

**Molekulare Mechanismen einer wechselseitigen Kontrolle  
der *Arabidopsis-Agrobacterium*-Interaktion**

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

vorgelegt von  
Marina Efetova  
aus Moskau

Würzburg 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

Gutachter: Prof. Dr. Rainer Hedrich

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Roitsch

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

## **Ich danke:**

in erster Linie Herrn Prof. Dr. Rainer Hedrich für die spannende und interessante Aufgabenstellung, zahlreiche Anregungen zur Bearbeitung und Weiterentwicklung des Themas und die engagierte Unterstützung meiner Arbeit, die mir unter anderem die Teilnahme an mehreren Tagungen ermöglicht hat.

Dr. Rosalia Deeken für die sorgfältige Betreuung meiner Arbeit, sowie für zahlreiche Hilfestellungen sowohl im experimentellen Bereich als auch beim Zusammenschreiben und Diskutieren der Ergebnisse. Frau Cornelia Ullrich für die Bereitstellung der Bakterienstämme. Frau Julia Engelmann für die statistische Auswertung der Mikroarrayrohdaten. Prof. Dr. Claus Wasternak und Dr. Otto Miersch für die Durchführung der ACC, Jasmon- und Salizylsäuremessungen. Prof. Dr. Jutta Ludwig-Müller für die Auxin-Bestimmungen.

Prof. Dr. Wolfram Hartung für die ABA-Analysen und die fruchtbaren Diskussionen der Phytohormonergebnisse. Besonders dankbar bin ich für die stets freundliche Hilfsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Botanischen Gartens, allen voran Joachim Rottenhöffer, deren Hilfe besonders bei der Anzucht meiner Pflanzen essentiell für meine Experimente war. Allen technischen Angestellten für ihre kompetente Unterstützung, vor allem Tina Latz und Bianca Röger.

Meiner Mutter und meinem Mann, die durch das Babysitten und liebevolle Unterstützung mir freie Stunden für die Fertigstellung dieser Arbeit verschafft haben. Und vor allem meinem Sohn Nils, der zwar einiges komplizierter gemacht hat, aber durch sein liebes, freundliches und unkompliziertes Wesen auch den grössten Stress bewältigen liess.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	6
1.1	<b>Die Interaktion zwischen Pflanzen und <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	6
1.1.1	Die Integration bakterieller DNA in pflanzliche Zellen	7
1.1.2	Phytohormone regulieren Nährstoffversorgung und Wasserhaushalt im Tumor	8
1.2	<b>Abscisinsäure (ABA) reguliert den Wasserhaushalt in höheren Pflanzen</b>	9
1.2.1	Adaptive Mechanismen gegen Trockenstress	10
1.2.2	Spezialisierte Oberflächen	10
1.3	<b>Abwehrreaktionen der Pflanze gegen Agrobakterien</b>	11
1.3.1	Antimikrobielle Proteine	11
1.3.2	Die Hypersensitive Reaktion (HR)	12
1.3.3	Stressphytohormone kontrollieren Abwehrreaktionen gegen Pathogene	13
1.4	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	17
2.1	<b>Bakterienkulturen und deren Anzucht</b>	17
2.1.1	Verwendete <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und <i>Pseudomonas syringae</i> Stämme	17
2.1.2	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> und <i>Pseudomonas syringae</i> für Infiltrationsexperimente	17
2.1.3	Medien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterienkulturen	17
2.2	<b>Anzucht und Wachstumsbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	18
2.2.1	Erdkulturen	18
2.2.2	Hydrokultur	18
2.2.3	<i>Arabidopsis</i> Wurzelkultur	19
2.2.4	Induktion der Tumore durch Infizieren mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.2.5	Präparation von Tumor- und Referenzgewebe	19
2.2.6	Infiltration von <i>A. thaliana</i>	20
2.3	<b>Bestimmung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Produktion</b>	20
2.4	<b>Arbeiten mit RNA</b>	20
2.4.1	Isolierung von Gesamt-RNA	20
2.4.2	Elektrophorese von RNA	20
2.4.3	DNase-Verdau	21
2.4.4	Synthese von cDNA	22
2.5	<b>Transkriptionsanalyse mittels der quantitativer Echtzeit PCR</b>	22
2.5.1	Entwurf der Primer für die quantitative PCR	22
2.5.2	Durchführung der quantitativen PCR	23
2.5.3	Auswertung der quantitativen PCR	24
2.6	<b>Arbeiten mit DNA</b>	24
2.6.1	DNA-Gelelektrophorese	24
2.6.2	Aufreinigung von DNA	25
2.6.3	Sequenzierungen	25
2.6.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	25
2.6.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
2.7	<b>Biochemische Analyseverfahren</b>	26
2.7.1	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte transiente Transformation	26
2.7.2	Bestimmung der $\beta$ -Glucuronidase (GUS)-Aktivität	26
2.7.3	Analytische Bestimmungen von Suberin und Lignin	27
2.7.4	Bestimmung von 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC), Jasmonsäure (JA), 12-Oxo-Phytodienoidsäure (OPDA) und Salizylsäure	27
2.7.5	Bestimmung von Auxin (IAA)	27
2.8	<b>Microarrays und Datenprozessierung</b>	27
2.8.1	Das Softwareprogramm <i>R</i>	28
2.8.2	<i>Bioconductor</i> -Programme zur Genexpressionsanalyse	28
2.8.3	Normalisierung der Microarraydaten	29
2.8.4	Verhältnis als Maß der Genexpressionsveränderung	30
2.8.5	Der T-Test in der Limma-Analyse	31
2.9	<b>Statistische Auswertung</b>	31
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	33
3.1	<b>Untersuchungen an drei Stadien der <i>Agrobacterium</i>-Pflanze-Interaktion</b>	33
3.1.1	Festlegung der Untersuchzeitpunkte innerhalb der Interaktionsstadien	33

3.1.2	Genexpressionsanalysen der drei Untersuchungszeitpunkte mittels Microarrays	35
3.1.3	Funktionelle Kategorisierung der signifikant differentiell exprimierten Gene	36
<b>3.2</b>	<b>Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr im Verlauf der Tumorentwicklung</b>	<b>37</b>
3.2.1	Agrobakterien unterdrücken die vom Elicitor ``EF-Tu`` ausgelöste frühe Expression von Abwehrgenen	37
3.2.2	Abwehrgene werden erst nach der T-DNA-Integration induziert	39
3.2.3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> spielt in frühen Stadien der Infektion noch keine Rolle	41
3.2.4	Ethylen, aber nicht Jasmonsäure, aktiviert die Expression pathogenabhängiger Abwehrgene	43
3.2.5	Ein erhöhter Salizylsäuregehalt induziert keine Pathogenabwehrgene im Tumor	45
3.2.6	Die Rolle von Auxin bei der Tumorentwicklung	46
<b>3.3</b>	<b>Auswirkung von Störungen in der Pathogen-Signaltransduktion auf die Tumorentwicklung.</b>	<b>48</b>
<b>3.4</b>	<b>Der Tumor induziert Mechanismen der Trockenstressanpassung</b>	<b>49</b>
3.4.1	Translokation von ABA in den Tumor.	50
3.4.2	Rolle von ABA auf die Tumorentwicklung.	51
3.4.3	Expressionsmuster der ABA- und Trockenstress-abhängigen Gene im Tumor.	53
3.4.4	Eine Suberinschicht schützt die Tumoroberfläche vor Austrocknung.	54
3.4.5	ABA-induziert die Suberin-Biosynthese in <i>Arabidopsis</i>	57
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
<b>4.1</b>	<b>Pathogenabwehrreaktionen des Wirts gegenüber <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>59</b>
4.1.1	Frühe Abwehrreaktionen sind in der Wirtspflanze unterdrückt.	60
4.1.2	Signale der Stressphytohormone regulieren morphologische Anpassungen	61
<b>4.2</b>	<b>Pflanzliche Tumore besitzen einen Schutz vor Trockenstress</b>	<b>63</b>
4.2.1	ABA induziert die Biosynthese von Suberin in einem Periderm-ähnlichen Abschlussgewebe.	64
4.2.2	ABA reguliert die Anpassungen an Trockenstress und den Wasserfluss.	64
4.2.3	ABA wird von der Wirtspflanze in den Tumor transloziert	65
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Referenzen</b>	<b>69</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b>	<b>96</b>
<b>10</b>	<b>Erklärung</b>	<b>98</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>99</b>
<b>12</b>	<b>Publikationsliste</b>	<b>100</b>

# 1 Einleitung

Das gramm-negative Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* wurde 1907 als Verursacher von Wurzelhalsgallen, d.h. Pflanzentumoren, an dikotyledonen Pflanzen identifiziert (Smith and Townsend, 1907). Die Tumore betreiben selbst kaum Photosynthese, sondern beziehen alle für das schnelle Wachstum notwendigen Nährstoffe von der Wirtspflanze; somit sind Tumore ein typisches *sink* (siehe Beiderbeck, 1977). In der Landwirtschaft führen Wurzelhalsgallen zu erheblichen Ertragseinbußen und beeinträchtigen besonders die Kultivierung von Wein, Steinfrüchten und Nussbäumen. Neben diesen schädigenden Eigenschaften der *Agrobakterien* ist es der Molekularbiologie gelungen, deren transformierende Eigenschaft als Genfährer für artfremde Gene nutzbar zu machen. Über diesen Mechanismus werden z.B. in der Grundlagenforschung transgene Pflanzen erzeugt oder neue Sorten resistenter Nutzpflanzen generiert.

## 1.1 Die Interaktion zwischen Pflanzen und *Agrobacterium tumefaciens*

Die erfolgreiche Etablierung eines Tumors erfordert eine Reihe notwendiger Ereignisse, wie den Kontakt der Agrobakterien mit pflanzlichen Zellen, die Übertragung und Integration der bakteriellen *Transfer-DNA* (T-DNA) in das pflanzliche Genom und letztlich die physiologische Veränderung der pflanzlichen Wirtszellen. Jedes dieser Ereignisse ist für eine erfolgreiche Tumorentwicklung notwendig und erfolgt unter Beteiligung von pflanzlichen Botenstoffen,



**Abbildung 1: *Arabidopsis*-Tumor, induziert durch Befall mit *Agrobacterium tumefaciens*.** Ein 30 Tage alter Tumor an der Infloreszenzachse von *Arabidopsis thaliana*.

den Phytohormonen. Historisch betrachtet, wurden einzelne Phytohormone als individuelle Signalwege untersucht; in jüngster Zeit aber wurde erkannt, dass einzelne Phytohormone nicht unabhängig voneinander wirken, sondern als komplexes Signalnetzwerk arbeiten. Die Interaktion zwischen einzelnen Hormonen im Netzwerk hängt dabei vom jeweiligen Prozess ab; so wirken Jasmonsäure und Ethylen synergistisch bei der Pathogenabwehr; bei der Verwundung jedoch antagonisiert Ethylen die Wirkung der Jasmonsäure (Lorenzo and Solano, 2005). Auch die Mengenverhältnisse verschiedener Phytohormone zueinander entscheiden über die Art der Interaktion, d.h. Antagonismus oder Synergie. So können die Phytohormone Salicylsäure und Jasmonsäure die hypersensitive Antwort nach Pathogenbefall entweder unterdrücken oder aber verstärken, je nach Verhältnis der beiden Komponenten (Mur et al., 2006).

Änderungen in der Biosynthese oder der Übertragung eines Hormonsignals können das Gleichgewicht des gesamten Hormonsystems destabilisieren (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Dies wird von Pathogenen ausgenutzt. So erleichtert z.B. eine externe Auxingabe die Transformation durch Agrobakterien (Morris, 1986). Des Weiteren führt die Expression der T-DNA kodierten Onkogene *iaaH*, *iaaM* und *ipt* zu einer vermehrten Synthese von Auxin und

Cytokinin in der infizierten Pflanze (Thomashow et al., 1980). Die enormen Konzentrationen dieser Phytohormone sind notwendig, um die Proliferation und die Entwicklung des pathologischen Leitbündelsystems zu induzieren (Ullrich and Aloni, 2000). Auxin und Cytokinin initiieren auch die Produktion von gasförmigem Ethylen, das für die Entwicklung der Leitbündel und die Induktion der Abscisinsäuresynthese essenziell ist (Aloni et al., 1998; Wächter et al., 2003). Abscisinsäure (ABA) scheint wiederum den Wasserhaushalt im Tumor und der Wirtspflanze zu regulieren (Mistrik et al., 2000; Wächter et al., 2003). Neben diesen physiologischen Veränderungen im Tumor induziert die agrobakterielle Infektion auch pflanzliche Abwehrmechanismen, die ebenfalls von den Phytohormonen Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen reguliert werden (Feys and Parker, 2000; Ditt et al., 2001; Veena et al., 2003; Ditt et al., 2006; Zipfel et al., 2006). Diese komplexen und integrativen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Signalmolekülen machen es unmöglich die Rolle



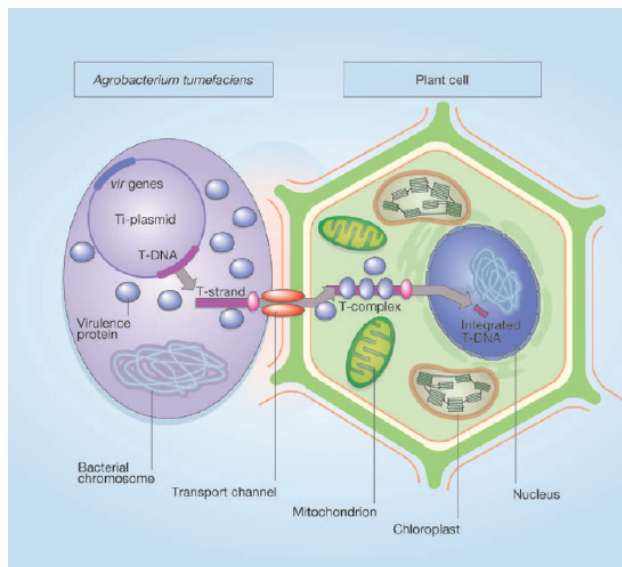
**Abbildung 2: Die Interaktion von *Agrobacterium* mit der Pflanze kann in drei Phasen unterteilt werden:** (i) Kontakt zwischen *Agrobacterium* und Wirt; (ii) die Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom; (iii) das Tumorstadium.

eines Phytohormons zu verstehen, ohne die Wirkung des gesamten Netzwerkes zu berücksichtigen. Für den speziellen Fall der Tumorentwicklung sind es die zeitlich diskreten Ereignisse während der Infektion, der T-DNA Integration und der aus dem Tumorstadium resultierenden physiologischen Veränderungen, die von Phytohormonsignalen abhängen (Abb. 2).

### 1.1.1 Die Integration bakterieller DNA in pflanzliche Zellen

Grundlage einer agrobakteriellen Infektion ist die Integration von Transfer-DNA (T-DNA) in das Genom des Wirts. Die T-DNA und 9 Virulenzgene (*virA-virJ*) befinden sich auf dem tumor-induzierenden Ti-Plasmid und können in eine Virulenzregion und eine Transferregion unterteilt werden (Zambryski et al., 1989). Die T-DNA ist in eine linke ( $T_L$ ) und eine rechte Seite ( $T_R$ ) eingeteilt, welche durch eine zentrale DNA-Region ( $T_C$ ) getrennt sind. Sowohl  $T_L$ , als auch  $T_R$  sind jeweils durch zwei Regionen begrenzt, die die Endpunkte des T-DNA-Stranges markieren (Thomashow et al., 1980; Hood et al., 1986; Spanier et al., 1989). Der  $T_L$ -DNA-Abschnitt trägt die genetische Informationen für die Synthese von Auxin, Cytokinin und Opin; die  $T_R$ -Region dagegen die für Mannopin (Zambryski, 1988; Spanier et al., 1989).

Die Infektion der Pflanzen durch *Agrobacterium tumefaciens* geschieht in Bodennähe durch das Eindringen von Bakterien in pflanzliches Gewebe (Abb. 3). Die Bakterien dringen hauptsächlich an wunden Stellen in die Pflanze ein, wobei durch die Verwundung entstandene phenolische Substanzen, wie etwa Acetosyringon, durch das Virulenzprotein A (VirA) wahrgenommen werden. VirA ist ein Membranprotein, das sowohl für phenolische Komponenten als auch für andere Faktoren, wie etwa Änderungen im pH-Wert, sensitiv ist (Gelvin, 2000; Tzifira & Zitovsky 2003). Anhand eines Zwei-Komponenten-Systems aktiviert die Rezeptorkinase VirA durch Phosphorylierung VirG, das seinerseits als Transkriptionsaktivator andere *vir*-Loci regulieren kann (Jin et al., 1990; Jin et al., 1990). VirD1/D2 Proteine sind für die Synthese und den Transport der T-DNA in die Pflanzenzelle verantwortlich.



**Abbildung 3: Transfer der bakteriellen T-DNA in eine Pflanzenzelle.** Erläuterungen im Text  
Quelle: (Gelvin 2005)

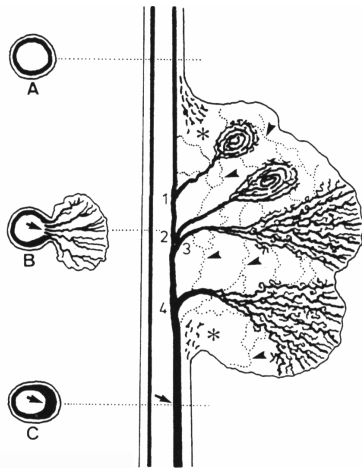
Dies ermöglicht die Transkription in der Wirtszelle mittels pflanzlicher Polymerase II (Willmitzer et al., 1981; Gelvin et al., 1982). Manche T-DNA kodierten Gene können auch durch pflanzliche Signale induziert werden, so ist der Promoter der Nopalinsynthese sensitiv gegen Verwundung oder Auxin (An et al., 1990).

VirD2 besitzt eine Endonukleasenfunktion und setzt den unteren Strang der T-DNA frei, wobei es kovalent an das 5' Ende dieser einzelsträngigen T-DNA gebunden bleibt. Dieser Komplex wird über ein Typ IV Sekretionssystem durch den T-Pilus in die Wirtszelle geschleust und dort durch Anlagerung von VirE-Proteinen geschützt. Hier wird die bakterielle DNA mit Hilfe pflanzlicher Proteine in das Wirtsgenom eingebaut (siehe Hwang and Gelvin, 2004; Lacroix et al., 2006). Obwohl die T-DNA bakteriellen Ursprungs ist, enthält sie eukariotische Regulatoren, wie etwa *TATA box*, *CAAT box* und Poly-

### 1.1.2 Phytohormone regulieren Nährstoffversorgung und Wasserhaushalt im Tumor

Nach der stabilen Integration der T-DNA in das Genom der Wirtszelle werden Gene exprimiert, die für Enzyme der Auxin-, Cytokinin- und Opinbiosynthese kodieren. Die Überproduktion der entsprechenden Phytohormone in den infizierten Zellen führt zu einer schnellen Proliferation. Der entstehende Tumor ist jedoch kein undifferenzierter Kallus, sondern ein dreidimensionales Gebilde mit ausgeprägtem Leitbündelsystem (Beiderbeck, 1977). Diese entwickeln sich durch die koordinierte Wirkung der Phytohormone Auxin, Cytokinin und Ethylen und stehen mit den Gefäßen des Wirtsorganismus in Verbindung (Ullrich and Aloni, 2000). Zum einen handelt es sich um verzweigte Gefäße, die sich durch den Tumor in schnell wachsende Regionen erstrecken. Zum anderen sind in dem sich langsam entwickelnden Bereichen globulär angeordnete Gefäße lokalisiert (Abb. 4). Bei der Entwicklung der Leitbündelmuster treten Unterschiede auf, die vom Verhältnis der Auxin- zur Cytokininkonzentration abhängig sind (Aloni et al., 1995; Ullrich and Aloni, 2000). Dieses Leitbündelsystem dient zum Transport der Nährstoffe und des Wassers in den Tumor. Bei *Arabidopsis thaliana* werden Kohlenhydrate, Mineralstoffe sowie proteinogene und glycoplastische Aminosäuren angereichert. In Bezug auf die Opine, Octopin und Nopalin, ist der Tumor autotroph; diese Substanzen dienen den Agrobakterien als Stickstoffquelle. Nach der initialen Transformation sind die Bakterien für eine weitere Tumorentwicklung jedoch nicht notwendig, da nahezu 100% der Tumorzellen transformiert sind (Lippincott et al., 1973; Pradel et al., 1996; Mistrik et al., 2000; Deeken et al., 2006).





**Abbildung 4: Das Leitbündelsystem verbindet den Tumor mit der Wirtspflanze.** Gezeigt ist ein schematischer Längsschnitt durch Tumor und Infloreszenz-achse bei *Ricinus communis*. Hier markieren die Ziffern 1 und 2 die Übergänge von globulären Gefäßen zu Gefäßen des Wirts. Die Ziffern 3 und 4 markieren jeweils die Basis der verzweigten Leitbündel einschliesslich Xylem und Phloem.

Die Querschnitte der Infloreszenzachse des Wirtes zeigen ein normales Leitbündelsystem oberhalb des Tumors in A. Das pathologische Leitbündelsystem (Pfeil) des Tumors weist enorm große Zellen auf; gezeigt in B. Unterhalb des Tumors erkennt man die assymetrische Xylemdifferenzierung in C.

Grafik modifiziert aus (Aloni et al., 1995).

Ethylen begünstigt die Nährstoffzufuhr im Tumor nicht nur durch die Differenzierung der Leitbündel, sondern auch durch Auflösen der Kutikula und Epidermis, wodurch eine hohe Transpirationsrate entsteht (Schurr et al., 1996; Wächter et al., 2003). Diese Anpassung verursacht ein negatives Wasserpotential, welches wiederum einen starken Wasser- und Nährstofffluss in Richtung Tumor lenkt (Aloni et al., 1995; Schurr et al., 1996; Ullrich and Aloni, 2000). Durch die vermehrte Transpiration besteht allerdings auch die Gefahr der schnellen Austrocknung; trotzdem welken weder der Tumor noch die Wirtspflanze. Die hohe Akkumulation von Abscisinsäure (ABA) in Tumoren wird als Signalgeber für die notwendige Anpassung an den Trockenstress vermutet (Mistrik et al., 2000).

## **1.2 Abscisinsäure (ABA) reguliert den Wasserhaushalt in höheren Pflanzen**

Ein erfolgreicher Schutz gegen Austrocknung beruht auf diversen physiologischen, metabolischen und biochemischen Prozessen, wobei die meisten dieser Adaptationen durch ABA gesteuert sind (Mahajan and Tuteja, 2005). ABA ist ein ubiquitär vorkommendes Phytohormon der Gefässpflanzen, wurde erstmal in den 1960er Jahren identifiziert und wirkt antagonistisch zu den Wachstumshormonen Auxin, Cytokinin und Gibberellin. In der Entwicklung spielt Abscisinsäure eine wichtige Rolle für die Wachstumsunterbrechung, wie z.B. bei der Samenruhe. Es wird ausserdem vermutet, dass ABA bei der Embryogenese die Akkumulation von Speicherproteinen fördert (Ohkuma et al., 1963; Addicott et al., 1968; Milborrow, 1969).

Die Wirkung von ABA als Stresshormon bei Trockenstress wurde erstmals von Wright und Hiron (1969) dokumentiert, als diese eine erhöhte ABA-Akkumulation in welkenden Pflanzen gemessen haben. *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten in der ABA-Signaltransduktion zeigten deutlich, dass dieser Signalweg essentiell für die Austrocknungstoleranz in Pflanzen ist (Koornneef et al., 1984). Heute ist ABA als Signal bei Trockenstress anerkannt und die Biosynthese, der Transport und seine Auswirkungen auf die Pflanze vielfach untersucht (Nambara and Marion-Poll, 2005). In höheren Pflanzen kann die Akkumulation von ABA auf unterschiedlichen Wegen erfolgen. Eine Möglichkeit ist der Abbau von Carotinoiden; hierbei wird Zeaxanthin zunächst in Violaxanthin umgebaut und anschließend durch Oxidation zu Xanthoxal gespalten. Xanthoxal kann dann entweder zu Xanthoxinsäure oxidiert werden, welche zu ABA umgebaut wird, oder es erfolgt eine Umwandlung des Xanthoxals zu ABA-

Aldehyd, der anschließend zu ABA oxidiert wird. Andere Möglichkeiten sind die Hemmung des Abbaus von ABA zur Dihydrophaseinsäure, oder die Hydrolyse von physiologisch inaktiven ABA-Speicherformen, wie ABA-Glukosiden, in aktives ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005).

### **1.2.1 Adaptive Mechanismen gegen Trockenstress**

Ungünstige Umweltbedingungen wie Trockenheit, Hitze oder Salzstress induzieren die Expression von ABA-Biosynthesegenen, was in einer schnellen Akkumulation und Induktion ABA-abhängiger adaptiver Mechanismen resultiert (Cornish and Zeevaart, 1985; Hartung et al., 1988; Zeevaart and Creelman, 1988): Zum einen wird die Wasseraufnahme über die Wurzel gesteigert (Hose et al., 2001); gleichzeitig ein Wasserverlust durch Schließung der Stomata verringert und das zelluläre osmotische Potential gesenkt. Letzteres geschieht über eine gesteigerte Synthese oder Aufnahme von osmoregulatorischen Substanzen (Referenzen siehe in Mahajan and Tuteja, 2005). Diese kleinen, nicht toxischen Verbindungen (z.B. Prolin und Glutamat, Zucker und anorganische Ionen) sind imstande Proteine und zelluläre Strukturen zu stabilisieren und erhöhen den osmotischen Druck in der Zelle; dies begünstigt eine erneute Wasseraufnahme in die Zelle (Yancey et al., 1982). Insgesamt helfen diese Substanzen den Wasserstatus der Zelle zu erhalten und verhindern eine Dehydrierung unter Dürrebedingungen.

ABA und Wasserstress induzieren die Expression von Schutzgenen, wie *RD* (*response to dehydration*), *COR* (*cold responsive*), *LEA/dehydrin-like* (*late embryogenesis-abundant*) und Aquaporinen (Seki et al., 2001). Deren Produkte können Chaperone aktivieren, die ihrerseits zelluläre Proteine vor einer Degradierung schützen und Proteinasen aktivieren, um bereits geschädigte Proteine zu entfernen. Die Wasserkanäle (Aquaporine), kontrollieren höchstwahrscheinlich den Wasserstatus der pflanzlichen Zelle, indem sie Wasserauf- bzw. abgabe nach Bedarf heraus- oder hineintransportieren (Seki et al., 2001; Siefritz et al., 2002; Zhu et al., 2005).

### **1.2.2 Spezialisierte Oberflächen**

Die Oberfläche von Pflanzen ist durch spezialisierte Zelltypen gegen einen unkontrollierten Wasserverlust geschützt. Im Apoplast dieser Zellen sind aliphatische Polymere, wie Kutin oder Suberin, angereichert. Kutin ist die Hauptkomponente der Kutikula, welche eine Barriere zwischen den oberirdischen Pflanzenorganen und der Atmosphäre formt. Im Unterschied dazu kommen Suberinablagerungen in höheren Pflanzen sehr unterschiedlich vor. Suberin findet sich konstitutiv in zahlreichen unterirdischen Geweben, inklusive endodermalen und hypodermalen Zellwänden in den Wurzeln. Zusätzlich wird Suberin im Periderm eingelagert, das die Oberfläche der Sprosse in der sekundären Wachstumsphase bildet (Kolattukudy, 1981; Zeier and Schreiber, 1998; Nawrath, 2002; Franke et al., 2005). Suberin ist durch eine polyphenolische Domäne charakterisiert und eine in Wachs eingebettete polyaliphatische Domäne (Bernards and Lewis, 1998; Bernards et al., 2000). Diverse Stresseinwirkungen, wie ABA, Verwundung oder Pathogenbefall, lösen eine

Suberinisierung aus, um eine undurchlässige Barriere zu bilden (Soliday et al., 1978; Cottle and Kolattukudy, 1982; Vogt et al., 1983).

### **1.3 Abwehrreaktionen der Pflanze gegen Agrobakterien**

Pflanzen haben im Laufe der Evolution eine Vielzahl an Verteidigungsmechanismen entwickelt, die es ihnen ermöglichen mit diversen Phytopathogenen zurechtzukommen. Das *Agrobacterium* muss diese pflanzlichen Abwehrmechanismen überwinden, um erfolgreich das Tumorstadium zu initiieren (Ditt et al., 2001; Veena et al., 2003; Gaspar et al., 2004; Ditt et al., 2006; Zipfel et al., 2006). Die induzierbaren Verteidigungsantworten der Pflanzen werden durch *Elicatoren* oder *PAMPs* (engl.: *pathogen-associated molecular patterns*) aktiviert (Ryan et al., 2007). Diese generellen Auslöser sind meist Oberflächenstrukturen der pathogenen Organismen, wie Lipopolysaccharide der Außenmembran der Gram-negativen Bakterien oder Faktoren, die in die Pflanzenzellen sekretiert werden (Referenzen siehe in Zipfel and Felix, 2005; Ryan et al., 2007). Weitere Beispiele für bakterielle Elicatoren sind Flagellin, eine Untereinheit der bakterieneigenen Flagellumfilamente, und pflanzliche Zellwandbruchstücke, die bei einem Befall durch hydrolytische Enzyme aus den Pflanzenorganen herausgelöst werden (Farmer et al., 1991; Kunze et al., 2004).

Nicht alle generellen Elicatoren sind funktionell; so kann Flagellin aus *Agrobacterium* aufgrund einer natürlichen Mutation nicht an den pflanzlichen Rezeptor binden und löst im Gegensatz zu Flagellinen anderer Mikroorganismen keinerlei bekannte Abwehrreaktionen aus (Gomez-Gomez et al., 1999). Aber auch das *Agrobacterium* sekretiert einen funktionellen Elicitor, den Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu). Dieses ist das abundant vorkommende bakterielle Translationsprotein, das bei Pflanzen massiv die Expression von Abwehrgenen und die Produktion von Stresssignalmolekülen, wie Ethylen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, auslöst (Zipfel et al., 2006). Nach dem Erkennen solch eines Elicitors kann bereits wenige Minuten bis Stunden eine Induktion von lokalen Abwehrmechanismen erfolgen. Diese Abwehrreaktionen können in sehr schnelle (innerhalb von Minuten ablaufende), schnelle (über Stunden andauernde) und langsame (Tage bis Monate anhaltende) unterteilt werden. Dabei können Pflanzen und pathogene Mikroorganismen in kompatible und inkompatible Interaktionspartner unterteilt werden (Prell, 1996). Die Infektion mit avirulenten Phytopathogenen resultiert in einer inkompatiblen Interaktion, bei der durch eine rechtzeitige und massive Induktion der Abwehrmechanismen eine weitere Vermehrung des Pathogens eingeschränkt bzw. verhindert wird. Bei einer kompatiblen Interaktion wird das Pathogen als virulent bezeichnet und kann die Wirtspflanze erfolgreich befallen, da die Induktion der Abwehrmechanismen wesentlich später und in einem schwächeren Modus erfolgt (Tao et al., 2003).

#### **1.3.1 Antimikrobielle Proteine**

Bereits wenige Minuten bis einige Stunden nach einer Infektion kann mRNA, die für antimikrobielle Proteine kodieren, im befallenen Gewebe detektiert werden; ihre Bildung gehört zu den frühen Reaktionen der Pflanze auf einen Pathogenbefall (Somssich and Hahlbrock, 1998). Diese Reaktion kann durch eine spätere Bildung von sekundären Signalstoffen, wie etwa Salizylsäure, Jasmonsäure oder Ethylen noch verstärkt werden. Die

bekannteste Klasse antimikrobieller Peptide sind die *pathogenesis-related* PR-Proteine; diese werden in 17 Familien unterteilt und sind durch ihre extreme pH-Wert-Toleranz, Resistenz gegenüber Proteasen und ihr niedriges Molekulargewicht charakterisiert (Kombrink and Somssich, 1995; van Loon and van Strein, 1999). Proteine des Typs PR1 kommen als saure und basische Formen vor und werden jeweils in die Interzellularräume oder die Vakuole der Pflanzenzelle sekretiert. Die Familie 2 beinhaltet 1,3- $\beta$ -Glucanasen, für die *in vitro* antifungale Wirkung nachgewiesen wurde (Delp and Palva, 1999). PR3 und verwandte Proteine sind Chitinasen; diese wirken der pilzlichen Invasion durch eine Hydrolyse von Chitin, dem Hauptbestandteil der pilzigenen Zellwand, entgegen. Zur Familie 5 der PR-Proteine zählen die Thaumatin-ähnlichen Proteine sowie die Osmotine; ihre Expression ist in *A. thaliana* nicht nur nach einer Pathogeninfektion gefunden worden, sondern ist auch durch ABA, Salz oder Trockenstress induzierbar (Capelli et al., 1997; Hu and Reddy, 1997). Bei Zeamatin, einem PR5-Protein aus Mais, basiert die antifungale Wirkung auf Permeabilisierung der pilzlichen Membran (Vigers et al., 1991; van Loon et al., 2006).

Die Expression mancher Gene der PR-Familie hat sich als Marker der bekannten Pathogenabwehrwege in *Arabidopsis* etabliert: So dient die Expression von PR1 als Marker für die Aktivierung des Salizylsäure-abhängigen Abwehrwegs, wobei die Expression von PR3 und PR4 mit Jasmonsäure- und Ethylen-vermittelten Signalen assoziiert ist (Dong, 1998; Thomma et al., 1998). Neben den PR-Proteinen akkumulieren weitere Proteine nach einem Pathogenbefall, wie z.B. Defensine. Im *Arabidopsis* Genom sind 13 mutmassliche Defensin-Gene enthalten, die für 11 Defensine und zwei Fusionsproteine kodieren. Defensine sind für pflanzliche und tierische Zellen ungiftig, inhibieren aber pilzliches und manchmal auch bakterielles Wachstum *in vitro*. Die Akkumulation der Transkripte von Defensin PDF1.2 dient ebenfalls als Marker für JA- und ET-induzierte Abwehr (Thomma et al., 2002).

### **1.3.2 Die Hypersensitive Reaktion (HR)**

Die Ausbildung von HR (engl. *hypersensitive response*) ist eine frühe Komponente der pflanzlichen Abwehr, bei der innerhalb weniger Stunden nach Erkennung eines Pathogens eine lokale und transiente Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt (Heath, 2000). Die Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies, wie z.B. Superoxidationen, Hydroperoxyl- und Hydroxylradikale oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), aus atmosphärischem Sauerstoff erfordert die Aktivität membrangebundener NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischer Peroxidasen (Lamb and Dixon, 1997; Bindschedler et al., 2006). Im Bezug auf Abwehrreaktionen gegen Pathogene werden für reaktive Sauerstoffspezies verschiedene Eigenschaften diskutiert, wie etwa eine direkte antimikrobielle Wirkung, eine oxidative Vernetzung von Glykoproteinen mit der Zellwand und die Auslösung von Signalkaskaden (Lamb and Dixon, 1997; Nürnberger et al., 1997; Bolwell, 1999; Mittler, 2002). Besonders bei inkompatiblen Interaktionen von Pflanze und avirulentem Pathogen kommt es nach einer schnellen Bildung von  $O_2$  - und  $H_2O_2$  zu einem weiteren, z.T. länger andauernden "*oxidative burst*" (Baker et al., 1995; Lamb and Dixon, 1997). Das Absterben der Pflanzenzellen am Infektionsort im Laufe der HR

schränkt das weitere Eindringen eines Pathogens und seine Ausbreitung auf einen möglichst kleinen Gewebeabschnitt ein. Das Kollabieren und anschließende Absterben befallener Zellen wird durch eine Modifikationen der Zellwand, Membranschädigungen, Elektrolytverlust, Lipidperoxidation, Induktion von Enzymen, Dekompartimentierung, Degeneration der DNA und der Bildung apoptotischer Vesikel während der HR verursacht (Dangl et al., 1996). Infolge des Zelltodes wird den biotrophen Pathogenen die Nahrungsgrundlage entzogen und ein weiteres Ausbreiten verhindert (Hammond-Kosack and Jones, 1996).

### 1.3.3 Stressphytohormone kontrollieren Abwehrreaktionen gegen Pathogene

Die basalen Abwehrmechanismen der Pflanze werden durch ein Netz von Signalen mit Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) als Signalmolekülen reguliert (Reymond and Farmer, 1998; Pieterse and van Loon, 1999; Glazebrook, 2001; Thomma et al., 2001). Während SA-vermittelten Abwehrmechanismen gegen biotrophe Pilze, wie Oomyceten (*Erysiphe orontii*, *Peronospora parasitica*) und Bakterien wie *Pseudomonas syringae* auslöst, vermitteln JA/ET-abhängige Abwehrwege die Resistenz gegen nekrotrophe Organismen und Herbivoren. Diese Hauptsignalwege sind antagonistisch, d.h. eine Aktivierung des einen resultiert häufig in der Unterdrückung des anderen (Feys and Parker, 2000).

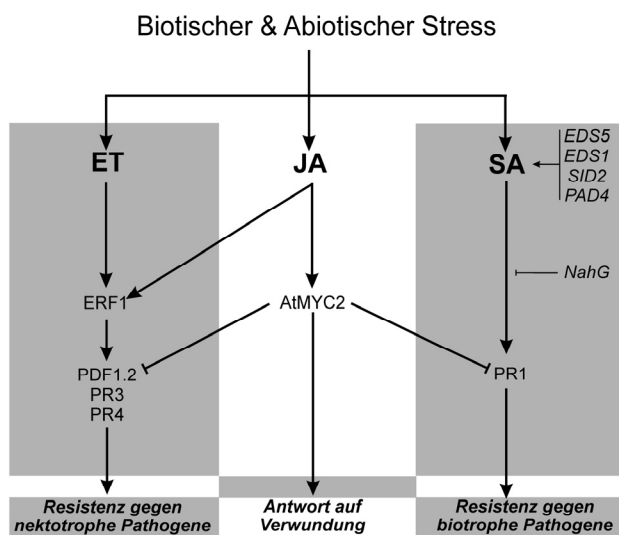


Abbildung 5: Phytohormone und deren Signalwege bei pflanzlichen Stressantworten. Erläuterungen im Text.

Der Anstieg endogener SA in befallenen Pflanzen führt zu einer verstärkten Expression von PR-Genen und einer Aktivierung von Krankheitsresistenz. Einer dieser Abwehrmechanismen ist die Unterdrückung von Auxinsignalen, die für die Entwicklung von Infektionssymptomen während vieler Pflanze/Pathogen-Interaktionen notwendig ist (Referenzen siehe in Robert-Seilaniantz et al., 2007). Abbildung 5 zeigt die Zusammenhänge zwischen den einzelnen Signalwegen, sowie die in dieser Arbeit benutzten Mutanten zur funktionellen Charakterisierung dieser Signalwege bei der *Arabidopsis-Agrobacterium* Interaktion.

### Salizylsäure (SA)

Früher wurde angenommen, dass SA in Pflanzen aus Phenylalanin synthetisiert wird (Verberne et al., 1999). Inzwischen ist ein alternativer Syntheseweg beschrieben worden, bei dem, ähnlich wie in manchen Bakterien, die Enzyme Isochorismatsynthase (ICS) und Isochorismat-Pyruvat-Lyase (IPL) die Syntheseschritte von Chorismat zu SA katalysieren. Mutantenanalysen an *Arabidopsis* bestätigten diese Annahmen, da *SA-induction-deficient sid2* Mutanten, die keine funktionierende ICS1 mehr besitzen, keine SA infolge eines Pathogenbefalls akkumulieren. Dementsprechend sind die Mutanten auch anfälliger für

Infektionen als wildtypische Kontrollpflanzen (Nawrath and Metraux, 1999; Wildermuth et al., 2001).

Es wurden weitere Proteine identifiziert, die die SA-Biosynthese regulieren. *EDS5* (engl.: *enhanced disease susceptibility*) kodiert für einen MATE (*multidrug and toxin extrusion*)-Transporterprotein (Nawrath et al., 2002). *Eds5*- Mutanten können, wie *sid2*, keine SA nach einem Pathogenbefall akkumulieren; höchstwahrscheinlich ist EDS5 an dem Transport phenolischer Substanzen beteiligt, die als Vorstufen der SA-Biosynthese fungieren (Nawrath et al., 2002). Bei *eds1* und *phytoalexin deficient4 (pad4)* Mutanten ist die SA-Biosynthese sowohl während der Pflanze-Pathogen Interaktion, als auch im SA-vermittelten Signalweg behindert. *Eds1* und *pad4* blockieren eine pathogen-aktivierte Expression von EDS5, was die Funktion von EDS1 und PAD4 in der Regulierung der SA-Biosynthese stromauf von EDS5 vermuten lässt. EDS1- und PAD4-Proteine sind Interaktionspartner und nicht nur an der Aktivierung von SA-Signalen beteiligt. Neuere Arbeiten haben die fundamentale Rolle von EDS1 und PAD4 bei der Transduktion von Redoxsignalen als Folge biotischer und abiotischer Stresseinwirkungen bewiesen. Diese Proteine vermitteln auch den Antagonismus zwischen SA-abhängigen Mechanismen und JA-/ET-induzierter Abwehr (Referenzen siehe in Wiermer et al., 2005).

Bevor die SA-Biosynthese bei Pathogenbefall in *Arabidopsis* entschlüsselt wurde, hat man vielfach eine SA-defiziente transgene Pflanze *NahG* für Pathogenabwehrstudien eingesetzt. Diese Transgene exprimiert eine Salizylathydrolase aus *Pseudomonas putida*, die konstitutiv SA zu Catechol degradiert (Friedrich et al., 1995). Allerdings belegen neuere Studien, dass die geschwächte Pathogenabwehr in dieser Pflanze nur zum Teil ein Effekt der geringen SA-Akkumulation ist; vielmehr sind auch die SA-Abbauprodukte Catechol und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biologisch aktiv (Heck et al., 2003). So sollten Ergebnisse, basierend auf Experimenten mit *NahG*, mit Vorsicht interpretiert werden.

### **Ethylen (ET)**

Ethylen ist in eine Vielzahl physiologischer Prozesse bei Pflanzen involviert, z.B. Samenkeimung, Zellstreckung, Fruchtreife, abiotischer Stress (Referenzen siehe in Chen et al., 2005). Ethylen wird über das im Yang-Zyklus gebildete S-Adenosylmethionin (SAM) synthetisiert, das durch ACC-Synthase zu 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC) umgewandelt wird. Die ACC-Oxidase wandelt diese Vorstufe letztendlich zu gasförmigem Ethylen um (Referenzen siehe in Chae and Kieber, 2005).

Ethylen wird von einer ER-lokalisierten Rezeptorfamilie erkannt. Mutationen in der hydrophoben Domäne von jedem der fünf in *Arabidopsis* bekannten Rezeptoren - ETR1, ETR2, EIN4, ERS1 und ERS2 - resultiert in dominanter Unempfindlichkeit gegenüber Ethylen. Manche dieser Mutationen beeinträchtigen die Bindung von Ethylen, was zeigt, dass die Rezeptoren in der Abwesenheit von Ethylen die ET-Signaltransduktion aktiv unterdrücken (Hua and Meyerowitz, 1998; Hua et al., 1998; Sakai et al., 1998). Die hohe ET-Akkumulation induziert verstärkt die Expression der Rezeptor-Gene, um die ET-Signalkaskaden besser kontrollieren zu können, sobald der Ethylenspiegel absinkt.

Die Rezeptoren interagieren physikalisch mit der Raf-ähnlichen Kinase CTR1. Die Bindung von Ethylen an die Rezeptoren inaktiviert sowohl die Rezeptoren, als auch CTR1 (Clark et al., 1998; Hua and Meyerowitz, 1998). Gleichzeitig wird EIN2 (engl.:*ethylene-insensitive*) freigesetzt, welches den ET-Signalweg positiv reguliert. Dieses positive Signal wird von EIN2 auf EIN3/EIL1 Proteine übertragen, die daraufhin im Nukleus akkumulieren. Die Menge an EIN3 wird von zwei F-box Proteinen reguliert, EBF1/2, deren Transkription ebenfalls von Ethylen induziert wird. EBF1 reguliert ET-Signalwege bei niedrigen ET-Konzentrationen, und EBF2 bei hohen (Guo and Ecker, 2003; Gagne et al., 2004). Im Nukleus induzieren EIN3/EIL1 die Transkription von ERF1 (engl.:*ET-response factor*) und anderer Ethylen-regulierter Gene als ersten Schritt der Transkriptionskaskade stromabwärts von Ethylen. ERF1 wird nicht nur durch EIN3 sondern auch durch Jasmonsäure (JA) aktiviert und wurde vor kurzem als ein Verbindungspunkt dieser zwei Signalwege in der Pathogenabwehr identifiziert (Lorenzo et al., 2003). Neben ERF1 sind weitere ERFs durch ET und/oder JA induziert, die in die Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene involviert sind.

### **Jasmonsäure (JA)**

Die Linolensäure ist Ausgangssubstrat für die Biosynthese von Jasmonsäure und ihren Derivaten. Lipoxygenase (LOX) wandelt diese zur 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure um. Allenoxidsynthase (AOS) bildet daraus das Allenoxid, die 12,13-Epoxyoctadecatriensäure. In den nächsten Schritten, katalysiert durch Allenoxidcyclase (AOC) und 12-Oxophytodiensäurereduktase (OPR), entsteht über 12-Oxophytodiensäure eine 12-Oxophytoensäure. Nach weiteren drei Oxidationsschritten an der Carboxylseitenkette entstehen die (-)- und die (+)-7-iso-Jasmonsäure, die im Gleichgewicht miteinander stehen. JA reguliert Antworten auf mechanischen Stress (Verwundung) und Pathogenabwehr. Zusammen mit ET aktiviert JA den Transkriptionsfaktor ERF1 (s.o.) und darüber die Expression der Pathogenabwehrgene *PDF1.2*, *PR3* und *PR4* (siehe 1.3.1.). Antagonistisch zu ERF1-vermittelter Signaltransduktion, reguliert JA über den Transkriptionsfaktor AtMYC2 die Antwort auf Verwundung (Lorenzo and Solano, 2005). Dementsprechend exprimiert die AtMYC2-Mutante *jin1* (*jasmonat-insensetive*) konstitutiv diese Pathogenabwehrgene und ist besonders resistent gegenüber nekrotrophen Pathogenen (Lorenzo et al., 2004).

### **1.4 Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, das komplexe Zusammenspiel von Phytohormonsignalen bei der Entstehung von Pflanzentumoren am Model *Arabidopsis thaliana* – *Agrobacterium tumefaciens* zu bestimmen. Phytohormon-vermittelte Signale sind zum einen direkt am onkogenen Prozess der Tumorgenese beteiligt, zum anderen vermitteln sie aber auch Abwehrreaktionen und physiologische Adaptationen der Pflanze als Folge eines Befalls mit dem onkogenen Pathogen, wie z. B. durch den Tumor verursachten Trockenstress. Somit besteht eine besondere Schwierigkeit darin, den Tumorgeneseprozess dahingehend zu verstehen, unter welchen Umständen Phytohormonsignale als Ursache eines pathogenen Prozesses oder aber als adaptive Anpassung der Wirtspflanze auf den Pathogenbefall wirken.

Die Tumorentwicklung beruht auf dynamischen Wechselwirkungen zwischen *Agrobacterien*, Pflanzenzellen und transformierten Tumorzellen, die sich in folgende Phasen einteilen lassen: (i) Kontakt zwischen *Agrobacterium* und Wirt; (ii) die Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom und Transformation; (iii) das Tumorwachstum (siehe Abb.2). Jede dieser Phasen sollen mit Hilfe von Microarrays auf Änderungen in der Genexpression analysiert werden, um erste Hinweise auf die jeweils beteiligten Phytohormonsignalwege bei der Abwehr der Wirtspflanze auf Agrobakterienbefall zu erhalten. Diese Pathogenabwehrwege, die durch die Stressphytohormone Ethylen, Jasmon- und Salizylsäure reguliert werden, sollen unter Verwendung von *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten in entsprechenden Biosynthese- und/oder Signalwegen funktionell analysiert werden. Diese Untersuchungen sollen Aufschluss darüber geben, welche Abwehrstrategien die Wirtspflanze gegen Agrobakterien einsetzt und warum es trotzdem zur T-DNA-Integration, und somit zur Tumorenstehung kommt.

Phytohormone können die Entwicklung eines Tumors begünstigen, indem sie die Physiologie der befallenen Zellen verändern. Vor allem das Stressphytohormon ABA scheint eine wichtige Rolle in der Regulierung des Wasserhaushaltes im Tumor zu spielen. Einerseits muss der Wasser- und Nährstofffluss von Wirt zum Tumor durch die erhöhte Transpiration umgeleitet werden, andererseits darf der Tumor nicht austrocknen. Diese mutmassliche Rolle von ABA bei der Regulation des Wasserhaushaltes im Tumor soll näher überprüft werden. Es soll dabei untersucht werden, welche ABA-regulierten molekulargenetischen Mechanismen im Tumor induziert sind. Unter Verwendung von ABA-insensitiven und –defizienten *Arabidopsis* Mutanten soll überprüft werden, welche dieser Mechanismen tatsächlich das Tumorwachstum beeinflussen.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Bakterienkulturen und deren Anzucht

#### 2.1.1 Verwendete *Agrobacterium tumefaciens* und *Pseudomonas syringae* Stämme

Die Induktion von Tumoren bei *Arabidopsis thaliana* erfolgte über Stämme des Gram-negativen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens*. Verwendet wurde der Wildtyp Stamm C58 noc (nopaline catabolism construction number 584), der auf YEB-Agar kultiviert wurde (s.u.) und der nicht-onkogene Stamm GV3101, der auf YEB-Selektionsagar durch Zugabe der Antibiotika Rifampicin und Kanamycin angezogen werden mußte. Desweiteren kam der avirulente *Pseudomonas syringae* Stamm, *Pst DC 3000 avirB* zum Einsatz, der auf KB-Selektionsagar mit den Antibiotika Rifampicin und Kanamycin (s.u.) vermehrt wurde. Alle Stammkulturen wurden bei -80 °C zur Erhaltung der Virulenz gelagert und vor jedem Experiment frisch angeimpft.

<u>Bakterium</u>	<u>Virulenz</u>	<u>Referenz</u>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 noc	Wild Typ, onkogen	(Hamilton and Fall, 1971)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Derivat von C58, enthält Plasmid pMP90, nicht onkogen	(Koncz and Schell, 1986)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> DC3000 avirB	avirulent	(Bisgrove et al., 1994)

#### 2.1.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* und *Pseudomonas syringae* für Infiltrationsexperimente

Für die Herstellung der zur Infiltration verwendeten Bakterien-Suspensionen wurden jeweils 50 ml YEB- oder KB-Medium in sterile Erlenmeyerkolben überführt. Von jeder Lösung wurden jeweils 3 ml in ein Reagenzglas überführt und anschließend mit dem Bakterien-Stamm angeimpft. Die Bakterienkulturen wurden über Nacht bei 28°C mit 220 U/min inkubiert. Jeweils 1 ml der Übernachtskulturen wurden am folgenden Tag in einen 50 ml Erlenmeyerkolben überführt und zwei bis drei Stunden bei 28°C inkubiert (120 U/min). Anschließend wurden die Suspensionen abzentrifugiert (10 min, 3.000 U/min, 4°C), der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet dreimal mit jeweils 10 ml einer 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung gewaschen. Die Bakterien wurden in 10 mM MgSO<sub>4</sub> suspendiert und anschließend mit dieser Lösung am Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm auf eine optische Dichte von 0,2 eingestellt. Dies entspricht einer Konzentration von 10<sup>8</sup> Kolonien pro ml Lösung.

#### 2.1.3 Medien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterienkulturen

Um YEB-Agar herzustellen wurden die Feststoffe (s.u.) in Aqua bidest gelöst und mit 1M KOH auf pH 7.8 eingestellt. Das Medium wurde bei 120 °C für 30 min autoklaviert. Jeweils 20 ml des Agars wurden unter sterilen Bedingungen in sterile Petrischalen gefüllt und abgekühlt. Zur Herstellung des YEB-Selektionsagars wurden dem auf ca. 60 °C abgekühlten Medium jeweils 50mg/l Rifampicin (Stammlösung: 10 mg/ml Isopropanol) und 100 mg/ml Kanamycin (Stammlösung: 50 mg/ml Aqua bidest) zugegeben. Für die Herstellung von Kings Broth Medium (KB)-Agarplatten wurden die unten aufgeführten Komponenten in Aqua bidest

gelöst und autoklaviert (s.o.). Nach dem Abkühlen wurde das Medium steril mit  $K_2HPO_4$ - und  $MgSO_4$ -Stammlösung (jeweils 10 %, *m/v*) aufgefüllt. Für die Anlage einer Kultur des avirulenten *Pst*-Stammes *DC3000 avrB* wurden 50 mg/l Rifampicin und 50 mg/l Kanamycin zugegeben. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert und innerhalb von zwei Monaten verbraucht. Das Flüssigmedium wurde wie oben beschrieben hergestellt, aber ohne Zugabe von Agar.

YEB-Agar :

Trypton	0,5 %
Hefeextrakt	0,5 %
Saccharose	0,5 %
$MgSO_4$	50 mM
Agar	1,5 %

Kings broth Agar:

Protease peptone #3	2 %
Glycerol	1 %
$MgSO_4$	1 %
$K_2HPO_4$	1 %
Agar	1,5 %

## **2.2 Anzucht und Wachstumsbedingungen von *Arabidopsis thaliana***

Die Anzucht der Wildtyp-Pflanzen, Mutanten und transgenen Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* erfolgte in Erdkultur.

### **2.2.1 Erdkulturen**

Die getrockneten und bei 4 °C gelagerten Samen des Genotypes WS-2 (Wassilewskija) von *Arabidopsis thaliana* wurden auf Einheitserde Typ P (Gebr. Patzer GmbH & Co KG) ausgesät und bis zu Keimung im Gewächshaus kultiviert. Die Keimlinge im Stadium von zwei Primärblättern wurden in Erde pikiert. Die Pflanzen wurden unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht) oder Langtagsbedingungen (12 h Licht) in einer Klimakammer (Percival, CLF Plant Climatics GmbH, Emersacker, Germany) bis zum Zeitpunkt des Blühens angezogen. Die Temperatur der Lichtperiode betrug 22 °C, die der Dunkelperiode betrug 16 °C. Die Belichtung erfolgte mit Fluoreszenzlampen F32/T8/TL741 für Percival Pflanzenanzuchtkammern (Phillips, USA). Die Pflanzen wurden mit 80 -120  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  belichtet. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug 50-60 %.

### **2.2.2 Hydrokultur**

Die Samen (s.o.) wurden einzeln in Einsätzen auf *Oasis Growing Medium* als Trägermaterial (Agrimedia, Eisenberg, Germany) ausgesät. Die Einsätze wurden in passenden Behältern mit Hydrokultur-Nährmedium (s.u.) plziert und unter regelmässiger Luftzufuhr (15 min alle 2h) mittels Aquariumsteinen in einer Klimakammer unter kontrollierten Bedingungen angezogen. Das Medium (s. u.) wurde 1x in der Woche gewechselt, nachdem die Behälter gründlich gereinigt worden waren, um Algen- und Bakterienwachstum im Medium zu vermeiden. Lichtperiode, Temperatur und Belichtungsintensität siehe oben.

### Nährmedium für Hydrokultur:

#### **Makroelemente**

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1,5 mM
KNO <sub>3</sub>	1,25 mM
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,75 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 mM

#### **Mikroelemente**

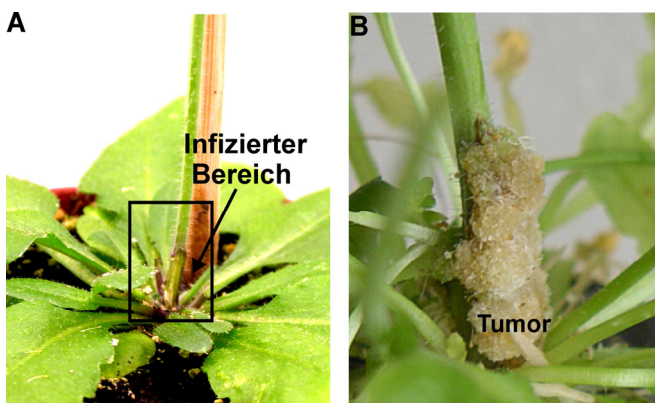
Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> Si	100 µM
Fe-EDTA	72 µM
KCl	50 µM
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50 µM
MnSO <sub>4</sub>	10 µM
ZnSO <sub>4</sub>	2 µM
CuSO <sub>4</sub>	1,5 µM
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,075 µM

### **2.2.3 Arabidopsis Wurzelkultur**

Sterilisierte Samen (Col-0) wurden in einem Erlenmeierkolben in 100 ml sterilem Murashige und Skoog Wachstumsmedium (MS Salze [Sigma] versetzt mit Gamborg's B5 Vitaminen [Sigma] und 1% Saccharose) ausgesät und bei 50 U/min geschüttelt. Keimlinge entwickelten eine hinreichende Menge an Wurzeln innerhalb von 2 Wochen.

### **2.2.4 Induktion der Tumore durch Infizieren mit *Agrobacterium tumefaciens***

Für die Infektion wurden die frisch angeimpften und 1 Tage bei 28°C auf Petrischalen kultivierten Agrobakterien verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde am basalen Ende der Infloreszenzachse mehrmals mit einer sterilen Nadel angeritzt, so dass ein 0,5-1 cm langer Wundbereich entstand (Abb.6). Der verletzte Bereich wurde dann mit Agrobakterien mittels einer Pipettenspitze dick bestrichen. Zur Infektion wurden Pflanzen verwendet, die bereits eine 3-5 cm lange Infloreszenzachse ausgebildet hatten. Nach ca. 30 bis 35 Tagen konnten die Tumore geerntet werden. Zum Vergleich (Referenz) wurden Proben herangezogen, bei denen die Infloreszenzachsen zwar verletzt, die Wunde aber nur mit dem sterilen Puffer (MgCl<sub>2</sub>) ohne Bakterien bestrichen wurde.



**Abbildung 6:** Infektion der Infloreszenzachse von *Arabidopsis thaliana* oberhalb der Rosettenblätter mit *Agrobacterium tumefaciens*. (A) verwundeter und infizierter Bereich an der Basis der Infloreszenzachse; (B) voll entwickelter Tumor 30 Tage nach der Infektion.

### **2.2.5 Präparation von Tumor- und Referenzgewebe**

Die Präparation der Tumore wurde mit Hilfe einer Stereolupe und eines Einmalskalpells durchgeführt. Für RNA- und DNA-Extraktion wurde Tumorgewebe von der Infloreszenzachse sauber abgetrennt, wobei darauf geachtet wurde, dass nur das eindeutig als Tumor

identifizierbare Gewebe abpräpariert wurde. Für Analysen der frühen Infektionsstadien wurde die Infloreszenzachse unmittelbar ober- und unterhalb des infizierten Bereichs mit dem Skalpell durchtrennt. Zum Vergleich wurde der verletzte aber nicht infizierte Bereich der Infloreszenzachsen der Referenzpflanzen abpräpariert. Das Versuchsmaterial wurde sofort im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.2.6 Infiltration von *A. thaliana***

Die Blätter von *A. thaliana* wurden auf der Blattunterseite durch die Stomata mit einer 1 ml Spritze infiltriert, die die Bakterien-Suspension (2.1.4) enthielt. Im Falle der Kontrollpflanzen wurde 10 mM  $\text{MgCl}_2$ -Lösung verwendet. Zur Ernte wurden die infiltrierten Blätter entweder sofort analysiert oder umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur späteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.3 Bestimmung der $\text{H}_2\text{O}_2$ Produktion**

Der Nachweis von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )-Bildung als Folge einer Verletzung oder einer bakteriellen Infektion wurde mittels einer 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Färbung durchgeführt wie bei (Thordal-Christensen et al., 1997) beschrieben. DAB polymerisiert bei Kontakt mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ , wodurch ein dunkel-braunes Präzipitat entsteht. DAB (1 mg/ml) wurde in Aqua bidest 10 min bei pH 2,5 (HCl) gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert mit KOH auf 3,8 eingestellt. Die mit Bakterien infiltrierten Blätter oder die infizierten Infloreszenzachsen wurden in einer frisch hergestellten DAB-Lösung 18 h inkubiert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln und unter Luftabschluss, um die unspezifische Polymerization von DAB zu vermeiden. Anschliessend wurde Chlorophyll aus dem pflanzliches Gewebe durch 10 min Kochen in ETOH 97% entfernt, so dass die dunkel-braune Färbung sichtbar wurde.

### **2.4 Arbeiten mit RNA**

Sterile Gefäße und Gerätschaften sowie RNase-freie Chemikalien wurden für sämtliche Arbeiten mit mRNA oder Gesamt-RNA verwendet. Wasser wurde mit 1 ml/l DEPC vorbehandelt und doppelt autoklaviert.

#### **2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA**

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung des *Plant RNeasy Extraction Systems* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. Die RNA aus Tumorgewebe wurde im RLC, die aus Infloreszenzachsen im RLT Cell-Lysis Puffer des *RNeasy Microkit* (Qiagen, Hilden, Germany) isoliert.

#### **2.4.2 Elektrophorese von RNA**

Ribonukleinsäureproben wurden mit einem Volumen RNA-Ladungspuffer (s.u.) versetzt, bei  $70^{\circ}\text{C}$  für 10 min denaturiert und in einem 1%igen MEN-Agarosegel in 1 x MEN-Puffer (s.u.) mit 6,5 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid zum RNA-Ladungspuffer und anschließender Fluoreszenzanregung (312 nm) sichtbar gemacht und dokumentiert (Image Master VDS, Pharmacia).

MEN-Puffer (10 x):

MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
EDTA	5 mM

RNA-Ladungspuffer (1:1 einzusetzen):

Formamid	720 µl
10 x MEN	160 µl
37 % Formaldehyd	260 µl
H <sub>2</sub> O	250 µl
80 % Glycerol	100 µl
Bromphenolblau	10 µl
Ethidiumbromid	1µl

1% MEN-Agarosegel:

Agarose	600 mg
H <sub>2</sub> O	44,4 ml
10 x MEN	6 ml
37 % Formaldehyd	9,6 ml

**2.4.3 DNase-Verdau**

Sollte Gesamt-RNA für die quantitative PCR eingesetzt werden, erfolgte zuvor ein DNase-Verdau. Für diesen wurden 2,5 µg Gesamt-RNA in 20 µl Gesamtvolumen für 30 Minuten bei 37°C mit DNase (s.u.) inkubiert und anschließend Wasser auf 100 µl Endvolumen aufgefüllt. Nach einer standardisierten Isopropanolfällung bei 4 °C wurde die Probe nochmals mit Ethanol gewaschen (s.u.). Anschließend wurde die RNA in 8 µl sterilem H<sub>2</sub>O gelöst und konnte dann für die cDNA Synthese verwendet werden.

Standard Ansatz DNase-Verdau:

2,5 µg Gesamt-RNA	X µl
10x DNase-Puffer	2 µl
RNase-Inhibitor (MBI)	1 µl
DNaseI (7,5 Units; Amersham)	1 µl

10xDNase-Puffer:

Tris/Cl	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
BSA	50 µg/ml

Isopropanol Fällung:

NH <sub>4</sub> AC (5M)	1/10 v/v
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	add 100 µl
Isopropanol	2/3 v/v

Zentrifugieren (14000 rpm) bei 4°C für 20 min, den Überstand verwerfen, Zugabe von 500µl 98% Ethanol, Zentrifugieren (14000 rpm) bei 4°C für 15 min, dann das RNA-Pellet bei 37°C 15 min trocknen.

#### **2.4.4 Synthese von cDNA**

Unter Verwendung eines Oligo-dT-Primers, der mit dem 3'-poly-A-Bereich der mRNA hybridisiert, wurde die Fähigkeit Reverser Transkriptasen ausgenutzt, von der mRNA eine komplementäre cDNA herzustellen. Der dafür verwendete Reaktionsansatz enthielt die unten aufgeführte Komponenten, zu denen nach zweiminütiger Erhitzung bei 70°C und anschließender Kühlung auf Eis 0,4 µl MMLV-RT (100 U/µl, Promega) zugefügt wurde. Die reverse Transkription selbst lief bei 42°C innerhalb einer Stunde ab. Bei den hier vorgestellten Ergebnissen erfolgte die cDNA-Synthese standardmäßig mit MMLV-RT (engl.: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*, Promega). Im Anschluss an die Synthese konnte die cDNA unverdünnt bei -80°C gelagert werden.

##### Standard-RT-Ansatz:

mRNA	6,7 µl
Oligo-dT-Primer (100 µM)	0,4 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
RT-Puffer (5x, Promega)	2,0 µl
Denaturierung bei 70 °C für 2 min, dann sofortige Kühlung auf Eis	
Zugabe von 0,4 µl MMLV-RT (100 U/µl, Promega),	
Inkubation bei 42 °C für 60 min	

#### **2.5 Transkriptionsanalyse mittels der quantitativer Echtzeit PCR**

Um mittels eines PCR-Ansatzes nicht nur absolute Aussagen über das Vorhandensein von cDNA zu treffen, sondern diese auch zu quantifizieren, wurde quantitative PCR mit Hilfe der LightCycler Technologie (Roche; Rasmussen *et al.* 1998) eingesetzt. Dieses Verfahren erlaubt es, nicht nur die Spezifität der PCR-Produkte anhand von Gelelektrophorese (2.6.1) zu überprüfen, sondern auch mit Hilfe einer Schmelzpunkt-Analyse die Produkte von unspezifischen Amplifikaten zu unterscheiden. Ein Verfolgen des Ablaufs der PCR-Reaktion über die Zunahme der Fluoreszenz pro PCR-Zyklus erlaubt es, auf die Ausgangsmenge eines bestimmten Transkriptes in der zu untersuchenden Probe rückschließen zu können.

##### **2.5.1 Entwurf der Primer für die quantitative PCR**

Das Programm *LightCycler Probe Design* (Roche) diente dazu, die für die quantitative PCR verwendeten Primer zu entwerfen, die von TIBMolBiol (Berlin) synthetisiert wurden. Gemäß den Vorgaben des Herstellers wurde dabei darauf geachtet, daß sowohl die Primerlänge (max. 18 Bp) als auch deren vorhergesagte Anlagerungstemperatur (ca. 60°C) eingehalten wurde. Ferner wurde vermieden, Primer mit einer Neigung zur Sekundärstrukturbildung oder Dimerbildung auszuwählen. Von Vorteil war es, wenn die Primer 3'-terminal die Nukleotide dGTP und dCTP aufwiesen. Da mit cDNA gearbeitet wurde, war es ebenfalls von Vorteil, wenn die Primerpositionen so gewählt wurden, dass das Produkt nicht länger als 500 Bp war und sie auf genomischer Ebene ein Intron umschlossen. Letzteres zeigte bei gelelektrophoretischer Auftrennung eine Verunreinigung mit genomischer DNA an. Vor der Anwendung im *LightCycler* wurde die optimale Hybridisierungstemperatur der Primer in einer konventionellen PCR bestimmt und das gewünschte PCR-Fragment isoliert. Dieses wurde nach Verifizierung mittels Gelelektrophorese (2.6.1) und Sequenzierung (2.6.8) schließlich zur Erstellung eines Standards genutzt werden.

Die Sequenzen der verwendeten Primer waren wie folgt: PR5 (At1g75040) 5'-AAT GTC AAG CTG GGG A (forward), 5'- AGG TGC TCG TTT CGT C (reverse), 283 bp; similar to PR1 (At2g19970), 5'-TCC GAT AGC GGC AAA G (forward), 5'- CCC ACT GGC ATA GGA T (reverse), 192 bp; PR3 (At3g12500), 5'- CAG ACT TCC CAT GAA AC (forward), 5'-TTG GTC CTC TTC CGT A (reverse), 163 bp; PR1-like (At2g19990), 5'-CTG TGC CAT GAA GCA TT (forward), 5'- GGA CGT TGA CCG ATG TA (reverse), 282 bp; PR1 AT2g14610 104 bp; LTP (At3g58550), 5'-AGT CAG GAT ATA AAG GGA TGT (forward), 5'-GGA AGG GAG GCT CAT TG (reverse), 225bp; Cor15b (At2g42530), 5'-TTG ATA TAC GCC GTT AAA AGT G (forward), 5'-CCC TCT ACG AAC TCA GC (reverse), 248 bp; ERD5 (At3g30775), 5'-AGT TTG CAC AGC TAT ATG G (forward), 5'-CCG GCG ATT AAT CTC CT (reverse), 211bp; GH3.3 (At2g23170), 5'-TGC GGA TAA GTC GAT AGG (forward), 5'-CTG GGC TGA AGT GTG TAG A (reverse), 185bp; MAM1 (At 5g23010), 5'-ATA GTT GGA GCG AAC TGT (forward), 5'-GCT AGA TGT TAC TAA TGC CTT CA (reverse), 297 bp; POT1 (At1g59740), 5'-TTA CAA GCA ATC TGC AAA GG (forward), 5'-TGC GTC TCG AAG ACT TAA T, 269 bp; PYK 10 (At3g09260), 5'-AAA TTA CGC CAT TGG TAG C (forward), 5'-GCA TAC TCA AAA GAT GCC T (reverse), 221 bp; ATCTH (At2g25900), 5'- ACG TGT ATT ACC TTG TTC G (forward), 5'-CTC TCT ACT GAG TCT TGC AT (reverse), 361 bp; ERF (At5g61590), 5'-GCA TGA ATT GAC CGG AG (forward), 5'-CAT TAC AGA GGC GTG AGA A (reverse), 216 bp. Die cDNA Mengen wurde über Lightcycler 3.1 (Roche) quantifiziert. Alle Quantifizierungen wurden in Bezug auf die Menge der Aktin 2/8 cDNA Fragmente durchgeführt, die mittels ACTfwd (5<sup>#</sup>-GGT GAT GGT GTG TCT) und ACTrev (5<sup>#</sup>-ACT GAG CAC AAT GTT AC) Primern amplifiziert wurden.

### 2.5.2 Durchführung der quantitativen PCR

Als Matrize für die quantitative PCR diente cDNA, die zuvor 1:20 mit sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt und 100:1 mit tRNA (Sigma) versehen worden war. tRNA erhöhte die Haltbarkeit der cDNA-Verdünnung. Die Reaktion der quantitativen PCR erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers mit dem *FastStart DNA Master SYBR Green I Kit* (Roche). Jeder Reaktionsansatz wurde dazu in Glaskapillaren (Roche) überführt. Bei dieser folgten auf einen anfänglichen Denaturierungsschritt von 10 Minuten bei 95°C 45 Vermehrungszyklen, in denen jeweils eine Sekunde bei 95°C denaturiert wurde und sich dann nach 7 Sekunden bei der ermittelten optimalen Anlagerungstemperatur der Primer eine Elongationsphase von 19 Sekunden bei 72°C anschloß. Darauf folgte eine Zeitspanne von 5 Sekunden, in der die Fluoreszenzdetektion bei 79°C stattfand. Nach diesen 45 Zyklen wurde die Bestimmung der Schmelzpunkte der erhaltenen PCR-Produkte vorgenommen.

#### Standard-Experiment:

sense-Primer (10 mM)	1 µl
antisense-Primer (10 mM)	1 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,4 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	11,6 µl
LightCycler FastStart Enzyme	2 µl
cDNA	2µl

### PCR-Profil:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation	Detektion
1	95° C, 10 min			
45	95° C, 1 sec	50-62° C (primerabhängig), 7 sec	72° C, 19 sec	79° C, 5 sec

### **2.5.3 Auswertung der quantitativen PCR**

Da die absolute Molekülanzahl an eingesetzter cDNA nicht genau bestimmt werden konnte, diente ein Abgleich mit der vorhandenen cDNA-Anzahl eines als konstitutiv exprimiert angesehenen Gens der relativen Quantifizierung. Dafür wurden in jeder Probe die cDNA-Fragmente des Aktins *Act2.8* (Szyroki et al., 2001) bestimmt. Die relative Molekülanzahl der cDNA (cDNA(Gen)) eines fraglichen Gens wurde hierzu im Verhältnis zur Aktin-Molekülzahl nach folgender Formel ermittelt:

$$(cDNA(Gen)) = 2[n(Aktin) - n(Gen)].$$

Hierbei repräsentiert  $n$  die Anzahl der PCR-Zyklen die zur Erlangung eines festgelegten Schwellenwert erforderlich waren. Dieser Schwellenwertzyklus war für die zu untersuchende cDNA und Aktin gleich. Er wurde in jeder PCR so bestimmt, dass die Messpunkte der Fluoreszenzsignale innerhalb der exponentiellen Phase der PCR lagen. Eichgeraden wurden für alle zu untersuchenden cDNAs dadurch erzeugt, dass Standards (2.5.1) mit 10, 1, 0,1, und 0,01 ng Amplifikat/ $\mu$ l als Proben eingesetzt wurden. Die unterschiedliche Anzahl an PCR-Zyklen, die bis zum Erreichen des erwähnten Schwellenwertzyklus verstrich, erlaubte eine Korrelierung der Zyklenzahl mit der spezifischen cDNA-Menge. Es konnte so die Bestimmung des absoluten cDNA-Gehalts für ein untersuchtes Gen in der Ausgangsprobe ermittelt werden. Dafür wurde grundsätzlich nicht nur die zu untersuchende Probe, sondern neben einer Wasserkontrolle auch der Standard mit 10 ng Amplifikat/ $\mu$ l verwendet.

## **2.6 Arbeiten mit DNA**

### **2.6.1 DNA-Gelelektrophorese**

Die Größenauftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte elektrophoretisch in Agarosegelen. Die entstandenen Bandenmuster wurden durch die Zugabe von 100 ng/ml Ethidiumbromid (Roth) zu den Gelen und eine anschließende Fluoreszenzanregung bei 320 nm (Image Master VDS; Pharmacia) sichtbar gemacht. Dabei konnten Fragmente, die durch quantitative PCR gewonnen wurden und deshalb kurz waren (<500 Bp), in 3%igen TBE-Agarosegelen (SeaKem LE-Agarose, Biozym) aufgetrennt werden. In Standard-Elektrophoresekammern erfolgte bei 40 mA in 1x TBE-Puffer (s.u.) die Auftrennung der DNA-Proben, denen zuvor das fünffache Volumen an Probenpuffer (s.u.) zugesetzt worden war. Als Größenstandard diente 100 bp-marker (Sigma-Aldrich).

#### 5 x DNA-Probenpuffer:

Bromphenolblau	0,25 %
Xylencyanol	0,25 %
Glycerin	50 %
EDTA	100 mM



#### 10 x TBE (Tris-Borat-EDTA):

Tris-HCl, pH 8,0	1 M
Borsäure	0,9 M
EDTA	0,01 M

### **2.6.2 Aufreinigung von DNA**

Banden von DNA-Fragmenten, die nach erfolgter gelelektrophoretischer Auftrennung (2.6.1) und Vergleich mit dem Größenstandard die gewünschte Größe zeigten, konnten aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA eluiert werden. Dies geschah für Standards zur quantitativen PCR (2.5) mit Hilfe des Kits, *QIAquick-Gel-extraction* (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers. War bei der gelelektrophoretischen Überprüfung von PCR-Produkten nur eine einzige Banden zu detektieren, so erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produkts direkt aus dem PCR-Ansatz mit Hilfe des Kit, *QIAquick-PCR-Purification* (Qiagen).

### **2.6.3 Sequenzierungen**

Alle Sequenzierungsreaktionen erfolgten mit aufgereinigtem PCR-Produkt (2.6.2), beruhten auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger, Nicklen, & Coulson 1977) und wurden mit dem Sequenziergerät LiCOR 4200 von S. Michel und U. Taggeselle durchgeführt (Chemielaborantin bzw. Biologisch-Technische-Assistentin, Julius-v.-Sachs-Institut, Universität Würzburg). Als Primer dienten die für die quantitative PCR verwendeten. Erhaltene DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm Vector NTI 7.1 (InforMax, Inc.) analysiert und Sequenzähnlichkeiten zu bekannten DNA- Sequenzen unter Verwendung des BLAST-Algorithmus' (Altschul *et al.* 1990) mit Hilfe des NCBI-Servers überprüft (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, Maryland, USA).

### **2.6.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Verschiedene Thermocycler (Modell Varius V45, Landgraf; RoboCycler Gradient 40, Stratagene oder Mastercycler personal, Eppendorf) dienten der PCR-Durchführung. Diese enthielten einen Standardansatz (s.u.) und wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 50 µl aufgefüllt. Eine Negativkontrolle (Ansatz ohne Template-DNA) fungierte ebenso zur Überprüfung der Reaktionen wie deren im Anschluß durchgeführte gelelektrophoretische Auftrennung (2.9.1) und die Kontrolle mit Hilfe des ImageMaster VDS Systems (Pharmacia Biotech). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten PCR erfolgten mit der *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Biotherm).

#### Standard-PCR-Ansatz:

PCR-Puffer (10x, Biotherm)	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
<i>fw</i> -Primer (10 µM)	1 µl
<i>rev</i> -Primer (10 µM)	1 µl
DNA-Matrize	10 ng
Taq-Polymerase (5 U/µl, Biotherm)	1 µl
PCR-H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

### Standardprogramm des Thermocyclers:

Zyklenzahl	Denaturierung	Annealing	Elongation
1	95° C, 5 min		
30-40	95° C, 30 sec	48-62° C (primerabhängig), 30 sec	72° C, 60 sec/1000 bp

### **2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit Hilfe eines UV-Photospektrometers (Gene Quant II, Pharmacia) mittels Messung der Extinktion bei 260 nm (Absorption der Nukleinbasen) und 280 nm (Absorption aromatischer Aminosäuren). Aus den daraus erhaltenen Werten konnten sowohl Konzentration als auch die Reinheit der zu untersuchenden Proben ermittelt werden.

## **2.7 Biochemische Analyseverfahren**

### **2.7.1 *Agrobacterium*-vermittelte transiente Transformation**

Für die transiente Transformation von *A. thaliana* ABA-Mutanten (*aba3-1*, *abi3-1*, *abi2-1*, *abi1-1*, *abi1-1R4*, *abi1-1R5*) und Wildtyp Pflanzen (Col-0, Ler) wurde *Agrobacterium* GV3101 (pMP90; Koncz and Schell, 1986) eingesetzt. Dieser Stamm beinhaltet das binäre Plasmid pMDC164 für die Expression von GUS unter Kontrolle von 2x CaMV-35S Promoter. Vor der Infiltration wurden Agrobakterien mit dem Stamm 19K vermischt, um *gene silencing* zu verhindern (Latz et al., 2007). Das Wachstum der Bakterien und die Infiltration in die Blätter wurde wie in 2.1. durchgeführt. Das bakterielle Pellet aus Übernachtskulturen wurde in dem Induktionsmedium mit 150 µM Acetosyringon gelöst und 2 Stunden bei RT in der Dunkelheit inkubiert, um die Expression der *vir*-Gene zu induzieren. Eine Suspension aus den beiden *Agrobacterium* Stämmen (5 ml GV3101 + 1 ml 19K), eingestellt auf OD<sub>600</sub> ~0.6, wurde entweder in die 2-3 Monate alten *Arabidopsis* Blätter infiltriert oder in die Basis der Infloreszenzachse von 3-4 Monate alten Pflanzen injiziert.

### **2.7.2 Bestimmung der β-Glucuronidase (GUS)-Aktivität**

Qualitative und quantitative Bestimmungen der GUS Aktivität wurde nach der Methode von (Jefferson et al., 1987) von C.-W. Lee (Botanik I, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg) an 4 bis 7 Tage alten *Arabidopsis* Blättern ausgeführt. Alle Lösungen wurden unter Vakuum infiltriert (jeweils 3-mal für 5 Minuten). Für die Visualisierung von GUS wurde das Chlorophyll aus den Blättern mit 70% Ethanol bei 70 ° C entfernt und die Dokumentation erfolgte mit dem Scanner (HP Scanjet 8200). Die fluorimetrische Quantifizierung der GUS-Aktivität erfolgte mit Hilfe eines Mikroplatten-Fluorimeter (Fluoroskan Ascent, Labsystems, Finnland) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm. Proteinkonzentrationen wurden mit Hilfe des Roti<sup>®</sup>-Nanoquant Kits (Roth, Karlsruhe, Germany) bei der OD<sub>595</sub> mit BSA als Standard in einem Mikroplattenlesegerät (Dynex MRX-TC Revelation; Dynex Technologies, Denckendorf, Germany) gemessen.

### **2.7.3 Analytische Bestimmungen von Suberin und Lignin**

Die analytische Bestimmung der Suberin- und Ligninzusammensetzung wurde mit 1-2 mg getrocknetem Pflanzenmaterial von J. Zeier (Botanik II, Julius-von-Sachs Institut, Universität Würzburg) durchgeführt, wie bei Zeier et al. (1999) beschrieben. Die Identifikation und Quantifizierung der Reaktionsprodukte mittels der Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) wurden wie bei Zeier and Schreiber (1997) beschrieben durchgeführt.

### **2.7.4 Bestimmung von 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC), Jasmonsäure (JA), 12-Oxo-Phytodienoidsäure (OPDA) und Salizylsäure**

Die Bestimmung von Stressphytohormonen JA, OPDA, ACC und SA wurde von O. Miersch im Labor von C. Wasternack (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale) ausgeführt. Für die Bestimmung von ACC wurden die gefrorenen pflanzlichen Proben (jeweils 500 mg Frischgewicht) im 1 ml 50% (vol/vol) Methanol für 30 min bei 55°C geschüttelt. Der ACC-Gehalt von Methanolextrakten wurde durch die chemische Oxidation zu Ethylen determiniert und mittels GC-MS quantifiziert (Lizada and Yang, 1979). JA und OPDA wurden durch die Derivatisierung zu JA- und dn-OPDA- Pentafluorobenzylester bestimmt (Stenzel et al., 2003). [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-JA und [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-OPDA wurden als interne Standards für die GC-MS eingesetzt. SA wurde mittels HPLC-Analyse nach der in Bi et al. (1995) beschriebenen Methode bestimmt.

### **2.7.5 Bestimmung von Auxin (IAA)**

Die Auxin-Bestimmung wurde im Labor von J. Lüdwig-Müller durchgeführt (Institut für Botanik, TU Dresden). Das gefriergetrocknete Pflanzenmaterial oder die Bakterienkultur (jeweils 100 mg Frischgewicht als Ausgangsmenge) wurden mit Isopropanol/Essigsäure (95:5, v/v) extrahiert. Für die Analyse der Gesamt-IAA wurde jede Probe mit 500 ng <sup>13</sup>C<sub>6</sub>-IAA (Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MS, USA) versetzt und für 2 Stunden bei 4 °C geschüttelt. Nach der anschliessenden Zentrifugation wurde der Überstand getrocknet und hydrolysiert mit 7 M NaOH bei 100 °C. Der pH wurde auf 2,5 eingestellt. Auxine wurden zweimal in gleichen Volumina Ethylacetat extrahiert. Die Methylierung wurde wie bei Cohen (1984) beschrieben mit Diazomethan durchgeführt und für die anschliessende Analyse in Ethylacetat gelöst. GC-MS wurde mit Hilfe des Varian CP-3900 Gaschromatograph und Varian Saturn 2100 Massenspektrometer durchgeführt. Der Gaschromatograph war mit einem CP-8400 Autosampler ausgestattet (Varian, Walnut Creek, CA, USA). Die Identifikation und die Quantifizierung der Produkte erfolgte nach dem Protokoll wie beschrieben (Campanella et al., 2004).

## **2.8 Microarrays und Datenprozessierung**

Um die differentielle Genexpression von verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung zu untersuchen, wurden Microarrays eingesetzt. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Microarrays (*ATH1-121501*, *Affymetrix*) repräsentieren das nahezu komplette exprimierte Genom von *Arabidopsis thaliana*. Zwei Labore in Wien, Österreich („VBC-Genomics Bioscience Research“-GmbH, [www.vbc-genomics.com](http://www.vbc-genomics.com), in Zusammenarbeit mit Prof. K. Palme, Universität Freiburg, Germany) und in Nottingham, UK („Genomic Arabidopsis

Resource Network“, GARNet, [www.york.ac.uk/res/garnet/may.htm](http://www.york.ac.uk/res/garnet/may.htm)) wurden beauftragt, jeweils zwei *Affymetrix Arabidopsis thaliana* Genomchips ATH1 mit RNA aus tumorfreiem sowie aus Tumorgewebe zu hybridisieren und die resultierenden Fluoreszenzintensitäten auszulesen (Deeken et al., 2006). Insgesamt standen also 8 Microarrays für vergleichende Expressionsanalysen vom Tumorstadium zur Verfügung: 4 Referenz-Arrays, die mit RNA aus tumorfreiem Infloreszenzachsengewebe und 4 Arrays, die mit RNA aus Tumorgewebe hybridisiert worden waren. Darüberhinaus wurde die differentielle Genexpression der beiden Zeitpunkte im Verlauf der Tumorentwicklung, 3 Stunden und 6 Tage nach Behandlung mit Agrobakterien anhand von Microarrays analysiert (*ATH1-121501*, *Affymetrix*). Die Durchführung der Hybridisierung und Auswertung der Rohdaten erfolgte in der Microarray Facility, Tübingen (<http://www.microarray-facility.com>). Hierfür wurden *Arabidopsis* Infloreszenzachsen an der Basis verletzt und entweder mit *Agrobacterium tumefaciens* C58 (2.1.) oder GV3101 (2.1.) infiziert sowie entsprechendes unbehandeltes Gewebe als Kontrolle analysiert. Daraus wurden jeweils drei RNA-Proben gewonnen, d. h. drei unabhängige biologische Replikate und für Hybridisierungen eingesetzt. Insgesamt wurden 15 Mikroarrays hybridisiert und ausgewertet, da bei der Infektion für 3 Stunden nur der onkogene Stamm C58 und nicht GV3101 verwendet wurde. Die ausgelesenen Fluoreszenzwerte wurden als CEL-Dateien zur Verfügung gestellt und für die weitere Auswertung verwendet.

### **2.8.1 Das Softwareprogramm R**

Die Aufbereitung und Normierung der Hybridisierungssignaldaten wurde mit Hilfe der *Bioconductor* Pakete des Softwareprogramms *R* durchgeführt, einem von Ross Ihaka & Robert Gentleman (1996) entwickelten System zur statistischen Analyse (Gentleman et al., 2004). Es ist Teil des GNU Projektes (rekursive Abk. „GNU is Not Unix“, [www.gnu.org](http://www.gnu.org), [Stand: 02.06.07]), das als frei erhältliche Software für das Betriebssystem Unix zur Verfügung steht. Das Softwareprogramm *R* kann von der Internetseite <http://www.cran.r-project.org>, [Stand: 24.04.07]) bezogen werden.

### **2.8.2 Bioconductor-Programme zur Genexpressionsanalyse**

Innerhalb von *Bioconductor* gibt es zahlreiche Software-Pakete, mit deren Hilfe Genomdaten statistisch und graphisch ausgewertet werden können. Diese sind unter <http://www.bioconductor.org> ([Stand: 05.05.04]) kostenfrei erhältlich und werden unter *R* angewendet (Gentleman, 2003). *R* und *Bioconductor* wurden in dieser Arbeit verwendet, um die *Arabidopsis* Microarray-Daten effektiv zu verwalten, bearbeiten, graphisch darzustellen und zu speichern. Besonders wichtige Funktionen, die mit Hilfe von *Bioconductor* für die Bearbeitung der Genexpressionsdaten ausgeführt worden sind, sind Normalisierungen und statistische Tests. Zur Auswertung von *Affymetrix* Microarrays ist das „affy“-Paket entwickelt worden, das in dieser Arbeit verwendet wurde. Statistische Tests wurden mit dem Paket „multtest“, Bay'sche Statistik-Methoden mit Hilfe des Paketes „limma“ durchgeführt. Bay'sche Statistikmethoden sind für die Berechnung von robusten statistischen Tests geeignet.

### 2.8.3 Normalisierung der Microarraydaten

Durch die Normalisierungs-Funktionen wurden aus den von einem Scanner ausgelesenen Werten der 11 Oligomere eines „Probe Sets“ pro Gen und Array ein Expressionswert berechnet, der der relativen Menge der mRNA des Gens entspricht. Die Normalisierung gliederte sich in vier Schritte: 1. Hintergrundkorrektur, 2. Normalisierung/Transformierung, 3. „*Perfect Match*“-Korrektur und 4. Zusammenfassung der Intensitäten zu einem Expressionswert.

#### Hintergrundkorrektur

Jedes Scannerbild enthält eine geringe Hintergrundfärbung, selbst wenn statt RNA Wasser fluoreszenzmarkiert würde und keine Hybridisierung stattgefunden haben kann (Gautier et al., 2004). Dieser Hintergrund wurde ermittelt und von den Daten subtrahiert.

#### Normalisierung/Transformierung

Das „affy“-Paket bietet mehrere Methoden zur Normalisierung an, die verschiedene Arrays miteinander vergleichbar machen, indem sie systematische Fehler entdecken und korrigieren. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Varianz-Stabilisierungs-Transformation (VSN, „*Variance Stabilizing Normalization*“), werden die Daten so transformiert, dass verschiedene Arrays miteinander verglichen werden können. Dazu wird die Varianz, die bei kleinen Werten typischerweise klein und bei großen Werten sehr groß ist, für alle Gene auf einen Wert berechnet, der von der mittleren Intensität unabhängig ist (Huber et al., 2002).

Da zahlreiche verschiedene Faktoren auf den gesamte Array einwirken, aber jeden Array anders beeinflussen, entstehen Unterschiede zwischen den Arrays. Entscheidend für die gemessenen Fluoreszenzwerte sind beispielsweise die Menge der eingesetzten RNA und die Effektivität der cDNA-Synthese sowie die zeitgleich ablaufende Fluoreszenzmarkierung der Proben. Diese Faktoren wirken jeweils auf einen ganzen Array und können mit der VSN korrigiert werden. Die VSN benutzt als Eingabewerte die von einem Scanner ausgelesenen Rohintensitäten der Microarrays, die in den CEL-Dateien als Oligomerintensitäten gespeichert sind. VSN wurde für die Normalisierung der Arrays verwendet, die mit RNA aus *Agrobacterium tumefaciens C58* für 3 Stunden behandelten Gruppen, Tumor-RNA und entsprechender Kontrollen hybridisiert wurden. Die Rohintensitäten der Arrays aus der 6 Tage Behandlungsgruppe wurden mittels gcRMA-Algorithmus (Bioconductor paket „gcrma“ (Wu, 2005) normalisiert. gcRMA ist eine Modifikation des *Robust Multiarray Analysis (RMA)*-Algorithmus (Irizarry et al., 2003). Im Gegensatz zu RMA benutzt gcRMA die Information der Probensequenz, um die Affinität jeder Probe für die Berechnung der Expressionswerte zu bestimmen.

#### „*Perfect Match*“-Korrektur

Die „*Mismatch*“ (MM)-Oligomere auf dem ATH1-Genchip (Affymetrix) sollen nicht-spezifische und Kreuzhybridisierungen mit anderen, ähnlichen Genen quantifizieren. Die MM-Intensitäten können von den „*Perfect Match*“ (PM)-Intensitäten abgezogen werden, um den nicht erwünschten Anteil des Signals zu löschen. Für das Berechnen der Expressionswerte der einzelnen Gene wurden nur PM-Werte verwendet.

### Zusammenfassung der Intensitäten

Bei diesem Schritt werden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Oligomere eines „Probe Sets“ zu einem Expressionswert zusammengefasst. Wiederum bietet das „affy“-Paket von *Bioconductor* (Gentleman et al., 2005) mehrere Methoden an. In dieser Arbeit wird die „Median Polish“-Funktion von Tukey (1977) verwendet, die für jedes Gen einen Expressionswert ermittelt, der zur Basis 2 logarithmiert ist. Der „Median Polish“ ist eine iterative Methode, die abwechselnd den Median der Spalten und Reihen einer Matrix aus Genexpressionswerten von den einzelnen Werten abzieht. Die Iteration wird bis zur Konvergenz der Daten oder bis eine vorher festgelegte Anzahl von Iterationen erreicht ist fortgeführt.

#### **2.8.4 Verhältnis als Maß der Genexpressionsveränderung**

Das „Verhältnis“ (V) beschreibt die Änderung der Expression eines Genes in verschiedenen Zuständen. Dazu wird ein Verhältnis aus den zwei Gewebetypen (Tumor und tumorfreies Gewebe) gebildet. Um für jedes Gen ein „Verhältnis“ zu berechnen, werden die Intensitäten der Microarrays mit der *Expresso*-Funktion normalisiert und anschließend das Verhältnis des Medians der Expressionswerte aus dem behandelten Gewebe und des Medians der Expressionswerte aus dem unbehandelten Gewebe gebildet.

$$V = \frac{\text{Median}(\text{behandelt})}{\text{Median}(\text{unbehandelt})}$$

Wobei V für den „Verhältnis“ steht.

Weil die „*Medianpolish*“-Option die Expressionswerte zur Basis 2 logarithmiert, wurden sie innerhalb der „Verhältnis“-Berechnung wieder entlogarithmiert, um das „Verhältnis“ auf der normalen Skala betrachten zu können. Das „Verhältnis“ auf normaler Skala wird gerne als Angabe für die differentielle Expression von Genen verwendet. Bei der Interpretation des „Verhältnisses“ muss allerdings beachtet werden, dass bei niedrigen Expressionslevels leicht sehr hohe „Verhältnisse“ entstehen, während diese bei hohen Expressionslevels sehr viel schwieriger zu erreichen sind. Deswegen ist ein Grenzwert ab dem ein Gen differentiell exprimiert sein soll, basierend auf dem „Verhältnis“ ungeeignet. Allerdings können differentiell exprimierte Gene mit anderen Methoden ausgewählt werden (s.u.) und anschließend deren „Verhältnisse“ betrachtet werden, um das Ergebnis zu interpretieren. Werden Rohintensitäten auf denen noch keine Normalisierung durchgeführt wurde betrachtet, so ist der zufällige Fehler bei Wiederholungen des gleichen Genexpressions-Experimentes ungefähr proportional zur Stärke des Signals (der Intensität). Daher sind „Verhältnisse“ bei hohen Intensitäten schwieriger zu reproduzieren als bei mittleren Intensitäten (Nadon and Shoemaker, 2002). Die Verteilungen der Genexpressionsintensitäten auf normaler Skala sind in der Regel zudem meist asymmetrisch und verletzen somit die Voraussetzung der normalverteilten Daten für statistische Tests.

### 2.8.5 Der T-Test in der Limma-Analyse

Das *Bioconductor*-Paket „Limma“ („*Linear Models for Microarray Analysis*“) wurde ebenfalls für die Analyse von Microarray-Daten programmiert (Gentleman et al., 2004; Smyth 2004). Sein Schwerpunkt liegt auf der Datenanalyse von cDNA-Arrays der Stanford-Technologie. Das statistische Modell beruht auf linearen Modellen, welche für alle Microarrays einschließlich *Affymetrix*-Arrays verwendet werden können, um differentiell exprimierte Gene zu finden. Das lineare Modell berechnet für jedes Gen einen durchschnittlichen M-Wert [ $\log(\text{Expressionswerte von behandeltem Gewebe}) - \log(\text{Expressionswerte von unbehandeltem Gewebe})$ ], der dem logarithmierten (Basis 2) Verhältnis entspricht, einen p-Wert und einen T-Wert. Die Berechnung der Bayes Statistik liefert differentiell exprimierte Gene mit Hilfe einer moderaten T-Statistik (Smyth et al., 2003). Diese liefert auch für wenige Wiederholungen der Experimente ( $n = 2-4$ , im Gegensatz zum klassischen T-Test  $n \geq 9$ ) glaubwürdigere Ergebnisse. Die logarithmierten Expressionswerte werden mit einer Normalverteilung modelliert. Zu der empirischen Varianz und dem Mittelwert werden modellierte „Prior“ (Annahmen) aus der Normalverteilung addiert. Diese repräsentieren die durchschnittlichen Werte für den Mittelwert und die Varianz aller Gene eines Microarray-Experimentes. Dadurch wird die Berechnung des T-Wertes bei wenigen Wiederholungen robuster, denn Gene mit zufällig sehr geringer Varianz bekommen durch die Addition des „Priors“ keinen überhöhten T-Wert zugeordnet, wie es bei dem klassischen T-Test oft beobachtet wird.

Folgende drei Versuchsgruppen wurden in einem linearen Model eingesetzt, um differentiell exprimierte Gene 6 Tage nach der Infektion zu identifizieren: (a) infiziert mit *A. tumefaciens* C58 versus Referenz (b) infiziert mit *A. tumefaciens* GV3101 versus Referenz und (c) infiziert mit *A. tumefaciens* GV3101 versus infiziert mit *A. tumefaciens* C58. Nur jeweils ein Vergleich wurde durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene 3 Stunden nach der Infektion mit C58 oder in entwickelten Tumoren zu ermitteln. Für jedes Gen und jeden Vergleich wurden Verhältnis, P-Wert und die Signifikanz mittels „*False Discovery Rate*“ (FDR) von (Benjamini and Hochberg, 2000) korrigiert.

### 2.9. Statistische Auswertung

Die dargestellten Werte in den Kurven und Balkendiagrammen sind Mittelwerte (MW). Die Fehlerbalken beschreiben entweder die Standardabweichung (SD) bei  $n=3$  oder den Standardfehler (SEM) bei  $n>6$ . Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Datensätzen wurde mittels Students T-Test bei Vergleich von zwei Datensätzen durchgeführt. Bei Vergleich von mindestens drei Datensätze wurde die univariate Varianzanalyse eingesetzt, nach der englischen Bezeichnung *analysis of variance*, auch als **ANOVA** bezeichnet. Die Verfahren untersuchen, ob (und gegebenenfalls wie) sich die Erwartungswerte der metrischen Zufallsvariablen in verschiedenen Gruppen (auch *Klassen*) unterscheiden. Mit den Prüfgrößen des Verfahrens wird getestet, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen. Für die statistische Auswertung der Mikroarrays siehe 2.8.5. Die Daten beziehen sich auf einen begrenzten Zeitraum, der in den jeweiligen Legenden vermerkt ist. Die Anzahl der Wiederholungen ist ebenfalls in den Legenden

angegeben. XY Diagramme wurden statistisch ausgewertet. Hierzu wurde nach Überprüfung der Normalverteilung die Pearson Korrelation angewandt. Die Berechnungen erfolgten mit SYSTAT 9 (SPSS Inc., Chicago, IL 606066307, 1999).



### 3 Ergebnisse

Phytohormone, wie Salizylsäure, Jasmonsäure, Ethylen, Abscisinsäure oder Auxin sind pflanzliche Signalmoleküle, die eine wichtige Rolle bei der Steuerung physiologischer Prozesse spielen. Bei der Aufklärung der einzelnen Signalwege in den letzten Jahrzehnten wurde deutlich, dass diese Signalstoffe keine individuellen Wege beschreiten, sondern vielmehr ihre physiologische Wirkung in einem komplexen Signalnetzwerk entfalten. Zu den durch Phytohormone gesteuerten Prozessen gehören Entwicklung, Wachstum, Pathogenabwehr und Anpassungen an abiotische Stressfaktoren. Eben diese Prozesse spielen auch bei der Entstehung pflanzlicher Tumore nach Befall mit *Agrobacterium tumefaciens* eine Rolle und die Akkumulation von Phytohormonen im Tumor legt deren Beteiligung daran nahe. Somit sind diese Signalstoffe zum einen direkt am Prozess der Tumorgenese (Entwicklung und Wachstum) beteiligt, zum anderen induzieren sie aber auch Abwehrreaktionen und Trockenstressanpassung in der Wirtspflanze als Folge des Befalls mit diesem onkogenen Pathogen. Dadurch entsteht die Schwierigkeit zu unterscheiden, unter welchen Umständen Phytohormonsignale als Ursache des pathogenen Prozesses, oder aber als adaptive Anpassung infolge des Pathogenbefalls wirken. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb zunächst untersucht, wann Pathogenabwehrreaktionen beim Wirt nach Befall mit *A. tumefaciens* einsetzen.

#### **3.1 Untersuchungen an drei Stadien der *Agrobacterium*-Pflanze-Interaktion**

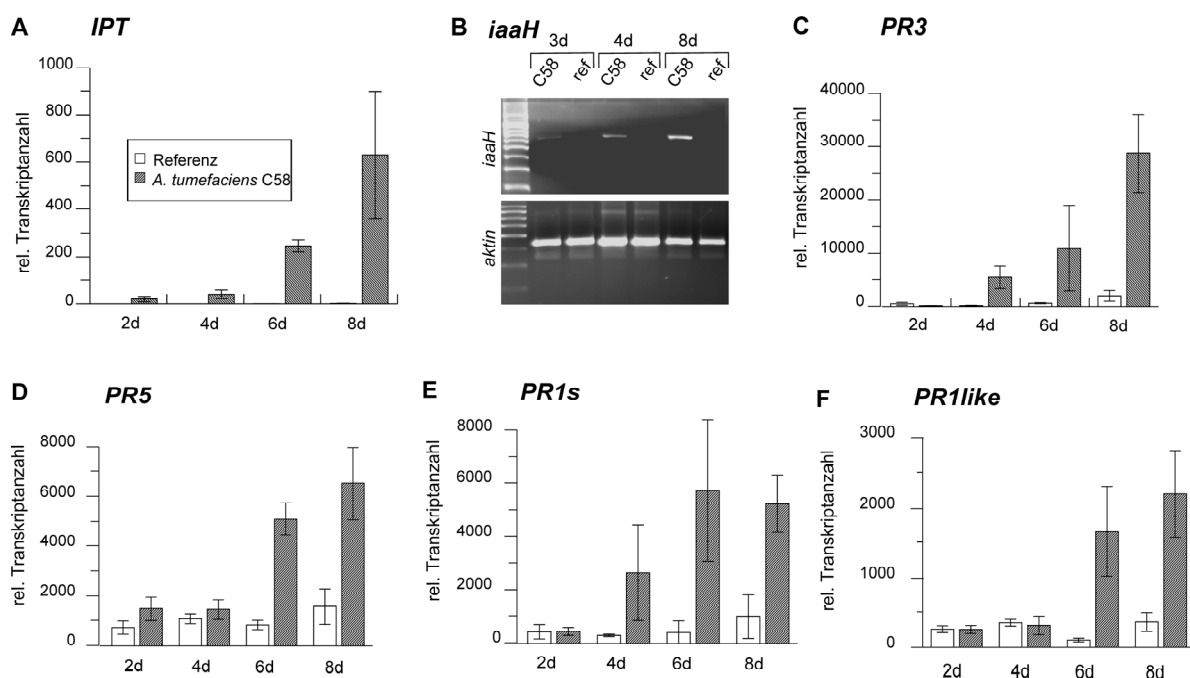
Im Verlauf der durch *Agrobacterium tumefaciens* ausgelösten Tumorentwicklung finden zu unterschiedlichen Zeitpunkten verschiedene Interaktionen zwischen Wirtspflanze und Agrobakterien statt: (1) vor der Transformation kommt die Pflanze zunächst mit dem Agrobakterium in Kontakt, wobei die T-DNA noch keine Rolle spielt; (2) nach der Transformation muss sich die Pflanze sowohl mit dem Bakterium, wie auch mit Veränderungen infolge der Expression von T-DNA-lokalisierten Gene auseinandersetzen; (3) die Zellen des voll entwickelten Tumors erfahren physiologische Veränderungen. Diese Interaktionsstadien lassen sich aufgrund Ihrer gegenseitigen Abhängigkeit nicht isoliert voneinander untersuchen, sondern stellen eher Phasen mit Übergängen dar. Um erste Hinweise auf mögliche pflanzliche Abwehrreaktionen zu erhalten, wurden genomweite Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays für die einzelnen Stadien durchgeführt. Für den Tumor lagen diese Ergebnisse bereits zu Beginn dieser Arbeit vor (Deeken et al., 2006), so dass nur noch für die beiden frühen Zeitpunkte der Infektion und Transformation weitere Microarray-Analysen notwendig waren.

##### **3.1.1 Festlegung der Untersuchungszeitpunkte innerhalb der Interaktionsstadien**

Der Zeitpunkt der Transformation von *Arabidopsis thaliana* (WS) mit *Agrobacterium tumefaciens* lässt sich durch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) bestimmen (Abb. 7). Als Markergene für eine erfolgreiche Transformation wurden die spezifisch auf der T-DNA lokalisierten Gene verwendet, die für *Isopentyl-Transferase* (*IPT*) und *Indolacetamid-Hydrolase* (*iaaH*) codieren (Wood et al., 2001). *IPT*-mRNA konnte in infiziertem Gewebe bereits 2 Tage nach Infektion detektiert werden und akkumulierte innerhalb von 6 Tagen um das 10-fache (Abb. 7A). *IaaH* Transkripte werden zuverlässig 4 Tage nach Infektion

detektiert, während im Referenzgewebe weder *IPT* noch *iaaH* Transkripte nachzuweisen waren (Abb. 7B). Die Expression der beiden T-DNA-Gene im Pflanzengewebe kann somit zwischen 4 und 8 Tagen nach Infektion sicher nachgewiesen werden.

Als Markergene für eine pflanzliche Pathogenabwehr wurde die relative Transkriptanzahl der antimikrobiell wirkenden PR-Genfamilie (*pathogenesis-related genes*) untersucht. Es ist bekannt, dass diese lokal bereits wenige Stunden nach einer Infektion mit verschiedenen Pathogenen in der Pflanze akkumulieren. Ihre Bildung gehört zu den Schlüsselreaktionen der Pflanze auf Pathogenbefall (Lamb and Dixon, 1997). Vier Mitglieder dieser Genfamilie (*PR3*, *PR5*, *PR1s* und *PR1like*; Abb. 7C-F) zeigten 4 bis 8 Tage nach Infektion mit Agrobakterien (Stamm C58) einen zuverlässigen Transkriptanstieg.



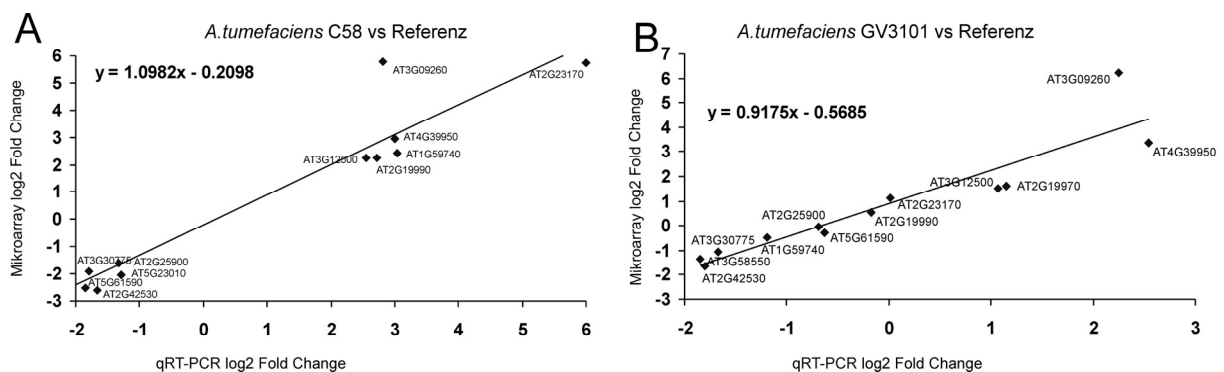
**Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Expression von Markergenen für die T-DNA Integration und pflanzlichen Pathogenantwort.** Transkripte der auf der T-DNA-lokalisieren Genen, *Isopentyl-Transferase* (*IPT*) und *Indolacetamid-Hydrolase* (*iaaH*) konnten 4 bis 6 Tage nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakterien (C58) eindeutig nachgewiesen werden (A und B). Die Markergene der pflanzlichen Pathogenantwort zeigten im gleichen Zeitraum eine deutlich verstärkte Transkription (C bis F). Der Nachweis der verschiedenen Transkripte erfolgte mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte von 3 Wiederholungen  $\pm$  Standardabweichung dar. Als Referenzgewebe wurden verwundete, aber nicht-infizierte Infloreszenzachsen gleichaltriger Pflanzen verwendet, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden.

Aufgrund der Korrelation zwischen der Expression von T-DNA-lokalisieren Genen und *PR*-Genen konnten die Zeitpunkte der beiden frühen Interaktionsstadien für die Transkriptomanalyse festgelegt werden. Die frühe pflanzliche Antwort auf den reinen Kontakt mit Agrobakterien lässt sich bis zu 3 Stunden nach Beginn der Infektion untersuchen. Zu diesem Zeitpunkt ist die T-DNA noch nicht integriert, wie auch bei (Mysore et al., 1998) gezeigt. Ein weiterer Zeitpunkt ist 6 Tage nach Infektion, wenn das Gewebe nachweisbar transformiert ist und bereits die Pathogenantwort der Wirtspflanze nachgewiesen werden kann (Abb. 7). Um

zwischen pflanzlichen Abwehrreaktionen auf die Bakterien oder des Transformationsereignisses unterscheiden zu können, wurde für die Transkriptomanalysen ein weiteres Experiment hinzugenommen. Hierfür wurden *Arabidopsis* Infloreszenzachsen mit einer Agrobakterien-Mutante, die keine T-DNA im Tumor-induzierenden Plasmid mehr aufweist (GV3101) verwendet.

### 3.1.2 Genexpressionsanalysen der drei Untersuchungszeitpunkte mittels Microarrays

Die Analyse des Transkriptoms zu verschiedenen Zeitpunkten der Tumorentwicklung kann Aufschluss darüber geben, wann welche Signalwege in *Arabidopsis* angesprochen werden. Zu den oben ermittelten Zeitpunkten (3 Stunden und 6 Tage nach Infektion mit dem onkogenen Stamm C58 und 6 Tage nach Infektion mit dem nicht-onkogenen Stamm GV3101 gegen die jeweilige Referenz) wurde das Transkriptom der Wirtspflanze mittels Affymetrix Gesamtgenom Microarray (Affymetrix, ATH1, 22 k) analysiert (s. auch Abb. 2). Die Durchführung der Hybridisierung und Auswertung der Rohdaten erfolgte in der *Microarray Facility*, Tübingen (<http://www.microarray-facility.com>). Microarray-Daten vom Tumor waren bereits vorhanden (Deeken et al., 2006). Die Auswertung der Microarraydaten folgte einer sehr konservativen Strategie. Gene mit schwacher Signalintensität, nahe dem Hintergrundhybridisierungssignalwert ( $< 200$ ) und Gene ohne signifikante differentielle Hybridisierungssignale beim Vergleich zweier Zustände ( $p\text{-Wert} \leq 0.01$ ) wurden nicht in die weiteren Analysen miteinbezogen. Die Expressionsunterschiede wurden ermittelt, indem für jedes detektierbare Gen die Verhältnisse aus den mittleren Signalintensitäten der Hybridisierungen mit infiziertem Gewebe und aus den der Referenzen gebildet wurden (*Verhältnis*; siehe 2.8). Nur die Gene, deren Verhältnis größer als 2 oder kleiner als 0.5 war, wurden als differentiell exprimiert behandelt. Die relative Transkriptanzahl ausgewählter Gene, die in den Mikroarray-Experimenten stark bzw. moderat differentielle Expressionswerte 6 Tage nach der Infektion mit Agrobakterien zeigten, wurde mittels quantitativen RT-PCR in unabhängigen Proben verifiziert (Abb. 8). Die Pearson Korrelationskoeffizienten bei dem Vergleich der Mikroarray-Ergebnisse und der qRT-PCR betragen  $\text{cor}=0.95$  (C58 *versus* Referenz) und  $\text{cor}=0.93$  (GV3101 *versus* Referenz). Die hohe Korrelation zwischen den beiden Experimenten ( $\text{cor} \approx 1$ ) bestätigt die Signifikanz der Mikroarraydaten.

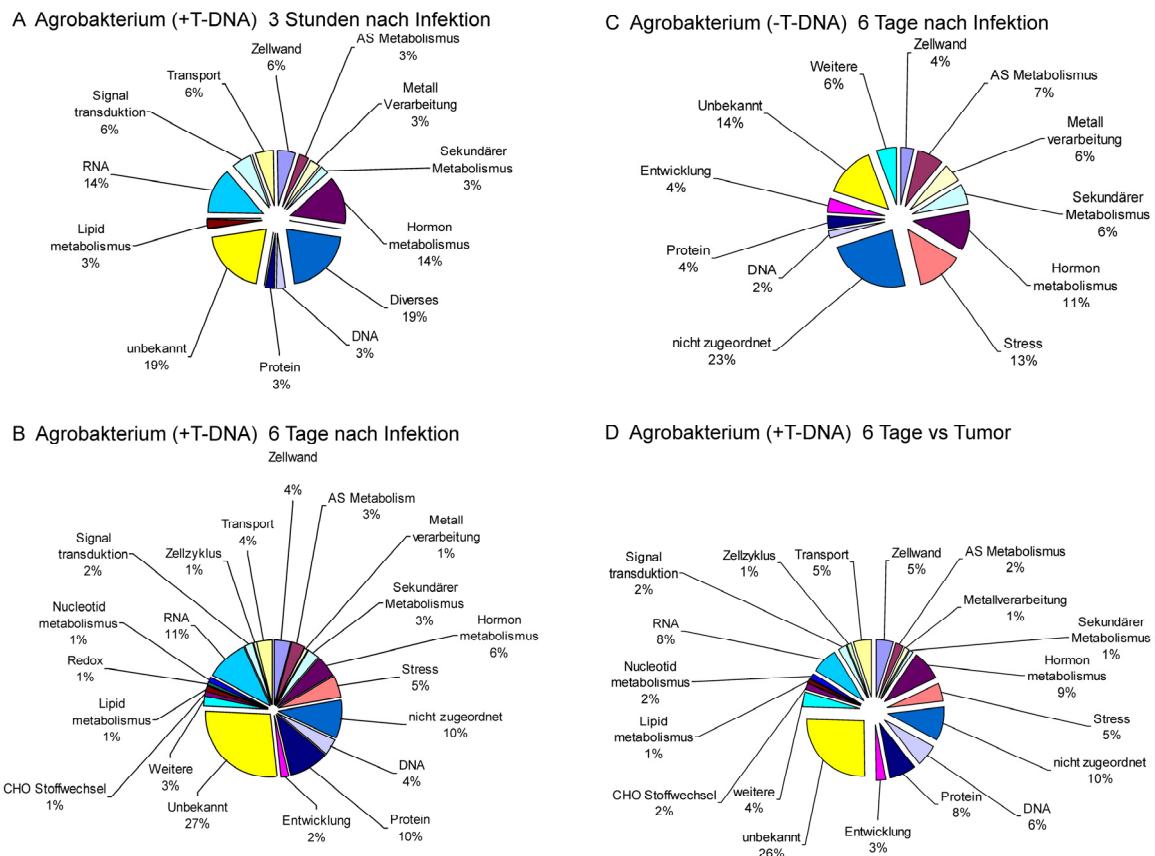


**Abbildung 8: Verifizierung der differentiell exprimierten Gene aus Mikroarray-Experimenten mittels quantitativer Echtzeit RT-PCR.** Die kalkulierten Änderungen in der Expression (logarithmisches ( $\log_2$ ) *Verhältnis*) ermittelt durch qRT-PCR sind auf der Abszisse und der der Mikroarrays auf der Ordinate aufgetragen. Die differentielle Genexpression wurde 6 Tage nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakterium, C58 (**A**) oder einem T-DNA-defizienten Stamm, GV3101 (**B**) untersucht.

Im einzelnen wurde die Expression folgender Gene überprüft: *pathogenesis-related PR5* (At1g75040), *similar to PR1* (At2g19970), *PR3* (At3g12500), *PR1-like* (At2g19990), *PR1* (AT2g14610); *lipid-transfer protein LTP* (At3g58550); *cold-responsive Cor15b* (At2g42530); *ERD5* (At3g30775); *GH3.3* (At2g23170); *MAM1* (At 5g23010); *oligopeptide transporter POT1* (At1g59740), *PYK 10* (At3g09260), *ATCTH* (At2g25900), *ethylene-response factor ERF* (At5g61590).

### 3.1.3 Funktionelle Kategorisierung der signifikant differentiell exprimierten Gene

Ein Vergleich der differentiell exprimierten Gene zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Tumorentwicklung zeigt, dass ein Grossteil der Veränderungen nach der Integration der T-DNA erfolgt. Waren drei Stunden nach der Infektion mit dem onkogenen Agrobakterien-Stamm C58 nur 37 Gene differentiell exprimiert (24 induziert und 13 reprimiert), so stieg deren Anzahl nach sechs Tagen auf 513 (268 überexprimiert und 262 reprimiert). Im Unterschied dazu führt die Behandlung mit T-DNA-defizienten Agrobakterien (GV3101) zu diesem Zeitpunkt nur zur differentiellen Transkription von 55 Genen (siehe Tabelle A1 im Anhang). Mit Hilfe des Programms MapMan (<http://gabi.rzpd.de/projects/MapMan>, Version 1.8.0 [30.01.2006]) wurden die differentiell exprimierten Gene entsprechend Ihrer bekannten Funktionen kategorisiert (Abb. 9).



**Abbildung 9: Funktionelle Kategorisierung differentiell exprimierter Gene.** Die Gesamtheit aller differentiell exprimierten Gene wurde mit Hilfe des Programms MapMan in funktionelle Klassen eingeteilt und ist als Kreisdiagramm dargestellt. **(A)** 3 Stunden nach Infektion mit Agrobakterium, Stamm C58 (+T-DNA), **(B)** 6 Tage nach Infektion mit Agrobakterium, Stamm C58 (+T-DNA) und **(C)** 6 Tage nach Infektion mit Agrobakterium, Stamm GV3101 (-T-DNA). **(D)** Klassen der 195 Gene, die sowohl im Tumor als auch 6 Tage nach Behandlung mit onkogenen Agrobakterien, C58, differentiell exprimiert sind.

Diese Daten zeigen, dass bei der Behandlung mit onkogenen Bakterien 6 Tage nach Infektion zusätzliche funktionelle Kategorien auftreten (vergleiche Abb. 9B mit A oder C). Ein

Drittel dieser Gene (195 aus 513) ist auch im Tumor ähnlich differentiell reguliert, so dass bereits 6 Tage nach einer Infektion mit onkogenen Agrobakterien eine Umprogrammierung der Zellen feststellbar war, ohne dass morphologische Änderungen sichtbar wurden.

### **3.2 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr im Verlauf der Tumorentwicklung**

Pflanzen induzieren als Reaktion auf Pathogenbefall vielfältige Abwehrmechanismen, wie die Modifikationen der pflanzlichen Zellwand, die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*oxidative burst*), die Expression von PR-Proteinen (*pathogenesis-related proteins*) und Akkumulation von Stresssignalmolekülen. Trotz dieser zahlreichen basalen Abwehrreaktionen sind *Agrobakterien* jedoch überdurchschnittlich erfolgreich bei der Transformation der Pflanzenzelle. Um diese Frage zu untersuchen, wurden ausgewählte pflanzliche Abwehrreaktionen während der drei oben beschriebenen Zeitpunkte während der Entwicklung eines Tumors analysiert. Dazu wurden die Mikroarray-Auswertungen zusammen mit molekular-genetischen sowie biochemischen und analytischen Methoden angewendet.

#### **3.2.1 Agrobakterien unterdrücken die vom Elicitor ``EF-Tu`` ausgelöste frühe Expression von Abwehrgenen**

Die Auslösung von Abwehrreaktionen beruht auf dem Erkennen des Pathogens, wobei die Pflanze pathogenspezifische Muster, *Elicatoren*, über spezielle Rezeptoren erkennt (Bonas and Van den Ackerveken, 1999). Nicht alle generellen Elicatoren sind funktionell; so löst Flagellin aus *Agrobacterium* aufgrund einer natürlichen Mutation im Gegensatz zu Flagellinen anderer Mikroorganismen keinerlei bekannte Abwehrreaktionen aus (Gomez-Gomez et al., 1999). Dagegen wird ein anderer Elicitor aus Agrobakterien, der bakterielle Elongationsfaktor Tu (Ef-Tu), von der Pflanze erkannt und löst vielfältige Pathogenabwehrmechanismen aus. Die Behandlung von *Arabidopsis* mit einem synthetischen Ef-Tu Elicitor (acetylierter N-Terminus von EF-Tu, *elf26*) induziert eine sehr frühe Aktivierung der pflanzlichen Abwehrmaschinerie und erhöht die Resistenz gegen Pathogene (Kunze et al., 2004). Bereits 60 Minuten nach Behandlung mit *elf26* fanden Kunze und Kollegen (2004) mit Hilfe von Mikroarrays eine Liste von differentiell exprimierten Genen, die bei der Behandlung mit *A. tumefaciens*, Stamm C58 3 Stunden nach Infektion stark reduziert auftrat. Nur 1% der nach 60 min durch *elf26* regulierten Genen wurden durch Agrobakterium aktiviert (Tabelle 1). Nur 9 aus 24 Genen unseres Assays zeigten ebenfalls eine höhere Expression wie 60 min nach einer *elf26*-Behandlung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Agrobakterien zu Beginn eines Befalls eine Pathogenantwort unterdrücken können.

**Tabelle 1: Liste von Genen, die 60 min nach Behandlung mit dem Peptid *elf26* induziert werden.** Aufgeführt sind die Verhältnisse der relativen Hybridisierungssignale basierend auf behandeltem (Agrobakteriumstamm C58 für 3 Stunden sowie *elf26* für 1 Stunde) und unbehandeltem Gewebe. Grau unterlegt sind die 9 Gene mit qualitativ gleicher differentieller Expression in beiden Microarray-Experimenten. Die Mikroarray-Daten der *elf26*-Behandlung von *A. thaliana* Keimlingen stehen in der *ArrayExpress* Datenbank unter der Accession-Nummer: E-MEXP-547 zur Verfügung (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>). Die Verhältnisse wurden aus den normalisierten Genexpressionswerten aller Microarrays kalkuliert. Die Tabelle listet nur die Verhältnisse der signifikant differentiell exprimierten Gene ( $P < 0.01$ ) auf, wobei die Spalten die Gennamen, den Genlocus (MIPSCode) und die Verhältnisse der Genexpressionswerte nach Behandlung mit Agrobakterien (C58(3h) bzw. *elf26* (*elf26*(1h)) zeigen. Die Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)".

Genname	MIPS Code	C58 (3h)	elf26 (1h)	
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	AT2G23170	6.11	1.10	
<i>sodium-inducible calcium-binding protein (ACP1)</i>	AT5G49480	3.20	1.29	
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	AT4G27260	3.09	0.83	
<i>expressed protein</i>	AT1G76600	2.99	9.14	
<i>UDP-glucose:indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase (IAGLU)</i>	AT4G15550	2.96	0.42	
<i>serine acetyl transferase, SAT</i>	AT1G55920	2.76	1.12	
<i>short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein</i>	AT4G13180	2.72	1.45	
<i>glutathione S-transferase, putative</i>	AT2G29420	2.68	0.97	
<i>protein phosphatase – like protein phosphatase 2C homolog</i>	AT5G02760	2.58	0.51	
<i>ACC synthase (AtACS-6)</i>	AT4G11280	2.55	8.89	
<i>UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein</i>	AT2G15490/80	2.44	6.07	
<i>heavy-metal-associated domain-containing protein</i>	<i>nearly identical to</i>			
<i>farnesylated protein ATFP2</i>	AT2G36950	2.41	1.37	
<i>protein small auxin up-regulated RNA</i>	AT4G34770	2.40	0.51	
<i>UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein</i>	AT3G11340	2.32	0.88	
<i>cytochrome P450, putative</i>	AT4G37370	2.28	15.97	
<i>WRKY family transcription factor</i>	AT1G80840	2.21	18.81	
<i>auxin-induced protein homolog IAA20</i>	AT3G62100	2.17	ns	
<i>embryo-abundant protein-related</i>	AT4G22530	2.17	2.40	
<i>pectate lyase family protein</i>	AT5G48900	2.14	0.80	
<i>expressed protein</i>	AT2G27830	2.11	2.25	
<i>no apical meristem (NAM) family protein</i>	AT5G63790	2.11	2.34	
<i>tolB protein-related</i>	AT4G01870	2.03	1.91	
<i>AP2 domain-containing transcription factor, putative</i>	AT1G22810	2.02	20.69	
<i>At2g32190-&gt;expressed protein</i>	AT2G32210/190	0.49	11.13	
<i>similar to trans-membrane nitrate transporter protein AtNRT2:1</i>	AT3G45060	0.49	ns	
<i>GDSL-motif lipase/hydrolase family protein</i>	<i>similar to lipase</i>	AT3G48460	0.48	0.84
<i>isoflavone reductase-like protein isoflavone reductase-like protein</i>	AT4G13660	0.48	0.98	
<i>unknown protein similar to GP</i>	AT2G39710	0.47	1.20	
<i>GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein</i>	AT2G39030	0.47	0.71	
<i>distantly related to antifungal protein, AFP10</i>	AT2G43510	0.47	0.77	
<i>bifunctional nuclease, putative</i>	AT1G68290	0.44	0.60	
<i>glycoside hydrolase family 28 protein</i>	AT3G15720	0.42	0.58	
<i>calcium-binding RD20 protein (RD20)</i>	AT2G33380	0.41	0.70	
<i>w acyl CoA reductase, putative</i>	AT5G22500	0.38	0.83	
<i>cytochrome P450 79B2</i>	AT4G39950	0.32	1.64	
<i>ribonuclease 1 (RNS1)</i>	AT2G02990	0.28	0.52	

### 3.2.2 Abwehrgene werden erst nach der T-DNA-Integration induziert

Ein Bestandteil der pflanzlichen Pathogenabwehr gegen Pathogene umfasst die Expression von pathogen-assoziierten PR-Proteinen und Defensinen, die antimikrobiell oder antifungal wirken (Somssich and Hahlbrock, 1998). Drei Stunden nach Infektion mit dem onkogenen *A. tumefaciens*-Stamm C58 waren solche Gene nicht induziert; erst nach sechs Tagen konnte deren Expression detektiert werden. Diese Art der Abwehr wird nicht nur als Folge der T-DNA-Integration induziert, sondern führte auch bei Infektion mit dem T-DNA-defizienten Stamm zur differentiellen Genexpression. In beiden Gruppen waren acht Gene transkriptionell aktiviert (Tabelle 2). Die  $\beta$ -Glycosidase, PYK10 (At3g09260), ist Hauptbestandteil der *ER-bodies* (ER: Endoplasmatischer Retikulum), die vor allem unter Stressbedingungen als eine mögliche Abwehrreaktion entstehen. Weitere Gene waren *PBP1* (At3g16240; engl.: *PYK10-binding protein*), welches für ein PYK10-Bindungsprotein kodiert; drei mutmassliche Chitinasen (At2g43620, At2g43610, At2g43570), das Defensin *PDF1.2*, der Cystein Proteaseinhibitor (At5g47550) und das mutmassliche PR-Protein, *similar to PR1* (At5g47550). Letzteres und *PDF1.2* wurden durch den onkogenen Stamm C58 doppelt so stark induziert wie durch den T-DNA-defizienten Stamm GV3101.

Auf die Integration der T-DNA, gemessen sechs Tage nach einer Infektion mit dem onkogenen Agrobakterienstamm C58 (Abb. 7), reagiert die Wirtspflanzen mit der Expression von spezifischen Abwehrgenen: *PR3*, *PR4*, *PR5*, *PR1-like* (At1g18250), ein mutmaßliches *Thaumatococcus* (At1g18250) und dem durch den Virulenzfaktor *avrRpt2*-induzierbarem *AIG2* (Tabelle 2). Gleichzeitig war die Expression von 3 Abwehrgenen (At1g78780, At2g21100 und At4g19810) nach erfolgter Transformation unterdrückt.

Die differentielle Expression der Abwehrgene erreicht in voll entwickelten Tumoren das Maximum, wobei 27 Gene dieser Kategorie induziert und 9 reprimiert waren (Tabelle 2). Die Hauptanzahl der induzierten Gene kodiert für *disease-resistance* Proteine, *pathogenesis-related* Proteine, Chitinasen und Defensine. Neun dieser Gene waren bereits 6 Tage nach der Infektion induziert, wie z.B. *PR-1-like* und *similar to PR-1*, *PYK10*, *PBP1*, *PR3*, *PR4*. Die negativ regulierten Abwehrgene kodieren überwiegend für *disease-resistance* Proteine der TIR-NBS Klasse sowie Trypsin- oder Proteaseinhibitoren. Insgesamt zeigt diese Kinetik der Abwehrgene, dass eine pflanzliche Abwehr erst einige Tage nach der Infektion erfolgt, und durch die T-DNA Integration verstärkt und spezifiziert wird.

**Tabelle 2: Differentiell exprimierte Pathogenabwehrgene nach Infektion mit Agrobakterien.**

Aufgelistet sind signifikant differentiell exprimierte Gene (P-Wert<0.01) 3 Stunden (3h) und 6 Tage (6d C58) nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakteriumstamm C58, 6 Tage nach Infektion mit dem T-DNA-defizienten Stamm GV3101 (6d Gv3101) sowie im 30 Tage alten Tumor. Angegeben sind die Verhältnisse der normierten Hybridisierungssignale von behandeltem zu unbehandeltem Gewebe als Logarithmus zur Basis 2 Aus den Mittelwerten von jeweils 3 Hybridisierungen pro Probe, außer beim Tumor wo es jeweils 4 waren. Die Spalten führen den Gennamen, Genlokus (MIPSCode) und die Verhältnisse der Genexpressionswerte auf. Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)". Ns, nicht signifikant.

Genname	MIPS Code	3h	6d		Tumor
			C58	GV3101	
<i>hevein-like protein (HEL) PR4</i>	At3g04720	ns	1.5	ns	1.1
<i>similar to pathogenesis-related protein 1</i>	At2g19970	ns	2.9	1.6	3.7

	<b>Gename</b>	<b>MIPS Code</b>	<b>3h</b>	<b>6d C58</b>	<b>6d GV3101</b>	<b>Tumor</b>
	<i>similar to basic endochitinase CHB4</i>	At2g43620	ns	2.2	2.5	ns
	<i>pathogenesis-related protein 1 (PR-1)</i>	At2g19990	ns	2.3	ns	3.3
	<i>PDF2.3</i>	At2g02130	ns	ns	ns	2.6
<i>thaumatin, putative strong similarity to pathogenesis-related group</i>	<i>5 protein</i>	At1g18250	ns	1.1	ns	2.6
	<i>pathogenesis-related protein 5 (PR-5)</i>	At1g75040	ns	2.1	ns	ns
	<i>basic endochitinase</i>	At3g12500	ns	2.2	ns	2.0
	<i>PDF1.2b</i>	At2g26020	ns	2.9	1.5	ns
	<i>glycoside hydrolase family 19 protein</i>	At2g43610	ns	6.0	6.9	4.2
	<i>#chitinase, putative</i>	At2g43570	ns	3.0	2.7	ns
	<i>glycosyl hydrolase family 1 protein PYK10</i>	At3g09260	ns	5.8	6.2	5.4
	<i>cysteine protease inhibitor, putative</i>	At5g47550	ns	3.4	1.4	ns
	<i>PDF1.2</i>	At5g44420	ns	3.1	1.4	ns
	<i>pathogenesis-related family protein</i>	At1g78780	ns	-1.3	ns	-2.2
	<i>avrRpt2-induced AIG2 protein (AIG2)</i>	At3g28930	ns	1.0	ns	ns
<i>disease resistance-responsive protein-related / dirigent protein-related</i>		At2g21100	ns	-2.1	ns	ns
	<i>glycosyl hydrolase family 18 protein</i>	At4g19810	ns	-1.4	ns	2.2
	<i>plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.2)</i>	At2g02100	ns	ns	ns	2.76
	<i>multidrug resistance P-glycoprotein (PGP1)</i>	At2g36910	ns	ns	ns	1.60
	<i>trypsin inhibitor, putative</i>	At2g43530	ns	ns	ns	-2.3
	<i>disease resistance response protein-related</i>	At3g13650	ns	ns	ns	3.69
<i>disease resistance-responsive family protein / dirigent family protein</i>			ns	ns	ns	2.48
	<i>disease resistance protein-related / LRR protein-related</i>	At1g33590	ns	ns	ns	1.56
	<i>PBP1</i>	At3g16240	ns	2.0	1.99	2.97
<i>pseudogene, disease-resistance family protein / fatty acid elongase-related  similar to fatty acid elongase 1 (FAE1)</i>		At2g15120, At2g15220, At1g61310, At1g61190, At1g61180,	ns	ns	ns	2.80
<i>disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative</i>		At1g61300	ns	ns	ns	-1.7
	<i>plant defensin-fusion protein, putative (PDF2.1)</i>	At2g02120	ns	ns	ns	2.97
	<i>disease resistance family protein / LRR family protein</i>	At5g23400	ns	ns	ns	1.16
<i>disease resistance family protein  contains leucine rich-repeat (LRR)</i>		At3g05650	ns	ns	ns	-1.6
	<i>thaumatin, putative</i>	At4g38660	ns	ns	ns	1.46
	<i>chitinase, putative</i>	At1g02360	ns	ns	ns	1.64
	<i>similar to basic endochitinase CHB4</i>	At2g43590	ns	ns	ns	1.01
	<i>acidic endochitinase (CHIB1)</i>	At5g24090	ns	ns	ns	1.72
	<i>disease resistance protein (TIR-NBS class), putative</i>	At4g16990	ns	ns	ns	ns
	<i>enhanced disease susceptibility protein, putative</i>	At2g21340	ns	ns	ns	-1.1
<i>trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein</i>			ns	ns	ns	3.75
	<i>protease inhibitor, putative (DR4)</i>	At1g73330	ns	ns	ns	-2.6
	<i>trypsin inhibitor, putative defensin-like</i>	At2g43520	ns	ns	ns	-1.3
<i>transferase family protein  similar to hypersensitivity-related gene product HSR201</i>		At1g27620	ns	ns	ns	1.02
		At5g41740/At5g41750	ns	ns	ns	-1.4
<i>disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative</i>		At1g62630,At1g63360	ns	ns	ns	ns
<i>disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative</i>		At1g64160	ns	ns	ns	2.63
	<i>disease resistance-responsive family protein</i>	At3g04210	ns	ns	ns	-1.1
	<i>disease resistance protein (TIR-NBS class), putative</i>	At4g33720	ns	ns	ns	2.18



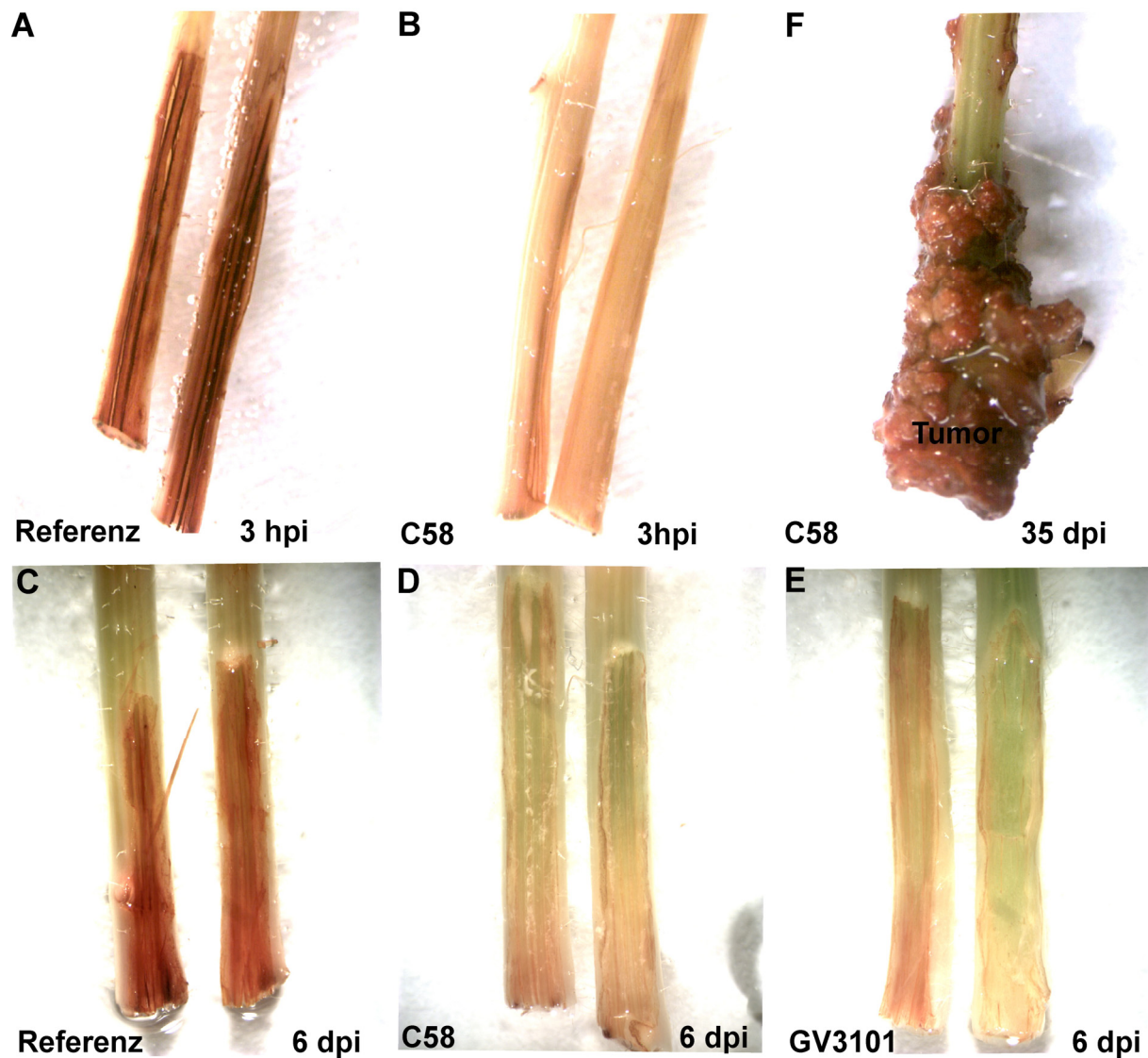
### 3.2.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> spielt in frühen Stadien der Infektion noch keine Rolle

Pathogenbefall, wie auch mechanische Verwundung, können die Produktion von reaktivem Sauerstoffspezies in Form von z. B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) induzieren. Dieser aktiviert Signalkaskaden und induziert so die Pathogenabwehr (Lamb and Dixon, 1997). Bei der Infektion mit Agrobakterien wurde die Bildung dieses Signalmolekül unterdrückt. Die Diaminobenzidin-färbung (DAB, 2.3.1), bei der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als dunkelbraunes Präzipitat nachgewiesen wird, zeigte 3 Stunden und 6 Tage nach Verwundung der Infloureszensachse ohne Applikation von Bakterien die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Bei Applikation von onkogenen Agrobakterien (Stamm C58) wird die Produktion dieses Signalstoffes zu beiden Zeitpunkte unterdrückt (Abb. 10). Diese Unterdrückung erfolgt etwas schwächer auch noch nach sechs Tagen durch T-DNA defiziente Agrobakterien (Stamm GV3101 auf Abb. 10E). Daher liegt der Schluss nahe, dass die Unterdrückung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion hauptsächlich durch das Bakterium selbst und nicht durch die T-DNA vermittelt wird. Im voll entwickelten Tumor (30 Tage nach Infektion) akkumuliert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im starken Masse (Abb. 10F). Dem daraus resultierendem oxidativen Stress kann durch eine gesteigerte Expression von Schutzgenen, wie etwa Glutathion-S-Transferasen (GST) entgegengewirkt werden. *GST1* wird durch einen *oxidative burst* induziert und war 2,75-fach höher im Tumor transkribiert (Tabelle 3; Levine et al., 1994; Alvarez et al., 1998). Insgesamt waren 11 GST-Gene höher und 5 niedriger exprimiert sowie 16 von 18 differentiell exprimierten Peroxidase-Gene aktiviert. Letztere Enzyme können nicht nur beim Abbau, sondern auch bei der Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beteiligt sein, wie etwa AtPCb/a (At3g49110/20), dessen Gen im Tumor erhöht exprimiert war (Bindschedler et al., 2006).

Bei den frühen Zeitpunkten (drei Stunden und sechs Tage) hingegen war H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach Applikation von Agrobakterien nicht nachweisbar. Deshalb wurde im Vergleich zum Tumor nur eine geringe Änderung in der Genregulation gefunden. Die Transkription eines Glutathion-S-transferase-Gens (At2g29420) war bereits drei Stunden nach Infektion aktiviert, sechs Tage danach 3 Peroxidase-Gene (At4g08770, At5g64120, At4g08780) und ein weiteres Glutathion-S-transferase-Gen (At1g02920). Diese Gene waren jedoch unabhängig von der T-DNA Integration betroffen, da sie sowohl bei Infektion mit onkongenen als auch T-DNA-defizientem Agrobakterien gefunden wurden (Tabelle 3). Einige Gene sind jedoch spezifisch reguliert: Drei Glutathion-S-transferasen (At2g29460, At2g29420, At2g2930) und einer Peroxidase (At2g37130) wurde nur durch den onkogenen Stamm C58 induziert, und sind somit abhängig von der T-DNA Integration.

**Tabelle 3: Differentiell durch oxidativen Stress regulierte Gene bei Infektion mit Arobakterien.** Aufgeführt sind Gene, die 3 Stunden (3h) und 6 Tage (6d C58) nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakterienstamm C58 oder 6 Tage nach Infektion mit dem T-DNA-defizienten Stamm GV3101 (6d GV3101) sowie im Tumor signifikant differentiell exprimiert waren (P-Wert<0.01). Angegeben sind die Verhältnisse der normierten Hybridisierungssignale von behandeltem zu unbehandeltem Gewebe als Logarithmus zur Basis 2 aus den Mittelwerten von jeweils 3 Hybridisierungen pro Probe, außer beim Tumor, wo es jeweils 4 waren. Die Spalten führen den Gennamen, Genlokus (MIPSCode) und die Verhältnisse der Genexpressionswerte auf. Ns, nicht signifikant. Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)". Ns, nicht signifikant.

Gename	MIPS Code	3h	6d C58	6d GV3101	Tumor
<i>Peroxidase PER22</i>	At2g38380/90	ns	ns	ns	5.13
<i>identical to cDNA class III peroxidase ATP31</i>	At4g36430	ns	ns	ns	4.63
<i>identical to class III peroxidase ATP38</i>	At4g08770	ns	3.08	3.22	3.97
<i>peroxidase 17 (PER17)</i>	At2g22420	ns	ns	ns	2.72
<i>peroxidase, putative peroxidase 30 (PER30); cell wall (Emmanuelle M. Bayer, 2006)</i>	At4g08780	ns	4.16	4.04	2.64
<i>peroxidase, putative peroxidase 3 (PER3) ; (Llorente et al., 2002)</i>	At3g21770	ns	ns	ns	2.61
<i>peroxidase, putative peroxidase 3 (PER3) ; (Llorente et al., 2002)</i>	At5g06730	ns	ns	ns	2.58
<i>similar to peroxidase ATP6a peroxidase, putative peroxidase 12 (PER12) (Bayer et al., 2006)</i>	At1g05260	ns	ns	ns	2.24
<i>identical to peroxidase ATP23a peroxidase-related (Sato et al., 2006)</i>	At2g18140/50	ns	ns	ns	2.21
<i>similar to peroxidase ATP20a peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At5g05340	ns	ns	ns	2.20
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At1g71695	ns	ns	ns	1.89
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At1g68850	ns	-2.08	ns	1.69
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At5g51890	ns	ns	ns	1.68
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At2g34060	ns	ns	ns	1.18
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At5g06720	ns	ns	ns	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 33 (PER33) (Bindschedler et al., 2006)</i>	At3g49120/10	ns	ns	ns	1.07
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At5g64120	ns	2.28	2.38	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g37130	ns	1.57	ns	-1.07
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At4g33420	ns	ns	ns	-2.36
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g17170	ns	ns	ns	3.47
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At3g09270	ns	ns	ns	3.16
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29490	ns	ns	ns	2.74
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29440	ns	ns	ns	2.23
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29470	ns	ns	ns	1.95
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29460	ns	1.94	ns	1.86
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g02930/20	ns	2.68	ns	1.78
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29480	ns	ns	ns	1.68
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g74590	ns	ns	ns	1.57
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g02920/30	ns	1.64	1.75	1.46
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g69930	ns	ns	ns	1.20
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29420	1.42	1.17	ns	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g29450	ns	ns	ns	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g10370	ns	ns	ns	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g10360	ns	ns	ns	-1.37
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At2g47730	ns	ns	ns	-1.48
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At5g17220	ns	ns	ns	ns
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At3g03190	ns	ns	ns	-1.62
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g59700	ns	ns	ns	-1.76
<i>peroxidase, putative peroxidase 21 (PER21) (Chassot et al., 2007)</i>	At1g78370	ns	ns	ns	-3.56

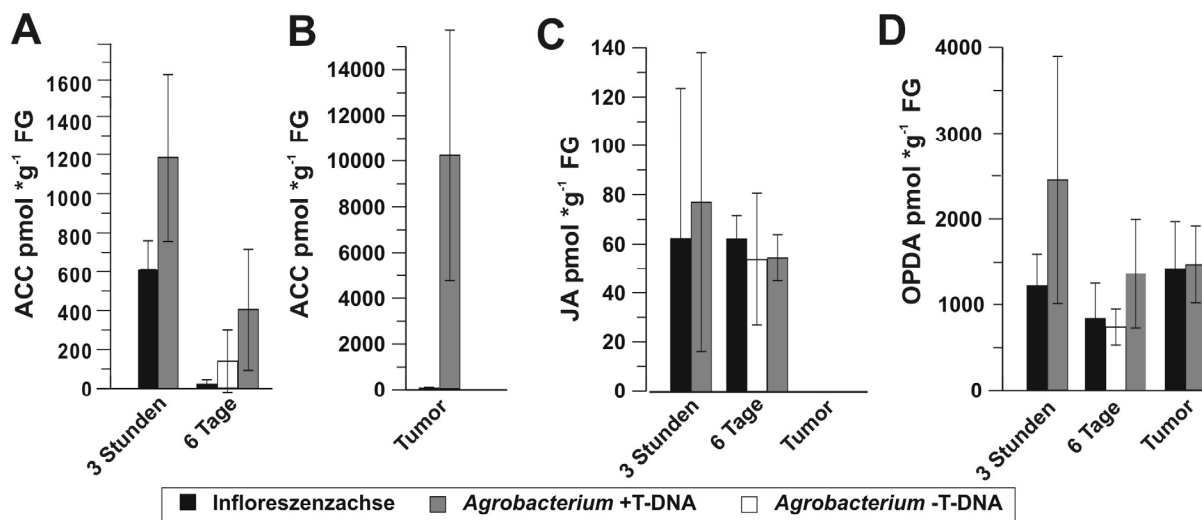


**Abbildung 10: Visualisierung der  $H_2O_2$ -Produktion während der Tumorentwicklung durch Diaminobenzidin-Färbung.** (A) 3 Stunden (3 hpi) und (C) 6 Tage (6 dpi) nach Verletzung einer *Arabidopsis*-Infloreszenzachse ohne Applikation von Agrobakterien. (B) 3 Stunden und (D) 6 Tage nach Infektion mit dem onkogenen Stamm C58 (+T-DNA) und (E) 6 Tage nach Infektion mit Stamm GV3101 (-T-DNA) sowie (F) 4 Wochen alter Tumor, induziert durch Agrobakterium C58. Jede Abbildung zeigt eine repräsentative Färbung von 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.4 Ethylen, aber nicht Jasmonsäure, aktiviert die Expression pathogenabhängiger Abwehrgene

Ethylen (ET) ist zusammen mit Jasmonsäure (JA) ein gut charakterisiertes Signal bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion. Sie steuern gemeinsam die Expression von Abwehrgenen (Referenzen siehe in Chen et al., 2005). Agrobakterien induzierten bereits vor der Integration der T-DNA die Ethylenproduktion (Abb. 11A). Drei Stunden nach Verwundung und Infektion mit Agrobakterien akkumulierten gegenüber dem ebenfalls verwundeten Referenzgewebe, Transkripte der ACC-Synthase, ACS-6 (Tabelle 4). Deren Produkt ist die Ethylenvorstufe, ACC. Es wurde jedoch keine differenzielle Genexpression des ET-induzierten Signalweges nach 3 Stunden Infektion mit onkogenen Agrobakterien gefunden (Tabelle 4). Die Konzentration von ACC ist nach 3 Stunden auch in der nicht infizierten Infloreszenzachse, im Vergleich zum Zeitpunkt nach 6 Tagen, deutlich erhöht.

Dies ist vermutlich auf die noch recht frische Verwundung nach 3 Stunden zurückzuführen, die die ET-Biosynthese ebenfalls induziert. Nach 6 Tagen zeigt die Bestimmung von ACC nur bei Behandlung mit onko-genen Agrobakterien (C58; +T-DNA) einen signifikanten Anstieg (Abb. 11A). Dieser Befund wird durch eine Erhöhung der Expression entsprechender Biosynthesegene gestützt, die ebenfalls nur durch onkogene Agrobakterien induziert wird (Tabelle 4). Hierzu zählten Gene, die in ET-abhängigen Signalwegen involviert sind, wie die Ethylenrezeptoren ERS1 und ETR2, das F-Box Protein EBF2, die Transkriptionsfaktoren EIL1 und ERF (At5g25190; Referenzen siehe in Chen et al., 2005). Die Expression von 3 weiteren *ERF* Genen (At5g61590, At5g61600 At5g07580) war nach 6 Tagen einer Infektion mit dem onkogenen Stamm C58 unterdrückt. In Tumoren waren die Ethylenrezeptoren ERS1 und ETR2, sowie die Transkriptionsfaktoren AtERF1 und ERF (At5g25190) transkriptionell aktiviert. Hier war der ACC-Gehalt fast 500-fach höher als im Referenzgewebe (Abb. 11B). Weder Jasmonsäure noch ihre Vorstufe, OPDA akkumulierten zu irgendeinem Zeitpunkt der Infektion (Abb.11C-D). Dieser Befund wurde durch unveränderte Expression der JA-Biosynthesegene zu allen Zeitpunkten der Tumorentwicklung unterstützt (Tabelle A1-3). Markergene für den ET/JA-induzierten Pathogenabwehrweg, wie etwa *PR3*, *PR4* und *Defensine (PDFs)*, waren sowohl sechs Tage nach Infektion mit onkogenen Agrobakterien, als auch im Tumor erhöht exprimiert (siehe 3.2.2; Tabelle 2). Diese Abwehrgene waren höchstwahrscheinlich nur durch Ethylen induziert, da weder JA noch ihre ebenfalls biologisch aktive Vorstufe OPDA während der Tumorentwicklung messbar verändert waren (Abbildung 11 C & D).



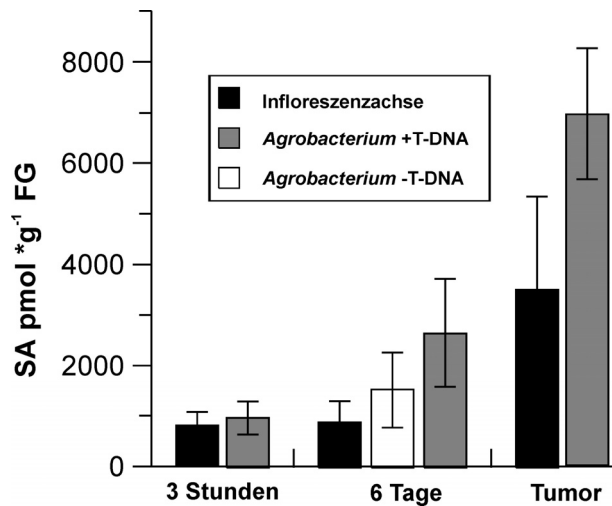
**Abbildung 11: Die Ethylenvorstufe, ACC akkumuliert im Gewebe nach Infektion mit Agrobakterien im Gegensatz zu Jasmonsäure und OPDA.** (A) Der Gehalt an ACC nach 3 Stunden und 6 Tagen Befall mit onkogenen (C58;+T-DNA) sowie nicht-onkogenen Agrobakterien (GV3101; -T-DNA). (B) Gehalt von ACC in Tumoren, (C) Jasmonsäure und (D) OPDA nach 3 Stunden, 6 Tagen und im Tumor. Für jedes Experiment wurde Gewebe aus 10-15 Pflanzen analysiert. Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung ( $\pm$  SD) aus 3 unabhängigen Experimenten.

**Tabelle 4: Differenziell exprimierte Gene der Biosynthese und Signalweiterleitung von Ethylen, Jasmonsäure und Salizylsäure nach Infektion durch Agrobakterien.** Aufgeführt sind Gene, die 3 Stunden (3h) oder 6 Tage (6d C58) nach Infektion mit dem onkogenen Bakterium C58 sowie 6 Tage nach Infektion mit dem T-DNA defizientem Stamm GV3101 und im 30 Tage alten Tumor signifikant differentiell waren (P-Wert<0.01).. Angegeben sind die Verhältnisse der normierten Hybridisierungssignale aus behandelten und unbehandelten Proben als Logarithmus zur Basis 2. Den Verhältnissen liegen jeweils 3 Hybridisierungen pro Behandlung zu Grunde, bei Tumor waren es je 4. Ns, nicht signifikant.

Genname	MIPS Code	3h	6d C58	6d GV3101	Tumor
<i>S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein; similar to defense-related protein cjs1</i>	At1g66700, At1g66690	ns	2.9	3.3	2.6
<i>S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase (SAMT)</i>	At5g38020	ns	ns	ns	3.3
<i>S-adenosyl-L-methionine:salicylic acid carboxyl methyltransferase-like protein</i>	At5g55250	ns	ns	ns	2.8
<i>enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)</i>	At4g39030	ns	ns	ns	1.18
<i>jacalin-like lectin domain; similar to jasmonate inducible protein</i>	At3g16460	ns	ns	1.3	3.2
<i>1 lipoxygenase, putative</i>	At1g55020	ns	-2.0	-1.2	1.5
<i>1 lipoxygenase AtLOX2</i>	At3g45140	ns	ns	ns	-1.9
<i>At2g38210, ethylene-responsive protein, putative</i>	At2g38230	ns	ns	ns	-1.4
<i>ethylene-responsive protein, putative identical to lob HLH transcription factor</i>	At1g05710	ns	ns	ns	2.2
<i>ethylene-inducible protein similar to ethylene-inducible protein</i>	At3g16050	ns	1.2	ns	ns
<i>ER6 protein</i>	At3g62550	ns	-1.9	ns	-4.5
<i>ethylene-insensitive3-like1 (EIL1)</i>	At2g27050	ns	1.0	ns	ns
<i>ethylene response factor 1 (ERF1)</i>	At3g23240	ns	ns	ns	1.7
<i>ethylene receptor, putative (ETR2)</i>	At3g23150	ns	1.7	ns	1.3
<i>transcription factor-like protein ethylene responsive element binding factor 5</i>	At5g07580	ns	-1.6	ns	-1.0
<i>AP2/EREBP-like transcription factor LEAFY PETIOLE</i>	At5g13910	ns	ns	ns	1.0
<i>ethylene responsive element binding factor 5, ERF5</i>	At5g61590	ns	-2.5	ns	ns
<i>ethylene-responsive element – like protein, ERF</i>	At5g25190	ns	1.5	ns	3.1
<i>ethylene response sensor (ERS)</i>	At2g40940	ns	1.3	ns	1.3
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase</i>	At2g19590	ns	2.6	ns	2.3
<i>2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative</i>	At2g25450	ns	-1.3	ns	-2.4
<i>2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative</i>	At2g25450	ns	-1.3	ns	-2.4
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase</i>	At1g05010	ns	ns	ns	-1.8
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase - putative</i>	At1g04350	ns	-1.0	ns	-3.0
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase</i>	At1g01480	ns	ns	ns	1.4
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase - like</i>	At4g37770	ns	ns	ns	1.3
<i>1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase</i>	At5g43440	ns	ns	ns	-1.9
<i>ethylene-forming-enzyme-like dioxygenase – like</i>	At5g20550	ns	ns	ns	ns
<i>F-box family protein EBF2</i>	At5g25350	ns	2.0	ns	ns
<i>ACC synthase (AtACS-6)</i>	At4g11280	1.4	ns	ns	ns

### 3.2.5. Ein erhöhter Salizylsäuregehalt induziert keine Pathogenabwehrgene im Tumor

Salicylsäure (SA) reguliert neben Jasmonsäure und Ethylen die antimikrobiellen Abwehrmechanismen in Pflanzen. Der Gehalt an SA erhöhte sich erst sechs Tage nach Infektion mit onkogenen Agrobakterien; war also T-DNA-abhängig und stieg in Tumoren weiter an (Abb. 12). Bei der Genexpression korrelierte dieser Anstieg mit einer Erhöhung der Transkripte von *EDS5*, dessen Produkt die pathogen-induzierte Akkumulation von SA steuert (Nawrath et al., 2002). Die Gene der klassischerweise durch SA vermittelten Signalwege, wie etwa *pathogenesis-related* Gens *PR1* (At2g1670), waren zu keinem Zeitpunkt differentiell exprimiert (Tabelle 2,4).

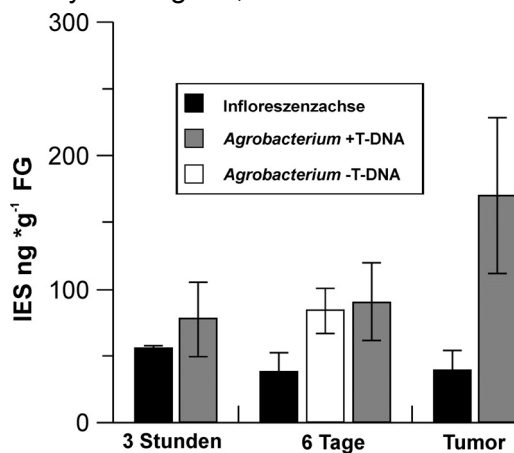


**Abbildung 12: Salizylsäuregehalt in Pflanzen nach Infektion mit Agrobakterien.**

*Arabidopsis* Infloreszenzachsen wurden für 3 Stunden, 6 Tage oder 30 Tage (Tumor) mit onkogenen (+T-DNA) oder nicht-onkogenen Agrobakterien (-T-DNA) an der Basis infiziert. Für jedes Experiment wurde Gewebe aus 10-15 Pflanzen analysiert. Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung ( $\pm$  SD) aus 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.2.6 Die Rolle von Auxin bei der Tumorentwicklung

In Bezug auf Agrobakterien wurde Auxin bislang als klassisches Phytohormon diskutiert, dass vornehmlich die Proliferation transformierter Zellen fördert und somit zur Tumorentwicklung beiträgt. Neue Studien haben gezeigt, dass Auxin bei vielen Phytopathogenen mit einer frühen Phase der pflanzlichen Abwehr interferieren kann (Robert-Seilaniantz et al., 2007). Da nach 3 Stunden Agrobakterienbefall die zuvor analysierten Mechanismen der klassischen Pathogenabwehr keine signifikanten Unterschiede hervorbrachten, die Bakterien jedoch Elicitoren besitzen (s. 3.2.1), könnten diese möglicherweise aktiv unterdrückt sein. Die Annahme, dass Auxin bei dieser Unterdrückung beteiligt sein könnte, wurde nachfolgend getestet. Ein dreistündiger Kontakt von *Arabidopsis*-Infloreszenzachsen mit onkogenen Agrobakterien (+T-DNA) führte noch nicht zu einem signifikanten Unterschied im Auxin-Gehalt (Abb. 13). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Agrobakterien selbst Auxin produzierten und an das Kulturmedium abgaben (1.8 ng Auxin pro ml Kulturmedium). Der onkogene Stamm, C58 (+T-DNA) induzierte nach 3 Stunden bereits die Expression von auxin-sensitiven Genen. Diese waren: *IAA 20* (At3g62100), *small auxin protein* (At4g34770) und zwei Vertreter der GH3-Familie (At2g23170; At4g27260; Tabelle 5). Zu diesem Zeitpunkt ist die T-DNA noch nicht integriert und Transkripte der entsprechenden bakteriellen Auxin-Biosynthesegene, *laaH* und *laaM* konnten bisher nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 13: Auxin akkumuliert in Arabidopsis nach Infektion mit Agrobakterien.**

Infektion von Infloreszenzachsen für 3 Stunden, 6 Tage oder 30 Tage (Tumor) mit onkogenen (C58;+T-DNA) oder nicht-onkogenen (GV3101; -T-DNA) Agrobakterien Für jedes Experiment wurde Gewebe aus 10-15 Pflanzen analysiert. Fehlerindikatoren repräsentieren die Standardabweichung ( $\pm$  SD) aus 3 unabhängigen Experimenten.

Sechs Tage nach der Infektion wurde eine zweifach höhere Auxin-Menge sowohl mit onkogenen (C58) als auch nicht-onkogenen (GV3101) Bakterien gefunden (Abb. 13). Die Analyse der pflanzlichen Genexpression zeigte eine erhöhte Transkription von Auxin-Synthesegenen, wie *Anthranilatphosphoribosyltransferase (PAT1)*, *Tryptophansynthase (TSA1)* und *CytochromP450-79B2 (Cyp79B2)* zu diesem Zeitpunkt (Referenzen siehe in Woodward and Bartel, 2005; Tabelle 5). Cyp79B2 reguliert den pflanzlichen, von der Expression der T-DNA Gene, *iaaM* und *iaaH* unabhängigen Auxin-Biosyntheseweg, der damit in der Wirtspflanze infolge der Infektion mit Agrobakterien aktiviert wurde. Darüberhinaus waren 11 auxin-sensitive Gene sechs Tage nach Behandlung mit onkogenen Bakterien aktiviert. Davon war die Transkriptmenge von 8 höher und von 3 niedriger als in der Referenz (Tabelle 5). Im Tumor mit nahezu ausschließlich transformierten Zellen, waren sowohl die Auxin-Konzentration als auch die Expression auxin-sensitiver Gene am höchsten: 18 waren induziert und 9 reprimiert (Abb.12; Tabelle 6;Deeken et al., 2006).

Diese Daten zeigen, dass es verschiedene Auxin-Quellen gibt. Zum einen wird Auxin infolge der T-DNA-Integration gebildet und sorgt für eine hohe Proliferationsrate und somit Tumorstadium; diese Rolle ist gut untersucht. Zusätzlich gibt es einen T-DNA unabhängigen Mechanismus, der zur Erhöhung des Auxin-Spiegels führt: (1) das Agrobakterium selbst, welches Auxin produzieren kann; (2) die durch das Bakterium induzierte Synthese von Auxin in befallenen Pflanzen.

**Tabelle 5: Auxin induzierte differentiell exprimierte Gene während eines Infektionsverlaufs mit Agrobakterien.**

Aufgeführt sind Gene, die 3 Stunden (3h) oder 6 Tage (6d C58) nach Infektion mit dem onkogenen Bakterium C58 sowie 6 Tage (6d GV3101) nach Infektion mit dem T-DNA-defizientem Stamm GV3101 (6d GV3101) und vom 30 Tage alten Tumor signifikant differentiell exprimiert waren (P-Wert<0.01). Angegeben sind die Verhältnisse der normierten Hybridisierungssignale aus infiziertem und nicht-infiziertem Material als Logarithmus zur Basis 2. Verhältnisse basierten auf je 3 Hybridisierungen pro Behandlung, bei Tumor aus jeweils 4. Die Tabelle beinhaltet Gennamen, Genlokus (MIPS Code) und Verhältnisse der Genexpressionswerte. Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)". Ns, nicht signifikant

Genname	MIPS Code	3h	6d C58	6d GV3101	Tumor
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	At2g23170	2.61	5.7	ns	5.8
<i>auxin-responsive-like protein</i>	At5g54510	ns	1.4	ns	5.0
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	At4g37390,				
<i>auxin-regulated GH3 protein</i>	At1g59500	ns	ns	ns	2.4
<i>identical to transcription factor MONOPTEROS</i>	At1g28130	ns	ns	ns	2.4
<i>auxin-induced protein, IAA17/AXR3-1</i>	At1g19850	ns	1.0	ns	2.3
<i>similar to auxin down-regulated protein ARG10</i>	At1g04250	ns	ns	ns	2.3
<i>similar to auxin down-regulated protein ARG10</i>	At4g27450	ns	ns	ns	2.3
<i>auxin-induced protein homolog IAA20</i>	At3g15450	ns	-1.5	ns	2.1
<i>auxin-induced protein, putative similar to auxin-induced atb2</i>	At3g62100	1.12	ns	ns	2.1
	At1g60730	ns	ns	ns	2.0
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	At5g13370,At5g13360	ns	ns	ns	1.8
<i>similar to auxin-induced protein TGSAUR21</i>	At5g20820	ns	3.4	ns	1.8
<i>early auxin-inducible protein 11 (IAA11)</i>	At4g28640	ns	ns	ns	1.7
<i>auxin-regulated gene</i>	At4g34750	ns	ns	ns	1.7
<i>unknown protein contains similarity to auxin-induced protein</i>	At3g12830	ns	ns	ns	1.7
<i>auxin-inducible gene (IAA2)</i>	At3g23030	ns	ns	ns	1.6
<i>auxin-responsive GH3 family protein</i>	At4g27260	1.63	1.7	ns	ns
<i>auxin-responsive family protein</i>	At1g56150	ns	-1.3	ns	1.5
<i>auxin-responsive AUX/IAA family protein</i>	At4g32280	ns	ns	ns	1.4

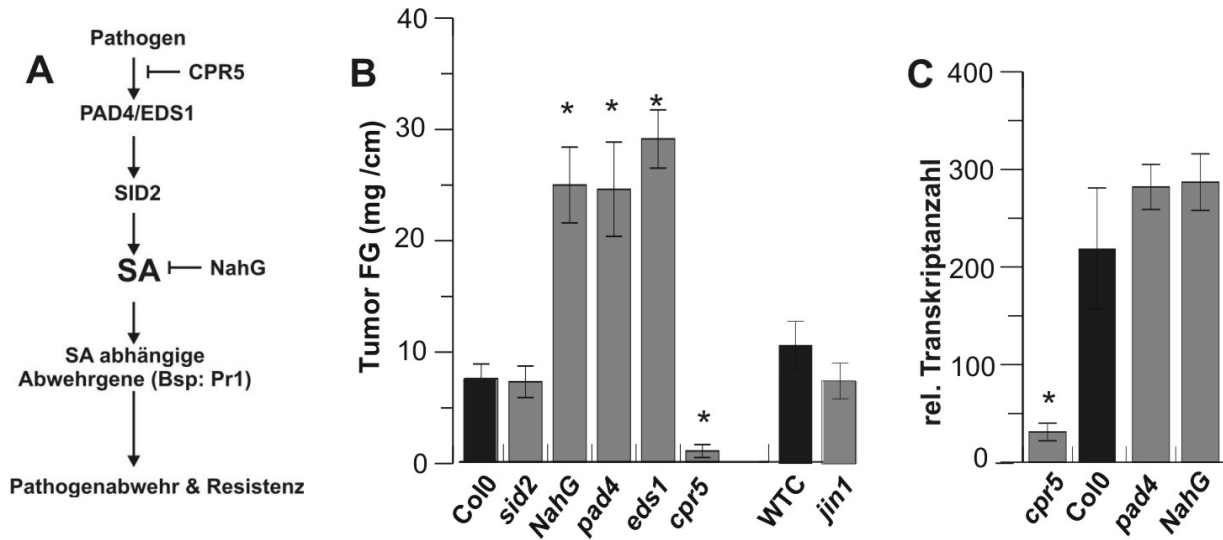
<i>auxin-responsive protein IAA1</i>	At4g14560	ns	1.3	ns	ns
<i>auxin transport protein REH1</i>	At1g70940	ns	1.1	ns	ns
<i>auxin-regulated protein auxin-induced protein X15</i>	At4g34760	ns	ns	ns	ns
<i>auxin-induced protein</i>	At1g16510	ns	-1.1	ns	ns
<i>early auxin-induced protein, IAA19</i>	At3g15540	ns	1.5	ns	ns
<i>auxin response factor 4</i>	At5g60450	ns	ns	ns	-1.0
<i>similar to auxin-induced protein SAUR-AC1</i>	At3g60690	ns	ns	ns	-1.2
<i>auxin-responsive protein-related</i>	At1g72430	ns	ns	ns	-1.2
<i>protein auxin-induced protein SAUR-AC1</i>	At3g61900	ns	ns	ns	-1.3
<i>auxin-inducible SAUR gene</i>	At4g38840	ns	ns	ns	-1.5
<i>indoleacetic acid-induced protein 28 (IAA28)</i>	At5g25890	ns	ns	ns	-1.6
<i>GH3-like protein</i>	At4g03400	ns	ns	ns	-2.1
<i>auxin-induced protein</i>	At1g23740	ns	ns	ns	-2.3
<i>similar to auxin-induced protein</i>	At4g00880	ns	-1.0	-0.4	-2.8
<i>protein small auxin up-regulated RNA</i>	At4g34770	1.3	ns	ns	ns
<i>anthranilate phosphoribosyltransferase (PAT1)</i>	At5g17990	ns	1.1	1.1	ns
<i>cytochrome P450 79B2, putative (CYP79B2)</i>	At4g39950	-1.6	2.9	3.4	ns
<i>tryptophan synthase, alpha subunit (TSA1)</i>	At3g54640	ns	1.3	1.3	ns

### **3.3 Auswirkung von Störungen in der Pathogen-Signaltransduktion auf die Tumorentwicklung**

Das Stressmolekül Salizylsäure (SA) ist eine Schlüsselverbindung bei der Vermittlung von Resistenz gegen biotrophe Pathogene und bei *Pseudomonas syringae* gut untersucht worden (Feys and Parker, 2000). Bei der Entstehung von Pflanzentumoren ist die Rolle von SA jedoch noch ungeklärt, die starke Akkumulation von SA im Tumor (s.3.2.5) legt jedoch eine Beteiligung nahe. Als Modellorganismus bietet *Arabidopsis thaliana* den großen Vorteil auf eine unbegrenzte Anzahl von Mutanten zurückgreifen zu können. Das ermöglicht Schlüsselgene der SA-vermittelten Pathogenabwehr (Abb. 14A) zu manipulieren, um so deren Funktion bei der Tumorentwicklung zu untersuchen. CPR5 (*constitutive expressor of PR genes*) unterbricht die SA-vermittelten Pathogenabwehr am Anfang (Abb. 14A); und so akkumuliert seine Mutante *cpr5* konstitutiv SA und PR-Gene (Clarke et al., 2000). Die Analyse des Tumorwachstums zeigte, dass *cpr5*-Pflanzen die Tumorentwicklung nicht unterstützten (Abb. 14B). Nur 4 von 22 getesteten *cpr5*-Pflanzen entwickelten sehr kleine Tumore im Unterschied zum Wildtyp, Col-0. Dieser Effekt könnte jedoch dadurch bedingt sein, dass hier bereits die Effizienz der T-DNA-Integration stark beeinträchtigt war (Abb. 14C). Dies bestätigten quantitative Transkriptanalysen des T-DNA-lokalisierten Gens, *IPT* (s.3.1.1.). Sechs Tage nach Infektion mit dem onkogenen *Agrobacterium*-Stamm, C58 wurden kaum Transkripte von *IPT* in *cpr5*-Pflanzen gemessen.

Der nächste Schritt in der SA-vermittelten Pathogenabwehr ist in den Mutanten *pad4* und *eds1* unterbrochen. Sie akkumulieren bei Pathogenbefall wegen dieser Defekte wenig SA (Wiermer et al., 2005). *NahG* exprimiert eine bakterielle Salizylhydrolyase aus *Pseudomonas putida*, die konstitutiv SA zu Catechol degradiert (Friedrich et al., 1995). All diese Pflanzen entwickelten grössere Tumore als die entsprechenden Wildtypen (Abb. 14B). Die Effizienz der T-DNA Integration, gemessen an der Transkriptanzahl des T-DNA-lokalisierten Gens *IPT* war aber nicht verstärkt. Dieser Befund legt nahe, dass SA einen direkten Einfluss auf das Tumorwachstum haben könnte. Diese Hypothese wurde an *sid2*-Mutanten geprüft, die Defekte in der SA-Biosynthese nach Pathogenbefall aufweisen (Wildermuth et al., 2001).





**Abbildung 14: Effizienz des Tumorwachstum und der T-DNA-Integration an *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten der Stressphytohormon-Signalvermittlung.** (A) Salizylsäuresignale bei der Pathogenabwehr. (B) Tumorwachstum bei den SA-defizienten Mutanten *sid2* (*salicylic acid deficient*), *pad4* (*phytoalexin-deficient*), *eds1* (*enhanced disease susceptibility*) und der transgenen Pflanze, *nahG*; *cpr5* (*constitutive expresser of pathogenesis-related genes*) mit konstitutiv aktiver SA/ET/JA-vermittelter Pathogenabwehr sowie der JA-insensitiven Mutante *jin1* (*jasmonate-insensitive*) und den entsprechenden Wildtyppflanzen Col-0 und WTC. Das Tumorfischgewicht in mg pro cm der infizierten Infloreszenzachse wurde 4 Wochen nach Infektion mit *Agrobacterium* Stamm C58 bestimmt. (C) Die Quantifizierung der IPT(*isopentenyl-transferase*)-Transkripte (n=3) erfolgte mittels Echt-Zeit RT-PCR in Mutanten (*cpr5*, *pad4*, *eds1*) und der Transgenen *NahG*, sowie dem Wildtyp Col-0. Hierzu wurden junge Infloreszenzachsen an der Basis verletzt und mit *A. tumefaciens* Stamm C58 behandelt. Infizierte Bereiche wurden 6 Tage nach der Infektion geerntet. Fehlerindikatoren repräsentieren Standardfehler ( $\pm$  SEM) aus 7-20 Pflanzen pro Genotyp; Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Weg ANOVA mit *Bonferroni post hoc* Test. Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Differenzen (\*:  $P < 0.05$ ) zwischen Mutanten und Wildtyp.

Hier unterschied sich das Tumorwachstum nicht vom Wildtyp Col-0 (Abb.14B). Dies bedeutet, dass allein die Akkumulation von SA nach Pathogenbefall keinen hemmenden Einfluss auf das Tumorwachstum hat. Vielmehr könnten pleiotrope Effekte in *pad4*, *eds1* und *NahG* für das vermehrte Tumorwachstum verantwortlich sein. In *NahG* akkumuliert das Abbauprodukt Catechol, das seinerseits biologisch aktiv ist. Die Signaltransduktionsmutanten *eds1* und *pad4* beeinflussen ihrerseits nicht nur die SA-Akkumulation, sondern darüberhinaus auch die ET/JA-Signaltransduktion während eines Pathogenbefalls und den Redoxstress (Glazebrook et al., 2003; Heck et al., 2003).

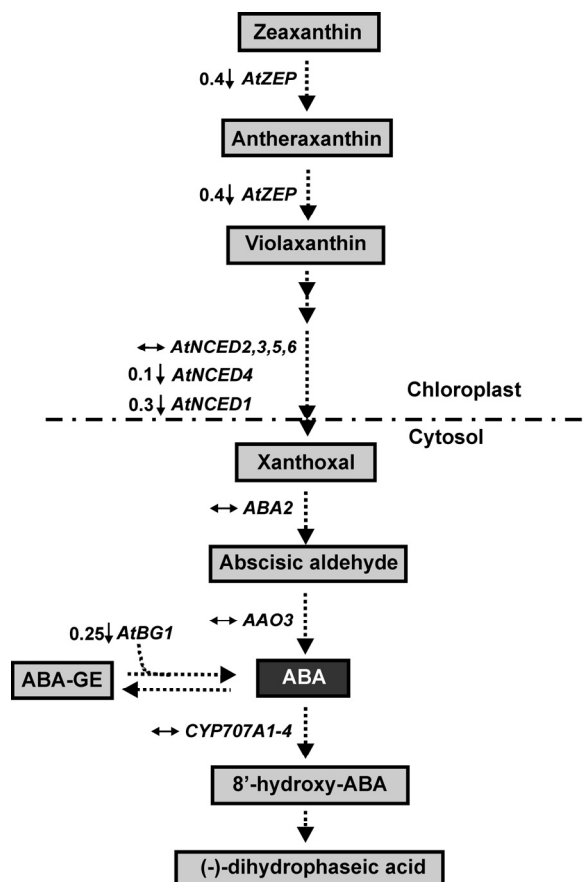
### 3.4 Der Tumor induziert Mechanismen der Trockenstressanpassung

Nicht nur eine erfolgreiche Transformation und Kontrolle der pflanzlichen Pathogenabwehr sind essentiell für die Etablierung eines Tumors. Für sein Wachstum benötigt der Tumor Nährstoffe von der Pflanze, die er über ein Leitbündelsystem zusammen mit Wasser von der Pflanze bezieht. Die treibende Kraft ist hierbei ein Transpirationssog, der aus dem Fehlen einer funktionsfähigen Epidermis und damit verbundener erhöhter Transpiration resultiert (Aloni et al., 1995; Schurr et al., 1996; Ullrich and Aloni, 2000). Die erhöhte Transpiration scheint jedoch reguliert zu sein, da weder die Pflanze noch der Tumor austrocknen. Der Austrocknungsgefahr könnte durch die Akkumulation des Stressphytohormons Abscisinsäure (ABA) im Tumor entgegen gewirkt werden (Mistrik et al., 2000). Unklar ist jedoch, welche

ABA-induzierten Anpassungen die Austrocknungstoleranz begünstigen und wie es zur Akkumulation von ABA im Tumor kommt, da die T-DNA keine Gene für die ABA-Synthese enthält.

### 3.4.1 Translokation von ABA in den Tumor

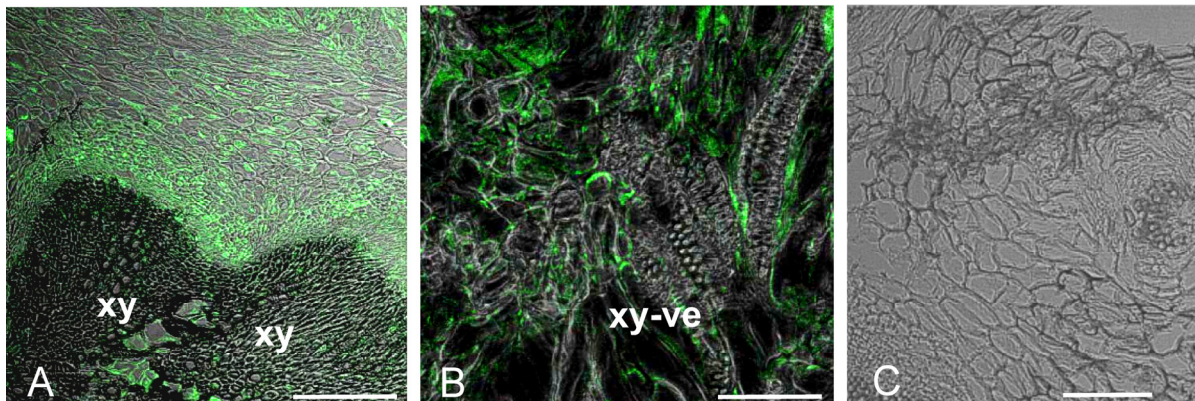
Im Vergleich zu nicht-infizierten Infloreszenzachsen akkumulieren sowohl der Tumor, als auch der Sprossabschnitt über dem Tumor das Stresshormons ABA. Es ist 10-fach im Tumor und 4-fach im Spross über dem Tumor erhöht (Efetova et al., 2007). Wider Erwarten wird diese Konzentrationssteigerung nicht auf Ebene der Genexpression reflektiert; Gene der ABA-Biosynthese oder des Abbaus sind nicht dementsprechend differenziell reguliert (Referenzen siehe in Nambara and Marion-Poll, 2005). Abbildung 15 verdeutlicht die einzelnen Schritte der ABA-Biosynthese. Daraus wird ersichtlich, dass die Gene der *Zeaxanthin-Epoxidase* (*AtZEP*) und *9-cis-Epoxycarotenoiddioxygenasen* (*AtNCED1* und *AtNCED4*) entweder reprimiert oder unverändert transkribiert wurden (siehe *AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED5* und *AtNCED6*, Abb. 15). *ABA2*, die eine Konversion von Xanthoxal zu ABA-Aldehyd katalysiert, und *AAO3*, eine ABA-Aldehyd-Oxidase, waren ebenfalls nicht differenziell exprimiert (Abb.15). Es wurde auch kein Hinweis darauf gefunden, dass der Abbau von ABA im Tumor gehemmt ist. Die Expression von *CYP70A7* Genen (*CYP70A7-1* bis *CYP70A7-4*; Abb. 15), die für Schlüsselenzyme der ABA Degradierung kodieren, war im Tumor unverändert. Weitere Ergebnisse zeigten, dass eine erhöhte Freisetzung von ABA



**Abbildung 15: Expressionsmuster der ABA-Biosynthesegene in Tumoren.** Violaxanthin ist aus Zeaxanthin von Zeaxanthin Epoxidase, *AtZEP* (*At5g67030*) synthetisiert. Die Spaltung des *cis*-Xanthophyll ist von der Familie der *9-cis*-Epoxycarotenoid- Dioxygenasen, *AtNCED* (*AtNCED1*, *At3g63520*; *AtNCED 2*, *At4g18350*, *AtNCED 3*, *At3g14440*, *AtNCED4*, *At4g19170*, *AtNCED 5*, *At1g78390* und *AtNCED 6*, *At3g24220*) catalysiert. Xanthoxal ist von der kurzkettigen Alkohol-Dehydrogenase (*ABA2*, *At1g52340*) in ABA-Aldehyde konvertiert, der wiederum von ABA-Aldehyd-Oxidase (*AAO3*, *At2g27150*) in ABA oxidiert wird. *AAO3* Protein enthält ein Molybden Cofaktor, der von einer Mo-Co Sulfurase (*ABA3*) aktiviert wird. Die Mitglieder der *CYP70A*-Familie (*AT2G29090*; *AT3G19270*; *AT4G19230*; *AT5G45340*) katalysieren die ABA 8'-Hydroxylierung, der Schlüsselschritt der ABA-Degradierung (Nambara and Marion-Poll, 2005). Die Hydrolyse der ABA-Glucoseester in aktive ABA wird von *AtBG1*, einer  $\beta$ -Glucosidase ausgeführt. Differentielle Expression relevanter Gene ist mit ( $\leftrightarrow$ ) für unveränderte, mit ( $\uparrow$ ) für höhere oder mit ( $\downarrow$ ) für niedrigere Transkriptmenge in Tumoren dargestellt.

aus konjugierten Verbindungen im Tumor ebenfalls unwahrscheinlich war, da *AtBG1* 4-fach reprimiert war. Dieses Gen codiert für eine  $\beta$ -Glucosidase, die mit Glukose konjugiertes, inaktives ABA zu freiem aktiven ABA hydrolysiert (Lee et al., 2006). Tumore von Pflanzen,

die in Hydrokultur kultiviert wurden (2.2.2) wiesen eine 2-fach höhere Konzentration an ABA-Glukoseestern auf als die uninfizierten Referenzinfloreszenzachsen (jeweils  $18,3 \pm 0,5$  und  $7,9 \pm 3,0$  pmol pro g Frischgewicht;  $n=3 \pm SD$ ). Dies macht eine verstärkte Freisetzung von ABA aus dieser Quelle unwahrscheinlich. Die Analyse der Genexpression in Arabidopsis-Tumoren zeigte, dass die hohen ABA-Konzentrationen nicht ausschließlich durch eine Tumor-autonome Biosynthese entstanden sein können. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die ABA-Biosynthese in Chloroplasten stattfindet, die im Tumor vermindert vorkommen. Eine Bestimmung der Chlorophyllkonzentration zeigte, dass der Tumor nur 161 mg Chlorophyll a/b pro g Frischgewicht statt 499 mg im tumorfreiem Infloreszenzachsengewebe ( $n=3$ ) aufweist. Viel mehr könnte die hohe Konzentration von ABA im Tumor durch eine Translokation über Leitbündel aus der Wirtspflanze entstanden sein. Ältere Immunolokalisations-Untersuchungen mit ABA-spezifischen Antikörpern zur Lokalisation von ABA im Arabidopsis-Tumor (Diplomarbeit M.Efetova, Efetova et al., 2007) bekräftigen diese Hypothese. Demnach wurden die stärksten Fluoreszenzsignale in der Nähe von Leitbündeln detektiert, welche den Tumor mit dem Wirt verbinden (Abb. 16).

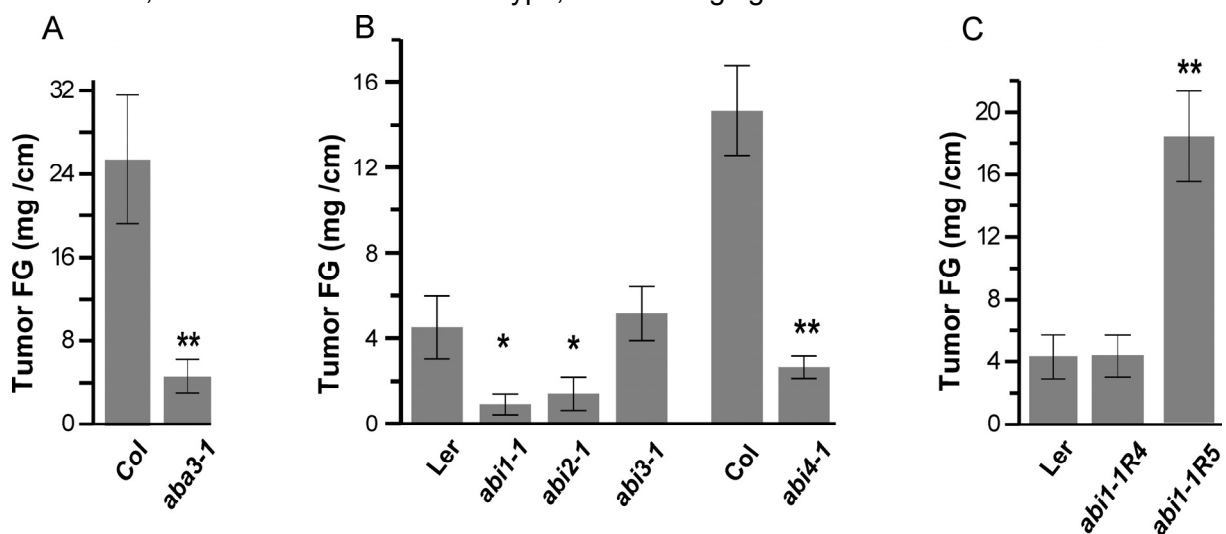


**Abbildung 16: Immunolokalisation von ABA in Tumorquerschnitten.** ABA Signale wurden mit monoklonalen anti-ABA-Antikörpern und Alexa 488-markiertem sekundären Antikörpern visualisiert. Abbildungen wurden mit einem Confocalen Laserscanningmikroskop erstellt. (A) Starke Fluoreszenzsignale waren um das Xylem (Xy) des Tumors herum und (B) im zytoplasmatischen Saum einzelner Zellen nahe der Xylemgefäße (xy-ve) sichtbar. (C) Die Kontrollhybridisierung mit nur dem sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper ergab kein Signal. Skala: A 100  $\mu\text{m}$ ; B und C 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.2 Rolle von ABA auf die Tumorentwicklung

Um den Einfluss von ABA auf das Tumorwachstum zu untersuchen, wurden *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten in der ABA-Synthese oder ABA-Signaltransduktion mit dem onkogenen *Agrobacterium*-Stamm C58 infiziert. *Aba3-1*, eine Mutante mit stark verminderten ABA-Gehalt infolge der beeinträchtigten Synthese, zeigte ein 6-fach reduziertes Tumorwachstum (Abb. 17A). Mutanten mit Störungen weiter stromabwärts im ABA-Signalweg, wie die ABA-insensitiven Mutanten, *abi1-1*, *abi2-1* und *abi4-1* entwickelten ebenfalls kleinere Tumore als der zugrunde liegende Wildtyp (Abb. 17B). Die ABA-insensitive Mutante *abi3-1*, mit Verlust des ABI3-Transkriptionsfaktors, zeigte keinen Effekt auf das Tumorwachstum. Diese Ergebnisse zeigen, dass die ABA-abhängigen Signalwege über die Phosphatasen ABI1 und ABI2, sowie über den Transkriptionsfaktor ABI4, eine wichtige Funktion während des Tumorwachstums ausüben.

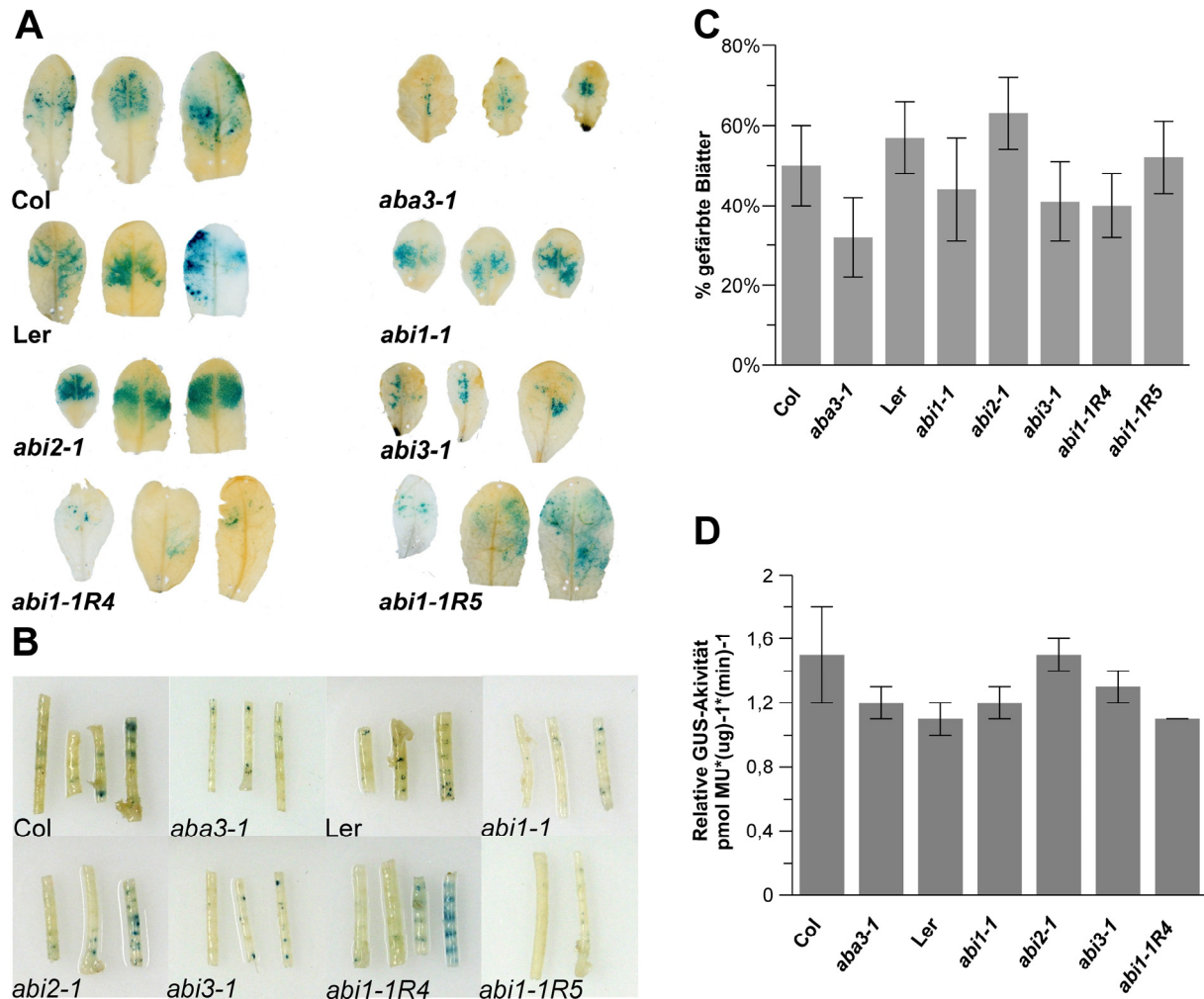
Die Wiederherstellung des Tumorstadiums auf Wildtypniveau durch externe ABA-Applikation bei ABA-defizienten Pflanzen ist experimentell nicht möglich. Die Tumorentwicklung dauert 30 Tage, eine Zeitspanne, in der das extern applizierte ABA metabolisiert und in Form von Phasein- und Dihydrophaseinsäure akkumulieren würde. Dies könnte wiederum unspezifische Nebeneffekte verursachen. Stattdessen wurden zwei intergenetische Revertanten Linien, *abi1-1R4* und *abi1-1R5*, der *abi1-1* Mutante verwendet (Gosti et al., 1999). Diese Revertanten sind Doppelmутanten, in denen der ursprüngliche *abi1-1* Mutantenphänotyp durch eine zusätzliche Mutation aufgehoben wurde. Das beobachtete reduzierte Tumorstadium der *abi1-1* Mutante konnte durch die Reversion aufgehoben und sogar noch verstärkt werden (Abb. 17C). Die *abi1-1R5* Revertante, die bei Trockenstress hypersensitiv auf ABA reagiert, zeigte interessanterweise ein besonders starkes Tumorstadium, das über das Maß des Wildtyps, Ler hinausging.



**Abbildung 17: Tumorentwicklung bei *Arabidopsis* Mutanten mit Defekten in der ABA-Biosynthese oder -Signaltransduktion.** Tumorgewichte (A) der ABA-defizienten Mutanten, *aba3-1*, (B) der ABA-insensitiven Mutanten *abi1*, *abi2*, *abi3* und *abi4*; und C den intergenetischen Revertanten von *abi1-1*, *abi1-1R4* und *abi1-1R5* (Koorneef et al., 1984; Gosti et al., 1999). Das Tumorstadium wurde pro cm infizierter Infloreszenzachse 4 Wochen nach Infektion mit *Agrobacterium*, Stamm C58 bestimmt. Fehlerindikatoren repräsentieren Standardfehler ( $\pm$  SEM) aus 7-20 Pflanzen pro Genotyp; Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Weg ANOVA mit *Bonferroni post hoc* Test. Sternchen bezeichnen statistisch signifikante Differenzen (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ) zwischen Mutanten und Wildtypen.

Infolge des komplexen Phänotyps der *abi1-1*, *abi2-1*, *abi4-1* und *aba3-1* Mutanten kann nicht unterschieden werden, ob das Tumorstadium durch eine Hemmung der T-DNA Integrationseffizienz, oder aber durch den Einfluss auf die Trockenresistenz der Wirtspflanze verringert wird. Um auszuschließen, dass die Transformationseffizienz in den ABA-Mutanten verringert war, wurde die Methode der transienten Transformation eingesetzt (2.7.1). Hierzu wurde das Reportergenkonstrukt, 35S::GUS, in ABA-Mutanten und Wildtyppflanzen übertragen und die Expression des Reportergens mittels GUS-Färbung visualisiert oder quantifiziert (Abb. 18). Die GUS-Färbungen von *Arabidopsis* Blättern (Abb. 18A) oder Infloreszenzachsen (Abb. 18B) zeigten bei Mutanten und Wildtyppflanzen vergleichbare Ergebnisse. Die Quantifizierung der T-DNA-Integrationseffizienz über die Anzahl der Blätter mit positiver GUS-Färbung sowie die fluorimetrische Quantifizierung der GUS-Aktivität

(2.7.2) ergab ebenfalls keinen signifikanten Unterschied (Abb. 18C & D). Dieses Ergebnis schließt eine reduzierte T-DNA-Integration in *abi* Mutanten als Ursache des verringerten Tumorstadiums aus und legt eine direkte Rolle von ABA auf die Tumorphysiologie nahe.



**Abbildung 18: Transiente GUS-Expression als Maß für die Transformationseffizienz in Mutanten der ABA-Biosynthese bzw. -Signalvermittlung.** Mutanten mit Defekten in der ABA-Synthese (*aba3-1*; Wildtyp Col-0) oder ABA-Signaltransduktion (*abi2-1*, *abi2-2*, *abi3-1*; Wildtyp Ler), ebenso wie Revertanten von *abi1-1* (*abi1-1R4*, *abi1-1R5*; Wildtyp Ler) wurden mit Agrobakterien (Stamm GV3101) infiziert, die mit der T-DNA 2x35S::GUS übertragen, und einer GUS-Färbung unterzogen. **(A)** Drei representative GUS-gefärbte Blätter jeder Linie nach der Infiltration der Agrobakterien. Die Größe der einzelnen Blätter variiert aufgrund der genetischen Manipulationen. **(B)** Drei bis vier GUS-gefärbte Infloreszenzachsen jeder Linie nach Injektion der Agrobakterien in die Basis der Infloreszenzachsen **(C)** Relative Anzahl von 80 infiltrierten Blättern pro Linie mit GUS-Färbung wie in **(A)** aus 12 unabhängigen Infiltrationsexperimenten (Fehlerindikatoren  $\pm$  SEM). **(D)** Bestimmung der relativen GUS-Aktivität in 5 unterschiedlichen Blättern pro Linie versus mit Puffer infiltrierten Blättern mittels fluorimetrischem Assay, das Methylumbelliferinglucuronid als Substrat enthielt (Fehlerindikatoren  $\pm$  SEM). Die statistische Analyse erfolgte mittels Ein-Weg ANOVA mit *Bonferroni post hoc* Test. Keine signifikanten Differenzen wurden in **(C)** und **(D)** gefunden ( $P > 0.05$ ). Dieses Experiment wurde von C-W Lee, Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut, Universität Würzburg, durchgeführt.

### 3.4.3 Expressionsmuster der ABA- und Trockenstress-abhängigen Gene im Tumor

ABA-abhängige Signale, vermittelt z.B. durch ABI1-1, ABI2-1 und ABI4-1, führen zu Anpassungen an Trockenstress in verschiedenen Pflanzenspezies (Koornneef et al., 1984; Ooms et al., 1993; Verslues and Bray, 2006). Die Untersuchungsergebnisse (3.4.2) haben gezeigt, dass ABA auch während der Tumorentwicklung eine schützende Funktion gegen

Austrocknung haben könnte. Die Analyse des Genexpressionsmusters ABA-regulierter Gene zeigte, dass die Stressadaptierung im Tumor sich von der anderer gut untersuchter Gewebe, wie Blätter oder Wurzeln, unterscheidet. Gene, die durch ABA oder Trockenstress reguliert werden, waren auch im Tumor stark exprimiert. Dazu zählten *late embryogenesis abundant protein*, *LEA* (At2g46140), zwei *ABA-response related* Gene (At5g23350, At5g08350), *HVA22c* und *drought inducible AtDI21* (Tabelle 6). Die Expression von *AtDR4* - ein Repräsentant der durch ABA und Trockenstress reprimierten Gene in *Arabidopsis* Wurzeln – war 6-fach erniedrigt. Darüber hinaus wurde eine starke Induktion von vier aus 35 *Arabidopsis* Genen der Aquaporin-Familie in Tumoren beobachtet. Einige dieser Wasserkanäle werden durch Trockenstress und/oder ABA reguliert, um die Zelle vor Austrocknung zu schützen (Seki et al., 2001; Seki et al., 2002). Im Gegensatz dazu waren Markergene, die in Blättern und Keimlingen durch ABA/Trockenstress induziert sind, wie *RD20*, *COR47*, einige Dehydrine, *RAB18*, *ERD7*, *ALDH31* und *LEA14* im Tumor stark reduziert (Tabelle 6).

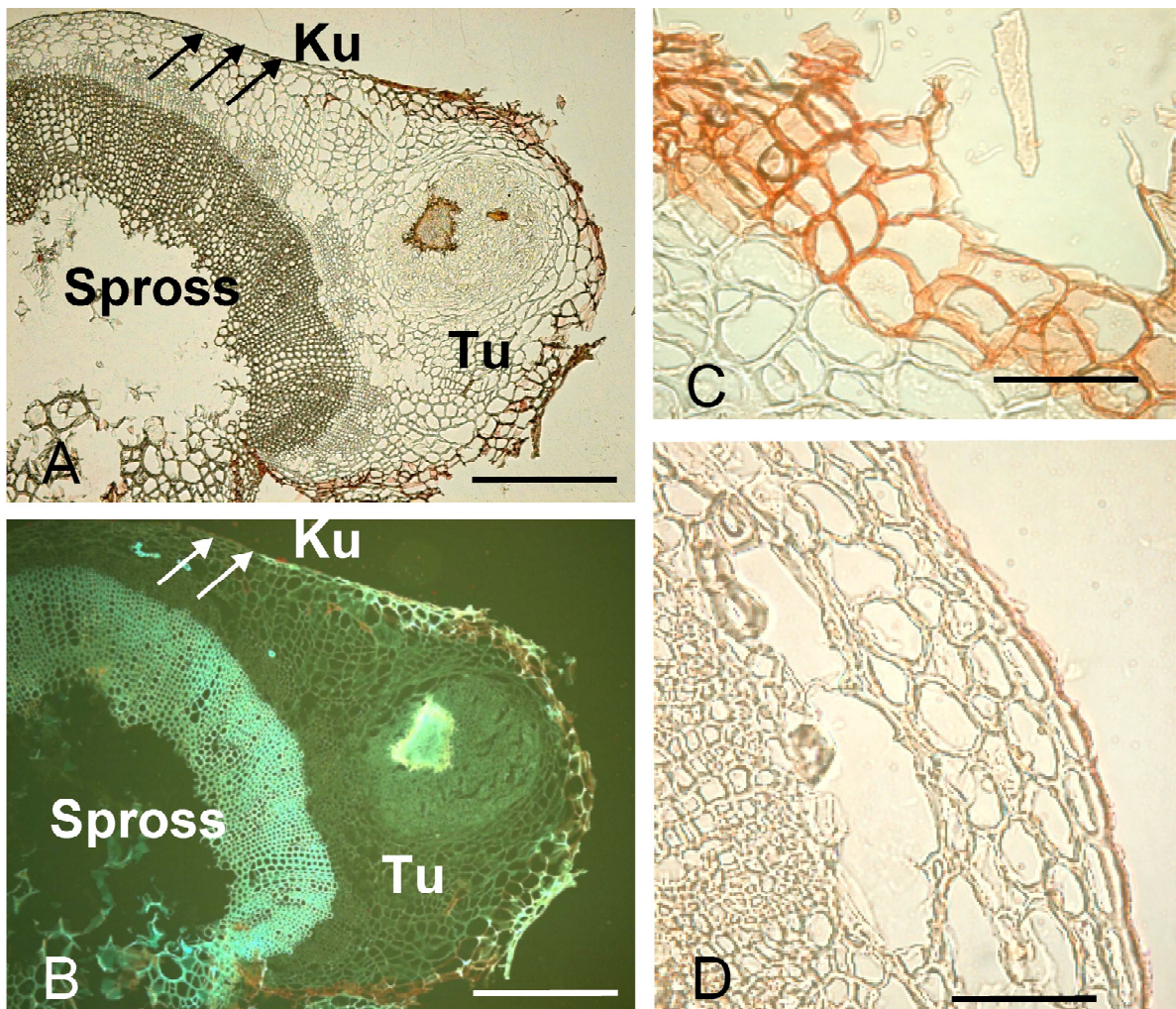
**Tabelle 6: Differenzielle Expression der ABA- und Trockenstress-regulierten Gene in *Arabidopsis* Tumoren.** Aufgelistet sind die Gennamen, die Genloci (MIPS-Code), die Signifikanz (P-Value) der Hybridisierungssignal-Verhältnisse (FCh) gebildet aus Tumor und Infloreszenzachse (Referenz) sowie die normalisierten Hybridisierungssignale (Rel. Signal) von Tumor und Infloreszenzachse. Differentiell exprimierte Gene der Aquaporinfamilie sind separat aufgeführt. Verglichen wurden die Daten von 4 Tumor- und 4 Referenzmikroarray-Hybridisierungen. Die Tabelle beinhaltet nur signifikant differentiell exprimierte Gene (P <0.01). Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)".

Gename	MIPS Code	P-value	FCh	Rel. Signal Tumor	Rel. Signal Referenz
<i>response to desiccation RD20</i>	At2g33380	0.00035	0.05	136	2842
<i>cold-responsive protein COR15a</i>	At2g42540	0.00057	0.16	42	267
<i>drought-repressed ATDR4h</i>	At1g73330	0.00003	0.16	207	1265
<i>cold-responsive protein COR414-TM1</i>	At1g29395	0.00027	0.2	144	692
<i>late embryogenesis abundant protein LEA1</i>	At1g32560	0.00070	0.23	70	304
<i>cold-responsive protein COR15b</i>	At2g42530	0.00015	0.3	105	375
<i>dehydrin RAB18</i>	At5g66400	0.00026	0.3	128	456
<i>dehydrin COR47</i>	At1g20440	0.00128	0.3	1662	5561
<i>late embryogenesis abundant protein LEA14</i>	At1g01470	0.02699	0.3	900	2902
<i>drought-inducible gene ERD7</i>	At2g17840	0.00041	0.37	430	1180
<i>aldehyde dehydrogenase ALDH311</i>	At4g34240	0.00226	0.4	189	456
<i>dehydrin LTI29</i>	At1g20450	0.01746	0.4	2040	4876
<i>calmodulin-related protein TCH2</i>	At5g37770	0.01935	0.5	202	413
<i>drought-induced AtDI21</i>	At4g15910	0.00226	2	402	192
<i>Aba-response related</i>	At5g08350	0.00475	2.3	633	275
<i>ABA-responsive protein HVA22c</i>	At1g69700	0.00589	2.5	481	192
<i>Aba-response related</i>	At5g23350	0.00110	3.6	271	74
<i>late embryogenesis abundant protein (LEA)</i>	At2g46140	0.00084	4.7	1326	282
<b>Aquaporine</b>					
<i>Plasma membrane intrinsic protein PIP 2;8</i>	At2g16850	0.0041	2.2	6690	2966
<i>NOD26-like protein NIP1;2</i>	At4g18910	0.0000	5.3	696	131
<i>Plasma membrane intrinsic protein PIP 1;3</i>	At2g01620	0.0001	6	2434	415
<i>Plasma membrane intrinsic protein PIP2;5</i>	At3g54820	0.0000	12.3	4405	357

### 3.4.4 Eine Suberinschicht schützt die Tumeroberfläche vor Austrocknung

Pflanzen haben eine epidermale Zellschicht entwickelt, die durch eine Kutikula vor einem substanziellen Wasserverlust schützt. Tumore hingegen, besitzen an ihrer Oberfläche keine funktionsfähige Epidermis und Kutikula. Mit dem Ziel herauszufinden, welche Schutzmecha-

nismen stattdessen den Tumor vor Austrocknung bewahren, wurde mit Hilfe einer spezifischen Färbe- und Fluoreszenztechnik eine Modifikation der Tumoroberfläche detektiert, die einem erhöhten Wasserverlust entgegenwirken kann. Eine Färbungstechnik mit Sudan-III-Behandlung und anschließender Filuoreszenzdetektion anhand der, aliphatische Verbindungen sichtbar gemacht werden können, zeigte, dass die Tumoroberfläche Suberin enthält (Abb. 19).

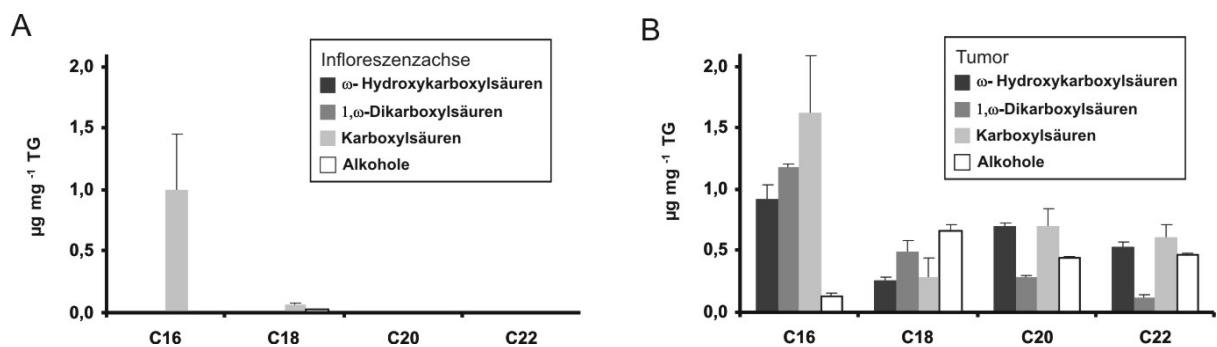


**Abbildung 19: Sudan-III Färbung zur Visualisierung von Suberin in Querschnitten von 30 Tage alten *Arabidopsis* Tumoren.**

(A) Tumor (Tu) mit perforierter Epidermis und Spross mit intakter Epidermis und Kutikula (Pfeile). Rötliche Farbe nach Sudan-III-Färbung im Bereich der äusseren Zellschichten markiert Suberin. (B) Starke Autofluoreszenz deutet auf aromatische Komponenten im verholzten Xylem und in den äusseren Zellschichten des Tumors hin. (C) Ausschnitt der äusseren Zellschichten des Tumors. (D) Ausschnitt vom Spross mit intakter Oberfläche. A, C und D wurden mittels Hellfeldmikroskopie und B mittels Fluoreszenzanregung bei 488 nm aufgenommen. Skala: A, B, 200 µm; C, D 50 µm.

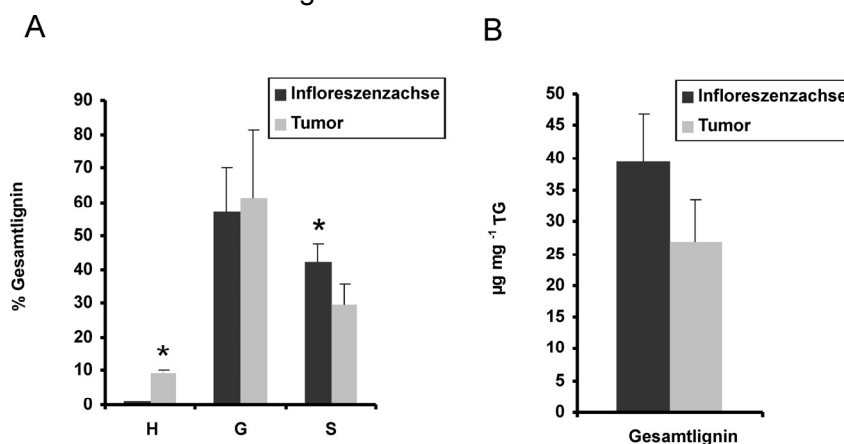
Mit Hilfe gaschromatographischer Analysen wurden daraufhin die Suberinablagerungen in Tumoren nachgewiesen (2.7.3). Die aliphatische Suberindomäne ist normalerweise aus monomeren Einheiten der langkettigen Fettsäurederivate ( $\omega$ -Hydro-carboxylsäuren, 1, $\omega$ -Dicarboxylsäuren, Carboxyl-säuren und Alkohole) zusammengesetzt. Diese sind durch Esterbrücken miteinander verbunden (Kolattukudy, 1984). Nach einer Deesterifizierung des Tumorgewebes entstanden typische Suberinmonomere mit einer Kettenlänge von C16 bis C22 (Abb. 20A). Der Gehalt des Gesamtsuberins, berechnet als Summe der deesterifizierten Monomere, betrug  $11.8 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  TG. Im Gegensatz dazu konnten im

Referenzgewebe keine typischen Suberinmonomere nachgewiesen werden. Als einzige Fettsäurederivate wurden Stearinsäure und Palmitinsäure detektiert, die wahrscheinlich aus Plasmamembranen der Infloreszenzzellen stammten (Abb. 20B). Ähnlich wie Lignin ist die aromatische Domäne von Suberin aus phenolischen Monomeren zusammengesetzt. Diese beinhalten drei aromatische Ringe mit einer unterschiedlichen Anzahl an Methoxygruppen, p-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G), und Syringyl (S, Whetten and Sederoff, 1995; Lapierre et al., 1996; S, Schreiber et al., 1999). Ein charakteristisches Merkmal von suberinisierten Zellwänden ist häufig ein erhöhter H-Gehalt im Vergleich zu lignifizierten Geweben. Ausserdem ist die Anzahl der chemisch degradierbaren Monomere generell niedriger als in Lignin (Zeier et al., 1999b).



**Abbildung 20: Identifikation von aliphatischen Suberinbestandteilen in Tumoren.** Verteilung von Substanzklassen und Kettenlängen der aliphatischen Suberinbestandteile in (A) Tumoren und (B) uninfizierten Infloreszenzachsen (Referenz). Ergebnisse sind in  $\mu\text{g}$  Monomer pro mg Trockengewicht (TG) dargestellt. Fehlerindikatoren representieren Standardabweichungen ( $\pm$  SD) aus drei unabhängigen Experimenten. Die Analysen hat J. Zeier, Botanik II, Julius-von-Sachs-Institut, Universität Würzburg durchgeführt

Die gaschromatographische Analyse hat eine beträchtliche Menge an H-Einheiten im Tumorgewebe ergeben (Abb 21A). Im Vergleich dazu, waren Isolate aus Infloreszenzachsen, die überwiegend aus lignifizierten Leitbündeln bestehen, hauptsächlich aus G- und S-Einheiten zusammengesetzt. H-Einheiten konnten hingegen nur in Spuren detektiert werden (Abb. 21B). Diese Ergebnisse deuten klar auf die Präsenz der aromatischen Bestandteile von Suberin im Tumorgewebe hin.



**Abbildung 21: Identifizierung aromatischer Suberinbestandteilen in Tumoren.** (A) Relative Menge von p-Hydroxyphenyl (H), Guaiacyl (G), und Syringyl (S) zur Gesamtmenge an Ligninmonomeren in Infloreszenzachsen oder Tumoren. (B) Summe aller Ligninmonomeren in  $\mu\text{g}$  Lignin pro mg Trockengewicht (TG). Fehlerindikatoren representieren SD aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzberechnung erfolgte mittels t-Test (\*,  $P < 0.05$ ).



Zusätzlich untermauern die Genexpressionsdaten diesen analytischen Befund. Etliche der Gene, die mutmaßlich für Enzyme der Suberinsynthese kodieren, waren im Tumor erhöht. Das Gen der Wurzel-spezifischen Fettsäure-Hydrolase CYP86A1 war im Tumor 3-fach stärker transkribiert; auch die Transkription der Gene, deren Produkte an der Biosynthese phenolischer Komponenten, wie Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL1) und 4-Kumarat-CoA Ligase (4CL2) oder Peroxidasen (Tabelle 3 und 7) waren im Tumor erhöht. Ein Mitglied der Familie von Lipidtransportproteinen, *lipid transfer protein 2* (LTP2), könnte an dem Transport der einzelnen Komponenten zur Tumoroberfläche beteiligt sein (Tabelle 7; Kolattukudy, 1981; Bernards and Razem, 2001; Kunst et al., 2004; Duan and Schuler, 2005). Die histologischen, chemischen und Genexpressionsanalysen lassen keinen Zweifel daran, dass die äußeren Zellschichten der Tumoroberfläche suberinisiert sind.

**Tabelle 7: Differenzielle Expression der mutmasslichen Gene für Suberinbiosynthese in *Arabidopsis* Tumoren.** Aufgelistet sind die Gennamen, die Genloci (MIPS-Code), die Signifikanz (P-Value) der Hybridisierungssignal-Verhältnisse (FCh) gebildet aus Tumor und Infloreszenzachse (Referenz) sowie die normalisierten Hybridisierungssignale (Rel. Signal) von Tumor und Infloreszenzachse. Verglichen wurden die Daten von 4 Tumor- und 4 Referenzmikroarray-Hybridisierungen. Die Tabelle beinhaltet nur signifikant differentiell exprimierte Gene (P <0.01). Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)".

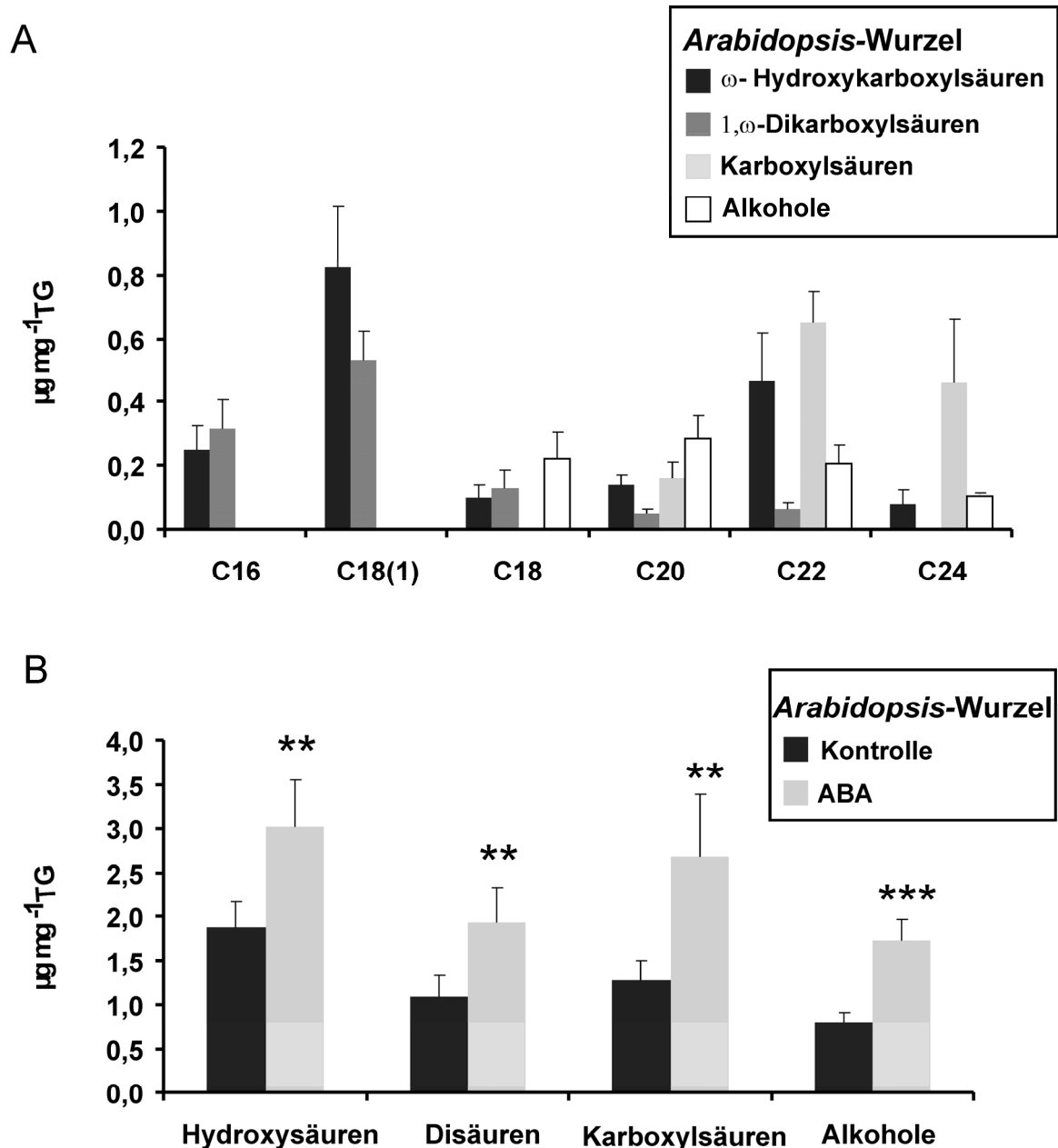
	Genname	MIPS Code	P-value	FCh	Rel. Signal Tumor	Rel. Signal Referenz
	<i>fatty acid ω-hydrolase</i> CYP86A1	At5g58860	0.00067	3.4	419	122
	<i>phenylalanine-ammonia lyase</i> PAL1	At2g37040	0.02079	1.9	2272	1198
	<i>4-coumarate-CoA ligase</i> 4CL2	At3g21240	0.00589	2.31	1050	455
	<i>lipid-transfer protein</i> LTP2	At2g38530	0.00023	10	2431	240
	<i>peroxidase</i>	At2g38390	0.00001	35	4935	141

### 3.4.5 ABA-induziert die Suberin-Biosynthese in *Arabidopsis*

Von anderen Spezies, wie etwa der Kartoffel, ist schon länger bekannt, dass ABA die Bildung von Suberin induzieren kann (Cottle and Kolattukudy, 1982). Dies legte die Vermutung nahe, dass auch in *Arabidopsis*-Tumoren die Suberinisierung als Trockenstressanpassung durch ABA induziert sein könnte. Dies wurde an *Arabidopsis* Wurzeln exemplarisch untersucht, da exogene ABA-Gaben an Tumoren durch den bereits sehr hohen endogenen ABA-Gehalte experimentell überlagert werden würden. Das aliphatische Suberin in *Arabidopsis* Wurzeln ist strukturell vergleichbar mit dem des Tumors (Abb. 22A), wobei jedoch einige spezifische Unterschiede vorkommen. Die Hauptkomponenten vieler Suberinpolymere, C18(1)-abgeleitete Hydroxy- und Dicarboxylsäuren, sind nur in der Wurzel vorhanden, nicht aber im Tumor (Kolattukudy, 1984; Zeier and Schreiber, 1998; Zeier et al., 1999a; Franke et al., 2005). Draüberhinaus, war die Kettenlänge in der Wurzel unterschiedlicher als im Tumor (vergleiche Abb. 22A mit 20A).

In *Arabidopsis* Wurzeln, die in Flüssigkultur kultiviert wurden, erfolgte die Stimulierung der Suberinbildung durch externe ABA-Zugabe. Diese enthielten einen 1.5- bis 2-fach höheren Suberingehalt als entsprechende Kontrollen (Abb. 22B). Der durch ABA induzierte Anstieg von Suberin wurde bei allen Substanzklassen gleichermaßen beobachtet; es wurden keine Präferenzen für Verbindungen mit bestimmten Kettenlängen festgestellt. Daraus folgt, dass ABA in *Arabidopsis* über das Potential verfügt, die Suberinsynthese zu induzieren. Diese

Ergebnisse untermauern die Hypothese, dass auch im Tumor die Synthese des Suberins durch ABA induziert sein könnte.

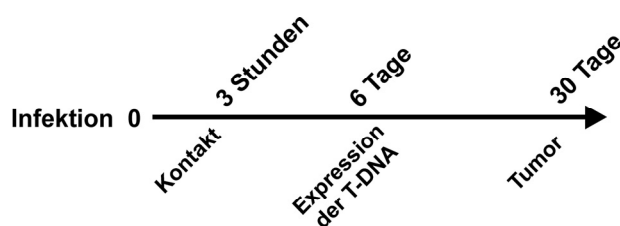


**Abbildung 22: ABA induziert die Suberinbildung in *Arabidopsis* Wurzeln.** (A) Verteilung der Substanzklassen und Kettenlängen aliphatischer Suberinbestandteile in *Arabidopsis* Wurzeln. (B) Konzentrationen an aliphatischen Substanzklassen aus unbehandelten (Kontrolle) und mit 10  $\mu$ M ABA behandelten Wurzeln. Angabe in  $\mu$ g Monomer pro mg Trockengewicht (TG). Fehlerindikatoren repräsentieren SD aus sechs unabhängigen Experimenten. Werte der Kontrollen und ABA-behandelten Pflanzen sind signifikant unterschiedlich (\*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ , t-Test).

## 4 Diskussion

Die durch *Agrobacterium* vermittelte Transformation pflanzlicher Zellen ist sehr umfangreich analysiert worden und es sind mehrere pflanzliche Faktoren bekannt, die diesen Prozess unterstützen (Lacroix et al., 2006; Tzfira and Citovsky, 2006; Citovsky et al., 2007; Djamei et al., 2007). Im Gegensatz dazu ist das Wissen über pflanzliche Abwehrmechanismen, die eine Transformation erschweren oder verhindern könnten, noch sehr begrenzt. Dabei wäre es sehr hilfreich diese Abwehrmechanismen besser verstehen und dadurch manipulieren zu können, um z.B. die Transformationseffizienz von verschiedenen pflanzlichen Spezies zu steigern oder überhaupt zu ermöglichen. Auf der anderen Seite könnte das Kennen solcher Mechanismen gezielt eingesetzt werden, um in der Landwirtschaft genutzt zu werden. Dort führt das durch Agrobakterien- ausgelöste Tumorwachstum zu erheblichen Ertragseinbußen. Bis jetzt wurden jedoch erst wenige Studien zu diesem Thema veröffentlicht, die hauptsächlich pflanzliche Reaktionen vor und nach der Transformation beschreiben. Laut einer Untersuchung von Veena et al. (2003) löst *Agrobacterium* eine verstärkte Expression von Abwehrgenen innerhalb von 6 Stunden nach der Infektion aus. Dies führte zu dem Model, in dem der Transfer von T-DNA und VIR-Proteinen in die pflanzliche Zelle eine Suppression dieser Abwehrgene innerhalb von 24 Stunden bewirkt. Diese Ergebnisse wurden in einem Experiment erzielt, in dem Zellsuspensionen von Tabak (BY2) mit verschiedenen onkogenen oder Transfer-defizienten (mit und ohne T-DNA), jedoch nicht mit Tumor-induzierenden *Agrobacterien* infiziert wurden. So konnten die Wirkungen der Phytohormone ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu dieser Studie erzielten Ditt und Kollegen Ergebnisse, die eine spätere Expression der Abwehrgene (48 Stunden nach Infektion) nach der erfolgreichen Transformation belegen. Letztere Befunde stimmten mit Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Als Versuchssysteme dienten dort Zellkulturen von *Ageratum conyzoides* und *Arabidopsis*, die mit nicht onkogenen und mit Tumor-induzierenden *Agrobacterium* Stämmen infiziert worden waren (Ditt et al., 2001; Ditt et al., 2006).

### 4.1 Pathogenabwehrreaktionen des Wirts gegenüber *Agrobacterium tumefaciens*



**Abbildung 23: Analyse der Interaktion von *Agrobacterium* mit der Pflanze zu drei entscheidenden Phasen der Infektion:** (i) Kontakt zwischen *Agrobacterium* und Wirt; (ii) nach der Integration der T-DNA ins pflanzliche Genom; (iii) in Tumoren.

Die vorliegende Arbeit hat bestehende Studien in folgender Weise erweitert und ergänzt: Zum einen wurde die pflanzliche Abwehr während des gesamten Verlaufs der Tumorentwicklung charakterisiert (Abb. 23), wobei ein spezielles Augenmerk auf die Rolle verschiedener Phytohormone bei dieser Pathogenabwehr gelegt wurde. Dieser Ansatz unterschied sich von den bereits publizierten insofern, als intakte Pflanzen

und nicht wie bei den vorherigen Arbeiten Zellkultur infiziert wurde. Zellkulturen werden in Gegenwart von extern zugesetztem Auxin und Cytokinin kultiviert, um eine schnelle und undifferenzierte Proliferation der kultivierten Zellen zu gewährleisten. Dadurch sind die

Phytohormon-vermittelten Signale bereits insensitiv gegenüber den durch die Agrobakterien mit Hilfe onkogener T-DNA synthetisierten erhöhten Auxin- und Cytokinin-Konzentrationen. Die Infektion von Pflanzen ermöglicht dagegen naturnahe Versuchsbedingungen und ein besseres Verständnis von der Rolle von Phytohormonen bei der Abwehr des bakteriellen Pathogens.

#### **4.1.1 Frühe Abwehrreaktionen sind in der Wirtspflanze unterdrückt**

Erste Hinweise auf eine aktive Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrreaktionen ergaben sich bei Untersuchungen mit dem generellen Elicitor, Elongationsfaktor TU. *Agrobacterien* besitzen, wie andere bakterielle Pathogene auch, den ubiquitären Elongationsfaktor Tu (EF-Tu), der von *Arabidopsis* erkannt wird und innerhalb kürzester Zeit basale Resistenzmechanismen *innate immunity* (engl.: angeborene Immunität; Zipfel et al., 2006) in der Pflanze aktiviert. Unseren Beobachtungen zu Folge reprimieren Agrobakterien diese EF-Tu-vermittelte Abwehr. Lebende Agrobakterien induzieren 3 Stunden nach der Infektion nur 1% von allen durch EF-Tu-regulierten Genen in *Arabidopsis* (3.2.1).

Weitere frühe Antworten der Pflanze auf Pathogenbefall, wie etwa die ET-abhängige Aktivierung von Abwehrgenen oder die Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (oxidative burst) wurde ebenfalls unterdrückt. Obwohl das *Agrobacterium* 3 h nach Infektion die Produktion der Ethylenvorstufe ACC induziert (3.2.4), konnte mit dem Microarray keine Transkriptionsaktivierung der ET-induzierten Abwehrgene nachgewiesen werden (Tabelle 2). Darüber hinaus haben Studien unter anderen experimentellen Bedingungen bestätigt, dass Agrobakterien die Expression von einigen Pathogenabwehrgenen schon kurz nach der Anlagerung an die pflanzliche Zelle, also innerhalb der ersten Stunden, unterdrücken (Ditt et al., 2001; Gaspar et al., 2004). Erst zu späteren Zeitpunkten, wenn die T-DNA im Genom integriert ist, wurden *pathogenesis-related* Gene (*PR*), *Defensine* und weitere Abwehrgene erhöht exprimiert gefunden (Abbildung 7; Tabelle 2). Eine verzögerte Aktivierung der Pathogenabwehrmechanismen bewirkt, dass die T-DNA ungehindert integriert werden kann und somit die Tumorentwicklung begünstigt wird.

Ähnliche Verzögerungen von Abwehrreaktionen des Wirts sind auch von anderen virulenten phytopathogenen Bakterien, wie bsp. *Pseudomonas syringae* (DC3000) bekannt, um eine erfolgreiche Etablierung der Infektion zu gewährleisten (Tao et al., 2003). Bei dieser Interaktion werden entsprechende Effektorproteine, d.h. Toxine und andere Faktoren ausgeschieden, die mit der pflanzlichen Abwehr interferieren und die Elicitor-vermittelte basale Immunantwort unterdrücken (Hauck et al., 2003; Abramovitch and Martin, 2004; Navarro et al., 2004; Kim et al., 2005). Weitere Beispiele für die aktive Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen sind von biotrophen und hemibiotrophen Pilzen bekannt, was eine gesteigerte Anfälligkeit der Pflanze zur Folge hat (Waspi et al., 2001; Bouarab et al., 2002). Sogar bei symbiotischen Pflanze-Mikrobe-Interaktionen spielt die Suppression der pflanzlichen Abwehr eine entscheidende Rolle für die Etablierung der Infektion. So führt beispielsweise die Expression von NopL aus *Rhizobium* sp. (NGR234) in Tabak oder *Lotus japonicus* zur Unterdrückung der Expression von *PR*-Genen (Bartsev et al., 2004).

Einer der möglichen Effektoren, der bei Agrobakterien für die Unterdrückung der *innate immunity* verantwortlich sein könnte, ist die bifunktionelle Katalase/Peroxidase KatA, die die Degradierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalysiert und dadurch die *hypersensitive response (HR)* unterdrücken könnte (Xu et al., 2001). 1990 demonstrierten Robinette und Matthysse, dass eine Infiltration von Tabak mit *Pseudomonas syringae pv. phaseolicola* die HR unterdrücken kann, wenn die gleiche Stelle vorher mit *A. tumefaciens* oder *Pseudomonas savastanoi* infiziert wurde. Eine Deletionsanalyse in beiden Stämmen demonstrierte, dass die Auxin-Produktion für die HR-Unterdrückung notwendig war. Das von Agrobakterien produzierte Auxin (3.2.6) könnte mit der Pathogenantwort des Wirtes interferieren. Frühere Studien belegen, dass Auxin-abhängige Signale die Anfälligkeit von Pflanzen gegenüber bakteriellen Infektionen begünstigt. Viele *P. syringae* Stämme synthetisieren ebenfalls Auxin; so induziert eine Infektion mit *Pto DC3000* die Auxin-Biosynthese in *Arabidopsis*, was wiederum eine besondere Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen vermittelt. Überdies verstärkt eine Behandlung von *Arabidopsis* mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, einem synthetischen Auxin-Analogon, die durch *Pst DC3000* hervorgerufenen Symptome. Umgekehrt erhöht die Degradierung von Auxin-Rezeptoren durch miR393 die Resistenz gegen *Pto DC3000* (Navarro et al., 2006). Marois und Kollegen zeigten, dass AvrBs3, ein TyplIII-Effektor aus *Xantomonas campestris pv. vesicatoria*, Auxin-sensitive Gene induzieren kann und zu einer Symptomverstärkung führt. Da eine Auxinbehandlung des Wirts vor der Infektion die Tumorinduktion stimuliert, wäre es vorstellbar, dass das von Bakterien synthetisierte Auxin die Verzögerung der pflanzlichen Abwehr verursacht. Schon frühere colorimetrische Messungen zeigten, dass der *A.tumefaciens* Stamm C58 grosse Mengen Auxin ins Medium ausscheidet, was in der vorliegenden Arbeit mit genaueren GC-MS verifiziert wurde (3.2.6; Morris, 1986). Zusätzlich zu dieser autonomen Auxin-Biosynthese induzierte *Agrobacterium* durch chromosomal-kodierte Faktoren die Auxin-Biosynthese in der Pflanze bereits zu einem Zeitpunkt, bevor die Expression der auf der T-DNA lokalisierten Auxin-Biosynthesegene *iaaH* und *iaaM* in der infizierten Pflanze zu einer Auxin-Anreicherung führt. Beide Auxin-Signale unterschieden sich nicht nur im Niveau, sondern auch in ihrer Fähigkeit die Genexpression zu regulieren; ob neben Auxin weitere Kofaktoren an der Regulation beteiligt sind bleibt jedoch vorerst offen (s. 3.2.6).

#### **4.1.2 Signale der Stressphytohormone regulieren morphologische Anpassungen**

Während in der frühen Phase der Infektion mit Agrobakterien die Abwehr durch den Wirt unterdrückt wurde, kam es nach der T-DNA Integration zur Expression von Abwehrgenen und zur Akkumulation von Stressphytohormonen. Dabei kann zwischen zwei Effekten unterschieden werden: (i) eine generelle verspätete Abwehr, die durch die Anwesenheit des Bakteriums selbst ausgelöst wird und auch bei nicht onkogenen Agrobakterien-Stämmen auftritt; (ii) eine spezifische durch die T-DNA-Integration und physiologische Umprogrammierung der Zellen ausgelöste Antwort.

Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass der Gehalt des Stressphytohormons, Ethylen (ET) ansteigt sowie Gene für dessen Biosynthese und Signaltransduktion bereits sechs Tage

nach Infektion in den transformierten Pflanzenzellen induziert sind, obwohl die T-DNA selbst keine ET-Biosynthesegene enthält (Wood et al., 2001; Tabelle Ethylen). Aber Auxin und Cytokinin, die T-DNA kodiert sind, fördern nachweislich die Ethylenbiosynthese (Referenzen siehe in Robert-Seilaniantz et al., 2007). Dadurch steigern diese pathologischen Phytohormonkonzentrationen die ET-Produktion im infizierten Gewebe. Weiterhin ist bekannt, dass ET zusammen mit Auxin vor allem die Entwicklung des pathologischen Leitbündelsystems zwischen Tumor und Wirt steuert, um den Import von Nährstoffen aus der Wirtspflanze zu gewährleisten (Aloni et al., 1998; Wächter et al., 2003). Wird die ET-Biosynthese gehemmt oder ist die Wirtspflanze unempfindlich gegenüber ET wachsen kaum Tumore. Das gasförmige ET kann aber auch durch den Transkriptionsfaktor ERF1 die Expression von Pathogenabwehrgenen, wie *PDF1.2*, *PR3* und *PR4* aktivieren (3.2.4; Tabelle 4; Alonso and Stepanova, 2004). Um diesen Signalweg getrennt von der morphologischen Rolle des ET zu untersuchen, wurden Tumore an der *jin1*-Mutante (*jasmonat-insensitive*) analysiert. JIN1 kodiert für einen kernlokalisierten bHLHzip-Transkriptionsfaktor (AtMYC2), der differentiell die Jasmonsäure- und/oder ET-Signale während zwei verschiedener Stresseinwirkungen (Pathogenbefall und Verwundung) reguliert (Anderson et al., 2004). AtMYC2 reprimiert die Expression von ERF1-induzierten Genen; dementsprechend zeigen *jin1*-Mutanten eine erhöhte Akkumulation von *PDF1.2*, *PR3* und *PR4*-Transkripten sowohl konstitutiv wie auch durch ET induziert (Anderson et al., 2004). Dennoch unterstützten *Jin1*-Mutanten das Tumorstadium genauso wie der Wildtyp. Da die höhere Expression von Ethylen-induzierten Abwehrgenen das Tumorstadium offensichtlich nicht beeinträchtigt, scheint eine ET-basierte Abwehr keine Rolle für das Tumorstadium zu spielen, sondern fördert dessen morphologische Differenzierung.

Das Stressphytohormon Salizylsäure (SA) akkumulierte erst nach der Integration der T-DNA und im voll entwickelten Tumor. Es ist bekannt, dass in Pflanzen SA die Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen vermittelt, wobei die Expression des *PR1*-Gens als molekularer Marker dieses Abwehrwegs dient (Dong, 1998; Feys and Parker, 2000). Bei einer agrobakteriellen Infektion ist dieser Weg jedoch nicht aktiviert (3.2.6). Das Ausschalten der SA-Biosynthese bei Pathogenbefall, wie in *sid2* Mutanten (*SA-induction-deficient*), hat keinen Einfluss auf das Tumorstadium (Abb. 14).

Beide Abwehrwege, ethylen-induziert und salizylsäure-induziert, bleiben möglicherweise wirkungslos bei einer Agrobakterieninfektion, da sie erst zu einem Zeitpunkt nach Integration der T-DNA induziert werden. Sind aber die Abwehrwege schon vor dem Transformationsprozess aktiviert, wie z.B. in *cpr5* oder *cep*-Mutanten, kann die T-DNA nicht integrieren und es entsteht kein Tumor. Diese Ergebnisse sind konsistent mit einer Rolle von Salizylsäure bei der Integration von T-DNA. Hier hemmt SA die Expression der *vir* Gene in Bakterien und blockiert somit den Transformationsprozess (Yuan et al., 2007).

Konträr zu dem Befund sich normal entwickelnder Tumore der SA-defizienten Mutante, *sid2*, zeigten weitere *Arabidopsis*-Pflanzen mit Defekten in der SA-abhängigen Signalkette (*pad4*, *eds1* und *NahG*), ein verbessertes Tumorstadium. Die Mutanten *pad4* und *eds1* weisen

Defekte in der entsprechenden Signalkette (Wiermer et al., 2005). *NahG* exprimiert eine bakterielle Salizylathydrolase aus (*Pseudomonas putida*), die konstitutiv SA zu Catechol degradiert (Friedrich et al., 1995). Der höhere Tumorstadium an diesen Pflanzen kann nicht auf eine geringere Akkumulation von SA zurückgeführt werden, da sich die SA-Mengen auch in *pad4*, *eds1* und *NahG* nicht von denen in *sid2* nach einem Pathogenbefall unterscheiden (Nawrath and Metraux, 1999). Vielmehr scheinen die Proteine EDS1 und PAD4 essentielle Regulatoren der basalen pflanzlichen Resistenzreaktionen gegen invasive biotrophen und hemibiotrophen Pathogene zu sein. Unabhängig von ihrer Wirkung auf die Akkumulation von SA agieren PAD4 und EDS1 als Repressoren der JA/ET-induzierter Pathogenabwehr. Diese Faktoren sind ausserdem auch an der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vermittelten Signalübertragung bei abiotischem Stress, wie z.B. Hypoxie, beteiligt (Glazebrook et al., 2003; Wiermer et al., 2005; Brodersen et al., 2006; Muhlenbock et al., 2007). Die verbesserte Tumorentwicklung bei den *NahG*-Pflanzen korrelierte mit der Tatsache, dass diese generell anfälliger, auch gegenüber anderen Pathogenen, wie *P. syringae*, *P. parasitica* oder *B. graminis* sind (Nawrath and Metraux, 1999; Zimmerli et al., 2004). Diese Effekte beruhen z.T. auf der biologischen Aktivität des SA-Abbauproduktes, Catechol, das die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Biosynthese induziert (van Wees and Glazebrook, 2003). Da ET/JA-induzierte Pathogenabwehr keine Wirkung auf Tumore hatte, wäre eine alternative Erklärung, dass das verstärkte Tumorstadium an *eds1*, *pad4* und *nahG* Mutanten über die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation in Tumoren reguliert wird. Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass *pad4* und *NahG* keinen Einfluss auf die Transformation haben, sondern erst während der Tumorentwicklung einwirken (3.3). Erst zu diesem Zeitpunkt akkumuliert auch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und die Expression der Peroxidasen erreicht ein Maximum. Diese späte Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnte wiederum eine direkte Folge der veränderten Physiologie des Tumors sein. Zum einen agiert H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Signalmolekül während des Wachstums und der Entwicklung. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist in die Differenzierung von Zellulose-reichen Zellwänden involviert. So wäre eine Rolle von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Tumorentwicklung und Morphologie denkbar, indem eine verstärkte Zellwandsynthese die schnelle Proliferation im Tumor begünstigt (Slesak et al., 2007). Zum anderen wird H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für die Trockenstressanpassung (4.2, s.u.) im Tumorgewebe benötigt, um mittels der im Tumor exprimierten Peroxidasen (3.2.3) die Modifizierung der Zellwände, wie etwa bei der Suberinisierung zu katalysieren. Dies erzeugt eine Barriere gegen zu starken Wasserverlust (Passardi et al., 2004).

#### **4.2 Pflanzliche Tumore besitzen einen Schutz vor Trockenstress**

Durch *A. tumefaciens* induzierte Tumore weisen einen verstärkten Wasserverlust auf, der als Transpirationssog den Wasser- und Nährstofffluss in Richtung Tumor umlenkt. Dieser Prozess ist auf der einen Seite unentbehrlich für die Versorgung und Entwicklung des Tumors (Schurr et al., 1996; Wächter et al., 2003), andererseits birgt er jedoch auch die akute Gefahr der Austrocknung. Die erfolgreiche Etablierung eines Tumors erfordert daher ein ausgewogenes Gleichgewicht zwischen diesen gegenläufigen Prozessen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Phytohormon Abscisinsäure (ABA) beide Prozesse reguliert. Auf der einen Seite steuert ABA den Aufbau einer Suberinschicht an der Tumoroberfläche, die der unkontrollierten Verdunstung entgegen wirkt. Auf der anderen Seite erhöht ABA das osmotische Potential im Tumor und lenkt so den Wasserfluss in

Richtung Tumor. In dem hier postulierten Model kann ABA den Wasserhaushalt im Tumor autonom regulieren.

#### **4.2.1 ABA induziert die Biosynthese von Suberin in einem Periderm-ähnlichen Abschlussgewebe**

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ABA die Suberinbiosynthese in *Arabidopsis* Wurzeln induziert und in Tumoren einige Suberin-Biosynthesegene induziert waren, die durch ABA reguliert werden. Wie auch in anderen Spezies entwickeln Tumore an *Arabidopsis* keine funktionierende Epidermis, sondern sind stattdessen durch zwei bis drei suberinisierte Zellschichten vor einer übermäßigen Austrocknung geschützt (3.4.4). Dieses Suberin weist eine enge strukturelle und chemische Verwandtschaft zu Periderm auf, dem Abschlussgewebe überirdischer Organe der Dikotyledonen und Gymnospermen im sekundären Wachstum oder nach Verwundung (Schönherr and Ziegler, 1980; Schreiber et al., 2005). Obwohl suberinisiertes Periderm eine Diffusionsbarriere gegen Verdunstung formt, ist es nicht perfekt wasserdicht (Kolattukudy and Dean, 1974; Vogt et al., 1983; Nawrath, 2002; Franke et al., 2005; Schreiber et al., 2005). Diese Eigenschaften legen nahe, dass die suberinisierten Zellreihen der Tumoroberfläche sowohl einer übermäßigen Austrocknung entgegenwirken als auch durchlässig genug sind, um den Wasser- und Nährstofffluss in den Tumor nicht zu behindern (Schurr et al., 1996; Wächter et al., 2003).

In höheren Pflanzen besteht das ubiquitär vorkommende Suberin aus einer phenolischen und einer aliphatischen Domäne. Die phenolischen Monomere des Suberins werden über den Phenylpropanoidsyntheseweg synthetisiert und über Peroxidasen, ähnlich wie bei Lignin, miteinander verknüpft (Kolattukudy, 1981; Bernards and Razem, 2001). Gene der im Phenylpropanoidweg wirkenden Enzyme Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) und 4-Coumarat-Ligase (4CL), sowie viele Peroxidasen zeigen im Tumor eine erhöhte Expression. In der Kartoffel induziert ABA die Suberinisierung direkt über PAL- und Peroxidase-Aktivität (Cottle and Kolattukudy, 1982). Die Synthese der aliphatischen Domäne von Suberin beinhaltet eine  $\omega$ -Oxidation, die die  $\omega$ -Position der Fettsäurederivate funktionalisiert. Diese  $\omega$ -Hydroxylierungsreaktion wird von NADPH-abhängigen P450-Cytochrom-Monooxygenasen aus der Cyp86A-Familie katalysiert (Schuler and Werck-Reichhart, 2003; Duan and Schuler, 2005). In Tumoren zeigt das wurzelspezifische Cyp86A1 erhöhte transkriptionelle Aktivität (Tabelle 7). Der Promoter von Cyp86A1 enthält einige ABA- und Trockenstress-sensitive Elemente (ABF/ABRE-like) und ist durch ABA induzierbar (Benveniste et al., 1998). Diese Befunde legen nahe, dass die Bildung von Suberin im Tumor direkt durch ABA induziert sein könnte.

#### **4.2.2 ABA reguliert die Anpassungen an Trockenstress und den Wasserfluss**

Trotz des reduzierten Wasserverlustes in Tumoren ist das Gewebe von Austrocknung bedroht. Wie auch in anderen von Trockenstress betroffenen Spezies enthalten Tumore an *Arabidopsis* eine hohe Konzentration des Stresshormons ABA (Mistrik et al., 2000; Veselov et al., 2003; Wächter et al., 2003). Dementsprechend wurden in dieser Arbeit auch ABA-induzierte physiologische Anpassungen in Tumoren gefunden. Davon betroffen war die

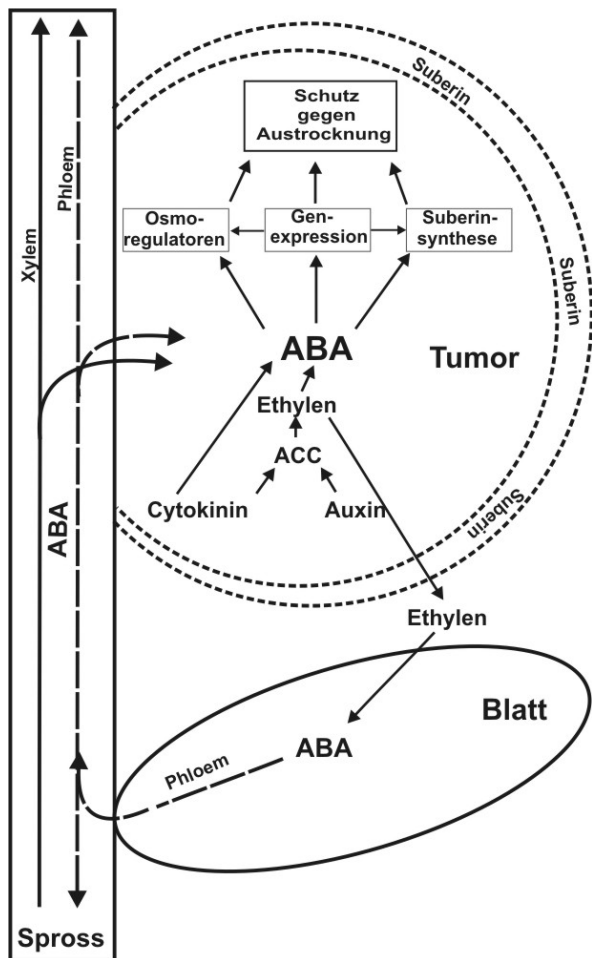


Genregulation oder eine veränderte Metabolitzusammensetzung durch Anreicherung von osmoprotektiven Substanzen. Die ABA-abhängige Genregulation unterschied sich jedoch von der in den klassischerweise untersuchten Geweben, wie Keimlingen, Blättern oder Wurzeln von *Arabidopsis*. Im Tumor werden vermehrt Transkripte der *late-embryogenesis-abundant* (LEA) und *dehydrin*-Genfamilien gefunden. LEA-Proteine sind besonders im reifenden Samen angereichert, werden aber auch in vegetativen Geweben gefunden, wo sie eine Rolle beim Austrocknungsschutz spielen (Tolleter und Mitarbeitern; 2007). So schützen die LEA- und Dehydrin-Proteine bei akutem Wassermangel die strukturelle Integrität von Membranen und anderen Proteinen durch Bindung von Calciumionen. Außerdem binden und transportieren diese Proteine Wasser und wirken als molekulare Chaperone (Grelet et al., 2005; Mahajan and Tuteja, 2005; Tolleter et al., 2007). Auch im Tumor könnte auf diese Weise dem Wassermangel durch eine ABA-abhängige Expression dieser Gene entgegen gewirkt werden.

Darüber hinaus zeigen sowohl die Tumore bei *Arabidopsis* als auch bei *Ricinus communis* eine starke Anreicherung des Osmoregulators Prolin (Wächter et al., 2003). Diese Aminosäure ist an der Erhöhung des Zellurgors und der Aufrechterhaltung des osmotischen Gleichgewichtes bei Trockenheit beteiligt. Die Analyse von ABA-Signalmutanten hat gezeigt, dass diese Funktion von Prolin und weiteren Osmoregulatoren bei der Anpassung an Trockenheit ABA-abhängig ist (Xiong et al., 2001; Verslues and Bray, 2006). Bei den hier präsentierten Untersuchungen an ABA-insensitiven Mutanten kristallisierte sich eine entscheidende Rolle für die Klasse der 2C-Phosphatasen (*abi1*, *abi2*) sowie von ABI4, einem Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne, für die Tumorentwicklung heraus (Leung et al., 1997; Finkelstein et al., 1998). Diese Mutanten zeigten ein stark reduziertes Tumorstadium, obwohl die Transformationseffizienz nicht beeinträchtigt war (3.4.2). In vegetativen Organen sind die ABI1- und ABI2-Proteine an der Trockenstressanpassung beteiligt und regulieren zusammen mit ABI4 unter anderem die Akkumulation von Prolin bei sinkendem Wasserpotential und Trockenheit (Verslues and Bray, 2006). Im Gegensatz dazu hat das Ausschalten des Transkriptionsfaktors, ABI3, keinen Effekt auf das Tumorstadium, vermutlich, weil ABI3 im Signalweg stromabwärts der Phosphatasen ABI1 und ABI2 wirkt (Brady et al., 2003).

#### **4.2.3 ABA wird von der Wirtspflanze in den Tumor transloziert**

Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Ergebnissen der ABA-Signaltransduktion zeigten die Untersuchungen keine Veränderung bezüglich der Genexpression für die Biosynthese, Degradierung oder Freisetzung aus konjugierten Formen von ABA (s. 3.4.1). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass ABA, wenn überhaupt, nur zu einem kleinen Teil im Tumor synthetisiert wurde. Vielmehr zeigt die Lokalisierung von ABA in Tumorquerschnitten die stärksten Signale im Xylem, welches Tumor und Spross miteinander verbindet, so dass ein Transport von ABA entlang des Nährstoffstroms von der Pflanze in den Tumor wahrscheinlich erscheint. Für Tumore an *R.communis* wurde eben solches Modell vorgeschlagen, wo der hohen Gehalt an Auxin und Cytokinin im Tumor die Produktion von Ethylen steigert; dieses gasförmige Signalmolekül kann seinerseits in den Blättern der



**Abbildung 24: Model der ABA-Funktion bei Austrocknungsschutz von Tumoren.**

In Tumoren verursachen die Gene der T-DNA erhöhte Cytokinin und IES-Akkumulation, die wiederum ACC Produktion, gefolgt von seiner Umwandlung zu Ethylen ankurbeln. Der abgesonderte Ethylen steuert die ABA-Biosynthese in Tumor und Blättern des Wirtes. ABA wird aus Rosettenblättern in die Tumore via Phloem und Xylem transportiert. In Tumoren aktiviert ABA die Expression der Stressgene, die Synthese von Suberin und induziert erhöhte Akkumulation von Osmoregulatoren. In Folge dessen werden die äusseren Zellschichten des Tumors suberinisiert und Tumor wird vor Austrocknung geschützt.

Pflanze die Produktion von ABA stimulieren (Aloni et al., 1998; Wächter et al., 1999; Veselov et al., 2003). Aufgrund der vorliegenden Daten scheint dieses Model auch für *Arabidopsis* plausibel: Hier enthalten die Tumore große Mengen der Ethylenvorstufe ACC und die Tumore entwickeln sich in unmittelbarer Nähe der Blattrosette. Im Phloensaft von *R. communis* und auch von *Arabidopsis* konnten zudem hohe ABA-Konzentrationen nachgewiesen werden und unterstützen damit die Hypothese für die Translokation von ABA. Diese externe Zufuhr von ABA kann als Regelkreis interpretiert werden, der die Feinabstimmung der Wasserbalance im Tumor regeln kann (Abb. 24). Auf der einen Seite gibt es im Tumor eine negative Rückkopplung zwischen der Reduktion des Wasserverlustes durch die suberinisierte Oberfläche und ABA-Biosynthese. Auf der anderen Seite gibt es eine positive Rückkopplung zwischen Wasserverlust und ABA-Import

über die Erhöhung der Genexpression und des osmotischen Potentials im Tumor. Da beide Effekte durch ABA vermittelt werden, stellt die Kommunikation zwischen Tumor und Wirtspflanze über das gasförmige Signalmolekül Ethylen einen Antrieb für die externe Versorgung des Tumors mit ABA dar (Abb. 24).

## 5 Zusammenfassung

Phytohormone sind wichtige Signalmoleküle bei der durch *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Tumorgenese. Zum einen sind sie direkt am onkogenen Prozess beteiligt, indem sie die Proliferation von transformierten Zellen fördern und physiologische Anpassungen im entstehenden Tumor steuern. Auf der anderen Seite vermitteln Phytohormone aber auch Abwehrreaktionen der Pflanze als Folge eines Befalls mit onkogenen Pathogenen. Um diese verschiedenen Wirkungen der Phytohormone während der Tumorgenese besser zu verstehen, wurde die Genexpression durch Microarrays zu unterschiedlichen Zeitpunkten dieses Prozesses an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* charakterisiert und die Rolle ausgewählter Phytohormone, wie Abscisinsäure, Salizylsäure, Jasmonsäure, Ethylen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Mutanten in entsprechenden Signalwegen funktionell untersucht.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass die bekannten Pathogenabwehrwege bei Befall durch onkogene *Agrobacterien* mit einer zeitlichen Verzögerung aktiviert werden. Diese Verzögerung wird wahrscheinlich durch das vom Bakterium abgegebene Auxin reguliert, und somit könnte dieses Auxin die Integration der T-DNA indirekt fördern. Sind die pflanzlichen Abwehrmechanismen jedoch vor dem Transformationsprozess aktiviert, wie z.B. in *cpr5*-Mutanten, kann die T-DNA nicht integrieren und es entsteht kein Tumor. Beim Wildtyp akkumulieren in Folge der T-DNA Integration mit Pathogenabwehr assoziierte Signalmoleküle, wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ethylen und Salizylsäure, nicht aber Jasmonsäure. Die Analyse des Tumorwachstums an Mutanten mit unterschiedlichen Defekten in diesen Signalwegen zeigte jedoch, daß Ethylen und Salizylsäure keinen Einfluß auf das Tumorwachstum haben. Vielmehr regulieren Ethylen und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> morphologische Anpassungen und Adaptationen an Trockenstress in Tumoren.

Die von *Agrobacterium tumefaciens* induzierten Tumore beziehen außer Nährstoffe, vor allem Wasser von der Wirtspflanze. Das Fehlen einer intakten Epidermis oder Kutikula führt allerdings zu unkontrolliertem Wasserverlust. Da aber weder der Tumor noch die Pflanze welken, muss eine Trockenstressadaptation stattzufinden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Phytohormone Abscisinsäure (ABA) und Ethylen an diesem Prozess beteiligt sind. Zum einen regulieren sie die Akkumulation von Osmoregulatoren, sowie Suberineinlagerungen in den äußeren Zellschichten des Tumors, wodurch eine dem Periderm ähnliche Schutzschicht entsteht. Diese Suberinisierung wird im Tumor wahrscheinlich von ABA induziert, wie Experimente an *Arabidopsis* Wurzeln belegten. Die Microarray-Analysen ergaben, dass im Tumor ein spezielles Muster an ABA- und Trockenstress-induzierten Markergenen exprimiert wird, sowie einigen Aquaporinen, die den erhöhten Wasserbedarf des Tumors regulieren könnten. Das verminderte Tumorwachstum an *abi*- und *aba*-Mutanten belegt die Bedeutung von ABA-Signalen für die Homeostase des Wasserhaushalts im Tumor.

## 6 Summary

Phytohormones are important signaling molecules involved in *Agrobacterium tumefaciens* mediated tumor development. On the one hand, they are directly involved in the infection process by supporting proliferation of transformed plant cells and mediating physiological adaptations of the developing tumor. On the other hand, phytohormones also mediate defense responses of the host plant upon bacterial infection. In order to get further insight into these supplementary roles of phytohormones during tumor development, microarray techniques have been used to analyze changes in gene expression of *Arabidopsis thaliana* upon infection with *Agrobacterium tumefaciens* at distinct time points during tumor development. The functional relevance of selected phytohormones, e.g. abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was analyzed by the use of *Arabidopsis* mutants with defects in the respective signaling pathways.

This work suggests a delayed activation of the well known defence response pathways to take place upon infection by agrobacteria. This delay is most likely mediated by auxin, which is synthesized and secreted by the bacteria. Hence, auxin indirectly promotes T-DNA integration by causing delay of the plant's defence responses. However, if pathogen defence is active before agrobacterial infection, e.g. in *cpr5* mutant plants, T-DNA integration is prevented and tumor growth cannot be observed. Signaling molecules associated with defence responses, e.g. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ethylene and salicylic acid, but not jasmonic acid accumulate due to T-DNA integration in wild type plants. However, *Arabidopsis* mutants with defects along the ethylene or salicylic acid signalling pathways revealed wild type like tumor development neglecting their involvement in tumor associated defence responses. Rather, this work supports the hypothesis that ethylene and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are involved in regulating tumor morphology and drought stress adaptations.

Crown gall tumours induced by *Agrobacterium tumefaciens* represent a sink that is provided with nutrients and water by the host plant. The lack of an intact epidermis or cuticle results in uncontrolled loss of water. However, neither the tumor nor the host plant display wilting. This phenomenon points to drought stress adaptations in both, tumours and the host plant. In order to understand the protecting molecular mechanisms against desiccation, the gene expression pattern of *Arabidopsis thaliana* tumors was compared with the profile of stress metabolites: *Arabidopsis* tumors accumulated high amounts of ABA, the ethylene precursor ACC, osmoprotectants and form a suberized periderm-like layer. Suberization of the outer tumor cell layers most likely is mediated by ABA since external application of ABA induced suberization of *Arabidopsis* roots. However, the expression level of the classical marker genes, known to respond to drought stress and/or ABA, was lower in tumors. Instead another set of drought and/or ABA-inducible genes, was higher transcribed. Elevated transcription of several ABA-dependent aquaporin genes might indicate that ABA controls the water balance of the tumor. The retarded tumor growth on *abi* and *aba* mutant plants underlined the importance of a tumor-specific ABA signaling pathway. Taken together, we propose that ABA is an important signal for protection of tumors against desiccation and thus supports tumor development.

## 7 Referenzen

- Abramovitch RB, Martin GB** (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 356-364
- Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF** (1968) Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science* **159**: 1493
- Aloni R, Pradel KS, Ullrich CI** (1995) The 3-dimensional structure of vascular tissues in *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls and in the host stems of *Ricinus-communis L.* *Planta* **196**: 597-605
- Aloni R, Wolf A, Feigenbaum P, Avni A, Klee HJ** (1998) The *never ripe* mutant provides evidence that tumor-induced ethylene controls the morphogenesis of *Agrobacterium tumefaciens*-induced crown galls on tomato stems. *Plant Physiol* **117**: 841-849
- Alonso JM, Stepanova AN** (2004) The Ethylene Signaling Pathway. *Science* **306**: 1513-1515
- Alvarez ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784
- An G, Costa MA, Ha SB** (1990) Nopaline synthase promoter is wound inducible and auxin inducible. *Plant Cell* **2**: 225-233
- Anderson JP, Badruzsaufari E, Schenk PM, Manners JM, Desmond OJ, Ehlert C, Maclean DJ, Ebert PR, Kazan K** (2004) Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 3460-3479
- Baker CJ, Harmon GL, Glazener JA, Orlandi EW** (1995) A Noninvasive Technique for Monitoring Peroxidative and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Scavenging Activities during Interactions between Bacterial Plant Pathogens and Suspension Cells. *Plant Physiol* **108**: 353-359
- Bartsev AV, Deakin WJ, Boukli NM, McAlvin CB, Stacey G, Malnoe P, Broughton WJ, Staehelin C** (2004) NopL, an Effector Protein of *Rhizobium* sp. NGR234, Thwarts Activation of Plant Defense Reactions. *Plant Physiol.* **134**: 871-879
- Bayer E, Bottrill a, Walshaw j, Vigouroux m, Naldrett mj, Thomas cl, aj M** (2006) *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *PROTEOMICS* **6**: 301-311
- Beiderbeck R** (1977) Pflanzliche Tumoren. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart
- Benjamini Y, Hochberg Y** (2000) On the Adaptive Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing With Independent Statistics. *Journal of Educational and Behavioral Statistics* **25**: 60-83
- Benveniste I, Tijet N, Adas F, Philipps G, Salaün J-P, Durst F** (1998) CYP86A1 from *Arabidopsis thaliana* encodes a cytochrome P450-dependent fatty acid omega-hydroxylase. *Biochem Biophys Res Comm* **243**: 688-693
- Bernards MA, Lewis NG** (1998) The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm. *Phytochemistry* **47**: 915-933
- Bernards MA, Razem FA** (2001) The poly(phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall biopolymer. *Phytochemistry* **57**: 1115-1122
- Bernards MA, Susag LM, Bedgar DL, Anterola AM, Lewis NG** (2000) Induced phenylpropanoid metabolism during suberization and lignification: a comparative analysis. *J Plant Physiol* **157**: 601-607
- Bindschedler LV, Dewdney J, Blee KA, Stone JM, Asai T, Plotnikov J, Denoux C, Hayes T, Gerrish C, Davies DR, Ausubel FM, Paul Bolwell G** (2006) Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J* **47**: 851-863
- Bisgrove SR, Simonich MT, Smith NM, Sattler A, Innes RW** (1994) A Disease Resistance Gene in *Arabidopsis* with Specificity for Two Different Pathogen Avirulence Genes. *Plant Cell* **6**: 927-933
- Bolwell GP** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294
- Bonas U, Van den Ackerveken G** (1999) Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr Opin Microbiol* **2**: 94-98
- Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A** (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**: 889-892
- Brady SM, Sarkar SF, Bonetta D, McCourt P** (2003) The *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3)* gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in *Arabidopsis*. *Plant J* **34**: 67-75
- Brodersen P, Petersen M, Bjorn Nielsen H, Zhu S, Newman MA, Shokat KM, Rietz S, Parker J, Mundy J** (2006) *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* **47**: 532-546
- Campanella JJ, Olajide AF, Magnus V, Ludwig-Muller J** (2004) A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiol.* **135**: 2230-2240

- Capelli N, Diogon T, Greppin H, Simon P** (1997) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* **191**: 51-56
- Chae HS, Kieber JJ** (2005) Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* **10**: 291-296
- Chassot C, Nawrath C, Metraux J-P** (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *The Plant Journal* **49**: 972-980
- Chen Y-F, Etheridge N, Schaller GE** (2005) Ethylene Signal Transduction. *Ann Bot* **95**: 901-915
- Citovsky V, Kozlovsky SV, Lacroix B, Zaltsman A, Dafny-Yelin M, Vyas S, Tovkach A, Tzfira T** (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol* **9**: 9-20
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C** (1998) Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5401-5406
- Clarke JD, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM, Dong XN** (2000) Roles of salicylic acid, jasmonic acid, and ethylene in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2175-2190
- Cornish K, Zeevaert JA** (1985) Movement of Abscisic Acid into the Apoplast in Response to Water Stress in *Xanthium strumarium* L. *Plant Physiol* **78**: 623-626
- Cottle W, Kolattukudy PE** (1982) Abscisic acid stimulation of suberization : induction of enzymes and deposition of polymeric components and associated waxes in tissue cultures of potato tuber. *Plant Physiol* **70**: 775-780
- Dangl JL, Dietrich RA, Richberg MH** (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Deeken R, Engelmann JC, Efetova M, Czirjak T, Müller T, Kaiser WM, Tietz O, Kruschke M, Mueller MJ, Palme K, Dandekar T, Hedrich R** (2006) An integrated view of gene expression and solute profiles of *Arabidopsis* tumors: a genome-wide approach. *Plant Cell* **18**: 3617-3634
- Delp G, Palva ET** (1999) A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant beta-1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* **39**: 565-575
- Ditt RF, Kerr KF, de Figueiredo P, Delrow J, Comai L, Nester EW** (2006) The *Arabidopsis thaliana* transcriptome in response to *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 665-681
- Ditt RF, Nester EW, Comai L** (2001) Plant gene expression response to *Agrobacterium tumefaciens*. *PNAS* **98**: 10954-10959
- Djamei A, Pitzschke A, Nakagami H, Rajh I, Hirt H** (2007) Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**: 453-456
- Dong X** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 316-323
- Duan H, Schuler MA** (2005) Differential expression and evolution of the *Arabidopsis* CYP86A subfamily. *Plant Physiol* **137**: 1067-1081
- Emmanuelle M. Bayer ARBJWMVMJNCLTAJM** (2006) *Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology. *PROTEOMICS* **6**: 301-311
- Farmer EE, Moloshok TD, Saxton MJ, Ryan CA** (1991) Oligosaccharide signaling in plants. Specificity of oligouronide-enhanced plasma membrane protein phosphorylation. *J Biol Chem* **266**: 3140-3145
- Feys BJ, Parker JE** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**: 449-455
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM** (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* **10**: 1043-1054
- Franke R, Briesen I, Wojciechowski T, Faust A, Yephremov A, Nawrath C, Schreiber L** (2005) Apoplastic polyesters in *Arabidopsis* surface tissues - A typical suberin and a particular cutin. *Phytochemistry* **66**: 2643-2658
- Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J** (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* **29**: 959-968
- Gagne JM, Smalle J, Gingerich DJ, Walker JM, Yoo SD, Yanagisawa S, Vierstra RD** (2004) *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 6803-6808
- Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee L-Y, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A** (2004) Characterization of the *Arabidopsis* Lysine-Rich Arabinogalactan-Protein AtAGP17 Mutant (*rat1*) That Results in a Decreased Efficiency of *Agrobacterium* Transformation. *Plant Physiol*. **135**: 2162-2171
- Gaspar YM, Nam J, Schultz CJ, Lee LY, Gilson PR, Gelvin SB, Bacic A** (2004) Characterization of the *Arabidopsis* lysine-rich arabinogalactan-protein AtAGP17 mutant (*rat1*) that results in a decreased efficiency of *agrobacterium* transformation. *Plant Physiol* **135**: 2162-2171
- Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA** (2004) Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* **20**: 307-315
- Gelvin SB** (2005) Agricultural biotechnology: gene exchange by design. *Nature* **433**: 583-584
- Gelvin SB, Thomashow MF, McPherson JC, Gordon MP, Nester EW** (1982) Sizes and map positions of several plasmid-DNA-encoded transcripts in octopine-type crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 76-80

- Gentleman R, Carey Vince, Huber Wolfgang, Irizarry Rafae, Sandrine D** (2005) Bioinformatics and Computational Biology Solutions Using R and Bioconductor. Springer
- Glazebrook J** (2001) Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis--2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 301-308
- Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang H-S, Nawrath C, Metraux J-P, Zhu T, Katagiri F** (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal* **34**: 217-228
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-284
- Gosti F, Beaudoin N, Serizet C, Webb AAR, Vartanian N, Giraudat J** (1999) ABI1 protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell* **11**: 1897-1910
- Guo H, Ecker JR** (2003) Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell* **115**: 667-677
- Hamilton RH, Fall MZ** (1971) The loss of tumor-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia* **27**: 229-230
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses. *Plant Cell* **8**: 1773-1791
- Hartung W, Radin JW, Hendrix DL** (1988) Abscisic Acid Movement into the Apoplastic solution of Water-Stressed Cotton Leaves: Role of Apoplastic pH. *Plant Physiol* **86**: 908-913
- Hauck P, Thilmony R, He SY** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *PNAS* **100**: 8577-8582
- Heath MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-334
- Heck S, Grau T, Buchala A, Metraux J-P, Nawrath C** (2003) Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. tomato interaction. *The Plant Journal* **36**: 342-352
- Hood EE, Chilton WS, Chilton MD, Fraley RT** (1986) T-DNA and opine synthetic loci in tumors incited by *Agrobacterium tumefaciens* A281 on soybean and alfalfa plants. *J Bacteriol* **168**: 1283-1290
- Hose E, Clarkson DT, Steudle E, Schreiber L, Hartung W** (2001) The exodermis: a variable apoplastic barrier. *J. Exp. Bot.* **52**: 2245-2264
- Hu X, Reddy AS** (1997) Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* **34**: 949-959
- Hua J, Meyerowitz EM** (1998) Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**: 261-271
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen QG, Bleeker AB, Ecker JR, Meyerowitz EM** (1998) EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1321-1332
- Huber W, Von Heydebreck A, Sülthmann H, Poustka A, Vingron M** (2002) Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* **18**: S96-S104
- Hwang HH, Gelvin SB** (2004) Plant proteins that interact with VirB2, the *Agrobacterium tumefaciens* pilin protein, mediate plant transformation. *Plant Cell* **16**: 3148-3167
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP** (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Bio-statistics* **4**: 249-264
- Jin S, Roitsch T, Ankenbauer RG, Gordon MP, Nester EW** (1990) The VirA protein of *Agrobacterium tumefaciens* is autophosphorylated and is essential for vir gene regulation. *J Bacteriol* **172**: 525-530
- Jin SG, Prusti RK, Roitsch T, Ankenbauer RG, Nester EW** (1990) Phosphorylation of the VirG protein of *Agrobacterium tumefaciens* by the autophosphorylated VirA protein: essential role in biological activity of VirG. *J Bacteriol* **172**: 4945-4950
- Kim MG, da Cunha L, McFall AJ, Belkhadir Y, DebRoy S, Dangl JL, Mackey D** (2005) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749-759
- Kolattukudy P, Dean B** (1974) Structure, Gas Chromatographic Measurement, and Function of Suberin Synthesized by Potato Tuber Tissue Slices. *Plant Physiol.* **54**: 116-121
- Kolattukudy PE** (1981) Structure, biosynthesis and biodegradation of cutin and suberin. *Annu Rev Plant Physiol* **32**: 539-567
- Kolattukudy PE** (1984) Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can J Bot* **62**: 2918-2933
- Kombrink E, Somssich IE** (1995) Pathogenesis-related proteins and plant defense. In *Plant Relationships 6*, (Carroll, G. and Tudzynski, P., eds); Berlin: Springer-Verlag: 107-128
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector *Mol Gen Genet* **204**: 383-396
- Koornneef M, Reuling G, Karssen CM** (1984) The isolation and characterization of abscisic-acid insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiol Plant* **61**: 377-383

- Kunst L, Samuels AL, Jetter R** (2004) The plant cuticle: Formation and structure of epidermal surfaces. *Plant Lipids - Biology, Utilisation and Manipulation*: 270-302
- Kunze G, Zipfel C, Robatzek S, Niehaus K, Boller T, Felix G** (2004) The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell* **16**: 3496-3507
- Lacroix B, Li J, Tzfira T, Citovsky V** (2006) Will you let me use your nucleus? How Agrobacterium gets its T-DNA expressed in the host plant cell. *Can J Physiol Pharmacol* **84**: 333-345
- Lacroix B, Tzfira T, Vainstein A, Citovsky V** (2006) A case of promiscuity: Agrobacterium's endless hunt for new partners. *Trends Genet* **22**: 29-37
- Lamb C, Dixon RA** (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lapierre C, Pollet B, Negrel J** (1996) The phenolic domain of potato suberin: Structural comparison with lignins. *Phytochemistry* **42**: 949-953
- Lee KH, Piao HL, Kim H-Y, Choi SM, Jiang F, Hartung W, Hwang I, Kwak JM, Lee I-J, Hwang I** (2006) Activation of Glucosidase via Stress-Induced Polymerization Rapidly Increases Active Pools of Abscisic Acid. *Cell* **126**: 1109-1120
- Leung J, Merlot S, Giraudat J** (1997) The *Arabidopsis* *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE2 (ABI2)* and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* **9**: 759-771
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583-593
- Lippincott JA, Beiderbeck R, Lippincott BB** (1973) Utilization of octopine and nopaline by Agrobacterium. *J Bacteriol* **116**: 378-383
- Lizada M, Yang S** (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem.* **100**: 140-145
- Llorente F, Lopez-Cobollo RM, Catala R, Martinez-Zapater JM, Salinas J** (2002) A novel cold-inducible gene from Arabidopsis, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *The Plant Journal* **32**: 13-24
- Lorenzo O, Chico JM, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**: 1938-1950
- Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez-Serrano JJ, Solano R** (2003) ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* **15**: 165-178
- Lorenzo O, Solano R** (2005) Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 532-540
- Mahajan S, Tuteja N** (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archiv Biochem Biophys* **444**: 139-158
- Milborrow BV** (1969) Current research on abscisic acid. *Biochem J* **114**: 1P-3P
- Mistrik I, Pavlovkin J, Wächter R, Pradel KS, Schwalm K, Hartung W, Mathesius U, Stöhr C, Ullrich CI** (2000) Impact of *Agrobacterium tumefaciens*-induced stem tumors on NO<sup>3-</sup> uptake in *Ricinus communis*. *Plant Soil* **226**: 87-98
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410
- Morris RO** (1986) Genes Specifying Auxin and Cytokinin Biosynthesis in Phytopathogens. *Annual Review of Plant Physiology* **37**: 509-538
- Muhlenbock P, Plaszczyca M, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpinski S** (2007) Lysigenous Aerenchyma Formation in Arabidopsis Is Controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *Plant Cell* **19**: 3819-3830
- Mur LAJ, Kenton P, Atzorn R, Miersch O, Wasternack C** (2006) The Outcomes of Concentration-Specific Interactions between Salicylate and Jasmonate Signaling Include Synergy, Antagonism, and Oxidative Stress Leading to Cell Death. *Plant Physiol.* **140**: 249-262
- Mysore KS, Bassuner B, Deng XB, Darbinian NS, Motchoulski A, Ream W, Gelvin SB** (1998) Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration. *Mol Plant Microbe Interact* **11**: 668-683
- Nadon R, Shoemaker J** (2002) Statistical issues with microarrays: processing and analysis. *Trends Genet* **18**: 265-271
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Ann Rev Plant Biol* **56**: 165-185
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG** (2006) A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436-439
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG** (2004) The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiol.* **135**: 1113-1128
- Nawrath C** (2002) The biopolymers cutin and suberin. *The Arabidopsis Book*



- Nawrath C, Heck S, Parinthewong N, Metraux J-P** (2002) EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid-Dependent Signaling for Disease Resistance in Arabidopsis, Is a Member of the MATE Transporter Family. *Plant Cell* **14**: 275-286
- Nawrath C, Metraux J-P** (1999) Salicylic Acid Induction–Deficient Mutants of Arabidopsis Express PR-2 and PR-5 and Accumulate High Levels of Camalexin after Pathogen Inoculation. *Plant Cell* **11**: 1393-1404
- Nurnberger T, Wirtz W, Nennstiel D, Hahlbrock K, Jabs T, Zimmermann S, Scheel D** (1997) Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *J Recept Signal Transduct Res* **17**: 127-136
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE** (1963) Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* **142**: 1592-1593
- Ooms J, Leon-Kloosterziel KM, Bartels D, Koornneef M, Karssen CM** (1993) Acquisition of desiccation tolerance and longevity in seeds of *Arabidopsis thaliana* (a comparative study using abscisic acid-insensitive *abi3* mutants). *Plant Physiol* **102**: 1185-1191
- Passardi F, Penel C, Dunand C** (2004) Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science* **9**: 534-540
- Pieterse CM, van Loon LC** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci* **4**: 52-58
- Pradel KS, Rezmer C, Krausgrill S, Rausch T, Ullrich CI** (1996) Evidence for symplastic phloem unloading with concomitant high activity of acid cell wall invertase in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Botanica Acta* **109**: 397-404
- Reymond P, Farmer EE** (1998) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 404-411
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD** (2007) Pathological hormone imbalances. *Current Opinion in Plant Biology* **10**: 372-379
- Rouet MA, Mathieu Y, Barbier-Brygoo H, Lauriere C** (2006) Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and Arabidopsis cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase. *J. Exp. Bot.* **57**: 1323-1332
- Ryan CA, Huffaker A, Yamaguchi Y** (2007) New insights into innate immunity in Arabidopsis. *Cellular Microbiology* **9**: 1902-1908
- Sakai H, Hua J, Chen QG, Chang C, Medrano LJ, Bleecker AB, Meyerowitz EM** (1998) ETR2 is an ETR1-like gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5812-5817
- Sato Y, Demura T, Yamawaki K, Inoue Y, Sato S, Sugiyama M, Fukuda H** (2006) Isolation and Characterization of a Novel Peroxidase Gene ZPO-C Whose Expression and Function are Closely Associated with Lignification during Tracheary Element Differentiation. *Plant Cell Physiol.* **47**: 493-503
- Schönherr J, Ziegler H** (1980) Water permeability of *Betula* periderm. *Planta* **147**: 345-354
- Schreiber L, Franke R, Hartmann K** (2005) Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration. *Planta* **220**: 520-530
- Schreiber L, Hartmann K, Skrabs M, Zeier J** (1999) Apoplastic barriers in roots: Chemical composition of endodermal and hypodermal cell walls. *J Exp Bot* **50**: 1267-1280
- Schuler MA, Werck-Reichhart D** (2003) Functional Genomics of P450s. *Ann Rev Plant Biol* **54**: 629-667
- Schurr U, Schuberth B, Aloni R, Pradel KS, Schmudt D, Jahne B, Ullrich CI** (1996) Structural and functional evidence for xylem-mediated water transport and high transpiration in *Agrobacterium tumefaciens*-induced tumors of *Ricinus communis*. *Bot Acta* **109**: 405-411
- Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2002) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* **2**: 282-291
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61-72
- Siefritz F, Tyree MT, Lovisolo C, Schubert A, Kaldenhoff R** (2002) PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. *Plant Cell* **14**: 869-876
- Slesak I, Libik M, Karpinska B, Karpinski S, Miszalski Z** (2007) The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta Biochim Pol* **54**: 39-50
- Smith, Townsend** (1907) A plant tumor of bacterial origin. *Science* **25**: 25
- Smyth GK, Yang YH, Speed T** (2003) Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* **224**: 111-136
- Soliday CL, Dean BB, Kolattukudy PE** (1978) Suberization: Inhibition by washing and stimulation by abscisic acid in potato disks and tissue culture. *Plant Physiol* **61**: 170-174
- Somssich IE, Hahlbrock K** (1998) Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci* **3**: 86-90

- Spanier K, Schell J, Schreier PH** (1989) A functional analysis of T-DNA gene 6b: the fine tuning of cytokinin effects on shoot development. *Mol Gen Genet* **219**: 209-216
- Stenzel I, Hause B, Miersch O, Kurz T, Maucher H, Weichert H, Ziegler J, Feussner I, Wasternack C** (2003) Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *PLANT MOLECULAR BIOLOGY* **51**: 895-911
- Szyroki A, Ivashikina N, Dietrich P, Roelfsema MR, Ache P, Reintanz B, Deeken R, Godde M, Felle H, Steinmeyer R, Palme K, Hedrich R** (2001) KAT1 is not essential for stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2917-2921
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang H-S, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F** (2003) Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317-330
- Thomashow MF, Nutter R, Montoya AL, Gordon MP, Nester EW** (1980) Integration and organization of Ti plasmid sequences in crown gall tumors. *Cell* **19**: 729-739
- Thomma BP, Cammue BP, Thevisen K** (2002) Plant defensins. *Planta* **216**: 193-202
- Thomma BP, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. *Curr Opin Immunol* **13**: 63-68
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 15107-15111
- Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB** (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *The Plant Journal* **11**: 1187-1194
- Tzfira T, Citovsky V** (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **17**: 147-154
- Ullrich CI, Aloni R** (2000) Vascularization is a general requirement for growth of plant and animal tumours. *J Exp Bot* **51**: 1951-1960
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ** (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**: 135-162
- van Loon LC, van Strein EA** (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Phys. Mol. Plant. Pathol.* **55**: 85-97
- van Wees SCM, Glazebrook J** (2003) Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *The Plant Journal* **33**: 733-742
- Veena, Jiang H, Doerge RW, Gelvin SB** (2003) Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression. *Plant J* **35**: 219-236
- Verberne M, Budi Muljono A, Verpoorte R** (1999) Salicylic acid biosynthesis. In *biochemistry and molecular biology of plant hormones*. Edited by Libbenga K, Hall M, Hooykaas PJJ. London: Elsevier **33**: 295-312
- Verslues PE, Bray EA** (2006) Role of abscisic acid (ABA) and *Arabidopsis thaliana* ABA-insensitive loci in low water potential-induced ABA and proline accumulation. *J Exp Bot* **57**: 201-212
- Veselov D, Langhans M, Hartung W, Aloni R, Feussner I, Götz C, Veselova S, Schlomski S, Dickler C, Bachmann et a** (2003) Development of *Agrobacterium tumefaciens* C58-induced plant tumors and impact on host shoots are controlled by a cascade of jasmonic acid, auxin, cytokinin, ethylene and abscisic acid. *Planta* **216**: 512-522
- Vigers AJ, Roberts WK, Selitrennikoff CP** (1991) A new family of plant antifungal proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **4**: 315-323
- Vogt E, Schönherr J, Schmidt HW** (1983) Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*Solanum tuberosum L.*). *Planta* **158**: 294-301
- Wächter R, Fischer K, Gäbler R, Kühnemann F, Urban W, Bögemann GM, Voesenek L, Blom C, Ullrich CI** (1999) Ethylene production and ACC-accumulation in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumours and their impact on tumour and host stem structure and function. *Plant Cell Environ* **22**: 1263-1273
- Wächter R, Langhans M, Aloni R, Götz S, Weilmünster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U, Schwalm K, Koch KE, Ullrich CI** (2003) Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* **133**: 1024-1037
- Waspi U, Schweizer P, Dudler R** (2001) *Syringol*in reprograms wheat to undergo hypersensitive cell death in a compatible interaction with powdery mildew. *Plant Cell* **13**: 153-161
- Whetten R, Sederoff R** (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001-1013
- Wiermer M, Feys BJ, Parker JE** (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 383-389

- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**: 562-565
- Willmitzer L, Schmalenbach W, Schell J** (1981) Transcription of T-DNA in octopine and nopaline crown gall tumours is inhibited by low concentrations of alpha-amanitin. *Nucleic Acids Res* **9**: 4801-4812
- Wood DW, Setubal JC, Kaul R, Monks DE, Kitajima JP, Okura VK, Zhou Y, Chen L, Wood GE, Almeida NF, Jr., Woo L, Chen Y, Paulsen IT, Eisen JA, Karp PD, Bovee D, Sr., Chapman P, Clendenning J, Deatherage G, Gillet W, Grant C, Kuttyavin T, Levy R, Li M-J, McClelland E, Palmieri A, Raymond C, Rouse G, Saenphimmachak C, Wu Z, Romero P, Gordon D, Zhang S, Yoo H, Tao Y, Biddle P, Jung M, Krespan W, Perry M, Gordon-Kamm B, Liao L, Kim S, Hendrick C, Zhao Z-Y, Dolan M, Chumley F, Tingey SV, Tomb J-F, Gordon MP, Olson MV, Nester EW** (2001) The Genome of the Natural Genetic Engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**: 2317-2323
- Woodward AW, Bartel B** (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Ann Bot* **95**: 707-735
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu J-K** (2001) The Arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* **13**: 2063-2083
- Xu XQ, Li LP, Pan SQ** (2001) Feedback regulation of an *Agrobacterium* catalase gene *katA* involved in *Agrobacterium*-plant interaction. *Molecular Microbiology* **42**: 645-657
- Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN** (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**: 1214-1222
- Yuan Z-C, Edlind MP, Liu P, Saenkhom P, Banta LM, Wise AA, Ronzone E, Binns AN, Kerr K, Nester EW** (2007) The plant signal salicylic acid shuts down expression of the vir regulon and activates quorum-quenching genes in *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 11790-11795
- Zambryski P** (1988) Basic processes underlying *Agrobacterium*-mediated DNA transfer to plant cells. *Annu Rev Genet* **22**: 1-30
- Zambryski P, Tempe J, Schell J** (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**: 193-201
- Zeevaart JAD, Creelman RA** (1988) Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **39**: 439-473
- Zeier J, Goll A, Schreiber L, Yokoyama M, Karahara I** (1999a) Structure and chemical composition of endodermal and rhizodermal/hypodermal walls of several species. *Plant Cell Environ* **22**: 271-279
- Zeier J, Schreiber L** (1998) Comparative investigation of primary and tertiary endodermal cell walls isolated from the roots of five monocotyledonous species: Chemical composition in relation to fine structure. *Planta* **206**: 349-361
- Zeier J, Schreiber L, Ruel K, Ryser U** (1999b) Chemical analysis and immunolocalisation of lignin and suberin in endodermal and hypodermal/rhizodermal cell walls of developing maize (*Zea mays L.*) primary roots. *Planta* **209**: 1-12
- Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR** (2005) Differential responses of maize *MIP* genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot* **56**: 2971-2981
- Zimmerli L, Stein M, Lipka V, Schulze-Lefert P, Somerville S** (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis. *The Plant Journal* **40**: 633-646
- Zipfel C, Felix G** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol* **8**: 353-360
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JDG, Boller T, Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760

## 8 Anhang

**Tabelle A1: Alle differentiell exprimierten Gene 3 Stunden nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakterium, Stamm C58.** Angegeben sind die Verhältnisse der relativen Signale von infiziertem zu Referenzgewebe als Logarithmus zur Basis 2. Den Verhältnissen lagen jeweils 3 Hybridisierungen pro Probe zu Grunde. Die Tabelle beinhaltet nur die Gene mit einem signifikant differentiellen Verhältnis (P-Wert<0.01). Aufgeführt sind der Genlocus (MIPSCode), Genname, funktionelle Kategorie und das Verhältnis der Signalwerte (3h C58) mit Signifikanz (PWert). Nomenklatur der Gene erfolgte gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)".

MIPSCode und Genname	Kategorie	3h C58	PWert
At5g48900->pectate lyase family protein	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	1.097	0.009
At1g55920->serine acetyl transferase, SAT	amino acid metabolism.synthesis.serine-glycine-cysteine group.cysteine.SAT hormone metabolism.auxin.	1.466	0.004
At2g23170->auxin-responsive GH3 family protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	2.610	0.004
At4g27260->auxin-responsive GH3 family protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	1.628	0.010
At4g34770->protein small auxin up-regulated RNA	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	1.265	0.009
At3g62100-> auxin-induced protein IAA20	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.ethylene.	1.120	0.003
At4g11280->ACC synthase (AtACS-6)	synthesis-degradation	1.353	0.003
At2g15480->UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	1.285	0.003
At3g11340->UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	1.214	0.003
At2g29420->glutathione S-transferase, putative	misc.glutathione S transferases	1.420	0.008
At4g37370-> similar to Cytochrome P450 91A1	misc.cytochrome P450	1.187	0.007
At4g13180->short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR) RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	1.444	0.007
At1g22810->AP2 domain-containing transcription factor, putative	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	1.017	0.003
At5g63790->no apical meristem (NAM) family protein	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	1.076	0.006
At1g80840->WRKY family transcription factor	transcription factor family	1.144	0.004
At4g22530->embryo-abundant protein-related	RNA.regulation of transcription.unclassified	1.119	0.004
At5g02760-> protein phosphatase 2C homolog	protein.postranslational modification	1.369	0.007
At5g49480->sodium-inducible calcium-binding protein (ACP1)	signalling.calcium	1.677	0.006
At2g36950->heavy-metal-associated domain-containing protein	transport misc	1.267	0.009
nearly identical to farnesylated protein AFTP2			
At4g15550->UDP-glucose:indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase (IAGLU)	not assigned.no ontology	1.565	0.006
At4g01870->tolB protein-related	not assigned.no ontology	1.023	0.003
At1g76600->expressed protein	not assigned.unknown	1.582	0.003
At2g27830->expressed protein	not assigned.unknown	1.077	0.007
At3g15720->glycoside hydrolase family 28 protein	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	-1.263	0.009
At5g22500->w acyl CoA reductase, putative / male-sterility protein, putative	lipid metabolism.lipid degradation.beta-oxidation.acyl CoA reductase	-1.383	0.010
At2g43510->distantly related to antifungal protein, AFP10	metal handling.binding, chelation and storage	-1.091	0.003
At4g13660->isoflavone reductase-like protein isoflavone reductase-like protein	secondary metabolism.flavonoids.isoflavonoids	-1.069	0.003
At4g39950->cytochrome P450 79B2, putative (CYP79B2)	misc.cytochrome P450	-1.649	0.003
At3g48460->GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	misc.GDSL-motif lipase	-1.044	0.007
At2g02990->ribonuclease 1 (RNS1)	RNA.processing.ribonucleases	-1.859	0.004
At1g68290->bifunctional nuclease, putative	DNA.synthesis/chromatin structure	-1.184	0.003
At2g33380->calcium-binding RD20 protein (RD20)  induced	signalling.calcium	-1.291	0.009

<i>by abscisic acid during dehydration</i>			
<i>At3g45060-&gt;high-affinity nitrate transporter, putative</i>	<i>transport.nitrate</i>	-1.038	0.009
<i>At2g39030-&gt;GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT)</i>			
<i>family protein</i>	<i>not assigned.no ontology</i>	-1.081	0.006
<i>At2g39710-&gt;unknown protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.079	0.010
<i>At2g32190-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.018	0.009

**Tabelle A2: Alle differentiell exprimierten Gene 6 Tage nach Infektion mit dem onkogenen Agrobakterium, Stamm C58.** Angegeben sind die Verhältnisse der relativen Signale aus infiziertem und nicht infiziertem Gewebe als Logarithmus zur Basis 2. Den Verhältnissen liegen jeweils 3 Hybridisierungen pro Probe zu Grunde. Die Tabelle beinhaltet nur die Verhältnisse der signifikant differentiell exprimierten Gene (P-Wert<0.01). Aufgeführt sind der Genlokus (MIPSCode), Genname, funktionelle Kategorie und Verhältnis der Signalwerte (6d C58) mit Signifikanz (PWert). Nomenklatur der Gene ist gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)".

<b>MIPSCode und Genname</b>	<b>Kategorie</b>	<b>6d C58</b>	<b>PWert</b>
At1g21310->proline-rich extensin-like family protein	cell wall.cell wall proteins.LRR cell wall.degradation.	2.21	0.0003
At4g02290->glycosyl hydrolase family 9 protein	cellulases and beta -1,4-glucanases cell wall.degradation.pectate lyases	1.26	0.0006
At1g10640->polygalacturonase, putative	and polygalacturonases cell wall.degradation.pectate lyases	2.75	0.0003
At1g60590->polygalacturonase, putative	and polygalacturonases	1.99	0.0029
At5g06860->polygalacturonase inhibiting protein 1 (PGIP1)	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	2.27	0.0004
At1g48100->glycoside hydrolase family 28 protein	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	1.78	0.0003
At1g69530->expansin, putative (EXP1)	cell wall.modification	1.09	0.0024
At4g37800->xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	cell wall.modification	1.56	0.0001
At2g03090->expansin, putative (EXP15)	cell wall.modification	1.09	0.0038
At5g48070->xyloglucan:xyloglucosyl transferase, putative	cell wall.modification	1.46	0.0005
At1g26770->expansin, putative (EXP10)	cell wall.modification	2.51	0.0000
At1g53830-> identical to pectinesterase 2 (PME2/ PE 2)	cell wall.pectin*esterases	1.04	0.0029
At1g43800->acyl-(acyl-carrier-protein) desaturase, putative	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.ACP desaturase	2.82	0.0034
At2g38540->nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1)	lipid metabolism.lipid transfer proteins	1.15	0.0001
At2g38530->nonspecific lipid transfer protein 2 (LTP2)	lipid metabolism.lipid transfer proteins lipid metabolism.lipid degradation.	1.17	0.0009
At2g06925->phospholipase A2 family protein	lysophospholipases	1.33	0.0002
At1g37130->nitrate reductase 2 (NR2)	N-metabolism.nitrate metabolism.NR amino acid metabolism.synthesis.	1.18	0.0110
At5g17330->glutamate decarboxylase 1 (GAD 1)	central amino acid metabolism.GABA amino acid metabolism.synthesis.	1.55	0.0004
At4g24830->arginosuccinate synthase family	glutamate family.arginine amino acid metabolism.synthesis.	1.04	0.0000
At5g65010->asparagine synthetase 2 (ASN2)	aspartate family.asparagine amino acid metabolism.synthesis.	1.05	0.0008
At2g17630->phosphoserine aminotransferase, putative	serine-glycine-cysteine group.serine	1.26	0.0003
At3g54640->tryptophan synthase, alpha subunit (TSA1)	amino acid metabolism.synthesis. aromatic aa.tryptophan	1.34	0.0008
At2g04400->indole-3-glycerol phosphate synthase (IGPS)	amino acid metabolism.synthesis. aromatic aa.tryptophan	1.04	0.0006
At5g17990->anthranilate phosphoribosyltransferase	aromatic aa.tryptophan	1.08	0.0004
At1g24909,At5g57890,At1g24807,At1g25220, At1g25083, At1g25155->flag_XH6anthranilate synthase beta subunit, putative	amino acid metabolism.synthesis. aromatic aa.tryptophan	1.09	0.0032
At1g20270->oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	amino acid metabolism.degradation. glutamate family.proline amino acid metabolism.degradation.	1.18	0.0003
At4g34710->arginine decarboxylase 2 (SPE2)	glutamate family.arginine	1.44	0.0006
At4g21990->b 5'-adenylylsulfate reductase (APR3) / PAPS reductase homolog (PRH26)	S-assimilation.APR	1.77	0.0047
At5g60950->phytochelatin synthetase-related	metal handling	3.63	0.0000

At2g02130->distantly related to antifungal protein, AFP8	metal handling.binding, chelation and storage	1.16	0.0140
At2g26020->distantly related to antifungal protein, AFP5	metal handling.binding, chelation and storage	2.89	0.0002
At5g44420->putative antifungal protein, AFP4	metal handling.binding, chelation and storage	3.07	0.0000
At5g01210->anthranilate N-benzoyltransferase - like protein	secondary metabolism.phenylpropanoids	1.48	0.0001
At1g67980->putative S-adenosyl-L-methionine:trans-caffeoyl-Coenzyme A 3-O-methyltransferase	secondary metabolism.phenylpropanoids.lignin biosynthesis.CCoAOMT	1.18	0.0195
At1g30700->FAD-binding domain-containing protein	secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	1.28	0.0069
At1g26380->FAD-binding domain-containing protein	secondary metabolism.N misc.alkaloid-like	1.90	0.0088
At1g19440->very-long-chain fatty acid condensing enzyme, putative	secondary metabolism.wax	1.20	0.0031
At2g39980->putative anthocyanin 5-aromatic acyltransferase	secondary metabolism.flavonoids.anthocyanins	1.32	0.0003
At4g31970->Cytochrome P450-like protein flavonoid 3,5 -hydroxylase, <i>Campanula medium</i> , PATCHX:D1003951	secondary metabolism.flavonoids.dihydroflavonols	2.91	0.0015
At5g53820->ABA-inducible protein-like	hormone metabolism.abscisic acid.induced-regulated-responsive-activated	1.01	0.0017
At1g70940->auxin transport protein REH1	hormone metabolism.auxin.signal transduction	1.07	0.0072
At2g23170->auxin-responsive GH3 family protein	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	5.73	0.0000
At5g54510->auxin-responsive-like protein	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	1.39	0.0000
At4g14560->auxin-responsive protein IAA1	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	1.34	0.0017
At3g15540->early auxin-induced protein, IAA19	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	1.52	0.0063
At1g19850->transcription factor MONOPTEROS (MP) / auxin-responsive protein (IAA24) / auxin response factor 5 (ARF5)	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	1.03	0.0042
At5g20820->auxin-responsive protein-related	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	3.43	0.0001
At4g27260->auxin-responsive GH3 family protein	hormone metabolism.auxin.induced-regulated-responsive-activated	1.67	0.0086
At2g19590->1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	hormone metabolism.ethylene.synthesis-degradation	2.64	0.0007
At5g25190->ethylene-responsive element - like protein ethylene-responsive element binding protein homolog	hormone metabolism.ethylene.signal transduction	1.46	0.0001
At2g40940->ethylene response sensor (ERS)	hormone metabolism.ethylene.signal transduction	1.33	0.0007
At2g27050->ethylene-insensitive3-like1 (EIL1)	hormone metabolism.ethylene.signal transduction	1.00	0.0001
At3g23150->ethylene receptor, putative (ETR2)	hormone metabolism.ethylene.signal transduction	1.72	0.0012
At3g16050->ethylene-inducible protein similar to ethylene-inducible protein	hormone metabolism.ethylene.induced-regulated-responsive-activated	1.19	0.0006
At5g15230->gibberellin-regulated protein 4 (GASA4)	hormone metabolism.gibberelin.induced-regulated-responsive-activated	1.32	0.0010
At1g74670->GAST1-like protein	hormone metabolism.gibberelin.induced-regulated-responsive-activated	2.11	0.0000
At1g66700,At1g66690 flag_XH2 ->S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein similar to defense-related protein cjs1 [ <i>Brassica carinata</i> ]	hormone metabolism.salicylic acid.synthesis-degradation	2.88	0.0025
At2g19970-> similar to pathogenesis-related protein 1 { <i>Arabidopsis thaliana</i> }	stress.biotic	2.95	0.0000

At2g43620-> similar to basic endochitinase CHB4 precursor SP:Q06209 from ( <i>Brassica napus</i> )	stress.biotic	2.20	0.0002
At2g19990-> identical to pathogenesis-related protein 1 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	stress.biotic	2.26	0.0000
At1g18250->thaumatin, putative	stress.biotic	1.08	0.0001
At1g75040->pathogenesis-related protein 5 (PR-5)	stress.biotic	2.06	0.0003
At3g12500->basic endochitinase	stress.biotic	2.23	0.0082
At2g43610->glycoside hydrolase family 19 protein	stress.biotic	6.02	0.0000
At2g43570-> similar to chitinase class IV	stress.biotic	3.04	0.0001
At5g47550->cysteine protease inhibitor, putative	stress.biotic	3.44	0.0000
At3g28930->avrRpt2-induced AIG2 protein (AIG2)	stress.biotic	1.03	0.0001
At4g37910->heat shock protein 70, mitochondrial, putative	stress.abiotic.heat	1.04	0.0000
At2g33210->mitochondrial chaperonin (HSP60)	stress.abiotic.heat	1.29	0.0001
At3g23990->mitochondrial chaperonin hsp60	stress.abiotic.heat	1.45	0.0000
At5g56030->heat shock protein 81-2 (HSP81-2)	stress.abiotic.heat	1.01	0.0017
At4g10270->wound-responsive family protein	stress.abiotic.touch/wounding	1.07	0.0091
At3g26450->major latex protein-related	stress.abiotic.unspecified	1.30	0.0072
At1g77510->protein disulfide isomerase, putative	redox.thioredoxin	1.05	0.0001
At2g16060->non-symbiotic hemoglobin 1 (HB1) (GLB1)	redox.heme	2.41	0.0024
At2g35040->purH-AICAR transformylase+IMPcyclohydrolase	nucleotide metabolism.synthesis.purine. AICAR transformylase and IMP synthase	1.22	0.0001
At5g09650->inorganic pyrophosphatase family protein	nucleotide metabolism.phosphotransfer and pyrophosphatases.misc	1.03	0.0001
At3g27060->ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	nucleotide metabolism.deoxynucleotide metabolism	1.21	0.0003
At3g46940->deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase family	nucleotide metabolism.deoxynucleotide metabolism	1.45	0.0000
At2g21790->ribonucleoside-diphosphate reductase small chain, putative	nucleotide metabolism.deoxynucleotide metabolism	1.19	0.0001
At1g71380->glycosyl hydrolase family 9 protein	misc.gluco-, galacto- and mannosidases	1.91	0.0009
At4g16260->glycosyl hydrolase family 17 protein	misc.beta 1,3 glucan hydrolases	1.53	0.0039
At1g02920,At1g02930 flag_XH2 ->glutathione S-transferase, putative	misc.glutathione S transferases	1.64	0.0009
At2g02930,At4g02520 flag_XH2 ->glutathione S-transferase, putative	misc.glutathione S transferases	2.68	0.0029
At2g29460->glutathione S-transferase, putative	misc.glutathione S transferases	1.94	0.0013
At2g29420->glutathione S-transferase, putative	misc.glutathione S transferases	1.17	0.0001
At2g30770->cytochrome P450 71A13, putative (CYP71A13)	misc.cytochrome P450	5.84	0.0000
At4g39950->cytochrome P450 79B2, putative (CYP79B2)	misc.cytochrome P450	2.94	0.0016
At5g36220->cytochrome P450 81D1 (CYP81D1) (CYP91A1)	misc.cytochrome P450	1.56	0.0040
At1g22440->alcohol dehydrogenase, putative	misc.alcohol dehydrogenases	1.24	0.0000
At4g08770->peroxidase, putative  identical to class III peroxidase ATP38 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	misc.peroxidases	3.08	0.0012
At2g37130->peroxidase 21 (PER21) (P21) (PRXR5)	misc.peroxidases	1.57	0.0024
At5g64120->peroxidase, putative	misc.peroxidases	2.28	0.0001
At4g08780->peroxidase, putative	misc.peroxidases	4.16	0.0015
At4g14930->acid phosphatase survival protein SurE, putative	misc.acid and other phosphatases	1.72	0.0001
At1g78860,At1g78850 flag_XH2 ->curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	misc.myrosinases-lectin-jacalin	3.62	0.0000



At5g18470->curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	misc.myrosinases-lectin-jacalin	1.73	0.0004
At1g61360->S-locus lectin protein kinase family protein	misc.myrosinases-lectin-jacalin	1.67	0.0026
At5g48485->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	1.80	0.0008
At4g12470->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	1.85	0.0000
At4g12480->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.17	0.0001
At3g22120->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.39	0.0006
At1g62500->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	3.35	0.0006
At1g12090->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.73	0.0003
At4g12500->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	1.09	0.0068
At5g55450->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	2.66	0.0005
At5g48490->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	1.43	0.0071
At4g13180->short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	misc.short chain dehydrogenase/reductase (SDR)	1.87	0.0004
At4g25630->fibrillarlin 2 (FIB2)	RNA.processing	1.87	0.0000
At2g18740->small nuclear ribonucleoprotein E, putative / snRNP-E, putative	RNA.processing	1.04	0.0018
At4g28450->transducin family protein / WD-40 repeat family protein SOF1 (involved in rRNA processing) protein-yeast	RNA.processing	1.05	0.0001
At1g14210->ribonuclease T2 family protein	RNA.processing.ribonucleases	1.14	0.0008
At5g61000->RNA helicase	RNA.processing.RNA helicase	1.33	0.0005
At2g29540->DNA-directed RNA polymerase I(A) and III(C) 14 kDa subunit (RPAC14)	RNA.transcription	1.04	0.0008
At3g25730->AP2 domain transcription factor contains Pfam profile: PF00847; similar to RAV1 (DNA-binding protein) GB:BAA34250 [Arabidopsis thaliana]	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	1.62	0.0008
At5g65640->basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	RNA.regulation of transcription.bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	1.72	0.0006
At5g15160->bHLH family protein	RNA.regulation of transcription.bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	2.43	0.0015
At1g10585->expressed protein	RNA.regulation of transcription.bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	2.49	0.0007
At3g02790->zinc finger (C2H2 type) family protein	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	1.34	0.0005
At5g47370->homeobox-leucine zipper protein 2 (HAT2)	RNA.regulation of transcription.HB, Homeobox transcription factor family	1.23	0.0115
At3g27220->kelch repeat-containing protein	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	1.13	0.0021
At5g63790->no apical meristem (NAM) family protein	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	1.22	0.0045
At5g03680->trihelix DNA-binding protein, putative  similar to DNA-binding protein DF1 (Pisum sativum) GI:13646986	RNA.regulation of transcription.Trihelix, Triple-Helix transcription factor family	1.02	0.0011
At2g47260->putative WRKY-type DNA binding protein	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	1.91	0.0001
At5g49160->DNA (cytosine-5-)-methyltransferase (ATHIM)	RNA.regulation of transcription.DNA methyltransferases	1.30	0.0005
At5g22650->expressed protein non-consensus AT donor splice site at exon 3, AC acceptor splice site at exon 4;	RNA.regulation of transcription.HDA	1.00	0.0000

At3g44750->putative histone deacetylase	RNA.regulation of transcription.HDA	1.70	0.0000
At2g27840->histone deacetylase-related	RNA.regulation of transcription.HDA	1.62	0.0000
At4g23800->high mobility group (HMG1/2) family protein	RNA.regulation of transcription.Nucleosome/ chromatin assembly factor group	1.10	0.0002
At1g56110->SAR DNA binding protein, putative	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	1.12	0.0011
At1g07370->proliferating cell nuclear antigen 1 (PCNA1)	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	1.40	0.0001
At2g29570->proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA2)	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	1.13	0.0007
At3g05060->putative SAR DNA-binding protein-1	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	1.02	0.0007
At4g25730->FtsJ-like methyltransferase family protein	RNA.regulation of transcription.putative DNA-binding protein	1.17	0.0001
At1g80270->DNA-binding protein, putative	RNA.regulation of transcription.putative DNA-binding protein	1.61	0.0002
At1g48630->guanine nucleotide-binding family protein / activated protein kinase C receptor, putative / RACK, putative	RNA.regulation of transcription.unclassified	1.18	0.0000
At4g30410->expressed protein similar to cDNA bHLH transcription factor (bHLH eta gene) gi:32563007	RNA.regulation of transcription.unclassified	1.40	0.0002
At1g09750->chloroplast nucleoid DNA-binding protein-related	RNA.regulation of transcription.unclassified	2.03	0.0015
At3g23830->glycine-rich RNA-binding protein, putative	RNA.RNA binding	1.39	0.0001
At3g18600->DEAD/DEAH box helicase, putative	DNA.synthesis/chromatin structure	1.06	0.0001
At5g46280->MCM3 homolog (emb CAA03887.1)	DNA.synthesis/chromatin structure	1.51	0.0003
At2g37470->putative histone H2B	DNA.synthesis/chromatin structure	1.04	0.0040
At5g55920->nucleolar protein, putative	DNA.synthesis/chromatin structure	1.34	0.0009
At5g41880->DNA polymerase alpha subunit IV (primase)-like protein	DNA.synthesis/chromatin structure	1.53	0.0000
At2g16440->putative CDC21 protein	DNA.synthesis/chromatin structure	1.02	0.0012
At5g59870->histone H2A - like protein histone H2A	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.30	0.0001
At1g54690->histone H2A, putative	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.27	0.0008
At5g65360->histone H3	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.05	0.0000
At1g09200->histone H3	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.20	0.0003
At5g10390->histone H3	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.35	0.0000
At3g54560->histone H2A	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.19	0.0000
At5g22880->histone H2B like protein	DNA.synthesis/chromatin structure. histone	1.31	0.0003
At3g46320,At3g45930 flag_XH2 ->histone H4	histone	1.32	0.0023
At3g51670->SEC14 cytosolic factor family protein /	DNA.unspecified	1.05	0.0019
At3g19130->nuclear acid binding protein, putative	DNA.unspecified	1.08	0.0001
At3g13610->unknown protein contains similarity to DNA-binding protein zyxin	DNA.unspecified	5.02	0.0001
At3g23890-> identical to topoisomerase II GB:L21015 [Arabidopsis thaliana]	DNA.unspecified	1.09	0.0002
At1g64880->hypothetical protein contains similarity	protein.synthesis.chloroplast/	1.04	0.0001

to 30S ribosomal protein S5 GI:6969105 from [Campylobacter jejuni]	mito - plastid ribosomal protein.unknown		
At3g49080->30S ribosomal protein S9 -like similar to 30S ribosomal proteins	protein.synthesis.chloroplast/ mito - plastid ribosomal protein.unknown	1.11	0.0002
At3g08520,At2g40205,At3g11120,At3g56020-> flag_XH4 60S ribosomal protein L41 (RPL41D)	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.33	0.0032
At2g39390->60S ribosomal protein L35	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.11	0.0013
At3g55280->ribosomal L23a - like protein various ribosomal L23a proteins	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.01	0.0001
At2g32060->40S ribosomal protein S12 ;supported by full-length cDNA	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.05	0.0000
At3g28900->60S ribosomal protein L34, putative similar to 60S ribosomal protein L34	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.03	0.0003
At5g22440->60S ribosomal protein L10A	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.15	0.0003
At3g44590->acidic ribosomal protein P2 -like	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.40	0.0003
At3g10610->putative 40S ribosomal protein S17.	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.13	0.0001
At2g20450->60S ribosomal protein L14	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.29	0.0001
At4g15770->60S ribosome subunit biogenesis protein, putative	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.03	0.0017
At3g16780->putative ribosomal protein similar to ribosomal protein L19	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.43	0.0000
At3g57490->40S ribosomal protein S2	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.09	0.0001
At4g30800->ribosomal protein S11 - like	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.85	0.0001
At1g26910->putative 60s ribosomal protein L10	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.03	0.0001
At3g22300->putative 40S ribosomal protein S10	protein.synthesis.misc ribososomal protein	1.14	0.0001
At1g52930->brix domain-containing protein	BRIX	1.55	0.0000
At2g24050->putative eukaryotic initiation factor 4, eIF4	protein.synthesis.initiation	1.05	0.0006
At4g02930->mitochondrial elongation factor Tu	protein.synthesis.elongation	1.04	0.0000
At5g08180->nhp2-like protein high mobility group-like nuclear protein 2 (nhp2)	protein.synthesis.misc	1.07	0.0005
At5g64670->putative protein similar to unknown protein	protein.synthesis.misc	1.01	0.0002
At1g02690->importin alpha, putative	protein.targeting.nucleus	1.05	0.0005
At1g61570->mitochondrial import inner membrane translocase (TIM13)	protein.targeting.mitochondria	1.01	0.0003
At3g18130->protein kinase C-receptor/G-protein, putative	protein.postranslational modification	1.22	0.0001
At1g53070->protein kinase, putative similar to many predicted protein kinases	protein.postranslational modification	1.34	0.0003
At2g44830->putative protein kinase contains a protein kinase domain profile (PDOC00100)	protein.postranslational modification	1.20	0.0006
At2g38860->protease1 (pfpl)-like protein (YLS5)	protein.degradation	1.35	0.0005
At4g30020->subtilase family protein	protein.degradation.subtilases	1.16	0.0000
At5g17760->AAA-type ATPase family protein	protein.degradation.AAA type	1.29	0.0010
At1g50490->E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative	protein.degradation.ubiquitin.E2	1.09	0.0006
At5g25350->F-box family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	2.04	0.0020
At1g78100->F-box family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF.FBOX	1.61	0.0002
At1g14980->chaperonin CPN10	protein.folding	1.08	0.0000
At3g13470->chaperonin 60 beta, putative	protein.folding	1.77	0.0000
At3g13860-> similar to CHAPERONIN CPN60-2, MITOCHONDRIAL PRECURSOR GB:Q05046 from [Cucurbita maxima]	protein.folding	1.02	0.0006
At4g25340->immunophilin-related / FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-related	protein.folding	1.03	0.0011
At2g19190->light-responsive receptor protein kinase / senescence-responsive receptor-like serine/threonine kinase, putative (SIRK)	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat I	2.47	0.0003

At2g41820->leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat X	1.49	0.0001
At1g09970->leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	1.10	0.0002
At4g28490->leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, putative	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat XI	1.11	0.0001
At4g36180->leucine-rich repeat family protein	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat VII	1.34	0.0000
At4g17615->calcineurin B-like protein 1 (CBL1)	signalling.calcium	1.39	0.0001
At1g18370->kinesin motor family protein (NACK1)	cell.organisation	1.43	0.0001
At1g20930->cell division control protein, putative	cell.division	1.03	0.0003
At3g56070->peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	cell.cycle	1.04	0.0002
At3g11520->cyclin, putative (CYC2)	cell.cycle	1.33	0.0001
At5g66170->senescence-associated family protein	development.unspecified	1.07	0.0035
At3g29970->germination protein-related	development.unspecified	4.75	0.0017
At5g44730->haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	development.unspecified	1.17	0.0014
At1g59740->proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transport.peptides and oligopeptides	2.42	0.0030
At5g13490->ADP, ATP carrier protein 2, mitochondrial	transport.unspecified cations	1.11	0.0005
At2g39010->PIP2.6; putative aquaporin (water channel protein)	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	2.22	0.0001
At3g04720->hevein-like protein (HEL)	not assigned.no ontology	1.55	0.0029
At5g22460->esterase/lipase/thioesterase family protein	not assigned.no ontology	1.93	0.0000
At5g40770->prohibitin	not assigned.no ontology	1.04	0.0000
At3g09260->glycosyl hydrolase family 1 protein	not assigned.no ontology	5.80	0.0000
At2g39030->GCN5-related N-acetyltransferase (GNAT) family protein	not assigned.no ontology	1.26	0.0011
At3g20370->mepirin and TRAF homology domain-containing protein	not assigned.no ontology	2.86	0.0001
At3g23940->dehydratase family	not assigned.no ontology	1.10	0.0002
At5g24320->WD-40 repeat family protein	not assigned.no ontology	1.45	0.0006
At3g27280->prohibitin, putative	not assigned.no ontology	1.21	0.0004
At5g02050->mitochondrial glycoprotein family protein / MAM33 family protein	not assigned.no ontology	1.49	0.0000
At3g60260->phagocytosis and cell motility protein ELMO1-related	not assigned.no ontology	1.08	0.0009
At4g01870->tolB protein-related	not assigned.no ontology	1.82	0.0002
At5g19750->peroxisomal membrane 22 kDa family protein	not assigned.no ontology	1.02	0.0001
At5g45700->NLI interacting factor (NIF) family protein	not assigned.no ontology	1.49	0.0017
At5g26280->mepirin and TRAF homology domain-containing protein	not assigned.no ontology	2.00	0.0005
At3g02120->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology. hydroxyproline rich proteins not assigned.no ontology.	1.21	0.0001
At1g02110->proline-rich family protein	proline rich family not assigned.no ontology.	1.04	0.0011
At1g61870->pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein not assigned.no ontology.	1.02	0.0014
At5g60960->pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein not assigned.no ontology.	1.05	0.0005
At3g13160->pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1.11	0.0001

	<i>not assigned.no ontology.</i>		
At3g02650->pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	1.30	0.0014
At3g08030->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.06	0.0003
At1g12080->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	2.10	0.0000
At1g19530->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	2.20	0.0018
At2g44080->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	2.21	0.0029
At1g49660->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.15	0.0002
At4g33560->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	3.31	0.0004
At5g13140->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.80	0.0004
At3g59900->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	5.16	0.0002
At3g52040->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.24	0.0001
At5g54970->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.87	0.0001
At1g10990->expressed protein and genscan At4g18630->expressed protein contains Pfam profile: PF05097 protein of unknown function (DUF688)	<i>not assigned.unknown</i>	1.26	0.0044
At4g15830->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.20	0.0002
At1g49410->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.17	0.0004
At5g65880->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.05	0.0011
At4g29520->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.09	0.0003
At1g08580->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.42	0.0005
At5g19260->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.19	0.0002
At5g10040->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	2.37	0.0003
At3g47510->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	3.82	0.0015
At5g17160->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.51	0.0001
At4g02800->expressed protein similar to A. thaliana hypothetical protein T6B20.12 (1946366)	<i>not assigned.unknown</i>	1.35	0.0002
At5g05180->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.57	0.0001
At1g64405->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.04	0.0000
At3g12870->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.34	0.0001
At1g65900->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.78	0.0007
At5g10010->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.49	0.0003
At1g48330->expressed protein similar to hypothetical protein GI:9294146 from (Arabidopsis thaliana)	<i>not assigned.unknown</i>	1.14	0.0001
At4g28310->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.02	0.0019
At1g13670->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.75	0.0001
At1g30515->expressed protein	<i>not assigned.unknown</i>	1.38	0.0123
At4g35730->protein mRNA for KIAA0174 gene, Homo sapiens, PID:g1136408	<i>not assigned.unknown</i>	3.59	0.0000
A3g16240-> PBP1, PYK10-binding protein	<i>not assigned.disagreeing hits</i>	1.07	0.0001
At1g79530,At1g16300 flag_XH2 ->j glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase, cytosolic, putative	glycolysis.glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	2.03	0.0001
At4g33070->pyruvate decarboxylase, putative	fermentation.PDC	1.01	0.0012
At3g24503->y aldehyde dehydrogenase (ALDH1a)	fermentation.aldehyde dehydrogenase	1.26	0.0074
At5g41670->p 6-phosphogluconate dehydrogenase family protein	OPP.oxidative PP.6-phosphogluconate dehydrogenase	1.74	0.0001
At5g61310->cytochrome c oxidase subunit - like	mitochondrial electron transport / ATP synthesis.cytochrome c oxidase	1.03	0.0004
At2g13360->serine-glyoxylate aminotransferase- related	PS.aminotransferases peroxisomal	1.03	0.0000
At2g24270->d NADP-dependent glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, putative	PS.calvin cyle.GAP	-1.78	0.0000
At1g12780->a UGE1 UDP-glucose 4-epimerase / UDP-galactose 4-epimerase	cell wall.precursor synthesis.UGE	-1.00	0.0002
At4g30270->MERI-5 protein (MERI-5) (MERI5B) / endo-xyloglucan transferase / xyloglucan endo-1,4- beta-D-glucanase (SEN4)	cell wall.degradation.mannan-xylose- arabinose-fucose	-0.99	0.0001
		-1.39	0.0001

At1g02640->glycosyl hydrolase family 3 protein	cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	-1.00	0.0003
At3g52840->beta-galactosidase, putative	cell wall.degradation.mannan-xylose-arabinose-fucose	-1.83	0.0006
At1g80170->polygalacturonase, putative / pectinase, putative  similar to polygalacturonase GI:7381227 from ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ); contains Pfam profile PF00295: Glycosyl hydrolases family 28 (polygalacturonases)	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	-1.32	0.0004
At3g07970->polygalacturonase, putative / pectinase, putative  similar to polygalacturonase precursor ( <i>Cucumis melo</i> ) GI:3320462; contains PF00295: Glycosyl hydrolases family 28 (polygalacturonases); contains non-consensus AA donor splice site at exon 2	cell wall.degradation.pectate lyases and polygalacturonases	-1.52	0.0006
At5g57560->xyloglucan:xyloglucosyl transferase / xyloglucan endotransglycosylase / endo-xyloglucan transferase (TCH4)  identical to xyloglucan endotransglycosylase TCH4 protein GI:886116	cell wall.modification	-2.56	0.0025
At3g45970->expansin family protein (EXPL1)  similar to cim1 induced allergen, <i>Glycine max</i> , EMBL:U03860; expansin-like gene, PMID:11641069, <a href="http://www.bio.psu.edu/expansins">www.bio.psu.edu/expansins</a>	cell wall.modification	-1.76	0.0025
At4g19420->b pectinacetyl esterase family protein contains Pfam profile: PF03283 pectinacetyl esterase	cell wall.pectin*esterases.acetyl esterase	-1.02	0.0001
At2g45220->pectin esterase family protein contains Pfam profile: PF01095 pectin esterase	cell wall.pectin*esterases.misc	-1.12	0.0018
At1g49430->h long-chain-fatty-acid--CoA ligase / long-chain acyl-CoA synthetase  nearly identical to acyl CoA synthetase (MF45P) GI:1617268 from ( <i>Brassica napus</i> )	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.long chain fatty acid CoA ligase	-1.31	0.0015
At1g01120->j fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase 1 (KCS1)  nearly identical to GB:AAC99312 GI:4091810 from ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	lipid metabolism.FA synthesis and FA elongation.beta ketoacyl CoA synthase	-1.37	0.0002
At2g41540->NAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase family protein	lipid metabolism.glycerol metabolism	-1.48	0.0001
At4g14440->x enoyl-CoA hydratase/isomerase family protein low similarity to PhaB ( <i>Pseudomonas putida</i> ) GI:3253198, SP	lipid metabolism.lipid degradation.beta-oxidation.enoyl CoA hydratase	-1.22	0.0012
At5g16570->glutamine synthetase, putative	N-metabolism.ammonia metabolism.glutamine synthase	-1.22	0.0011
At2g38400->alanine--glyoxylate aminotransferase, putative	amino acid metabolism.synthesis.central amino acid metabolism.alanine	-1.12	0.0047
At3g19710-> branched-chain amino acid transaminase, putative (BCAT4)	amino acid metabolism.synthesis.branched chain group.common	-1.63	0.0019
At1g10070-> branched-chain amino acid transaminase 2 (BCAT2)	amino acid metabolism.synthesis.branched chain group.common	-1.14	0.0008
At5g23010->2-isopropylmalate synthase 3 (IMS3)	amino acid metabolism.synthesis.branched chain group.leucine specific	-2.02	0.0011
At3g30775->proline oxidase, mitochondrial / osmotic stress-responsive proline dehydrogenase (POX) (PRO1) (ERD5)	amino acid metabolism.degradation.glutamate family.proline	-1.89	0.0008
At4g33150->lysine-ketoglutarate reductase	amino acid metabolism.degradation.aspartate family.lysine	-1.24	0.0004
At2g20340->tyrosine decarboxylase -related	amino acid metabolism.degradation.aromatic aa.tyrosine	-1.37	0.0001
At5g67520-> similar to adenylylsulfate kinase, chloroplast precursor (APS kinase, Adenosine-5-phosphosulfate kinase, ATP adenosine-5-phosphosulfate 3'-phosphotransferase)	S-assimilation.AKN	-1.08	0.0020
At5g49730, At5g49740 flag_XH2 ->ferric chelate reductase, putative, FRO7	metal handling.acquisition	-1.44	0.0001
At1g07610->metallothionein 1c, AtMT1c	metal handling.binding, chelation	-1.40	0.0033

	and storage		
At2g30210->putative laccase	secondary metabolism.simple phenols	-1.97	0.0001
At2g40370->putative laccase (diphenol oxidase)	secondary metabolism.simple phenols	-1.32	0.0002
At3g10340->putative phenylalanine ammonia-lyase	secondary metabolism.phenylpropanoids. lignin biosynthesis.PAL	-1.03	0.0012
At3g21230->putative 4-coumarate:CoA ligase 2	secondary metabolism.phenylpropanoids. lignin biosynthesis.4CL	-1.14	0.0000
At1g80820->cinnamoyl CoA reductase, putative	secondary metabolism.phenylpropanoids. lignin biosynthesis.CCR1	-1.40	0.0030
At1g62570->flavin-containing monooxygenase, putative	secondary metabolism.sulfur-containing.glucosinolates	-1.11	0.0002
At5g57800->CER1 protein, putative (WAX2)	secondary metabolism.wax	-0.98	0.0011
At5g63590->flavonol synthase	secondary metabolism.flavonoids.flavonols hormone metabolism.abscisic acid.	-1.73	0.0001
At5g13200->ABA-responsive protein - like	induced-regulated-responsive-activated	-1.31	0.0002
At3g15450->expressed protein similar to auxin down-regulated protein ARG10 ( <i>Vigna radiata</i> )	hormone metabolism.auxin. induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	-1.51	0.0000
At4g00880-> similar to auxin-induced protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	-0.99	0.0014
At1g16510->auxin-induced protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.auxin.	-1.07	0.0092
At1g56150->auxin-responsive family protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.brassinosteroid.	-1.30	0.0008
At4g37760->squalene epoxidase - like protein	synthesis-degradation	-1.08	0.0063
At2g25450->2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative	hormone metabolism.ethylene. synthesis-degradation	-1.33	0.0006
At1g04350->1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase - putative	hormone metabolism.ethylene. synthesis-degradation	-0.99	0.0025
At5g61590-> ethylene responsive element binding factor 5	hormone metabolism.ethylene. signal transduction	-2.51	0.0006
At5g61600-> DNA binding protein EREBP-4	hormone metabolism.ethylene. signal transduction	-2.37	0.0018
At5g07580->transcription factor-like protein ethylene responsive element binding factor 5	hormone metabolism.ethylene. signal transduction	-1.59	0.0004
At3g62550->ER6 protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.jasmonate.	-1.94	0.0000
At1g55020->1 lipoxygenase, putative	synthesis-degradation major CHO metabolism.degradation.	-1.98	0.0000
At4g17090->Beta-amylase 3, BAM3	starch.starch cleavage major CHO metabolism.degradation.	-1.46	0.0001
At3g23920->Beta-amylase 1, BAM1	starch.starch cleavage	-1.23	0.0006
At1g78780->pathogenesis-related family protein	stress.biotic	-1.28	0.0004
At2g21100->disease resistance-responsive protein	stress.biotic	-2.13	0.0000
At4g19810->glycosyl hydrolase family 18 protein	stress.biotic	-1.39	0.0057
At4g36040->DnaJ-like protein	stress.abiotic.heat	-1.90	0.0004
At1g80920-> similar to DnaJ homologue J8	stress.abiotic.heat	-1.75	0.0001
At2g42530->cold-responsive protein / cold-regulated protein ( <i>cor15b</i> )	stress.abiotic.cold	-2.60	0.0009
At2g42540->cold-responsive protein / cold-regulated protein ( <i>cor15a</i> )	stress.abiotic.cold	-1.57	0.0001
At4g25480->DRE-binding protein (DREB1A) / CRT/DRE-binding factor 3 (CBF3)	stress.abiotic.drought/salt	-1.73	0.0001
At5g05410->DRE-binding protein (DREB2A)	stress.abiotic.drought/salt	-1.51	0.0002
At1g19660,At1g75380 <i>flag_XH2</i> ->wound-responsive family protein	stress.abiotic.touch/wounding	-1.09	0.0003
At3g50970->dehydrin xero2 (XERO2) / low-temperature-induced protein LTI30 (LTI30)	stress.abiotic.unspecified	-1.33	0.0003
At1g08570->thioredoxin family protein	redox.thioredoxin	-1.22	0.0006

At5g11930->glutaredoxin family protein	redox.glutaredoxins	-1.34	0.0063
At1g80050->aprt-adenine phosphoribosyltransferase 2	nucleotide metabolism.salvage. phosphoribosyltransferases.aprt	-1.46	0.0023
At2g31790->UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	misc.UDP glucosyl and glucuronyl transferases	-1.07	0.0077
At1g61820->glycosyl hydrolase family 1	misc.gluco-, galacto- and mannosidases	-2.12	0.0000
At2g27500->glycosyl hydrolase family 17 protein	misc.beta 1,3 glucan hydrolases	-1.10	0.0003
At4g12290,At4g12280 flag_XH2 ->copper amine oxidase, putative	misc.oxidases - copper, flavone etc.	-1.06	0.0009
At1g12200->flavin-containing monooxygenase family protein / FMO family protein	misc.oxidases - copper, flavone etc.	-1.13	0.0032
At4g13770->cytochrome P450 family protein	misc.cytochrome P450	-1.33	0.0030
At5g58860->cytochrome P450 86A1 (CYP86A1)	misc.cytochrome P450	-2.31	0.0001
At1g13080->cytochrome P450 family protein	misc.cytochrome P450	-1.76	0.0002
At3g03470->cytochrome P450, putative	misc.cytochrome P450	-1.16	0.0004
At1g68850-> identical to peroxidase ATP23a	misc.peroxidases	-2.08	0.0001
At3g61060->F-box family protein / lectin-related	misc.myrosinases-lectin-jacalin	-2.09	0.0001
At1g22480->plastocyanin-like domain-containing protein	misc.plastocyanin-like	-1.13	0.0008
At2g02850->plastocyanin-like domain-containing protein	misc.plastocyanin-like	-1.58	0.0047
At3g22600->protease inhibitor/seed storage /lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage /lipid transfer protein (LTP) family protein	-1.88	0.0005
At3g22620->protease inhibitor/seed storage /lipid transfer protein (LTP) family protein similar to pEARL1 1	misc.protease inhibitor/seed storage /lipid transfer protein (LTP) family protein	-2.03	0.0004
At2g18370->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	-2.24	0.0001
At2g48140->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein similar to pEARL1 1	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	-2.49	0.0000
At3g58550->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	-2.27	0.0004
At2g48130->protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	misc.protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	-2.14	0.0001
At2g23540->GDSL-motif lipase/hydrolase family protein similar to family II lipase EXL1	misc.GDSL-motif lipase	-1.65	0.0001
At5g37690->GDSL-motif lipase/hydrolase family protein similar to family II lipase EXL3	misc.GDSL-motif lipase	-1.94	0.0000
At1g74460->GDSL-motif lipase/hydrolase family protein similar to family II lipases EXL3	misc.GDSL-motif lipase	-1.79	0.0001
At3g50400->GDSL-motif lipase/hydrolase family protein similar to family II lipase EXL3	misc.GDSL-motif lipase	-2.42	0.0007
At1g13260->DNA-binding protein RAV1	RNA.regulation of transcription.AP2/EREBP, APETALA2/Ethylene-responsive element binding protein family	-1.25	0.0003
At4g25470->DRE-binding protein (DREB1C) / CRT/DRE-binding factor 2 (CBF2)	RNA.regulation of transcription.bHLH, element binding protein family	-1.30	0.0142
At1g61660->basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	RNA.regulation of transcription.bHLH, Basic Helix-Loop-Helix family	-1.26	0.0006
At5g57660->zinc finger (B-box type) family protein	RNA.regulation of transcription. C2C2(Zn) CO-like, Constans-like zinc finger family	-2.05	0.0000
At2g28200->zinc finger (C2H2 type) family protein	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-2.16	0.0000



At1g27730->zinc finger (C2H2 type) family protein (ZAT10) / salt-tolerance zinc finger protein (STZ)	RNA.regulation of transcription.C2H2 zinc finger family	-1.57	0.0054
At4g29190->zinc finger (CCCH-type) family protein	RNA.regulation of transcription.C3H zinc finger family	-1.35	0.0014
At2g19810->zinc finger (CCCH-type) family protein Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)	RNA.regulation of transcription.C3H zinc finger family	-1.55	0.0028
At2g25900->zinc finger (CCCH-type) family protein Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type (and similar)	RNA.regulation of transcription.C3H zinc finger family	-1.60	0.0005
At1g50600->scarecrow-like transcription factor 5 (SCL5)	RNA.regulation of transcription.GRAS transcription factor family	-1.03	0.0003
At2g35940->homeodomain-containing protein	RNA.regulation of transcription.HB,Homeobox transcription factor family	-0.98	0.0002
At4g37260->myb family transcription factor (MYB73)	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1.49	0.0005
At1g17950->myb family transcription factor (MYB52)	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1.00	0.0005
At5g59780->myb family transcription factor (MYB59)	RNA.regulation of transcription.MYB domain transcription factor family	-1.67	0.0014
At1g74840->myb family transcription factor	RNA.regulation of transcription.MYB-related transcription factor family	-1.62	0.0002
At1g28470->no apical meristem (NAM) family protein	RNA.regulation of transcription.NAC domain transcription factor family	-1.02	0.0006
At3g56400->DNA-binding protein-like DNA-binding protein 4 WRKY4	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.47	0.0001
At4g31800->WRKY family transcription factor	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.04	0.0009
At5g46350->putative protein contains similarity to WRKY	RNA.regulation of transcription.WRKY domain transcription factor family	-1.12	0.0014
At5g49450->bZIP family transcription factor	RNA.regulation of transcription.bZIP transcription factor family	-2.19	0.0002
At5g24470->pseudo-response regulator 5 (APRR5)	RNA.regulation of transcription.Pseudo ARR transcription factor family	-1.10	0.0002
At3g61260->putative DNA-binding protein DNA-binding protein (dbp)	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	-1.03	0.0000
At3g57540->putative protein DNA binding protein	RNA.regulation of transcription.putative transcription regulator	-1.09	0.0004
At5g23750->remorin family protein	RNA.regulation of transcription.unclassified	-0.98	0.0015
At5g50450->zinc finger (MYND type) family protein	RNA.regulation of transcription.unclassified	-2.25	0.0000
At5g07460->peptide methionine sulfoxide reductase-like protein	DNA.synthesis/chromatin structure	-0.98	0.0004
At1g49450->transducin family protein / WD-40 repeat family protein	DNA.synthesis/chromatin structure	-1.33	0.0038
At5g24490->putative protein contains similarity to ribosomal protein 30S subunit	protein.synthesis.chloroplast/ mito - plastid ribosomal protein.unknown	-1.21	0.0000
At1g32640->protein kinase, putative identical to bHLH protein	protein.posttranslational modification	-1.07	0.0069
At5g01820->putative protein serine/threonine protein kinase ATPK10	protein.posttranslational modification	-1.61	0.0004
At5g47330->palmitoyl-protein thioesterase precursor-like	protein.posttranslational modification	-1.19	0.0001
At5g65530->putative protein contains similarity to lectin-like protein kinase	protein.posttranslational modification.kinase.receptor like cytoplasmatic kinase VI	-1.20	0.0004
At1g76360->putative protein kinase similar to protein kinase (APK1A)	protein.posttranslational modification.kinase.receptor like cytoplasmatic kinase VII	-1.23	0.0004
At2g45170->autophagy 8e (APG8e)	protein.degradation.autophagy	-1.00	0.0001
At5g22920->zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1.31	0.0004

At3g47160->expressed protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-0.98	0.0012
At2g04240->zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1.13	0.0000
At5g55970->zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1.36	0.0003
At1g76410->zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1.17	0.0002
At1g26800->zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.RING	-1.67	0.0001
At1g23390->kelch repeat-containing F-box family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF. FBOX	-1.42	0.0000
At1g80440->kelch repeat-containing F-box family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF. FBOX	-2.76	0.0001
At3g59940->kelch repeat-containing F-box family protein	protein.degradation.ubiquitin.E3.SCF. FBOX	-2.02	0.0000
At4g37610->TAZ zinc finger family protein / BTB/POZ domain-containing protein	protein.degradation.ubiquitin.E3. BTB/POZ Cullin3.BTB/POZ	-1.80	0.0001
At2g47180->galactinol synthase, putative	minor CHO metabolism.raffinose family.galactinol synthases.known	-1.70	0.0002
At5g20250->raffinose synthase family protein / seed imbibition protein, putative (din10)	minor CHO metabolism.raffinose family.raffinose synthases.putative	-1.97	0.0001
At3g57520->alkaline alpha galactosidase, putative	minor CHO metabolism.raffinose family.raffinose synthases.putative	-1.09	0.0001
At1g60140->TPS10, trehalose-6-phosphate synthase	minor CHO metabolism.trehalose. potential TPS/TPP	-1.31	0.0001
At1g70290->TPS8, trehalose-6-phosphate synthase	minor CHO metabolism.trehalose. potential TPS/TPP	-2.75	0.0000
At2g19800->myo inositol oxygenase (MIOX 2)	minor CHO metabolism.myo-inositol. myo inositol oxygenases	-2.13	0.0028
At5g64260->phosphate-responsive protein, putative  similar to phi-1 (phosphate-induced gene)	signalling.in sugar and nutrient physiology	-2.02	0.0000
At5g09440->phosphate-responsive protein, putative  similar to phi-1 (phosphate-induced gene)	signalling.in sugar and nutrient physiology	-1.60	0.0000
At3g26740->light responsive protein-related	signalling.light	-1.34	0.0001
At4g37250->leucine-rich repeat family protein / protein kinase family protein	signalling.receptor kinases.leucine rich repeat III	-0.98	0.0000
At4g34150->C2 domain-containing protein similar to calcium-dependent protein kinase (Dunaliella tertiolecta)	signalling.calcium	-1.34	0.0045
At5g58350->MAP kinase	signalling.MAP kinases	-1.08	0.0053
At5g27950->kinesin motor protein-related  kinesin heavy chain-like protein, potato, PIR:T07397	cell.organisation	-0.97	0.0007
At3g26100->regulator of chromosome condensation (RCC1) family protein weak similarity to UVB-resistance protein UVR8 (Arabidopsis thaliana)	cell.division	-0.97	0.0010
At3g52400->syntaxin, putative (SYP122)	cell. vesicle transport	-1.09	0.0095
At5g19120->expressed protein low similarity to extracellular dermal glycoprotein EDGP precursor	development.storage proteins	-0.99	0.0065
At2g16660->nodulin family protein	development.unspecified	-1.65	0.0003
At2g23810->senescence-associated family protein	development.unspecified	-1.27	0.0002
At4g34950->nodulin family protein	development.unspecified	-1.08	0.0010
At5g65040-> similar to senescence-associated protein SAG102	development.unspecified	-1.21	0.0078
At5g14120->nodulin family protein	development.unspecified	-1.22	0.0001
At1g01070->nodulin MtN21 family protein	development.unspecified	-1.12	0.0080
At3g47950->ATPase, plasma membrane-type, putative	transport.p- and v-ATPases	-2.38	0.0000
At3g51860->Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> exchangers, AtCAX3	transport.metal	-1.43	0.0001
At2g38170->Ca <sup>2+</sup> /H <sup>+</sup> exchangers, AtCAX1	transport.metal	-1.04	0.0019
At1g68570->proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transport.peptides and oligopeptides	-1.79	0.0000

At3g54140->proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transport.peptides and oligopeptides	-1.84	0.0000
At2g37900->proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transport.peptides and oligopeptides	-1.75	0.0000
At1g32450->proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	transport.peptides and oligopeptides	-1.05	0.0096
At4g12030->bile acid:sodium symporter family protein	transport.unspecified cations	-1.72	0.0147
At3g16340->ABC transporter family protein	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	-1.05	0.0001
At5g13580->ABC transporter family protein	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	-2.36	0.0001
At3g53510->ABC transporter family protein breast cancer resistance protein (BCRP), Homo sapiens, EMBL:AF098951	transport.ABC transporters and multidrug resistance systems	-2.71	0.0000
At3g27170->chloride channel protein (CLC-b)	transport.unspecified anions	-1.23	0.0006
At4g23400->PIP1.5; water channel - like protein plasma membrane intrinsic protein 1c	transport.Major Intrinsic Proteins.PIP	-1.14	0.0001
At5g09220->amino acid transport protein AAP2	transport.amino acids	-1.04	0.0000
At5g49630->amino acid permease 6 (AAP6)	transport.amino acids	-1.35	0.0039
At5g23810->amino acid transporter family protein	transport.amino acids	-1.29	0.0002
At2g24550->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.67	0.0004
At1g21440->mutase family protein	not assigned.no ontology	-1.03	0.0029
At3g56880->VQ motif-containing protein	not assigned.no ontology	-1.09	0.0006
At5g41040->transferase family protein	not assigned.no ontology	-2.24	0.0000
At4g20260->DREPP plasma membrane polypeptide family protein	not assigned.no ontology	-1.22	0.0001
At3g29240->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.07	0.0001
At1g32700->zinc-binding family protein	not assigned.no ontology	-1.40	0.0026
At1g76990->ACT domain containing protein	not assigned.no ontology	-1.03	0.0017
At1g15740->leucine-rich repeat family protein	not assigned.no ontology	-1.10	0.0025
At3g50440->hydrolase, alpha/beta fold family protein	not assigned.no ontology	-1.59	0.0001
At5g49360->glycosyl hydrolase family 3 protein	not assigned.no ontology	-1.74	0.0000
At2g02710->PAC motif-containing protein	not assigned.no ontology	-2.15	0.0001
At2g38310->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.15	0.0003
At1g76590->zinc-binding family protein	not assigned.no ontology	-2.15	0.0000
At5g25280->serine-rich protein-related	not assigned.no ontology	-1.28	0.0013
At3g63210->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.19	0.0015
At5g06320->harpin-induced family protein / HIN1 family protein	not assigned.no ontology	-1.21	0.0054
At1g29400->RNA recognition motif (RRM)-containing protein	not assigned.no ontology	-1.08	0.0060
At3g16570->rapid alkalization factor (RALF) family protein	not assigned.no ontology	-1.29	0.0031
At2g32150->haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein	not assigned.no ontology	-1.96	0.0000
At4g36610->hydrolase, alpha/beta fold family protein	not assigned.no ontology	-1.95	0.0009
At4g24140->hydrolase, alpha/beta fold family protein	not assigned.no ontology	-2.12	0.0001
At1g52870->peroxisomal membrane protein-related	not assigned.no ontology	-1.00	0.0008
At4g20390->integral membrane family protein	not assigned.no ontology	-1.45	0.0006
At5g46780->VQ motif-containing protein	not assigned.no ontology	-1.38	0.0009
At3g62410->CP12 domain-containing protein	not assigned.no ontology	-1.06	0.0000
At1g01610->phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	not assigned.no ontology	-1.65	0.0001
At3g56710->sigA-binding protein	not assigned.no ontology	-0.97	0.0030
At1g76560->CP12 domain-containing protein	not assigned.no ontology	-1.59	0.0000
At3g03530,At3g03540 flag_XH2 ->phosphoesterase family protein	not assigned.no ontology	-2.69	0.0001
At3g62730->expressed protein	not assigned.no ontology	-2.43	0.0000

At3g55890->yippee family protein	not assigned.no ontology	-1.02	0.0002
At5g54170->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.08	0.0003
At2g03730->ACT domain-containing protein (ACR5)	not assigned.no ontology	-1.04	0.0003
At1g78070->WD-40 repeat family protein	not assigned.no ontology	-1.22	0.0099
At5g44550->integral membrane family protein	not assigned.no ontology	-1.75	0.0003
At3g48450->nitrate-responsive NOI protein, putative	not assigned.no ontology	-1.00	0.0075
At3g11430->phospholipid/glycerol acyltransferase family protein	not assigned.no ontology	-2.49	0.0001
At3g10420->sporulation protein-related	not assigned.no ontology	-1.06	0.0002
At5g63560->transferase family protein	not assigned.no ontology	-2.61	0.0004
At1g09070->C2 domain-containing protein / src2-like protein, putative	not assigned.no ontology.C2 domain-containing protein	-1.06	0.0030
At3g58990->aconitase C-terminal domain-containing protein	not assigned.no ontology.aconitase C-terminal domain-containing protein	-1.57	0.0041
At1g67870->glycine-rich protein contains non-consensus GG donor splice site at exon2; modeled to est match.	not assigned.no ontology.glycine rich proteins	-1.26	0.0001
At4g30460->glycine-rich protein	not assigned.no ontology.glycine rich proteins	-1.35	0.0006
At5g09530->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	-2.10	0.0001
At4g38080->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	-1.93	0.0002
At5g09480->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	-1.51	0.0003
At5g09520->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	-2.21	0.0000
At2g22510->hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	not assigned.no ontology.hydroxyproline rich proteins	-2.33	0.0005
At2g15890->expressed protein	not assigned.unknown	-1.71	0.0009
At2g17710->expressed protein	not assigned.unknown	-1.12	0.0001
At3g10020->expressed protein	not assigned.unknown	-1.25	0.0000
At5g60680->expressed protein	not assigned.unknown	-1.06	0.0092
At3g15630->expressed protein	not assigned.unknown	-1.68	0.0005
At5g11070->expressed protein	not assigned.unknown	-1.29	0.0006
At2g40000->expressed protein	not assigned.unknown	-1.77	0.0001
At4g05070->expressed protein	not assigned.unknown	-1.15	0.0006
At4g17870->expressed protein	not assigned.unknown	-1.45	0.0001
At1g17380->expressed protein	not assigned.unknown	-1.21	0.0008
At1g56320->expressed protein	not assigned.unknown	-1.60	0.0002
At5g57340->expressed protein	not assigned.unknown	-1.08	0.0001
At4g17220->expressed protein	not assigned.unknown	-0.99	0.0135
At4g01026->expressed protein	not assigned.unknown	-1.24	0.0008
At1g29050->expressed protein	not assigned.unknown	-1.16	0.0013
At2g46220->expressed protein	not assigned.unknown	-1.09	0.0021
At2g29670->expressed protein	not assigned.unknown	-0.98	0.0002
At1g01360->expressed protein	not assigned.unknown	-0.98	0.0029
At1g11210->expressed protein	not assigned.unknown	-1.14	0.0002
At3g15840->expressed protein	not assigned.unknown	-1.33	0.0000
At2g47200->expressed protein	not assigned.unknown	-2.18	0.0001
At3g07310->expressed protein	not assigned.unknown	-0.98	0.0005
At1g70700->expressed protein	not assigned.unknown	-3.03	0.0001
At2g33850->expressed protein	not assigned.unknown	-1.21	0.0061
At1g73750->expressed protein	not assigned.unknown	-2.08	0.0003
At5g18130->expressed protein	not assigned.unknown	-2.56	0.0001
At5g58650->expressed protein	not assigned.unknown	-1.18	0.0042
At3g22970->expressed protein	not assigned.unknown	-0.99	0.0001
At5g59050->expressed protein	not assigned.unknown	-1.08	0.0022

<i>At4g14990-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.04	0.0001
<i>At1g54540-&gt;hypothetical protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-3.19	0.0000
<i>At1g13340-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.01	0.0010
<i>At1g07280-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.71	0.0001
<i>At4g04630-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.28	0.0041
<i>At2g27830-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.49	0.0015
<i>At3g19800-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.02	0.0002
<i>At5g06980-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.29	0.0012
<i>At1g68440-&gt;expressed protein</i>	<i>not assigned.unknown</i>	-1.03	0.0011
	0 <i>not assigned.disagreeing hits</i>	-1.02	0.0003
<i>At5g09660-&gt;c malate dehydrogenase</i>	<i>gluconeogenesis.Malate DH</i>	-1.13	0.0005
<i>At1g13700-&gt;glucosamine/galactosamine-6-phosphate</i>	<i>OPP.oxidative PP.6-</i>		
<i>isomerase family protein</i>	<i>phosphogluconolactonase</i>	-2.16	0.0000
<i>At5g12420-&gt;putative protein similarity to various</i>			
<i>predicted proteins~Contains ATP synthase delta</i>	<i>mitochondrial electron transport / ATP</i>		
<i>(OSCP) subunit signature</i>	<i>synthesis.F1-ATPase</i>	-1.76	0.0001

**Tabelle A3: Alle differentiell exprimierten Gene 6 Tage nach Infektion mit dem T-DNA-defizienten Agroakterium, Stamm GV3101.** Angegeben sind die Verhältnisse der relativen Signale von infiziertem zu Referenzgewebe als Logarithmus zur Basis 2. Den Verhältnissen lagen jeweils 3 Hybridisierungen pro Probe zu Grunde. Die Tabelle beinhaltet nur die Gene mit einem signifikant differentiellen Verhältnis (P-Wert<0.01). Aufgeführt sind der Genlocus (MIPSCode), Genname, funktionelle Kategorie und das Verhältnis der Signalwerte (6d GV3101) mit Signifikanz (PWert). Nomenklatur der Gene erfolgte gemäss "The Arabidopsis Information Resource, TAIR; [www.arabidopsis.org/servlets](http://www.arabidopsis.org/servlets)"

<b>MIPSCode und Genname</b>	<b>Kategorie</b>	<b>6d GV3101</b>	<b>PWert</b>
At1g55850->cellulose synthase catalytic subunit, putative, AtCslE1	cell wall.cellulose synthesis	1.14	0.0077
At1g21310->proline-rich extensin-like family protein	cell wall.cell wall proteins.LRR	1.60	0.0098
At5g17330->glutamate decarboxylase 1 (GAD 1)	amino acid metabolism.synthesis.	1.59	0.0039
At3g54640->tryptophan synthase, alpha subunit (TSA1)	central amino acid metabolism.GABA	1.34	0.0065
At5g05730->anthranilate synthase, alpha subunit, component I-1 (ASA1)	amino acid metabolism.synthesis.	1.16	0.0048
At5g17990->anthranilate phosphoribosyltransferase	aromatic aa.tryptophan	1.11	0.0039
At5g60950->phytochelatin synthetase-related	metal handling	3.17	0.0002
At5g44420->putative antifungal protein, AFP4	metal handling.binding, chelation and storage	1.40	0.0087
At1g26420->FAD-binding domain-containing protein	secondary metabolism.N	2.55	0.0101
At1g30700->FAD-binding domain-containing protein	misc.alkaloid-like	1.91	0.0080
At4g31970->Cytochrome P450-like protein, flavonoid 3,5-hydroxylase	secondary metabolism flavonoids.	3.86	0.0040
At5g53820->ABA-inducible protein-like	dihydroflavonols	1.27	0.0051
At5g15230->gibberellin-regulated protein 4 (GASA4)	hormone metabolism.abscisic acid.	1.22	0.0108
At3g16460->putative lectin	induced-regulated-responsive-activated	1.27	0.0090
At1g66700,At1g66690 flag_XH2 ->S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein similar to defense-related protein cjs1	hormone metabolism.gibberellin.	3.32	0.0098
At3g13790->beta-fructosidase (BFRUCT1)	hormone metabolism.jasmonate.	1.10	0.0099
At2g43610->glycoside hydrolase family 19 protein	induced-regulated-responsive-activated	6.86	0.0000
At2g43570-> similar to chitinase class IV	hormone metabolism.salicylic acid.	2.72	0.0018
At2g43620-> similar to basic endochitinase CHB4	synthesis-degradation	2.45	0.0011
At2g19970-> similar to pathogenesis-related protein 1	major CHO metabolism.degradation.	1.61	0.0015
At5g47550->cysteine protease inhibitor, putative	sucrose.invertases.cell wall	1.40	0.0015
At1g17860->trypsin and protease inhibitor family protein / Kunitz family protein	stress.biotic	1.05	0.0022
At1g30730,At1g30720 flag_XH2 ->FAD-binding domain-containing protein	misc.nitrilases, *nitrile lyases, berberine bridge enzymes,	3.03	0.0017
At1g02920,At1g02930 flag_XH2 ->glutathione S-transferase, putative	reticuline oxidases, troponine reductases	1.75	0.0060
At2g30770->cytochrome P450 71A13, putative (CYP71A13)	misc.glutathione S transferases	5.53	0.0002
At4g39950->cytochrome P450 79B2, putative (CYP79B2)	misc.cytochrome P450	3.38	0.0068
At2g30750->cytochrome P450 71A12, putative (CYP71A12)	misc.cytochrome P450	1.60	0.0004

At1g13110->cytochrome P450 71B7 (CYP71B7)	misc.cytochrome P450	1.09	0.0051
At4g08770-> identical to class III peroxidase ATP38	misc.peroxidases	3.22	0.0074
At5g64120->peroxidase, putative	misc.peroxidases	2.38	0.0004
At1g78860,At1g78850 flag_XH2 ->curcumin-like (mannose-binding) lectin family protein	misc.myrosinases-lectin-jacalin	3.42	0.0002
At4g12480->protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein  identical to pEARLI 1	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	1.56	0.0058
At4g12470->protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein  similar to pEARLI 1	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	1.25	0.0012
At4g13180->short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	misc.short chain dehydrogenase/ reductase (SDR)	1.78	0.0051
At3g13610->unknown protein	DNA.unspecified protein.postranslational modifica- tion.kinase.receptor like	4.19	0.0023
At2g07180->putative protein kinase	cytoplasmatic kinase VII	1.14	0.0073
At2g38860->proteaseI (pfpl)-like protein (YLS5)	protein.degradation	1.64	0.0021
At3g29970->germination protein-related  similar to HvB12D (Hordeum vulgare subsp. vulgare)	development.unspecified	5.51	0.0068
At2g39210->nodulin family protein	development.unspecified	1.29	0.0044
At3g09260->glycosyl hydrolase family 1 protein	not assigned.no ontology	6.21	0.0003
At3g20370->mepirin and TRAF homology domain- containing protein / MATH domain-containing protein	not assigned.no ontology	2.89	0.0004
At5g26280->mepirin and TRAF homology domain- containing protein / MATH domain-containing protein	not assigned.no ontology	2.13	0.0038
At3g24510->expressed protein	not assigned.unknown	2.57	0.0039
At4g33560->expressed protein	not assigned.unknown	2.55	0.0101
At1g64405->expressed protein	not assigned.unknown	1.23	0.0020
0	not assigned.disagreeing hits	1.99	0.0014
At3g24503->y aldehyde dehydrogenase (ALDH1a)	fermentation.aldehyde dehydrogenase	1.73	0.0005
At5g49730,At5g49740 flag_XH2 ->ferric chelate reductase, putative, FRO7	metal handling.acquisition hormone metabolism.auxin.	-1.03	0.0020
At1g56150->auxin-responsive family protein	induced-regulated-responsive-activated hormone metabolism.jasmonate.	-1.18	0.0092
At1g55020->1 lipoxygenase, putative	synthesis-degradation major CHO metabolism.degradation.	-1.20	0.0006
At4g17090->Beta-amylase 3, BAM3	starch.starch cleavage	-0.99	0.0065
At2g42540->cold-responsive protein / cold-regulated protein (cor15a)	stress.abiotic.cold	-1.12	0.0027
At2g48140->protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein  similar to pEARLI 1	misc.protease inhibitor/seed storage/ lipid transfer protein (LTP) family protein	-1.03	0.0050
At3g62730->expressed protein	not assigned.no ontology	-1.40	0.0002

## 9 Verzeichnis der Abkürzungen

ABA engl.:	<b>A</b> bscisic <b>A</b> cid Abscisinsäure
ABRE engl.:	<b>A</b> BA-responsive <b>e</b> lement
A. th	<i><b>A</b>rabidopsis <b>t</b>haliana...</i>
A. t.	<i><b>A</b>grobacterium <b>t</b>umefaciens</i>
AUX/IAA	<b>A</b> uxin/ <b>I</b> AA-Gen
AuxRE engl.:	<b>a</b> uxin-responsive <b>e</b> lement
BSA engl.:	<b>b</b> ovine <b>s</b> erum <b>a</b> lbumin
C	<b>C</b> ytosin
°C Grad	<b>C</b> elsius
Ca	<b>C</b> alcium
CLSM	<b>C</b> onfocal <b>L</b> aser <b>S</b> canning <b>M</b> icroscopy
cDNA engl.:	<b>c</b> opy- <b>D</b> NA (DNA-Kopie einer mRNA)
CNGC engl.:	<b>c</b> yclic- <b>n</b> ucleotide- <b>g</b> ated <b>c</b> hannel
dCTP	<b>D</b> eoxycytidin <b>t</b> riphosphat
DEPC	<b>D</b> iethylpyro <b>c</b> arbonat
DNA engl.:	<b>d</b> esoxyribo <b>n</b> ucleic <b>a</b> cid
dNTP	<b>D</b> esoxy- <b>N</b> ukleotid- <b>T</b> riphosphat
dT	<b>D</b> eoxythymidin
DW engl.	Trockengewicht (dry weight)
eds engl.:	enhanced disease susceptibility
EDTA engl.:	<b>e</b> thylendiaminetetra <b>a</b> cetic <b>a</b> cid
ELISA engl.	<b>E</b> nzyme <b>L</b> inked <b>I</b> mmuno <b>S</b> orbent <b>A</b> ssay
ER	<b>E</b> ndoplasmatisches <b>R</b> etikulum
ERF engl.:	<b>e</b> thylene <b>r</b> esponse <b>f</b> actor
ET	<b>E</b> thylen
FG	<b>F</b> rischgewicht
fw engl.:	<b>f</b> orward (vorwärts, für 5'-3'-Primer)
JA engl.:	<b>j</b> asmonic <b>a</b> cid
G	<b>G</b> uanin
GC-MS	<b>G</b> aschromatographie- <b>M</b> assenspektrometrie
GFP engl.:	<b>g</b> reen <b>f</b> luorescent <b>p</b> rotein
IAA engl.:	indole-3- <b>a</b> cetic <b>a</b> cid
l	<b>L</b> iter
M	<b>M</b> olar
m	<b>M</b> illi-
μ	<b>M</b> ikro-
min	<b>M</b> inute
mRNA engl.:	<b>m</b> essenger- <b>R</b> NA
MS	<b>M</b> urashige und <b>S</b> koog
MW	<b>M</b> ittelwert
Oligo (dT)	<b>O</b> ligo <b>D</b> eoxythymidin



p	<b>Piko-</b>
pad engl.:	<b>phytoalexin-deficient</b>
PDF engl.	Defensin
Poly (A)+	<b>Poly-Adenin</b>
PR engl.:	<b>pathogenesis related</b>
rev engl.:	<b>reverse</b> (rückwärts, für 3'-5'-Primer)
RNA engl.:	<b>ribonucleic acid</b>
RNase	<b>Ribonuklease</b>
rpm engl.:	rotations <b>per minute</b>
RT	<b>Raumtemperatur</b> <b>Reverse Transkription / Reverse Transkriptase</b>
s	Sekunde
SA engl.:	<b>salicylic acid</b>
SF	<b>Standardfehler</b>
Sid	<b>SA induction deficient</b>
T	<b>Thymin</b>
TA	<b>Thymin-Adenin</b>
T-DNA	tumor-induzierende <b>DNA</b>
TEMED	N,N,N,N – <b>Tetramethyl-Ethylendiamin</b>
TIR1 engl.:	<b>transport inhibitor response 1</b>
U	<b>Uracil</b>
U (Enzyme) engl.:	<b>unit</b> (Einheit für Enzymaktivitäten)
V	<b>Volt</b>
v/v	Volumen/Volumen
dpi	<b>days post infection</b>
DNA	engl.: <b>desoxyribonucleic acid</b>
DNase	<b>DNA-abbauendes Enzym</b>
dNTP	<b>Desoxy-Nukleotid-Triphosphat</b>
dT	<b>Deoxythymidin</b>
EGTA	engl.: <b>ethyleneglycoltetraacetic acid</b>
Hepes	<b>4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure</b>
n	<b>1.Nano-</b> <b>2. Anzahl an unabhängigen Stichproben</b>
p	Signifikanzniveau
PBS engl.:	<b>phosphate buffered saline</b>
PCR engl.:	<b>polymerase chain reaction</b>
SD engl.	Standardabweichung
SEM engl.	Standardfehler
Tab.	Tabelle
TBE engl.:	<b>Tris boric acid + Ethylenediaminetetra acetic acid</b>
Tris	<b>Tris(hydroxymethyl)aminomethan</b>
tRNA	<b>Transfer RNA</b>

## **10 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbst angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt.

Ich habe bislang noch keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....

Marina Efetova

## 11 Lebenslauf

Name Marina Efetova  
Geboren am 19. August 1973 in Moskau, Russland  
Staatsangehörigkeit deutsch  
Familienstand verheiratet seit 2003, 1 Kind (\* 03.09.2007)

### Schulbesuch

1980-1987 Mittlere Schule Nr.126 in Moskau, Russland  
1987-1990 Mittlere Schule Nr.7 mit Vertiefungsfach Mathematik in Moskau, Russland  
1990 *Abschluss: Allgemeine Hochschulreife*

1990 Umzug nach Stuttgart, Deutschland  
1990-1991 Deutschkurs am Goethe-Institut in Stuttgart  
1991 *Abschluss: Kleines Deutsches Sprachdiplom*

### Studium

1991-1992 Studienkolleg an der Universität München  
1993-1996 Psychologie an der Universität Würzburg  
*Ohne Abschluss*

1997-2003 Biologie an der Universität Würzburg  
2002-2003 Diplomarbeit am Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik bei Prof. Dr. Rainer Hedrich  
2003 *Abschluss: Diplom-Biologin*

2003-2007 Doktorarbeit am Lehrstuhl für molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik bei Prof. Dr. Rainer Hedrich, Universität Würzburg

## 12 Publikationen

- Rosalia Deeken, Julia C. Engelmann, Marina Efetova, Tina Czirjak, Tobias Müller, Werner M. Kaiser, Olaf Tietz, Markus Krischke, Martin J. Mueller, Klaus Palme, Thomas Dandekar, and Rainer Hedrich: **An Integrated View of Gene Expression and Solute Profiles of *Arabidopsis* Tumors: A Genome-Wide Approach.** *Plant Cell*, 2006 Dec;18(12):3617-34.
- Marina Efetova, Jürgen Zeier, Markus Riederer, Nadja Stingl, Martin Müller, Wolfram Hartung, Rainer Hedrich and Rosalia Deeken: **Central Role of ABA in Drought Stress Protection of *Agrobacterium*-Induced Tumours on *Arabidopsis*.** *Plant Physiology*, 2007 Nov;145(3):853-62.
- Marina Efetova, Julia C. Engelmann, Rainer Hedrich and Rosalia Deeken (2008) **Molecular mechanisms controlling the *Agrobacterium*-plant interaction.** Manuscript in preparation.