mit verschiedenen RES-Oxylipinen, so stellt man eine gewisse Überlappung fest, die sich auch in ihrer biologischen Aktivität niederschlägt, was typisch für oxidierte Lipide ist. Dies spricht eher dafür, dass der Oxylipinsignalweg eher über eine Mustererkennung stattfindet als über spezifische Rezeptoren. Aufgrund der Vielfalt von Oxylipinen scheint es auch denkbar, dass deren Signal über verschiedene Mechanismen wahrgenommen wird.

Dennoch sind dies alles nur Möglichkeiten wie eine Singalweiterleitung mittels RES-Oxylipinen funktionieren könnte. Der genaue Mechanismus ist nach wie vor unbekannt.

### 1.2.7 Das *GST6* Gen

Um näheres über den RES-Oxylipin Signalweg zu erfahren ist ein möglicher Ansatz die Analyse von Mutanten mittels eines „Forward genetic Approaches“ dieser setzt jedoch ein geeignetes Reportersystem voraus. Dies muss auf RES-Oxylipine reagieren und in der Lage sein eine geänderte Antwort der Pflanze auf RES-Oxylipine aufzuzeigen. Besonders gut eignet sich dabei eine Linie, bei der ein Luciferase Gen an den *GST6* Promotor gekoppelt ist. Das *GST6* Gen gehört zu den Glutathion S-transferasen. Diese Enzyme sind ubiquitär in Pflanzen verbreitet und spielen eine wichtige Rolle in vielen Stressantworten (Coleman et al., 1997). Ihre Aufgabe ist dabei die Katalyse der Konjugation von Glutathion mit einer Vielzahl von Elektrophilen. Damit schützen sie die Zellen durch Detoxifizierung von zytotoxischen Substanzen oder durch Schutz vor oxidativen Schaden. Das *Arabidopsis* Genom kodiert für eine Vielzahl an GST's, die durch verschiedene Umweltreize induzierbar sind. Zu diesen Reizen gehören unter anderem Pathogenbefall, Kontakt mit Herbiziden, Hormonen und Schwermetallen (siehe Review Droog, 1997). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten *GST6* Gen ist eine starke Induktion durch SA, vor allem in den Wurzeln nachgewiesen, wird aber dort noch stärker durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert. In den oberirdischen Teilen der Pflanze war die Induktion durch SA jedoch nur sehr schwach aber durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> weiterhin hoch (Chen and Singh, 1999). Es hat sich gezeigt, dass die Luciferase-Aktivität durch Substanzen mit einer  $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonyl Gruppe wie: OPDA, Phytoprostan A<sub>1</sub> und Prostaglandin A<sub>1</sub> (PGA) induziert werden kann. Verwendet man dagegen Oxylipine denen die  $\alpha,\beta$  ungesättigten Carbonyl Gruppe fehlt wie: JA, Phytoprostan E<sub>1</sub> oder Prostaglandin E<sub>1</sub> kommt es zu keiner Induktion der Luciferase-Aktivität (Diplomarbeit M. Zöllner 2008). Dies zeigt, dass der Promotor auf RES vor allem im oberirdischen Teil der Pflanze gut anspricht und so durch Expression der Luciferase eine *in vivo* Beobachtung der *GST6* Aktivität und damit der Reaktion auf RES und im speziellen RES-Oxylipine ermöglicht.

### 1.3. Zielsetzung

Über den Signalweg, der durch RES-Oxylipine vermittelt wird, ist noch sehr wenig bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass RES-Oxylipine bei der Abwehr gegen bestimmte Pathogene eine wichtige Rolle spielen. Auch ihr Einfluss auf abiotische Stressreaktionen konnte bereits gezeigt werden ist aber nur wenig untersucht. Mit Hilfe eines „Forward Genetic Approach“ sollen Komponenten des RES-

Oxylipin Signalweges entschlüsselt werden und die Auswirkungen, die ein Defekt in diesen Komponenten auf den Phänotyp und die Reaktion gegenüber Stressbedingungen in *Arabidopsis thaliana* hat, untersucht werden. Dafür sollten Mutanten verwendet werden, die eine veränderte Reaktion auf das RES-Oxylipin sensitive Reportersystem *GST6::LUC* besitzen. Zunächst wird untersucht, wie die Mutation vererbt wird und ob die Luciferase-Aktivität durch geänderte Phytohormonspiegel oder Promotorsequenzen zustande kommt. Anschließend soll ein Überblick über das Transkriptom und Metabolom jeder Mutante gewonnen werden um eine Vorstellung zu erhalten, welche physiologischen Prozesse durch die Mutation betroffen sind. Mit diesen Daten können dann bestimmte Stressbedingungen gewählt werden um die Reaktion der Mutanten darauf zu untersuchen. Dies alles soll dabei helfen weitere Phänotypen zu finden in denen sich die Mutanten von der Kontrolle unterscheiden. Um das Gen zu finden, welches ursächlich für die Mutation ist, sollen zunächst eine F2 Population aufgebaut werden und dann mit den Phänotypen, die eine Unterscheidung zwischen Mutanten und Kontrolle ermöglichen, die Kartierungspopulation erstellt werden. Mit dieser soll dann, mittels „Next Generation Genome-Mapping“, die Position der Mutation soweit eingegrenzt werden, dass mit Komplementierungsexperimenten das exakte Gen identifiziert werden kann.

## 2. Material

### 2.1 Chemikalien

Tab. 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
<b>[18O]2-oxo-Phytodiensäure</b>	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<b>2-Propanol</b>	Applichem, Darmstadt
<b>6X Lade-Puffer DNA Loading Dye</b>	Fermentas, St. Leon-Roth
<b>Aceton</b>	Merck, Darmstadt
<b>Acetonitril</b>	Merck, Darmstadt
<b>Acrylamid (30 %)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ammoniumacetat (NH<sub>4</sub>·CH<sub>3</sub>COOH)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ammoniumdihydrogenphosphat (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Ammoniumnitrat (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>B5-Vitamine</b>	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<b>Borsäure</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Braun Injektionswasser</b>	Braun, Melsungen
<b>Bromphenolblau</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>Butylhydroxytoluol (BHT)</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>Calciumcarbonat (CaCO<sub>3</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Chloroform</b>	Merck, Darmstadt
<b>DanKlorix</b>	Gaba GmbH, Hamburg
<b>Diethylpyrocarbonat (DEPC)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Dihydrojasmonsäure</b>	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<b>D-Luciferin Natriumsalz</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>D-Mannitol</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ethanol (absolute Molecular biology grade)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ethanol (technisch)</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Ethidiumbromid</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ethylacetat</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Ethylendiamintetraacetat (EDTA)</b>	Roth, Karlsruhe

Material

<b>Gel Stain</b>	Roth, Karlsruhe
<b>Glycerin</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Glykogen</b>	Fermentas, St. Leon-Roth
<b>Harnstoff</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Hochauflösende Agarose</b>	Bio & Sell, Feucht
<b>HPLC-Wasser</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Imidazol</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Isopropanol</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Jasmonsäure-Norvalin</b>	Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
<b>Kaliumchlorid (KCl)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Kaliumhydroxid (KOH)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Kaliumnitrat (KNO<sub>3</sub>)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Methanol</b>	Biosolve, Valkenswaard, NL
<b>Methansäure</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Methyl-Jasmonat</b>	Aldrich, Taufkirchen
<b>Murashige und Skoog Medium (MS-Medium) (Basal Salt Mixture)</b>	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
<b>Myo-Inositol</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumacetat</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumchlorid (NaCl)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Natriumdodecylsulfat (SDS)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	Merck, Darmstadt
<b>Phenol</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Phytoagar</b>	Duchefa Biochemie, Haarlem, NL
<b>Saccharose</b>	Südzucker International, Ochsenfurt
<b>Salzsäure</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Silwet L-77</b>	LEHLE SEEDS, Round Rock, USA
<b>Trifast<sup>TM</sup> Trizol</b>	PEQLAB, Erlangen
<b>Triphenylphosphin (TPP)</b>	Merck, Darmstadt

<b>Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Triton X-100</b>	AppliChem, Darmstadt
<b>Tween 20</b>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
<b>Universal Agarose</b>	Bio & Sell, Feucht
<b>β-Mercaptoethanol</b>	Merck, Darmstadt

## 2.2 Kits, Enzyme und Puffer

Tab. 2.2 Kits, Enzyme und Puffer

<b>Kits, Enzyme, Puffer</b>	<b>Firma</b>
<b>50 bp DNA Marker</b>	Bio & Sell, Feucht
<b>Absolute QPCR SYBR Green Capillary Mix</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>DNase I</b>	Fermentas, St. Leon-Roth
<b>Dnase Puffer Dnase I + MgCl<sub>2</sub> (10x)</b>	Fermentas, St. Leon-Roth
<b>dNTP Set (molecular biology grade)</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>Dream Taq DNA Polymerase 5U/μl</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>Dream Taq Puffer (10x)</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>Gene Ruler 1 kb DNA Ladder</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>; 25 mM)</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>M-MLV Reverse Transkriptase Puffer (5x)</b>	Promega, Mannheim
<b>M-MLV Reverse Transkriptase RNase H Minus, Point Mutant</b>	Promega, Mannheim
<b>NEBNext Index 1 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 2 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 3 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 4 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 5 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 6 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 7 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 8 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 9 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 10 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 11 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext Index 12 Primer for Illumina (25 μM)</b>	New England Biolabs, Ipswich

<b>NEBNext Universal PCR Primer for Illumina</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® Adaptor (15 µM)</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® dA-Tailing Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® End Repair module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® High Fidelity 2x PCR Master Mix</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® mRNA Second Strand Synthesis Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® Quick Ligation Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NEBNext® RNA First Strand Synthesis Module</b>	New England Biolabs, Ipswich
<b>NucleoSpin® Gel and PCR Clean up Kit</b>	Macherey und Nagel, Düren
<b>peqGOLD TriFast™</b>	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
<b>PolydT27Primer (100 mM)</b>	TIB Molbiol, Berlin
<b>RNAse H</b>	Thermo Scientific, Dreieich
<b>TrueStart Hot Start <i>Taq</i> DNA Polymerase (5 U/µl)</b>	Fermentas, St. Leon-Roth
<b>USER Enzyme</b>	New England Biolabs, Ipswich

### 2.3 Primer

Tab. 2.3 SSLP Primer für Grobkartierung (5' → 3')

<b>Name</b>	<b>Primersequenz forward</b>	<b>Primersequenz reverse</b>
<b>nga111</b>	TGTTTTTAGGACAAATGGCG	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG
<b>nga168</b>	TCGTCTACTGCACTGCCG	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG
<b>nga172</b>	AGCTGCTTCCTTATAGCGTCC	CATCCGAATGCCATTGTTC
<b>nga225</b>	GAAATCCAAATCCCAGAGAGG	TCTCCCCACTAGTTTTGTGT
<b>nga6</b>	TGGATTTCTTCCTCTTTCAC	ATGGAGAAGCTTACACTGA
<b>nga63</b>	AACCAAGGCACAGAAGCG	ACCCAAGTGATCGCCACC
<b>nga76</b>	GGAGAAAATGTCACTCTCCACC	AGGCATGGGAGACATTTACG
<b>nga8</b>	GAGGGCAAATCTTTATTTCCGG	TGGCTTTCGTTTATAAACATCC

Tab. 2.4 Primer für qPCR (5'→3')

Genname	Primersequenz forward	Primersequenz reverse
<b>AKTIN2/8</b>	GGTGATGGTGTGTCT	ACTGAGCACAATGTTAC
<b>DREB2A (AT5G05410)</b>	AGGGTCGAAGAAGGGTTGTA	CAGCTTCTTGAGCAGTAGGG
<b>GLUCTRANS (AT3G46660)</b>	GCTGCACCAGAAAAAGACAA	AATCATGTGGTGGATGGTGT
<b>GOLS1 (AT2G47180)</b>	TTCATCACCGCTCTTACTGAAG	CTGTGTATTAGGGGTTGGAGA A
<b>GST22 (AT2G29460)</b>	AGGTTCCGGTTCTGTCTAC	TGATTGCAACCTCTACTCCC
<b>GST6 (AT2G47730)</b>	CCCCGTCGATATGAGAG	TTAAAGACACGCTCGAAGGCA
<b>GSTU25 (AT1G17180)</b>	GATCTGTGGAACAAAAGCCC	GAAAACCTGAGCGAAAGCAT
<b>LTPIV.4 (AT5G59310)</b>	CACATATCACAAACAGAGTTGAGTGAGA	ACAAAGTCTGTGGGAGACTGG G
<b>NAC032 (AT1G77450)</b>	CTCCGATTATCACCGAACTC	CGGTTTAGGACGACCTATTG
<b>OPR1 (AT1G76680)</b>	GCACCGCTGAATAAGTACG	GTAAAGTTTATGTTGGTCTC
<b>PDR12 (AT1G15520)</b>	GAGGCAAAACGAAAACGAGA	GAAAACCTGAGCGAAAGCAT
<b>PR1 (AT2G14610)</b>	TAGGTGCTCTTGTCTTCCC	CCCACCAGAGTGTATGAGTC
<b>TF10585 (AT1G10585)</b>	AGAGAAGGATCGAAGGATGC	CCTTCGTAGAGATTCCCGAG
<b>TOLB (AT1G21670)</b>	CAACAGACTCTATTCATC	CGCTCGCAGATAACCACTC

Tab. 2.5 Primer für Sequenzierung des GST6 Promotors (5'→3')

Name	Sequenz
<b>GST6Prom-783</b>	TTGACATGTATATAATCACC
<b>GST6Promplus8</b>	GGAATTGGATGAAGAAG
<b>LucStartRevGST6prom</b>	TGTTTTTGGCGTCTCCAT

## 2.4 Geräte

Tab. 2.6 Verwendete Geräte

Geräte	Bezeichnung und Firma
<b>Absorptionsmessung</b>	NANODROP 1000 Spectrophotometer Thermo Scientific, USA; Software: ND-1000 V3.5.2 MRX TC Revelation, Dynex Technologies, Berlin
<b>Analysenwaage</b>	BP211D und Laborwaage 1600 Sartorius, Göttingen
<b>Autoklav</b>	Tuttnauer Systec 5075ELV New York, USA

<b>Durchmischer</b>	Vortex Genie 2, Scientific Industries, USA
<b>Exsikkator</b>	Hartenstein, Würzburg
<b>Gefrierschrank -20 °C</b>	Gefrierschrank -20 °C Liebherr, Ochsenhausen
<b>Gefrierschrank -80 °C</b>	Gefrierschrank -80 °C New Brunswick Scientific, Nürtingen
<b>Gefriertrocknung</b>	CHRIST ALPHA 2-4 B. Braun, Pumpe: CIT Alcatel 2004 A, Osterode
<b>Geldokumentation</b>	UV-Systeme INTAS GelCapture, Ahmedabad, India
<b>Heizblock</b>	Thermo Stat Plus, Eppendorf, Hamburg
<b>Klimaschränke</b>	AR-36L3 und AR-36L, Percival Scientific, USA
<b>Kugelmühle</b>	MM 400 Retsch, Haan
<b>Luciferase-Kamera</b>	Modellnr. 4742-98, Hamamatsu, Herrsching am Ammersee, DE
<b>Massenspektrometer (MS)</b>	Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer Waters, Micromass, Milford, USA qTOF, Synapt G2 HDMS, Waters
<b>PCR-Geräte</b>	Mastercycler ep realplex S, Eppendorf, Hamburg CFX96 Real-Time System C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, München
<b>pH-Meter</b>	HI 9321 microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein
<b>Pipetten, Research (10, 100 und 1000 µl)</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Querstromsterilbank</b>	Ceag Envirco, Dortmund
<b>Reinstwasseranlage</b>	RiOs Water Purification System, Millipore, Schwalbach
<b>Rotationsvakuumkonzentrator</b>	Rotationsvakuumkonzentrator RVC 2-18 und RVC 2-25 Heraeus-Christ, Osterode mit Membranvakuumpumpe MZ 2C Vakuubrand, Wertheim
<b>Scanner</b>	Scan Maker 9800 XL Microtek, Hsincu, Taiwan
<b>Tischzentrifuge</b>	Eppendorf Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg
<b>Ultrahochleistungsflüssigkeitschromatograph (UPLC)</b>	Acquity™ Ultra Performance LC, Waters Micromass, Milford, USA
<b>Ultraschallbad</b>	Sonorex TK52 Bandelin, Berlin

### 3. Methoden

#### 3.1 Herstellung von MS-Medium/ Agar

Tab. 3.1 MS-Medium (Murashige-Skoog Medium) für 500 ml

<b>MS Salze (Ink. MES)</b>	2,4 g
<b>B5 Vitamine</b>	500 µl
<b>Zucker</b>	15 g
<b>Myo-Inositol (100 mg/ml)</b>	50 mg
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Ad 500 ml

pH einstellen mit 1 M KOH Lösung auf pH 5.7

Für die Herstellung von MS-Agar wurden 6 g Phytoagar vor dem Autoklavieren zugefügt. Nach dem Abkühlen wurde der Agar in Petrischalen gegossen und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### 3.2 Anzucht und Behandlung von Pflanzen

##### 3.2.1 Pflanzenmaterial

Die *Arabidopsis thaliana* Ökotypen *Columbia-0* und *Landsberg erecta* wurden als WT eingesetzt. Die Linie *GST6::LUC* wurden von der Arbeitsgruppe um Singh am Department of Molecular, Cell and Developmental Biology, University of California Los Angeles zur Verfügung gestellt. Die hier untersuchten Linien *coe3*, *nr1* und *nr2* wurden in einem Screen der EMS mutagenisierten *GST6::LUC* Samen am Lehrstuhl der Pharmazeutischen Biologie isoliert.

##### 3.2.2 Sterilisation von Samen

Für die Trockensterilisation wurden eine Spatelspitze voll Samen in eine frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und offen in einem Exsikkator platziert. Ein mit 100 ml Danklorix befülltes Becherglas kam ebenfalls in den Exsikkator und wurde mit 4 ml konzentrierter Salzsäure versetzt. Der Exsikkator wurde sofort geschlossen, die Samen für 2 h sterilisiert und bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert

##### 3.2.3 Anzucht von Erdpflanzen

Für die Anzucht wurden die nötigen Samen auf Erde gestreut und 2 Wochen unter Kurztagsbedingungen (9 h hell/16 h dunkel, bei 22 °C tagsüber und 20 °C nachts mit einer Luftfeuchtigkeit von 60-80 %) angezogen. Anschließend erfolgte die Vereinzelung der jungen Pflanzen

und eine weitere Anzucht für 3 Wochen. Im Alter von 5 bis 6 Wochen konnten die Pflanzen dann für Versuche verwendet werden.

### 3.2.4 Anzucht von Pflanzen in Flüssigmedium

Eine sterile Mehrfachkulturschale (24 oder 96 Well) wurde mit 1 ml (für 24 Well) oder 200  $\mu$ l (für 96 Well) gefüllt und die gewünschte Menge an sterilisierten Samen in die Vertiefungen (Wells) gegeben. Standardmäßig 10 Samen pro Well bei 24 Well Platten und 1 Samen pro Well bei 96 Well Platten. Zur Stratifikation kamen die Samen für 3 Tage bei 4 °C in den Kühlschrank und anschließend für 10 Tage in einen Klimaschrank, wo sie unter Kurztagsbedingungen (9 h hell/16 h dunkel, bei 22 °C tagsüber und 20 °C nachts mit einer Luftfeuchtigkeit von 60-80 %) angezogen wurden. Nach 7 d erfolgte ein Medienwechsel.

### 3.2.5 Behandlung von Pflanzen in Flüssigkultur

Bei den 10 Tage alten Pflanzen wurden das MS-Medium entfernt und durch 500  $\mu$ l MS-Medium mit der gewünschten Substanz ersetzt (bei 24 Well Platten) oder durch 50  $\mu$ l bei 96 Well Platten. Anschließend erfolgte die Inkubation der Pflanzen im Klimaschrank, unter Kurztagsbedingungen (9 h hell/16 h dunkel, bei 22 °C tagsüber und 20 °C nachts mit einer Luftfeuchtigkeit von 60-80 %), für die gewünschte Zeit. Danach wurde entweder die Luciferase-Aktivität gemessen oder die Proben wurden geerntet und weiter aufbereitet.

## 3.3 *Luciferase-Messungen unter der CCD Kamera*

### 3.3.1 Flüssigpflanzen

Um die konstitutive Luciferase-Aktivität von Pflanzen in Flüssigmedium messen zu können wurden in jedes Well einer 24 Well Platte 50  $\mu$ l Luciferinlösung pipettiert, bei einer 96 Well Platte waren es 10  $\mu$ l pro Well. Für 1,5 ml Luciferinlösung brauchte man: 30  $\mu$ l 50 mM Luciferin, 3  $\mu$ l Triton X-100 (5 %) und 1467  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O. Die Luciferinlösung wurde direkt in das MS-Medium gegeben und die Platten unter der Kamera positioniert. Nach einer 10 min Dunkeladaptation der Platten, in der geschlossenen Fotobox, wurde ein Bild mit 10 minütiger Belichtungszeit aufgenommen. Um die Aktivität der Pflanzen nach Zugabe verschiedener Substanzen zu messen wurde nach der konstitutiven Messung das gesamte Medium abgenommen und durch 500  $\mu$ l, bei einer 24 Well Platte bzw. 50  $\mu$ l bei einer 96 Well Platte, MS-Medium mit der gewünschten Substanz und in geforderter Konzentration ersetzt. Soweit nicht anders angegeben erfolgte eine 1 h Inkubation auf dem Schüttler im Klimaschrank unter Licht. Anschließend wurden wieder 50  $\mu$ l bzw. 10  $\mu$ l Luciferin in jedes Well gegeben und die Platten nach 10

minütiger Dunkeladaption unter der CCD Kamera gemessen. Dabei wurde keine einzelne Aufnahme gemacht sondern ein Zeitverlauf aufgenommen. Es wurde alle 20 Minuten ein Bild mit einer Belichtungszeit von 10 Minuten aufgenommen über einen Zeitraum von rund 15 h.

### 3.3.2 Erdpflanzen/ Pflanzen auf Agar

Um Erdpflanzen oder Pflanzen die auf MS-Agar angezogen wurden mit Luciferinlösung behandeln zu können wurde zuerst eine Sprühlösung hergestellt. Von der 50 mM Luciferinstocklösung wurden 40 µl mit 2 ml dH<sub>2</sub>O, 4 µl 5% Triton X-100 und 0,2 µl Silwet versetzt und in eine Sprühflasche gefüllt. Auf jede zu untersuchende Erdpflanze oder Agarplatte kam 1 Sprühstoß Luciferinlösung und nach erfolgter Positionierung unter der CCD Kamera mussten die Pflanzen 10 Minuten im Dunkel inkubiert werden. Anschließend konnte auch bei ihnen ein Bild mit einer 10 minütigen Belichtungszeit aufgenommen werden.

### 3.4 Trockenexperimente

Für die Trockenexperiment wurden Samen der entsprechenden Mutanten auf Erde ausgesät und unter Kurztagsbedingungen 2 Wochen angezogen. Danach wurden sie vereinzelt und in Schalen mit je 40 Töpfchen zu gleichen Teilen gemischt einsortiert. Die Pflanzen wurden weitere 4 Wochen angezogen und die Schalen alle 2 Tage um 180° gedreht um ein gleichmäßiges Beleuchten zu gewährleisten. Zu Experimentbeginn wurden die Schalen mit Wasser geflutet sodass sich die Pflanzen über Nacht mit Wasser vollsaugen konnten. Am nächsten Morgen wurde das überschüssige Wasser abgegossen und mehrere Tage gewartet, bis sich bei rund 50 % der Pflanzen, in einer Schale, die Blätter im Zentrum zusammenrollten. Zu diesem Zeitpunkt wurde die entsprechende Schale wieder mit Wasser geflutet und nach 5 d die überlebenden Pflanzen dokumentiert.

### 3.5 DNA-Isolierung

Für die DNA-Isolierung aus Pflanzen kamen rund 100 mg gefrorenes Pflanzenmaterial zum Einsatz. Dies wurde mit einem Spatel grob zerkleinert und mit 750 µl Extraktionspuffer und 750 µl Chloroform versetzt. Der Extraktionspuffer setzte sich aus 1 % Sarcosyl; 0,8 M NaCl; 0,022 M EDTA; 0,22 M Tris-HCl pH 7,8; 0,8 % CTAB und 0,14 M Mannitol zusammen. Dem Extraktionspuffer setzte man zuvor noch 14 µl β-Mercaptoethanol pro 10 ml Puffer zu. Die Proben kamen dann für 45 Minuten in den Heizblock bei 65 °C und wurden alle 15 Minuten invertiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 7500 g für 10 min. Die oberer wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß

überführt. Zur Fällung der DNA kamen 600 µl Isopropanol hinzu. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet 2 mal mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Waschen wurde das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und in 50 µl dH<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 3.6 PCR

Für jede PCR Reaktion wurden rund 200 ng chromosomale DNA eingesetzt. Der Reaktionsansatz für jede Probe setzte sich wie folgt zusammen:

Tab. 3.2 Reaktionsansatz für eine PCR Reaktion

<b>dH<sub>2</sub>O</b>	Ad 20 µl
<b>10x Reaktionspuffer</b>	2 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25 mM)</b>	1,6 µl
<b>dNTP Mix (2,5 mM je dNTP)</b>	1,6 µl
<b>5' Primer</b>	0,3 µl
<b>3' Primer</b>	0,3 µl
<b>Polymerase</b>	0,2 µl
<b>Template</b>	200 ng

Das Standard PCR-Programm sah aus folgt:

Tab. 3.3 Ablauf des Standard PCR-Programms

<b>Anzahl Zyklen</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>1 x</b>	95 °C	15 min
	95 °C	15 sek
<b>40 x</b>	Primerspezifisch	20 sek
	72 °C	Variabel (für jedes kb wird 1 min benötigt)
<b>1 x</b>	72 °C	5 min

### 3.7 Aufreinigung von PCR Produkten mit dem Macherey-Nagel PCR clean up Gel extraction Kit

Nach der PCR Reaktion wurde zu jeder Probe das 2 fache Volumen an NTI Puffer gegeben und solange gemischt bis keine Schlieren mehr sichtbar waren. Für jede Probe die aufgereinigt werden sollte wurde eine NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen platziert. Diese Säule

konnte mit bis zu 700 µl Probe beladen werden und anschließend für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang solange wiederholt bis die gesamte Probe über die Säule gelaufen war. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und auf die Säule wurden 700 µl NT3 Puffer pipettiert. Erneut wurde für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Membran zu trocknen und verbliebenen Puffer zu entfernen erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 rpm für 1 min. Die Säule wurde anschließend vorsichtig auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt. Für die Elution wurden 15-30 µl NE Puffer auf die Membran pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation für 1 min bei 11000 g sammelte sich die DNA im Reaktionsgefäß. Mit diesem Kit wurden alle Proben aufbereitet die für die Promotorsequenzierung benötigt wurden. Alternativ wurde die Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit durchgeführt. Dies wurde vor allem für die Aufreinigungen der RNA-Seq Proben verwendet.

### ***3.8 Gelelektrophorese***

Zur Analyse des PCR Ergebnisse wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Zur Analyse größerer Fragmente (größer als 300 bp) wurde ein 1 %iges Agarosegel verwendet, für kleiner Fragmente wurde ein 3 %iges Agarosegel aus hochauflösender Agarose hergestellt. Dazu wurde die entsprechende Menge Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 80 ml 1 x TBE aufgegossen, kurz geschwenkt und anschließend so lang in der Mikrowelle gekocht und immer wieder geschwenkt, bis die gesamte Agarose geschmolzen war. Das dabei verdampfte Wasser wurde ersetzt und nach abkühlen der Agarose auf rund 50 °C wurden 4 µl Gel Stain oder 2 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Das Gel wurde in einen Gelschlitten gegossen, in den zuvor die Kämme eingesetzt worden waren. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in die mit 1 x TBE gefüllte Gelelektrophoresekammer eingesetzt und die Kämme entfernt. Die aufzutragenden Proben wurden mit der entsprechenden Menge 6x Ladepuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Als Marker kamen 5 µl des 1 kb Marker oder des 50 bp Markers zum Einsatz. Sie wurden ebenfalls mit je 1 µl 6 x Ladepuffer vermischt. Die Elektrophoresekammer wurde an die Spannungsquelle angeschlossen und das Gel bei 80 V bis 120 V, je nach untersuchtem PCR Produkt, solange laufen gelassen, bis die Proben rund 2/3 der möglichen Laufstrecke zurückgelegt hatten. Die Analyse erfolgte unter ultraviolettem Licht. Die aus 3 %iger hochauflösender Agarose bestehenden Gele, wurden wieder eingeschmolzen und bis zu 6 mal wiederverwendet.

### *3.9 DNA Extraktion aus Agarosegelen mit dem Macherey-Nagel PCR clean up Gel extraction Kit*

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die gewünschte Bande unter der UV Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gewicht des Agarosestücks bestimmt. Für jedes mg wurden 2 µl NTI Puffer auf das Gelstück gegeben und bei 50 °C für 5 – 10 Minuten eingeschmolzen. Pro Probe wurde eine NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen platziert. Diese Säule konnte mit bis zu 700 µl Probe beladen werden und anschließend für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang so oft wiederholt bis die gesamte Probe über die Säule gelaufen war. Der Durchfluss wurde wieder verworfen und auf die Säule wurden 700 µl NT3 Puffer pipettiert. Erneut wurde für 30 Sekunden bei 11000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Membran zu trocknen und verbliebenen Puffer zu entfernen erfolgte eine Zentrifugation bei 11000 g für 1 min. Die Säule wurde anschließend vorsichtig auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt auf die Mitte der Membran 15-30 µl NE Puffer pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Durch die folgende Zentrifugation für 1 min bei 11000 g sammelte sich die DNA im Reaktionsgefäß und die Säule konnte verworfen werden.

### *3.10 DNA Extraktion aus Agarosegelen mit dem QIAquick Gel Extraction Kit*

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurde die gewünschte Bande unter der UV Lampe mit einem Skalpell ausgeschnitten und das Gewicht des Agarosestücks bestimmt. Für jedes mg wurden 3 µl QG Puffer zu dem Gelstück gegeben. Die Proben wurden für 10 min bei 50 °C inkubiert bis das Gel vollständig geschmolzen war. Für jedes mg des Gels wurde nun zu der geschmolzenen Lösung 1 µl Isopropanol geben und gut durchmischt. Für jede Probe die aufgereinigt werden sollte wurde eine QIAquick spin Säule in einem 2 ml Sammelröhrchen platziert. Diese Säule konnte mit bis zu 800 µl Probe beladen werden und anschließend für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert werden. Der Durchfluss wurde verworfen und der Vorgang so oft wiederholt bis die gesamte Probe über die Säule gelaufen war. Zum Waschen wurde auf die Säule 750 µl PE Puffer pipettiert und erneut zentrifugiert. Wieder konnte der Durchfluss verworfen werden und um die Säule von Pufferresten zu befreien schloss sich ein weiterer 1 min Zentrifugationsschritt an. Danach kam die Säule auf ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß und die gebundene DNA wurde durch Zugabe von 50 µl EB Puffer, der 4 min auf der Membran inkubiert und anschließender Zentrifugation, von der Säule gelöst

### *3.11 RNase Verdau chromosomaler DNA*

Von der zu verdauenden chromosomalen DNA wurden 20 µl mit 1,2 µl RNase (10 mg/ml) und 18,8 µl 10 mM Tris HCL pH 7,5 versetzt und vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz inkubierte anschließend für 1 h bei Raumtemperatur bevor das Volumen auf 200 µl mit Millipore Wasser aufgefüllt wurde. Zur Isolation der RNA freien DNA wurden 600 µl Phenol sowie 600 µl Chloroform zugegeben und vorsichtig invertiert bis eine Emulsion entstanden war. Diese inkubierte 2 min bei RT und wurde zur Phasentrennung 1 min bei 11000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit dem 2,5 fachen Volumen an eisgekühltem 100 %igem EtOH und 1/10 Volumen an 3 M NaAcetat pH 5.2 vorsichtig vermischt. Um die DNA zu pelletieren wurden die Proben 1 h bei -20 °C inkubiert und danach für 20-30 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 2 mal mit 70 %igem EtOH gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei RT getrocknet um anschließend in 30 µl AE Puffer resuspendiert zu werden.

### *3.12 Sequenzierung der GST6 Promotorfragmente*

Die Sequenzierung der DNA wurde von LGC Genomics durchgeführt. Dazu wurde zunächst der zu sequenzierende Abschnitt mittels PCR aufamplifiziert (siehe 3.6) und aufgereinigt. Von der aufgereinigten DNA kamen 200 ng gelöst in einem 10 µl Volumen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß und wurden mit 4 µl einer 5 pmol/µl Primerlösung versetzt. Diese Proben wurden dann von LGC Genomics sequenziert, die Auswertung erfolgte mit der Software Gentle.

### *3.13 RNA Isolation mit Trizol*

Für die RNA Isolation wurden rund 100 mg gefrorenes Blattmaterial mit einer gekühlten Zirkoniumoxid Kugel in 2 ml Schraubdeckel Röhrchen gegeben und ohne Aufzutauen bei 20 Hz für 2 min gemörsert. Auf die noch gefrorenen Proben wurde 1 ml Trizol gegeben und so lang auf dem Vortexer gemischt bis die Proben aufgetaut und gut durchmischt waren. Nach einer 5 min Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugesetzt, auf dem Vortexer gemischt und erneut 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C und 12000 rpm für 10 min. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 600 µl Isopropanol gefällt. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde bei 4 °C und 14000 rpm für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet 1 x mit 750 µl und 1 x mit 500 µl 75 % EtOH gewaschen. Nach dem

letzten Waschen wurde der Überstand entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Zum resuspendieren wurden 30 µl DEPC-Wasser verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte am Nanodrop.

### 3.14 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA am Nanodrop

Die Messung von Nukleinsäuren erfolgte an einem Spektrophotometer. Die wurde zuerst mit 1 µl dH<sub>2</sub>O kalibriert und anschließend mit 1 µl des entsprechenden Elutionspuffers tariert. Je nach Aufreinigungsmethode musste der dem Kit beigefügte Elutionspuffer verwendet werden. Von 1 µl Probe wurde die Absorption bei 260 nm gemessen und mit der Formel  $E_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$  die Konzentration in ng/µl berechnet.

### 3.15 DNase-Verdau

Für den DNase Verdau wurden 1 µg RNA eingesetzt und auf ein Gesamtvolumen von 8 µl mit DEPC Wasser aufgefüllt. Die Proben wurden gemischt mit 1 µl 10 x DNase Puffer sowie 1 µl DNase (1 U/µl) versetzt und abzentrifugiert. Nach einer 15 min Inkubation bei RT wurden in jede Probe 1 µl EDTA (25 mM Fermentas) zugegeben und für 10 min bei 65 °C im Heizblock inkubiert. Anschließend kamen in jede Probe 201 µl eines Mastermix der sich wie folgt zusammensetzte:

Tab. 3.4 Reaktionsansatz für eine DNase-Verdau Reaktion

<b>DEPC-Wasser</b>	90 µl
<b>Glycogen (20 mg/ml)</b>	1 µl
<b>Isopropanol (eisgekühlt)</b>	100 µl
<b>5 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup></b>	10 µl

Das Gemisch wurde gründlich durchmischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNA durch Zentrifugation bei 4 °C, 14000 rpm für 15 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl 75 % EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen bei RT wurde die RNA in 7 µl DEPC Wasser gelöst.

### 3.16 cDNA Synthese

Von der gelösten DNase Verdauten RNA wurden 6,7 µl in PCR Reaktionsgefäße überführt und im Thermocycler für 2 min auf 70 °C erhitzt. Anschließend kamen die Proben sofort auf Eis und wurden mit 3,3 µl cDNA-Mastermix versetzt. Dieser setzte sich zusammen aus:

Tab. 3.5 Reaktionsansatz für eine cDNA Synthese Reaktion

<b>M-MLVxRT 5 x Reaktionspuffer</b>	2 µl
<b>dNTP Mix (2,5 mM je dNTP)</b>	0,5 µl
<b>Oligo dT Primer (100 µM)</b>	0,4 µl
<b>MMLvRT Enzym (200 U/µl)</b>	0,4 µl

Die Proben wurden herunterzentrifugiert und im Thermocycler bei 42 °C für 1 h gefolgt von 70 °C für 15 min inkubiert. Die cDNA wurde dann entweder 1:20 oder 1:5 mit t-RNA Wasser verdünnt bei -20 °C für kurze Lagerung oder bei -80 °C für längere Lagerung aufbewahrt.

### 3.17 qPCR

Für jede zu messende Probe und jedes Gen, das getestet werden sollte, wurde folgender Mix zusammen gestellt:

Tab. 3.6 Reaktionsansatz für eine qPCR Reaktion

<b>HPLC-Wasser</b>	7,52 µl
<b>5'-Primer (50 µM)</b>	0,24 µl
<b>3'-Primer (50 µM)</b>	0,24 µl
<b>Cyber Green</b>	10 µl

In jedes Reaktionsgefäß der 96 Well Platte wurde der vorher zusammengestellte Mix pipettiert, sowie 2 µl der entsprechend verdünnten cDNA. Die Platte wurde mit Folie versiegelt, runterzentrifugiert und je nach Primer das qPCR Programm mit 55 °C oder 59 °C Anlagerungstemperatur gestartet. Die eingesetzten Verdünnungen sowie die gewählte Anlagerungstemperatur sind in Tab 3.7 dargestellt.

Tab. 3.7 Eingesetzten Verdünnungen, sowie die gewählte Anlagerungstemperatur

<b>Genname</b>	<b>Anlagerungstemperatur in °C</b>	<b>cDNA Verdünnung</b>
<b>GST6</b>	55	1:20
<b>GTSTU25</b>	55	1:20
<b>GST22</b>	55	1:5
<b>TOLB</b>	55	1:20
<b>AKTIN</b>	55	1:20
<b>GOLS1</b>	59	1:20
<b>LTPIV.4</b>	55	1:20
<b>TF10585</b>	55	1:5
<b>PDR12</b>	55	1:20

<b>OPR1</b>	55	1:20
<b>PR1</b>	55	1:20
<b>DREB2A</b>	55	1:20
<b>NAC032</b>	55	1:20

Die Einstellungen des gewählten qPCR Programms sind in Tab. 3.8 aufgeführt.

Tab. 3.8 Ablauf des Standard qPCR-Programms

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
<b>1 x</b>	95 °C	15 sek
	95 °C	15 sek
<b>44x</b>	55 °C bzw. 59 °C	20 sek
	72 °C	20 sek
<b>1 x</b>	95 °C	10 sek
<b>1 x</b>	65 °C	0,5 sek
<b>1 x</b>	95 °C	5 sek

### 3.18 RNA Sequenzierung

#### 3.18.1 Proben Vorbereitung

Um die genaue Konzentration der verwendeten RNA zu bestimmen wurde diese vor Experimentbeginn mit dem Experion™ Automated Electrophoresis System nach dem HighSens RNA Assay Protokoll gemessen.

#### 3.18.2 Isolierung von mRNA aus gesamt RNA

Zuerst mussten die verwendeten Sera-Mag Oligo(Dt) „Beads“ vorbereitet werden. Für jede verwendete RNA Probe wurden 15 µl der „Beads“ in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und 2 mal bei RT mit 100 µl Hybridisierungspuffer gewaschen. Dazu wurde der Puffer zu den „Beads“ gegeben und kurz resuspendiert. Nach einer 2 sek Zentrifugation bei 2500 rpm kamen die Reaktionsgefäße für 2 min in den Magnetständer. Danach konnte das Medium abgenommen und verworfen werden. Nach dem letzten Waschschrift wurden die „Beads“ in 50 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert. Von der gemessenen RNA wurden 5 µg in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Braun Injektionswasser auf 50 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Proben wurden anschließen für 5 min bei 65 °C inkubiert und danach sofort auf Eis abgekühlt. Diese 50 µl RNA wurden zu den „Beads“ pipettiert und 5 min bei RT rotiert. Die Proben kamen in den Magnetständer und der Überstand wurde

verworfen. Es folgte ein zweimaliges waschen mit Waschpuffer, nach dem gleichen Schema wie die Vorbereitung der „Beads“. Nach dem letzten Waschschrift wurden 50 µl Elutionspuffer zu den „Beads“ gegeben, das Gemisch resuspendiert und für 2 min bei 80 °C inkubiert. Die Proben kamen direkt in den Magnetständer und konnten dort abkühlen. Danach wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß mit 50 µl Hybridisierungspuffer pipettiert. Die benutzen „Beads“ wurden erneut 2 mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen wobei nach dem letzten Waschschrift der Puffer auf den „Beads“ verblieb damit diese nicht austrockneten. Das RNA/Hybridisierungspuffergemisch wurde auf 65 °C erwärmt und für 5 min inkubiert, danach kamen die Proben direkt in ein Eisbad zum Abkühlen. Der verbliebene Waschpuffer wurde von den „Beads“ entfernt und die 100 µl RNA/Hybridisierungspuffer zugegeben. Die Proben mussten nun wieder 5 min bei RT rotieren bevor sie in den Magnetständer gestellt und der Überstand verworfen werden konnte. Nach dem die Proben erneut 2 mal mit Waschpuffer gewaschen wurden kamen 20 µl Elutionspuffer auf die „Beads“. Nach dem Resuspendieren und der 2 minütigen Inkubation bei 80 °C kühlten die Proben im Magnetständer ab und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die mRNA wurde bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Die so erhaltenen mRNA wurde erneut mit dem Experion™ Automated Electrophoresis System nach dem HighSens RNA Assay Protokoll gemessen.

### 3.18.3 mRNA Fragmentierung

Von der aufgereinigten und gemessenen mRNA wurden für die Reaktion 18 µl pro Probe eingesetzt und mit 2 µl 10 x RNA Fragmentations-Reaktionspuffer versetzt. Diese Proben inkubierten anschließend für 5 min bei 94 °C und kamen danach direkt auf Eis zum Abkühlen. Zum Stoppen der Reaktion wurde jeder Probe 2 µl 10 x RNA Fragmentierungs-Stopp Lösung zugesetzt. Zur Aufreinigung der Proben kamen in jedes Reaktionsgefäß 2 µl 3 M Natrium Acetat (pH 5,5), 2 µl lineares Acrylamid (10 mg/ml) und 60 µl 100 % EtOH. Dieses Gemisch wurde für 1 h bei -80 °C inkubiert und dann bei 4 °C, 14000 rpm für 25 min abzentrifugiert. Der Überstand konnte verworfen werden und das Pellet wurde zweimal mit je 300 µl 70% EtOH gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift konnte das Pellet bei RT trocknen und wurde in 14,5 µl Nuklease freiem Wasser resuspendiert. Die fragmentierte mRNA wurde erneut mit dem Experion™ Automated Electrophoresis System nach dem HighSens RNA Assay Protokoll gemessen.

### 3.18.4 „First- and Second-Strand“ cDNA-Synthese

Für die cDNA Synthese wurde zuerst 13,5 µl der fragmentierten mRNA mit 1 µl Random Primer gemischt und in einem Thermocycler für 5 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden danach auf Eis gekühlt und anschließend jeder Probe 4 µl 5 x „First Strand Synthesis Reaction Buffer“ und 0,5 µl Murine RNase Inhibitor zugesetzt. Nach einer erneuten Inkubation von 2 min bei 25 °C kamen noch 1 µl Protoscript 2 Reverse Transkriptase hinzu. Die Proben kamen in den Thermocycler und wurden für

10 min bei 25 °C, gefolgt von 50 min bei 42 °C und abschließend für 15 min bei 70 °C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Eis kamen in jedes Reaktionsgefäß 48 µl Nuklease freies Wasser, 8 µl 10 x „Second Strand Synthesis Reaction Buffer“ sowie 4 µl 10 x „Second Strand Synthesis Enzyme Mix“. Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt und schließlich für 2,5 h bei 16 °C inkubiert. Die Aufreinigung der cDNA erfolgte mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit und die cDNA wurde in je 52 µl EB Puffer eluiert.

### 3.18.5 End Repair der cDNA

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 50 µl der doppelsträngigen cDNA mit 35 µl Nuklease freiem Wasser, 10 µl „NEBNext End Repair Reaction Buffer“ und 5 µl „NEBNext End Repair Enzyme Mix“ gemischt und für 30 min bei 20 °C inkubiert. Die Proben wurden erneut mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit aufgereinigt und in 42 µl Elutionspuffer eluiert

### 3.18.6 dA-Tailing der cDNA

Die 42 µl cDNA wurden mit 5 µl 10 x „NEBNext dA-Tailing Reaction Buffer“ und 3 µl Klenow Fragment (3'-5'-exo-) versetzt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung erfolgte wieder mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit die Menge des Elutionspuffers betrug 40 µl.

### 3.18.7 Adapter Ligation

Für die Ligation des Adapters an die cDNA wurden 38 µl der dA „getailten“ cDNA verwendet und mit 10 µl 5x „NEBNext Quick Ligation Reaction Buffer“ sowie 1 µl NEBNext Adaptor (15 µM) und 1 µl Quick T4 DNA Ligase versetzt. Die Proben wurden 15 min bei RT inkubiert, anschließend kamen 3 µl USER Enzym hinzu und die Proben wurden 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit und die cDNA in 12 µl eluiert.

Zur Selektion der cDNA mit der passenden Größe wurde eine 2 %iges Agarosegel hergestellt und mit 2 µl EtBr versetzt. Als Ladepuffer für die Proben kam eine 30 %ige Glycerollösung zum Einsatz, wovon jeweils 2 µl mit jeder Probe vermischt wurden. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, sowie der 1 kb und der 100 bp Marker. Nach 40 min Laufzeit bei 100 V wurden die Banden auf einer Höhe von 250 bp und 200 bp ausgeschnitten und in separaten Reaktionsgefäßen gelagert. Weiter aufgereinigt wurden nur die 250 bp Proben die 200 bp Proben dienten als „Back up“. Die Aufreinigung erfolgte mit dem QIAquick PCR Kit nach dem Aufreinigungsprotokoll für Gelextraktion. Eluiert wurde die cDNA in 25 µl EB Puffer.

### 3.18.8 PCR Anreicherung der Adapter-ligierten cDNA

Um die erhaltene cDNA anzureichern wurden 23 µl jeder zuvor aus dem Gel extrahierten cDNA mit 25 µl NEBNext High-Fidelity 2 x CR Master Mix, 1 µl Universal PCR Primer (25 µM) und 1 µl Index Primer (25 µM) versehen. Das PCR Programm sah wie folgt aus:

Tab. 3.9 Ablauf des PCR-Programms zur Anreicherung der Adapter-ligierten cDNA

Anzahl Zyklen	Temperatur	Zeit
1 x	98 °C	10 sek
	98 °C	10 sek
13 x	65 °C	30 sek
	72 °C	30 sek
1 x	72 °C	5 min

Die PCR Produkte wurden mit dem QIAquick PCR Column Purification Kit gereinigt und in 15 µl EB Puffer eluiert. Die erhaltenen Proben wurden zur genauen Konzentrationsbestimmung mit dem Experion™ Automated Electrophoresis System nach dem DNA 1K Protokoll gemessen. Anschließend erfolgte eine Verdünnung auf 50 nmol mit EB Puffer und jeweils 6 Proben wurden zu gleichen Teile gemischt. Dieses Gemisch wurde dem Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie zur Durchführung des RNA-Sequenzierungsexperimentes übergeben.

### 3.19 Chlorophyllextraktion aus Pflanzen

Zunächst wurden rund 100 mg gefrorenes und gemörstertes Pflanzenmaterial in ein Schraubdeckelröhrchen eingewogen und das genaue Gewicht notiert. Zu diesem tiefgefrorenen Material kamen 1 ml 80 %iges Aceton hinzu und wurden solange auf dem Vortexer gemischt bis die Proben aufgetaut und gut durchmischt waren. Damit das Chlorophyll aus den Zellen austreten konnte wurde 3 h, im Dunkeln, bei 4°C inkubiert und zur Pelletierung des Blattmaterials 3 min bei 2700 g zentrifugiert. Der Überstand, welcher jetzt das Chlorophyll enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Extinktion, bei den Wellenlängen 664 nm und 647 nm gegen eine 80 %ige Acetonlösung gemessen. Um eine verlässliche Aussage über den Chlorophyllgehalt treffen zu können musste die Extinktion bei beiden Wellenlängen kleiner als 1 sein und gegebenenfalls verdünnt werden. Die Menge an Chlorophyll a (µg/ml) wurde mit der Formel:  $(11,78 \times \text{Extinktion}_{664\text{nm}} - 2,29 \times \text{Extinktion}_{647\text{nm}}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$  berechnet. Für Chlorophyll b (µg/ml) wurde die Formel:  $(20,05 \times \text{Extinktion}_{647\text{nm}} - 4,77 \times \text{Extinktion}_{664\text{nm}}) \times \text{Verdünnungsfaktor}$  verwendet. Die Menge an Gesamtchlorophyll (µg/g), die in der Probe vorhanden war, konnte mit Chlorophyll a + b/ Menge an Frischgewicht in g berechnet werden.

### 3.20 Quantifizierung der Phytohormone JA, JA-Ile, OPDA, dnOPDA, SA und ABA

#### 3.20.1 Herstellung des internen Standards

Für die Herstellung des internen Standards für die verschiedenen Phytohormone mussten verschiedene Substanzen gewählt werden, die ähnliche physikalisch chemische Eigenschaften aufwiesen wie die zu untersuchenden Phytohormone. Welche Substanzen dabei eingesetzt wurden ist in Tab 3.10 zu sehen.

Tab. 3.10 Auflistung welche Substanzen als interner Standard für welches Phytohormon gewählt wurden, sowie die Response-Faktoren für die einzelnen Phytohormone.

Analyt	Interner Standard	Response-Faktor
<b>JA</b>	dihydroJA (dhJA)	1
<b>JA-Ile</b>	JA-Norvaline (JA-Nval)	1,3
<b>OPDA</b>	[ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ] OPDA	1,4
<b>dnOPDA</b>	[ <sup>18</sup> O <sub>2</sub> ] OPDA	1,5
<b>ABA</b>	[D <sub>6</sub> ]ABA	2,3
<b>SA</b>	[D <sub>4</sub> ]SA	2,4

Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 1 µg/ml eingewogen, in Acetonitril gelöst und zu gleichen Teilen in einem IS Mix zusammengefasst.

#### 3.20.2 Phytohormonextraktion

Die Blätter der 6 Wochen alten Pflanzen, von denen die Phytohormone gemessen werden sollten, wurde entweder direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren oder auf beiden Seiten der Blattmittelrippe, 3 mal mit einer Pinzette gequetscht und für eine Stunde im Klimaschrank unter Kurztagsbedingungen stehen gelassen. Anschließend wurden auch diese Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das gefrorene Blattmaterial wurde gemörsert und 50 mg, in ein 2 ml Schraubdeckelröhrchen eingewogen, ohne dass die Proben auftauten. Zur späteren Gehaltsbestimmung musste das genaue Gewicht notiert werden. Zu jeder Probe kamen 950 µl einer 99:1 Mischung bestehend aus Ethylacetat und Methansäure (Ameisensäure). Die Proben wurden auf dem Vortexer gemischt bis sie vollständig aufgetaut waren und anschließend mit 50 µl IS-Mix und einer Keramikugel versehen. Nun kamen die Röhrchen für 3 min bei 20 Hz in die Kugelmühle. Anschließend folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 14000 rpm. Der entstehende Überstand kam in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß und wurde bei 45 °C für 35 Minuten eingedampft. Die dabei entstandenen Pellets wurden in einem 40 µl 1:1 Gemisch aus Acetonitril und MilliQ Wasser wieder gelöst. Um ein besseres Lösen der Rückstände zu ermöglichen wurden sie für 5 Minuten im Ultraschallbad sonifiziert. Da allerdings mögliche feste Bestandteile die Kapillaren in der UPLC verstopfen konnten mussten die Proben vor dem Umfüllen in UPLC Vials für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert werden.

### 3.20.3 Quantifizierung von Phytohormonen

Die Auftrennung des Probengemisches zur Messung der Phytohormone erfolgte mit einer Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC, Waters). Die eigentliche Detektion erfolgte mit einem Quattro Premier Triple Quadrupol-Massenspektrometer. Als Säule für die UPLC wurde eine BEH C18 Säule von Waters eingesetzt (Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm, Partikelgröße: 1,7 µm) mit einem 0,2 µm Partikelfilter. Die verwendete Vorsäule war eine Acquity BEH C18 VanGuard, 2,1 x 5 mm, 1,7 µm. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Der verwendete Eluent A bestand aus 0,1 % Ameisensäure in MilliQ Wasser, der Eluent B aus Acetonitril. Um die Phytohormone von der Säule zu eluieren wurde ein linearer Gradient gewählt der bei einem Lösemittelverhältnis A:B von 97:3 (v/v) begann und sich zu 0:100 (v/v) in 7 min änderte. Die Flussrate betrug dabei 0,25 ml/min.

Für die Detektion der Phytohormone wurden am Quattro Premier Triple Quadrupol Massenspektrometer folgende Einstellungen gewählt.

Tab. 3.11 Gewählte MS-Einstellung zur Messung von Phytohormonen

Parameter	Einstellungen
<b>Desolvatisierungsgas (Stickstoff)</b>	800 l/h
<b>Desolvatisierungstemperatur</b>	400 °C
<b>Elektrospray-Modus (ESI)</b>	negativ
<b>Kapillarspannung</b>	3 kV
<b>Konusgas (Stickstoff)</b>	50 l/h
<b>Quellentemperatur</b>	120 °C

Anhand der unten aufgeführten Massenübergänge (m/z), der dazugehörigen Fragment-Ionen, sowie der Kollisionsenergie und Konuspannung war eine Unterscheidung der einzelnen Phytohormone und ihrer internen Standards möglich.

Tab.3.12 Massenübergänge (m/z), Fragment-Ionen, Kollisionsenergien und Konuspannungen der Phytohormone und ihrer internen Standards

Phytohormon/ Standard	Molekül-Ion (m/z)	Fragment-Ion (m/z)	Kollisionsenergie (eV)	Konuspannung (V)
<b>Jasmonsäure</b>	209	59	17	19
<b>Dihydrojasmon- säure</b>	211	59	17	19

<b>Jasmonsäure- Isoleucin</b>	322	130	18	24
<b>Jasmonsäure- Norvalin</b>	308	116	18	24
<b>OPDA</b>	291	165	26	22
<b>dnOPDA</b>	263	165	26	22
<b>[<sup>18</sup>O]<sub>2</sub>-OPDA</b>	295	165	26	22
<b>SA</b>	137	93	17	17
<b>[D<sub>4</sub>]SA</b>	141	97	17	17
<b>ABA</b>	263	153	14	26
<b>[D<sub>6</sub>] ABA</b>	269	159	14	26

Die weitere Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der QuanLynx Software von Waters. Damit wurde die Peakflächen der Phytohormone bestimmt und mit denen der internen Standards verglichen. Zur genauen Berechnung wurde folgende Formel eingesetzt:

$$m(A) = \frac{f \times (m(IS) \times \text{Fläche}(A))}{\text{Fläche}(IS)} \times \left(\frac{1}{w}\right)$$

Dabei stellt m(A) die gesuchte Masse (in ng pro g) des Analyten dar, welche sich aus dem Produkt der Masse des internen Standards (m(IS) in ng) und der Fläche der Analyten (Fläche (A)) multipliziert mit dem Response-Faktor (f) ergibt. Dies wird durch die Fläche des internen Standards (Fläche (IS)) geteilt und mit dem Kehrwert der Einwaage des Analyten (w in g) multipliziert.

### 3.21 „untargeted“ Metabolomics

#### 3.21.1 Bligh and Dyer Extraktion

Um sowohl Metabolite messen zu können, die lipophile Eigenschaften besitzen, als auch solche die lipophobe Eigenschaften aufweisen, wurden die Pflanzen, deren Metabolite „untargeted“ gemessen werden sollten, mit dem Extraktionsverfahren nach Bligh und Dyer extrahiert. Dafür mussten zunächst 50 mg gefrorenes Pflanzenmaterial eingewogen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert werden. Das, für die Aufreinigung benötigte Chloroform wurde mit 1 mg TPP (Triphenylphosphan) und 1 mg BHT (Butylhydroxytoluol) versehen und die Standards Triglycerid 10:0/10:0/10:0 und Margarinsäure C17:0 zugegeben. Die Endkonzentration der Standards betrug 4 ppm. Für die wässrige Phase wurden MeOH und MilliQ Wasser im Verhältnis 2:1 gemischt und mit Norvalin versetzt. Die

Endkonzentration dieses Standards betrug 3 ppm. Auf jede Probe kamen 300 µl Chloroform und 300 µl MeOH/H<sub>2</sub>O sowie eine Keramikugel. Anschließend wurde 10 sek auf dem Vortexer gemischt. Um für eine gute Homogenisierung der Proben zu sorgen wurden sie in der Kugelmühle 10 min bei 21 Hz und RT gemahlen und zur Phasentrennung danach bei 4 °C und 14000 rpm 10 min zentrifugiert. Die wässrige und die organische Phase wurden jeweils getrennt in frischen 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt und auf das verbliebene Pellet erneut 300 µl Chloroform und 300 µl MeOH/H<sub>2</sub>O gegeben. Die Proben wurde erneut 10 sek auf dem Vortexer gemischt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm. Die Phasen wurden wieder getrennt abgenommen und mit den zuvor gesammelten Phasen vereinigt. Die wässrige Phase wurde in HPLC-Vials umgefüllt und bis zur Messung bei -20 °C gelagert. Die Chloroformphase musste zuvor noch bei 40 °C eingedampft und das erhaltene Pellet in 100 µl resuspendiert werden. Zum besseren Lösen des Pellets wurde es zweimal für 10 min im Ultraschallbad sonifiziert und für 30 sek auf dem Vortexer gemischt. Danach konnte auch diese Phase in HPLC-Vials umgefüllt und bis zur Messung bei -20 °C gelagert werden.

### 3.21.2 „untargeted“ Analyse

Für die chromatographische Auftrennung wurde eine Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC, Waters) verwendet und zur Detektion ein Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (qTOF, Synapt G2 HDMS, Waters). Die beiden in 3.21.1 erhaltenen Phasen wurden mit unterschiedlichen Methoden gemessen. In der wässrigen Phase wurden Fettsäuren gemessen, sowie die hydrophilen Metabolite mit Hilfe der hydrophilen Interaktionsflüssigkeitschromatografie (HILIC). In der organischen Phase wurden Fettsäuren und Lipide gemessen. Bei der Ionisation wurde jeweils die Elektrospray-Ionisation (ESI, Zspray™ Lockspray EXI,APCI,ESCI, Waters) verwendet. Die Parameter, die in allen Messungen gleich waren, sind in Tab. 3.13 aufgelistet. Zudem sind in Tab. 3.14 die Einstellungen für das „Lock Spray“ aufgeführt.

Tab. 3.13 unveränderte Parameter in allen Methoden

Parameter	Einstellungen
Flow rate	0,3 mL/min
Low mass	50 Da
High mass	1200 Da
Sample temperature	10 °C
Collision energy	15 - 35 V
Capillary	0,8 kV
Sampling cone	25
Trap collision energy	4
Desolvation temperature	350 °C

<b>Desolvation gas flow</b>	800 (L/Hr)
<b>Cone gas flow</b>	30 (L/Hr)
<b>Helium Cell gas flow</b>	180
<b>Sample infusion flow rate</b>	20 µl/min

Tab. 3.14 Verschiedene Parameter der „Lock Spray“ Einstellung

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>
<b>Reference cone voltage</b>	25 V
<b>Reference capillary voltage</b>	2,5 kV
<b>Reference trap collision energy</b>	4
<b>Reference scan frequency</b>	30 sec

Für jede Methode wurde ein entsprechender Elutionsgradient gewählt. Bei der Lipidmessung begann der Gradient bei einem Lösemittelverhältnis A:B von 70:30 (v/v) und änderte sich zu 1:99 (v/v) in 10 min, in den folgenden 5 min änderte es sich wieder zu A:B 70:30 (v/v). Bei der Fettsäuremessung begann der Gradient bei einem Lösemittelverhältnis A:B von 100:0 (v/v) und änderte sich zu 0:100 (v/v) in 10 min, in den folgenden 5 min änderte es sich wieder zu A:B 100:0 (v/v). Bei der HILIC Messung begann der Gradient bei einem Lösemittelverhältnis A:B von 20:80 (v/v) und änderte sich zu 80:20 (v/v) in 15 min, in den folgenden 4 min blieb er bei A:B 95:5 (v/v) und änderte sich dann bis min 23 wieder zu A:B 20:80 (v/v). Alle weiteren messungsspezifischen Parameter sind in Tab. 3.15 aufgelistet.

Tab. 3.15 Spezifische Parameter in den Lipid-, Fettsäure-, HILIC Messungen

<b>Parameter</b>	<b>Einstellungen</b>		
	Lipid Messungen	Fettsäure Messungen	HILIC Messungen
<b>Run Time</b>	15 min	15 min	23 min
<b>Säule</b>	BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm; Waters)	BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm; Waters)	BEH Amid (1.7 µm, 2.1 x 100 mm; Waters)
<b>Säulen-temperatur</b>	60 °C	40 °C	30 °C
<b>Eluent A</b>	60 % ddH <sub>2</sub> O, 40 % Acetonitril, 10 mM Ammoniumacetat	0,1 % Ameisensäure in Wasser	0,1 % Ameisensäure in Wasser
<b>Eluent B</b>	10 % Acetonitril, 90 % Isopropanol, 10 mM Ammoniumacetat	100 % Acetonitril	0,08 % Ameisensäure in Acetonitril

<b>Weak wash</b>	50 % ddH <sub>2</sub> O, 50 % Acetonitril	50 % ddH <sub>2</sub> O, 50 % Acetonitril	100 % Acetonitril
<b>Strong wash</b>	100 % Acetonitril	100 % Acetonitril	90 % ddH <sub>2</sub> O, 10 % Acetonitril
<b>Elektrospray -Modus (ESI)</b>	negativ/ positiv	negativ	negativ/ positiv
<b>Modus</b>	Resolution	Resolution	Sensitivity
<b>Datenformat</b>	Continuum	Continuum	Centroid

### 3.22 Messung von Arginin

#### 3.22.1 Probenaufbereitung

Zuerst musste eine Extraktionslösung hergestellt werden. Diese setzte sich wie folgt zusammen:

Tab.3.16 Zusammensetzung des Extraktionspuffers für die Argininmessungen

<b>Methanethiosulfonat</b>	1000 mg/l
<b>Norvalin (IS)</b>	0,25 mg/l
<b>MeOH</b>	12,5 ml
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Ad 25 ml

Zudem wurden Argininstandards mit einer Endkonzentration von 20 ppm, 10 ppm und 5 ppm in Wasser hergestellt und ebenfalls mit aufbereitet.

Für die Aufbereitung wurden jeweils 50 µl der Argininstandards bzw. 50 mg gemörserteres, tiefgefrorenes Pflanzenmaterial mit je 300 µl Extraktionspuffer versetzt. In jedes Reaktionsgefäß kam eine Keramikugel und die Proben wurden in vorgekühlten Einsätzen für 10 min bei 21 Hz in der Kugelmühle gemahlen. Es folgte eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 10 min und 4 °C. Der gesamte Überstand kam in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß. Auf das verbliebene Pellet wurden erneut 300 µl Extraktionspuffer gegeben und alles gut durchmischt. Wieder wurden die Proben 10 min bei 21 Hz in der Kugelmühle gemahlen und anschließend bei 12000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit dem vorherigen vereinigt und weitere 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert um mögliche feste Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und konnte nun bei -20 °C gelagert oder direkt derivatisiert werden.

Die Derivatisierung der Proben erfolgte mit dem Waters AccQ•Taq™ Ultra Derivatization Kit. Zu 60 µl des AccQ•Taq™ Ultra Borat Puffer kamen 20 µl Probe, sowie 20 µl AccQ•Taq™ Ultra Reagenz und wurden sofort gründlich gemischt. Der Ansatz wurde 1 min bei RT und danach bei 55 °C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert und 50 µl in die UPLC-Vials überführt.

### 3.22.2 Arginin Messung

Die Auftrennung des Probengemisches zur Messung der Aminosäuren erfolgte mit einer Acquity™ Ultra Performance LC (UPLC, Waters). Die eigentliche Detektion erfolgte mit einem Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometer (qTOF, Synapt G2 HDMS, Waters). Als Säule für die UPLC wurde eine BEH C18 Säule von Waters eingesetzt (Durchmesser: 2,1 mm, Länge: 50 mm, Partikelgröße: 1,7 µm) mit einem 0,2 µm Partikelfilter. Die Säulentemperatur betrug 40 °C. Der verwendete Eluent A bestand aus 0,1 % Ameisensäure in MilliQ Wasser, der Eluent B aus Acetonitril. Um die Aminosäuren von der Säule zu eluieren wurde ein linearer Gradient gewählt der bei einem Lösemittelverhältnis A:B von 100:0 (v/v) begann und sich zu 70:30 (v/v) in 13 min änderte. In den folgenden 2 min blieb er bei A:B 70:30 (v/v) und änderte sich wieder zu A:B 100:0(v/v) bis zum Ende der Messung bei min 18. Die Flussrate betrug dabei 0,4 ml/min. Es wurde im positiven Sensitivitäts-Modus gemessen und das verwendete Datenformat war „centroid“. Die „Low mass“ bzw. „High mass“ lagen bei 50 Da bzw. 1200 Da. Für die Berechnung der Menge an Arginin in nmol/mg wurde folgende Formel verwendet:

$$\left( \frac{\text{Peakfläche Arginin}}{\text{Responsfaktor}} \times 6 \right) \div \text{Peakfläche IS} \div \text{Einwaage}$$

Der Responsefaktor für Arginin lag bei 0,05.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Selektionierung von Mutanten mit unterschiedlicher Reaktion auf reaktive elektrophile Spezies Oxylipine

#### 4.1.1 Screen

Die in dieser Arbeit untersuchten Mutanten sind Linien, die mittels Ethylmethansulfonat (EMS) Mutagenese von *GST6::LUC* Samen erzeugt worden sind. Die mutagenisierten Samen wurden ausgesät und von jeder Pflanze Samen geerntet. Von diesen F1 Samen kamen jeweils 8 in eine 96 Loch-Mikrotiterplatte und es wurde die konstitutive Luciferase-Aktivität, sowie die Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe ermittelt. Von diesem Screening sollten die 3 vielversprechendsten Mutantenlinien in dieser Arbeit näher untersucht werden. Bei diesen handelte es sich um eine Linie, die basal eine höhere Luciferase-Aktivität zeigte, sowie ein starke Luciferase-Reaktion auf PGA, welche vergleichbar war mit der der Kontrolllinie. Diese Mutantenlinie wird im Folgenden als *coe3* („*constitutive overexpressor 3*“) bezeichnet. Die beiden anderen, in dieser Arbeit untersuchten Mutantenlinien zeigten keine basal erhöhte Luciferase-Aktivität. Nach PGA Gabe wiesen sie eine reduzierte Lichtabgabe auf. Die Linie *nr1* („*non responsive 1*“) zeigte eine abgeschwächte Luciferase-Reaktion, verglichen mit der Reaktion der Kontrolllinie nach PGA Gabe. Bei der Linie *nr2* („*non-responsive 2*“) war diese Lichtreaktion auf ein Minimum reduziert und wurde nur sehr schwach wahrgenommen, siehe Abb. 4.1

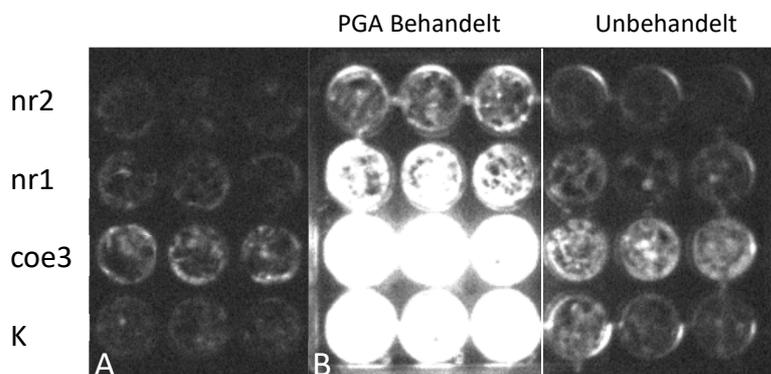


Abb.4.1 A: Luciferase-Aktivität von Keimlingen vor PGA Zugabe. B: Luciferase-Aktivität von Keimlingen 6 h nach 75  $\mu$ M PGA Gabe (linke Hälfte) bzw. MeOH Gabe (rechte Hälfte). Je 10 Keimlinge von jedem Genotyp pro Napf (Well) eingesetzt und 10 d in Flüssigmedium angezogen. Als Kontrolle (K) wurde die *GST6::LUC* Linie verwendet.

#### 4.1.2 Vererbung und Allelismus

##### 4.1.2.1 Vererbung

Es galt zu klären wie die Mutationen in den einzelnen Mutanten vererbt werden. Dazu wurden die Mutanten jeweils mit der Ausgangslinie *GST6::LUC* gekreuzt und die erhaltene F1 Generation auf ihren

Luciferase-Phänotyp hin untersucht. Sollte die Mutation dominant vererbt werden, würde man den Mutantenphänotyp in allen F1 Pflanzen finden, bei einer rezessiven Vererbung jeweils nur den der Ausgangslinie. Handelt es sich um einen intermediären Erbgang, wäre der Phänotyp nur in abgeschwächter Form zu detektieren (geringeres konstitutives Leuchten bei der *coe3* unter basalen Bedingungen, erhöhte Luciferase-Aktivität in den beiden nicht responsiven Mutanten nach PGA Gabe, jedoch geringer als in der Kontrolllinie). Von jedem Kreuzungsereignis wurden mehrere Samen ausgelegt dabei jedoch darauf geachtet, dass nur 1 Keimling in jedes Well gelegt wurde. Die 10 d alten Keimlinge wurden mit PGA behandelt. Wie sich zeigte, besaßen die F1 Pflanzen aus den Kreuzungen *GST6::LUC x nr1* und *GST6::LUC x nr2* kein reduziertes Leuchten nach PGA Gabe sondern leuchteten genauso stark wie die Kontrolle. Die F1 Pflanzen der Kreuzung *GST6::LUC x coe3* zeigten ebenfalls kein verändertes Leuchten nach PGA Gabe, zudem keine erhöhte Aktivität unter basalen Bedingungen (Bilder siehe Anhang).

Es scheint sich bei den drei unterschiedlichen Mutationen also nicht um einen dominanten Erbgang zu handeln, auch ein intermediärer Erbgang scheint unwahrscheinlich. Dies legt die Vermutung nahe, dass die Mutationen rezessiv vererbt werden. Um dies zu überprüfen wurden die Keimlinge aus dem vorangegangenen Experiment auf Erde überführt und die durch Selbstung entstandenen F2 Samen gesammelt. Diese Samen wurden ebenfalls einzeln in 96 Well Platten angezogen und ihre Luciferase-Aktivität gemessen. Bei einem rezessiven Erbgang müssten rund  $\frac{3}{4}$  der Pflanzen einen Phänotyp zeigen der dem der Ausgangslinie entspricht, die fehlenden  $\frac{1}{4}$  müssten den jeweiligen Mutantenphänotyp zeigen. Die Ergebnisse der konstitutiven Luciferase-Messung für die F2 Pflanzen der Kreuzung *GST6::LUC* mit *coe3*, sowie die Messungen nach PGA Gaben für die F2 Pflanzen der Kreuzungen *GST6::LUC x nr1* und *GST6::LUC* mit *nr2* sind in Abb.4.2 dargestellt.

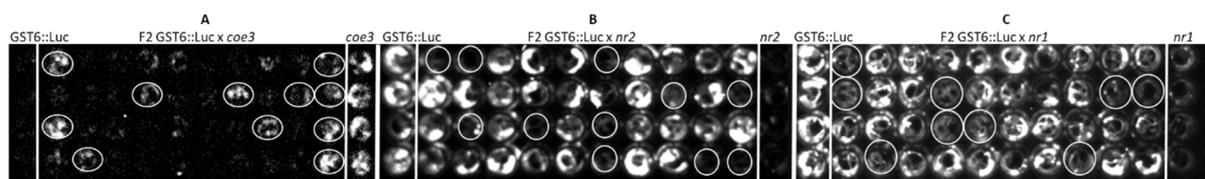


Abb.4.2 10 d alte F2 Pflanzen der jeweiligen Kreuzungen aus *GST6::LUC* und entweder *coe3* (A), *nr2* (B) oder *nr1* (C). Als Kontrolle wurden jeweils die *GST6::LUC* Linie verwendet oder die entsprechende Mutante. Die Pflanzen auf der linken Seite (A) sind unbehandelt. Die Pflanzen in B und C sind mit 75  $\mu$ M PGA behandelt. Weiße Kreise markieren die Pflanzen, die dem jeweiligen Mutantenphänotyp entsprechen.

Im linken Abschnitt (A) von Abb.4.2 sieht man die Luciferase-Aktivität unbehandelter Keimlinge. Deutlich zu erkennen ist die geringe Aktivität bei der Kontrolllinie und die basal erhöhte Aktivität bei der *coe3* Mutante. Durch die weißen Kreise sind die F2 Pflanzen markiert, die ebenfalls eine höhere Luciferase-Aktivität aufwiesen, die vergleichbar mit der der *coe3* war. Im hier gezeigten Beispiel sind

es 11 von 40 F2 Pflanzen, die eine höhere Aktivität zeigten. Der mittlere (B) und der rechte (C) Abschnitt zeigen die Luciferase-Aktivität von Keimlingen nach PGA Behandlung. Beim Mittleren handelt es sich um Keimlinge aus der Kreuzung *GST6::LUC* und *nr2* sowie die beiden Ausgangslinien. Es ist deutlich die erhöhte Leuchtaktivität der Kontrolle, sowie der meisten F2 Pflanzen zu erkennen. Bei 11 der 40 F2 Pflanzen zeigte sich eine geringere Aktivität, wie auch bei der *nr2* Kontrolle. Der rechte (C) Abschnitt gibt Auskunft über die Kreuzung *GST6::LUC* und *nr1*. Auch hier zeigten die *GST6::LUC* und der Großteil der F2 Pflanzen eine erhöhte Leuchtaktivität, nur 9 der F2 Pflanzen leuchteten deutlich weniger, vergleichbar mit der *nr1* Linie. Bei allen 3 Kreuzungen zeigte sich, dass in der F2 Generation rund  $\frac{1}{4}$  aller Pflanzen den gleichen Phänotyp aufwiesen wie die entsprechende Mutantenlinie. Demnach werden die Mutationen in den einzelnen Mutanten, welche für die veränderten Luciferase-Reaktionen verantwortlich sind, rezessiv vererbt.

### 4.1.2.2 Allelismus

Eine weitere wichtige Frage, die es zu klären galt, bevor mit den drei Mutanten weiterführende Experimente durchgeführt wurden, war, ob die Mutationen zueinander allel sind. Bei der *coe3*, im Vergleich zu den beiden nicht responsiven Mutanten, schien dies recht unwahrscheinlich, aber bei *nr1* und *nr2* konnte dies nicht ausgeschlossen werden. Um zu testen ob die Mutanten allel sind, wurden sie untereinander gekreuzt und die erhaltene F1 Generation auf ihre Luciferase-Reaktion unter basalen Bedingungen, sowie nach PGA Gabe untersucht. Sollten die Mutanten nicht allel sein so würden die F1 Generationen alle eine Luciferase-Reaktion zeigen, die der *GST6::LUC* Linie entspricht. Wären sie allel so würden sich die Phänotypen der beiden gekreuzten Mutanten in der F1 Generation wiederfinden.

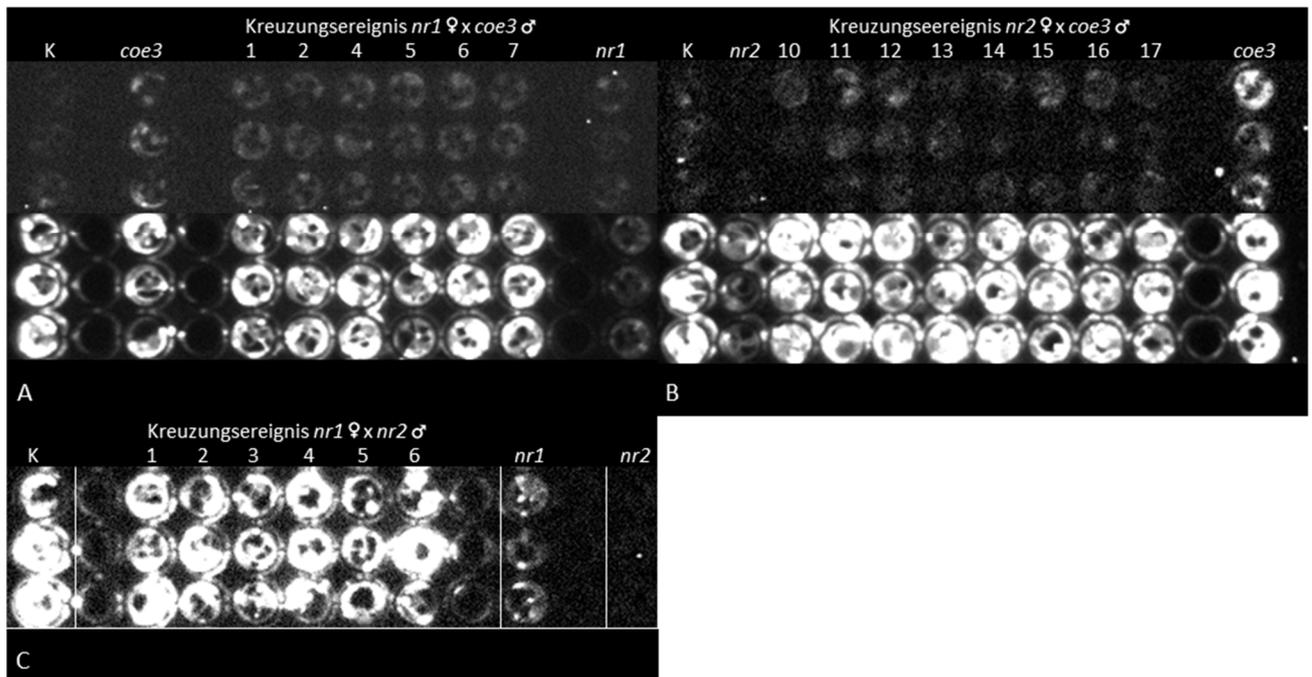


Abb.4.3 F1 Pflanzen aus Kreuzungen *nr1* x *coe3* basal (obere Hälfte) sowie nach 75 μM PGA Gabe (A), Kreuzungen *nr2* x *coe3* basal (obere Hälfte) sowie nach 75 μM PGA Gabe (B), Kreuzungen *nr1* x *nr2* nach 75 μM PGA Gabe. Als Kontrollen wurden jeweils die an der Kreuzung beteiligten Mutanten sowie die *GST6::LUC* Linie (K) mit ausgelegt. Es handelte sich immer um 10 d alte Keimlinge mit jeweils 1 Keimling pro Well, Spalten ohne Nummer oder Beschriftung enthielten keine Pflanzen.

Die beiden oberen Hälften der Abschnitte A und B in Abb.4.3 zeigen die basalen Messungen der Kreuzungen *nr1* x *coe3* sowie *nr2* x *coe3* und der entsprechenden Kontrolllinien. Es ist zu erkennen, dass außer bei der *coe3* keine erhöhte Luciferase-Aktivität messbar war. Nach PGA Gabe war bei allen Pflanzen eine erhöhte Luciferase-Aktivität zu messen, außer bei den Kontrollen *nr1* und *nr2*. In Abschnitt C ist die Kreuzung der beiden nicht responsiven Mutanten *nr1* und *nr2* nach PGA Gabe zu sehen. Man erkennt deutlich, dass beide Ausgangslinien nicht oder nur sehr schwach Licht abgeben, während die *GST6::LUC* sowie die F1 Kreuzungen stark leuchten. Es wurden mehrere Kreuzungen durchgeführt und alle zeigten das gleiche Bild. Keine erhöhte basale Luciferase-Aktivität, wenn die *coe3* mit einer anderen Mutante gekreuzt wurde und keine abgeschwächte Aktivität, wenn die nicht responsiven Mutanten in der Kreuzung enthalten waren. Daraus lässt sich ableiten, dass die drei Mutantenlinien nicht allel zueinander sind.

## 4.2 Überprüfung des *GST6* Promotors und der Phytohormonspiegel

### 4.2.1 Der *GST6* Promotor des Luciferase Gens

Um zu klären, ob die weitere Studie der Mutanten zielführend wäre musste geklärt werden, ob die veränderte Luciferase-Aktivität eine mögliche Folge einer Punktmutation im codierenden Bereich des Luciferase-Gens (i.F. Luc-Gen) oder des davor befindlichen *GST6* Promotors sein konnte. Dass eine Punktmutation im codierenden Bereich des Luc-Gens bei der *coe3* Mutante vorlag, konnte ausgeschlossen werden, da dies nicht zu einer basal erhöhten Luciferase-Aktivität führen würde. Bei der *nr1* konnte ein Defekt im codierenden Bereich ebenfalls ausgeschlossen werden, da sie unter anderen Stressbedingungen eine, der Kontrolllinie vergleichbare, Luciferase-Aktivität zeigte (siehe 4.4.2 Einfluss von gasförmigen Lösungsmitteln auf Erdpflanzen). Auch bei der *nr2* ist eine Mutation im Luc-Gen unwahrscheinlich, da auch diese Mutante nach Kontakt mit Hexenal eine messbare Luciferase-Aktivität aufweist (siehe 4.3.4 Abb.4.13). Um eine Mutation im Promotorbereich des Luc-Gens auszuschließen, welche eine geänderte Transkriptionsrate zur Folge haben könnte, wurden die Promotorbereiche aller drei Mutanten sequenziert und es konnten keine Abweichungen von der Kontrolllinie festgestellt werden (Daten siehe Anhang).

### 4.2.2. Phytohormonspiegel

Eine weitere mögliche Ursache für die geänderten Luciferase-Aktivitäten bei den Mutanten wären geänderte Phytohormonspiegel. Erhöhte oder erniedrigte OPDA Spiegel würden die erhöhten bzw. erniedrigten Luciferase-Aktivitäten erklären. Es ist möglich, durch Verwundung die Luciferase-Aktivität zu induzieren. Zudem ist aus der Literatur bekannt, dass durch Verwundung einige Phytohormone verstärkt gebildet werden. So ließe sich testen, ob bei der *coe3* basal mehr OPDA vorliegt, was die erhöhte Luciferase-Aktivität erklären könnte. Oder die beiden anderen Mutanten nach einem Reiz weniger RES-Oxylipine freisetzen können als die Ausgangslinie. Daher wurden Blätter von unverwundeten und verwundeten Pflanzen isoliert und auf ihre Phytohormonspiegel hin analysiert.

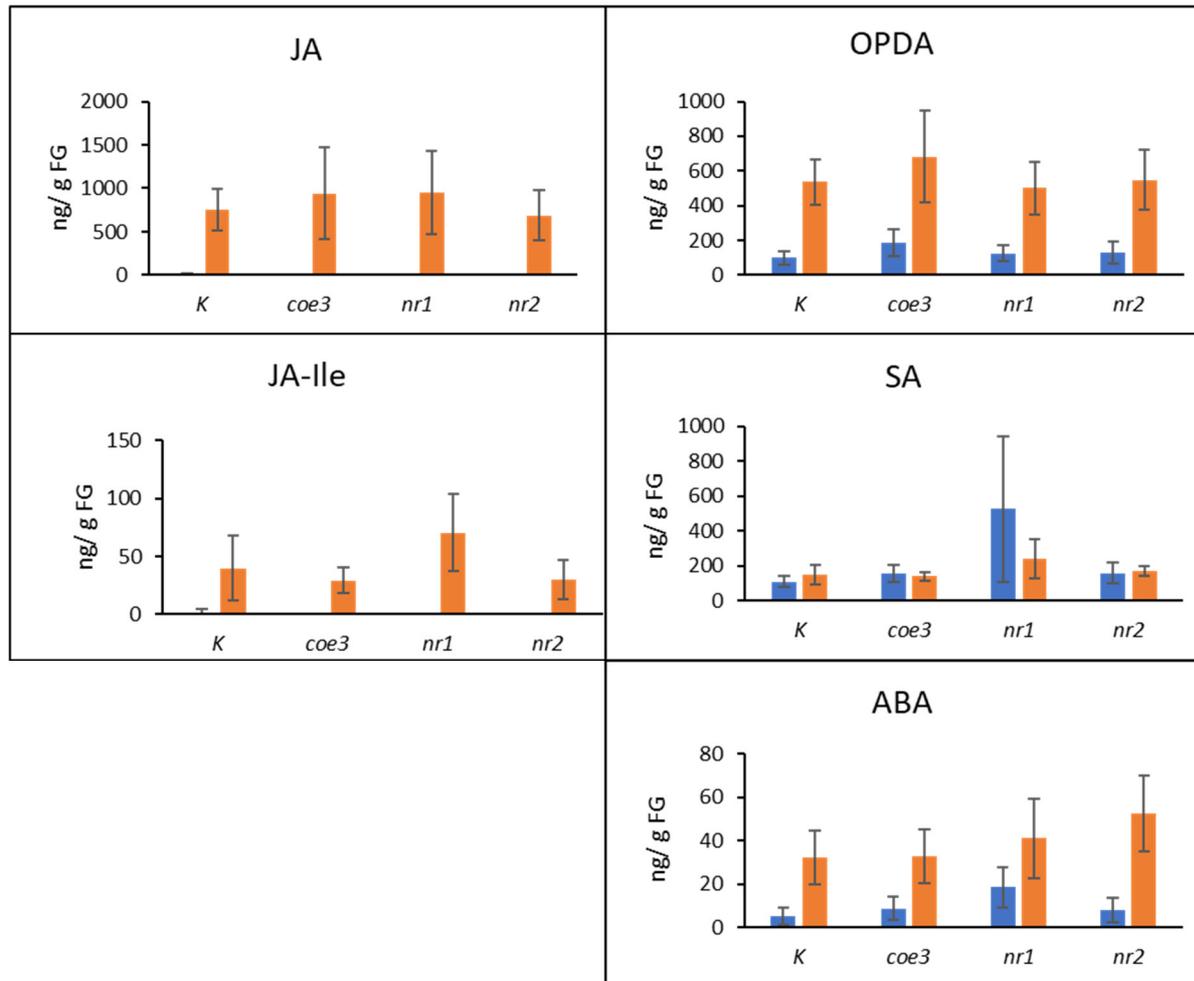


Abb.4.4 Gehalte an 12-Oxophytodiensäure (OPDA), Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Abscisinsäure (ABA) und Jasmonsäure-Isoleucin (JA-Ile). Abgebildet sind deren Mittelwerte und Standardabweichungen von je 10 Blattproben jeder Mutanten unverwundet (blaue Balken) und 1 h nach Verwundung (orange Balken). Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet.

Gemessen wurden OPDA (ein endogenes RES- Oxylipin), Jasmonsäure (JA, welche aus OPDA synthetisiert wird), die biologisch aktive Form der JA, Jasmonsäure-Isoleucin (Ja-Ile), Salicylsäure (SA, welche antagonistisch gegen JA wirkt) und Abscisinsäure (ABA, ein wichtiges Trockenstresshormon). Unter basalen Bedingungen waren in allen 3 Genotypen sowie der Kontrolllinie geringe Mengen OPDA nachzuweisen. Die Mengen lagen zwischen 101 ng/g FG bei der Kontrolle und 187 ng/g FG bei der *coe3* Mutante. Die gemessenen Werte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. JA sowie JA-Ile waren in unverwundeten Pflanzen nicht zu detektieren. Die Mengen an SA lagen zwischen 109 ng/g FG bei der Kontrolle und 525 ng/g FG bei der *nr1* Mutante, zeigten jedoch bei der *nr1* hohe Standardabweichungen. Auch die Mengen an SA unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Mengen an ABA (5 ng/g FG bei der Kontrolle und 18 ng/g FG bei der *nr1*), unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant. Nach Verwundung stiegen die Werte bei OPDA, JA und JA-Ile in allen Mutanten deutlich an. Bei OPDA erhöhten sich die Mengen um das 5,3 fache für die Kontrolle und um das 3,6 fache für die *coe3* Mutante. Jedoch unterschieden sich die Werte nach Verwundung für OPDA, JA und

JA-Ile zwischen den verschiedenen Mutanten nicht signifikant voneinander. Auch bei ABA kam es zu einem Anstieg nach Verwundung verglichen mit den unverwundeten Pflanzen, für die Kontrolle um das 6,2 fache und für die *nr1* Mutante um das 2,2 fache. Die Salicylsäurespiegel blieben dagegen unverändert und unterschieden sich kaum von denen der unverwundeten Pflanzen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Mutanten keine Veränderung in ihrer Phytohormonsynthese oder in ihrer Funktionalität des Reportersystems aufwiesen. Dies bedeutet, dass sie eine Veränderung in ihrer RES-Oxylipin abhängigen Signaltransduktion aufweisen.

### 4.3. Phänotypischen Analyse

#### 4.3.1 Samen, Keimung ,Wachstum, Blüten

Die Samen der Mutanten waren, in ihrer Form, Farbe und Größe, vergleichbar mit denen der Kontrolllinie oder Wildtypsamen wie die von *Col-0*. Auch bei der Keimung waren keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen und der *GST6::LUC* Linie festzustellen. Bei früheren Samenchargen keimte die *nr2* zwar deutlich schlechter, dies konnte in Folgegenerationen jedoch nicht wieder beobachtet werden. Bei der Kultivierung der Mutanten fiel immer wieder auf, dass die *nr1* deutlich später blühte und ihre Blätter meist kleiner wirkten als die gleichaltriger anderer Pflanzen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Eine Messung des Blattrosettendurchmessers von 7 Wochen alten Pflanzen ergab, dass die *coe3* und die *nr1* Pflanzen im Mittel einen kleineren Durchmesser aufwiesen als die *GST6::LUC* Kontrolle und die *nr2* einen größeren. Der Unterschied zwischen der Kontrolle und der *coe3* sowie der Kontrolle und der *nr1* war dabei hoch signifikant, während der Unterschied zwischen Kontrolle und *nr2* nur schwach signifikant war.

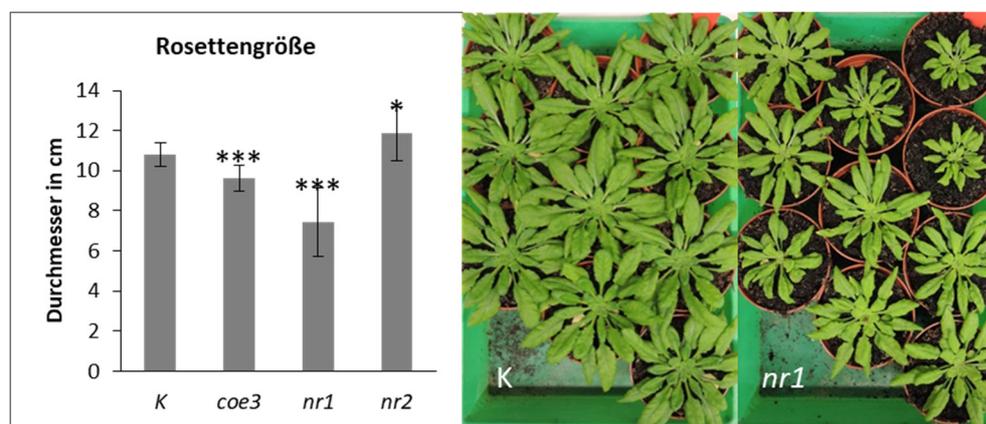


Abb.4.5 Linke Hälfte: Mittlere Rosettengröße von je 10, 7 Wochen alten, Pflanzen angezogen unter Kurztagbedingungen. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* Linie verwendet.  $\pm$  Standardabweichungen. \* $P < 0,05$  schwach signifikant; \*\* $P < 0,01$  sehr signifikant, \*\*\* $P < 0,001$  hoch signifikant. Rechte Hälfte: Fotoaufnahme der ausgemessenen *GST6::LUC* Kontrolle und der *nr1* Mutante

Nicht nur die Rosettengröße der *nr1* unterschied sich von denen der anderen Genotypen auch der Zeitpunkt des Blühbeginns war deutlich später als bei der *GST6::LUC*. Die Beobachtung des Blühzeitpunktes hat ergeben, dass die *nr1* rund 19 d später zu blühen beginnt als die *GST6::LUC* Linie.

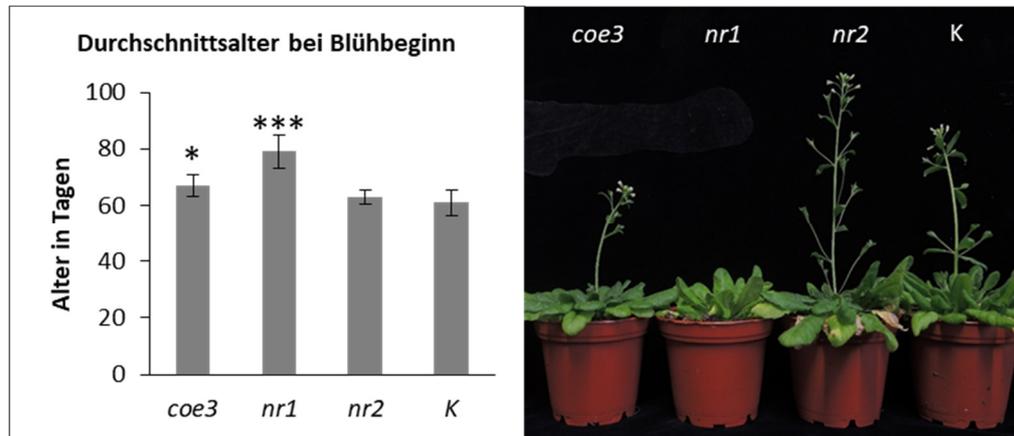


Abb.4.6 Linke Hälfte: Alter von je 11 Pflanzen zum Blühbeginn bei Anzucht unter Kurztagsbedingungen. Beginn des Blühzeitpunktes wurde als der Tag festgelegt, an dem zuerst in der Mitte der Blattrosette Blütenansätze erkennbar waren. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Rechte Hälfte: Repräsentative Aufnahme von 9,7 Wochen alten Pflanzen angezogen unter Kurztagsbedingungen.  $\pm$  Standardabweichungen. \* $P < 0,05$  schwach signifikant; \*\* $P < 0,01$  sehr signifikant, \*\*\* $P < 0,001$  hoch signifikant.

Abb.4.6 zeigt deutlich, wie bereits alle Genotypen zu blühen begonnen haben, während bei der *nr1* noch kein Blütenstand erkennbar war. Es zeigt sich, dass die *GST6::LUC*, *nr2* und *coe3* im Alter zwischen 65 und 72 Tagen zu Blütenansätze auszubilden. Bei der *nr1* geschieht dies jedoch durchschnittlich erst ab dem 86. Tag. Dieser Unterschied war hoch signifikant verglichen mit der Kontrolle. Die Entwicklung der *nr1* scheint mit ihrer geringeren Größe und ihrem späteren Blühbeginn deutlich verzögert.

### 4.3.2 Ungerichtete Metabolomanalyse

Um einen näheren Einblick zu gewinnen wie sich Mutante und Kontrolle auf Metabolitebene unterschieden, wurden ungerichtete Metabolom-Analysen durchgeführt. Dazu musste zunächst Blattmaterial von 6 Wochen alten Pflanzen aufbereitet und anschließend gemessen werden (siehe Material und Methoden). Zuerst wurde mittels der Software Progenesis QI jede Mutante mit der Kontrolle *GST6::LUC* verglichen und alle möglichen Fragmente, die sich in ihren Mengen unterschieden, aufgelistet. Deren Chromatogramme wurden anschließend genauer mittels der Software QuanLinx betrachtet und mögliche falsch Positive oder Metabolite mit zu geringen Unterschieden auszusortieren. Letzten Endes zeigten sich die größten Unterschiede zwischen der Mutante *nr2* und der Kontrolle. Hier waren, von 3 im negativen ESI Modus näher betrachteten Fragmenten, 2 um den Faktor 10 bzw. 60 höher in der Kontrolle als in der Mutante. Der dritte Marker war um den Faktor 4,5 in der Mutante erhöht. Zunächst wurden die 3 Fragmente aus der *nr1* Mutante näher untersucht. Die beiden Fragmente, die niedriger in der Mutante waren, hatten ein Masse-zu-Ladungsverhältnis ( $m/z$ ) von 873.088 mit einer Retentionszeit von 3.936 und 841.103 und einer

Retentionszeit von 2.477. Bei der Betrachtung des Massenspektrums zu den jeweiligen Retentionszeiten fiel auf, dass in beiden Fällen zwei deutlich kleinere Massen das Hauptfragment bildeten. Daher stellte sich die Frage, ob die hier von der Analysesoftware ermittelten Fragmente nicht sogenannte „in-source“ Fragmente der Hauptfragmente sein könnten. Dazu müssten zwei der kleineren Fragmente zusammen das gleiche  $m/z$  besitzen, wie das hier gefundene größere Fragment, mit dem Unterschied, dass das größere Fragment ein Wasserstoffmolekül mehr besitzt und sein  $m/z$  daher um 1 größer wäre, als die Summe der zwei kleineren Fragmente. Die Analyse zeigte, dass die beiden größeren Fragmente tatsächlich „in-source“ Fragmente von den beiden Hauptkomponenten waren. Bei dem Fragment 873.088 besaß das Hauptfragment ein  $m/z$  von 436.0411 und bei dem Fragment mit der  $m/z$  von 841.103 besaß das Hauptfragment ein  $m/z$  von 420.0462. Bei diesen beiden Fragmenten wurde eine Datenbanksuche unter Abgleich des Ionenfragmentmusters durchgeführt und es konnten in beiden Fällen Substanzen identifiziert werden. Bei 436.0411 handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um Glucoraphanin und bei dem Fragment 420.0462 um Glucoerucin.

Bei dem dritten Marker, der in der Mutante erhöht war, handelte es sich um ein Fragment mit der Retentionszeit von 4.26 und ein  $m/z$  von 408.008. Auch hier bildet dieses Fragment nicht das Hauptfragment. Das Hauptfragment hier besitzt ein  $m/z$  von 422.0255. Es lag die Vermutung nahe, dass diese beiden Fragmente co-eluieren. Für das 408.008 Fragment konnten keine Datenbankeinträge gefunden werden. Allerdings ergab die Suche für das Fragment 422.0255 einen Treffer für Glucoiberin. Auch hier stimmten die theoretischen Fragmentmuster mit den gemessenen überein. Diese 3 Substanzen wurden nun in verschiedenen Replikaten untersucht. Es wurden 2 weitere Experimente mit ebenfalls 6 Wochen alten Erdpflanzen durchgeführt, sowie Pflanzen in Flüssigmedium angezogen. Die für diese nachfolgenden Experimente verwendeten Pflanzen unterschieden sich in einem wesentlichen Punkt von den zuvor analysierten Pflanzen. Es handelte sich bei den eingesetzten Samen um die der Folgegeneration, was massive Auswirkungen auf die gemessenen Glucosinolat Spiegel hatte. Die folgenden Diagramme zeigen die für die 3 Substanzen gemessenen Peakflächen in dem ersten Experiment, einem der Folgeexperimente mit einer jüngeren Samencharge, sowie mit den Pflanzen angezogen in Flüssigmedium, ebenfalls aus der jüngeren Samencharge.

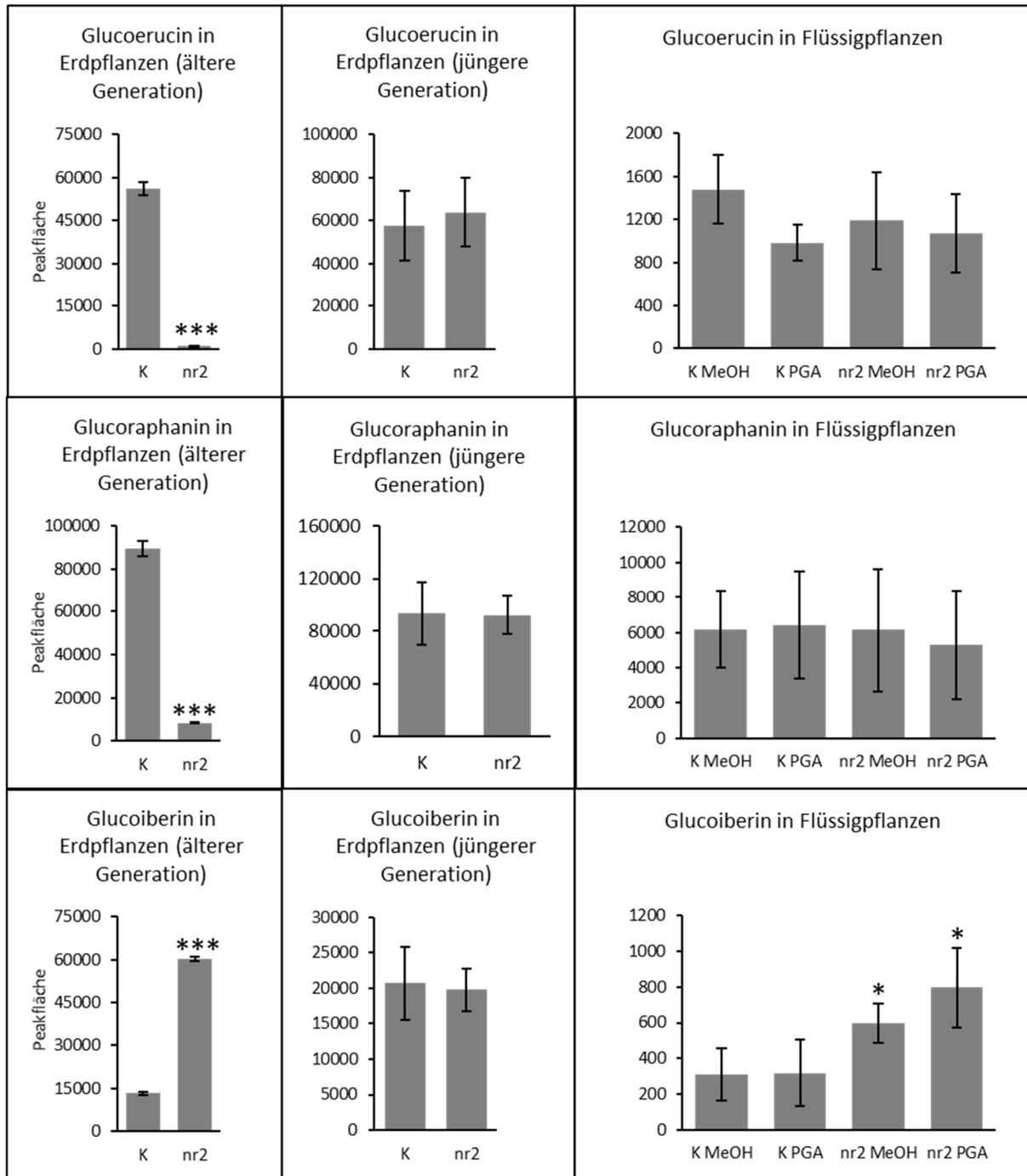


Abb.4.7 Gemessene Peakflächen von Glucoerucin, Glucoraphanin und Glucoiberin im negativen ESI Modus  $\pm$  Standardabweichungen. Untersucht wurden unbehandelte 6 Wochen alte Erdpflanzen aus verschiedenen Generationen, sowie 10 d alte Flüssigpflanzen, die mit PGA oder MeOH für 4 h inkubiert wurden. Untersucht wurde die *GST6::LUC* Kontrolle und die *nr2*. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), dabei wurde die *nr2* mit der jeweils gleichbehandelten Kontrolle verglichen.

In allen Reihen der Abb.4.7 ist ein gleiches Muster zu erkennen. Bei der ersten Messung in der älteren Generation sieht man einen deutlichen Unterschied zwischen Kontrolle und Mutante. Bei der Messung der Glucosinolate in der jüngeren Generation ist dieser Unterschied nicht mehr zu erkennen. Vergleicht man die Werte der Kontrolle bei Glucoraphanin und Glucoerucin bei beiden Messungen fällt

auf, dass sie sich nicht sehr verändert haben, dafür haben sich die Werte der Mutante *nr2* in den jüngeren Generationen denen der Kontrolle angeglichen. Anders verhält es sich bei Glucoiberin hier haben sich die Werte in der Kontrolle, in der jüngeren Generation von rund 13000 auf 20000 erhöht, während sie in der Mutante von rund 60000 auf 20000 gesunken sind. Bei allen Pflanzen, die in Flüssigmedium angezogen wurden, ist auffällig, dass ihre Werte an Glucosinolaten teilweise bis zum 100 fachen niedriger sind als in den Erdpflanzen. Zudem war kein deutlicher Anstieg der Spiegel nach PGA Gabe festzustellen. Auch ein signifikanter Unterschied, in den Flüssigpflanzen, zwischen Mutante und Kontrolle konnte weder bei MeOH noch nach PGA Gabe festgestellt werden. Für diesen Versuchsteil muss festgehalten werden, dass der finale Beweis, dass es sich bei den hier gemessenen Substanzen um Glucosinolate handelt, nicht erbracht wurde. Dazu wären Messungen mit den jeweiligen reinen Glucosinolaten nötig gewesen um anschließend deren Fragmentationsmuster mit dem der hier untersuchten Substanzen zu vergleichen.

Ein weiterer Unterschied, bei der anfangs durchgeführten ungerichteten Metabolomanalyse, konnte zwischen der Mutante *nr1* und der Kontrolle festgestellt werden. Hier war ein Marker in der Mutante mit dem Faktor 2,1 deutlich häufiger vorhanden als in der Kontrolle. Dieser Marker besaß eine Retentionszeit von 9,66 und ein m/z von 173.104. Anhand des Fragmentationsmusters konnte er als Arginin identifiziert werden. Eine vergleichende Messung bei der nur Arginin gemessen wurde brachte dasselbe Fragmentationsmuster zum Vorschein. Da es für die Messung von Arginin eine etablierte gerichtete Messmethode gab, wurde für weitere Messungen diese verwendet. Zusätzlich konnte durch die Zugabe eines internen Standards die genaue Menge an Arginin in den Proben bestimmt werden, was eine Angabe in nmol/mg Frischgewicht ermöglichte. Auch bei diesem Experiment wurden bei der zweiten Messung Erdpflanzen aus der Folgegeneration verwendet.

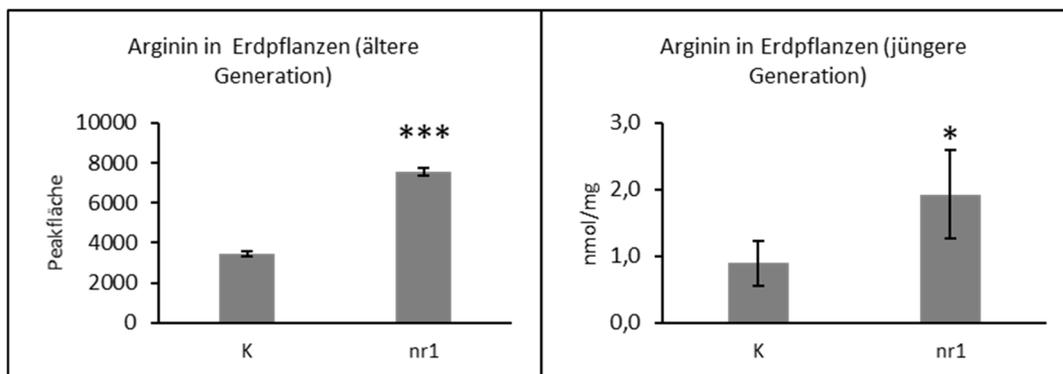


Abb.4.8 Gemessen Peakflächen von Arginin im negativen ESI Modus  $\pm$  Standardabweichungen, sowie Menge an Arginin in einer gerichteten Metabolomanalyse. Getestet wurden unbehandelte 6 Wochen alte Erdpflanzen aus verschiedenen Generationen. Untersucht wurde die *GST6::LUC* Kontrolle und die *nr1*. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Wie man in der Abb.4.8 erkennt, ist hier in beiden Messungen der Argininspiegel in der Mutanten *nr1* deutlich erhöht. Da die den beiden Diagrammen zugrunde liegenden Daten durch zwei völlig verschiedene Probenaufbereitungs- und Messmethoden gewonnen wurden, ist ein direkter Vergleich schwierig. Es zeigte sich jedoch, dass die Menge an Arginin in der ersten Messung um das 2,1 fache höher war als in der Kontrolle und in der zweiten Messung ebenfalls um den Faktor 2,1 höher war. Die Argininspiegel der *nr1* zeigten also, anders als die der Glucosinolate der *nr2*, auch in den Folgenergenerationen einen Unterschied zur Kontrolle

### 4.3.3 Verändert die Mutation die Genexpression?

#### 4.3.3.1 Gewinnung und Auswertung der RNA-Seq Daten

Um nicht nur einen Einblick auf metabolischer Ebene in die Mutanten zu bekommen, sondern auch auf transkriptioneller Ebene, wurde ein RNA Sequenzierungsexperiment durchgeführt. Dafür wurden für jeden Genotyp 6 Wells mit je 10 Pflanzen angelegt und nach 10 d 3 dieser Wells mit 0,5 % MeOH und die anderen Wells mit 75  $\mu$ M PGA für 4 h unter Kurztagsbedingungen inkubiert, anschließend geerntet und die RNA isoliert. Um zu überprüfen ob die Induktion auch funktioniert hat, wurden die Expressionsraten von *GST6* und *TOLB* relativ zu *Aktin* bei allen Proben gemessen. Das *GST6* Gen wurde gewählt, da dessen Promotor zusammen mit dem Luciferase-Gen das Reportersystem bildet. Auch die Wahl von *TOLB* war nicht zufällig. In voran gegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass dieses Gen durch Phytoprostane (RES-Oxylipine) induzierbar war. Um die Ergebnisse dieser qPCR besser darstellen zu können, wurde aus den 3 jeweils gleich behandelten Replikaten der Mittelwert gebildet; dieser ist in Abb.4.9 aufgetragen.

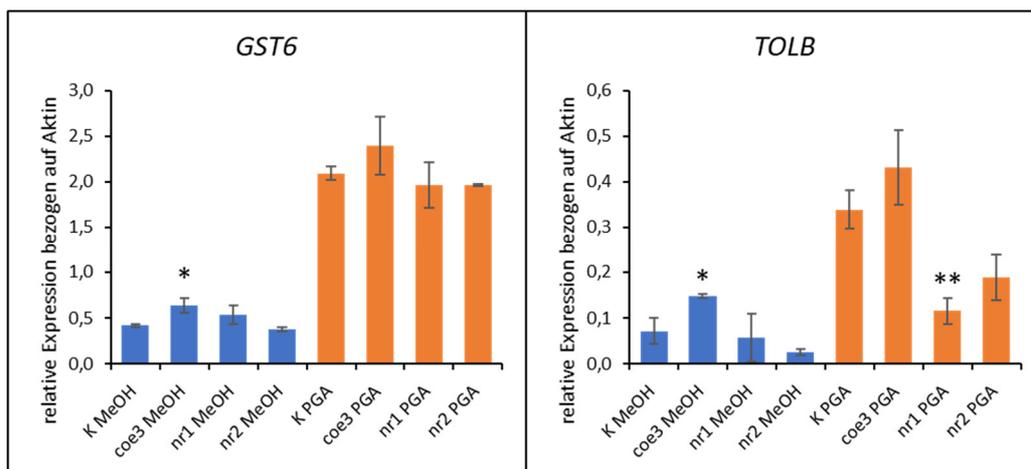


Abb.4.9 Relative Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen von *GST6* sowie *TOLB* in 10 d alten Keimlingen 4 h inkubiert mit 0,5 % MeOH oder 75  $\mu$ M PGA. Mittelwerte aus je 3 Replikaten gebildet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen der Mutanten verglichen mit der entsprechenden Probe der Kontrolllinie (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Wie man gut erkennen kann, war die Expression der mit MeOH behandelten *coe3* Proben sowohl bei *GST6* als auch bei *TOLB* höher als bei den gleich behandelten *GST6::LUC* Proben. Dies passt sehr gut zum beobachteten Luciferase-Phänotyp. Des Weiteren war bei allen Proben eine starke Induktion der Genexpression nach PGA Gabe festzustellen. Bei der *coe3* und der *GST6::LUC* fiel diese am stärksten aus, wobei sie bei der *coe3* noch etwas ausgeprägter war, als bei der *GST6::LUC*. Eine leicht schwächere Induktion des *GST6* Gens zeigten die *nr1* und die *nr2*. Diese war noch deutlicher bei der Expression des *TOLB* Gens festzustellen, wobei hier die *nr2* höhere Transkriptmengen aufwies als die *nr1*. Da nur für 12 Proben auf dem Sequenzierungschip Platz war, konnten nicht von allen Proben 2 Replikate gemessen werden. Folgende Auswahl wurde daher getroffen: es wurden die 3 jeweils gleichbehandelten Replikate anhand ihrer Expression des *GST6* Gens verglichen und, wie im Folgenden beschrieben, ausgewählt. Von den mit MeOH behandelten Pflanzen wurden von den *GST6::LUC* Pflanzen 1 Replikat mit einer durchschnittlichen Expression ausgewählt, von der *coe3* 2 Replikate mit der höchsten und von der *nr1* und *nr2* je 1 Replikat mit der niedrigsten Expressionsrate. Für die mit PGA behandelten Pflanzen wurden von der *GST6::LUC* 2 Replikate mit der höchsten Expressionsrate ausgewählt, von der *coe3* 1 Replikat mit der höchsten und für die *nr1* und *nr2* jeweils 2 Replikate mit der niedrigsten Expression des *GST6* Gens. Diese Proben wurden wie unter Punkt 3.18 erläutert für die RNA Sequenzierung vorbereitet und am Lehrstuhl für Entwicklungsbiochemie der Universität Würzburg gemessen. Die erhaltenen Daten konnten dann mittels R ausgewertet werden. Für eine bessere Visualisierung der großen Datenmengen wurden die Gene, die sich zwischen Mutante und Kontrolle bei den MeOH behandelten Keimlingen unterschieden, sowie die nach PGA Behandlung unterschiedlichen Gene in MapMan 3.6.0 (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Golm) eingelesen. Das Programm sortiert die Gene entsprechend ihrer bereits bekannten oder putativen Annotierung einem Signal- oder Syntheseweg zu. Da eine Verbindung der RES-Oxylipine zu Stressreaktionen nahe liegt, wurde hier der Signalweg für biotischen Stress abgebildet. Für die *coe3* zeigte sich, dass bereits unter nicht induzierenden Bedingungen eine Vielzahl an Zellwand assoziierten Genen runterreguliert war. Dies ist besonders interessant, da bei Mueller et al., 2008 Zellwand assoziierte Gene nach der Behandlung mit einem anderen RES-Oxylipin, Phytoprostan A<sub>1</sub>, runterreguliert waren. Bei der *nr1* waren nach PGA Behandlung sehr viele Gene unterschiedlich reguliert, jedoch nur sehr wenige davon wirklich stark. Besonders auffällig haben sich hier die *PR*-Gene gezeigt, da hier einige Gene, in ihrer Expression, deutlich runterreguliert waren. Bei der *nr2* zeigten sich nur wenige Gene nach PGA unterschiedlich reguliert und Überraschender Weise waren die Gene die einen deutlichen Unterschied aufwiesen in der Mutante deutlich stärker exprimiert als in der Kontrolle.

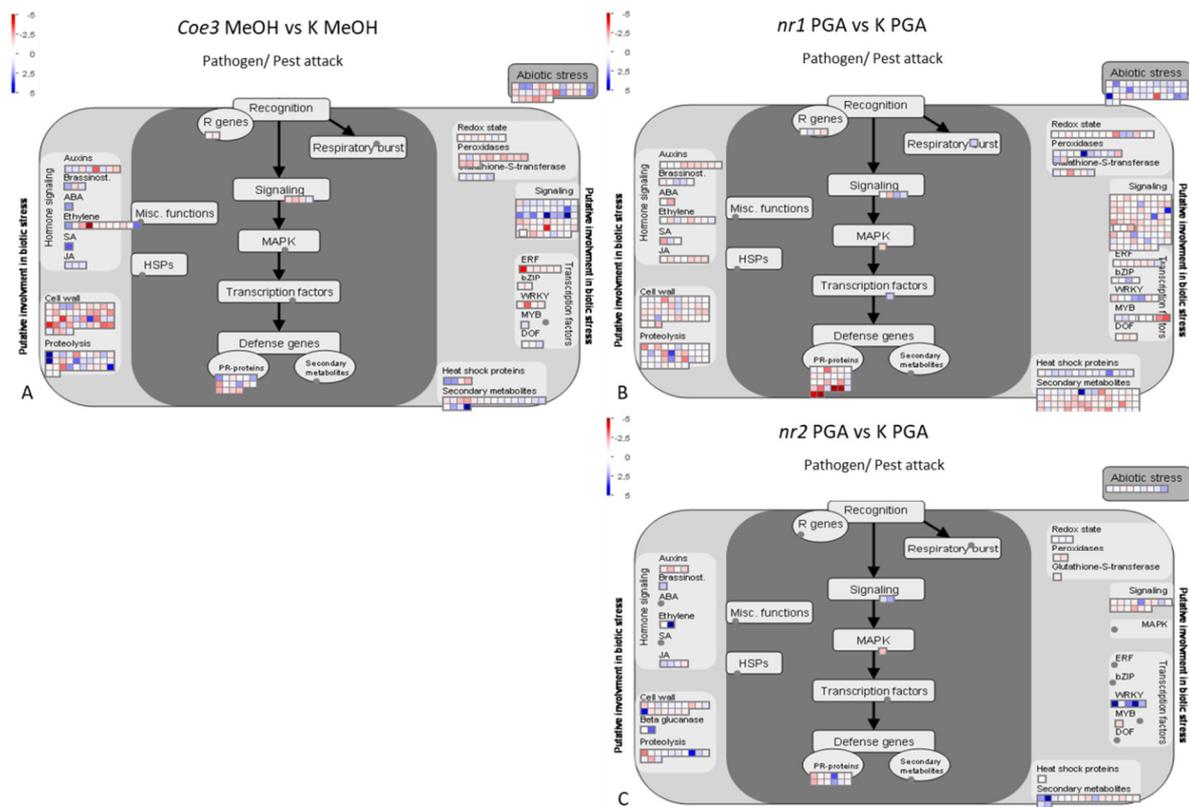


Abb.4.10 Darstellung des Signalwegs für biotischen Stress aus MapMan 3.6.0. Die Gene wurden von MapMan automatisch, entsprechend ihrer bisher bekannten oder vermuteten Funktion in die entsprechenden Untergruppen einsortiert. Jedes Kästchen repräsentiert ein Gen. Je stärker die Blaufärbung desto höher ist es in der Mutante exprimiert, verglichen mit der Kontrolle. Je stärker die Rotfärbung desto geringer sind die Gene in der Mutante exprimiert. Gene deren Werte über die angegebene Farbskala (links oben in jedem Bild) hinausgehen werden dunkelrot bis dunkelblau abgebildet. Die Farbskala reicht von -5 (rot) bis +5 (blau) und bezieht sich auf den logarithmischen n-fachen Unterschied, der Genexpression, zwischen Mutanten und Kontrolle. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* Linie verwendet. Verglichen wurden die Genexpressionen von *coe3* und *GST6::LUC* (A) nach MeOH Behandlung. Von den 901 unterschiedlich regulierten Genen sind in diesem Signalweg 274 abgebildet. Bild B zeigt die Genexpressionen von *nr1* und *GST6::LUC* nach PGA Behandlung hier sind 413 von 1227 Genen abgebildet. Der Vergleich von *nr2* und *GST6::LUC* nach PGA Behandlung ist in C zu sehen. Hier waren insgesamt 311 Gene unterschiedlich reguliert von denen 112 abgebildet sind.

Durch die Darstellung in Abb.4.10 sind nicht alle Gene abgebildet, die eine unterschiedliche Expression zur Kontrolle aufweisen. Zudem ist eine vergleichende Darstellung aller 3 Mutanten und möglicher Überschneidungen von Genen, die in allen Mutanten anders reguliert werden (verglichen mit der Kontrolle), nicht möglich. Dafür eignet sich die Darstellung mittels Venn-Diagramm besser. Um die Darstellung möglichst übersichtlich zu halten wurde unterteilt in Gene, die bei MeOH Behandlung unterschiedlich reguliert waren und welche sich nach PGA Behandlung unterschieden. Es wurde jedoch keine Unterscheidung zwischen hoch- und runterregulierten Genen getroffen. Da bei der bioinformatischen Auswertung sehr viele Gene einen Unterschied zwischen Mutante und Kontrolle

zeigten, wurden zur weiteren Eingrenzung nur die Gene in das Diagramm aufgenommen, die sich in ihrer logarithmischen Expressionsrate mindestens um den Faktor 2 unterschieden.

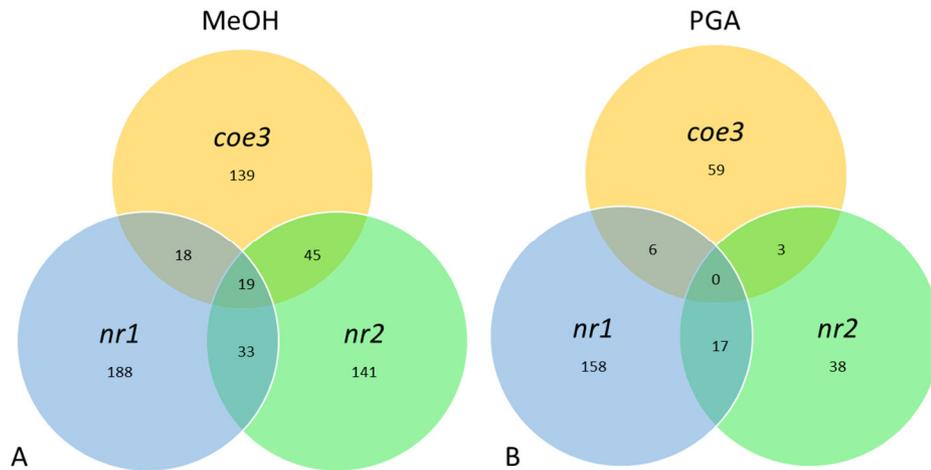


Abb.4.11 Venn-Diagramm der Gene die im RNA-Sequenzierungsexperiment einen logarithmischen Expressionsunterschied von mindestens 2 verglichen zur *GST6::LUC* Kontrolle aufwiesen. Es wurde dabei nicht zwischen Hoch- oder Runterregulation unterschieden. Allerdings wurde in Gene unterteilt, die sich bei den MeOH behandelten Pflanzen (A) und nach Behandlung mit 75  $\mu$ M PGA (B) unterschieden.

Die beiden Venn-Diagramme aus Abb.4.11 veranschaulichen recht gut was man durch das RNA-Seq über die Mutanten erfahren hat. Zum einen unterschieden sich die Mutanten bereits ohne Induktion (A) stark von der Ausgangslinie (*GST6::LUC*). Mehr als 100 Gene waren in jeder Mutante unterschiedlich exprimiert. Zudem gab es eine recht hohe Anzahl an Überschneidungen bei jeweils 2 der Mutanten miteinander. Versucht man dies in Relation zu den bisher beschriebenen Phänotypen zu setzen, ist dieses Ergebnis durchaus nachvollziehbar. So zeigte die *nr1* bereits ohne Stresseinwirkung Wachstumsunterschiede und besaß auch hier im RNA-Seq mit 188 Genen den größten Unterschied zur Kontrolle. Auch die recht hohe Anzahl an Überschneidungen mit der *nr2* (33) war nicht verwunderlich, da sich der Unterschied der beiden nicht responsiven Mutanten erst nach PGA-Induktion zeigte. Dass der Unterschied zur *coe3* (18) geringer war als zur *nr2* scheint ebenfalls plausibel, da die *coe3* basal bereits ein Leuchten aufwies, welches der *nr1* fehlte. Überraschend war der recht große Unterschied der *nr2* (141) zur Kontrolle, da die *nr2* bisher keinen sichtbaren Unterschied im Wachstum oder Leuchten, unter nicht induzierenden Bedingungen, gezeigt hatte. Auch die Überschneidung mit der *coe3* von 45 Genen war unerwartet. Generell zeigt sich, dass die Mutanten bei den MeOH Behandlungen auf Genexpressionsebene noch recht ähnlich waren (siehe Überlappungen). Anders verhielt es sich nämlich nach der PGA Behandlung. Hier gab es keinerlei Überschneidung von allen 3 Mutanten miteinander und nur sehr wenige mit der *coe3* und den beiden nicht responsiven Mutanten, sowie wenige zwischen beiden nicht responsiven untereinander. Betrachtet man zunächst die *coe3* zeigte sich, dass die Menge an Genen, die sich zwischen Mutante und Kontrolle unterschieden, deutlich

reduziert war. Dies passte gut zum Luciferase-Phänotyp, da beide nach PGA Induktion stark leuchteten. Aber auch bei der *nr1* war ein geringer Rückgang an unterschiedlich exprimierten Genen festzustellen, da auch die *nr1* ein abgeschwächtes Leuchten zeigte. Überraschend war hier wieder die *nr2*, bei der sich nur sehr wenige Gene (38) von der Kontrolle unterschieden, obwohl sie kaum Leuchten zeigte. Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass sich die Mutanten nach PGA Induktion stärker voneinander unterschieden als vorher, jedoch war der Unterschied der einzelnen Mutanten *coe3* und *nr2*, zur Kontrolle, unter nicht induzierenden Bedingungen deutlich größer als nach der Induktion. Einzig die *nr1* unterschied sich sowohl unter nicht induzierten als auch unter induzierten Bedingungen deutlich von der Kontrolle.

#### 4.3.3.2 Überprüfung der RNA-Seq Ergebnisse mittels qPCR

Anhand der aus dem RNA-Seq gewonnenen Informationen wurden Gene ausgewählt, die in den Mutanten deutlich höher oder niedriger exprimiert wurden und mittels qPCR deren Expression untersucht. Dazu wurden Pflanzen nach dem gleichen Schema wie beim RNA-Seq angezogen und mit 75 µM PGA oder MeOH behandelt. Die ATG-Nummern und verwendeten Namen aller so näher untersuchten Gene sind in Tab.4.1 aufgelistet.

Tab.4.1 ATG Nummern mit zugehörigen Gennamen, sowie deren Regulation verglichen mit der *GST6::LUC* Kontrolle und ob diese Regulation in Flüssigpflanzen auch durch qPCR in weiteren Replikaten zu finden war

ATG Nummer	Gename	Regulation laut RNA-Seq in	Tendenz in qPCR bei Flüssigpflanzen
AT2G47180	<i>GOLS1</i>	<i>coe3</i> nach PGA höher	ja
AT5G59310	<i>LTPIV.4</i>	<i>nr2</i> nach MeOH niedriger	nein
AT1G17180	<i>GSTU25</i>	<i>coe3</i> nach MeOH höher	nein
AT1G15520	<i>PDR12</i>	<i>coe3</i> nach MeOH niedriger	nein
AT1G10585	<i>TF10585</i>	<i>nr1</i> nach PGA niedriger	ja
AT2G29460	<i>GST22</i>	<i>nr1</i> und <i>nr2</i> nach PGA niedriger	für <i>nr1</i> ja, <i>nr2</i> nein
AT2G14610	<i>PR1</i>	<i>nr2</i> nach MeOH und PGA höher	ja
AT1G76680	<i>OPR1</i>	<i>nr2</i> nach MeOH niedriger	nein

Zudem gibt die Tabelle Auskunft darüber, ob die im RNA-Seq beobachtete Genregulation auch in den darauffolgenden Experimenten zu beobachteten waren oder nicht. Bei 4 von 9 der hier gezeigten Gene konnte die Tendenz, die sich bereits im RNA-Seq abgezeichnet hatte, bestätigt werden, auch wenn der Faktor um den die Regulation, laut RNA-Seq, höher oder niedriger sein sollte bei weitem nicht erreicht werden konnte. Bei den anderen 3 Genen war die Genexpression entgegengesetzt dem was man laut den Sequenzierergebnissen erwartet hätte. Für jeden dieser beiden Fälle ist je ein Beispiel im Folgenden abgebildet. Dabei sollte man aber berücksichtigen, dass viele der Gene eine sehr geringe Expressionsrate aufweisen (wie das hier gezeigte *PDR12*) dies führt dazu, dass kleinste biologische Schwankungen bereits zu großen Standardabweichungen führen.

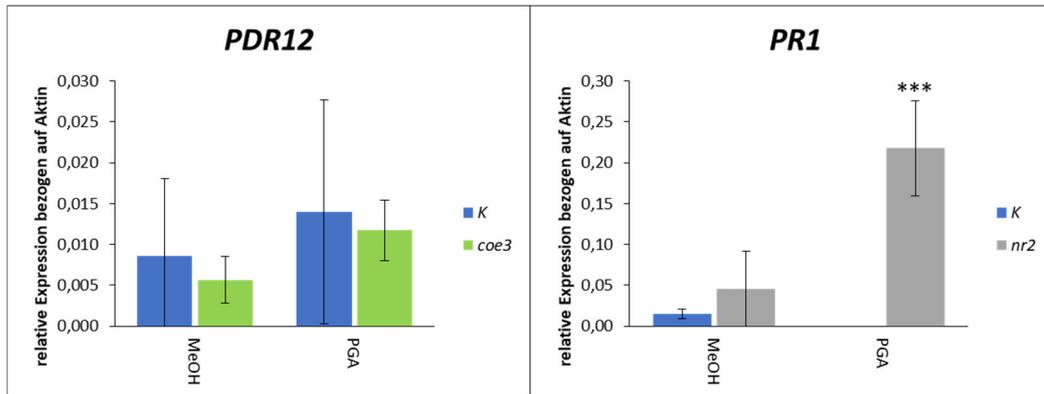


Abb.4.12 Mittelwerte der relativen Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *Aktin*, von *PR1*, sowie *PDR12* in 10 d alten Keimlingen 4 h inkubiert mit 75  $\mu$ M PGA (orange) bzw. 0,5 % MeOH (blau). Es wurden je 3 biologische Replikate gemessen, als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen den 2 Genotypen: *GST6::LUC*, *nr2*, bzw. *coe3* nach MeOH bzw. PGA Behandlung. (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Bei *PR1* war es nicht möglich Transkripte in der PGA behandelten Kontrolle nachzuweisen.

#### 4.3.4 Wie reagieren die Mutanten auf andere RES-Oxylipine

Es sollte untersucht werden ob die Reaktion der Mutanten auf endogene RES-Oxylipine ähnlich verändert ist wie auf PGA. Zunächst wurde die Luciferase-Aktivität untersucht. Dazu wurden je 10 Keimlinge in jeder Vertiefung einer 24 Well Platte angezogen und mit verschiedenen RES-Oxylipinen behandelt. Nach einer 1 h Inkubation im Licht wurde über mehrere Stunden hinweg die Luciferase-Aktivität gemessen. Die getesteten Substanzen waren: OPDA, Hexenal ein flüchtiges RES-Oxylin, sowie MeOH als Lösungsmittel-Kontrolle.

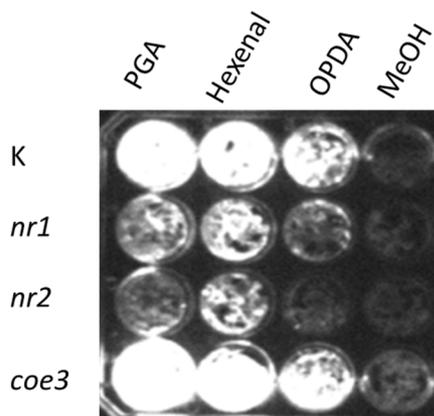


Abb.4.13 Luciferase-Aktivität von Keimlingen der Mutanten 8 h nach Behandlung mit 75  $\mu$ M PGA, 1,5 mM Hexenal, 75  $\mu$ M OPDA bzw. 0,5 % MeOH. Keimlinge wurden 10 d in Flüssigmedium angezogen, als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* Linie verwendet.

Das Bild in Abb.4.13 wurde 8 h nach der Behandlung der Keimlinge aufgenommen. Wie bereits bekannt zeigte die *coe3* eine erhöhte Luciferase-Aktivität unter nicht induzierenden Bedingungen (hier 0,5 % MeOH). Nach Induktion mit 75  $\mu$ M PGA konnte bei der Kontrolle und bei der *coe3* eine starke

Leuchtreaktion wahrgenommen werden. Bei der *nr1* fiel diese deutlich schwächer aus und bei der *nr2* war sie weiter reduziert. Die Behandlung mit 1,5 mM Hexenal sorgte ebenfalls für eine starke Aktivität bei der *GST6::LUC* und *coe3*, diese war vergleichbar mit der nach PGA. Die beiden nicht responsiven Pflanzen leuchteten nach Hexenal-Behandlung deutlich stärker als nach PGA Behandlung, aber immer noch schwächer als die *coe3* oder die *GST6::LUC* Linie. Die eingesetzten 75  $\mu$ M OPDA waren nicht in der Lage eine Luciferase-Reaktion hervorzurufen, die vergleichbar war mit PGA oder Hexenal. Zwar zeigten auch hier die *GST6::LUC* und *coe3* erhöhtes Leuchten doch deutlich geringer als bei den beiden anderen Substanzen. Bei der *nr1* war die Aktivität gerade noch zu erkennen, während die *nr2* Mutante in ihrer Aktivität nicht von der der MeOH Kontrolle zu unterscheiden war.

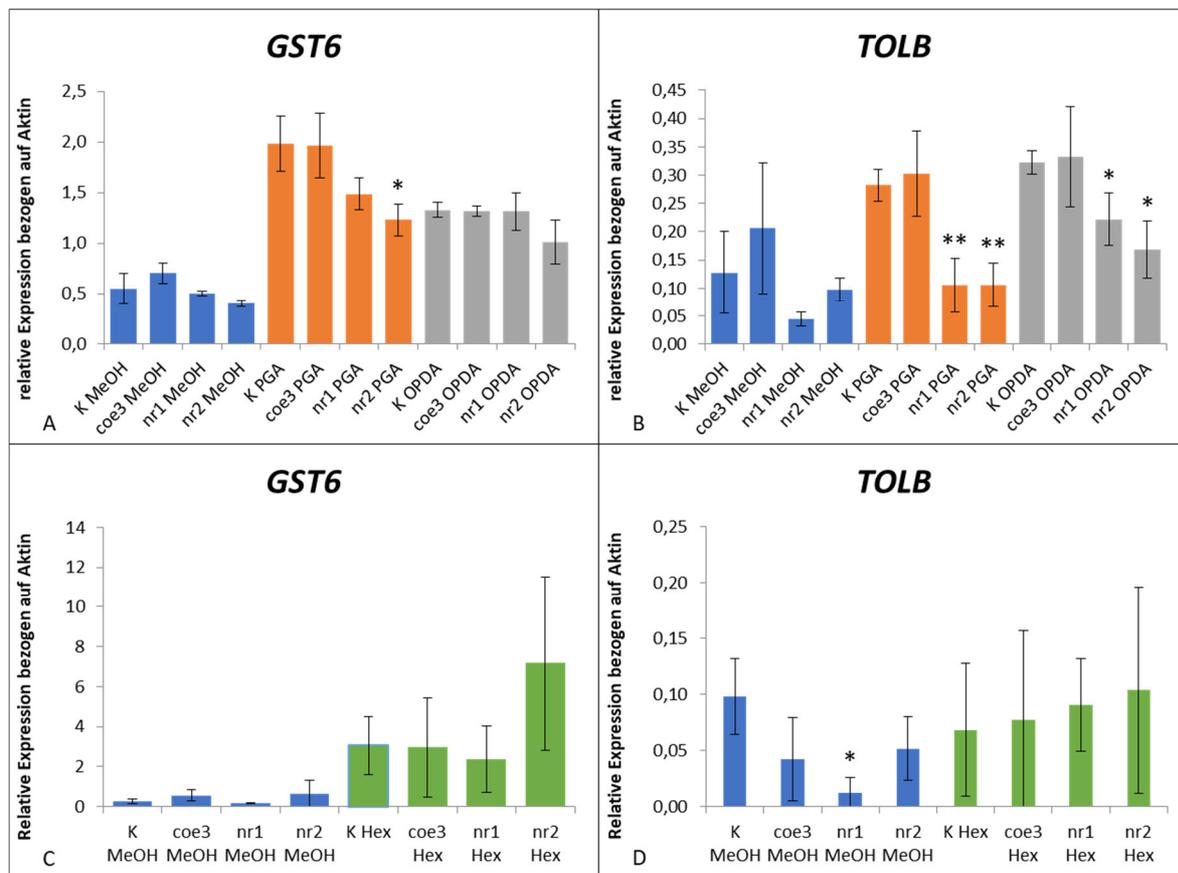


Abb.4.14 Mittelwerte der relativen Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *Aktin*, von *GST6*, sowie *TOLB* in 10 d alten Keimlingen 4 h inkubiert mit 75  $\mu$ M PGA (orange), 75  $\mu$ M OPDA (grau), 1,5 mM Hexenal (grün), bzw. 0,5 % MeOH (blau). Es wurden je 3 biologische Replikate gemessen als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen der Mutanten verglichen mit der entsprechenden Probe der Kontrolllinie (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Tab.4.2 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Behandlung mit RES-Oxylipinen zur jeweiligen MeOH Behandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.14 (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt, um den die Expression erhöht oder erniedrigt ist verglichen mit der MeOH Kontrolle des jeweiligen Genotyps.

	GST6						TOLB					
	GST6::LUC PGA		GST6::LUC OPDA		GST6::LUC Hex		GST6::LUC PGA		GST6::LUC OPDA		GST6::LUC Hex	
GST6::LUC MeOH	**	3,6	**	2,4	*	12,5	*	2,2	*	2,5		0,7
	coe3 PGA		coe3 OPDA		coe3 Hex		coe3 PGA		coe3 OPDA		coe3 Hex	
coe3 MeOH	**	2,8	**	1,9		5,4		1,5		1,6		1,8
	nr1 PGA		nr1 OPDA		nr1 Hex		nr1 PGA		nr1 OPDA		nr1 Hex	
nr1 MeOH	***	2,9	**	2,6		15,7		2,3	*	4,9	*	7,4
	nr2 PGA		nr2 OPDA		nr2 Hex		nr2 PGA		nr2 OPDA		nr2 Hex	
nr2 MeOH	**	3,1	*	2,5		11,7		1,1		1,7		2,0

Es wurde ebenfalls die Expression von zwei Oxylipin-responsiven Genen nach OPDA und Hexenal mit PGA verglichen. Die qPCR Ergebnisse spiegeln den gleichen Trend wieder, den auch das Luciferase-Experiment gezeigt hat. Zum einen zeigte sich, was bereits vor dem RNA-Seq Experiment gezeigt werden konnte: die Behandlung mit PGA führte zu einem deutlichen Anstieg der Genexpression von *GST6* und *TOLB*. Bei *GST6* war dieser Anstieg bei allen Mutanten signifikant, verglichen mit der jeweiligen MeOH Behandlung. Innerhalb der PGA behandelten Pflanzen unterschied sich nur die *nr2* signifikant von der Kontrolle. Bei *TOLB* war zwar ebenfalls bei allen Genotypen ein deutlicher Anstieg der Genexpression zu verzeichnen. Dieser war, aufgrund der großen Standardabweichungen, jedoch nur für die Kontrolllinie signifikant. Innerhalb der PGA behandelten Pflanzen zeigte sich hier allerdings, dass sich beide nicht responsiven Mutanten signifikant von der Kontrolle unterschieden. Zum anderen zeigte die Behandlung mit endogenen RES-Oxylipinen ebenfalls einen deutlichen Anstieg in der Genexpression bei beiden betrachteten Genen. Für OPDA war der Anstieg der Expressionslevel von *GST6* etwas geringer als bei PGA, unterschied sich aber ebenfalls bei allen Mutanten signifikant, verglichen mit der jeweiligen MeOH Behandlung. Innerhalb der OPDA behandelten Pflanzen konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Bei *TOLB* war der Anstieg der Genexpression sogar leicht höher als bei der PGA Behandlung, unterschied sich aber nur leicht signifikant bei der Kontrolle und der *nr1*, verglichen mit MeOH. Dafür konnte hier, innerhalb der OPDA behandelten Pflanzen, ein signifikanter Unterscheid zwischen der Kontrolle und den beiden nicht responsiven Mutanten festgestellt werden. Die Wirkung von Hexenal auf die Genexpression wurde in einem getrennten Experimentieransatz durchgeführt, weshalb ein direkter Vergleich mit der Induktion durch PGA und OPDA schwieriger war. Ein Blick auf die Expressionslevel der MeOH behandelten Pflanzen zeigte jedoch, dass sich deren Spiegel auf ähnlichem Niveau bewegten, wie die MeOH behandelten aus dem ersten Ansatz. Auch bei einer Hexenal Behandlung kam es zu einem deutlichen Anstieg der *GST6* Genexpression. Dieser war bei *GST6* sogar noch stärker als bei PGA oder OPDA. Bei *TOLB* war der Anstieg dafür deutlich weniger stark ausgeprägt als bei PGA und OPDA und bei dem direkten Vergleich der *GST6::LUC* MeOH Behandlung mit der Hexenal Behandlung zeigte sich sogar ein leichter Rückgang

der Expressionslevel. Aufgrund der starken Standardabweichungen konnten nur schwach signifikante Unterschiede des *GST6* Gens bei MeOH Behandlung und Hexenal Behandlung festgestellt werden, sowie beim *TOLB* Gen für die *nr1* Mutante. Allgemein lässt sich sagen, dass die Mutanten durch einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Aktivität auf die Gabe von OPDA und Hexenal reagierten, wobei die Reaktion auf Hexenal stärker ausgeprägt war als die auf OPDA. Dies spiegelte sich auch in den Transkriptmengen des *GST6* Gens wieder, welche am stärksten nach Hexenal Behandlung anstiegen, gefolgt von PGA und OPDA. Allerdings muss deutlich hervorgehoben werden, dass die Konzentration an Hexenal deutlich höher war als die von OPDA. Bei *TOLB* war der stärkste Anstieg nach OPDA und PGA Behandlung zu messen gefolgt von Hexenal.

### 4.3.5 Wie reagieren die Mutanten auf RES

Eine weitere Fragestellung, die es zu untersuchen galt war, ob die Induktion der Luciferase-Aktivität auf RES-Oxylipine beschränkt war oder ob es möglich war, sie auch durch RES zu induzieren. Eine Stoffgruppe, die RES enthalten, tauchten bereits bei der metabolischen Untersuchung der Mutanten auf: die Glucosinolate. Es wurde untersucht, ob sich die Mutanten in ihrer Reaktion nach Exposition mit den enzymatischen Abbauprodukten der Glucosinolate unterschieden. Dazu wurden 2 Isothiocyanate gewählt: zum einen Sulforaphan, welches durch die enzymatische Spaltung von Glucoraphanin entsteht, zum anderen Benzylisothiocyanat (BITC), welches bei der Spaltung von Glucotropaeolin gebildet wird. Beide Isothiocyanate sind reaktive elektrophile Spezies wobei BITC ein stärkeres RES darstellt als Sulforaphan. Die 10 Tage alten Keimlinge wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an BITC sowie 100  $\mu\text{M}$  Sulforaphan behandelt, als Positivkontrolle und Referenz dienten 75  $\mu\text{M}$  PGA. Anschließend wurde ihre Luciferase-Aktivität über 12 h hinweg aufgezeichnet. Die Abb.4.15 zeigt die Keimlinge 6 h nach der Exposition mit den RES. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da hier PGA sein Maximum an Luciferase-Induktion erreichte. Es wurden alle Mutanten auf ihre Luciferase-Aktivität hin überprüft, um zu testen, ob der beobachtete Luciferase-Phänotyp nur bei Exposition mit RES-Oxylipinen auftrat oder auch nach Kontakt mit RES detektiert werden konnte.

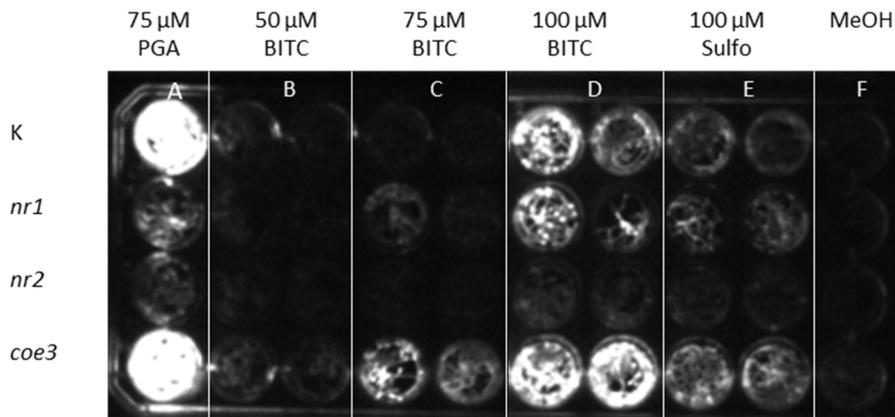


Abb.4.15 Luciferase-Aktivität von je 10 Keimlingen der 4 Genotypen 6 h nach 75 µM PGA (A), 50 µM BITC (B), 75 µM BITC (C), 100 µM BITC (D), 100 µM Sulforaphan (E) bzw. 0,5 % MeOH (F) Gabe. Keimlinge wurden 10 d in Flüssigmedium angezogen, als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* Linie verwendet. Die Belichtungszeit betrug 10 Minuten.

Betrachtet man zunächst die beiden Kontrollbehandlungen PGA (A) und MeOH (F) kann man die bereits beobachteten Phänotypen wieder finden, was für die Robustheit dieser spricht. Bei der MeOH Behandlung kann man bei der *coe3* eine ganz schwache aber dennoch erhöhte Luciferase-Aktivität im Vergleich zu den 3 anderen Genotypen feststellen. Bei der PGA Behandlung zeigt sich, dass die *nr1* schwächer reagiert während die *nr2* eine noch geringere Luciferase-Aktivität besitzt. Bei der Behandlung mit 50 µM BITC war keine Luciferase-Aktivität festzustellen. Bis auf die *coe3*, deren erhöhte Luciferase-Aktivität konnte durchaus auf ihre basal erhöhte Aktivität zurückgeführt werden. Nach Zugabe von 75 µM BITC war bei der *coe3* bereits eine deutliche Zunahme an Luciferase-Aktivität zu verzeichnen auch bei der *nr1* konnte leichte Aktivität gemessen werden, bei der *nr2* und der *GST6::LUC* hingegen war keinerlei Luciferase-Reaktion zu erkennen. Die *GST6::LUC* und die *nr2* zeigten erst ab 100 µM BITC klare Luciferase-Aktivität. Bei allen 4 Mutanten konnte hier eine Luciferase-Aktivität festgestellt werden, die beobachtete Aktivität entsprach von ihrem Muster her der nach PGA Behandlung, allerdings war die Intensität deutlich abgeschwächt. Die *coe3* leuchtete am stärksten gefolgt von der Kontrolle und der *nr1*, die geringste Leuchtaktivität besaß die *nr2*. Auch die Zugabe von 100 µM Sulforaphan zu den Pflanzen bewirkte eine Induktion der Luciferase-Aktivität. Diese war allerdings deutlich schwächer als die nach PGA und immer noch schwächer, als die nach BITC gemessene Aktivität. Aber auch hier ließ sich erkennen, dass die *coe3* am stärksten leuchtet und die *nr2* am schwächsten.

Da im obigen Experiment bei 100 µM BITC und Sulforaphan die stärkste Leuchtaktivität gemessen werden konnte, wurden 10 Keimlinge, die mit eben jenen Konzentrationen für 4 h inkubiert worden waren, isoliert und mittels qPCR die Expression der Gene *GST6* und *TOLB* näher untersucht.

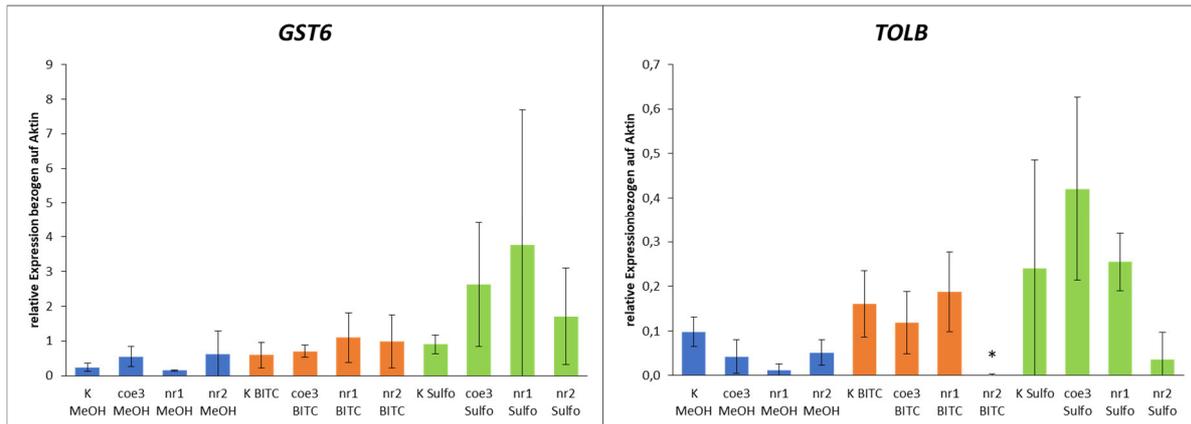


Abb.4.16 Mittelwerte der relativen Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *Aktin*, von *GST6*, sowie *TOLB* in 10 d alten Keimlingen 4 h inkubiert mit 100  $\mu$ M BITC (orange), 100  $\mu$ M Sulforaphan (grau) bzw. 0,5 % MeOH (blau). Es wurden je 3 biologische Replikate gemessen als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen den 4 Genotypen: *GST6::LUC*, *coe3*, *nr1* und *nr2* nach MeOH, BITC, bzw. Sulforaphan Behandlung (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Tab.4.3 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Behandlung mit RES zur jeweiligen MeOH Behandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.16 (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt um den die Expression erhöht oder erniedrigt ist verglichen mit der MeOH Kontrolle des jeweiligen Genotyps.

	<i>GST6</i>		<i>TOLB</i>	
	<i>GST6::LUC</i> BITC	<i>GST6::LUC</i> Sulfo	<i>GST6::LUC</i> BITC	<i>GST6::LUC</i> Sulfo
<i>GST6::LUC</i> MeOH	2,4	* 3,7	1,6	2,5
<i>coe3</i> MeOH	<i>coe3</i> BITC	<i>coe3</i> Sulfo	<i>coe3</i> BITC	<i>coe3</i> Sulfo
	1,3	4,8	2,8	* 9,9
<i>nr1</i> MeOH	<i>nr1</i> BITC	<i>nr1</i> Sulfo	<i>nr1</i> BITC	<i>nr1</i> Sulfo
	7,2	24,8	* 15,3	** 20,8
<i>nr2</i> MeOH	<i>nr2</i> BITC	<i>nr2</i> Sulfo	<i>nr2</i> BITC	<i>nr2</i> Sulfo
	1,6	2,8	* 0,04	0,7

Wie man in Abb.4.16 erkennen kann, sind bei allen 3 Genen die Expressionsraten in den mit MeOH behandelten Pflanzen sehr niedrig und steigen im Mittel nach der Behandlung mit BITC oder Sulforaphan an. Beim *GST6* Gen ist dieser Anstieg nach BITC Behandlung extrem gering obwohl die Luciferase-Aktivität deutlich gemessen werden konnte. Nach der Behandlung mit Sulforaphan ist diese Expressionsrate sogar noch höher obwohl eine niedrigere Luciferase-Aktivität gemessen wurde. Es fällt jedoch auf, dass bei der Behandlung mit Sulforaphan bei allen Mutanten sehr große Standardabweichungen aufgetreten sind, was eine genaue Aussage sehr schwierig macht. Bei *TOLB* zeigte nach BITC Behandlung die *nr1* die größte Expressionsrate, allerdings mit sehr großen Standardabweichungen, gefolgt von *GST6::LUC* und *coe3* welche fast gleich stark exprimiert wurden. Die geringste Expression wies die *nr2* Mutante auf. Nach der Behandlung mit Sulforaphan sah dies jedoch anders aus. Auch hier gab es zwar große Standardabweichungen, die Tendenz deutete allerdings darauf hin, dass hier die *coe3* die stärkste Expressionsrate aufwies gefolgt von *nr1* und *GST6::LUC*. Die niedrigste Expression zeigte *nr2*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit RES in beiden Fällen zu einer Zunahme der Luciferase-Aktivität führte. Diese fiel jedoch deutlich, trotz größerer Mengen, schwächer aus als bei PGA. Auch auf Genexpressionsebene stieg die Transkriprate deutlich an, hier sogar stärker durch Sulforaphan als durch BITC. Was sich genau umgekehrt zur beobachteten Luciferase-Induktion verhielt.

#### 4.4 Reaktionen auf abiotischen Stress

##### 4.4.1 Verwundung

RES-Oxylipine werden, genau wie Jasmonate, verstärkt nach Verwundung gebildet (Imbusch and Mueller, 2000). Dies bedeutet für die *GT6::LUC* Linie eine erhöhte Luciferaseaktivität nach Verwundung. Genau diese Reaktion sollte auch bei den 3 Mutanten untersucht werden. Dazu wurden 6 Wochen alte Erdpflanzen mit einer Pinzette an mehreren Stellen eines Blattes über die Blattmittelrippe verwundet und anschließend unter der Luciferase-Kamera beobachtet.

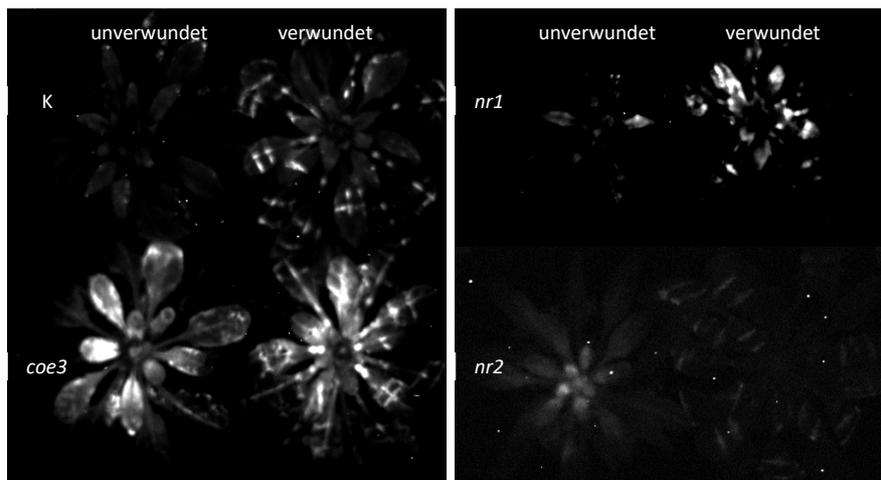


Abb.4.17 6 Wochen alte Erdpflanzen unverwundet bzw. nach Verwundung mit einer Pinzette 2 x pro Blatt quer über die Blattmittelrippe. Aufnahme direkt nach der Verwundung, Belichtungszeit 10 Minuten. Als Kontrolle (K) wurde die *GST6::LUC* verwendet.

Bei den unverwundeten Pflanzen kann man sehr gut erkennen, dass bereits ohne äußere Einwirkung die *coe3* deutlich stärker leuchtet als die Kontrolllinie oder die anderen beiden Mutanten. Nach der Verwundung der Blätter konnte man deutlich erkennen, wie die Leuchtintensität der Pflanzen *GST6::LUC*, *coe3* und *nr1* stark anstieg. Vor allem natürlich im Bereich der verwundeten Stellen aber auch in der gesamten Pflanze. Bei der *nr2* ist ebenfalls ein Leuchten bei der unverwundeten Pflanze zu erkennen. Dies liegt jedoch an den sensibler eingestellten Farbkontrasten. Damit war es möglich an den verwundeten Stellen ebenfalls ein Leuchten zu detektieren allerdings deutlich schwächer als bei

den anderen Mutanten. Wie erwartet sorgte eine Verwundung für einen deutlichen Anstieg der Luciferase-Aktivität. Zusätzlich unterstützt dieses Ergebnis, dass das Luciferase-Gen in *coe3* und *nr1* intakt ist (s. Punkt 4.2.1)

#### 4.4.2 Einfluss von gasförmigen Lösungsmitteln auf Erdpflanzen

Bei den vielfältigen Experimenten, die während der Datenaufnahme für diese Arbeit durchgeführt wurden, sollten auch Pflanzen mit dem RES-Oxylipin Hexenal behandelt werden. Dies wurde ja bereits in Flüssigpflanzen durchgeführt und sollte auch in Erdpflanzen getestet werden. Dafür wurden 6 Wochen alte Pflanzen einzeln in kleine Plastikboxen gepackt und sollten dort mit Hexenal begast werden. Um das Hexenal in den Boxen zu verteilen wurde MeOH als Trägersubstanz eingesetzt, da dies vollständig in den Boxen verdampfen konnte. Anschließend wurde die Luciferase-Aktivität nach einer 24 h Inkubation in diesen Boxen gemessen. Zwischen den verschiedenen Genotypen und der Kontrolle konnte kein Unterschied nach der Begasung mit Hexenal festgestellt werden. Da sich bereits bei der Begasung mit MeOH bei der *GST6::LUC* Kontrollpflanze eine deutlich erhöhte Luciferase-Aktivität einstellte und sich diese nicht von den *GST6::LUC* Pflanzen, die mit Hexenal begast wurden unterschied, wurden keine weiteren Begasungen mit Hexenal durchgeführt. Stattdessen sollte der Frage nachgegangen werden, ab welcher Menge an MeOH ein Leuchten bei der *GST6::LUC* auftrat und ob dieses mit steigender MeOH Menge zunimmt oder sofort das Maximum erreicht, welches in den ersten Versuchen beobachtet wurde. Dazu wurden in die Begasungskammern jeweils 1,4 mM (50 µl), 2,7 mM (100 µl), 4,1 mM (150 µl), 5,5 mM (200 µl), 6,8 mM (250 µl) und 8,2 mM (300 µl) MeOH gegeben und nach 24 h die Luciferase-Aktivität der *GST6::LUC* Pflanzen gemessen.

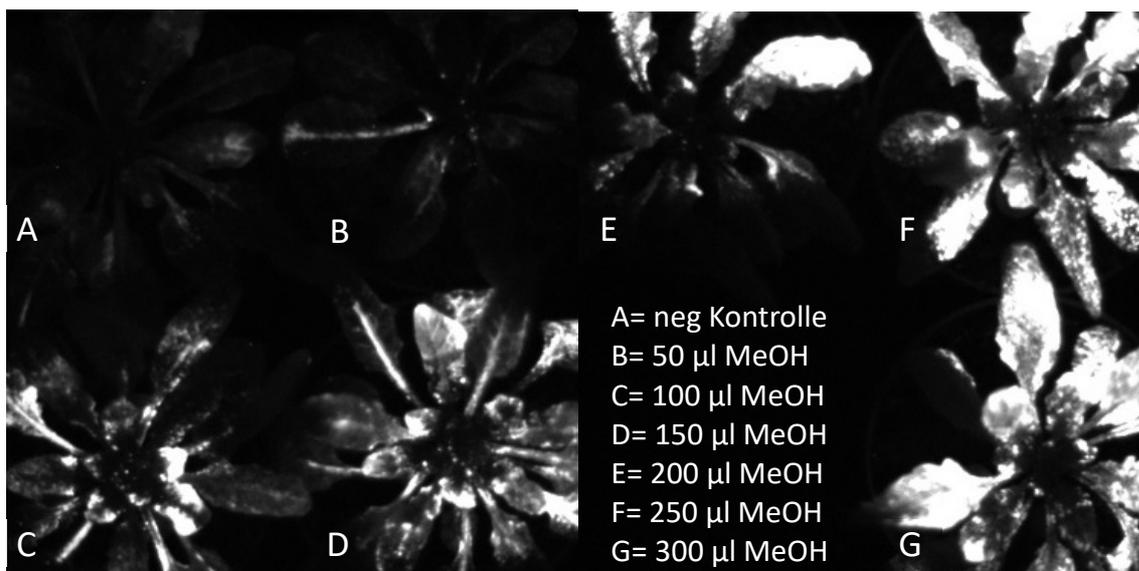


Abb.4.18 6 Wochen alte Erdpflanzen nach einer 24 h stündigen Begasung mit 0 mM (A) 1,4 mM (B), 2,7 mM (C), 4,1 mM (D), 5,5 mM (E), 6,8 mM (F) und 8,2 mM (G) MeOH. Getestet wurde nur der Genotypen *GST6::LUC*, Belichtungszeit 10 min.

Wie sich zeigte (Abb.4.18) reichten 1,4 mM noch nicht aus um eine ausreichende Luciferase-Aktivität zu induzieren. Jedoch ab 2,7 mM MeOH ist die Menge ausreichend um eine Luciferase-Reaktion zu induzieren, die eine eindeutige Unterscheidung zur Negativkontrolle möglich machte. Diese Leuchtintensität nahm mit steigender MeOH Menge weiter zu und erreichte bei 6,8 mM ihr Maximum welches bei 8,2 mM nicht weiter anstieg. Höherer Konzentrationen wurden daher nicht getestet.

Beim Vergleich der beiden weniger PGA-responsiven Mutanten mit der Kontrolle, die nur mit MeOH begast wurden, zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Luciferase-Aktivität zwischen der *GST6::LUC* und der *nr2*. Die Pflanzen der *nr2* Mutante zeigten so gut wie keine Luciferase-Aktivität während die *nr1* und die *GST6::LUC* durch die Begasung mit MeOH eine deutliche Luciferase-Reaktion zeigten.

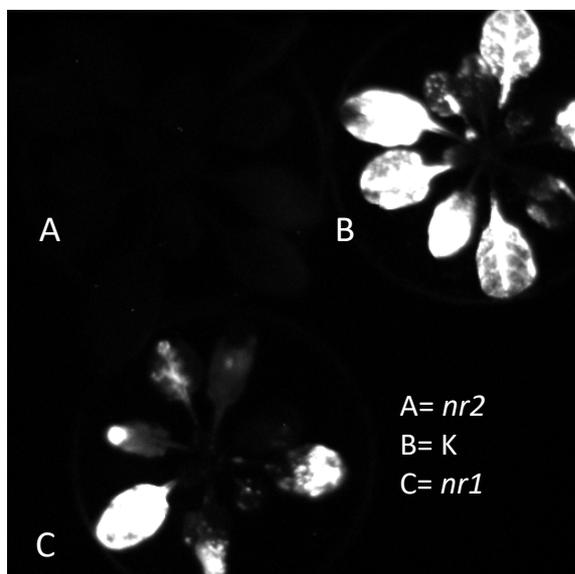


Abb.4.19 6 Wochen alte Erdpflanzen nach einer 24 h stündigen Begasung mit 8,2 mM (300  $\mu$ l) MeOH. Getestet wurden die Genotypen *nr2* (A), *GST6::LUC* (B) und *nr1* (C). Belichtungszeit 10 min.

### 4.4.3 Reaktionen auf Trockenstress

Bei der Reaktion auf Trockenstress spielt neben dem wichtigen Trockenstresshormon ABA auch das RES-Oxylipin OPDA eine Rolle (Savchenko et al., 2014). Da die hier untersuchten Mutanten einen veränderten RES-Oxylipinsignalweg besitzen könnten, wurden verschiedene Experimente durchgeführt um zu untersuchen, ob die Mutanten einen veränderten Phänotyp bei Trockenstress aufweisen. Zuerst sollte die Überlebensrate von 6 Wochen alten Pflanzen nach einem rund 2-wöchigen Trockenstress untersucht werden. Die Pflanzen in einer Schale wurden erst wieder gegossen wenn rund die Hälfte der Pflanzen die Blätter in der Rosettenmitte zusammengerollt hatten, ein deutliches

Anzeichen dafür, dass sie nach dem Wässern sich nicht wieder regenerieren. Diese Experimente wurden in mehreren unabhängigen Replikaten wiederholt.

Nach ersten Experimenten zeigte sich, dass die *coe3* und die *nr1* eine höhere Trockenstresstoleranz besaßen als die Kontrolle, die *nr2* hingegen eine niedrigere. Aus diesem Grund wurden in den folgenden Experimenten die Genotypen so aufgeteilt, dass die *coe3*, *nr1* und *GST6::LUC* zusammen getestet wurden und in einem weiteren Ansatz die *GST6::LUC* mit der *nr2*. Diese Aufteilung findet sich auch in Abb.4.20 wieder.

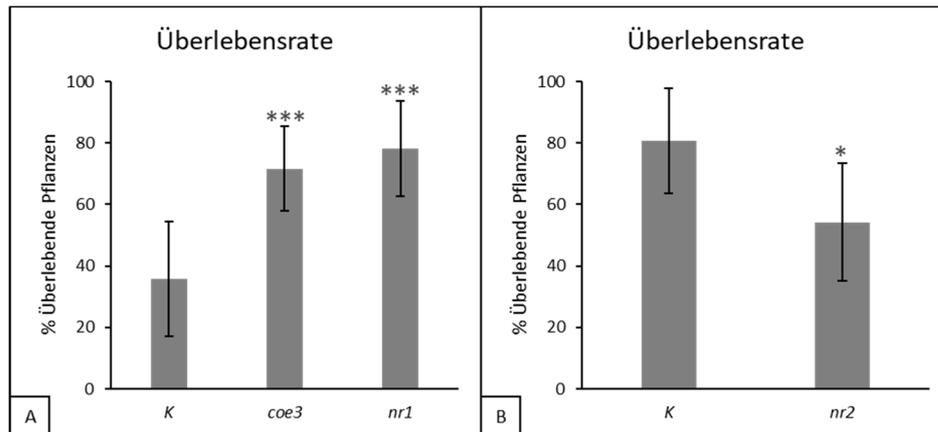


Abb.4.20 Überlebensrate der Mutanten *coe3* und *nr1* im Vergleich mit der Kontrolllinie (A), bzw. der *nr2* mit der Kontrolllinie (B) nach 2 wöchigem Trockenstress mit 6 Wochen alten Erdpflanzen. Es wurden 186 *coe3*, 145 *nr1* und 185 *GST6::LUC* Pflanzen (A) bzw. 90 *GST6::LUC* und *nr2* Pflanzen (B) verwendet. Die Auswertung erfolgte 6 d nach erneutem Gießen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus mind. 2 unabhängigen Versuchsansätzen. Das Experiment wurde insgesamt 4-mal wiederholt mit ähnlichen Resultaten. Die *nr2* wurde getrennt getestet um Unterschiede zur Kontrolle besser sichtbar zu machen. (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Wie man in Abb.4.20 A sehen kann unterscheiden sich die *coe3* und die *nr1* signifikant von der *GST6::LUC* Kontrolle. Bei der *coe3* überlebten 71,66 % der Pflanzen und bei der *nr1* 78,21 %. Bei der Kontrolle waren es dagegen nur 35,77 % aller Pflanzen. Damit unterscheiden sich die *coe3* und *nr1* hoch Signifikant (nach Students T.Test) mit einem p-Wert  $\leq 0,00000066$  bei der *coe3* und  $\leq 0,00000019$  bei der *nr1*. Die *nr2* (siehe B) überlebte eine längere Trockenperiode schlechter als die *GST6::LUC*. Für die Kontrolle lag die Überlebensrate bei 80,71 %. Die *nr2* überlebte nur zu 54,28 % und zeigte einen schwach signifikanten Unterschied zur Kontrolle (p-Wert  $\leq 0,026$ ). Für diese Experimente muss festgehalten werden, dass der deutliche Unterschied zwischen *GST6::LUC* und *nr1* höchstwahrscheinlich auf die deutlich reduzierte Blattfläche der *nr1* zurückzuführen war (siehe 4.3.1 Abb.4.5). Daher ist eine geänderte Reaktion auf Trockenheit bei dieser Mutante so nicht eindeutig festzustellen. Für die *coe3* und die *nr2* gab es jedoch einen sichtbaren Unterschied in ihrer Überlebensrate nach Trockenheit. Dieser ist in Abb.4.21 exemplarisch abgebildet.

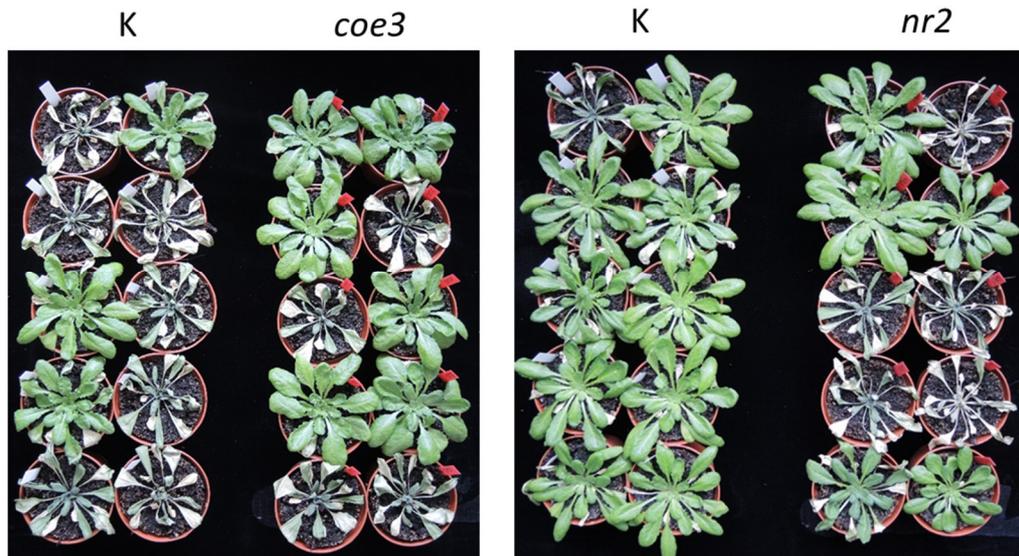


Abb.4.21 Exemplarische Abbildung der überlebenden Mutanten *coe3* (links) und *nr2* (rechts) verglichen mit der *GST6::LUC* Kontrolle. Pflanzen wurden nach rund 2 Wochen Trockenstress erneut gewässert. Bilder 3 Tage nach dem erneuten Gießen aufgenommen.

Vergleicht man die Phytohormonspiegel aus Abb.4.4 sieht man, dass es keinen signifikanten Unterschied bei dem basalen ABA Level gibt. Es wäre daher möglich, dass die beiden Mutanten *coe3* und *nr2* unterschiedlich auf ABA reagieren. Da ABA eine wichtige Funktion beim Stomaschluss der Blätter erfüllt, könnte eine geänderte Reaktion auf ABA zu einem schnelleren bzw. langsameren Stomaschluss führen. Dies hätte einen geringeren oder schnelleren Wasserverlust in den Blättern zur Folge, was eine mögliche Erklärung für die erhöhte Resistenz bzw. Anfälligkeit gegenüber Trockenheit wäre. Um dies experimentell zu überprüfen wurden Blätter der zwei Mutanten, *coe3* und *nr2*, sowie der *GST6::LUC* Kontrolle abgeschnitten und ihr Gewicht bestimmt. Nach 7 h und 24 h wurden die Blätter erneut gewogen. Ihr Gewichtsverlust, in Prozent, über diese 24 h hinweg ist im Diagramm in Abb.4.22 abgebildet.

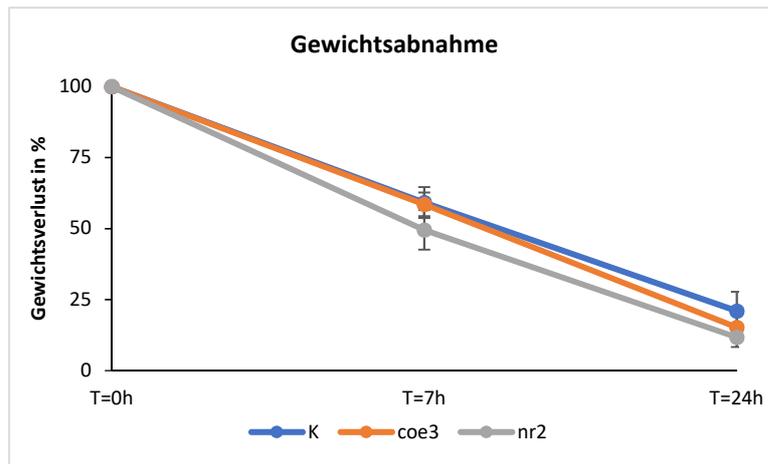


Abb.4.22 Gewichtsabnahme der abgeschnittenen Blätter der Mutanten *coe3* und *nr2* im Vergleich mit der Kontrolle GST6::LUC. Je 6 Blätter wurden über einen Zeitraum von 24 h gemessen und ihr Gewichtsverlust aufgetragen.

Wie sich gezeigt hat, verhalten beide Mutanten in der gleichen Geschwindigkeit wie die Kontrolle. Daher scheint ein veränderter Stomaschluss nicht die Ursache für eine erhöhte Trockenresistenz bzw. Anfälligkeit.

Eine weitere Möglichkeit, die Reaktion der Mutanten auf ABA zu testen, ist sie auf ABA haltigem Medium keimen zu lassen. ABA spielt nicht nur eine entscheidende Rolle beim Stomaschluss sondern ist auch bei der Samenkeimung von entscheidender Bedeutung. Als Antagonist von Gibberellinsäure verhindert es die Keimung und hält so die Samendormanz aufrecht. Wenn die *coe3* Mutante sensibler auf ABA reagiert, dann müssten bereits geringe Mengen ausreichen um die Samen am Keimen zu hindern, während die Kontrolle deutlich besser keimen müsste. Um diese Fragestellung zu beantworten musste zuerst geklärt werden, bei welcher Konzentration an ABA ein hemmender Effekt auftritt. Dieser musste jedoch schwach genug sein, damit noch rund 50 % der Kontrollsamens keimen konnten. Getestet wurde 1, 2 und 3  $\mu\text{M}$  ABA, die auf autoklaviertes Whatman-Papier gegeben wurde. Es wurden die Samen als gekeimt gezählt, bei denen die Keimwurzel mindestens so lang war wie der Samen breit

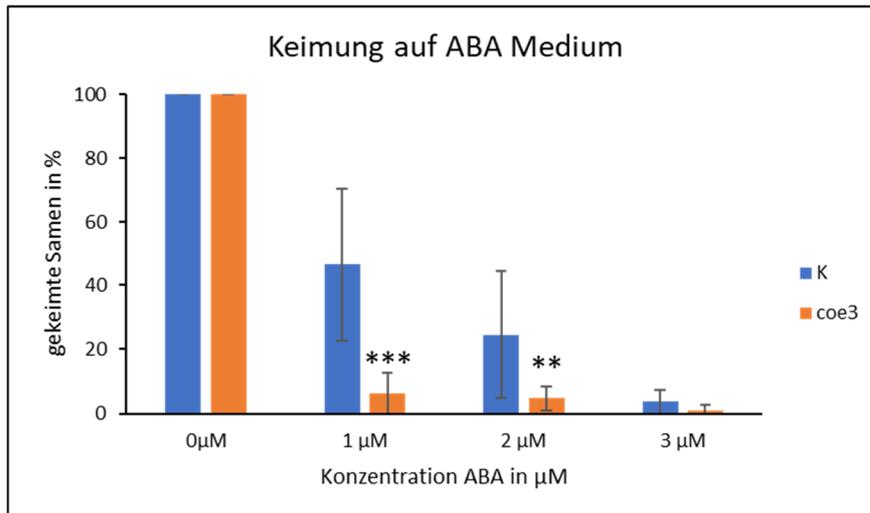


Abb.4.23 Prozentualer Anteil der gekeimten Samen von *GST6::LUC* (K) und der Mutante *coe3* nach insgesamt 8 d auf Whatman-Papier mit 1, 2 oder 3  $\mu\text{M}$  ABA oder nur Wasser als Negativkontrolle. Der Mittelwert gekeimter Samen der Negativkontrollen wurde als 100 % festgesetzt. Dieser Experimentansatz wurde insgesamt 6 mal wiederholt. Für jeden Experimentansatz kamen 60 Samen pro Petrischale zum Einsatz, wobei je 4 Petrischalen für jede Kontrolle und je 2 Petrischalen für jede Behandlung ausgelegt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), dabei wurde die *coe3* mit der jeweils gleichbehandelten Kontrolle verglichen.

Das Ergebnis dieser Keimungsversuche zeigt Abb.4.23. Dargestellt sind jeweils die gekeimten Samen in % der *GST6::LUC* Kontrolle sowie der *coe3* Mutante bei unterschiedlichen ABA Konzentrationen. Bei 3  $\mu\text{M}$  ABA war fast keinerlei Keimung mehr zu erkennen lediglich 3,5 % aller Samen keimten noch aus. Bei der *coe3* waren es sogar nur 0,84 %. Bei 2  $\mu\text{M}$  waren es schon deutlich mehr Kontrollpflanzen die auskeimen konnten, 24,52 % dieser unterschieden sich sogar stark signifikant von den 3,9 % der gekeimten *coe3* Samen. Am besten war der Unterschied bei 1  $\mu\text{M}$  ABA zu erkennen. Hier unterschied sich die Kontrolle mit 46,6 % hoch signifikant von der *coe3* Mutante mit nur 6,2 %. Daher wurden in den folgenden Experimenten nur die unbehandelten Pflanzen mit den 1  $\mu\text{M}$  behandelten Pflanzen auf ihre Keimung hin untersucht.

Da die Ergebnisse in den 6 einzelnen Experimenten teilweise sehr stark schwankten (siehe Standardabweichungen Abb.4.23) und die für diese Experimente verwendeten Samen aus unterschiedlich alten Samenchargen stammten, sollte getestet werden, ob das Alter der Samen und der damit verbundene natürliche Abbau von ABA die Reaktion auf 1  $\mu\text{M}$  extern zugefügtes ABA stark beeinflussen. Dafür wurden für jedes Experiment je 40 Samen in eine Petrischale mit Whatman-Papier ausgelegt und für jede Kontrolle sowie jede Behandlung 3 Replikate angesetzt. Es standen für dieses Experiment 3 verschiedene *GST6::LUC* Samenchargen unterschiedlichen Alters und 2 verschiedene alte *coe3* Samenchargen zur Verfügung. Die Keimungsrate bei den Kontrollen schwankte sehr stark und korrelierte nicht mit dem Alter der jeweiligen Samencharge.

Bei der *coe3* zeigte sich, dass die älteren Samen etwas besser keimten. Prinzipiell zeigte sich bei diesem Experiment, dass der zuvor beobachtete Unterschied (siehe Abb.4.23) in der Keimungsrate zwischen *coe3* und *GST6::LUC* nicht reproduzierbar war. Daher wurde dieser Versuchsaufbau nicht weiter verfolgt.

Da sich der zuerst beobachtete, geänderte Keimungsphänotyp der *coe3* auf ABA nicht als robust erwiesen hatte, wurde eine andere Möglichkeit gesucht eine mögliche geänderte Reaktion auf ABA zu untersuchen. Die Expression von ABA induzierbaren Genen sollte zeigen, ob ein Unterschied zwischen der *coe3* und *GST6::LUC* besteht. Dazu wurden die Gene *NAC032* und *DREB2A* ausgewählt. Die Geninduktion sollte in 6 Wochen alten Erdpflanzen erfolgen. Dafür wurden die Pflanzen mit einer ABA Lösung mit 50 µM ABA infiltriert.

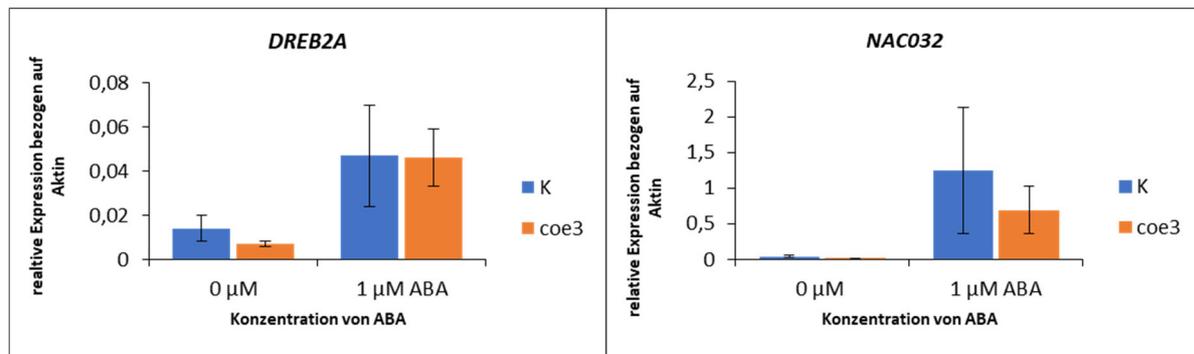


Abb.4.24 Relative Genexpression, bezogen auf *AKTIN*, von *DREB2A*, sowie *NAC032* in 6 Wochen alten Erdpflanzen ohne und mit 50 µM ABA infiltriert in die Blätter. Geerntet wurden die infiltrierten Blätter 4 Stunden nach der Behandlung.

Tab.4.4 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Behandlung mit ABA zur jeweiligen Wasser Behandlung. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.24 (T-test: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001). Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt um den die Expression erhöht oder erniedrigt ist verglichen mit der Wasser Kontrolle des jeweiligen Genotyps.

	<i>DREB2A</i>		<i>NAC032</i>	
T.Test	<i>GST6::LUC</i> 1 µM ABA		<i>GST6::LUC</i> 1 µM ABA	
<i>GST6::LUC</i> 0 µM		3,4		30,4
	<i>coe3</i> 1 µM ABA		<i>coe3</i> 1 µM ABA	
<i>coe3</i> 0 µM	**	6,6	*	40,5

Durch die Infiltration mit ABA ist bei beiden Genotypen ein deutlicher Anstieg in der Expression von *DREB2A* sowie *NAC032* zu erkennen. Allerdings zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Transkriptmengen zwischen *GST6::LUC* und *coe3*. ABA schien also keine geänderte Reaktion auf Transkriptebene bei den Pflanzen hervorzurufen. Die Mutanten *coe3* und *nr2* zeigten jedoch einen eindeutigen Phänotyp bei der Überlebensrate nach Trockenstress. Eine veränderte Reaktion auf ABA scheint jedoch nicht die Ursache für diesen Phänotyp zu sein. Um diesen Phänotyp weiter zu erforschen wurden weitere Bedingungen getestet mit denen sich ein Trockenstress simulieren lässt

und die Pflanzen dann weiter untersucht werden können, z.B. auf Transkriptionsebene oder durch Analyse des Metaboloms. Zu diesem Zweck wurden zuerst Keimlinge 3 d auf normalem 3 % MS Agar angezogen. Die 3 Tage alten Keimlinge wurden danach auf mannitolhaltigem Schrägagar umgesetzt und für weitere 10 d aufrecht inkubiert. Anschließend wurden die Luciferase-Aktivität sowie das Gewicht der Keimlinge gemessen. Da diese Experimente dafür gedacht waren zu prüfen, ob dieser Experimentieransatz einen unterschiedlichen Phänotyp zwischen Mutante und Kontrolle aufzeigen kann, wurde zunächst nur die *GST6::LUC* und die *coe3* getestet. Es konnten bei mehreren Replikaten in unterschiedlichen Experimenten kein Unterschied zwischen *GST6::LUC* und *coe3* beobachtet werden. Sowohl das Gewicht als auch die Luciferase-Aktivität unterschied sich nicht zwischen Kontrollmedium und 100 mM und 200 mM Mannitol Behandlung. Die Mutanten und auch die Kontrolle reagierten nicht auf Mannitol. Daher wurden keine weiteren Experimente mit Mannitol unternommen und auch keine weiteren Tests bezüglich der erhöhten Trockenresistenz der *coe3* und der verminderten Trockenresistenz der *nr2*.

#### 4.4.4 Salzstress

In Anlehnung an die Trockenexperimente, welche bereits Unterschiede bei der *coe3* und der *nr2*, bezogen auf die Kontrolle zeigten, wurde auch die Toleranz auf Salzstress untersucht. Da die Verdunstung von Wasser im Boden zu einer erhöhten Salzkonzentration im verbleibenden Wasser führt, weisen heiße und trockene Regionen auch öfter erhöhte Salzkonzentrationen im Boden auf. In höheren Konzentrationen ist NaCl jedoch schädlich für Pflanzen und behindert oder hemmt stark ihr Wachstum. Dies konnte bereits ein einfacher Keimungsversuch auf NaCl-haltigem Agar zeigen. Dazu wurden 20 Samen aller 4 Genotypen (*GST6::LUC*, *coe3*, *nr1* und *nr2*) auf MS-Agar ohne, mit 100 mM und 200 mM NaCl ausgelegt und nach 14 d die Anzahl der gekeimten Pflanzen gezählt.

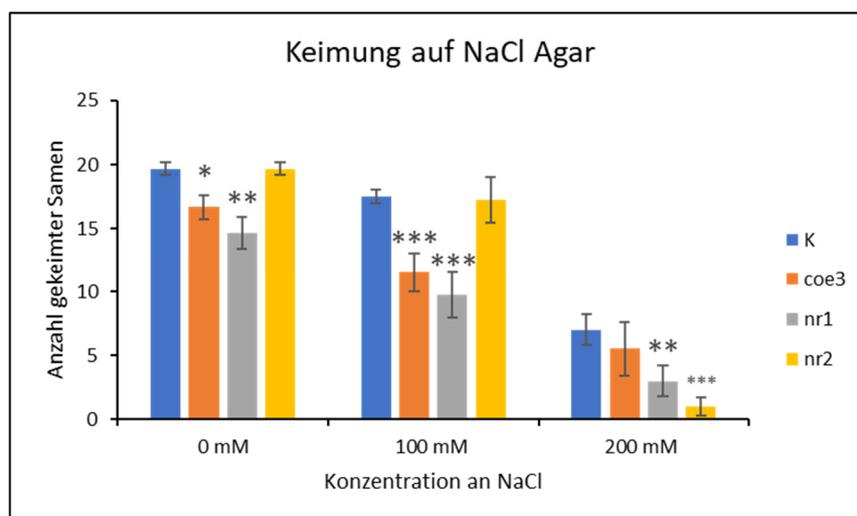


Abb.4.25 Mittelwerte der gekeimten Samen,  $\pm$  Standardabweichungen, aller 4 Genotypen auf MS-Agar mit verschiedenen hohen NaCl Konzentrationen nach 14 d unter Kurztagsbedingungen. Als Kontrolle wurde die

*GST6::LUC* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Tab.4.5 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Wachstum auf NaCl zum jeweiligen Wachstum auf NaCl freiem MS-Agar . Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.25 (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt um den die Keimung erniedrigt ist verglichen mit der NaCl freien Kontrolle des jeweiligen Genotyps.

	<i>GST6::LUC</i> 100 mM		<i>GST6::LUC</i> 200 mM	
<i>GST6::LUC</i> 0 mM	**	0,89	***	0,36
	<i>coe3</i> 100 mM		<i>coe3</i> 200 mM	
<i>coe3</i> 0 mM	**	0,69	***	0,33
	<i>nr1</i> 100 mM		<i>nr1</i> 200 mM	
<i>nr1</i> 0 mM	*	0,66	***	0,20
	<i>nr2</i> 100 mM		<i>nr2</i> 200 mM	
<i>nr2</i> 0 mM		0,88	***	0,05

Wie zu erwarten war, keimte die *GST6::LUC* Kontrolle auf reinem MS-Medium sehr gut, durchschnittlich rund 19,6 von 20 Samen, genau wie bei der *nr2*. Die *coe3* keimte etwas schlechter, hier konnten im Mittel nur 16,6 Keimlinge gezählt werden, die schlechteste Keimung unter Kontrollbedingungen zeigt die *nr1* mit gerade einmal 14,6 Keimlingen. Dies war jedoch nicht ungewöhnlich für diese Mutante und wurde bei vielen unterschiedlichen Versuchen beobachtet. Auch auf Erde war die Keimung schlechter als bei den anderen Pflanzen. Betrachtet man die Pflanzen, welche auf 100 mM NaCl angezogen wurden, fiel auf, dass bei den Keimlingen, die gewachsen sind, die Pflanzen an sich kleiner und kompakter wirkten als auf den Kontrollplatten, außerdem waren die Wurzeln der Keimlinge kürzer. Zählt man auch hier die Keimlinge, erhält man für die Kontrolle 17,5 und für die *nr2* 17,25 gekeimte Samen. Bei der *coe3* keimten nur noch 11,5 und bei der *nr1* sogar nur 9,75. Dieser keimungshemmende Effekt verstärkte sich bei 200 mM noch deutlicher. Hier keimten nur 7 von 20 Samen bei der *GST6::LUC*, 5,5 bei der *coe3*, 3 bei der *nr1* und überraschenderweise nur 1 bei der *nr2*. Zudem waren bei den Keimlingen meist nur die Wurzel ausgebildet und nur in seltenen Fällen die Blätter, die zudem keinerlei Grünfärbung aufwiesen. Dieses Experiment verdeutlicht wie stark Salz die Keimung und Entwicklung beeinflusst. In diesem ersten Experiment zeigte sich, dass die *nr2* auf 100 mM Salz deutlich weniger reagiert, als die anderen Genotypen. Auf 200 mM Salz reagiert sie allerdings am empfindlichsten. Ein weiteres Experiment sollte zeigen, ob die weitere Entwicklung der Pflanzen auf Salz ebenfalls unterschiedlich ist. Samen der verschiedenen Genotypen wurden auf MS-Agar ohne Salz ausgelegt und nach 3 d Inkubation im Klimaschrank auf salzhaltigen Agar mit 100 mM, 200 mM und 300 mM umgesetzt. Nach weiteren 10 d erfolgte die Dokumentation der Platten und die Wurzellänge wurde bestimmt. Da jedoch nur bei 100 mM ausreichend lange Wurzeln für eine Auswertung gewachsen waren, sind nur diese im Vergleich zu den unbehandelten Pflanzen in Abb.4.26 aufgetragen.

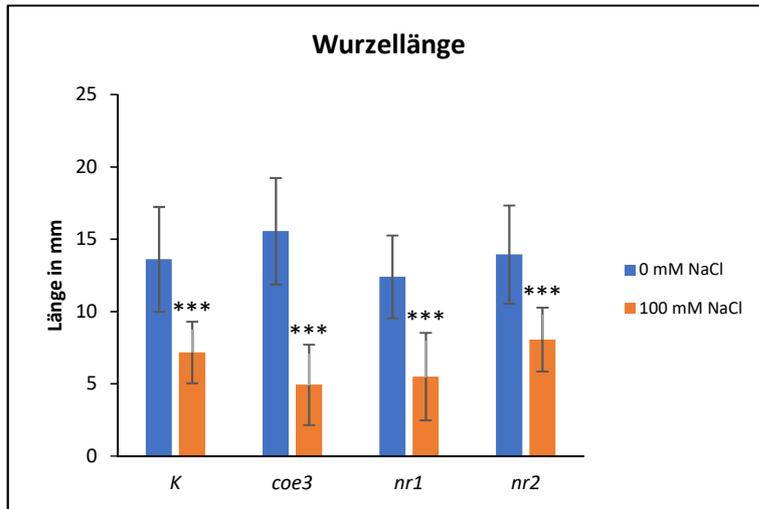


Abb.4.26 Mittelwerte der Wurzellängen,  $\pm$  Standardabweichungen, aller 4 Genotypen auf MS-Agar ohne bzw. mit 100 mM NaCl nach 13 d unter Kurztagsbedingungen. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zu erkennen ist, dass bereits eine Salzkonzentration von nur 100 mM das Wurzellängenwachstum hoch signifikant reduzierte. Aber nicht nur die Wurzellänge des Keimlings war reduziert auch die Blätter wirkten kleiner. Dieser Effekt war unabhängig von der betrachteten Mutante. Ging man mit der Salzkonzentration höher, wurde der Effekt noch deutlicher. Bei 200 mM waren nur sehr kurze Wurzeln ausgebildet und die Keimlinge sehr gedrunken und besaßen nur kleine Keimblätter. Bei der höchsten getesteten Konzentration, 300 mM, war die Wurzel der Keimlinge nach dem Umsetzen auf den salzhaltigen Agar kaum weiter gewachsen und die meisten Keimlinge hatten auch keine Keimblätter ausgebildet, sondern befanden sich noch in ihren Samenhüllen. Dieser Effekt war unabhängig von den untersuchten Genotypen und trat sowohl bei der Kontrolle als auch bei der *coe3*, *nr1* und *nr2* auf. Die hier untersuchten Salzkonzentrationen stellten also bereits einen sehr starken Stressfaktor dar, der es nicht ermöglichte, eventuell vorhandene Reaktionen auf eine geringere oder langsam steigenden Salzkonzentration zu beobachten. Um dies näher zu untersuchen wurde ein Schrägagarsystem gewählt, bei welchem der untere Teil der Agarplatte mit salzhaltigem Agar gefüllt war und der obere Teil mit ganz normalem MS-Medium. Die schräge Anordnung des Agars wurde gewählt um den, aufgrund des Gravitropismus, nach unten wachsenden Wurzeln eine Ausweichmöglichkeit mit geringerer Salzkonzentration anzubieten.

Dazu wurden Keimlinge für 3 d auf normalen 3 % MS-Agar angezogen und danach auf die Schrägagarplatten überführt. Die Keimlinge wurden dabei schräg auf die obere Hälfte des Agars umgesetzt, welche ebenfalls normalen 3 % MS-Agar enthielt. Nach weiteren 8, 12 und 17 d senkrechten Wachstums im Klimaschrank wurden die Platten fotografiert und ausgewertet.

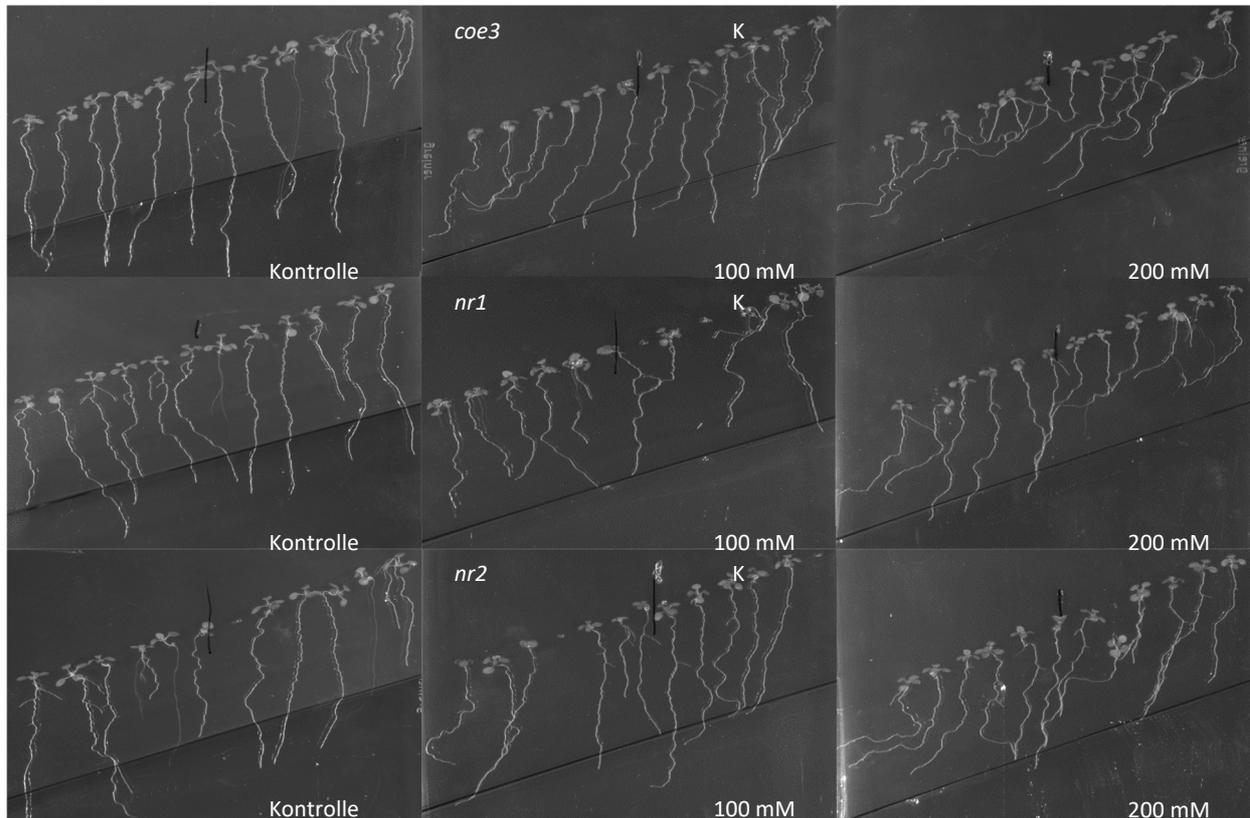


Abb.4.27 15 d alte Keimlinge die 12 d auf den salzhaltigen- bzw. Kontrollplatten unter Kurztagsbedingungen in senkrechter Position angezogen wurden. Auf jede Platte wurden 6 *GST6::LUC* Pflanzen (rechte Hälfte eines jeden Bildes) und 6 Mutanten Keimlinge (linke Hälfte eines jeden Bildes) ausgelegt. Im jeweils unteren Bereich der Agarplatten (gekennzeichnet durch den diagonal verlaufenden Strich befindet sich entweder normales MS-Medium als Kontrolle (Bilder linke Spalte) oder MS-Medium mit 100 mM (mittlere Spalte) oder 200 mM (rechte Spalte) NaCl. Untersucht wurden die *coe3* (oberste Reihe), die *nr1* (mittlere Reihe) und die *nr2* (unterste Reihe). Es wurden für jede Mutante 48 Keimlinge in 3 unabhängigen Versuchen getestet.

Die Abb.4.27 zeigt das Ergebnis des Experiments nach 12 d Inkubation der Pflanzen auf dem Schrägagarsystem. Bei den Kontrollplatten wurde der untere Teil des Agars in der Platte entfernt und durch neuen MS-Agar ohne Salz ersetzt. In jedem der Teilbilder befand sich auf der rechten Seite die *GST6::LUC* Kontrolle und auf der linken Seite die jeweilige Mutante. Wie man bei allen Kontrollen sehen konnte, zeigten die Wurzeln einen klaren Gravitropismus und wuchsen klar nach unten. Es war ebenfalls gut zu erkennen, dass viele Wurzeln bereits deutlich die Schnittkante überquert hatten und somit in die untere Hälfte des Agars gewachsen waren. Dies war bei 100 mM Salz im unteren Abschnitt (mittlere Bildspalte Abb.4.27) nicht mehr so eindeutig zu sehen. Betrachtete man zunächst wieder nur die *GST6::LUC* Kontrolle auf der jeweils rechten Bildhälfte fiel auf, dass sie zwar im obersten Bild deutlich über die Schnittkante gewachsen war, jedoch nicht so weit wie auf den Kontrollplatten. Im mittleren Bild hatte keine der Kontrollen die Schnittkante eindeutig überquert und im untersten Bild waren es nur 2 von 5 Pflanzen die klar darüber gewachsen waren. Die anderen Wurzeln in den Teilbildern (der mittleren Spalte) waren zwar an der Schnittkante angelangt wuchsen jedoch nicht

weiter nach unten sondern schienen die Richtung zu ändern und wuchsen nun mehr in die Richtung der niedrigeren Salzkonzentration (nach links). Betrachtete man nun die *nr1* und *nr2* Mutante, fiel auf, dass diese sich ähnlich wie die *GST6::LUC* verhielten. Auch hier waren die Wurzeln nicht so weit gewachsen wie bei den Kontrollplatten und in einigen Fällen zeigten sie ein Abknicken in die Richtung der niedrigeren Salzkonzentration. Deutlich anders verhielt sich dagegen die *coe3*. Bei 4 von 6 Pflanzen zeigte sich ein Abknicken der Wurzel bereits deutlich vor Erreichen der Schnittkante. Dieser Effekt konnte noch stärker bei einer Konzentration von 200 mM im unteren Teil der Agarplatte beobachtet werden. Alle Wurzeln der *coe3* Keimlinge knickten deutlich vor der Schnittkante weg zum Ort der niedrigeren Salzkonzentration. Dies traf zwar auch für die *GST6::LUC* Kontrolle zu, jedoch schien diese weniger empfindlich gegen Salzkonzentrationen zu sein, da ihre Wurzeln erst weiter unten, verglichen mit der *coe3*, die Wachstumsrichtung änderten. Interessanterweise war das Wachstumsverhalten der *GST6::LUC* Kontrolle bei dem Versuchsansatz mit 200 mM nicht so eindeutig wie bei 100 mM. Betrachtete man das Wachstumsverhalten der Wurzeln in Relation zur Schnittkante, so fiel auf, dass sie auf den Platten mit den *coe3* Mutanten erst kurz vor der Schnittkante die Wachstumsrichtung änderten. Auf den Platten mit der *nr1* geschah diese Richtungsänderung bereits deutlich eher und auf den Platten mit der *nr2* erreichten die Wurzeln der *GST6::LUC* Kontrolle sogar die Schnittkante. Betrachtete man die *nr2* bei dieser Salzkonzentration genauer, zeigte sich, dass einige der Wurzeln die Schnittkante erreichten jedoch die anderen vorher deutlich abknickten. Man konnte hier keinen deutlichen Unterschied zwischen der *nr2* Mutante und der Kontrolle feststellen. Anders verhielt es sich bei der *nr1*. Die Wurzeln der *GST6::LUC* Kontrolle knickten relativ weit vor der Schnittkante ab, während die Wurzeln der *nr1* weiterhin nach unten wuchsen. Bei 4 von 6 Wurzeln zeigte sich, dass sie sogar die Schnittkante überquerten. Die hier beobachteten Effekte konnten bei den 17 d auf Schrägagar gewachsenen Keimlingen ebenfalls beobachtet werden, auch wenn die Wachstumsrichtung der einzelnen Wurzeln, aufgrund ihrer Länge und Nähe zu den benachbarten Wurzeln, nicht mehr so klar zu erkennen war wie bei den 12 d inkubierten Keimlingen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *coe3* Pflanzen besonders sensibel auf die Anwesenheit von Salz reagieren, während sich die *nr1* von Salzkonzentrationen, die die Kontrolle bereits in ihrem Wachstum stören, unbeeindruckt zeigt.

### 4.4.5 Dunkel-induzierte Seneszenz

Angeregt durch die Veröffentlichung von Liao et al., 2016, welche eine Mutante beschrieben haben, die anfälliger für einige Bakterien und Pilze ist sowie eine schnellere Seneszenz in Dauerdunkelheit zeigt, sollten auch die hier untersuchten Mutanten auf ihre Reaktion im Dauerdunkel hin untersucht werden. Zuerst wurden in 3 Versuchsdurchläufen Blätter von 6 bis 7 Wochen alten Pflanzen abgeschnitten und für 6 d im Dunkeln auf Wasser flotiert oder als Kontrolle unter

Kurztagsbedingungen, ebenfalls auf Wasser, flotiert. Um mögliche Altersunterschiede der Blätter bei Experimentbeginn zu minimieren, wurden von jeder Pflanze möglichst gleichaltrige Blätter verwendet und je 4 ins Licht und 4 ins Dunkle gestellt. Zur besseren Auswertung des Experiments wurden die Blätter, welche von derselben Pflanze abgeschnitten wurden, jeweils so angeordnet, dass sich die 4 Blätter aus der Kontrolle und der Dauerdunkelbehandlung auf der gleichen Position im Licht bzw. Dunkel befanden (siehe Abb.4.28)

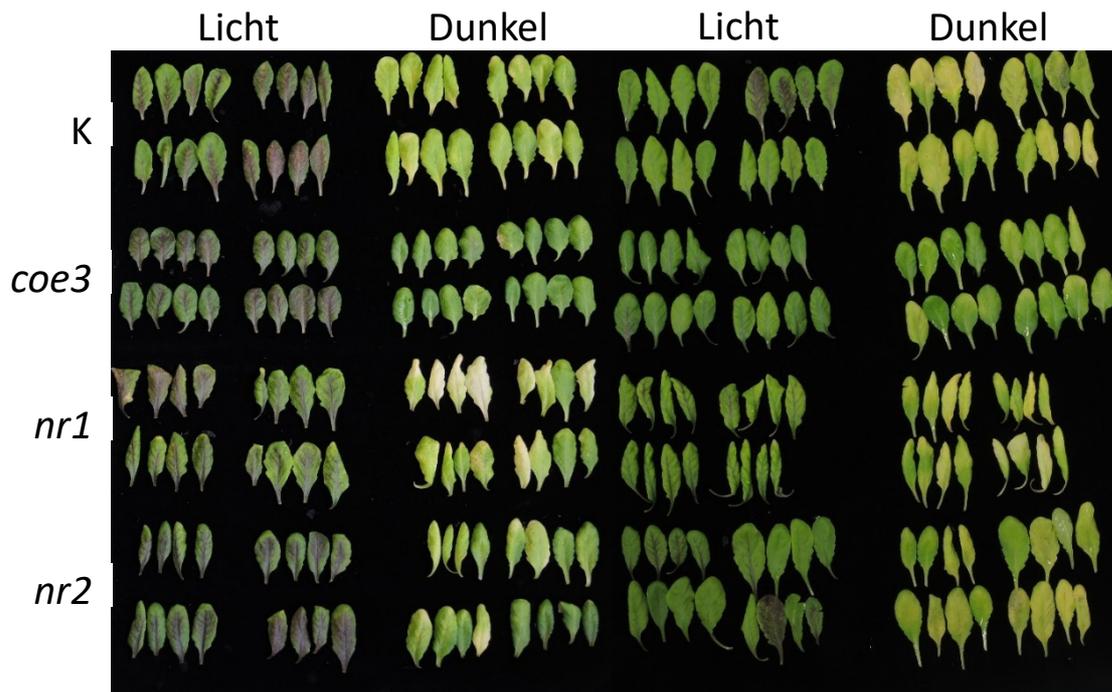


Abb.4.28 Abgebildet sind 2 der 6 durchgeführten Dunkelexperimente mit abgeschnittenen Blättern von 7 Wochen alten Erdpflanzen. Die 4 zusammen gruppierten Blätter aus den Licht und Dunkel Behandlungen stammten jeweils von derselben Pflanze. Es wurden also für jeden Genotyp 4 Pflanzen getestet. Die untersuchten Genotypen waren *coe3*, *nr1*, *nr2* als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Die Blätter wurden 6 d auf Wasser in Dunkelheit oder Kurztagsbedingungen flotiert.

Die Blätter aus Abb.4.28 stammten aus 2 unterschiedlichen Wiederholungen (linke Hälfte und rechte Hälfte) und zeigen die Blätter nach 6 d im Dauerdunkel bzw. Kurztag. Betrachtet man zunächst nur die Blätter, welche im Licht flotiert wurden, fällt auf, dass diese eine deutliche Rotfärbung aufweisen. Diese starke Anthocyanbildung ließ sich bei allen Experimenten, mal stärker mal weniger stark ausgeprägt, beobachten. Dabei konnte beobachtet werden, dass sich diese Stressreaktion von der Schnittstelle am Stängel langsam bis zur Blattspitze hin ausbreitet (Daten hier nicht gezeigt) und daher vermutlich eine Stressantwort auf den Verwundungsreiz darstellt. Die Anthocyanbildung konnte auch bei älteren Blättern beobachtet werden, welche, wie in diesem Fall, dauerhaft unter Kurztagsbedingungen angezogen wurden. Um nicht nur optisch eine Aussage über die Blattfärbung geben zu können wurden die Chlorophyllgehalte der Blätter gemessen. Dabei wurden immer die 4

Blätter einer Behandlung und Mutante, die zusammen inkubiert worden waren, gemörsert und so durchmischt. Um die Chlorophyllgehalte von unbehandelten Pflanzen zu ermitteln wurden zunächst von vier 7 Wochen alten Pflanzen je 4 Blätter geerntet, gemörsert und aufbereitet. Wie sich zeigte besaßen die *coe3* und die *GST6::LUC* die höchsten basalen Chlorophyllgehalte, welche jedoch stark schwankten. Die niedrigsten wurden bei der *nr1* und *nr2* mit 400 µg/g und 436 µg/g Frischgewicht gemessen. Es wurde nur ein schwach signifikanter Unterschied zwischen der *nr1* und der Kontrolle festgestellt.

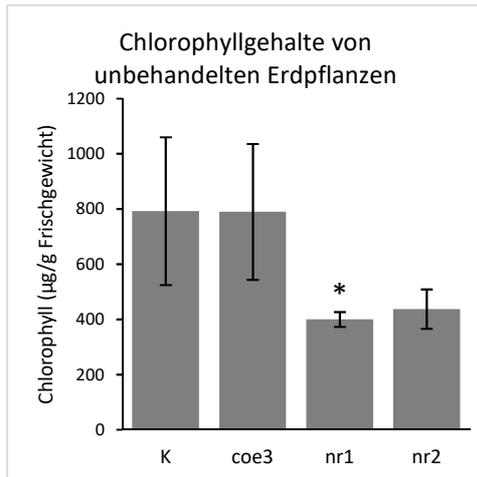


Abb.4.29 Mittlere Chlorophyllgehalte in µg/g ± Standardabweichungen aus Blättern von 7 Wochen alten Erdpflanzen die keinerlei untersuchten Stressbedingungen ausgesetzt waren. Die untersuchten Genotypen waren *coe3*, *nr1*, *nr2* als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Es wurden die Mittelwerte aus 4 untersuchten Proben gebildet, die aus je 4 Blättern von einer Pflanze bestanden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-test (\* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

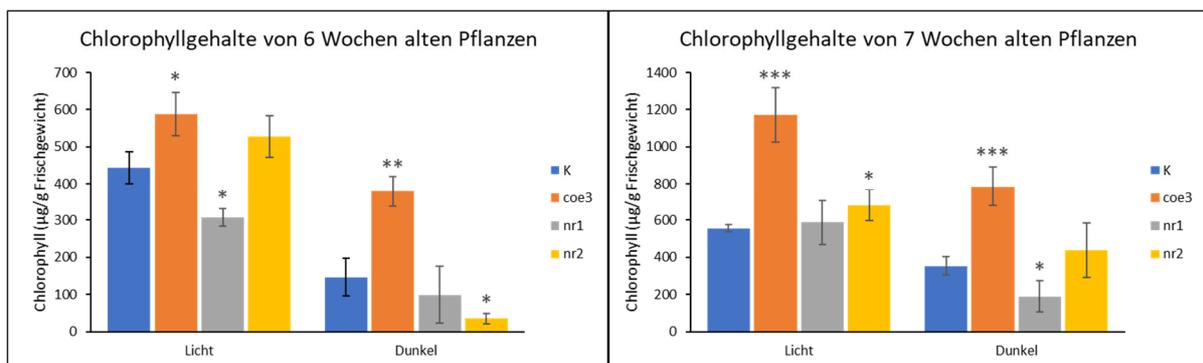


Abb.4.30 Mittlere Chlorophyllgehalte in µg/g ± Standardabweichungen aus Blättern von 6 (links) bzw. 7 (rechts) Wochen alten Erdpflanzen. Die Blätter wurden entweder auf Wasser unter Kurztagsbedingungen (Licht) oder im Dauerdunkeln (Dunkel) floriert. Die untersuchten Genotypen waren *coe3*, *nr1*, *nr2* als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Es wurden die Mittelwerte je aus 4 untersuchten Proben gebildet die aus je 4 Blättern von einer Pflanze bestanden. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen den Genotypen: *GST6::LUC*, *coe3*, *nr1* und *nr2* im Licht bzw. Dunkel Wachstum (T-test: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001).

Tab.4.6 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Wachstum im Dunkeln zum jeweiligen Wachstum im Licht. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.30 (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt um den die Chlorophyllgehalte erniedrigt sind, verglichen mit im Licht inkubierten Blättern des jeweiligen Genotyps.

	6 Wochen alte Pflanzen		7 Wochen alte Pflanzen	
	<i>GST6::LUC</i> Dunkel		<i>GST6::LUC</i> Dunkel	
<i>GST6::LUC</i> Licht	**	0,33	***	0,64
	<i>coe3</i> Dunkel		<i>coe3</i> Dunkel	
<i>coe3</i> Licht	*	0,65	**	0,67
	<i>nr1</i> Dunkel		<i>nr1</i> Dunkel	
<i>nr1</i> Licht	*	0,32	**	0,32
	<i>nr2</i> Dunkel		<i>nr2</i> Dunkel	
<i>nr2</i> Licht	***	0,07	*	0,64

Anders als in Abb.4.29 stellte sich das Ergebnis nach der Dauerdunkelbehandlung dar. Bei diesen Auswertungen musste jedes Experiment einzeln betrachtet werden, da sich die Chlorophyllmengen zwischen den einzelnen Experimenten zu stark unterschieden (vergleiche Skalen Abb.4.29 linkes Experiment vs. rechtes Experiment). Es ließ sich dennoch eine deutliche Tendenz erkennen, welche sich auch schon bei der rein optischen Betrachtung der Blätter andeutete. Es zeigte sich, dass bei den Blättern, die im Licht inkubiert wurden, die *coe3* die höchsten Chlorophyllgehalte aufwies, verglichen mit den basalen Messungen war der Unterschied jedoch deutlicher und unterschied sich in manchen Experimenten signifikant von den *GST6::LUC* Blättern. Die Chlorophyllgehalte der *nr1* Blätter unter Lichtbedingungen waren meist niedriger oder sehr ähnlich der *GST6::LUC* Kontrolle, wohingegen die der *nr2* stark schwankten. Alle Messungen zeigten, dass die dunkel inkubierten Pflanzen deutlich niedrigere Chlorophyllgehalte aufwiesen, jedoch waren bei der *coe3* in 2 von 3 Experimenten signifikant höhere Chlorophyllmengen vorhanden als in den gleichbehandelten *GST6::LUC* Pflanzen oder den beiden anderen Mutanten. Bei der Durchführung der Experimente zeigt sich erneut, dass die Blätter der *nr1* meist deutlich kleiner waren als die der gleichaltrigen Pflanzen der anderen Genotypen. Dies führte bei manchen Experimenten dazu, dass nach 6 d Dunkelinkubation die kleineren Blättern sich stark zersetzt hatten und von ihnen fast nichts mehr übrig war. Da kleinere Blätter auch weniger Reservestoffe haben, wurde versucht Experimentbedingungen zu wählen, bei denen der Größenunterschied nicht auftrat. Während der Arbeiten mit diesen Genotypen zeigte sich dabei immer wieder, dass der auf Erde zu beobachtende Phänotyp der kleineren Blätter und des verlangsamten Wachstums nicht auftrat wenn die Pflanzen in Flüssigmedium oder auf Agarplatten angezogen wurden. Überführte man sie dann jedoch wieder auf Erde wuchsen sie auch hier deutlich langsamer als die anderen Mutanten. Daher wurden Dunkelexperimente mit Keimlingen durchgeführt, die 14 Tage lang auf Agarplatten angezogen wurden und dann auf neuen Agar ohne Zucker überführt wurden. Anschließend wurden diese Keimlinge für 10 d im Dauerdunkel inkubiert bzw. die Kontrollen unter Kurztagsbedingungen gehalten. Es sollten dabei nur *GST6::LUC* und *nr1* miteinander verglichen

werden. Nach 10 d im Dunkeln zeigte sich, dass die Keimlinge zwar deutlich kleiner waren als die der Kontrollbehandlung aber immer noch einen deutlichen Rest an Chlorophyll enthielten. Zudem wiesen sie keinen Unterschied zwischen *GST6::LUC* und *nr1* auf. Auch eine Abwandlung des Experiments, in welchem die Keimlinge für 8 d in Wasser floriert wurden, zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Da die Mutanten hier gleich groß waren und sich kein Unterschied zeigte wurden die geringeren Chlorophyllgehalte, welche zuvor bei der *nr1* in Erdpflanzen gemessen werden konnten, nicht weiter untersucht.

### 4.5 Ansätze zur Identifizierung der Mutation

#### 4.5.1 *nr1*: Genkartierung einer Mutante mit reduzierter Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe

##### 4.5.1.1 Durch RNA-Seq identifizierte Gene als Anhaltspunkte für mögliche Selektionsmarker

Die bereits oben beschriebenen RNA-Seq Experiment lieferten einen Anhaltspunkt für mögliche Gene, welche sich als molekulare Marker zur Selektionierung der Mutanten, unabhängig vom Luciferase-Assay, eignen könnten. Die Gene, deren Regulation sich in diesen Experimenten bestätigen ließ, sollten im nächsten Schritt auch bei Erdpflanzen untersucht werden. Zum einen, weil Erdpflanzen mehr Pflanzenmaterial zur Verfügung stellen konnten als kleine Keimlinge, was wiederum die Durchführung verschiedener Isolationen ermöglicht, z.B. DNA-Isolation und RNA-Isolation. Zum anderen können von Erdpflanzen Samen gewonnen werden, was die Untersuchung der Folgegeneration ermöglicht. Um auch Gene untersuchen zu können, welche nach PGA Gabe induziert anstiegen, wurden auch Blätter mit PGA infiltriert und zwischen 1 und 6 h inkubiert. Hierfür wurden vor allem die Gene *GST6* und *TOLB* betrachtet, da sie sich im Flüssigpflanzenmodell als gut induzierbar gezeigt hatten. In Erdpflanzen lieferten diese Experimente jedoch keine verlässlichen reproduzierbaren Ergebnisse. Bei der Wiederholung dieser Experimente zeigte sich auch, dass Gene, die zuvor zu einem der Zeitpunkte im Vergleich zur Kontrolle hochreguliert waren, plötzlich nicht mehr reguliert waren oder niedriger als in der Kontrolle. Daher wurde für eine Untersuchung möglicher Marker-Gene aus dem RNA-Seq entschieden nur unbehandelte Blätter zu verwenden, was jedoch nur einen Vergleich mit den MeOH Behandlungen aus dem RNA-Seq erlaubte. Zudem wurden nicht nur die 4 Genotypen auf ihre Expression hin untersucht, sondern auch der Ökotyp *Landsberg erecta*, da ebenfalls geplant war, die Mutanten mit diesem Ökotyp zu kreuzen (siehe 4.5.2). Für die Analyse wurden Blätter von jeweils 3 unbehandelten, 6 Wochen alten Erdpflanzen geerntet und die Genexpression untersucht.

Tab.4.7 ATG Nummern mit zugehörigen Gennamen, sowie deren Regulation verglichen mit der *GST6::LUC* Kontrolle in Flüssig- und Erdpflanzen und ob diese Regulation auch durch qPCR in weiteren Replikaten zu finden war

ATG Nummer	Genname	Regulation laut RNA-Seq in	Tendenz in qPCR bei Flüssigpflanzen	Tendenz in qPCR bei Erdpflanzen
AT2G47180	<i>GOLS1</i>	<i>coe3</i> nach PGA höher	ja	bei <i>coe3</i> in unbehandelten Blättern höher
AT5G59310	<i>LTPIV.4</i>	<i>nr2</i> nach MeOH niedriger	nein	bei <i>nr2</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT1G17180	<i>GSTU25</i>	<i>coe3</i> nach MeOH höher	nein	bei <i>coe3</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT1G15520	<i>PDR12</i>	<i>coe3</i> nach MeOH niedriger	nein	bei <i>coe3</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT1G10585	<i>TF10585</i>	<i>nr1</i> nach PGA niedriger	ja	bei <i>nr1</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT2G29460	<i>GST22</i>	<i>nr1</i> und <i>nr2</i> nach PGA niedriger	für <i>nr1</i> ja, <i>nr2</i> nein	bei <i>nr1</i> höher, bei <i>nr2</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT2G14610	<i>PR1</i>	<i>nr2</i> nach MeOH und PGA höher	ja	bei <i>nr2</i> kein Unterschied zur Kontrolle
AT1G76680	<i>OPR1</i>	<i>nr2</i> nach MeOH niedriger	nein	bei <i>nr2</i> kein Unterschied zur Kontrolle

Betrachtet man die verschiedenen Gene, die untersucht wurden, so ließ sich bei keinem der Experimente die Tendenz, die man nach dem RNA-Seq oder auch den Flüssigpflanzen Experimenten erwarten würde, bestätigen. Für den Genotyp für den die unterschiedlichen Gene als Marker ursprünglich gedacht waren, konnte man sie daher nicht einsetzen. Allerdings zeigte sich durch die Untersuchung aller Mutanten, dass manche der Gene sich in Erdpflanzen vielleicht als Marker für andere Mutanten eignen würden, für die sie ursprünglich eigentlich nicht gedacht waren. Dies waren für die Mutante *nr1* die Gene *PR1* und *PDR12*. Ihre Expressionsdaten sind in Abb.4.31 dargestellt.

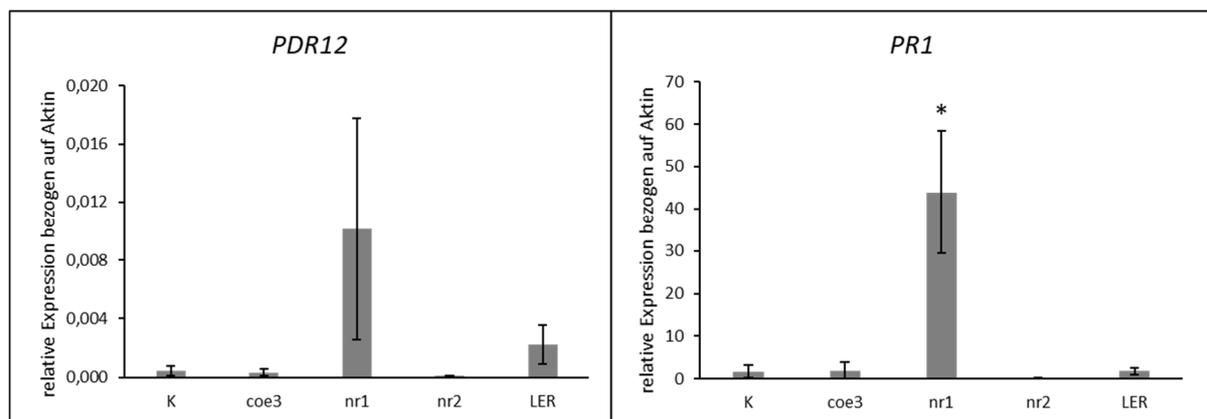


Abb.4.31 Relative Genexpression ± Standardabweichungen, bezogen auf *AKTIN*, von *PDR12* und *PR1* in je 3 unbehandelten 6 Wochen alten Erdpflanzen. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Bei diesen Daten handelt es sich jedoch um Mittelwerte aus mehreren biologischen Replikaten. Um die Gene tatsächlich zur Selektion einsetzen zu können, war es nötig deren Expression in einzelnen Pflanzen der Kontrolle und *nr1* zu messen und zu vergleichen.

Zur Analyse wurden *GST6::LUC* bzw. *nr1* Pflanzen verwendet, die parallel zu den zu selektionierenden F2 Pflanzen angezogen wurden. Die qPCR Ergebnisse der beiden Gene sind in Abb.4.32 gezeigt. Da von jeder Pflanze nur ein technisches Replikat angefertigt wurde, war es nicht möglich hier Standardabweichungen anzugeben.

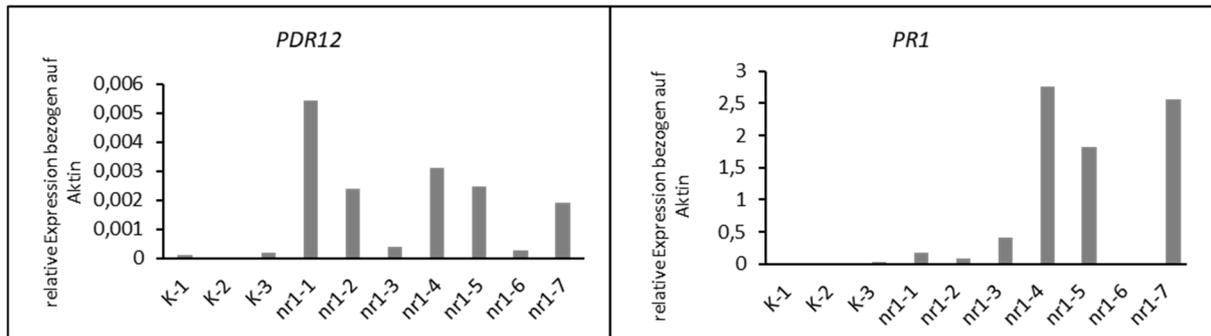


Abb.4.32 Relative Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *AKTIN*, von *PDR12* und *PR1* unbehandelten 6 Wochen alten Erdpflanzen. Es wurden 3 *GST6::LUC* Pflanzen als Kontrolle verwendet und 7 Pflanzen der *nr1* Mutante.

Wie sich durch diese Experimente zeigte, schwankten die Werte für die Gene *PR1* und *PDR12* extrem stark. Teilweise waren die niedrigsten Werte bei der *nr1* sogar kleiner als die höchsten Expressionswerte bei der *GST6::LUC*. Dies machte eine Verwendung der Genexpression als Marker für die Isolation von F2 Pflanzen, die homozygot für die Mutation waren, unmöglich.

#### 4.5.1.2 *nr1*: Selektionierung von Pflanzen für die Genkartierung

Das Ziel dieses Projektes ist die Identifikation der mutierten Stelle im Genom der einzelnen Mutanten, welche für den jeweiligen Phänotyp verantwortlich ist. Dafür musste eine Kartierungspopulation hergestellt werden. Um diese zu erhalten wurden zuerst die Mutanten mit der Ausgangslinie *GST6::LUC* gekreuzt. Für die Kreuzungen mit *GST6::LUC* wurden die Blüten der Mutanten mit dem Pollen der *GST6::LUC* Linie befruchtet. Hier konnte eine erfolgreiche Kreuzung über einen Luciferase-Assay überprüft werden. Bei erfolgreicher Kreuzung zeigten alle F1 Pflanzen vor und nach PGA Gabe eine Luciferase-Reaktion wie die *GST6::LUC* Linie. Von diesen F1 Pflanzen wurden Samen geerntet und diese F2 Generationen dann für die Selektionierung von Pflanzen verwendet, die homozygot für den Mutantenphänotyp waren.

Wie bereits oben erwähnt konnten keine weiteren Marker gefunden werden, die sich zur eindeutigen Identifizierung von für die Mutation homozygoten F2 Pflanzen eignen. Daher wurde beschlossen, die Pflanzen nach dem Phänotyp zu selektionieren, nachdem sie auch für diese Arbeit ausgewählt wurden: ihre reduzierte Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe. Je ein Samen einer F2 Pflanze wurde in einem Loch einer 96 Well Platte platziert. Zusätzlich wurden zum Vergleich auf jeder dieser Platten je eine 8er Reihe mit *GST6::LUC* und eine mit *nr1* Samen bestückt. Die Pflanzen wurden wie im Material- und Methodenteil beschrieben angezogen, mit PGA behandelt und die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Pflanzen, die im Vergleich mit der *GST6::LUC* Kontrolle eine niedrigere und im Vergleich mit der *nr1*

eine ähnliche Aktivität aufwiesen, kamen in Erde. Die Erdpflanzen konnten nun unter Kurztagbedingungen wachsen. Nachdem ihnen im Alter von ungefähr 6 Wochen Blattmaterial für die DNA Isolation entnommen wurde, konnten sie blühen und die Samen abreifen. Diese F3 Samen wurden erneut in 96 Well Platten ausgelegt. Diesmal jedoch von jeder Pflanze 8 Samen, je einer pro Well. Eine erneute Behandlung mit PGA und Messung der Luciferase konnte nun zeigen ob die F2 Pflanzen wirklich homozygot waren. Zeigten alle 8 F3 Keimlinge ein geringeres Leuchten als die *GST6::LUC* Kontrolle war die F2 Pflanze von der sie stammten homozygot. Nur das Blattmaterial der homozygoten F2 Pflanzen wurde zur DNA Isolation herangezogen.

Die DNA wurde wie im Material-und Methodenteil beschrieben aufbereitet und anschließend zum sequenzieren zur GATC Biotech AG in Konstanz geschickt. Die Computerprozessierung der Daten wurde von Prof. Dr. Arthur Korte am Center for Computational and Theoretical Biology (CCTB) der Universität Würzburg durchgeführt. Bei der *GST6::LUC* wurde eine Abdeckung der Genomsequenz (inklusive des Mitochondrien- und Chloroplastengenoms) von 35 erreicht, bei der *nr1* von rund 40. Ein Vergleich der beiden Genome mit dem Referenzgenom, welches bei TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) hinterlegt ist, hat gezeigt, dass bei der *GST6::LUC* 852 SNP's, 956 Insertionen und 542 Deletionen im Vergleich zum Referenzgenom auftraten. Bei der *nr1* Mutante waren es 904 SNP's, 950 Insertionen und 524 Deletionen. Vergleicht man die *GST6::LUC* und *nr1* gibt es eine Überlappung in 784 SNP's, 888 Insertionen und bei 492 Deletionen. Dies bedeutet, dass sich *GST6::LUC* und *nr1* in 120 SNP's, 62 Insertionen und 32 Deletionen voneinander unterscheiden. Zur weiteren Analyse wurden nur die SNP's herangezogen. Mit Hilfe von SHOREmap v3.5 (Schneeberger et al., 2009) wurden die Daten weiter prozessiert und das Ergebnis mit Hilfe des Programms R graphisch in Abb.4.33 dargestellt.

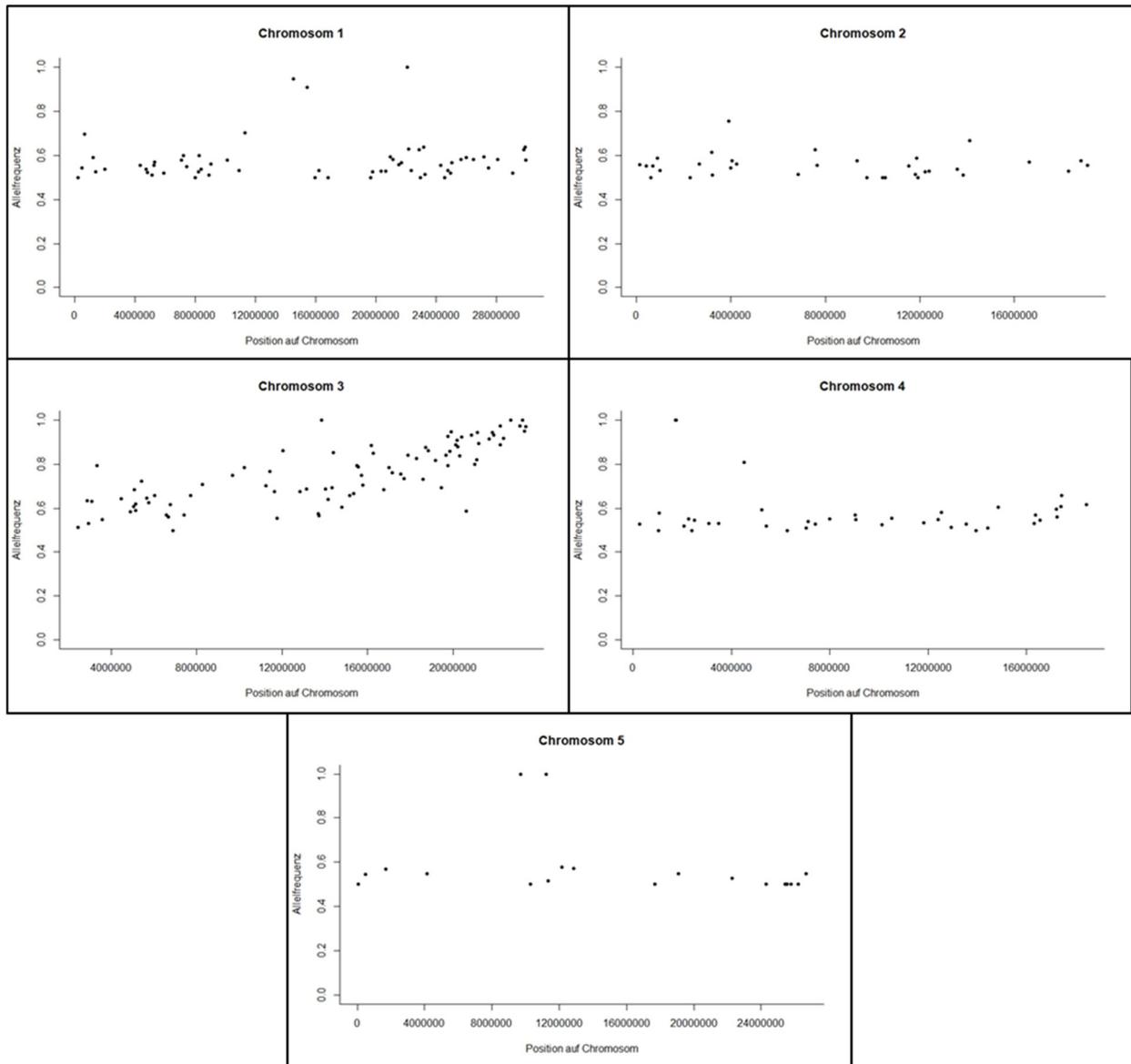


Abb.4.33 Abgebildet sind die SNP's auf den Chromosomen 1 bis 5 der *nr1* nach dem Anwenden verschiedenen Qualitätsfilter. Kommt der betrachtete SNP (schwarzer Punkt) in der untersuchten F2 Population (50 Pflanzen) zu gleichen Teilen aus dem *GST6::LUC* Hintergrund und aus dem *nr1* Hintergrund besitzt es eine Allelfrequenz von 0,5. Das bedeutet dass in der F2 Population 50 % der Pflanzen das *nr1* Allel aufweisen und 50 % das Allel aus *GST6::LUC*. Je mehr sich diese Frequenz 1 nähert, desto öfter kommt der betrachtete SNP aus dem *nr1* Genom-Hintergrund und desto seltener aus dem der *GST6::LUC*. Die Abbildungen wurden mit R erstellt aus den Daten die nach der Prozessierung mit SHOREmap v3.5 zur Verfügung standen.

Die Abb.4.33 zeigt eine graphische Darstellung des „Mapping“-Ergebnisses. Bei allen Chromosomen fanden sich immer wieder SNP's die eine Allelfrequenz von rund 1 hatten. Durch die bei der Meiose stattfindende Rekombination ist es jedoch sehr unwahrscheinlich, dass nur der Marker, welcher ursächlich für den Mutanten Phänotyp ist, vom Rekombinationsereignis betroffen ist. Meist ist es so, dass SNP's, die etwas weiter von diesem für den Phänotyp ursächlichen SNP liegen ebenfalls mit rekombiniert werden, je weiter sie von diesem, SNP entfernt liegen, desto stärker nimmt ihre Rekombinationshäufigkeit zu. Dies hat zur Folge, dass sich eine Art „Berg“ ausbildet, mit einem

allmählichen Anstieg der Allelfrequenz hin zu 1. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen entfielen alle einzelnen SNP's, die eine Allelfrequenz von rund 1 zeigten. Ein allmählicher Anstieg dagegen konnte am Ende von Chromosom 3 beobachtet werden, was den Schluss zuließ, dass die kausale Mutation in diesem Bereich zu finden war. Die 5 wahrscheinlichsten Gene die ursächlich für den reduzierten Luciferase-Phänotyp in der *nr1* sind zeigt Tab.4.8.

Tab.4.8 ATG Nummern der 5 Gene der *nr1*, mit zugehörigen Gennamen bzw. Beschreibungen aus TAIR und den Allelfrequenzen der jeweiligen Marker

<b>AT3G56040</b>	UDP-glucose Pyrophosphorylase 3	94,8 %
<b>AT3G60120</b>	Beta glucosidase 27 (BGLU27)	97,4 %
<b>AT3G61340</b>	F-Box Protein	100 %
<b>AT3G62900</b>	CW-type Zinc Finger	100 %
<b>AT3G63300</b>	forked1	97 %

#### 4.5.2 *Coe3*: Grobkartierung mittels SSLP

Aus finanziellen Gründen konnte nur eine der 3 hier betrachteten Mutanten auf oben beschriebene Art und Weise kartiert werden. Damit der *nr1* bereits eine der beiden weniger responsiven Mutanten näher betrachtet wurde, sollte die *coe3* als einzige konstitutiv aktive Mutante näher untersucht werden. Um zumindest einen Eindruck zu bekommen auf welchem Chromosom und bestmöglich auf welchem Chromosomenarm die Mutation lokalisiert ist, sollte mit dieser Mutante eine Grobkartierung durchgeführt werden, da diese bereits mit geringerem finanziellem Aufwand realisierbar war. Dazu musste die Mutante, welche von einem *Columbia-0* Ökotyp stammte, mit einem anderen Ökotyp gekreuzt werden, hier *Landsberg erecta*. Da die Ökotypen sich an definierten Stellen auf jedem Chromosom mit repetitiven Basenabfolgen in ihrer Länge unterscheiden (single sequence length polymorphism = SSLP) kann dieser Unterschied mittels einfacher PCR und anschließender Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden. Auch bei diesen Kreuzungen wurde mangels einer besseren Alternative ausschließlich über den Luciferase-Phänotyp selektioniert. Zunächst wurden *LER* Pflanzen mit Pollen der *coe3* Pflanzen bestäubt. Eine erfolgreiche Kreuzung konnte mittels Test auf Luciferase-Aktivität in den resultierenden F1 Pflanzen überprüft werden. Diese Pflanzen bestäubten sich selbst und die entstehende F2 Generation wurde auf basal erhöhte Luciferase-Aktivität untersucht. Keimlinge, die eine erhöhte Aktivität aufwiesen, wurden in Erde überführt und nach 5 Wochen erneut auf basal erhöhtes Leuchten überprüft. Anschließend wurden Blätter für die spätere DNA Isolation geerntet und die Samen der F2 Pflanzen erneut ausgelegt. Hierfür wurden von jeder F2 Pflanze 12 F3 Samen ausgelegt und auf basale Luciferase-Aktivität überprüft. Bei Pflanzen, die in der F2 Population homozygot für ein erhöhtes Leuchten waren, zeigten alle Keimlinge der F3 Generation ebenfalls ein erhöhtes Leuchten. Waren die F2 Pflanzen heterozygot, zeigten in der F3 Generation

mehrere Keimlinge kein erhöhtes Leuchten. Von den homozygoten F2 Pflanzen wurde die DNA isoliert und mittels PCR sowie anschließender Gelelektrophorese die in Abb.4.34 grün markierten SSLP's untersucht.

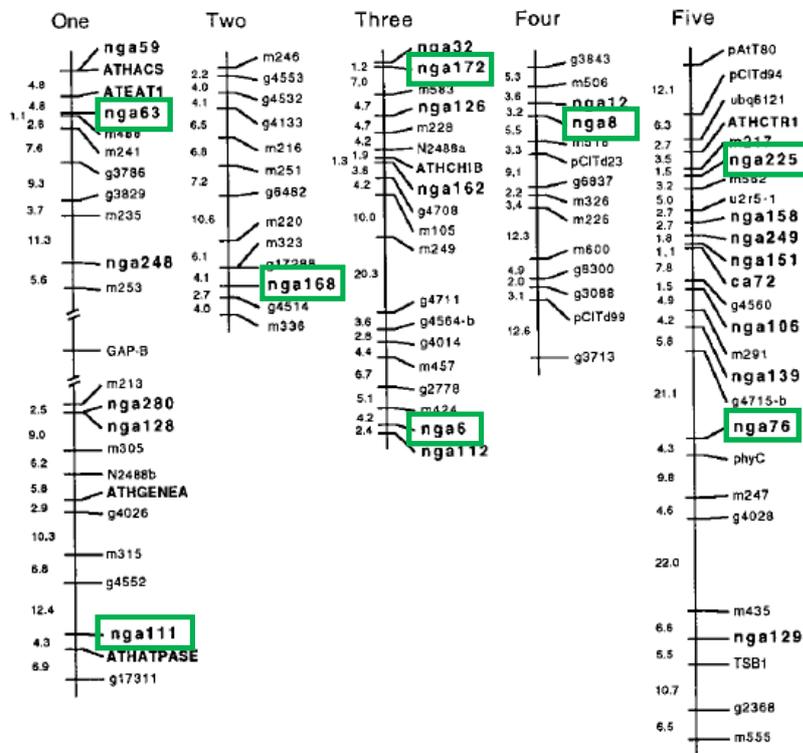


Abb.4.34 SSLP's und ihre Positionen im *Arabidopsis thaliana* Genom. Grün markierte SSLP's wurden in dieser Arbeit verwendet. Quelle: Bell and Ecker, 1994 „Assignment of 30 Microsatellite Loci to the Linkage Map of Arabidopsis“

Tab.4.9 SSLP's und ihre Herkunft in den getesteten F2 Pflanzen, sowie Berechnung der Rekombinationshäufigkeit

Chromosom	1	2	3	4	5			
SSLP	nga111	nga63	nga168	nga172	nga6	nga8	nga225	nga76
Allele <i>LER</i>	25	23	9	23	21	15	8	
Allele <i>Col-0</i>	47	49	63	49	51	57	64	48
Rekombinationshäufigkeit	34,72	31,94	12,50	31,94	29,17	20,83	11,11	0,00

Der Vergleich der Längen dieser SSLP's gab Aufschluss darüber, ob diese aus dem *LER* Hintergrund oder aus dem von *Columbia-0* kamen. Da diese Selektionierung und das Nachtesten der F3 Generation extrem zeitaufwendig waren, konnte die für eine gesicherte Aussage angestrebte Menge von mindestens 50 homozygoten F2 Pflanzen nicht erreicht werden. Die Arbeit wird jedoch weiter fortgeführt und im Rahmen dieser Arbeit kann ein vorläufiges Ergebnis abgebildet werden. Bisher wurden 36 F2 Pflanzen getestet. Bei diesem Experimentieransatz sollte nicht nur 1 Bereich gefunden werden, der aus dem *Col-0* Hintergrund stammt sondern 2, da neben dem Merkmal „erhöhte

Luciferase-Aktivität“ auch nach dem Merkmal „Luciferase“ selektiert werden musste. Es sollten also im Verlauf dieses Experimentes sich 2 Bereiche herauskristallisieren die eine Rekombinationsfrequenz von unter 50 % aufweisen. Derzeit ist dies noch bei allen getesteten SSLP's der Fall. Dies kann aber eine Folge der zu geringen Probenmenge sein. Es zeigen sich jedoch bereits SSLP's mit einer recht hohen Rekombinationshäufigkeit. Dies sind zum einen nga111 und nga63, die beide auf Chromosom 1 lokalisiert sind. Auch nga172 und nga6 zeigen verhältnismäßig hohe Rekombinationsraten, auch diese beiden liegen auf einem Chromosom, dem 3. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden Phänotypen, auf die selektioniert wurde, nicht auf Chromosom 1 und 3 liegen. Dies kann den zu testenden Bereich schon deutlich einschränken, aber es müssen noch mehr Proben dazu analysiert werden. Am wahrscheinlichsten ist eins der beiden Merkmale auf Chromosom 5 lokalisiert, da die Sequenzierung der *GST6::LUC* ergab, dass das *GST6*-Lucifersae Konstrukt auf Chromosom 4 liegt und ab Basenpaar 14.550.557 beginnt. Durch die geringe Rekombinationsrate auf Chromosom 5 ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass sich die *coe3* Mutation auf Chromosom 5 befindet.

## 5. Diskussion

RES-Oxylipine sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen in Pflanzenzellen beteiligt. Auch eine Menge an Genen wird durch RES-Oxylipine beeinflusst. Besonders hervorzuheben sind die Gene für die Detoxifizierung und abiotischen Stress. Wie die Pflanze RES-Oxylipine wahrnimmt und deren Signal weiterleitet und letzten Endes in eine Antwort umwandelt ist noch nicht näher bekannt. Es gibt jedoch verschiedene, eingangs beschriebene, Möglichkeiten wie RES-Oxylipine durch die Pflanze perzipiert werden. Die Untersuchung der drei in dieser Arbeit vorgestellten Mutanten soll dabei helfen diesen Vorgang der Wahrnehmung, Signalweiterleitung und Umwandlung zu verstehen und die beteiligten Proteine und Moleküle zu identifizieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Mutanten wurden bereits am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie generiert und auf ihre Luciferase-Aktivität vor bzw. nach PGA-Gabe hin selektioniert. Zudem wurde die Genexpression des Gens *TOLB* und *GST6* in einigen wenigen Replikaten untersucht und zeigte basal erhöhte Werte für die *coe3* und niedrigere Werte für die *nr1* und *nr2* nach PGA-Gabe.

Als erstes konnte, in dieser Arbeit, gezeigt werden, dass diese Mutanten zum einen homozygot für ihre Mutation sind und zum anderen diese rezessiv vererbt wird. Diese Tatsachen stellen wichtige Voraussetzungen für die spätere Lokalisation der Mutation dar. Ein weiterer Punkt, der in diesem Zusammenhang geklärt werden konnte, war die Frage, ob die Mutanten zueinander allel sind. Dies ist hier jedoch nicht der Fall. Bis zu diesem Punkt kann man also sagen, dass es sich um 3 Mutationen handelt die nicht Allel zueinander sind, homozygot in den Mutanten vorliegen und rezessiv vererbt werden. Da in dieser Arbeit Mutanten im RES-Oxylipin Signalweg untersucht werden sollten, galt es noch auszuschließen, dass die Mutanten eine erhöhte oder erniedrigte Produktion an RES-Oxylipinen aufweisen. Solche Mutanten sind bereits untersucht und ihre Phänotypen beschrieben. Zu ihnen zählen die *aos* Mutante, die kein OPDA herstellen kann, oder die *hpl3* Überexprimierer die unter Trockenstress verstärkt OPDA bilden (Savchenko et al., 2014). Wichtig für diese Arbeit war es zu zeigen, dass die *coe3* keine basal erhöhte Produktion an OPDA aufweist, was eindeutig belegt werden konnte. Auch die anderen beiden Mutanten zeigen keine veränderten Phytohormonspiegel.

### 5.1. Die *nr1* Mutante

Ein weiterer markanter Phänotyp der *nr1*, abseits der Luciferase-Reaktion, ist das spätere Blühen bzw. verzögerte Wachstum. Mutanten die ein verzögertes Blühen aufweisen und kleiner wachsen sind bereits beschrieben. Sie besitzen einen Defekt in der Biosynthese des Hormons Gibberellinsäure. Zu ihnen zählen die *ga1-ga5* Mutanten, aber auch die *ddf1* Mutante (Koornneef and van der Veen, 1980;

Magome et al., 2004). Bei der *ddf1* Mutante lassen sich einige Parallelen zur *nr1* finden. Bei der beschriebenen Mutante handelt es sich um eine Mutante mit kleinerem Wuchs und späterem Blühen, jedoch zeigt sie eine normale Keimungsrate und auch die Blütenmorphologie gleicht der des WT. Zudem hat sie sich in Experimenten mit NaCl als resistenter erwiesen, verglichen mit dem WT (Magome et al., 2004). Auch dies konnte bei der *nr1* beobachtet werden. Allerdings konnten die Autoren der Publikation zeigen, dass die Mutation dominant vererbt wird, was dafür spricht, dass es sich bei der *nr1* um eine andere Mutation handelt. Des Weiteren zeigt sich bei der Betrachtung der Kreuzung zur Selektionierung von F2 Pflanzen, dass dort der Phänotyp des späteren Blühens nicht mit dem der geringeren Luciferase-Aktivität korreliert. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass diese Mutante zwei verschiedenen Mutationen besitzt. Eine, die für eine reduzierte Luciferase-Aktivität sorgt und in dieser Arbeit durch Selektion fokussiert wurde, sowie eine, die für das geringere Wachstum und den später Blühzeitpunkt verantwortlich ist, aber nicht mit dem Luciferase-Reportersystem selektioniert werden kann.

Die Analyse des Metaboloms von unbehandelten Erdpflanzen brachte einen weiteren interessanten Phänotyp der *nr1* zum Vorschein. Die Spiegel an Arginin in den Blättern unterscheiden sich deutlich von denen der *GST6::LUC* Pflanzen. Arginin weist die höchste Stickstoff-zu-Kohlenstoff-Ratio auf und wird daher von Pflanzen als Speicher für Stickstoff verwendet (siehe Review Winter et al., 2015). Erhöhte Mengen dieser Speicherasminosäure könnten also in einer erhöhten Aufnahme von Stickstoff begründet sein. Da Arginin jedoch auch Ausgangspunkt für die Synthese zahlreicher Sekundärmetabolite ist (siehe Review in Winter et al., 2015), kann ein erhöhter Spiegel auch durch eine gestörte „Weiterverarbeitung“ von Arginin zu Stande kommen. Einen Einblick, welche Theorie wahrscheinlicher ist, bietet hier das durchgeführte RNA-Sequenzierungs-Experiment.

Für die Metabolomanalyse wurden unbehandelte Erdpflanzen verwendet, und mit den RNA-Seq Daten von MeOH behandelten Keimlinge verglichen. Dabei zeigt sich, dass zahlreiche Gene, deren Produkte an Signalwegen beteiligt sind, runterreguliert sind sowie eine Vielzahl weiterer Gene, zu denen auch einige Glucosinolatsynthese Gene gehören. Gleichzeitig zeigt sich, dass viele Gene für proteolytische Enzyme hochreguliert sind. Dies alles spricht dafür, dass weniger Arginin weiterverarbeitet wird und durch erhöhte Proteolyse größere Mengen Stickstoff freigesetzt werden, die dann in Form von Arginin gespeichert werden. Im RNA-Seq hat sich außerdem gezeigt, dass etliche Gene runterreguliert sind, deren Produkte an der Bildung von PR-Proteinen beteiligt sind, unter ihnen finden sich auch einige *PDF* Gene. Interessanterweise sind zudem einige Hitzeschockproteine in der *nr1* leicht stärker exprimiert als bei der Kontrolle. Ob die *nr1* jedoch hitze- oder trockenstressresistenter ist, lässt sich nicht eindeutig sagen. In den Trockenexperimenten hat sich zwar gezeigt, dass sie besser mit Trockenheit zurechtkommt als die Kontrolle aber ihr langsames Wachstum macht einen Vergleich mit

gleichaltrigen Kontrollpflanzen schwierig. Bemerkenswert bei der Betrachtung der RNA-Seq Daten ist die Menge an Genen, die sich vor allem nach PGA Behandlung zwischen *nr1* und der Kontrolle unterscheiden (639 bei MeOH Behandlung zu 1227 nach PGA Behandlung). Die meisten dieser Gene unterschieden sich jedoch nur sehr gering mit einem logarithmischen „Foldchange“ von weniger als 2. Nimmt man diese Gene alle aus der Betrachtung heraus ergibt sich das Venn-Diagramm aus Abb.4.11. Hier zeigt sich, dass sogar mehr Gene vor als nach der PGA Behandlung unterschiedlich in der *nr1* exprimiert werden. So sorgt die PGA Behandlung nicht nur für eine Unterscheidung auf Luciferase-Ebene (*GST6::Luc* starkes Leuchten gegenüber *nr1* geringes Leuchten), sondern auch für einen stärkeren Unterschied auf Transkriptomebene, da die Menge an überlappenden Genen abnimmt. Allgemein müssen die Ergebnisse des RNA-Seq-Experiments mit Vorsicht betrachtet werden, da aus Platz und Kostengründen die Probenmengen stark reduziert werden mussten. Dies hat zur Folge, dass für einige Genotypen und Behandlungen nur 1 Replikat gemessen werden konnte. Durch die viel zu geringe Anzahl an Proben, kann keine signifikante Aussage über die Genexpressionen in den einzelnen Mutanten unter den jeweiligen Behandlungen getroffen werden. Das RNA-Seq Experiment kann aber einen Einblick geben in welche Richtung die Genexpression verändert ist.

Dies hat sich vor allem bei der Untersuchung der Gene mittels qPCR gezeigt. Zwar konnten für einige Gene die Tendenzen, die im RNA-Seq beobachtet wurden, bestätigt werden, verglichen mit dem RNA-Seq waren die gemessenen Expressionsunterschiede jedoch deutlich geringer als erwartet und zudem häufig von hohen Standardabweichungen begleitet (siehe Abb.4.12). Eine Übertragung der Ergebnisse auf andere Anzuchtbedingungen (Wechsel von Flüssigkultur auf Erdpflanzenanzucht) hat leider gezeigt, dass diese im RNA-Seq gewonnenen Erkenntnisse nicht auf die Anzucht in Erde übertragbar sind. Regulationsunterschiede, die zuvor im RNA-Seq gefunden wurden und sogar mittels qPCR eine ähnliches Expressionsmuster aufwiesen, waren bei Anzucht auf Erde komplett anders reguliert (z.B. *GST22* und *TF10585*). Eine Ausweitung der qPCR Experimente durch das Testen aller bisher untersuchten Gene in allen Mutanten brachte für die *nr1* die veränderte Expression der Gene *PR1* und *PDR12* als „neue“ Phänotypen zum Vorschein. Das hier in den qPCR Experimenten hervorstechende *PR1*- Gen (AT2G14610) gehört zur *PR1* Gen Familie die, in *Arabidopsis*, aus 22 Paralogen besteht (van Loon et al., 2006). Sie werden vor allem bei Pathogenbefall stark exprimiert (Van Loon and van Strien, 1999). Dabei ist das *PR1* Gen AT2G14610 das einzige, welches sich bisher auch durch SA induzierbar gezeigt hat (van Loon et al., 2006). Aber auch durch abiotische Umweltfaktoren wie Salz und Trockenstress kann die Expression von PR-Genen induziert werden (Seo et al., 2008). Die Expression des *PR1* Gens kann sowohl durch Leucin-Zipper als auch durch Zink-Finger Transkriptionsfaktoren gesteuert werden (Durrant and Dong, 2004; Liu et al., 2013). Eine erhöhte Expression des *PR1* Gens sollte laut Liu et al., 2013 auch zu einer verstärkten Trockenresistenz führen, was jedoch auf Grund des bereits beschriebenen geringen Wachstums nicht mit Sicherheit für die *nr1* gesagt werden konnte.

Interessant ist aber, dass Seo et al., 2008 gezeigt haben, dass Salzstress ebenfalls für eine erhöhte Expression von *PR1* sorgt. Ob jedoch erhöhte Spiegel an *PR1* zu einer besseren Salztoleranz führen, wurde noch nicht untersucht. Da erhöhte *PR1* Spiegel zu erhöhter Trockenresistenz führen, liegt die Vermutung nahe, dass auch eine erhöhte Salzresistenz möglich ist. Interessanterweise kann hier bei der *nr1* ein Phänotyp beobachtet werden, der diese These stützt. Beim Wachstum auf salzhaltigen Agar zeigt sich, dass die *nr1* auch bei 200 mM NaCl weiter in das salzhaltige Medium hineinwächst, während die anderen Mutanten und die *GST6::LUC* von diesem weg wachsen.

Das zweite Gen, welches mittels qPCR eine deutliche Überexpression zeigt, ist *PDR12* (pleiotropic drug resistance). Dabei handelt es sich um einen ABC-Transporter, der bei der Detoxifizierung von Blei(II) eine entscheidende Rolle spielt. Beschrieben wurde er von Lee et al., 2005. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Transporter in der Plasmamembran lokalisiert ist und seine Expression durch Blei(II) stark induziert wird. *PDR12* transportiert Blei(II) aus dem Zytosol. Jedoch ist unklar, ob der Transport direkt oder indirekt funktioniert und ob weitere Substanzen, die durch Bleivergiftungen gebildet werden, mit diesem Transporter aus der Zelle heraus geschleust werden. In früheren Publikationen zeigt sich außerdem, dass die Transkriptionsrate von *PDR12* durch Pathogene oder Moleküle der Pathogenabwehr (inkl. SA, Jasmonsäure und Methyljasmonat) induziert werden kann (Campbell et al., 2003). Daher ist nicht auszuschließen, dass in der Mutante *nr1* durch einen geänderten Signalweg in der Pathogenabwehr auch das Gen *PDR12* in seiner Expression so verändert wurde, dass es zu einer stärkeren Expression kommt. Betrachtet man noch einmal beide Gene, *PR1* und *PDR12*, so sieht man deutlich die Unterschiede in den Transkriptmengen. Die Transkriptmengen bei *PDR12* sind in der Kontrolle schon extrem gering und bereits eine verhältnismäßig kleine Zunahme der Transkriptmengen in der *nr1* sorgt für einen deutlichen Anstieg der relativen Expressionsrate im Verhältnis zur Kontrolle. Zudem fallen natürliche Schwankungen der Transkriptanzahl hier deutlich stärker ins Gewicht, was sich in der größeren Standardabweichung widerspiegelt. Man muss den hier gefundenen Expressionsunterschied daher mit Vorsicht betrachten, da er sehr gering ausfällt. Deutlicher ist hier der Unterschied bei *PR1*. Das bereits basal verhältnismäßig stark exprimierte Gen wird in der Mutante noch deutlich stärker exprimiert und biologische Schwankungen fallen hier deutlich weniger ins Gewicht als bei *PDR12*, was man auch in der deutlich kleineren Standardabweichung sieht. Der Phänotyp der erhöhten *PR1* Expression scheint also robuster und damit realistischer als der der erhöhten *PDR12* Expression.

Alle bisher beobachteten Phänotypen geben zwar einen Einblick in die Mutante *nr1*. Die genaue Ursache der Phänotypen und ob diese alle durch die selbe Mutation ausgelöst werden, kann man jedoch erst sagen, wenn das mutierte Gen tatsächlich gefunden ist. Um das Gen zu finden, welches für den veränderten Luciferase-Phänotyp und vielleicht auch für die anderen Phänotypen verantwortlich

ist, wurde für diese Mutante das „Genome-Mapping“ Experiment durchgeführt. Die Mutante eignet sich dafür besonders gut, weil der Luciferase-Phänotyp des reduzierten Leuchtens besonders eindeutig aus den F2 Kreuzung heraus zu selektieren ist. Zwar war es angedacht weitere Phänotypen zur Kontrolle der selektierten Pflanzen heranzuziehen, jedoch haben sich die Schwankungen innerhalb der Population als viel zu stark erwiesen, was eine klare Aussage zur Zugehörigkeit einer Einzelpflanze anhand anderer Phänotypen schwierig macht. Getestet wurden das spätere Blühen, die erhöhte Salzresistenz und die Genexpression der Gene *PR1* und *PDR12*. Daher konnte nur auf den Luciferase-Phänotyp zurückgegriffen werden. Aber dies reichte aus um einen Bereich zu finden, in dem mit hoher Wahrscheinlichkeit das mutierte Gen liegt, welches die Ursache für den geänderten Luciferase-Phänotyp ist. Bei der homologen Rekombination, die während der Meiose auftritt, werden DNA Fragmente von zufälliger Größe zwischen den mütterlichen und väterlichen Chromosomen eines Chromosomenpaars ausgetauscht. Wird auf eine rezessive Mutation selektiert so ist es bei den F2 Pflanzen, die den Mutanten-Phänotyp zeigen, unwahrscheinlich, dass es in direkter Nähe des ursächlichen Gens ein solches Rekombinationsereignis stattfindet. Je weiter weg man jedoch vom, für den Phänotyp ursächlichen Gen, kommt, desto wahrscheinlicher wird ein Rekombinationsereignis. Hat ein betrachtetes Gen nichts mit dem für den Phänotyp ursächlichen Gen zu tun und liegt weit entfernt von diesem, so findet man in einer ausreichend großen Population eine Wahrscheinlichkeit von 50 %, dass das Gen von der Mutante stammt. Je näher man jetzt dem für die Mutation ursächlichen Gen kommt desto höher steigt die Wahrscheinlichkeit an und sollte um das betroffenen Gen bei 100 % liegen. Genau dieser allmähliche Anstieg kann auf Chromosom 3 beobachtet werden. Hier kommt es zu einem Anstieg am Ende des 3. Chromosoms. Was bedeutet, dass dort 100 % der Sequenzen mit denen aus der Mutante übereinstimmen. Ein genauer Blick auf diesen Bereich zeigt, dass dort 5 Gene lokalisiert sind, die alle eine Allelfrequenz von 0,94 oder mehr aufweisen. Was bedeutete, dass mindestens 94 % der sequenzierten Allele aus dem Mutanten-Hintergrund kommen. Diese 5 Gene sind in Tab.4.8 aufgeführt. Laut der TAIR Annotation handelt es sich dabei um eine BETA GLUCOSIDASE 27 (AT3G60120), ein F-Box Protein (AT3G61340), sowie ein CW-type Zink Finger Protein (AT3G62900) die entsprechend ihrer Sequenz annotiert wurden, aber noch nicht näher untersucht sind. Die verbleibenden 2 Gene wurden bereits näher untersucht und in Publikationen beschrieben. Bei diesen beiden handelt es sich um *FORKED 1* (AT3G63300) und die UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 3 (AT3G56040).

*FORKED1* ist daran beteiligt, dass die Blattvenen im distalen Bereich wieder zusammen kommen. Ist dieses Gen defekt bilden sich zwar Leitbündel aus, die dann jedoch einfach im distalen Bereich des Blattes enden. Zudem ist die Expression von Auxin-responsiven Genen gestört. Die Expression des Gens wird dabei durch Auxin gesteuert und das *FORKED1* Protein ist eine Komponente der autoregulatorischen Auxin Transportschleife. Dabei ist *FORKED1* für die Lokalisation des

Auxintransporters PIN1 entscheidend und somit maßgeblich an der Auxinverteilung während der Leitbündelentwicklung beteiligt (Hou et al., 2010). Es lässt sich hier durchaus eine Verbindung zwischen dem Auxin und der beobachteten verminderten Luciferase-Aktivität der *nr1* herstellen. In der Publikation von Chen et al., 1996 konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von Auxin die RNA Level von *GST6* ansteigen, was im Umkehrschluss bedeutet, dass *GST6* Expression durch Auxin induzierbar ist und somit auch das *GST6::LUC* Konstrukt in der *nr1*. Ob bei dieser Reaktion auf Auxin auch RES-Oxylipine eine Rolle spielen ist noch nicht geklärt. Es ist aber denkbar, dass bei den durchgeführten Experimenten mit Auxin der *GST6* Anstieg eine Reaktion auf chemischen Stress darstellt (Chen et al., 1996). Weitere leicht zu sehende Phänotypen scheinen *frk1*-Mutanten nicht zu besitzen. Die Struktur der Leitbündel sowie die Expression von Auxin-responsiven Genen wurde in der hier untersuchten *nr1* Mutante im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht, sind aber mit geringem Aufwand durchaus nachzuprüfen.

Das zweite Gen codiert für ein Enzym namens UDP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE 3 (UGP3), welches in der Chloroplastenmembran lokalisiert ist. Dort wandelt sie Glucose-1-Phosphat in UDP-Glucose, unter Verbrauch von UTP, um (Okazaki et al., 2009). Diese UDP-Glucose wird weiter umgewandelt zu Sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQDG) einem Lipid, welches in photosynthetisch aktiven Organismen weit verbreitet ist (Haines, 1973). Die genaue Rolle, die SQDG in diesen Organismen unter normalen Wachstumsbedingungen spielt, ist allerdings noch nicht untersucht. Ist jedoch die Produktion von SQDG gestört, führt dies bei den Pflanzen dazu, dass sie schneller unter Phosphatmangel leiden als WT Pflanzen (Benning et al., 1993). Bei Mutanten, die einen Defekt in dem Enzym UGP3 besitzen, konnte durch massenspektrometrische Analyse gezeigt werden, dass keinerlei SQDG produziert wird (Okazaki et al., 2009). Da auch bei der *nr1* eine ungerichtete Metabolomanalyse durchgeführt wurde, bei der auch die lipophilen Bestandteile extrahiert und analysiert wurden, wäre ein solch extremer Unterschied zwischen der *nr1* und der *GST6::Luc* Kontrolle festgestellt worden. Die Mutation in diesem Gen scheint also weder die Ursache für die reduzierte Luciferase-Reaktion zu sein, noch einen Einfluss auf die SQDG Spiegel zu haben. Bei der *nr1* bleiben also 4 Gene, die ursächlich für den Luciferase-Phänotyp sein können, übrig. Da die bisher dokumentierten Phänotypen sehr vielfältig sind, wäre es durchaus denkbar, dass Transkriptionsfaktoren, die unter anderem Zink-Finger Domänen besitzen können, oder F-Box Proteine ursächlich für den Phänotyp sind. Es ist aber auch durchaus denkbar, dass, wie bereits beschrieben, die verschiedenen Phänotypen durch verschiedene Mutationen hervorgerufen werden und nur eine davon für die geänderte Luciferase-Aktivität verantwortlich ist. Letztlich wurde in dieser Arbeit durch die Selektionsmethode auch nur auf diese Mutation fokussiert. Aufschluss kann hier nur ein Komplementationsexperiment bringen. Ist damit das Gen gefunden, welches die Luciferase-Aktivität beeinflusst, kann auch überprüft werden ob der „Knock-out“ dieses Gens im WT die anderen beobachteten Phänotypen aufweist.

## 5.2. Die *nr2* Mutante

Was bei der Kultivierung dieser Mutante sofort auffällt, vergleicht man sie mit der anderen nicht responsiven Mutante, ist ihr normales Wachstum, welches dem des WT gleicht. Setzt man die Mutante jedoch Trockenstress aus, so zeigt sich, dass sie diesen deutlich schlechter überlebt als die Kontrolle. Dass bei diesem Phänotyp durchaus RES-Oxylipine eine Rolle spielen können, zeigten Savchenko et al., 2014. Dabei beschreiben sie, dass OPDA für einen Stomataschluss sorgt und somit die Transpirationsrate in den Blättern verringert. Ein Vergleich der Phytohormonspiegel an ABA und OPDA zeigt dabei basal keinen signifikanten Unterschied, der hier untersuchten Mutanten zu einander oder zur Kontrolle.

Schaut man sich die Mutante auf Metabolomebene an, so zeigt die ältere Samencharge einen beeindruckenden Phänotyp. Die Mengen des Glucosinolates Glucoiberin sind um mehr als das 4-fache erhöht im Vergleich zum WT und die Glucosinolate Glucoerucin und Glucoraphanin, welche sich von Glucoiberin um nur 1-C Atom mehr in ihrer Seitenkette unterscheiden, sind um das 60- bzw. 10-fache geringer in der Mutante vorhanden als im WT. Auch nachfolgende Glucosinolate, deren Seitenketten stets um 1-C Atom zunehmen, sind in der Mutante in geringeren Mengen vorhanden als im WT. Glucosinolate sind sekundäre Pflanzenmetabolite, die der Pflanze zur Abwehr von Feinden, vor allem Fraßfeinden, dienen. Sie werden durch das Enzym Myrosinase in Zucker und Isothiocyanate gespalten. Diese Isothiocyanate stellen dabei die aktive Form dar und sorgen für einen bitteren Geschmack oder stechenden Geruch. Das Enzym Myrosinase ist dabei räumlich, meist in der Vakuole, von den Glucosinolen getrennt und nur durch Verwundung kommen beide in räumliche Nähe und können miteinander reagieren. Besonders hervorzuheben ist, dass die entstehenden Isothiocyanate zu den RES gehören, da sie besonders elektrophil sind. Andersson et al., 2015 konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass diese Isothiocyanate in der Lage sind auch als Signalmoleküle zu wirken. Sie sind fähig Zelltod zu induzieren und die hypersensitive Antwort als Abwehrreaktion gegen Pathogene auszulösen (Andersson et al., 2015). Bei der *nr2* hat sich jedoch gezeigt, dass dieser Phänotyp der geänderten Glucosinolatspiegel nicht mit dem der geänderten Luciferase-Aktivität gekoppelt ist. In den Folgegenerationen sind keine geänderten Glucosinolatspiegel mehr zu messen. Es würde sich aber anbieten für weitere Experimente, welche sich mehr mit Glucosinolaten und deren Signalwirkung oder Synthese beschäftigen, aus den verbliebenen Samen auf die geänderten Glucosinolatspiegel zu selektieren und so neue Einblicke in diese Bereiche der pflanzlichen Pathogenabwehr zu gewinnen. Allgemein muss bei diesen Metabolomexperimenten noch einmal ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass in dieser Arbeit nicht der finale Beweis erbracht wurde, dass es sich bei den gefundenen Massen tatsächlich um die beschriebenen Glucosinolate handelt. Andere Arbeitsgruppen am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie haben diese jedoch unter Verwendung von Referenzsubstanzen und Einsatz der gleichen Massenspektrometer gezeigt. Der

Vergleich der dabei gewonnenen Fragmentationsmuster und der in dieser Arbeit erhaltenen Fragmentationsmuster stimmt überein, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Massen zu den hier erwähnten Glucosinolaten gehören. Zusätzlich sollte eine Behandlung mit RES zeigen, ob sie auch hier eine veränderte Reaktion aufweisen. Wie sich gezeigt hat reagieren auch die in dieser Arbeit getesteten Mutanten auf diese RES mit einer Luciferase-Reaktion, die der nach PGA Gabe gleicht. Die Art der Seitenkette des Isothiocyanatmoleküls beeinflusst dabei die Intensität der Luciferase-Reaktion.

Die *nr2* reagiert kaum auf RES-Oxylipine, wie PGA, und auch bei Verwundung ist fast kein Signal zu erkennen. Auch die Behandlung mit gasförmigen MeOH, welches bei allen anderen Mutanten für einen Anstieg der Luciferase-Aktivitäten sorgt, zeigt keinerlei Wirkung auf die *nr2*. Dies wirft die Frage auf, ob es sich hier tatsächlich um eine Mutation des Signalweges handelt oder aber einen Defekt im Gen oder des Promotors der Luciferase. Dass es sich nicht um einen Defekt des Promotors handelt, konnte in dieser Arbeit eindeutig gezeigt werden. Dass das Luciferase-Gen nicht betroffen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr nachgeprüft werden. Es gibt aber durchaus auch Hinweise, dass die Luciferase funktionsfähig ist. Einen Hinweis darauf liefert die Behandlung mit dem RES-Oxylipin Hexenal (Abb.4.13). Neben der Induktion der Luciferase-Aktivität bei den anderen Mutanten sorgt Hexenal auch für eine deutlich sichtbare Induktion bei der *nr2*, welche sogar stärker ausfällt als bei den PGA behandelten *nr2* Pflanzen und durchaus in ihrer Intensität mit der der *nr1* vergleichbar ist. Endgültige Gewissheit, ob das Luciferase-Gen in der *nr2* mutiert ist, kann jedoch nur eine Sequenzierung bringen.

Wie alle anderen Mutanten auch, wurde auch die *nr2* auf Transkript-Ebene genauer betrachtet. Zuerst einmal zeigt sie bei der Expression von *GST6* und *TOLB* ein Muster, welches man auch vom Luciferase-Phänotyp aus erwarten würde, mit einer niedrigeren *GST6* und *TOLB* Expression nach PGA Behandlung. Der Unterschied in der *GST6* Expression zwischen Kontrolle und Mutante nach PGA Gabe fällt allerdings nur minimal aus. Thatcher et al., 2015 haben in ihrer Arbeit ebenfalls eine *GST6::LUC* Linie verwendet und konnten zeigen, dass bei ihrer untersuchten Mutante mit erhöhter Luciferase-Aktivität (*esr1* Mutante), keine erhöhte Expression des *GST6* Gens vorhanden war. Was wiederum zeigt, dass Genexpression und Luciferase-Aktivität nicht miteinander gekoppelt sein müssen. Es wurden aber nicht nur die beiden Gene *TOLB* und *GST6* betrachtet, sondern im Rahmen des RNA-Seq Experiments ein Blick auf das gesamte Transkriptom der *nr2* geworfen. Basal würde man hier kaum einen Unterschied zur Kontrolle erwarten, da der Hauptunterschied, nach dem die *nr2* selektiert wurde, eine geringere Luciferase-Aktivität nach PGA Gabe ist. Aber bereits basal unterscheidet sich die *nr2* massiv auf Transkriptionsebene von der Kontrolle. In mehr als 200 Genen findet sich ein deutlicher (log „Foldchange“ größer als 2) Expressionsunterschied zur Kontrolle. Ein Blick auf die MapMan

Auswertung zeigt, dass eine Vielzahl an Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen geringer exprimiert sind als in der Kontrolle (unter ihnen auch WRKY und bZIP Transkriptionsfaktoren) außerdem sind viele abiotische Stressgene in ihrer Expression erniedrigt. Es gibt aber auch Gene, die eine deutlich höhere Expression zeigen unter ihnen sind Gene, die an der Proteindegradation und an der Zellwandsynthese beteiligt sind. Überraschenderweise sorgt nun die Behandlung mit PGA für einen deutlich geringeren Unterschied auf Transkriptionsebene zwischen Kontrolle und Mutante. Von den ehemals mehr als 200 Genen bleiben gerade noch rund 50 übrig in denen sich Mutante und Kontrolle unterscheiden. Dies war unerwartet und machte es nicht möglich Gene zu finden, die sich als Markergene eignen würden, um so eine Kartierungspopulation aus einer Kreuzung heraus zu selektionieren. Aber wie bei der *nr1* gezeigt werden konnte, reicht die Luciferase-Aktivität aus um eine Kartierungspopulation aufzubauen. In dieser Arbeit konnte aus Zeitgründen jedoch nur die Kartierungspopulation für eine Mutante aufgebaut und analysiert werden. Da die *nr1* von Anfang an den stabileren Genotyp aufwies (siehe Glucosinolate bei der *nr2*), fiel die Wahl auf die *nr1*. Für die *nr2* Mutante konnten allerdings die F1 und F2 Kreuzungen mit der *GST6::LUC* hergestellt werden, sodass direkt mit der Selektionierung der homozygoten F2 Pflanzen begonnen werden kann.

### 5.3. Die *coe3* Mutante

Die dritte in dieser Arbeit beschriebene Mutante ist gleichzeitig auch die einzige Mutante, die ohne äußere Einwirkungen bzw. Stressbedingungen eine erhöhte Luciferase-Aktivität aufweist. Wie sich in dieser Arbeit herausgestellt hat, ist dies jedoch nicht ihr einziger Phänotyp. Inkubiert man abgeschnittene Blätter im Dunkeln so enthalten die Blätter der *coe3* nach 6 d Inkubation mehr Chlorophyll als gleichbehandelte Blätter der Kontrolle. Seltmann et al., 2010 konnten zeigen, dass es sowohl bei altersbedingter als auch bei Dunkelheit induzierter Seneszenz zu einem Anstieg von Oxylipinen kommt, zu denen auch das RES-Oxylipin OPDA gehört. Es wird allerdings auch klar hervorgehoben, dass es einen deutlichen Unterschied zwischen der natürlichen Seneszenz und der durch Dunkelheit induzierten Seneszenz gibt. Während bei der natürlichen Seneszenz ein moderater Anstieg an JA und OPDA, wobei die JA Spiegel höher sind als die von OPDA, gemessen werden kann, steigen die Werte an JA bei der dunkelinduzierten Seneszenz dramatisch an. Der Anstieg an OPDA ist bei der dunkelinduzierten Seneszenz dabei vergleichsweise niedrig (Seltmann et al., 2010). Dieser Anstieg an JA korreliert dabei nicht mit einem Anstieg der JA-Biosynthese-Gene wie z.B. *OPR3*, *AOS*, und *LOX2* (van der Graaff et al., 2006). Es wäre durchaus interessant in der *coe3* die Phytohormone und die Genexpression auch nach Dunkelinduktion zu messen und mit den publizierten Ergebnissen zu vergleichen. Liao et al., 2016 haben in ihrer Veröffentlichung eine Mutante vorgestellt, die anfälliger gegen *Botrytis cinerea* sowie *Pseudomonas syringae* ist und zudem einen stärkeren Effekt auf

dunkelinduzierte Seneszenz zeigt. Diese Mutante verhält sich also nach Dunkelinduktion genau entgegengesetzt zur *coe3*. Daher wäre das Verhalten der *coe3* unter biotischen Stressbedingungen von großem Interesse und sollte unbedingt untersucht werden. In dieser Dissertation wurde der Einfluss der dunkelinduzierten Seneszenz auf die Mutanten untersucht. Dabei zeigte nur die *coe3* einen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Zudem besitzen auch die im Licht inkubierten Blätter der *coe3* höhere Chlorophyllwerte, was die Vermutung nahe legt, dass diese Mutante bereits von Anfang an mehr Chlorophyll besaß. Nimmt man bei allen Mutanten eine gleiche Abbaurate an Chlorophyll an, so bleibt der *coe3* am Ende mehr Chlorophyll als den anderen Pflanzen. Diese Theorie konnte jedoch mit der Messung von Blättern, die nicht inkubiert worden sind widerlegt werden, da hier die *GST6::Luc* und die *coe3* vergleichbare Mengen an Chlorophyll aufwiesen. Für die dunkelinduzierte Seneszenz konnte gezeigt werden, dass die *coi1* Mutante (die eine Beeinträchtigung im JA-Signalweg aufweist) einen verlangsamten Chlorophyllabbau aufweist (Castillo and León, 2008). Auch eine Mutante, die eine Beeinträchtigung in der JA-Biosynthese besitzt, zeigt verlangsamten Chlorophyllabbau im Dauerdunkel (Castillo and León, 2008). Man könnte daher vermuten, dass andere Signalwege, wie die über RES-Oxylipine vermittelten Signale, bei der dunkelinduzierten Seneszenz eine Rolle spielen. Die *coe3* hingegen, die möglicherweise sensibler auf RES-Oxylipine reagiert oder deren Signalweg dauerhaft aktiv ist, simuliert so erhöhte RES-Oxylipinspiegel was wiederum zu einem verlangsamten Chlorophyllabbau führt. Einen genaueren Einblick könnte die Untersuchung von Genen geben, die während der Seneszenz verstärkt exprimiert werden. Zu ihnen gehören *SAG13* und *SEN1*, die sowohl bei der natürlichen Seneszenz als auch bei der Inkubation auf Sorbitol deutlich ansteigen, sowie auch nach Dunkelinkubation (Seltmann et al., 2010).

Während sich die *coe3* bei der dunkelinduzierten Seneszenz widerstandsfähiger als die Kontrolle gezeigt hat, ist sie bei Salzstress anfälliger als die Kontrolle oder andere Mutanten. Gibt man den Wurzeln die Möglichkeit, so versuchen sie bereits Salzkonzentrationen von 100 mM auszuweichen, bei 200 mM setzt dieses Ausweichwachstum bereits deutlich früher ein als das der Kontrolle und die Länge der Wurzeln von Keimlingen auf 100 mM NaCl sind die kürzesten aller 4 getesteten Genotypen auch wenn sie sich dabei nicht signifikant zu den anderen Genotypen unterscheiden. Es gibt zahlreiche Arbeiten die sich mit der Salztoleranz von *Arabidopsis* befassen. Seo et al., 2008 haben zum Beispiel gezeigt, dass PR Gene bei Salz stark hochreguliert werden und vor allem *PR3* für eine ABA abhängige Salzantwort der Pflanze sorgt. Eine fehlende Hochregulation solcher PR Gene könnte daher unter Salzstress zu einer erhöhten Sensibilität der Pflanze führen. Schaut man sich noch einmal die Genexpression der *coe3* Mutante im RNA-Seq Experiment an so sieht man, dass die Anzahl an hoch und runter regulierten PR-Genen fast gleich ist und deren Expressionsunterschiede zur Kontrolle sehr gering ausfallen. Auch die von Seo et al., 2008 beschriebenen PR-Gene tauchen in dieser MapMan Abbildung nicht auf. Da die PR-Proteine jedoch allein schon in 17 Familien unterteilt werden und allein

mehr als 20 Proteine in *Arabidopsis* eine *PR1* Domäne besitzen (van Loon et al., 2006), gibt es eine Vielzahl an PR-Genen die einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der *coe3* unter Salzstress haben können. Wie Seo et al., 2008 zudem gezeigt haben, führt der „Knock-out“ des *PR3* Gens zu einer deutlich verringerten Keimung auf salzhaltigem Agar. Dies ist besonders interessant, da auch die *coe3* eine signifikant schlechtere Keimung auf salzhaltigem Agar zeigt. Die Ursache für diese schlechtere Keimung liegt, wie bereits erwähnt, höchstwahrscheinlich nicht an einer geringeren Expression von PR-Genen. Aber die Keimung auf salzhaltigem Agar wird bei *Arabidopsis* entweder durch einen ABA-abhängigen Weg, in dem auch *PR3* involviert ist, oder einen ABA unabhängigen Signalweg reguliert (Seo et al., 2008). Bei diesem ABA unabhängigen Signalweg könnten auch RES-Oxylipine eine entscheidende Rolle spielen. Des Weiteren haben auch Sagor et al., 2016 mit ihren Untersuchungen zur zytoplasmatischen Polyamine Oxidase (PAO) gezeigt, dass eine Reduzierung von deren Aktivität zu einer Erhöhung der Salzresistenz führt. Die Polyamine Oxidase spielt eine wichtige Rolle im Polyamin (PA) Katabolismus und Pflanzen mit erhöhten PA-Spiegeln zeigen eine erhöhte abiotische Stresstoleranz während Pflanzen mit reduzierten PA-Spiegeln eine geringere Toleranz gegenüber abiotischen Stressen aufweisen (Berberich et al., 2015; Capell et al., 2004; Urano et al., 2003; Yamaguchi et al., 2007). *Arabidopsis* weist 5 PAO-Gene auf, deren Produkte im Zytoplasma (PAO1 und PAO5) bzw. in den Peroxisomen (PAO2, PAO3 und PAO4) zu finden sind (siehe Referenzen in Sagor et al., 2016). Werden die beiden Zytoplasmatischen PAO's ausgeschaltet, zeigt die daraus resultierende Doppelmutante eine erhöhte Salz- und Trockenheitsresistenz. Die Einzelmutanten hingegen sind alle salzsensitiver. Wie bereits erwähnt werden unter Salzstress auch ABA-abhängige und unabhängige Signalwege aktiviert. Sagor et al., 2016 konnten zeigen, dass dies auch hier der Fall ist. Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass PAO's Wasserstoffperoxid (welches zu den reaktiven Sauerstoffspezies gehört (ROS)) produzierende Enzyme sind (Mittler, 2002). ROS dienen dabei nicht nur zur Indizierung des programmierten Zelltodes, sondern dienen auch zur Übermittlung von Signalen die eine wichtige Rolle bei der biotischen und abiotischen Stressantwort spielen. Sagor et al., 2016, haben in ihrer PAO-Doppelmutante reduzierte ROS-Spiegel gemessen, was laut ihrer Vermutung zu reduziertem programmiertem Zelltod führt und der Mutante so ein besseres Überleben unter Salzstress ermöglicht. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass die *coe3* eine Veränderung in einem Signalweg aufweist, der auch die PAO's reguliert. Daher wäre eine Messung der ROS Spiegel, gekoppelt mit Expressionsanalysen, in der *coe3* unter basalen Bedingungen bzw. Salzstress eine gute Möglichkeit zu prüfen ob die Aktivität der PAO's hier verändert ist.

Da auch die *coe3* eine geänderte Reaktion auf Trockenstress zeigt, verglichen mit der Kontrolle, kann man wieder Vergleiche mit der Publikation von Savchenko et al., 2014 ziehen. Dabei konnten Savchenko et al., 2014 zeigen, dass die *opr3* Mutante, welche nur OPDA herstellen kann es aber nicht zu JA umwandelt, eine deutlich höhere Trockenresistenz aufweist als die Kontrolle. Außerdem

verringert sich durch die Gabe von OPDA, oder allgemein durch höhere OPDA Spiegel in der Pflanze, die Spaltöffnung der Schließzellen, was eine geringere Verdunstung zur Folge hat. Zudem sorgt die zusätzliche Gabe von Hexenal (ebenfalls ein RES-Oxylipin) dafür, dass sich der Spalt zwischen den Schließzellen weiter verkleinert als bei reiner Applikation von OPDA. Einen Mechanismus wie OPDA bei Trockenstress reguliert wird und zusammen mit ABA für einen Stomataschluss sorgt, ist jedoch noch unbekannt. Die *coe3* Mutante in dieser Arbeit zeigt basal keine höheren OPDA Spiegel und auch keine geringere Transpirationsrate, was auf stärker geschlossene Stomata hinweisen würde. Dennoch ist sie resistenter gegen Trockenstress. Es wäre also denkbar, dass in dieser Mutante eine Mutation vorliegt, die eine stärkere Reaktion auf RES-Oxylipine auslöst als gleiche Mengen RES dies bei WT Pflanzen tun würden oder aber Transkriptionsfaktoren dauerhaft aktiv sind, die in einer Signalkaskade so weit unten stehen, dass sie die Expression von Trockenstressgenen fördern aber keinen stärkeren Stomataschluss verursachen. Dies könnte dazu führen, dass die Pflanze bereits vor Beginn einer Trockenperiode besser darauf vorbereitet ist als andere Genotypen.

Wie bei Salz, spielt auch bei Trockenstress ABA eine wichtige Rolle. Um zu zeigen, dass dies bei der *coe3* jedoch nicht als Ursache für die Phänotypen infrage kommt, wurden zum einen die ABA-Spiegel gemessen und kein Unterschied festgestellt, zum anderen wurde die Keimung auf ABA haltigem Medium analysiert. Zwar konnte anfänglich ein Unterschied in der Keimung zwischen *coe3* und Kontrolle festgestellt werden, bei weiteren Wiederholungen erwies sich dieser jedoch nicht als robust. Somit kann zusammengefasst werden, dass auch hier die *coe3* keinen Unterschied zur Kontrolle zeigt. Dies deutet darauf hin, dass in der *coe3* keine geänderte ABA-abhängige-Signalkaskade vorliegt.

Ein Blick auf die Daten aus dem RNA-Seq Experiment kann die bereits oben erwähnte These der erhöhten Spiegel/Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren durchaus stützen. Zudem finden sich unter Kontrollbedingungen zahlreiche hochregulierte Gene. Darunter sind viele, die für Rezeptor-Kinasen aber auch Hitzeschockproteine und Proteine die an Degradationsprozessen beteiligt sind. Es gibt aber auch einige stark reprimierte Gene z.B. Zellwand assoziierte Gene, sowie Gene des Ethylensignalweges und Gene, die bei der Reaktion auf abiotischen Stress eine Rolle spielen. Nach PGA Behandlung von *coe3* Pflanzen finden sich hingegen deutlich weniger Unterschiede auf RNA Ebene zwischen Mutante und Kontrolle. Zudem sind fast alle basal unterschiedlich exprimierten Gene nach PGA Behandlung überexprimiert. Gene, die in der Mutante schwächer exprimiert werden, sind nach PGA Behandlung nicht zu finden. Allgemein betrachtet entsprechen die Ergebnisse des RNA-Seq Experiments genau dem, was erwartet worden war. Unter MeOH Einfluss, also Kontrollbedingungen, zeigt die *coe3* einen deutlich größeren Unterschied zur Kontrolle als unter Einfluss von PGA. Wie auch bei der *nr1* und *nr2* zeigt sich bei genauerer Betrachtung der Genexpression, dass die Expression des *GST6* Gens nicht mit der Luciferase-Aktivität korreliert. Zwar findet sich eine leicht erhöhte *GST6*

Expression, diese ist jedoch nur minimal und nicht signifikant, während der Luciferase-Phänotyp doch deutlich zu Tage tritt. Des Weiteren konnten im RNA-Seq Experiment einige Gene ermittelt werden, die sich signifikant von der Kontrolle unterschieden. Zu diesen Genen gehörten *PDR12*, *GSTU25* sowie *GOLS1*. Bei weiteren Untersuchungen der Genexpression zeigte sich jedoch, dass die Unterschiede nur selten (nur bei *GOLS1*) in Flüssigpflanzen und gar nicht in Erdpflanzen reproduzierbar waren.

Da keiner der bisher beschriebenen Phänotypen in der *coe3* sich zur Selektionierung eignet musste eine Selektionierung ausschließlich über den Luciferase-Phänotyp erfolgen. Im Gegensatz zur *nr1* wurde bei der *coe3* ein anderer Versuchsansatz verfolgt. Durch die Kreuzung mit dem Ökotyp *Landsberg erecta* ist es möglich anhand der unterschiedlichen Längen von definierten Sequenzabschnitten (SSLP) zu unterscheiden, ob der untersuchte Bereich von *Landsberg erecta* oder aus dem *Col-0* Hintergrund kommt. Da *Landsberg erecta* weder das Luciferase-Gen noch das Gen, welches für die erhöhte Luciferase-Aktivität verantwortlich ist trägt, muss bei der F2 Generation auf 2 Merkmale selektioniert werden. Bei der anschließenden Analyse der DNA Abschnitte müssten sich demnach 2 Bereiche herauskristallisieren, bei denen sich fast ausschließlich ein *Col-0* Hintergrund findet. Oder anders ausgedrückt die Rekombinationshäufigkeit sollte möglichst gering ausfallen. Damit diese eine robuste Aussagekraft hat, muss eine ausreichend große Anzahl an F2 Pflanzen untersucht werden, die homozygot für beide Merkmale sind (Luciferase und Mutation). Dies konnte in dieser Arbeit nicht vollständig erreicht werden. Es wurden nur 36 Pflanzen untersucht, anvisiert war eine Anzahl von 50 Pflanzen. Dieser Teil des Projektes wird jedoch fortgeführt, um die nötige Menge an Pflanzen testen zu können. Die hier gezeigten Ergebnisse zur Grobkartierung sind daher nur vorläufige Ergebnisse und können sich noch ändern. Es zeigt sich jedoch, dass die Rekombinationshäufigkeit auf Chromosom 2 und auf Chromosom 5 am niedrigsten ausfallen, weshalb man spekulieren kann, dass auf diesen beiden Chromosomen die Luciferase und die Mutation zu finden ist. Generell sind die Rekombinationsraten jedoch bei allen Chromosomen recht gering, da ab einer Rekombinationshäufigkeit von 50 % davon ausgegangen werden kann, dass die gesuchten Gene nicht gekoppelt sind, sprich nicht in der Nähe des untersuchten SSLP-Markers liegen. Bei der Selektionierung der F2 Pflanzen fiel auf, dass diese äußerlich stark *Col-0* geprägt waren. Es scheint daher möglich, dass die Ausprägung der gesuchten Mutation im *Col-0* Hintergrund stärker zum Vorschein tritt als in anderen Ökotypen wie z.B. *Landsberg erecta*. Dies hätte zur Folge, dass vor allem F2 Pflanzen selektiert werden, die einen starken *Col-0* Anteil in ihrem Genom aufweisen. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das verstärkte Auftreten von *Col-0* Markern in allen untersuchten SSLP's. Es wäre aber auch denkbar, dass die Menge an untersuchten Pflanzen noch zu gering ist, dann würden sich mit weiteren F2 Pflanzen die SSLP Marker auf den Chromosomen 1, 3 und 4 weiter der 50 % Marke annähern. Interessanterweise kann das „Genom-Mapping“ Experiment, welches mit der *nr1* durchgeführt wurde, bei der Frage helfen auf welchem Chromosom die Luciferase lokalisiert ist.

Durch Computeranalysen konnte gezeigt werden, dass sich die Luciferase auf dem 4. Chromosom befindet. Für dieses Chromosom wurde eine Rekombinationshäufigkeit von 20,8 ermittelt. Dies ist die dritt kleinste ermittelte Rekombinationshäufigkeit. Noch geringer ist nur die der bereits erwähnten Chromosomen 2 und 5. Es wäre eigentlich zu erwarten gewesen, dass das Luciferase-Gen auf dem Chromosom 2 oder 5 liegt. Da diese beiden Chromosomen jedoch eine niedrigere Rekombinationshäufigkeit aufweisen als das Chromosom 4, auf welchem eines der beiden Merkmale liegt, auf das auch selektioniert wurde, kann an der bisher noch zu geringen Probenmenge liegen. Um nun die Position des Gens einzukreisen, welches für den Mutantenphänotyp der *coe3* verantwortlich ist, würde es sich anbieten zuerst das Chromosom 5 näher zu untersuchen, da hier die geringste Rekombinationsrate festgestellt werden konnte. Aber auch ein detaillierter Blick auf Chromosom 2 sollte später durchgeführt werden. Durch die Wahl weiterer SSLP Marker kann so der Bereich, in dem sich das mutierte Gen befindet, weiter eingegrenzt werden. Dennoch darf die Selektionierung und Untersuchung der fehlenden F2 Pflanzen nicht vernachlässigt werden.

### ***5.4 Das GST6::Luc Reportersystem als Werkzeug im „Forward Genetic Approach“***

Mit dem in dieser Arbeit gewählten „Forward Genetic Approach“ und dem eingesetzten Reportersystem soll ein Einblick in den RES-Oxylipin Signalweg gewonnen werden. Dass sich die hier gewählte Methode und das eingesetzte Reportersystem (*GST6::Luc*) dafür eignen, konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen erfolgreich gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe um Singh hat in zwei Publikationen zeigen können, dass es möglich ist mit diesem Reportersystem Gene zu finden, deren Mutation für eine geänderte Luciferase-Aktivität sorgt und gleichzeitig neue Einblicke in die biotischen und abiotischen Stressreaktionen von *Arabidopsis* gibt. Die erste von ihnen in diesem Zusammenhang entdeckte Mutante wurde im Paper von Gleason et al., 2011 vorgestellt. Es handelt sich dabei um die *dsr1* Mutante (disrupted in stress response 1). Sie zeigt nach SA Behandlung verglichen mit der Kontrolle kaum Luciferase-Aktivität in den Wurzeln und ist anfälliger gegen bestimmte Stämme des Pathogens *Rhizoctonia solani*, sowie *Alternaria brassicicola*. Mittels Grobkartierung war es möglich die Mutation am distalen Ende von Chromosom 5 zu lokalisieren. In diesem Bereich wurde dann ein „Fein-Mapping“ durchgeführt, das letzten Endes eine Basenpaarmutation im Gen AT5G66760 zum Vorschein brachte. Diese Vorgehensweise entspricht genau der, die auch in dieser Arbeit für die Mutante *coe3* angedacht ist und bereits auch teilweise durchgeführt wurde. Das mutierte Gen in der *dsr1* kodiert für eine Flavoproteinuntereinheit von SDH (SDH1-1), welches ihrerseits Teil des Komplex II der Elektronentransportkette in Mitochondrien ist. Das überraschende an dieser Studie ist dabei, dass es gelungen ist eine Mutante zu erzeugen, deren Mitochondrien nur noch eine SDH Aktivität von 20 % besitzen aber gleichzeitig keinen Fitnessnachteil

besitzt solange sie unter Kontrollbedingungen angezogen wird. Dies ist umso erstaunlicher wenn man bedenkt, dass es nicht möglich ist „Knock-out“ Mutanten für SDH1-1 herzustellen, das dieser „Knock-out“ lethal ist und bei heterozygoten Mutanten (SDH1-1/sdh1-1) Defekte in der Gametophyten Entwicklung auftreten. All dies ist bei der *dsr1* nicht der Fall. Dies zeigt, dass es von erheblichem Vorteil sein kann eine Mutante zu besitzen, die keinen kompletten „Knock-out“ oder „Knock-down“ aufweist, sondern immer noch das mutierte Gen exprimiert und translatiert wird und lediglich die Aktivität des resultierenden Proteins vermindert ist. Zudem war es bis zur Entdeckung dieser Mutante nicht möglich den genauen Einfluss von mitochondrialen ROS zu untersuchen. Mit der *dsr1* Mutante steht nun eine Mutante mit reduzierten mitochondrialen ROS (mROS) zur Verfügung und es konnte gezeigt werden, dass diese mROS einen wichtigen Beitrag zur Verteidigung gegen Pathogene wie *R.solani* und *A. brassicicola* leisten, aber keinen Einfluss auf die Verteidigung gegen avirulente Bakterien wie *Pseudomonas syringae* DC3000 haben. Der Vorteil des „forward genetic approaches“, der hier als Methode gewählt wurde, war die Entdeckung eines Gens das für eine Flavoproteinuntereinheit kodiert und gleichzeitig eine wichtige Rolle bei der Reaktion auf SA spielt. Bei anderen Herangehensweisen wäre dieses Gen nie in den Fokus der Untersuchungen geraten und seine Rolle sicher nicht aufgedeckt worden.

In einer zweiten Publikation aus der Arbeitsgruppe um Singh (Thatcher et al., 2015) wurde eine Mutante vorgestellt deren Luciferase-Aktivität bereits basal erhöht ist, so wie es auch bei der *coe3* der Fall ist. Die Mutante bei Thatcher et al. wird als „enhanced stress response 1“ bezeichnet (*esr1-1*). Ihre Luciferase-Aktivität ist nicht nur basal erhöht sondern auch nach SA-Gabe. Hier findet ein Anstieg der Biolumineszenz auch deutlich schneller statt als bei der Kontrolle. Im Gegensatz zur *dsr1* ist bei der *esr1* teilweise eine erhöhte Resistenz festgestellt worden. So zeigt sich zwar kein Unterschied bei der Infektion mit *Rhizoctonia solani*, aber bei der Infektion mit *Fusarium oxysporum* ist die *esr1* deutlich resistenter als die Kontrolle. Zur Lokalisation des mutierten Gens wurde bei dieser Mutanten ein „Genom Mapping 2 Experiment durchgeführt. Für die *esr1* zeigte sich, dass die Mutation auf dem 5. Chromosom lokalisiert ist und anschließende Komplementierungsexperimente haben gezeigt, dass die Mutation durch einen Basenaustausch im Gen AT5G53060 zu Stande kommt. Diese Versuchsdurchführung entspricht dabei genau den geplanten und teilweise schon umgesetzten Versuchen, welche für die Lokalisation des mutierten Gens in der *nr1* angedacht sind. Das Gen AT5G53060 kodiert für ein RNA-Bindeprotein. Wie sich gezeigt hat gab es bereits andere Allele Mutanten in diesem Gen, nämlich *CBF gene expression 3 (rcf3-1)*, *Shiny1 (shi1)* und *High Osmotic Stress Gene Expression 5 (hos5-1)*. Fasst man deren Phänotypen zusammen, zeigt sich dass das Gen AT5G53060 an vielen abiotischen Stressreaktionen beteiligt ist z.B. Reaktion auf Salz, Kälte oder wie im Fall der *esr1* auf Hitze. Thatcher et al., 2015 haben gezeigt, dass AT5G53060 eine wichtige Rolle bei der JA-vermittelten Abwehr von Pflanzen spielt, aber keinen Einfluss auf das JA-vermittelte Wachstum

und die JA-vermittelte Entwicklung nimmt, auch die Wahrnehmung von JA ist nicht beeinträchtigt. Es konnte gezeigt werden, dass AT5G53060 eine wichtige Rolle bei transkriptionellen Prozessen spielt und dabei starken Einfluss auf stressinduzierbare Gene nimmt.

### **5.5 Fazit und Ausblick**

Mit den in dieser Doktorarbeit verwendeten Mutanten und den gewählten Versuchsansätzen ist es möglich neue Gene zu finden, die einen wichtigen Einfluss auf die Reaktion von biotischen und abiotischen Stressen haben. Dabei hat sich gezeigt, dass sowohl die Grobkartierung (SSLP-basiert) als auch das „Next generation Genome Mapping“ Methoden sind, die es ermöglichen ein mutiertes Gen zu identifizieren und dessen Phänotyp zu beschreiben. Bis jetzt konnte bei der *nr1* die Anzahl von Genen, die ursächlich für den Luciferase-Phänotyp sein könnten, auf 5 Gene eingegrenzt werden. Bei einer zweiten ebenfalls weniger responsiven Mutante (*nr2*) war es möglich die nötigen F2 Samen zu erzeugen, sodass auch hier zeitnah mit einer Selektionierung begonnen werden kann. Bei der dritten Mutante, die basal höhere Luciferase-Aktivität zeigt (*coe3*), war es möglich die Position der Mutation auf 2 Chromosomen einzugrenzen. Alle diese drei Mutanten wurden zudem auf ihr Verhalten gegenüber bestimmten abiotischen Stressfaktoren hin untersucht und es konnten Einblicke in ihr Transkriptom und Metabolom gewonnen werden. All diese Daten und Ergebnisse können jedoch nur der Anfang weiterführender Experimente sein, die notwendig sind um endgültig das Gen zu finden, welches ursächlich für die geänderte Reaktion auf RES-Oxylipine in den jeweiligen Mutanten ist, und so helfen einen Einblick in den noch unbekanntem RES-Oxylipin Signalweg zu geben. Betrachtet man die Gene, welche sich beim „Mapping“ der *nr1* als mögliche Kandidaten herauskristallisiert haben und bezieht man auch die Publikation von Savchenko et al., 2014 mit ein so könnte man für eine mögliche Perzeption von RES-Oxylipinen bisher sagen, dass eine Interaktion der Signalmoleküle durchaus wahrscheinlich ist, und so zu einer entsprechenden Antwort der Pflanze auf bestimmte Umweltreize führt. Die beobachtete Reaktion auf unterschiedliche RES-Oxylipine ist dabei immer ähnlich, was für eine Perzeption der RES-Oxylipine durch einen gemeinsamen Rezeptor spricht. Zudem scheinen die RES-Oxylipine ein sehr breites Spektrum an Veränderungen und Reaktionen in der Pflanze hervorrufen zu können. Betrachtet man zudem die zahlreichen Stressbedingungen an den sie beteiligt sind (Trockenstress, Salzstress, Pathogenabwehr, Dunkelinduzierte Seneszenz), ist eine Interaktion mit anderen Signalwegen sehr wahrscheinlich und trägt vermutlich einen großen Teil zur Feinabstimmung der Stressantwort auf einen bestimmten Reiz bei. Der Einfluss des Redoxpotentials auf die RES-Oxylipin vermittelte Stressantwort muss hingegen noch erforscht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- Acosta, I.F., and Farmer, E.E.** (2010). Jasmonates. Arab. Book 8, e0129.
- Ahmad, P., Rasool, S., Gul, A., Sheikh, S.A., Akram, N.A., Ashraf, M., Kazi, A.M., and Gucel, S.** (2016). Jasmonates: Multifunctional Roles in Stress Tolerance. Front. Plant Sci. 7.
- Almérás, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Mène-Saffrané, L., and Farmer, E.E.** (2003). Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. Plant J. Cell Mol. Biol. 34, 205–216.
- Andersson, M.X., Nilsson, A.K., Johansson, O.N., Boztaş, G., Adolfsson, L.E., Pinosa, F., Petit, C.G., Aronsson, H., Mackey, D., Tör, M., et al.** (2015). Involvement of the Electrophilic Isothiocyanate Sulforaphane in *Arabidopsis* Local Defense Responses1. Plant Physiol. 167, 251–261.
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H., and Goldman, M.H.S.** (2010). Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. Genet. Mol. Res. GMR 9, 484–505.
- Ayers, P.W., Parr, R.G., and Pearson, R.G.** (2006). Elucidating the hard/soft acid/base principle: a perspective based on half-reactions. J. Chem. Phys. 124, 194107.
- Bell, C.J., and Ecker, J.R.** (1994). Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis*. Genomics 19, 137–144.
- Benning, C., Beatty, J.T., Prince, R.C., and Somerville, C.R.** (1993). The sulfolipid sulfoquinovosyldiacylglycerol is not required for photosynthetic electron transport in *Rhodobacter sphaeroides* but enhances growth under phosphate limitation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90, 1561–1565.
- Berberich, T., Sagor, G.H.M., and Kusano, T.** (2015). Polyamines in Plant Stress Response. In Polyamines, (Springer, Tokyo), pp. 155–168.
- Berger, S., Benediktyová, Z., Matous, K., Bonfig, K., Mueller, M.J., Nedbal, L., and Roitsch, T.** (2007). Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. J. Exp. Bot. 58, 797–806.
- Breithaupt, C., Strassner, J., Breiting, U., Huber, R., Macheroux, P., Schaller, A., and Clausen, T.** (2001). X-ray structure of 12-oxophytodienoate reductase 1 provides structural insight into substrate binding and specificity within the family of OYE. Struct. Lond. Engl. 1993 9, 419–429.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate: Preventing the Maize Tassel from Getting in Touch with His Feminine Side. Sci. Signal. 2, pe9-pe9.
- Campbell, E.J., Schenk, P.M., Kazan, K., Penninckx, I.A.M.A., Anderson, J.P., Maclean, D.J., Cammue, B.P.A., Ebert, P.R., and Manners, J.M.** (2003). Pathogen-Responsive Expression of a Putative ATP-Binding Cassette Transporter Gene Conferring Resistance to the Diterpenoid Sclareol Is Regulated by Multiple Defense Signaling Pathways in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 133, 1272–1284.
- Capell, T., Bassie, L., and Christou, P.** (2004). Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 9909–9914.

- Castillo, M.C., and León, J.** (2008). Expression of the  $\beta$ -oxidation gene 3-ketoacyl-CoA thiolase 2 (KAT2) is required for the timely onset of natural and dark-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* *59*, 2171–2179.
- Chen, W., and Singh, K.B.** (1999). The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis* GST6 promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *19*, 667–677.
- Chen, W., Chao, G., and Singh, K.B.** (1996). The promoter of a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *10*, 955–966.
- Cipollini, D.** (2010). Constitutive expression of methyl jasmonate-inducible responses delays reproduction and constrains fitness responses to nutrients in *Arabidopsis thaliana*. *Evol. Ecol.* *24*, 59–68.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., and Davies, E.** (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends Plant Sci.* *2*, 144–151.
- Devoto, A., Ellis, C., Magusin, A., Chang, H.-S., Chilcott, C., Zhu, T., and Turner, J.G.** (2005). Expression profiling reveals COI1 to be a key regulator of genes involved in wound- and methyl jasmonate-induced secondary metabolism, defence, and hormone interactions. *Plant Mol. Biol.* *58*, 497–513.
- Dominguez-Solis, J.R., He, Z., Lima, A., Ting, J., Buchanan, B.B., and Luan, S.** (2008). A cyclophilin links redox and light signals to cysteine biosynthesis and stress responses in chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16386–16391.
- Droog, F.** (1997). Plant Glutathione S-Transferases, a Tale of Theta and Tau. *J. Plant Growth Regul.* *16*, 95–107.
- Dueckershoff, K., Mueller, S., Mueller, M.J., and Reinders, J.** (2008). Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* *1784*, 1975–1985.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* *42*, 185–209.
- Farmer, E.E., and Davoine, C.** (2007). Reactive electrophile species. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 380–386.
- Feussner, I., and Wasternack, C.** (2002). The Lipoxygenase Pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* *53*, 275–297.
- Garretón, V., Carpinelli, J., Jordana, X., and Holuigue, L.** (2002). The as-1 Promoter Element Is an Oxidative Stress-Responsive Element and Salicylic Acid Activates It via Oxidative Species. *Plant Physiol.* *130*, 1516–1526.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L.F., Foley, R.C., Anderson, C.R., Carroll, A.J., Millar, A.H., and Singh, K.B.** (2011). Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 10768–10773.

- van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flügge, U.-I., and Kunze, R.** (2006). Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol.* *141*, 776–792.
- Haines, T.H.** (1973). Sulfolipids and Halosulfolipids - Lipids and Biomembranes of Eukaryotic Microorganisms - CHAPTER 4.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M.M.R., and Pereira, A.** (2010). Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiol.* *154*, 1254–1271.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., and Dörmann, P.** (2005). Vitamin E Protects against Photoinhibition and Photooxidative Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *17*, 3451–3469.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Désaubry, L., Holder, E., Grausem, B., Kandel, S., Miesch, M., et al.** (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 Catalyze Two Successive Oxidation Steps of Plant Hormone Jasmonoyl-isoleucine for Catabolic Turnover. *J. Biol. Chem.* *287*, 6296–6306.
- Hou, H., Erickson, J., Meservy, J., and Schultz, E.A.** (2010). FORKED1 encodes a PH domain protein that is required for PIN1 localization in developing leaf veins. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *63*, 960–973.
- Imbusch, R., and Mueller, M.J.** (2000). Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F1 (Phytoprostanes F1) in Plants. *Plant Physiol.* *124*, 1293–1304.
- Iqbal, M., Evans, P., Lledó, A., Verdaguer, X., Pericàs, M.A., Riera, A., Loeffler, C., Sinha, A.K., and Mueller, M.J.** (2005). Total Synthesis and Biological Activity of 13,14-Dehydro-12-Oxo-Phytodienoic Acids (Deoxy-J1-Phytoprostanes). *ChemBioChem* *6*, 276–280.
- Koo, A.J.K., Cooke, T.F., and Howe, G.A.** (2011). Cytochrome P450 CYP94B3 mediates catabolism and inactivation of the plant hormone jasmonoyl-L-isoleucine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 9298–9303.
- Koornneef, M., and van der Veen, J.H.** (1980). Induction and analysis of gibberellin sensitive mutants in *Arabidopsis thaliana* (L.) heynh. *TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet.* *58*, 257–263.
- Lee, M., Lee, K., Lee, J., Noh, E.W., and Lee, Y.** (2005). AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *138*, 827–836.
- Liao, C.-J., Lai, Z., Lee, S., Yun, D.-J., and Mengiste, T.** (2016). *Arabidopsis* HOOKLESS1 Regulates Responses to Pathogens and Abscisic Acid through Interaction with MED18 and Acetylation of WRKY33 and ABI5 Chromatin. *Plant Cell* *28*, 1662–1681.
- Liu, F., Jiang, H., Ye, S., Chen, W.-P., Liang, W., Xu, Y., Sun, B., Sun, J., Wang, Q., Cohen, J.D., et al.** (2010). The *Arabidopsis* P450 protein CYP82C2 modulates jasmonate-induced root growth inhibition, defense gene expression and indole glucosinolate biosynthesis. *Cell Res.* *20*, 539–552.
- Liu, W.-X., Zhang, F.-C., Zhang, W.-Z., Song, L.-F., Wu, W.-H., and Chen, Y.-F.** (2013). *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. *Mol. Plant* *6*, 1487–1502.
- Loeffler, C., Berger, S., Guy, A., Durand, T., Bringmann, G., Dreyer, M., von Rad, U., Durner, J., and Mueller, M.J.** (2005). B1-Phytoprostanes Trigger Plant Defense and Detoxification Responses. *Plant Physiol.* *137*, 328–340.

- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J.** (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135–162.
- Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., and Oda, K.** (2004). dwarf and delayed-flowering 1, a novel *Arabidopsis* mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *37*, 720–729.
- Mandaokar, A., Thines, B., Shin, B., Lange, B.M., Choi, G., Koo, Y.J., Yoo, Y.J., Choi, Y.D., Choi, G., and Browse, J.** (2006). Transcriptional regulators of stamen development in *Arabidopsis* identified by transcriptional profiling. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *46*, 984–1008.
- Mano, J., Belles-Boix, E., Babiychuk, E., Inzé, D., Torii, Y., Hiraoka, E., Takimoto, K., Slooten, L., Asada, K., and Kushnir, S.** (2005). Protection against Photooxidative Injury of Tobacco Leaves by 2-Alkenal Reductase. Detoxication of Lipid Peroxide-Derived Reactive Carbonyls. *Plant Physiol.* *139*, 1773–1783.
- Matsuyama, S., and Reed, J.C.** (2000). Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. *Cell Death Differ.* *7*, 1155–1165.
- McConn, M., Creelman, R., Bell, E., E. Mullet, J., and Browse, J.B.** (1997). Jasmonate is Essential for Insect Defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 5473–5477.
- Michel, K., Abderhalden, O., Bruggmann, R., and Dudler, R.** (2006). Transcriptional changes in powdery mildew infected wheat and *Arabidopsis* leaves undergoing syringolin-triggered hypersensitive cell death at infection sites. *Plant Mol. Biol.* *62*, 561–578.
- Mirabella, R., Rauwerda, H., Struys, E.A., Jakobs, C., Triantaphylidès, C., Haring, M.A., and Schuurink, R.C.** (2008). The *Arabidopsis* her1 mutant implicates GABA in E-2-hexenal responsiveness. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *53*, 197–213.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* *7*, 405–410.
- Moreno, J.E., Tao, Y., Chory, J., and Ballaré, C.L.** (2009). Ecological modulation of plant defense via phytochrome control of jasmonate sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 4935–4940.
- Mosblech, A., Feussner, I., and Heilmann, I.** (2009). Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiol. Biochem. PPB* *47*, 511–517.
- Mou, Z., He, Y., Dai, Y., Liu, X., and Li, J.** (2000). Deficiency in fatty acid synthase leads to premature cell death and dramatic alterations in plant morphology. *Plant Cell* *12*, 405–418.
- Muckenschnabel, I., Goodman, B.A., Williamson, B., Lyon, G.D., and Deighton, N.** (2002). Infection of leaves of *Arabidopsis thaliana* by *Botrytis cinerea*: changes in ascorbic acid, free radicals and lipid peroxidation products. *J. Exp. Bot.* *53*, 207–214.
- Mueller, M.J.** (2004). Archetype signals in plants: the phytoprostanes. *Curr. Opin. Plant Biol.* *7*, 441–448.
- Mueller, M.J., and Berger, S.** (2009). Reactive electrophilic oxylipins: pattern recognition and signalling. *Phytochemistry* *70*, 1511–1521.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S.** (2008). General detoxification and stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *20*, 768–785.

- Muthuramalingam, M., Seidel, T., Laxa, M., Nunes de Miranda, S.M., Gärtner, F., Ströher, E., Kandlbinder, A., and Dietz, K.-J.** (2009). Multiple redox and non-redox interactions define 2-Cys peroxiredoxin as a regulatory hub in the chloroplast. *Mol. Plant* *2*, 1273–1288.
- Nafie, E., Hathout, T., Mokadem, A., and Shyma, A.** (2011). Jasmonic acid elicits oxidative defense and detoxification systems in *Cucumis melo* L. cells. *Braz. J. Plant Physiol.* *23*, 161–174.
- Nguyen, T., Nioi, P., and Pickett, C.B.** (2009). The Nrf2-Antioxidant Response Element Signaling Pathway and Its Activation by Oxidative Stress. *J. Biol. Chem.* *284*, 13291–13295.
- Oberschall, A., Deák, M., Török, K., Sass, L., Vass, I., Kovács, I., Fehér, A., Dudits, D., and Horváth, G.V.** (2000). A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *24*, 437–446.
- Okazaki, Y., Shimojima, M., Sawada, Y., Toyooka, K., Narisawa, T., Mochida, K., Tanaka, H., Matsuda, F., Hirai, A., Hirai, M.Y., et al.** (2009). A Chloroplastic UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Arabidopsis* Is the Committed Enzyme for the First Step of Sulfolipid Biosynthesis. *Plant Cell* *21*, 892–909.
- de Ollas, C., and Dodd, I.C.** (2016). Physiological impacts of ABA–JA interactions under water-limitation. *Plant Mol. Biol.* *91*, 641–650.
- Park, S.-W., Li, W., Viehhauser, A., He, B., Kim, S., Nilsson, A.K., Andersson, M.X., Kittle, J.D., Ambavaram, M.M.R., Luan, S., et al.** (2013). Cyclophilin 20-3 relays a 12-oxo-phytodienoic acid signal during stress responsive regulation of cellular redox homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 9559–9564.
- Poudel, A.N., Zhang, T., Kwasniewski, M., Nakabayashi, R., Saito, K., and Koo, A.J.** (2016). Mutations in jasmonoyl-L-isoleucine-12-hydroxylases suppress multiple JA-dependent wound responses in *Arabidopsis thaliana*. *Biochim. Biophys. Acta* *1861*, 1396–1408.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M.-T., Rosahl, S., et al.** (2005). Evaluation of the antimicrobial activities of plant oxylipins supports their involvement in defense against pathogens. *Plant Physiol.* *139*, 1902–1913.
- Ranjan, R., and Lewak, S.** (1992). Jasmonic acid promotes germination and lipase activity in non-stratified apple embryos. *Physiol. Plant.* *86*, 335–339.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E.E., Reymond, P., and Poirier, Y.** (2008). Induction of the *Arabidopsis* PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Physiol.* *147*, 696–706.
- Romano, P.G.N., Horton, P., and Gray, J.E.** (2004). The *Arabidopsis* Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiol.* *134*, 1268–1282.
- Sagor, G.H.M., Zhang, S., Kojima, S., Simm, S., Berberich, T., and Kusano, T.** (2016). Reducing Cytoplasmic Polyamine Oxidase Activity in *Arabidopsis* Increases Salt and Drought Tolerance by Reducing Reactive Oxygen Species Production and Increasing Defense Gene Expression. *Front. Plant Sci.* *7*, 214.
- Sattler, S.E., Mène-Saffrané, L., Farmer, E.E., Krischke, M., Mueller, M.J., and DellaPenna, D.** (2006). Nonenzymatic Lipid Peroxidation Reprograms Gene Expression and Activates Defense Markers in *Arabidopsis* Tocopherol-Deficient Mutants. *Plant Cell* *18*, 3706–3720.

- Savchenko, T., Kolla, V.A., Wang, C.-Q., Nasafi, Z., Hicks, D.R., Phadungchob, B., Chehab, W.E., Brandizzi, F., Froehlich, J., and Dehesh, K.** (2014). Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. *Plant Physiol.* *164*, 1151–1160.
- Schneeberger, K., Ossowski, S., Lanz, C., Juul, T., Petersen, A.H., Nielsen, K.L., Jørgensen, J.-E., Weigel, D., and Andersen, S.U.** (2009). SHOREmap: simultaneous mapping and mutation identification by deep sequencing. *Nat. Methods* *6*, 550–551.
- Seltmann, M.A., Stingl, N.E., Lautenschlaeger, J.K., Krischke, M., Mueller, M.J., and Berger, S.** (2010). Differential Impact of Lipoxygenase 2 and Jasmonates on Natural and Stress-Induced Senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *152*, 1940–1950.
- Seo, P.J., Lee, A.-K., Xiang, F., and Park, C.-M.** (2008). Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol.* *49*, 334–344.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 12837–12842.
- Stotz, H.U., Mueller, S., Zoeller, M., Mueller, M.J., and Berger, S.** (2013). TGA transcription factors and jasmonate-independent CO11 signalling regulate specific plant responses to reactive oxylipins. *J. Exp. Bot.* *64*, 963–975.
- Takahashi, H., Kopriva, S., Giordano, M., Saito, K., and Hell, R.** (2011). Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* *62*, 157–184.
- Taki, N., Sasaki-Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A., Kobayashi, K., Ainai, T., Yagi, K., Sakurai, N., Suzuki, H., Masuda, T., et al.** (2005). 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *139*, 1268–1283.
- Thaler, J.S., Stout, M.J., Karban, R., and Duffey, S.S.** (2001). Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecol. Entomol.* *26*, 312–324.
- Thatcher, L.F., Kamphuis, L.G., Hane, J.K., Oñate-Sánchez, L., and Singh, K.B.** (2015). The *Arabidopsis* KH-Domain RNA-Binding Protein ESR1 Functions in Components of Jasmonate Signalling, Unlinking Growth Restraint and Resistance to Stress. *PLoS ONE* *10*.
- Urano, K., Yoshida, Y., Nanjo, T., Igarashi, Y., Seki, M., Sekiguchi, F., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2003). Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* *26*, 1917–1926.
- 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*.
- Vandenbroucke, K., Robbens, S., Vandepoele, K., Inzé, D., Van de Peer, Y., and Van Breusegem, F.** (2008). Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Mol. Biol. Evol.* *25*, 507–516.
- Vellosillo, T., Martínez, M., López, M.A., Vicente, J., Cascón, T., Dolan, L., Hamberg, M., and Castresana, C.** (2007). Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate

lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell* **19**, 831–846.

**Vick, B.A., and Zimmerman, D.C.** (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol.* **75**, 458–461.

**Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A., and Farmer, E.E.** (2000). Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **24**, 467–476.

**Wasternack, C.** (2007). Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**, 681–697.

**Weber, H., Chételat, A., Reymond, P., and Farmer, E.E.** (2004). Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **37**, 877–888.

**Widemann, E., Miesch, L., Lugan, R., Holder, E., Heinrich, C., Aubert, Y., Miesch, M., Pinot, F., and Heitz, T.** (2013). The Amidohydrolases IAR3 and ILL6 Contribute to Jasmonoyl-Isoleucine Hormone Turnover and Generate 12-Hydroxyjasmonic Acid Upon Wounding in *Arabidopsis* Leaves. *J. Biol. Chem.* **288**, 31701–31714.

**Winter, G., Todd, C.D., Trovato, M., Forlani, G., and Funck, D.** (2015). Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Front. Plant Sci.* **6**, 534.

**Winterbourn, C.C., and Hampton, M.B.** (2008). Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 549–561.

**Wirtz, M., and Hell, R.** (2006). Functional analysis of the cysteine synthase protein complex from plants: structural, biochemical and regulatory properties. *J. Plant Physiol.* **163**, 273–286.

**Xiang, C., Miao, Z., and Lam, E.** (1997). DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **34**, 403–415.

**Yamaguchi, K., Takahashi, Y., Berberich, T., Imai, A., Takahashi, T., Michael, A.J., and Kusano, T.** (2007). A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352**, 486–490.

**Zoeller, M., Stingl, N., Krischke, M., Fekete, A., Waller, F., Berger, S., and Mueller, M.J.** (2012). Lipid profiling of the *Arabidopsis* hypersensitive response reveals specific lipid peroxidation and fragmentation processes: biogenesis of pimelic and azelaic acid. *Plant Physiol.* **160**, 365–378.

# 7. Anhang

## 7.1 Promotorsequenzen und Alignments

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	130
coe3	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGTTATGATCCCTCTT													
6ST6::Luc	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGATCCCTCTT													
Consensus	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGATCCCTCTT													
coe3	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
6ST6::Luc	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
Consensus	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
coe3	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
6ST6::Luc	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
Consensus	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
coe3	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
6ST6::Luc	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
Consensus	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
coe3	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
6ST6::Luc	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
Consensus	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
coe3	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
6ST6::Luc	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
Consensus	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
coe3	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													
6ST6::Luc	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													
Consensus	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													
nr1	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGATCCCTCTT													
6ST6::Luc	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGATCCCTCTT													
Consensus	ATATACCTGTTCCCAATTTGATGATGGTAAATGCAAAATCTGATGAGGAGGGAGATGGTCTGTTCCAGCACTAGATTAGTTATACATAGGGGATTTGATTATGTTATGATCCCTCTT													
nr1	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
6ST6::Luc	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
Consensus	CTCCCTGTTGATTTGGATTTGAGGATTTAGTTGGTCAAAAGGTTATGGGTTTAGAAAATTAATAAAACAGGTGGGCTTTGCTGTACATGCTCTTAATATTTGTTTGGGAGTAGTTATATCGAA													
nr1	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
6ST6::Luc	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
Consensus	TGATACGTTTACACGTAAAAAGTCTTTCTTTTGGTCTGCTCAGGAAGATGAGATTCGTTCTAGGAGAGGTTGACTTTTCARTCCACACTTATACCTTAGAATCTTATGTCATTGATGACGA													
nr1	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
6ST6::Luc	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
Consensus	CTCCCTCACACTTTTGGATTTGATGTTTACAAAGGAGGAGGATTTACCTTAGACAGTTTATGTGATGTTTGGTCTTTCTATTTTATTCAGTAAATTTCTTACATGTCATAGATTAGCTATA													
nr1	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
6ST6::Luc	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
Consensus	TTGACATGATCTTACCTGATTTTTTGGTTGCAAAATACCAATTTAGTGAGGGGATTTTGGTTTCAGTCATAAATCCGTTGATTTCTATATGTTAGTGGTACACATGCATAAATAGGGGGACCCAA													
nr1	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
6ST6::Luc	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
Consensus	TAAAAAARAGGAAAGAGACGCTGCCTGGGTAGTGGTGGTGGTGGAGAGATTCGGAARATGGGACGATTCAGCTCGCTTCCCTTGTCTTCCCTTCTATAAACACCATACCTTC													
nr1	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													
6ST6::Luc	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													
Consensus	CTTCATTCTTCTCATTCCCAATCCGTCGACCAT													

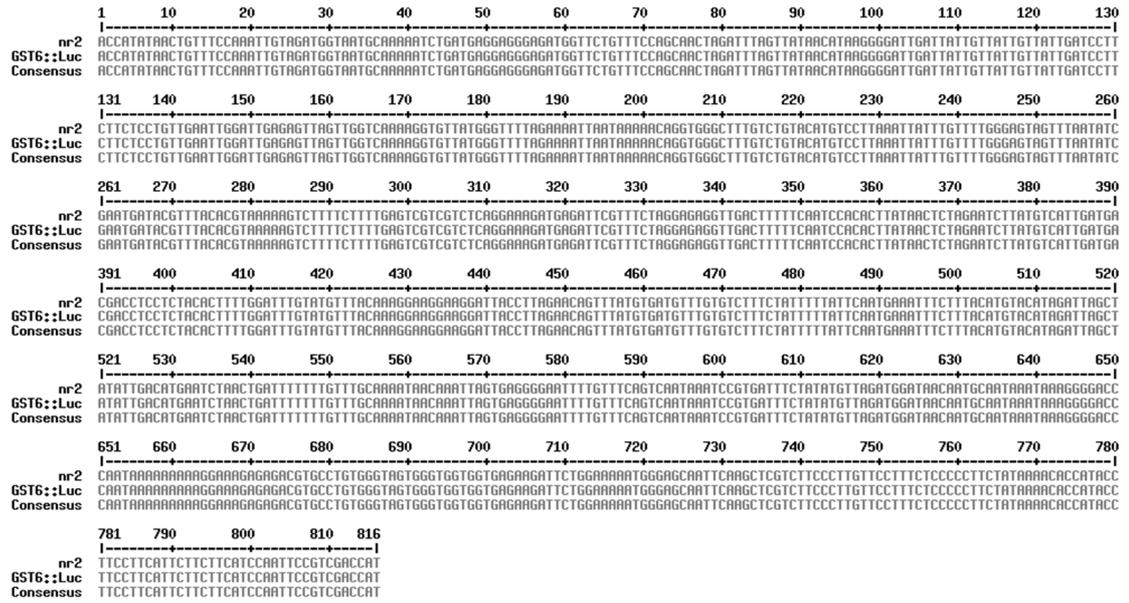


Abb. 7.1 Promotorsequenzen des Luciferasegens in der *coe3*, *nr1* und *nr2* verglichen mit der Promotorsequenz des Luciferasegens in der *GST6::LUC*

## 7.2 Trockenexperimente

Darstellung der Ergebnisse der einzelnen Trockenexperimente. Im 2. und 4. Experiment wurden die *nr2* einzeln untersucht mit eigenen Kontrollen um der großen Standardabweichung aus Experiment 1 entgegenzuwirken. Im Experiment 3 wurde nur die *nr2* untersucht.

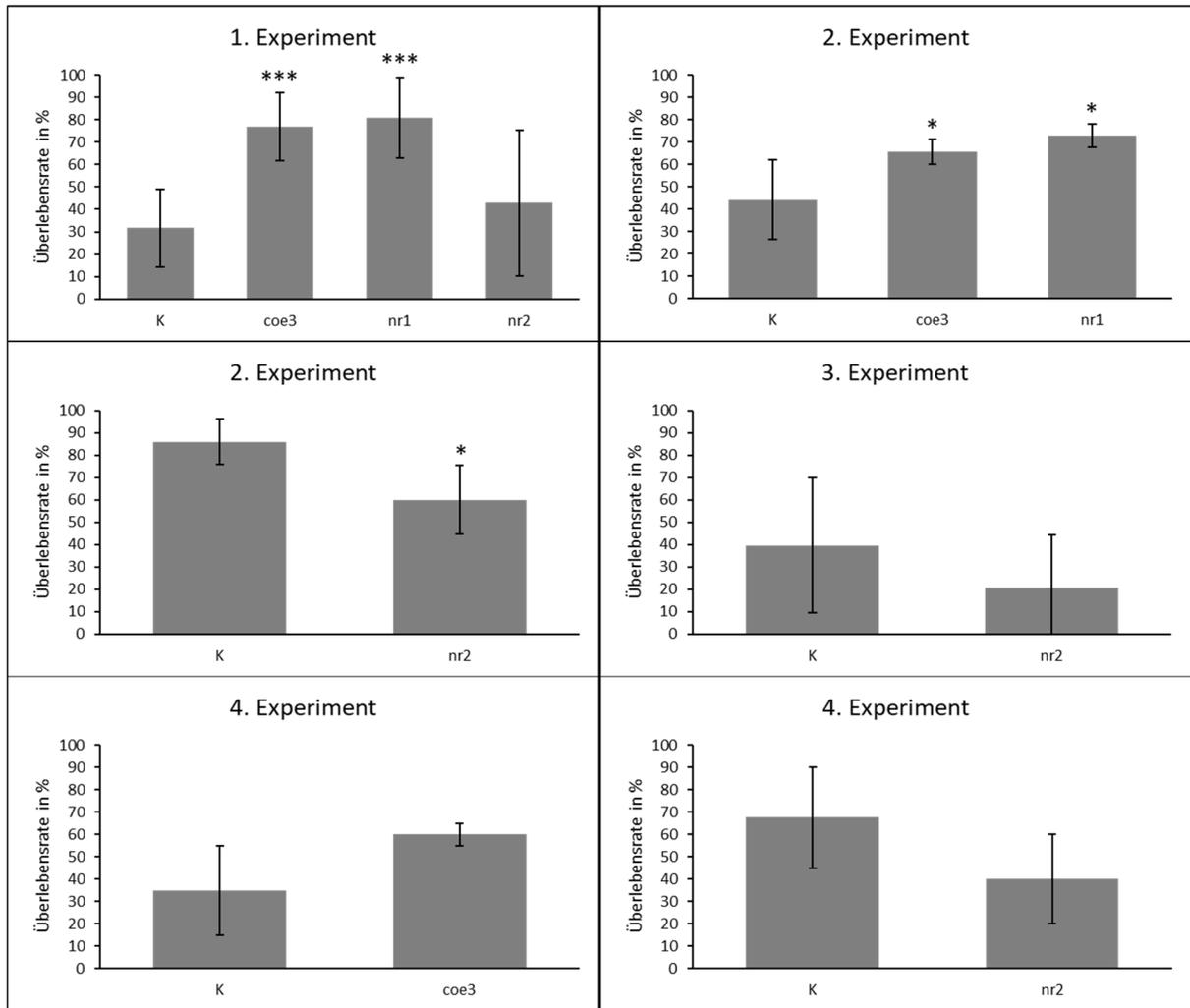


Abb. 7.2 Überlebensrate der Mutanten *coe3* und *nr1* im Vergleich mit der Kontrolllinie bzw. der *nr2* mit der Kontrolllinie nach 2 wöchigem Trockenstress mit 6 Wochen alten Erdpflanzen. Die Auswertung erfolgte 6 d nach erneutem Gießen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchsansätzen. Die *nr2* wurde getrennt getestet um Unterschiede zur Kontrolle besser sichtbar zu machen. (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 7.3 Keimung auf ABA

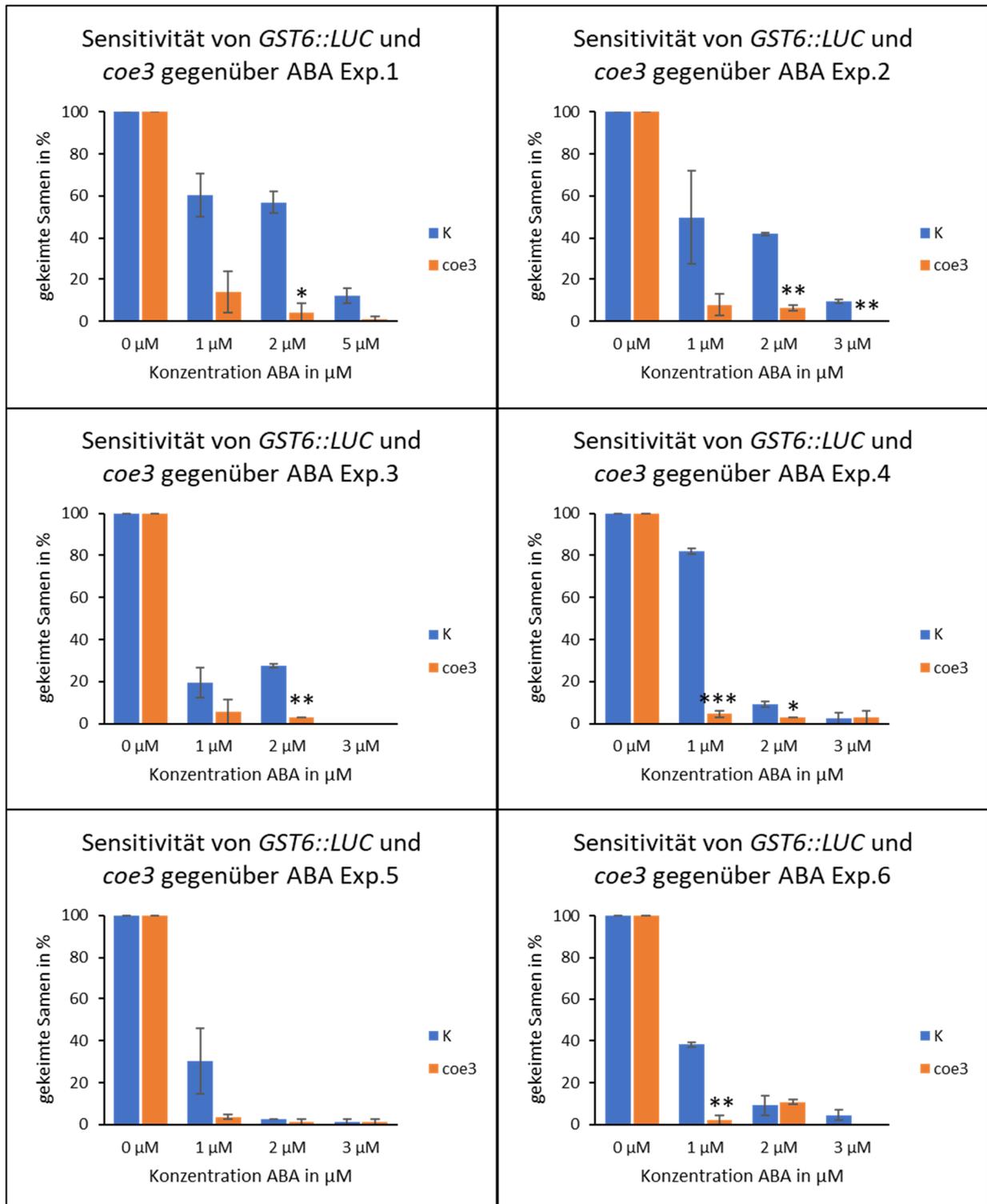


Abb. 7.3 Prozentualer Anteil der gekeimten Samen von *GST6::LUC* (K) und der Mutante *coe3* nach insgesamt 8 d auf Whatman-Papier mit 1, 2 oder 3 bzw. 5 μM ABA oder nur Wasser als Negativkontrolle. Der Mittelwert gekeimter Samen der Negativkontrollen wurde als 100 % festgesetzt. Für jeden Experimentansatz kamen 60 Samen pro Petrischale zum Einsatz, wobei je 4 Petrischalen für jede Kontrolle und je 2 für Petrischalen für jede Behandlung ausgelegt wurden. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ), dabei wurde die *coe3* mit der jeweils gleichbehandelten Kontrolle verglichen.

### 7.4 Gewicht der Keimlinge nach Wachstum auf Mannitol

3 Tage alte Keimlinge wurden auf mannitolhaltigen Schrägagar umgesetzt und für weitere 10 d aufrecht inkubiert und danach das Gewicht der Keimlinge gemessen. Es wurde dabei nur der obere Teil des Keimlings gewogen, die Wurzel wurde vorher entfernt.

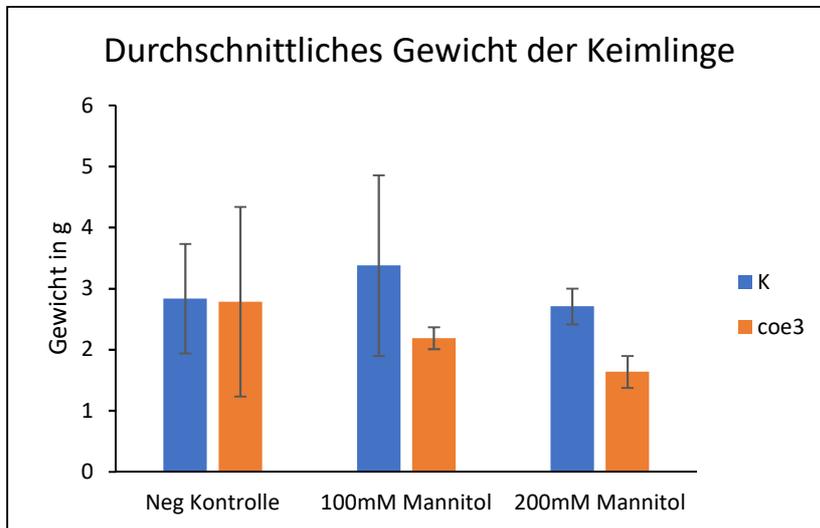


Abb. 7.4 Durchschnittliches Gewicht eines Keimlings nach 10 tägiger Inkubation auf Mannitolhaltigem Agar bzw. auf Kontrollmedium. Die Wurzel wurde vor dem Wiegen entfernt.

### 7.5 qPCR Daten der getesteten Gene

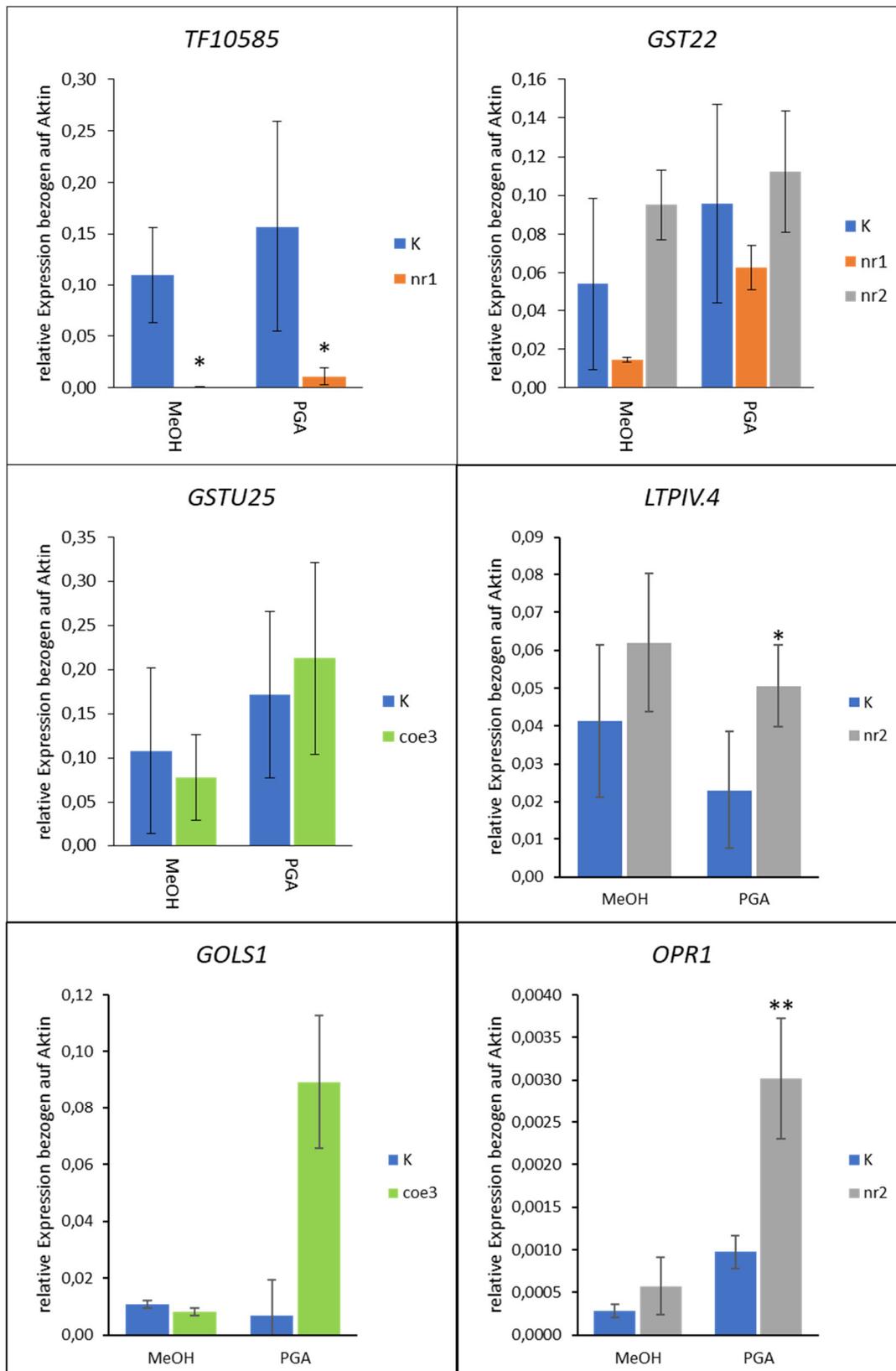


Abb. 7.5 Relative Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *AKTIN*, von *TF10585*, *GST22*, *GSTU25*, *LTPIV.4*, *GOLS1* und *OPR1*. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T-test (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Abgebildet sind die Mittelwerte aus je 3 Replikaten, jedes Replikat bestand aus 10 Keimlingen die im Alter von 10 d behandelt wurden.

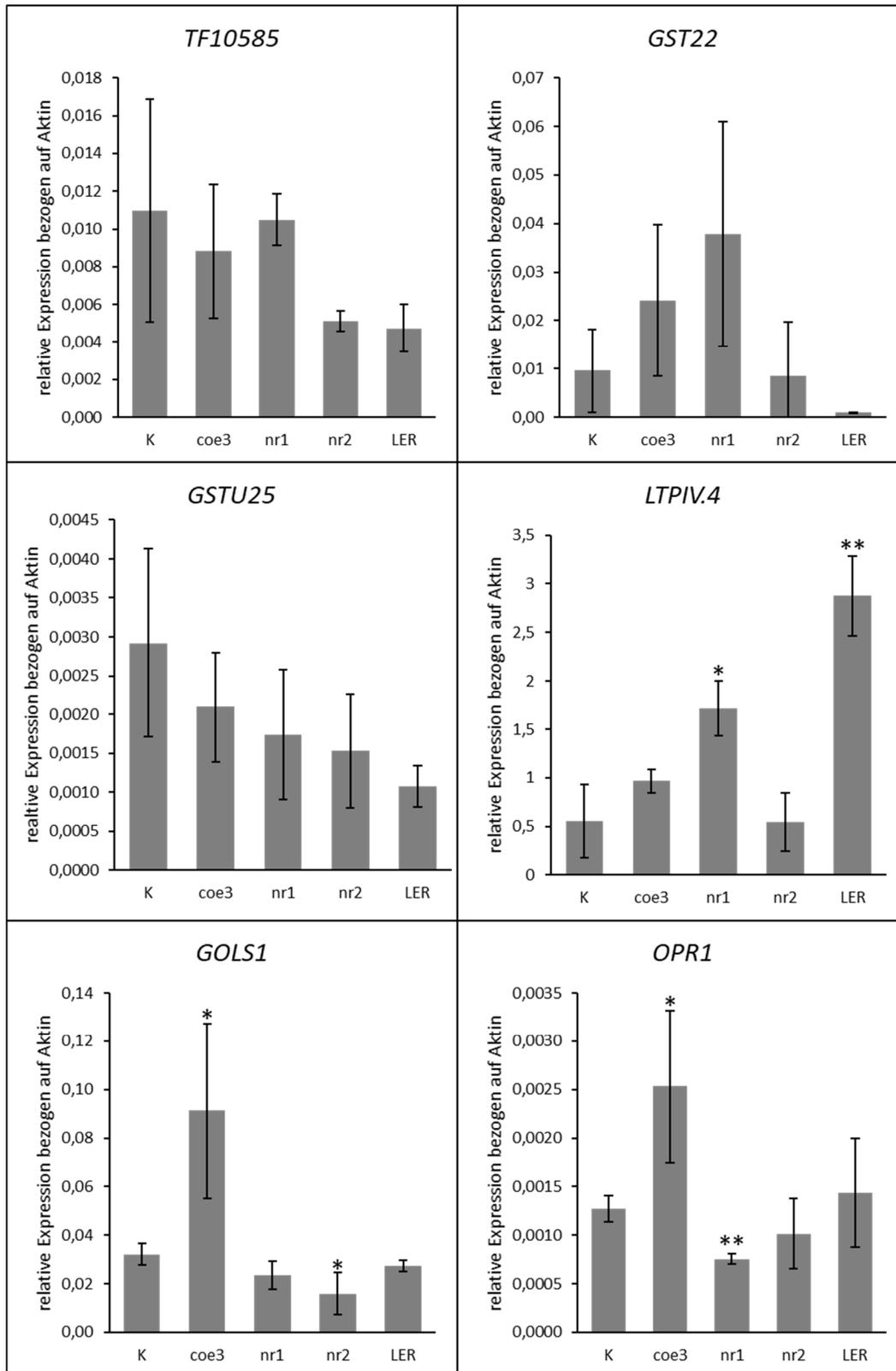


Abb. 7.6 Relative Genexpression  $\pm$  Standardabweichungen, bezogen auf *AKTIN*, von *TF10585*, *GST22*, *GSTU25*, *LTPIV.4*, *GOLS1* und *OPR1* in je 3 unbehandelten 6 Wochen alten Erdpflanzen. Als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Student's T.test (\* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001).

## 7.6 RNA-Sequenzierungs Daten

Die ausgewerteten Daten des RNA Sequenzierungsexperimentes finden sich in Tabellenform auf der beigefügten CD. Das verwendete R Protokoll ist ebenfalls auf der beigefügten CD einsehbar.

## 7.7 Chlorophyllmessungen nach Dunkelinkubation

Chlorophyllgehalte nach Inkubation im Licht bzw. im Dunkeln. Im letzten Experiment wurde nur die *coe3* untersucht.

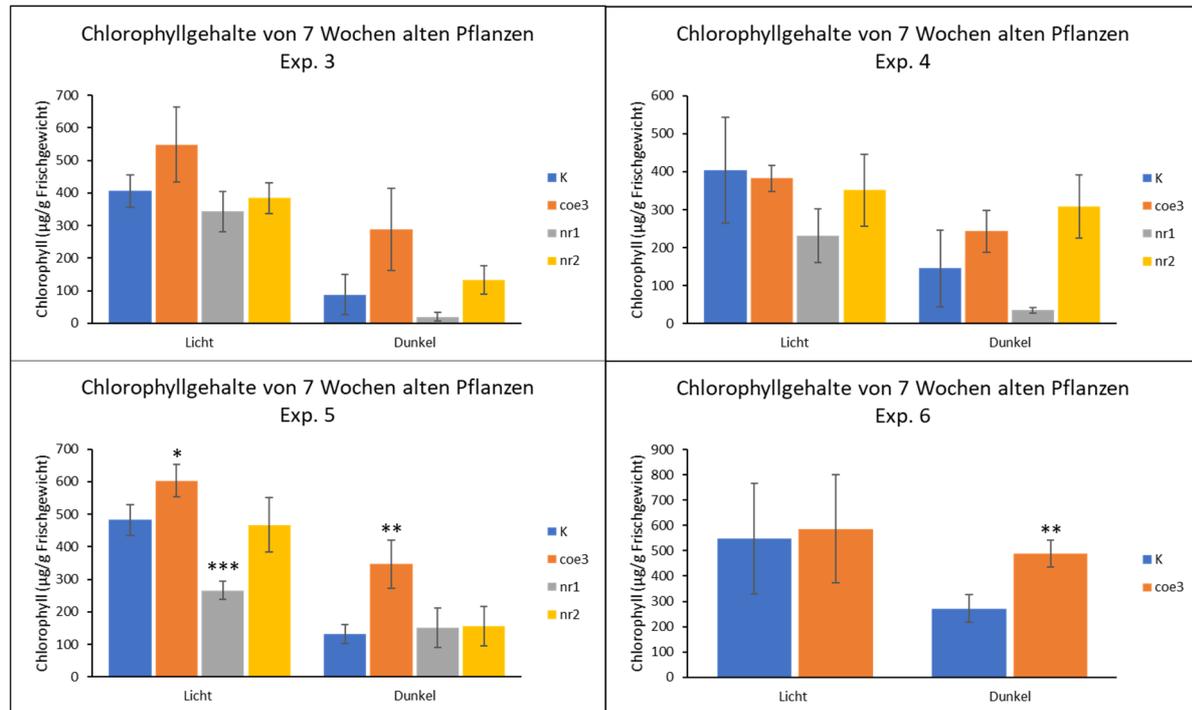


Abb.7.7 Mittlere Chlorophyllgehalte in µg/g ± Standardabweichungen aus Blättern von 7 Wochen alten Erdpflanzen. Die Blätter wurden entweder auf Wasser unter Kurztagsbedingungen (Licht) oder im Dauerdunkeln (Dunkel) floriert. Die untersuchten Genotypen waren *coe3*, *nr1*, *nr2* als Kontrolle wurde die *GST6::LUC* verwendet. Es wurden die Mittelwerte je aus 4 untersuchten Proben gebildet die aus je 4 Blättern von einer Pflanze bestanden. Hier dargestellt sind die Signifikanzen zwischen den Genotypen: *GST6::LUC*, *coe3*, *nr1* und *nr2* im Licht bzw. Dunkel Wachstum (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Tab.7.1 Signifikanzen der einzelnen Genotypen nach Wachstum im Dunkeln zum jeweiligen Wachstum im Licht. Die Signifikanzen beziehen sich auf die Daten aus Abb.4.30 (T-test: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Zusätzlich ist der jeweilige Faktor dargestellt um den die Chlorophyllgehalte erniedrigt sind, verglichen mit im Licht inkubierten Blättern des jeweiligen Genotyps

	Exp3		Exp 4		Exp 5		Exp 6	
	<i>GST6::LUC</i> Dunkel		<i>GST6::LUC</i> Dunkel		<i>GST6::LUC</i> Dunkel		<i>GST6::LUC</i> Dunkel	
<i>GST6::LUC</i> Licht	**	0,22		0,36	***	0,27	*	0,50
	<i>coe3</i> Dunkel		<i>coe3</i> Dunkel		<i>coe3</i> Dunkel		<i>coe3</i> Dunkel	
<i>coe3</i> Licht		0,52	**	0,64	**	0,58		0,83
	<i>nr1</i> Dunkel		<i>nr1</i> Dunkel		<i>nr1</i> Dunkel			
<i>nr1</i> Licht	**	0,06	**	0,15	*	0,57		
	<i>nr2</i> Dunkel		<i>nr2</i> Dunkel		<i>nr2</i> Dunkel			
<i>nr2</i> Licht	**	0,35		0,88	***	0,34		

## Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich bei PD Dr. Susanne Berger bedanken, dass sie mich an den Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie geholt hat. Sowie für ihr Vertrauen das letztlich dafür gesorgt hat, dass aus den geplanten 6 Monaten dann doch 3 Jahre Doktorarbeit geworden sind. Für dein immer offenes Ohr bei Fragen, deine konstruktiven Lösungsvorschläge und die Fähigkeit einen aufzumuntern, wenn mal wieder ein Marker nicht robust war und die Suche wieder von vorn losging oder wir mal wieder auf Ergebnisse warten mussten. Auch jetzt am Ende meiner Doktorarbeit hast du dich durch meine wirren Satzstellungen geschlagen immer auf der Suche nach dem Roten Faden. Vielen, vielen Dank für deine Unterstützung und all deine Hilfe in den letzten 3 Jahren.

Ich möchte mich auch ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Becker bedanken. Für die Übernahme der Zweitkorrektur, sowie für neue Denkanstöße.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. Martin J. Müller bedanke ich mich, dass er es mir finanziell ermöglicht hat an seinem Lehrstuhl zu promovieren. Auch seine kritische Betrachtung meiner Ergebnisse, sowie neue Ideen für Experimente waren für mich sehr hilfreich.

Bei der Arbeitsgruppe um Dr. Elmar Wolf am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie möchte ich mich bedanken für die Durchführung des RNA-Seq Experimentes, sowie die Hilfe bei Fragen und Problemen während der Probenaufbereitung. In diesem Zusammenhang auch vielen Dank an Dr. Lorenzo Pedrotti für die Hilfe bei der bioinformatischen Auswertung der Daten. An Prof. Dr. Arthur Korte ein großes Dankeschön für die bioinformatische Analyse der „Mapping“ Daten, sowie die Zeit die er für die Besprechungen und Diskussionen mit uns verbracht hat.

Bei Dr. Agnes Fekete und ihrer Arbeitsgruppe, sowie bei Dr. Markus Krischke möchte ich bei der Unterstützung der Metabolom-Experimente bedanken für all die Hilfe bei Messungen und Auswertung der Daten. Bei Sarah Frosch, die mich am Anfang meiner Arbeit als TA am Lehrstuhl unterstützt hat, und Ulrike Samfaß, die ebenfalls kurze Zeit als TA dieses Projekt begleitet hat, möchte ich mich natürlich auch bedanken und natürlich bei Sarah's Nachfolgerin Claudia Müller. Ohne dich wäre es nicht möglich gewesen die riesigen Mengen an Pflanzen zu pflegen und zu verarbeiten. Zudem hast du mir viele zeitraubende Arbeiten abgenommen, vom Samen sieben bis zum Medium herstellen. Nur so war es möglich in der Zeit mit dem Projekt soweit voranzukommen, Danke. Auch allen Studenten die länger oder kürzer an diesem Projekt mitgewirkt haben, möchte ich noch einmal ganz herzlich bedanken. Besonders meiner Bachelorstudentin Nina, die in ihrer Zeit hier sich intensiv mit dem ABA-Teil beschäftigt hat und auch in allen anderen Bereichen dieses Projekts eine große Hilfe war.

Während so einer Doktorarbeit gewinnt man sehr viele neue Erkenntnisse, über sein Fachgebiet, über neue Methoden, über sich selbst. Manchmal gewinnt man sogar mehr als das, nämlich Freunde. Ich

hatte das große Glück gleich drei wahnsinnig gute Freunde zu finden, die mir nicht nur den Arbeitstag lustiger, unterhaltsamer und angenehmer gestaltet haben sondern auch fern ab des Labors viele tolle und bleibende Augenblicke mit mir geteilt haben. Stephe, Stefan, Michel vielen vielen Dank ihr Lieben für die letzten 4 Jahre. Auch allen anderen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie, die ich hier nicht namentlich erwähnt habe, möchte ich Danke sagen für ihre Hilfe bei allen kleineren und größeren Problemen und die schöne Zeit am Lehrstuhl.

Zu guter Letzt möchte ich mich natürlich bei all meinen Freunden und Verwandten bedanken die mich abseits des Arbeitsalltages unterstützt haben, und vor allem bei meinen Eltern. Ihr habt mir immer geholfen wo ihr nur konntet und mich nach Kräften unterstützt. Ohne eure Hilfe wäre ich nie so weit gekommen. Auch dir Katharina ein ganz großes Dankeschön, dass du mich an schlechten Tagen aufgebaut hast, mich all die Jahre unterstützt hast und einfach nur dass du da bist.

## **Erklärungen nach §4 Abs. 3 Satz 3, 5, 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie**

### **Affidavit**

I hereby declare that my thesis entitled: „**Mutanten im RES-Oxylipin Signalweg von *Arabidopsis thaliana***“ is the result of my own work.

I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Mutanten im RES-Oxylipin Signalweg von *Arabidopsis thaliana***“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Unterschrift