

Untersuchungen zur Rolle des Kohlenhydratmetabolismus
während Pflanze-Pathogen-Interaktionen
und der Keimlingsentwicklung

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



vorgelegt von

Katharina Barbara Bonfig

aus Bad Neustadt a. d. Saale

Würzburg, 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. M. J. Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. T. Roitsch

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Kaiser

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary.....	3
3	Einleitung	5
3.1	Das biologische Stresskonzept.....	5
3.2	Phytopathogene	5
3.3	Pflanzliche Resistenzmechanismen.....	8
3.4	Pflanzliche Abwehrmechanismen	11
3.5	Photosynthese und Chlorophyllfluoreszenz - konkurrierende Prozesse	13
3.6	Chlorophyllfluoreszenz und Stress.....	14
3.7	Regulation von <i>Source</i> - und <i>Sink</i> -Übergängen	15
3.8	Charakterisierung der Familie der Invertasen	16
3.9	Bedeutung der Invertasen in der pflanzlichen Entwicklung	18
3.10	Regulation von Invertasen	19
3.10.1	Effektoren der Invertaseaktivität	19
3.10.2	Expressionkontrolle und Expressionsmuster von Invertasen	20
3.10.3	Regulation durch Invertaseinhibitoren	23
3.11	Zielsetzung der Arbeit.....	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen	28
4.1.1	Phänotypische Charakterisierung.....	28
4.1.2	Regulation der photosynthetischen Aktivität	29
4.1.3	Koordinierte Regulation der Genexpression	35
4.1.4	Regulation des Kohlenhydratmetabolismus.....	37
4.1.5	Regulation endogener Invertaseinhibitoren in <i>A. thaliana</i> nach Stressbehandlung	39
4.2	Untersuchungen zur Funktion von Invertasen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen durch Repression dieser Enzyme	43
4.2.1	Pharmakologischer Ansatz zur Inhibition von Invertasen.....	43
4.2.1.1	Vergleich der chemischen Inhibitoren β -Thio-fructofuranosid und Acarbose.....	43
4.2.1.2	Wirkungen der Acarbose auf <i>P. syringae</i> und <i>A. thaliana</i>	44
4.2.1.3	Veränderungen des Primärmetabolismus durch Acarbose	46
4.2.1.4	Charakterisierung der Abwehrreaktionen unter dem Einfluss der Acarbose.....	48
4.2.2	Transgene Ansätze zur Inhibition von Invertasen	51

4.2.2.1	Invertaseinhibitoren aus <i>A. thaliana</i> unter Kontrolle synthetischer Pflanzenpromotoren.....	51
4.2.2.2	Invertaseinhibitoren aus <i>A. thaliana</i> unter Kontrolle eines Estradiol-induzierbaren Promotors.....	52
4.2.2.3	Der Invertaseinhibitor NiCIF aus <i>N. tabacum</i> unter Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors.....	54
4.3	Bedeutung und Funktion von Invertasen während der Keimlingsentwicklung.....	59
4.4	Generierung verschiedener „Werkzeuge“ zur weiteren Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen.....	66
4.4.1	Erstellung eines Macroarrays zur Untersuchung der Beteiligung verschiedener Stoffwechselwege an einer Pathogeninfektion.....	66
4.4.2	Generierung fluoreszierender Bakterien der Art <i>Pseudomonas syringae</i>	73
4.4.2.1	Transformation von <i>P. syringae</i> mit dem Plasmid pUTgfp.....	73
4.4.2.2	Transformation von <i>P. syringae</i> mit dem Plasmid pPNptGreen.....	73
4.4.2.3	Vergleichende Infektion von <i>A. thaliana</i> mit fluoreszierenden und Wildtyp-Bakterien.....	74
4.4.2.4	Quantifizierung des bakteriellen Wachstums.....	75
5	Diskussion.....	77
5.1	Durch Pathogeninfektionen werden in Pflanzen gleichzeitig verschiedene Stoffwechselwege koordiniert reguliert.....	77
5.1.1	Pathogeninfektionen verursachen lokal innerhalb der Infektionsstellen einen Abfall photosynthetischer Prozesse.....	77
5.1.2	Die Kinetik der Photosyntheseinhibition unterscheidet sich zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion.....	79
5.1.3	Die Regulation der <i>Source-Sink</i> -Übergänge und des Abwehrverhaltens unterscheiden sich zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion.....	80
5.1.4	Ausblick: Durch den Einsatz verschiedener „Werkzeuge“ können Pflanze-Pathogen-Interaktionen einfacher und schneller untersucht werden.....	82
5.2	Die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus spielt eine zentrale Rolle in Pflanze-Pathogen-Interaktionen.....	84
5.2.1	Die Aktivität von Zellwandinvertasen ist notwendig für die pflanzliche Abwehr....	84
5.2.2	Die Repression der Invertaseinhibitor-Expression ist Teil der pflanzlichen Abwehr.....	85
5.2.3	Die Sensitivität gegenüber einer Pathogeninfektion bei Inhibition der Aktivität von Zellwandinvertasen ist unabhängig vom SA-vermittelten Signalweg pflanzlicher Abwehr.....	86
5.2.4	Ausblick.....	87

5.3	Induzierbare Promotorsysteme ermöglichen eine kontrollierte Genexpression	88
5.3.1	Induzierbare Promotorsysteme besitzen Vorteile, jedoch auch Limitationen.....	88
5.3.2	Ausblick: Eine Inhibition der Invertaseaktivität durch Expression eines Invertaseinhibitors in transgenen Ansätze ist möglich.....	91
5.4	Die Regulation von Invertasen spielt eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Entwicklung	92
5.4.1	Die Aktivität von Invertasen ist essentiell für eine normale Keimlingsentwicklung	92
5.4.2	Ausblick.....	93
6	Material und Methoden.....	95
6.1	Material.....	95
6.1.1	Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Laborgeräte	95
6.1.2	Nährmedien.....	98
6.1.3	Bakterien- und Pilzstämmen.....	98
6.1.4	Pflanzen	99
6.2	Methoden	100
6.2.1	Arbeit mit Pathogenen	100
6.2.1.1	Anzucht von und Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	100
6.2.1.2	Nachweis des Bakterienwachstums	101
6.2.1.3	Herstellung elektrokompetenter <i>P. syringae</i>	102
6.2.1.4	Elektroporation.....	102
6.2.1.5	Anzucht von und Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i>	103
6.2.1.6	Kultivierung von und Infektion mit <i>Hyaloperonospora parasitica</i>	103
6.2.2	Arbeit mit pflanzlichem Material.....	103
6.2.2.1	Kultivation von Pflanzen	103
6.2.2.2	Erzeugung transgener <i>A. thaliana</i>	104
6.2.2.3	Sterile Aussaat von Samen	104
6.2.2.4	Induktion der Promotorsysteme der transgenen Pflanzenlinien	105
6.2.3	Molekularbiologische Methoden	105
6.2.3.1	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	105
6.2.4	Methoden für die Arbeit mit Bakterien.....	109
6.2.4.1	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen.....	109
6.2.4.2	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten.....	109
6.2.4.3	Agarosegelelektrophorese	109
6.2.4.4	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	110
6.2.4.5	Ligation von DNA-Fragmenten	110
6.2.4.6	Herstellung kompetenter Bakterienzellen	110

6.2.4.7	Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock	111
6.2.4.8	Identifizierung transformierter <i>A. tumefaciens</i> mittels „Colony screen“	111
6.2.4.9	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	112
6.2.4.10	Konservierung von Bakterien	113
6.2.4.11	Quantifizierung von DNA und RNA.....	113
6.2.4.12	Sequenzierung von DNA.....	113
6.2.5	Molekularbiologische Methoden an Pflanzenmaterial	114
6.2.5.1	Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	114
6.2.5.2	Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial.....	114
6.2.5.3	RNA-Gelelektrophorese	114
6.2.5.4	RNA-Transfer (Northern Blot).....	115
6.2.5.5	Markierung von DNA-Fragmenten mit ³² P	115
6.2.5.6	Hybridisierung und Auswertung.....	115
6.2.5.7	Herstellung von cDNA aus isolierter RNA.....	116
6.2.5.8	Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in <i>N. tabacum</i>	116
6.2.6	Proteinbiochemische Methoden	116
6.2.6.1	Invertaseaktivitäts-Test	116
6.2.6.2	Bestimmung der Aktivität endogener Invertaseinhibitoren	117
6.2.7	Analytische Methoden	118
6.2.7.1	Bestimmung der Salicylsäuregehalte	118
6.2.7.2	Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker	118
6.2.8	Histologische Methoden	119
6.2.8.1	Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität mittels X-Gluc.....	119
6.2.8.2	Invertase <i>in situ</i> Färbung.....	119
6.2.9	Chlorophyllfluoreszenzmessungen.....	120
7	Anhang.....	122
8	Literatur.....	132
	Veröffentlichungen	150
	Danksagung	151
	Lebenslauf.....	152
	Ehrenwörtliche Erklärung	153

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (L., Heynhold)
<i>A. brassicicola</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
cfu	„colony forming units“ (=Kolonie-bildende Einheiten)
CIA	Chloroform:Isoamylalkohol
CO ₂	Kohlendioxid
Col-0	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Columbia
cv	Kultivar
cwINV	„cellwall invertase“ (=extrazelluläre Invertase)
dATP	2´- Desoxy- Adenosin- 5´- Triphosphat
dNTP	2´- Deoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes H ₂ O
DEX	Dexamethason
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpg	„days post germination“ (=Tage nach der Keimung)
e-	Elektron(en)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eds-1</i>	„enhanced disease sensitivity-1“
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (=und andere)
EtOH	Ethanol
ETR	„electron transport rate“ (=Elektronentransportrate)
F ₀	minimale Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F ₀ '	minimale Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _m	maximale Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F _m '	maximale Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _s bzw. Ft	Fluoreszenz im sog. „steady state“, d.h. Fluoreszenz unter konstanten äußeren Bedingungen
F _v (F _v = F _m – F ₀)	variable Fluoreszenz (dunkeladaptierter Zustand)
F _v ' (F _v ' = F _m ' - F ₀ ')	variable Fluoreszenz (lichtadaptierter Zustand)
F _v /F _m	maximale Quantenausbeute des PSII
FG	Frischgewicht
g	Gramm
Glc	Glucose
GUS	β-Glucuronidase
h	„hour“, Stunde
HR	„hypersensitive response“ bzw. hypersensitive Reaktion
IR	„induced resistance“ bzw. induzierte Resistenz
JA	Jasmonsäure
k	Kilo (10 ³)
K	Kontrolle
Kan	Kanamycin
KB	King's B
konz	konzentriert
λ	Wellenlänge (in nm)
l	Liter

LB	Luria und Bertani
LED	“light emitting diode” (=Lichtdiode)
μ	mikro (10^{-6})
m	milli (10^{-3}) bzw. Meter
M	molar
min	Minute(n)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (=Boten-RNA)
MS	Murashige und Skoog
n	nano (10^{-9})
NADP	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotidphosphat
nm	Nanometer
NPQ (Fm-Fm')/Fm'	nichtphotochemisches „Quenching“ (=Energierücklauf)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei der Wellenlänge 660 nm
p.a.	pro Analysis-Qualität (analytischer Reinheitsgrad einer Substanz)
PAL	Phenylalaninammoniumlyase, phenylalanin ammonia lyase
PAMPs	“pathogen associated molecular patterns”
pER8	β -Estradiol-induzierbarer Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDA	potato dextrose agar
Pr	„pathogenesis related“
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000
pv	Pathovar
qN	nichtphotochemisches „Quenching“ (=Energierücklauf)
(Fm-Fm')/(Fm-Fo)	
qP	photochemisches „Quenching“ (=Energierücklauf)
(Fm'-Ft)/(Fm'-Fo')	
r	resistent
RbcS	Rubisco
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rRNA	ribosomale RNA
rpm	“rounds per minute“ (=Umdrehungen pro Minute)
RE	relative Einheiten
ROS	„reactive oxygen species“ (=reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SA	Salicylsäure
SAR	„systemic acquired resistance“ (=systemisch erworbene Resistenz)
SD	Standardabweichung
SSC	Standard Natriumcitrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
Str	Streptomycin
Suc	Sacharose
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	„unit“ (=Einheit der Enzymaktivität) [μ mol bzw. μ g/min]
UV	Ultraviolett
V	Volt
vINV	vakuoläre Invertase
WS	<i>A. thaliana</i> Wildtyp Wassilewskija
WT	Wildtyp
Y(II) (Fm-Fo/Fm)	“yield“ (=effektive Quantenausbeute des PSII)

1 Zusammenfassung

Trotz vieler Forschungsprojekte im Bereich der Pflanze-Pathogen-Interaktionen sind bis heute die Regulationsmechanismen der verschiedenen pflanzlichen Stoffwechselwege nach einer Pathogeninfektion nur wenig verstanden. Invertasen sind Schlüsselenzyme in der Kohlenhydratverteilung und haben möglicherweise auch während einer Pathogeninfektion eine zentrale Bedeutung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Regulation verschiedener Stoffwechselwege in *Arabidopsis thaliana* nach Infektionen mit einem virulenten oder einem avirulenten Stamm von *Pseudomonas syringae* untersucht. Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung konnten räumliche und zeitliche Veränderungen der Photosynthese verfolgt werden. Verschiedene Chlorophyllfluoreszenz-Parameter waren unterschiedlich reguliert. In beiden Interaktionen waren Effekte jeweils nur lokal um die Infektionsstellen erkennbar und qualitativ ähnlich. Unterschiede waren jedoch im Zeitpunkt des Eintretens und im zeitlichen Verlauf der Veränderungen sichtbar. Die Methode erwies sich außerdem als geeignet für die sensitive, nicht-invasive Pathogenfrüherkennung vor dem Auftreten sichtbarer Symptome. Die Regulation verschiedener Gene innerhalb von *Source-Sink*-Übergängen und die Aktivität von Invertasen war in den beiden Interaktionen qualitativ unterschiedlich. Die Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm resultierte in einer Repression photosynthetischer Gene und in einer Induktion der vakuolären Invertasen. Die Aktivität der vakuolären Invertasen stieg vorübergehend nach Infektion mit den virulenten Bakterien an, während sie nach Infektion mit den avirulenten Bakterien sank. Die Aktivität der extrazellulären Invertasen war in beiden Interaktionen reprimiert.

Die erfolgreiche Generierung eines virulenten und eines avirulenten Bakterienstammes von *P. syringae*, die das grün fluoreszierende Protein exprimieren, kann bei der weiteren Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen helfen.

Die Regulation von Invertasen erfolgt auf transkriptioneller und posttranslationaler Ebene. Um die Funktion von Invertasen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen zu verstehen, wurde zunächst die Regulation von Invertasen durch endogene proteinogene Invertaseinhibitoren untersucht. In Übereinstimmung mit *in silico* Expressionsdaten konnte durch Untersuchung von Reporterlinien sowie in Northern Blot Analysen eine starke Expression von Invertaseinhibitoren in *Source* Blättern von *A. thaliana* festgestellt werden. Nach Applikation verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren wurde diese Expression nahezu vollständig reprimiert. Die indirekte Bestimmung der Invertaseinhibitoraktivität durch Messung der Invertaseaktivität in Mischextrakten zeigte, dass nach einer Pathogeninfektion die Aktivität der Inhibitoren vollständig reprimiert wurde.

In funktionellen Ansätzen wurden transgene Pflanzen generiert, die Invertaseinhibitoren unter der Kontrolle von chemisch induzierbaren Promotoren exprimieren. Ein Effekt der Induktion der Invertaseinhibitorexpression auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Pathogenen konnte bisher nicht beobachtet werden.

In einem pharmakologischen Ansatz wurden verschiedene chemische Inhibitoren zur Hemmung der Invertaseaktivität in *A. thaliana* verwendet. Ein Vergleich der Hemmfähigkeit zwischen einem Thiofructosid und Acarbose *in vitro* zeigte eine stärkere Repression durch Acarbose. Eine Behandlung von Blättern mit Acarbose bei gleichzeitiger Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm zeigte eine phänotypisch erhöhte Sensitivität der Pflanzen gegenüber der bakteriellen Infektion, eine stärkere Repression verschiedener Chlorophyllfluoreszenzparameter sowie ein erhöhtes Bakterienwachstum im Vergleich zu einer Infektion mit den Bakterien allein. Keine Effekte wurden auf transkriptioneller Ebene bei der Untersuchung verschiedener Gene der Photosynthese, des Kohlenhydratmetabolismus und der Abwehr gefunden. Die Invertaseaktivität nach zusätzlicher Behandlung mit Acarbose war tendenziell niedriger als die Aktivität nach einer Pathogeninfektion alleine. Acarbose erhöhte die Spiegel an Salicylsäure unabhängig von einer Pathogeninfektion. Da das Bakterienwachstum in verschiedenen Mutanten des Salicylsäure-vermittelten Signalweges der pflanzlichen Abwehr bei zusätzlicher Behandlung mit Acarbose ebenfalls erhöht war, kann eine Beteiligung des Salicylsäure-vermittelten Abwehrweges am Acarboseeffekt bisher ausgeschlossen werden.

Invertasen sind neben ihrer Beteiligung am pflanzlichen Abwehrverhalten auch für die Regulation von Entwicklungsprozessen wichtig. In einem funktionellen Ansatz mit verschiedenen Pflanzen, die ektopisch jeweils einen Invertaseinhibitor produzieren, wurde die Funktion von Invertasen genauer getestet. Zur Generierung spezifischer Effekte wurden die Inhibitoren unter Kontrolle synthetischer, pathogen- und wundinduzierbarer Promotoren in *A. thaliana* exprimiert. Unerwarteterweise war das Wachstum putativ transgener Keimlinge jedoch im 4-Blatt-Stadium arretiert. Eine Analyse der Aktivität der β -Glucuronidase in den entsprechenden Reporterlinien zeigte eine Korrelation zwischen der Wachstumsarretierung und einer hohen Aktivität dieser Promotoren unter verschiedenen *in vitro* Bedingungen. Dieser negative Effekt der Invertaseinhibition auf das Keimlingswachstum wurde in transgenen Tabakpflanzen bekräftigt, die Invertaseinhibitoren unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems exprimierten. Eine erfolgreiche Induktion des Promotorsystems resultierte in einer Reduktion des Frischgewichtes der Keimlinge. Mittels *in silico* Expressionsdaten und Northern Blot Analysen konnte für *A. thaliana* eine spezifische und starke Expression von verschiedener Invertaseisoformen während der Keimlingsentwicklung nachgewiesen werden. Diese komplementären Ergebnisse zeigen deutlich die Notwendigkeit der Invertaseaktivität für eine normale Keimlingsentwicklung.

2 Summary

In spite of a number of projects dealing with plant-pathogen-interactions the mechanisms of regulation of different plant metabolic pathways after pathogen infection are poorly understood. However, invertases are key metabolic enzymes in carbohydrate partitioning which may also play an important role during pathogen infection.

In this study, the regulation of different metabolic pathways in *Arabidopsis thaliana* plants after infection by a virulent and an avirulent strain of *Pseudomonas syringae* was investigated. With help of chlorophyll fluorescence imaging spatio-temporal changes in photosynthesis were monitored. The monitored chlorophyll fluorescence parameters were showing differential regulation. The effects were restricted to the vicinity of the infection site and did not spread to uninfected areas of the leaf. Qualitatively similar changes in photosynthetic parameters were observed in both interactions. Major differences between the responses to both strains were evident in the onset and time course of changes. Changes could be detected by chlorophyll fluorescence imaging before symptoms were visible by eye. In contrast to photosynthesis, the regulation of marker genes for source/sink relations and the activities of invertase isoenzymes showed qualitative differences between both interactions. Inoculation of the virulent but not the avirulent strain resulted in downregulation of photosynthetic genes and upregulation of vacuolar invertases. The activity of vacuolar invertases transiently increased upon infection with the virulent strain but decreased with the avirulent strain while extracellular invertase activity was downregulated in both interactions.

As an advanced tool for the characterization of the interaction between *A. thaliana* and *P. syringae* bacteria expressing the green fluorescing protein were generated.

Invertases are regulated on transcriptional and posttranscriptional level. To understand the function of invertases in plant-pathogen-interactions, the regulation of endogenous proteinaceous invertase inhibitors was investigated. According to expression profiling the analysis of reporter gene lines and Northern Blot analyses revealed a strong expression of invertase inhibitors in source leaves of *A. thaliana*. After application of biotic and abiotic stress factors this expression was completely repressed. Indirect determination of invertase inhibitor activity by measurement of invertase activity in mixed extracts revealed a complete repression of inhibitor activity after pathogen infection.

In functional approaches transgenic plants were generated, that express invertase inhibitor proteins under control of inducible promoters. However, no effect of the induction of inhibitor expression on the sensitivity to different pathogens could be observed so far.

In a pharmacological approach the inhibitory potential of acarbose and a thiofructoside towards invertases of *A. thaliana* was investigated. *In vitro* studies identified acarbose as the more potent inhibitor. Simultaneous treatment of plants with acarbose and bacteria revealed an increased sensitivity of the plant towards the bacterial infection and a stronger repression of chlorophyll fluorescence parameters compared to plants treated with bacteria alone. No effects on photosynthesis, carbohydrate metabolism and defence could be observed on transcriptional level. A tendency of lowered invertase activity could be observed after treatment with acarbose and bacteria compared to bacterial treatment alone. Acarbose treatment enhanced the levels of salicylic acid independent of bacterial infection. The acarbose-mediated increase in sensitivity was also detectable in *sid2* and *cpr6* mutants indicating that the effect of acarbose is independent of the salicylic acid mediated defence pathway.

Invertases are important enzymes in higher plants, which are involved in regulating developmental processes and responses to external factors. In a functional approach the role of invertases was investigated using transgenic plants ectopically expressing inhibitor proteins to decrease invertase activity. For generating specific effects, these inhibitor proteins were expressed in *A. thaliana* under the control of synthetic promoters consisting of tetramers of pathogeninducible elements, which were reported to yield low constitutive expression. Unexpectedly, seedling growth of putative transgenic plants was arrested at the four-leaf stage. Analysis of β -glucuronidase activity of corresponding reporter gene lines showed a correlation of the growth arrest with high activity of these promoters in seedlings grown under tissue culture conditions. The negative effect of invertase inhibition on seedling growth was substantiated by transgenic tobacco plants expressing an invertase inhibitor under control of a tetracycline inducible promoter. Ectopic induction of the invertase inhibitor during early seedling development resulted in a reduced fresh weight of seedlings. Expression profiling and Northern Blot analyses further supported the importance of invertase in *Arabidopsis thaliana* seedling development. Different invertases were specifically and strongly expressed. These complementing results show that invertase activity is required for normal seedling development.

3 Einleitung

3.1 Das biologische Stresskonzept

Das biologische Stresskonzept wurde 1936 von Hans Selye zunächst für tierische Organismen entwickelt und enthält die Kernaussage: „Stress ist die Summe aller Adaptationsvorgänge und Reaktionen körperlicher wie psychischer Art, mit denen ein Lebewesen auf seine Umwelt und die von innen und außen kommenden Anforderungen reagiert.“

Auch für Pflanzen, welche aufgrund ihrer Ortsgebundenheit verschiedensten abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt sind, ist ein einheitliches Stresskonzept nötig. Zu den abiotischen Stressfaktoren zählen Licht, Temperatur, Wasser, Nährstoffmangel, Schadstoffe oder Verwundung, biotischer Stress wird verursacht durch Viren, Bakterien, Pilze, Herbivore oder andere pflanzliche Organismen. Zur Vermeidung der Beeinträchtigung des Wachstums, der Reproduktion und der Fitness durch verschiedene Umweltfaktoren benötigen Pflanzen spezifische Mechanismen zur Stressvermeidung sowie zur Stressadaptation (Levitt, 1980).

Diese Mechanismen erfolgen durch Regulation der allgemeinen Abwehr oder Stressorspezifisch, als schnelle Reaktionen aber auch als spezifische Langzeitanpassungen (zur Übersicht siehe Lichtenthaler, 1998). Moderne phytopathologische Untersuchungsansätze beschäftigen sich mit der Entwicklung von Methoden zur Kontrolle von Krankheiten bzw. mit der Stressvermeidung selbst durch Aufklärung der molekularen Grundlagen der Wechselwirkungen zwischen Wirt und Pathogen und der Virulenzprinzipien.

3.2 Phytopathogene

Pflanzliches Material stellt sowohl Lebensraum als auch Nahrungsquelle phytopathogener Organismen dar. Befallen Phytopathogene Nutzpflanzen, so können dadurch beträchtliche wirtschaftliche Schäden verursacht werden. Nach der Art der Parasitierung ihrer Wirte werden Phytopathogene als biotroph, hemibiotroph oder nekrotroph klassifiziert.

Biotrophe Pathogene benötigen für Wachstum und Vermehrung lebendes Pflanzenmaterial. *Hyaloperonospora parasitica*, ein biotropher Pilz, gehört zu der Klasse der Oomyceten. Er ist auf einer Reihe von Kulturpflanzen, darunter verschiedene Kohlarten und Raps, Verursacher des falschen Mehltaus. Auch *Arabidopsis thaliana* stellt eine Wirtspflanze dar.

Der natürliche Infektionszyklus beginnt im Frühjahr, wenn Oosporen, die im Boden überwintert haben, Keimblätter von *A. thaliana* infizieren. Infektionen treten typischerweise bei kühler und feuchter Witterung auf. Es erfolgen über Konidien sukzessive mehrere Zyklen neuer Infektionen (Slusarenko und Schlaich, 2003). Die eigentliche Infektion beginnt nach der Auskeimung der Konidien und der Bildung von Appressorien. Sogenannte Penetrationshyphen wachsen von der Unterseite der Appressorien und penetrieren das Blatt an der Verbindungstelle zweier Epidermiszellen. In seltenen Fällen können Penetrationshyphen auch direkt durch Stomata in das Blatt wachsen (Koch und Slusarenko, 1990; Slusarenko und Schlaich, 2003). Während des interzellulären Wachstums der Hyphen erfolgt die Ausildung von Haustorien in Mesophyllzellen. Weiterhin werden Konidiophoren produziert, die aus den Stomata herauswachsen (Mauch-Mani und Slusarenko, 1994). Die höchste Konidiophorendichte kann bei einer hohen Dichte an Stomata beobachtet werden, also in der Regel auf der Unterseite eines Blattes.

Es gibt kompatible und inkompatible Interaktionen zwischen *H. parasitica* und *A. thaliana*. Für die Bezeichnung der verschiedenen Isolate von *H. parasitica* gibt es eine spezielle Nomenklatur (siehe Dangl *et al.*, 1992). So ist das Isolat NOCO virulent auf dem Ökotyp Columbia, wohingegen WELA virulent auf dem Ökotyp Landsberg ist. Die Interaktion zwischen Col-0 und WELA ist inkompatibel. Innerhalb der inkompatiblen Interaktion gibt es je nach Genotyp mehr oder weniger ausgeprägte Resistenzphänotypen. Auch innerhalb kompatibler Interaktionen können Grad und Ausmaß der Kolonisierung mit *H. peronospora* in einer vom Genotyp abhängigen und für eine Interaktion spezifischen Weise variieren (Holub *et al.*, 1994).

Zu den hemibiotrophen Pathogenen zählt das Bakterium *Pseudomonas syringae*, ein gram-negatives, obligat aerobes, stäbchenförmiges und polar begeißeltes Proteobakterium. Dieses kann zunächst über viele Generationen als Epiphyt auf Blattoberflächen wachsen, bevor es über Stomata oder kleine Verletzungen im Pflanzengewebe in dieses eindringt und dann zum Krankheitsauslöser wird (Hirano und Upper, 2000). *P. syringae* kann eine Vielzahl von Wirtspflanzen befallen, darunter Kern- und Steinobst, sowie Nutzpflanzen aus den Familien der Fabaceae und Brassicaceae. Nach einem Befall wird die sogenannte bakterielle Blattfleckkrankheit mit den typischen Symptomen in Form von nekrotischen Läsionen und Flecken an Stängeln, Blättern und Früchten ausgelöst. Es existieren über 50 verschiedene Pathovaren. Diese beschreiben die Fähigkeit eines Stammes, bestimmte Wirtspflanzen als Pathogen zu befallen. So ist *P. syringae* pv. *tomato* der Erreger der Blattfleckkrankheit auf Tomate, welche auf den Blättern der Pflanzen in Form schwarz verfärbter Flecken mit gelbem Hof auftritt. Nach einem Befall von Früchten entwickeln sich ebenfalls schwarze Punkte, wodurch die Qualität der Früchte beim Verkauf gemindert wird. Da auch Blüten

befallen werden, kann es zu beträchtlichen wirtschaftlichen Schäden kommen. Unter natürlichen Bedingungen tritt die Krankheit bevorzugt bei kühler und feuchter Witterung auf, wenn die Bakterien über geöffnete Spaltöffnungen in die Blätter eindringen können. Das Genom des Stammes *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 ist vollständig sequenziert (Buell *et al.*, 2003). Neben einem zirkulären Chromosom enthält das Genom zwei Plasmide, pDC3000A und pDC3000B.

Auch *A. thaliana* ist eine Wirtspflanze von *P. syringae* pv. *tomato*. Da man verschiedene rassenspezifische Kultivare für *A. thaliana* kennt, ist ein Studium kompatibler und inkompatibler Interaktionen möglich (Preston, 2000). Nach einer Infektion von Blättern treten typischerweise wasserdurchtränkte, sich ausbreitende Läsionen auf, die teilweise von einem chlorotischen Rand umgeben sind (Preston, 2000). Mit fortschreitender Infektion sterben die Pflanzenzellen ab. Für die erfolgreiche Kolonisierung von Wirtspflanzen besitzt *P. syringae* ein Typ III Sekretionssystem (TTSS; Jakobek *et al.*, 1993). Das TTSS ist ein Kennzeichen gram-negativer Bakterien und befähigt diese, Effektorproteine direkt in das Zytoplasma bzw. den extrazellulären Raum einer Wirtszelle zu translozieren (Heuck, 1998; Cornelis und Gijsegem, 2000; Guttman *et al.*, 2002). Diese Proteine agieren als Virulenzfaktoren, sind direkt für die Pathogenität des Bakteriums verantwortlich und fördern damit auch die Entwicklung von Krankheitssymptomen (Heuck, 1998; Büttner und Bonas, 2002; Grant *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006; Goel *et al.*, 2008). Das TTSS ist auch für die Auslösung einer HR in Nichtwirtspflanzen nötig (siehe auch Kapitel 3.3). Die Gene dieses hochkonservierten Komplexes werden als *hrp*-Gene (*hrp* = hypersensitive response and pathogenicity genes) bezeichnet (Cornelis und Gijsegem, 2000). Einige dieser *hrp*-Gene, die sogenannten *hrc*-Gene (*hrc* = *hrp* conserved), kodieren für membranassoziierte Proteine, die Teile des aktiven TTSS während der Infektion einer Pflanze bilden (Baker *et al.*, 1997).

Mit Hilfe von Mutantanalysen konnte gezeigt werden, dass bei der Resistenz gegen *P. syringae* in *A. thaliana* insbesondere die durch SA regulierte Abwehr wichtig ist (Delaney *et al.*, 1994). *P. syringae* pv. *tomato* ist zur Produktion des Phytotoxins Coronatin (COR) befähigt, welches strukturell den Jasmonaten ähnelt. COR gilt als wichtiger Virulenzfaktor, der entscheidend am Krankheitsverlauf bzw. an der Ausprägung der typischen Chlorosen beteiligt ist (Bender *et al.*, 1999). Weiterhin wurde gezeigt, dass Coronatin die Salicylsäure-abhängige Abwehr der Pflanze hemmt und für die Virulenz dieses Pathogens wichtig ist (Zhao *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu den biotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogenen besiedeln nekrotrophe Pathogene abgetötete Pflanzengewebe, denen sie für das eigene Wachstum Nährstoffe entziehen (Thomma *et al.*, 2001). Ein nekrotrophes Pathogen ist der Pilz *Alternaria brassicicola*, der zu der Gruppe der Deuteromyceten (Fungi imperfecti) gehört. Nicht alle

Vetreter der Gattung *Alternaria* sind nekrotroph, überwiegend leben sie saprophytisch, man findet sie im Boden oder in verfaulenden und abgestorbenen Pflanzengeweben. Auch *Alternaria* kann erhebliche wirtschaftliche Schäden verursachen. So befällt er eine Reihe verschiedener Nutzpflanzen, darunter verschiedene Getreidearten, Raps, Gemüse wie Blumenkohl, Karotte oder Kartoffel, aber auch Früchte wie Tomate oder Apfel (Thomma, 2003). Typische Krankheitssymptome sind das Auftreten von runden, braunen oder grauen Chlorosen und nekrotischen Läsionen, in deren Zentrum der Pilz sitzt (Kagan und Hammerschmidt, 2002; Thomma, 2003). Befällt *A. brassicicola* Rapspflanzen, so wird die sogenannte Rapsschwärze ausgelöst, welche Ernteverluste von bis zu 30 % mit sich bringen kann. *A. brassicicola* kann nahezu alle Vertreter der Gattung *Brassica* befallen (Maude und Humpherson-Jones, 1980; Pattanamahakul und Strange, 1999; Westman *et al.*, 1999). Auch *A. thaliana* stellt eine Wirtspflanze dar. Nach einer Infektion löst der Pilz die Akkumulation des Phytoalexins Camalexin aus, das antimikrobielle Eigenschaften besitzt (Thomma *et al.*, 1999). Die *Arabidopsis* Mutante *pad3-1* („*pytoalexin-deficient 3-1*“) zeigt aufgrund ihrer stark reduzierten Spiegel an Camalexin eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *A. brassicicola*. Das für PAD3 kodierende Gen schien damit zunächst eine Schlüsselrolle in der Resistenz gegenüber *A. brassicicola* zu spielen (Thomma *et al.*, 1999). Eine weitere Studie konnte diesen direkten Zusammenhang nicht bestätigen. Vielmehr wird spekuliert, dass an der Abwehr des Pathogens *A. brassicicola* verschiedene Signalwege in unterschiedlicher Gewichtung beteiligt sind (Kagan und Hammerschmidt, 2002).

3.3 Pflanzliche Resistenzmechanismen

Gegen die Mehrzahl an Mikroorganismen sind Pflanzen resistent. Resistenz lässt sich allgemein in die Wirts- und die Nichtwirtsresistenz gliedern. Die Nichtwirtsresistenz (=Basis-Inkompatibilität) basiert auf präformierten und induzierten Abwehrreaktionen (Heath, 2000a; siehe auch Kapitel 3.4). Die induzierte Resistenz (IR) ist eine unspezifische Resistenz in Form einer erhöhten Abwehrbereitschaft gegen eine Vielzahl von Stressfaktoren. Die IR ist gleichbedeutend mit dem „Priming“ und kann künstlich ausgelöst werden (Conrath *et al.*, 2001; Conrath *et al.*, 2002; Heil und Kost, 2006; van Hulst *et al.*, 2006). Werden diese Pflanzen zu einem späteren Zeitpunkt Stressfaktoren ausgesetzt, so können sie schneller und auch effektiver weitere Abwehrreaktionen aktivieren (Conrath *et al.*, 2002). Eine Quantifizierung der verursachten Effekte in einer Pflanze ist jedoch bisher nicht möglich (Conrath *et al.*, 2006).

Nach einem Pathogenbefall können Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber weiteren Infektionen entwickeln, die man als induzierte (ISR = „induced systemic resistance“) oder als

systemisch erworbene Resistenz (SAR = „systemic acquired resistance“) bezeichnet. Diese Immunität gegenüber nachfolgenden Infektionen kann bis zu einigen Monaten andauern (Thomma *et al.*, 2001). Nach Feys und Parker (2000) wird eine ISR Jasmonat- und Ethylen-abhängig induziert, wohingegen bei der Induktion der SAR die Salicylsäure eine Schlüsselrolle spielt. Eine SAR wird unabhängig vom Typ der Pathogeninfektion ausgelöst, setzt jedoch eine durch einen Pathogenkontakt bereits erfolgte HR voraus. Gegenüber nachfolgenden Infektionen mit verschiedenen Pathogenen sind Pflanzen dann langfristig geschützt (Ryals *et al.*, 1996). Durch die Identifikation der Mutante *npr1* („nonexpresser of *Pr* genes“) in *A. thaliana*, die nicht zur Ausprägung einer SAR befähigt ist, konnte gezeigt werden, dass das *npr1*-Gen ein positiver Regulator der SAR ist (Cao *et al.*, 1994). Das Vorhandensein eines funktionsfähigen Salicylatweges ist jedoch nicht die einzige Grundlage der Entstehung einer SAR, vielmehr besteht ein Zusammenspiel aus Salicylat-, Jasmonat- und Ethylen-vermittelter Abwehr.

Eine ISR wird im Gegensatz zu einer SAR durch Rhizobakterien verursacht (Dong, 1998; Pieterse *et al.*, 1998; Pieterse und van Loon, 1999). Erfolgt eine Besiedelung der Rhizosphäre von *A. thaliana* mit *Pseudomonas fluorescens*, so ist die Pflanze gegenüber anschließenden Pathogeninfektionen resistent. Es wurde gezeigt, dass die gleichzeitige Aktivierung von SAR und ISR in diesen Pflanzen zu einem erhöhten Schutz gegen eine nachfolgende Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* führt (van Wees *et al.*, 2000).

Gelang es einem Pathogen im Lauf der Evolution, die Basis-Inkompatibilität durch die Entwicklung von Pathogenitätsfaktoren oder Suppressoren zu brechen, so wurde die befallene Pflanze zu einer Wirtspflanze. Die Resistenz wird als Wirtsresistenz bezeichnet (Heath, 2000b; Rausher, 2001). In einem neueren Modell wird die Resistenz definiert als die Summe aus (PTI – ETS) + ETI. Die PTI ist definiert als eine durch PAMPs ausgelöste Immunität („PAMP-triggered immunity“), die ETS ist definiert als die Suszeptibilität gegenüber Effektoren von Pathogenen („effector-triggered immunity“). Die ETI schließlich beschreibt eine auf die ETS in Pflanzen evolvierte Immunität gegenüber den Effektoren der Pathogene (Jones und Dangl, 2006). Resistenz oder Anfälligkeit einer Pflanze gegenüber einem Pathogen ist also immer im Kontext einer Koevolution zwischen pflanzlichen Resistenzmechanismen und der Entwicklung von Virulenzfaktoren der Pathogene zu betrachten.

Die Wirtsresistenz lässt sich in eine horizontale und eine vertikale Resistenz unterteilen (Agrios, 1997). Unter der horizontalen Resistenz versteht man eine generelle unspezifische Resistenz, bei der eine Wirtspflanze Resistenz gegenüber allen Rassen eines Pathogens zeigt. Bei der vertikalen Resistenz liegt eine rassenspezifische Resistenz vor.

Die genetischen Grundlagen der spezifischen Resistenz einer Pflanze gegenüber einem Pathogen wurden bereits 1955 von Flor in der sogenannten Gen-für-Gen-Hypothese beschrieben. Nach dieser Hypothese liegt eine Resistenz dann vor, wenn eine Pflanze, die ein spezifisches Resistenz-Gen (*R*-Gen) besitzt, ein Pathogen mit korrespondierendem Avirulenzgen (*Avr*-Gen) erkennt. Das bedeutet, dass spezifische Genpaare für Wirt und Pathogen existieren müssen, damit eine spezifische Resistenz ausgelöst werden kann. Die Interaktion zwischen der resistenten Wirtspflanze und dem avirulenten Pathogen bezeichnet man als inkompatibel. Löst eine Pathogeninfektion hingegen in einer Pflanze eine Krankheit aus, so liegt eine kompatible Interaktion vor, das Pathogen bezeichnet man in diesem Fall als virulent. Intensiv untersucht wurden die kompatible und die inkompatible Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* (Whalen *et al.*, 1991; Dong *et al.*, 1991; Tao *et al.*, 2003). Neuere Untersuchungen konnten zeigen, dass die Avirulenzgen-Produkte Virulenzfaktoren des Pathogens sind (Desveaux *et al.*, 2006). Haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, um diese Virulenzfaktoren mit Hilfe von Resistenzproteinen zu erkennen, werden die Faktoren zu Avirulenzsignalen. In Übereinstimmung mit diesem Modell wurde für *P. syringae* bestätigt, dass das TTSS der Bakterien einerseits für die Pathogenität, andererseits für die Induktion der hypersensitiven Reaktion bedeutsam ist (Hauck *et al.*, 2003). Das Typ III Sekretionssystem ist für den Transport bakterieller Effektorproteine in pflanzliche Zellen verantwortlich (Alfano und Collmer, 1997; Goel *et al.*, 2008). Es besteht aus einem Proteinkomplex, der die innere und äußere Bakterienmembran durchspannt und wird in vielen phytopathogenen und tierpathogenen Bakterien gefunden (siehe auch Kapitel 3.2). Da mutierte Bakterien ohne funktionelles Typ III Sekretionssystem ihre Pathogenität einbüßen, wird das TTSS als essentiell für die Virulenz betrachtet (Petnicki-Ocwieja *et al.*, 2002; Alfano und Collmer, 2004). Die zunächst zugrundegelegte direkte Interaktion zwischen dem Resistenzprotein und dem Avirulenzprotein wurde jedoch nur für die Interaktionspartner PTO-AVRPTO und RRS1R-PopP2 experimentell bestätigt. Weitere Studien stützten vielmehr die sogenannte Guard-Hypothese, nach der Resistenzproteine die Aktivität verschiedener Avirulenzproteine erkennen, die mit derselben Bindungsstelle in der Pflanzenzelle interagieren (Quirino und Bent, 2003; Alfano und Collmer, 2004; Gomez-Gomez, 2004). Nach erfolgter Detektion der Veränderungen an dieser Bindungsstelle wird die Einleitung einer hypersensitiven Reaktion (HR) vermittelt. Diese lokal induzierte Abwehrreaktion ist häufig ein Begleiter von Resistenzreaktionen einer Pflanze gegenüber einem Pathogen (Staskawicz *et al.*, 1995). Lokal auftretende Nekrosen, die vermutlich aus dem programmierten Zelltod resultieren, sind ein Kennzeichen der HR (Heath, 2000a). Ziel einer HR ist letztendlich Stressvermeidung, indem infizierte Zellen sofort erkannt und eliminiert werden. Während einer HR werden reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sowie Stickstoffmonoxid gebildet, wodurch Plasmamembranen ihre Semipermeabilität verlieren und

phenolische Substanzen freigesetzt werden. Daraus wiederum resultieren der oben genannte lokale Zelltod und die nekrotischen Läsionen. Eine Ausbreitung des Pathogens wird so unterbunden (Buchanan *et al.*, 2000). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann zu einem sogenannten „oxidative burst“ führen. Dabei entstehen durch Ozon, Schwermetalle, Temperatur- oder Lichtstress, aber auch durch den Befall mit Pathogenen mehr ROS als von der Pflanze entgiftet werden können (Salin, 1987; Palmer und Paulson, 1997). Eine Akkumulation der ROS führt letztendlich zum Zelltod (Feys und Parker, 2000; Heath, 2000a).

3.4 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Zu den präformierten Abwehrmechanismen einer Pflanze zählen morphologische Barrieren wie beispielsweise die Kutikula. Durch Kutin, Suberin und Lignin kann diese weiter verstärkt werden, was das Eindringen von Mikroorganismen in die Pflanze erschwert. Im pflanzlichen Sekundärmetabolismus gebildete Substanzen weisen häufig antimikrobielle Eigenschaften auf. Beispiele hierfür sind Alkaloide und Polyphenole.

Überwindet ein Pathogen die präformierten Abwehrmechanismen einer Pflanze und verursacht eine Infektion, wird pflanzliches Abwehrverhalten nach einem Modell von Thomma *et al.* (2001) abhängig von der Art des Erregers induziert. Nach Befall mit biotrophen Erregern wird insbesondere der Salicylsäure-abhängige Signalweg induziert, wohingegen der Jasmonsäure-abhängige Signalweg in der Abwehr nekrotropher Erreger notwendig ist. Eine Regulation der verschiedenen Abwehrwege erfolgt jedoch nicht getrennt voneinander. Vielmehr konnte demonstriert werden, dass ein Netzwerk regulierter Interaktionen zur Abwehr von Pathogeninfektionen besteht (Nickstadt *et al.*, 2004). In der Modellpflanze *A. thaliana* konnten durch verschiedene Stressfaktoren unterschiedliche, sich teilweise überschneidende Abwehrreaktionen hervorgerufen werden (Schenk *et al.*, 2000). Unterschiede nach der Infektion von *A. thaliana* mit einem virulenten bzw. einem avirulenten Bakterienstamm von *P. syringae* traten hauptsächlich in der Geschwindigkeit der Aktivierung der Genregulation auf, jedoch weniger in der Qualität (Tao *et al.*, 2003).

Induzierte Abwehrreaktionen werden in Pflanzen lokal oder systemisch nach Kontakt mit Pathogenen aktiviert. Die Erkennung eines Pathogens durch eine Pflanze ist dabei der erste Aktivierungsschritt, sie erfolgt über sogenannte Elicitoren der Pathogene (Vasconsuelo und Boland, 2007). Man unterscheidet exogene und endogene Elicitoren.

Exogene Elicitoren weisen Ähnlichkeiten mit den PAMPs („pathogen associated molecular pattern“) in tierischen Organismen auf und werden daher auch im Pflanzenreich als PAMPs bzw. MAMPs („microbe associated molecular pattern“) bezeichnet. Beispiele sind

Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, Proteine oder Oligosaccharide. PAMPs kommen typischerweise in Mikroorganismen, jedoch nicht im Tier- und Pflanzenreich vor. Das Protein Flagellin, eine Komponente des Flagellums gramnegativer Bakterien, ist das am besten untersuchte PAMP. Ein Fragment des Flagellins von 22 Aminosäuren (flg22) Länge wirkt in *A. thaliana* und Tomate als Elicitor (Felix *et al.*, 1999). Bei dem Rezeptor für flg22, FLS2, handelt es sich um ein transmembranes Rezeptorkinase-Protein (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Die nach der Erkennung des Flagellins durch FLS2 ausgelösten Abwehrreaktionen beinhalten u.a. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden zur Signalweiterleitung und die Induktion von *Pr*-Proteinen (Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Endogene Elicitoren sind von der Pflanze selbst stammende Zellwandbruchstücke, die durch hydrolytische Enzyme freigesetzt werden.

Eine Elicitierung induziert, wie bereits angedeutet, verschiedene Abwehrreaktionen. Am schnellsten treten Ionentranslokationen ein, welche zu einem intrazellulären Anstieg an Ca^{2+} und K^+ führen. Im weiteren Verlauf einer Infektion kann dann die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) sowie die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Proteinen beobachtet werden (Yang *et al.*, 1997). Außerdem werden Zellwandverstärkungen (Kalloseablagerungen, Lignifizierung) ausgebildet sowie Phytoalexine und antimikrobielle Proteine synthetisiert (Glazebrook und Ausubel, 1994; Dangl und Jones, 2001; Thomma *et al.*, 2001). Kennzeichen der letztgenannten Reaktionen ist die Synthese *de novo*, d. h. diese Substanzen sind in gesundem Gewebe nicht oder nur in geringen Mengen vorhanden (Tsuji *et al.*, 1992). In *A. thaliana* wird nach Pathogeninfektionen vornehmlich das Phytoalexin Camalexin (3-Thiazol-2'-yl-Indol) gebildet (Tsuji *et al.*, 1992; Glazebrook und Ausubel, 1994; Rogers *et al.*, 1996).

Auch die Bildung von Signalmolekülen wie Salicylsäure (SA), Oxylipinen und Ethylen wird nach Pathogeninfektionen beobachtet. Die Biosynthese von Salicylsäure stellt einen wichtigen Kontrollpunkt in der pflanzlichen Abwehr dar. Sie erfolgt in Pflanzen ausgehend von Phenylalanin oder alternativ über Chorismat (Weiss und Edwards, 1980; Lee *et al.*, 1995; Verpoorte *et al.*, 1999; Shah, 2003). Mittels Mutantanalysen konnte gezeigt werden, dass eine schnelle Akkumulation von SA notwendig ist für eine effektive Abwehr gegen verschiedene Stressfaktoren. In den Mutanten *sid1* und *sid2* („salicylic acid-induction deficient“), in denen aufgrund eines Defektes im Chorismatweg keine SA akkumulieren kann, ist die Anfälligkeit gegenüber den Pathogenen *P. syringae* und *H. parasitica* erhöht (Nawrath und Métraux, 1999). Die SA-Signaltransduktionsmutante *npr1*, die zwar normale Spiegel an SA, jedoch eine gestörte Expressionsregulation von *Pr1* aufweist, ist ebenfalls sensitiver gegenüber Infektionen mit diesen Pathogenen (Cao *et al.*, 1997; Glazebrook, 1999). Die transgene Linie *nahG* akkumuliert aufgrund der Expression des bakteriellen Gens für die Salicylat-Hydroxylase keine SA und weist eine unterdrückte *Pr*-Genexpression auf.

Gegenüber viralen, pilzlichen und bakteriellen Pathogenen zeigt sie eine erhöhte Anfälligkeit (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*, 1994). Auch eine R-Gen abhängige HR („hypersensitive response“) gegenüber Pathogenen wird nicht ausgebildet (Delaney *et al.*, 1994).

Oxylipine sind Oxidationsprodukte von zumeist mehrfach ungesättigten Fettsäuren und können enzymatisch oder nicht-enzymatisch gebildet werden. Die Bildung nicht-enzymatischer Oxylipine wird durch freie Radikale, insbesondere durch Hydroxylradikale, katalysiert. Zu den in Pflanzen vorkommenden nicht-enzymatisch gebildeten Oxylipinen zählen Phytoprostane, Hydroxyfettsäuren und Malondialdehyd. Enzymatisch gebildete Oxylipine entstehen aus Linol- oder Linolensäure. Diese werden zunächst durch Lipoxygenasen umgesetzt in Hydroperoxide, welche zu einer Vielzahl von Verbindungen weiterreagieren können. Wichtige Oxylipine sind OPDA und Jasmonsäure. Ein Anstieg von Jasmonsäure in Pflanzen konnte nach der Einwirkung einer Reihe verschiedener biotischer und abiotischer Stressfaktoren gezeigt werden (Feussner und Wasternack, 2002; Wasternack, 2007).

Die Signaltransduktionseignisse nach Pathogeninfektionen führen, wie bereits beschrieben, zu einer veränderten pflanzlichen Genexpression. So werden beispielsweise *Pr1*, *Pr2* und *Pr5* durch Salicylsäure induziert. Vor allem *Pr1* wird als Marker für die SA-abhängige Pathogenabwehr angesehen (Glazebrook, 2001). Die Bedeutung der *Pr*-Gene in der Pathogenabwehr konnte ebenfalls durch Mutantanalysen gezeigt werden: Verschiedene *cpr* Mutanten („constitutive expresser of Pr-genes“), die konstitutiv *Pr*-Gene exprimieren, weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen auf (Bowling *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 1998). Die Mutante *npr1*, die in der SA-Signaltransduktion gestört ist, ist hingegen sensitiver gegenüber verschiedenen Pathogenen (Glazebrook, 1999).

3.5 Photosynthese und Chlorophyllfluoreszenz - konkurrierende Prozesse

Photosynthese ist definiert als ein Redoxprozess, bei dem Sonnenenergie genutzt wird, um unter Freisetzung von Sauerstoff H_2O zu oxidieren und CO_2 zu organischen Verbindungen zu reduzieren. Photosynthese findet an den Thylakoidmembranen in den Chloroplasten statt und läuft in zwei Teilschritten ab. In der Lichtreaktion werden mit Hilfe einfallender Lichtenergie die energiereichen Verbindungen ATP und NADPH gebildet. Während der lichtunabhängigen Dunkelreaktion werden diese Verbindungen dann für die Kohlenhydratbiosynthese genutzt.

Intakte Pflanzen verwenden nicht die gesamte einfallende Lichtenergie für die Photochemie (ca. 95 %). Geringe Teile werden auch in Form von Fluoreszenz (3 - 4 %) und Wärme (1 - 2

%) entwertet. Zu einem vernachlässigbar geringen Teil erfolgt die Energieabgabe des Weiteren durch Energietransfer. Unter der Annahme, dass der Anteil der abgegebenen Energie in Form von Wärme konstant ist, kann man durch Messung der Änderungen der Chlorophyllfluoreszenz auf die Intensität der Photosynthese schließen. Dieser in erster Näherung reziproke Zusammenhang zwischen Chlorophyllfluoreszenz und Photosynthese wurde zuerst von Kautsky und Hirsch (1931) beschrieben. Als Fluoreszenz wird generell die Lichtabstrahlung nach Lichtabsorption bezeichnet. Die am häufigsten untersuchte Fluoreszenz bei Pflanzen ist die dunkelrote Fluoreszenz. Daneben gibt es jedoch auch eine Reihe von Untersuchungen zur Blau-Grün-Fluoreszenz (Mazzinghi *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 1994; Morales *et al.*, 2005; Stober and Lichtenthaler, 2005). Zahlreiche Publikationen haben sich mit den theoretischen Aspekten, Anwendungsmöglichkeiten und der Definition verschiedener Parameter der Chlorophyllfluoreszenz beschäftigt (van Kooten und Snel, 1990; Krause und Weis, 1991; Lichtenthaler und Miehe, 1997; Maxwell und Johnson, 2000; Govindjee und Nedbal, 2000; Bilger *et al.*, 2001; Hunt, 2002; Rohacek, 2002; Krause und Jahns, 2003; Oxborough, 2004; Baker und Rosenqvist, 2004; Baker, 2008).

Die Vorteile von Chlorophyllfluoreszenzmessungen bestehen darin, dass die Methode nichtinvasiv, sensitiv und schnell ist (van Kooten und Snel, 1990). Wiederholte Messungen am gleichen Pflanzenmaterial unter sich ändernden Umweltbedingungen oder während der pflanzlichen Entwicklung sind möglich (Bilger *et al.*, 2001). Ergebnisse sind außerdem einfacher zu erzielen als über Messungen der CO₂-Aufnahme oder O₂-Abgabe.

3.6 Chlorophyllfluoreszenz und Stress

Die Untersuchung abiotischer Stressfaktoren auf die Chlorophyllfluoreszenz war Gegenstand einer Reihe von Studien. So erfolgten unter anderem Untersuchungen nach Kältestress (Fryer *et al.*, 1995; Tambussi *et al.*, 2004), Hitzestress (Hill *et al.*, 2004), Trockenstress (Flexas *et al.*, 2002), Salzstress (Belkhodja *et al.*, 1994), Nährstoffmangel (Wykoff *et al.*, 1998), Ozonbehandlung (Lorenzini *et al.*, 1999; Leipner *et al.*, 2001) und Lichtstress (Russell *et al.*, 1995; Pfündel, 2003; Bartak *et al.*, 2004). Es wurden für die Untersuchungen insbesondere Höhere Pflanzen, aber auch Grünalgen verwendet. Welche Parameter sich nach der Applikation von Stressfaktoren ändern, ist eine sehr spezifische Reaktion, die abhängig vom untersuchten System ist.

Bei der Suche nach neuen, resistenteren Pflanzenkultivaren können Chlorophyllfluoreszenzmessungen praktische Anwendung erfahren (Baker und Rosenqvist, 2004). Ebenso findet man eine große Anzahl von Studien, in denen die Wirkung biotischer Stressfaktoren auf die Chlorophyllfluoreszenz von Pflanzen untersucht wurde. Nach Befall

von Tabakpflanzen mit dem Tabakmosaikvirus konnte eine Abnahme der Photosyntheserate in infizierten Regionen unter verschiedenen Licht- und Nährstoffbedingungen gezeigt werden (Balachandran und Osmond, 1994, Balachandran *et al.*, 1994, Chaerle *et al.*, 2004). In der Interaktion zwischen dem *Abutilon* Mosaik Virus und *Abutilon striatum* konnten komplexe Zusammenhänge zwischen *Source-Sink*-Übergängen, der Photosynthese und dem nichtphotochemischen Quenching nachgewiesen werden (Lohaus *et al.*, 2000).

Der Einfluss von Pilzinfektionen auf die Chlorophyllfluoreszenz wurde ebenfalls in verschiedenen Studien erforscht. Pilzliche Infektionen hemmen die Elektronentransportrate lokal begrenzt innerhalb infizierter Bereiche (Peterson und Aylor, 1995; Scholes und Rolfe, 1996; Förchler *et al.*, 2003). In zwei weiteren Studien konnte zusätzlich jeweils ein distinkter Ring erhöhter photosynthetischer Aktivität um die Infektionsstellen beobachtet werden. Die Pflanze-Pathogen-Interaktionen zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Albugo candida* (Chou *et al.*, 2000) bzw. zwischen *Lycopersicon esculentum* und *Botrytis cinerea* (Berger *et al.*, 2004) wurden dabei untersucht. Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden zumeist für kompatible Interaktionen durchgeführt. Jedoch konnten auch für die inkompatiblen Interaktionen zwischen Tabak und *Phytophthora nicotianae* bzw. Gerste und *Blumeria graminis* Veränderungen der photosynthetischen Kapazität beobachtet werden (Scharte *et al.*, 2005; Swarbrick *et al.*, 2006).

Prinzipiell können Chlorophyllfluoreszenzmessungen für die Früherkennung von Pflanzenkrankheiten angewandt werden. Beispielsweise wurde die Methode als Werkzeug zur Überprüfung der Güte gelagerter Früchte genutzt (Nedbal *et al.*, 2000).

Auch eine natürliche bzw. entwicklungsabhängige Regulation von Photosynthese und Chlorophyllfluoreszenz konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Meng *et al.*, 2001; Humbeck und Krupinska, 2003; Walter *et al.*, 2003). Die Regulation bei der tropischen Pflanze *Ficus microcarpa* L. f. cv. *Golden Leaves* ist von der Stärke des Tageslichtes abhängig (Takahashi *et al.*, 2002). Mögliche Schäden durch Lichtstress werden dadurch von der Pflanze vermieden. In CAM-Pflanzen können charakteristische circadian regulierte Muster beobachtet werden (Rascher *et al.*, 2001).

3.7 Regulation von *Source*- und *Sink*-Übergängen

Die während der Photosynthese gebildeten Kohlenhydrate dienen Pflanzen zum Wachstum, zur Entwicklung und zur Differenzierung. Photosynthese findet lediglich in grünen Pflanzenteilen, den sogenannten *Source*-Gewebe statt. Die Kohlenhydrate werden effizient

vom Bildungsort zu *Sink*-Geweben wie Knospen, Blüten, Früchten, Knollen oder Wurzeln transportiert und dort verbraucht oder gespeichert.

Pflanzen nutzen für den Transport von Kohlenstoff-Assimilaten zumeist das Disaccharid Saccharose. Dieses besteht aus den Bausteinen Glucose und Fructose, die über eine α -1,2-glycosidische Bindung miteinander verknüpft sind. Pflanzliche Vertreter aus den Familien der *Cucurbitaceae*, *Scrophulariaceae* und *Verbenaceae* nutzen andere Oligosaccharide wie Raffinose oder Stachyose als Transportformen. Saccharose kann auch direkt als Speicherform von Kohlenhydraten eingesetzt werden, beispielsweise in Zuckerrohr (Zhu *et al.*, 2000). Die Saccharose stellt ein Signal für den Zuckerstatus dar (Roitsch 1999). Sie beeinflusst die Genexpression (Koch *et al.*, 1996) und hat damit eine regulatorische Funktion (siehe auch Kapitel 3.8).

Aus den *Source*-Geweben verläuft der Langstreckentransport der Saccharose entlang eines Konzentrationsgradienten im Phloem zu den *Sink*-Geweben. Die Entladung erfolgt symplastisch oder apoplastisch über Saccharosetransporter (Sauer, 2007). Saccharose selbst ist als Energiequelle für Pflanzen erst nach der Spaltung nutzbar, die Hydrolyse kann entweder enzymatisch durch Saccharosesynthasen oder durch Invertasen erfolgen. Saccharosesynthasen (EC 2.4.1.13) sind im Zytoplasma lokalisierte Glycosyltransferasen. Sie arbeiten reversibel und übertragen aus der Saccharose stammende Glucose auf UDP, wobei Fructose freigesetzt wird (Geigenberger und Stitt, 1993).

Die enzymatische Spaltung durch Invertasen (EC 3.2.1.26) hingegen erfolgt hydrolytisch unter Verbrauch eines Wassermoleküls und ist irreversibel (Geigenberger und Stitt, 1993).

3.8 Charakterisierung der Familie der Invertasen

Der Begriff Invertase bezieht sich auf Enzyme pilzlichen, bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs. Enzyme gleicher Funktion im Menschen werden als Saccharasen bezeichnet. Invertasen sind β -Fructofuranosidasen und werden in zwei Hauptklassen eingeteilt. Man unterscheidet Invertasen mit saurem/neutralen oder mit alkalischem pH-Optimum. Eine genauere Einteilung der Enzyme kann durch die Charakterisierung ihrer subzellulären Lokalisation, ihrer pH-Optima oder ihrer isoelektrischen Punkte getroffen werden (Sturm und Chrispeels, 1990; Roitsch und Tanner, 1995; Tymowska-Lalanne *et al.*, 1996). Während man Invertasen mit neutralem und alkalischen pH-Optimum im Zytosol findet, kommen die Invertasen mit saurem pH-Optimum entweder als apoplastisch an Zellwände gebundene (cwINV) oder als lösliche vakuoläre (vINV) Isoformen vor. Für alle Invertasen gilt ein K_M von etwa 1 bis 30 mM Saccharose für die hydrolytische Spaltung (Lee und Sturm, 1996; Ross *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996; Isla *et al.*, 1999). Invertasen sind meist glycosyliert.

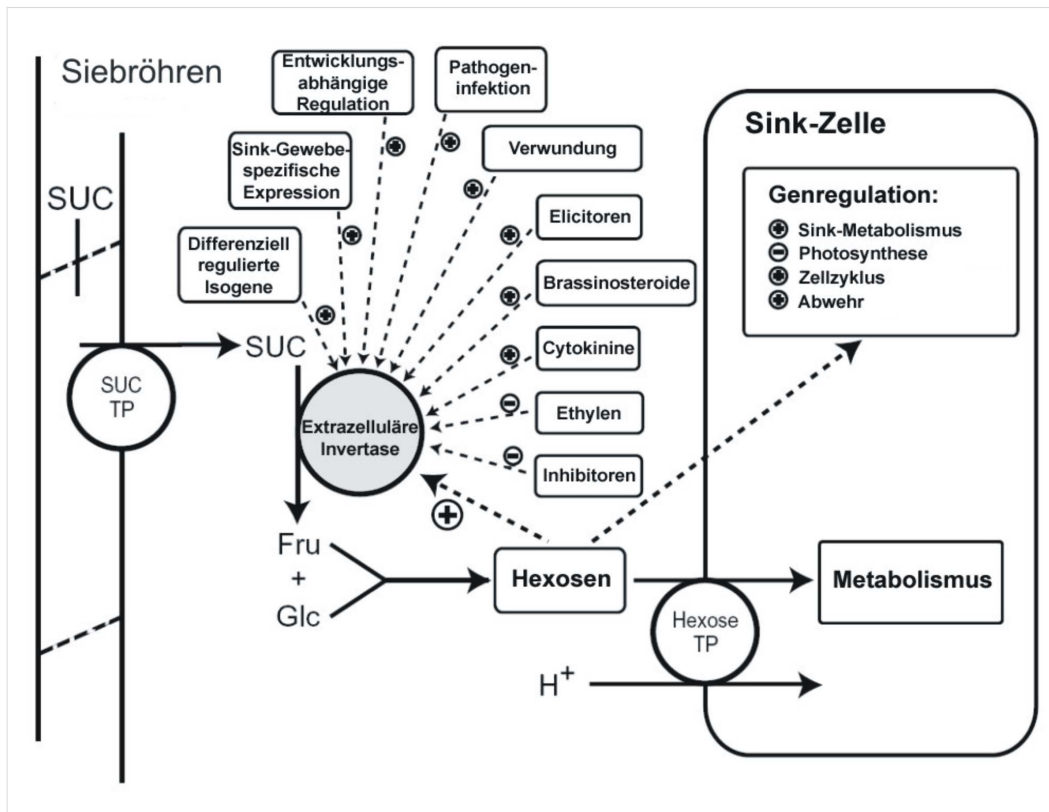


Abb. 1: Modell der apoplastischen Phloementladung in *Sink*-Geweben und Regulation von extrazellulären Invertasen. Saccharose (Suc) wird von einem Saccharosetransporter (Suc TP) aus den Siebröhren in den Apoplasten entladen, durch die extrazelluläre Invertase in die Hexosemonomere Glucose (Glc) und Fructose (Fru) gespalten und mit Hilfe eines Hexosetransporters (Hexose TP) in die *Sink*-Zelle aufgenommen. Extrazelluläre Invertasen werden reguliert durch eine Reihe von Stimuli, unter anderem durch die Hexosemonomere selbst, durch Phytohormone oder durch verschiedene Stressfaktoren. Zucker sind Substrate für das heterotrophe Wachstum und dienen als Signale für die Genregulation (verändert nach Roitsch *et al.*, 2000).

Die Hauptfunktion von extrazellulären Invertasen besteht im Transport von Zuckern über das Phloem, sie spielen daher eine zentrale Rolle im pflanzlichen Metabolismus. Ein Modell der apoplastischen Phloementladung und der Regulationsmöglichkeiten der extrazellulären Invertasen durch verschiedene Faktoren zeigt Abb. 1. Neben dem Transport von Zuckern sind weitere Aufgaben der Invertasen die Beeinflussung der *Sink*-Stärke von Geweben und die Beteiligung an *Source-Sink*-Übergängen. Sie stellen Schlüsselenzyme in der Verteilung des Assimilats Saccharose innerhalb der Pflanze dar (Roitsch *et al.*, 2003). Durch ihre Aktivität wird bestimmt, ob eine Zelle mit apoplastischer Saccharose oder Hexosen versorgt wird (Sherson *et al.*, 2003). Invertasen sind außerdem beteiligt an der Versorgung sich entwickelnder und wachsender Gewebe mit Hexosen, der Speicherung von Zuckern, der Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks, der Regulation verschiedener Gene, der Bereitstellung von Metaboliten für die Respiration und die Biosynthese von Primär- und Sekundärmetaboliten und der Weiterleitung von Stress-Signalen (Sturm, 1999).

Aufgrund hoher Sequenzhomologien werden die Invertasen mit saurem pH-Optimum zusammen mit den Fructosyltransferasen und den Fructan-Exohydrolasen einer Genfamilie

zugeordnet. Das Genom von *A. thaliana* enthält vier Gene, die für Zellwand gebundene Invertasen (*cwINV*) und zwei Gene, die für vakuoläre Invertasen (*vINV*) kodieren (de Coninck *et al.*, 2005). Das Molekulargewicht von Invertasen mit saurem pH-Optimum liegt zwischen 55 und 70 kD (Sturm, 1999).

Fructosyltransferasen können Fructane synthetisieren (Vijn und Smeekens, 1999). Fructane bestehen aus einer Saccharoseeinheit, die mit einer unterschiedlich großen Anzahl an Fructosyleinheiten verknüpft ist. Die meisten Invertasen weisen neben der sucrolytischen Eigenschaft die Fähigkeit auf, das Fructan 1-Kestose zu bilden, indem sie den Fructosylrest auf Saccharose anstelle von H₂O übertragen. Diese Fähigkeit zur Fructosyl-Übertragung belegt eine gemeinsame evolutionäre Herkunft von vakuolären Invertasen und Fructosyltransferasen. Zellwand gebundene Invertasen hingegen weisen Ähnlichkeit mit Fructan-Exohydrolasen (FEHs) auf, welche jedoch die β -(1,2)-glycosidische Bindungen der Saccharose nicht spalten können und als Substrate nur komplexere Fructane akzeptieren. Ein weiterer Unterschied zu den apoplastischen Zellwandinvertasen ist ihre Lokalisation in der Vakuole (van den Ende *et al.*, 2000; de Coninck *et al.*, 2005).

3.9 Bedeutung der Invertasen in der pflanzlichen Entwicklung

Die pflanzliche Entwicklung ist ein komplexer Prozess, der eine Vielzahl morphologischer und physiologischer Veränderungen beinhaltet. Die Assimilatproduktion und -verteilung stellt die molekulare Basis für Entwicklungsvorgänge dar. Das Vorkommen von Zuckern als Nährstoffe und Signalmoleküle ist unabdingbare Voraussetzung für Wachstum und Entwicklung (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2006). Keimlinge stellen ein sich schnell entwickelndes Mosaik aus *Source*- und *Sink*-Gewebe dar. Keimblätter sind *Source*-Gewebe, das Hypokotyl, die Sprossspitze und die Wurzeln hingegen repräsentieren *Sink*-Gewebe. Sich entwickelnde Blätter markieren den *Sink*-Zustand am Übergang zum *Source*-Zustand. Der Assimilattransport verläuft folglich aus den Keimblättern (*Source*) in Richtung der *Sink*-Gewebe. Vakuoläre Invertasen beeinflussen die Saccharosekonzentration in der Vakuole und regulieren die Zuckerkonzentrationen in pflanzlichen Speicherorganen wie Knollen und Früchten.

Transgene Pflanzen mit modulierter Invertaseaktivität weisen Veränderungen in verschiedenen Entwicklungsphasen auf. Mit Hilfe eines Antisense-Konstruktes hergestellte transgene Karotten mit reduzierter Invertaseaktivität zeigen phänotypische Veränderungen schon im Keimblattstadium. Im Gegensatz zu den Kontrollkeimlingen kann bei den transgenen Keimlingen keine Trennung in einzelne Keimblätter beobachtet werden, das Wachstum ist verkümmert. Durch Zugabe einer Mischung aus Saccharose, Glucose und

Fructose kann ein weitgehend normales Wachstum dieser Pflanzen erzielt werden. Die Studie konnte außerdem zeigen, dass die Aktivität von Invertasen für eine normale Keimlingsentwicklung über die Kontrolle der Zuckerzusammensetzung notwendig zu sein scheint (Tang *et al.*, 1999). Studien an transgenen Maispflanzen belegen diese Beobachtungen: Moduliert man die Aktivität von Invertasen, kommt es zu Entwicklungsstörungen in der Samenentwicklung (Miller und Chourey, 1992; Cheng und Chourey, 1997). Auch für eine normale Pollenentwicklung in Tabakpflanzen sind Invertasen essentiell, fehlt die Invertaseisoform Nin88, sind die Pflanzen männlich steril (Goetz *et al.*, 2001). Einen weiteren Nachweis zum Einfluss von Invertasen auf die Entwicklung lieferten Heyer *et al.* (2004). Exprimiert man eine Hefeinvertase im Blütenmeristem von *A. thaliana*, so blühen die Pflanzen früher und weisen zudem einen um 30 % höheren Samenertrag durch vermehrte Schotenbildung auf.

3.10 Regulation von Invertasen

Wie in Abb. 1 gezeigt (siehe Kapitel 3.8), können Invertasen durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren und Stimuli positiv oder negativ beeinflusst werden. Im Folgenden sollen diese Faktoren beschrieben werden, die Invertasen auf verschiedenen Ebenen regulieren können (Einteilung nach Lauer, 2006). Insbesondere soll auf die Regulation durch Invertaseinhibitoren eingegangen werden.

3.10.1 Effektoren der Invertaseaktivität

Produkthemmung: Eine Hemmung von Invertasen kann durch ihre Reaktionsprodukte erfolgen. Glucose kann Invertasen in einem nichtkompetitiven Mechanismus hemmen, ein kompetitiver Mechanismus konnte hingegen für Fructose nachgewiesen werden (Sampietro *et al.*, 1980; Burch *et al.*, 1992; Isla *et al.*, 1999).

pH-Wert: Auch der pH-Wert pflanzlicher Gewebe beeinflusst die Aktivität von Invertasen. Das Aktivitätsmaximum von Invertasen mit saurem pH-Optimum liegt zwischen pH 4,0 und 5,0. Das Optimum der vakuolären Invertasen liegt in einem Bereich, der etwa um pH 0,6 bis 0,9 höher ist als der der Zellwand gebundenen Invertasen (Krishnan und Pueppke, 1990; Tang *et al.*, 1996; Sturm 1999). Das Aktivitätsmaximum von Invertasen mit neutralem pH-Optimum liegt zwischen pH 7,0 und 7,8 (Ross *et al.*, 1996; Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998) und das von Invertasen mit alkalischem pH-Optimum bei einem pH-Wert von 8,5. Außerhalb der jeweiligen pH-Optima fällt die Aktivität der Enzyme sehr schnell ab. Veränderungen im pH-Wert des Apoplasten treten während der natürlichen pflanzlichen Entwicklung auf (Almeida und Huber, 1999). Insbesondere für Zellwand gebundene

Invertasen wird daher eine *in vivo* Regulation über Änderungen des pH-Werts diskutiert (Roitsch *et al.*, 1995; Blee und Anderson, 1998; Goetz und Roitsch, 1999).

Invertaseinhibitoren: Aufgrund der Bedeutung von Invertaseinhibitoren für die vorliegende Arbeit soll die Regulation von Invertasen durch die endogenen Proteine und durch andere pflanzliche und chemische Moleküle, die als Invertaseinhibitoren wirken können, in einem eigenen Kapitel behandelt werden (Kapitel 3.10.3).

3.10.2 Expressionkontrolle und Expressionsmuster von Invertasen

Expressionskontrolle: Die Regulation von Invertasen erfolgt auf Ebene der Expression in spezifischen, entwicklungsabhängigen und organ- bzw. gewebespezifischen Mustern (Tymowska-Lalanne *et al.*, 1996; Godt und Roitsch, 1997; Tymowska-Lalanne und Kreis, 1998). Ebenso wie die pflanzliche Abwehr werden auch Invertasen durch ein Netzwerk verschiedener Faktoren beeinflusst, so dass additive und synergistische Effekte entstehen können (Roitsch *et al.*, 2003).

Verschiedene Invertaseisoformen weisen charakteristische lokale und temporäre Expressionsmuster auf. Die räumliche und zeitliche Expression verschiedener Isoenzyme in Tomatenpflanzen wurde genau charakterisiert (Godt und Roitsch, 1997; Fridman und Zamir, 2003).

Lokalisation: Invertasen mit saurem pH-Optimum sind vornehmlich in *Sink*-Geweben lokalisiert. Genexpression und Enzymaktivität dieser Isoformen lassen sich daher insbesondere in Knospen, Blüten, Früchten, Knollen, Wurzeln oder jungen Blättern nachweisen. Eine Expression der Invertase CIN1 in *C. rubrum* ist dementsprechend in Wurzeln, jedoch nicht in Blättern und Stängeln nachweisbar (Roitsch *et al.*, 1995). Auch in Mais- und Tomatenpflanzen sind verschiedene Invertaseisoenzyme in *Sink*-, aber nicht in *Source*-Geweben detektierbar (Xu *et al.*, 1996; Godt und Roitsch, 1997). Ausnahmen sind für *L. temulentum*, *A. thaliana* sowie *L. esculentum* bekannt. Hier wurden auch in *Source*-Geweben Transkripte bzw. die Aktivität von Invertasen mit saurem pH-Optimum nachgewiesen (Kingston-Smith *et al.*, 1999; Fridman und Zamir, 2003).

Phytohormone: Phytohormone steuern und koordinieren das pflanzliche Wachstum, die Entwicklung und die Differenzierung. Durch Abscisinsäure beispielsweise konnte die Expression von Zellwand gebundenen und vakuolären Invertasen beeinflusst werden (Proels *et al.*, 2003; Trouverie *et al.*, 2004). Ein ähnlicher Effekt konnte auch für die Phytohormone Auxin und Gibberelinsäure gezeigt werden (Morris und Arthur, 1984). Verschiedene Studien in *Chenopodium*- bzw. Tomatenzellkulturen und an Tabakpflanzen konnten belegen, dass Invertasen auch durch Cytokinine beeinflussbar sind (Ehness und Roitsch, 1997; Godt und Roitsch, 1997; Balibrea-Lara *et al.*, 2004). In Tomatenzellkulturen konnte sowohl auf

transkriptioneller als auch auf posttranslationaler Ebene ein differentieller Effekt auf Invertasen durch Brassinosteroide gezeigt werden (Goetz *et al.*, 2000).

Zucker: Das Vorkommen verschiedener Zucker beeinflusst die Expression von Invertasen. Zucker, insbesondere Glucose, werden daher Signalmoleküle betrachtet (Roitsch *et al.*, 1995). Sie können die Expression von Genen des *Sink*-Metabolismus induzieren oder reprimieren. Durch die Steuerung einer Vielzahl weiterer Gene sind sie an verschiedensten Prozessen des pflanzlichen Stoffwechsels beteiligt, beispielsweise an der Photosynthese oder der Samenentwicklung (Koch *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Jang und Sheen, 1997; Wobus und Weber, 1999). Von Bedeutung scheinen dabei einerseits die Absolutkonzentrationen der einzelnen Zucker, andererseits ihre Verhältnisse zueinander zu sein. Hexosen induzieren Mitose und das pflanzliche Wachstum, Saccharose hingegen die Zelldifferenzierung (Roitsch *et al.*, 1999; Wobus und Weber, 1999). Ein Kennzeichen der Regulation von Invertasen durch Zucker ist der sogenannte Feed-forward-Mechanismus: Durch Zucker induzierte bzw. reprimierte Invertasen können durch Veränderung der relativen Zuckerkonzentration ihre eigene Transkription fördern bzw. hemmen. Es sind jedoch auch Invertaseisoformen bekannt, die keine Zuckerabhängigkeit zeigen (Sturm und Chrispeels, 1990; Weil und Rausch, 1990; Roitsch *et al.*, 1995). Zucker induzieren nicht nur Gene des *Sink*-Metabolismus, sondern auch Gene der pflanzlichen Abwehr. Reprimiert werden dagegen photosynthetische Gene (Koch, 1996; Ehness *et al.*, 1997).

Kälte: Unter dem Begriff „cold induced sweetening“ ist der Effekt bekannt, dass der Zuckergehalt kohlenhydratspeichernder Pflanzenorgane bei Kältelagerung ansteigt. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktivität einer vakuolären Invertase als Auslöser für diesen Effekt anzusehen ist (Zrenner *et al.*, 1996). Der eigentliche Nachweis erfolgte, indem gezeigt werden konnte, dass das Konzentrationsverhältnis zwischen Hexosen und Saccharose mit der extrahierbaren Invertaseaktivität korreliert, wohingegen kein Zusammenhang zwischen der Gesamtinvertaseaktivität und der Akkumulation reduzierender Zucker hergestellt werden konnte.

Trockenheit: Die Regulation von Invertasen nach Trockenstress ähnelt der Regulation nach mechanischer Verwundung (siehe unten). Verschiedene Studien an Maispflanzen konnten belegen, dass sowohl die Expression und Aktivität der vakuolären Invertase Ivr2 als auch die Konzentration an Hexosen nach Trockenstress ansteigen (Pelleschi *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2000). Andere Invertaseisoformen wie die vakuoläre Isoform Ivr1 oder die apoplastischen Isoformen Incw1 und Incw2 zeigen keine Regulation durch Trockenstress (Andersen *et al.*, 2002).

Verwundung: In einer Reihe von Studien wurde nachgewiesen, dass mechanische Verwundung spezifisch bestimmte Invertaseisoformen auf transkriptioneller und/oder der Aktivitätsebene beeinflusst (Sturm und Chrispeels, 1990; Ehness *et al.*, 1997; Godt und

Roitsch, 1997). In Rüben von *B. vulgaris* wird nach Verwundung zunächst die Zellwand gebundene Invertase CWI-1, im zeitlichen Verlauf jedoch auch die vakuoläre Invertase VI-1 auf transkriptioneller und auf der Proteinebene induziert. Die Invertasen CWI-2 und VI-2 blieben dagegen fast unbeeinflusst. In Übereinstimmung mit der erhöhten Invertaseaktivität konnte ein Anstieg der löslichen Zucker, vor allem von Glucose und Fructose, gemessen werden (Rosenkranz *et al.*, 2001).

Pathogene: Voraussetzung für das pflanzliche Abwehrverhalten ist eine schnelle Induktion des *Sink*-Metabolismus. Dadurch wird der erhöhte Energiebedarf gedeckt, der aufgrund der Entnahme von Assimilaten durch das Pathogen und der Induktion des Abwehrverhaltens selbst entsteht (Roitsch, 2004). Die Photosynthese wird als Reaktion auf einen Pathogenbefall erniedrigt, verursacht durch einen direkten Effekt des Pathogens auf die photosynthetischen Gene oder durch einen indirekten Effekt aufgrund des steigenden Assimilatflusses und des induzierten *Sink*-Metabolismus (Chou *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2004; Swarbrick *et al.*, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass pflanzliche Invertasen nach Infektion mit *Fusarium oxysporum* (Benhamou *et al.*, 1991), *Erysiphe cichoracearum* (Fotopoulos *et al.*, 2003) und *Erwinia carotovora* (Sturm und Chrispeels, 1990) reguliert werden. In der letztgenannten Studie wurde die Regulation von Invertasen aus Karotte nach der Infektion mit *E. carotovora* verglichen mit der Regulation nach mechanischer Verwundung. Nach der Pathogeninfektion konnten schneller Änderungen der Invertaseexpression beobachtet werden als nach Verwundung.

Auch Veränderungen der Zuckerspiegel lassen sich nach Pathogeninfektionen beobachten. Ein Anstieg der Zuckerspiegel konnte für die Interaktionen zwischen Weizen und *Erysiphe graminis*, zwischen *A. thaliana* und *Albugo candida*, zwischen Tabak und dem Kartoffelvirus PVY^N sowie zwischen Tabak und *Phytophthora nicotianae* beobachtet werden (Wright *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 2000; Herbers *et al.*, 2000; Scharte *et al.*, 2005). Interessanterweise konnte eine gegenteilige Regulation der Zuckerspiegel in Tomatenpflanzen festgestellt werden, die mit *B. cinerea* infiziert worden waren. Da die Konzentration der Saccharose stärker absank als die Konzentration an Hexosen, stieg das Verhältnis von Hexosen zu Saccharose an. Es wurde spekuliert, dass dieser Befund auf eine erhöhte Aktivität der pflanzlichen Invertasen zurückzuführen ist (Berger *et al.*, 2004).

Ein Umstand, der Untersuchungen zur Regulation von Invertasen und der Kohlenhydratverteilung nach einem Pathogenbefall komplexer macht, ist die Tatsache, dass auch Pathogene bekannt sind, die Invertasen bilden können. Beispiele hierfür sind der nekrotrophe Pilz *Botrytis cinerea* oder der obligat biotrophe Pilz *Uromyces fabae* (Geissmann *et al.*, 1991; Voegelé *et al.*, 2006). Noch ungeklärt ist die Frage, ob die Invertasen, die von den Pathogenen gebildet werden, für deren Pathogenität notwendig sind.

3.10.3 Regulation durch Invertaseinhibitoren

Endogene proteinogene Invertaseinhibitoren: Da Invertasen sehr stabile Enzyme sind, haben Pflanzen neben den bereits beschriebenen Regulationsmechanismen eine weitere Möglichkeit verwirklicht, die Aktivität von Invertasen während verschiedener Differenzierungsprozesse räumlich und zeitlich zu kontrollieren (Rausch und Greiner, 2003). Am Übergang von Geweben mit hoher meristematischer Aktivität zu den vegetativen Speicherorganen ist eine Repression der Invertaseaktivität notwendig (Link *et al.*, 2004). Diese Aufgabe wird durch spezifische endogene Proteine, die Invertaseinhibitoren übernommen, deren Vorkommen in Kartoffeln schon vor über 40 Jahren postuliert wurde (Pressey, 1967). Bis heute konnten Invertaseinhibitoren in einer Vielzahl von Pflanzen nachgewiesen werden (Pressey, 1968; Schwimmer *et al.*, 1991; Pressey, 1994; Krausgrill *et al.*, 1998). Sie hemmen die Aktivität der Invertasen nichtkompetitiv, indem sie mit diesen einen reversiblen Komplex ausbilden. Abhängig von ihrer Lokalisation können die Invertaseinhibitoren ebenso wie die Invertasen in Zellwand gebundene und vakuoläre Inhibitoren eingeteilt werden. Invertaseinhibitoren besitzen pH-Wert abhängig ein Molekulargewicht zwischen 16 und 20 kD (Horthorn *et al.*, 2003). Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte die Kristallstruktur des Invertaseinhibitors *NtCIF* aufgeklärt werden. Das Strukturmodell lässt ein asymmetrisches 4-Helix-Bündel mit einer ungewöhnlichen Verlängerung in Form einer helikalen Haarnadel am N-terminalen Ende erkennen, welche als Voraussetzung für die strukturelle Intaktheit und die Spezifität des Proteins gilt (Horthorn *et al.*, 2004a und b).

Invertaseinhibitoren sind gekennzeichnet durch bestimmte physikochemische Eigenschaften: Im Gegensatz zu den Invertasen sind Invertaseinhibitoren nicht glycosyliert (Pressey, 1994; Weil *et al.*, 1994), was auf eine mögliche Komplexbildung zwischen den beiden Proteinen hindeutet. Invertaseinhibitoren sind hitzestabile Proteine mit einer Schmelztemperatur von ca. 70°C (Pressey, 1994; Horthorn *et al.*, 2004a). Im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen sind sie auch bei sehr niedrigen pH-Werten stabil, ihr Aktivitätsmaximum liegt bei einem pH von etwa 4,5. Sie besitzen dadurch eine Eigenschaft, die dazu genutzt werden kann, um Inhibitoren aus pflanzlichen Proteinextrakten aufzureinigen (Pressey, 1967; Pressey, 1994). Ähnlich wie die Expression und Aktivität von Invertasen werden auch Invertaseinhibitoren gewebe- und entwicklungsabhängig reguliert. Sie konnten vor allem in Speichergeweben wie roter Beete, Zuckerrübe oder Süßkartoffel nachgewiesen werden (Pressey, 1968). Auch in der frühen Entwicklung von Maiskörnern konnte eine Invertaseinhibitoraktivität gezeigt werden (Bate *et al.*, 2004). Studien an *N. tabacum* und *A. thaliana* konnten zeigen, dass Invertaseinhibitoren nicht ausschließlich in Speichergeweben vorkommen. Während der Invertaseinhibitor *NtCIF* (Y12805) aus Tabak vor allem in Blüten, aber auch in *Source-*

Blättern und Stängeln exprimiert wird, ist die vakuoläre Form *NtVIF* (Y12806) insgesamt schwächer und vor allem in Wurzeln und Stängeln nachweisbar (Greiner *et al.*, 1998). Ein ähnlich differentielles Expressionsmuster zweier Invertaseinhibitoren aus *A. thaliana* konnte von Link *et al.* (2004) gezeigt werden. Während *AtC/VIF1* (At1g47960) ausschließlich in vaskulärem Gewebe exprimiert wird, findet man *AtC/VIF2* (At5g64620) innerhalb der gesamten Pflanze. Es wurde postuliert, dass *AtC/VIF1* spezifisch die Aktivität vakuolärer Invertasen hemmt, wohingegen *AtC/VIF2* insbesondere die vakuolären, jedoch auch die Zellwand gebundenen Invertasen hemmen kann. Daraus wird deutlich, dass die Spezifität von Invertaseinhibitoren gegenüber einzelnen Invertasen als gering einzustufen ist. Verschiedene Faktoren können einen Einfluss auf die Bindungsrate zwischen Invertase und Inhibitor haben, dazu zählen Salze, der pH-Wert, die Temperatur und Zucker. Salze, insbesondere zweiwertige Kationen verringern die inhibitorische Wirkung der Inhibitorproteine in starkem Maß (Anderson *et al.*, 1980; Weil *et al.*, 1994). Die Bindung zwischen Invertase und Inhibitor ist bei pH 4,5 am stärksten. Man nimmt an, dass die Änderungen des pH-Wertes Veränderungen an den Invertasen bewirken, damit eine Bindung erfolgen kann (Horthorn *et al.*, 2004a). Den Einfluss der Temperatur auf die Bildung eines Komplexes zwischen Invertase und Inhibitor haben Jaynes und Nelson (1971) untersucht. Niedrige Temperaturen führen zu einer verminderten Bindungsrate. Zucker, vor allem Saccharose, können Invertasen konzentrationsabhängig vor einer Inhibition schützen (Weil *et al.*, 1994). Wenig bekannt ist hingegen über die Modulatoren und Mechanismen, die die Expression der Invertaseinhibitoren kontrollieren. Untersucht ist, dass der Inhibitor *NtCIF* durch Abscisinsäure und das Osmotikum Polyethylenglycol (PEG) beeinflusst wird (Rausch und Greiner, 2004).

Die Funktion von Invertaseinhibitoren wird klar, wenn man sich verdeutlicht, dass Invertasen glycosylierte Proteine und damit stabil gegenüber einem Proteinabbau sind (Yamaguchi, 2002). Zwar sind eine Reihe von Regulationsmöglichkeiten für Invertasen bekannt (siehe oben), diese erfolgen jedoch zumeist auf transkriptioneller Ebene. Auf der Aktivitätsebene können Invertasen durch endogene Invertaseinhibitoren reguliert werden. Bis heute ist jedoch nur wenig über die tatsächliche Bindung zwischen Invertase und Inhibitor *in vivo* bekannt. Nachgewiesen ist, dass beide Proteine häufig in den gleichen Pflanzengeweben auftreten (Pressey, 1968; Krausgrill *et al.*, 1998). Auf den Inhibitionsstatus *in vivo* kann aus dieser Beobachtung jedoch nicht geschlossen werden (Krausgrill *et al.*, 1998; Lauer, 2006).

Calystegine: Calystegine sind Produkte des Tropanalkaloidbiosyntheseweges, deren Kennzeichen ein unterschiedlich häufig hydroxyliertes 8-Azabicyclo[3.2.1]octan-Grundgerüst ist (Dräger, 2004). Die verschiedenen Calystegine unterscheiden sich durch ihre Hydroxylierungsgrade, deren Positionen und stereochemischen Anordnungen. Calystegine

akkumulieren vor allem in Vertretern der Solanaceen (Bekkouche *et al.*, 2001), erstmals beschrieben wurde ihr Vorkommen in *Calystegia sepium*. Sie akkumulieren dort in einem entwicklungsabhängigen Muster, vor allem in jungen und meristematischen Geweben (Scholl *et al.*, 2001). Es wurde beschrieben, dass Calystegine als kompetitive Glucosidaseinhibitoren wirken können (Molyneux *et al.*, 1993; Dräger, 2004). Dass auch pflanzliche Invertasen von Calysteginen gehemmt werden, jedoch in Pathogenversuchen keine Interaktion mit Pilzinvertasen stattfindet, konnte ebenfalls gezeigt werden (Höke und Dräger, 2003).

Glycosidaseinhibitoren werden in der medizinischen Therapie bei der Behandlung von Diabetes mellitus eingesetzt. Glycosidasen sind erforderlich bei der Biosynthese von Glycoproteinen und dem lysosomalen Abbau von Glykokonjugaten sowie bei der intestinalen Verdauung (Asano *et al.*, 2000a). Glycosidaseinhibitoren hemmen α -Glucosidasen und verhindern somit den Anstieg der Blutglucose nach der Nahrungsaufnahme (Asano *et al.*, 2001a).

Calystegine werden nicht therapeutisch angewandt, jedoch gibt es andere α -Glucosidaseinhibitoren, die zur therapeutischen Anwendung zugelassen sind, vornehmlich Acarbose ($C_{25}H_{45}NO_{18}$), Miglitol ($C_8H_{17}NO_5$) und Voglibose ($C_{10}H_{21}NO_7$). Miglitol ist ein Pseudomonosaccharid, welches als Diastabol® vertrieben wird, Voglibose ist unter den Namen Volix® oder Vocarb® im Handel zu finden.

Acarbose: Acarbose ist ein stickstoffhaltiges Pseudotetrasaccharid, das in gram-positiven Bakterien der Gruppe der Actinomyceten produziert wird. Das charakteristische Strukturmerkmal der Acarbose und ihrer Homologen, die sich in der Anzahl der Glucosereste unterscheiden, ist die Acarviosyl-Einheit. Je nach vorhandenen Kohlenstoffquellen im Kulturmedium kommen die Unterschiede in den Produkten zustande (Thomas, 2001). Seit 1990 wird Acarbose in einem Fermentationsprozess aus dem Bakterium *Actinoplanes utahensis* gewonnen. Sie ist unter dem Namen Glucobay® zur Behandlung von Diabetes mellitus im Handel. Durch die Einnahme von Glucobay® wird die Freisetzung von Monosacchariden und somit die Resorption von Glucose aus dem Darm verzögert. Der typische Anstieg des Blutzuckerspiegels nach einer Mahlzeit wird reduziert. Dies wird erzielt, indem die Acarbose mit den Enzymen sehr stabile Enzym-Inhibitor-Komplexe ausbildet, da sie im Vergleich zu Saccharose eine rund 15000-fach höhere Affinität zu Saccharasen aufweist (Wehmeier, 2004).

Neben der therapeutischen Wirkung beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Acarbose als Saccharose- α -D-glukohydrolase-Inhibitor (EC 3.2.1.148) in der Lage ist, die Invertaseaktivität in Proteinextrakten aus Pilzmycel zu hemmen (Höke und Dräger, 2004).

Auch synthetisch erzeugte Substanzen können die Fähigkeit besitzen, α -Glucosidasen sowie β -Fructofuranosidasen zu inhibieren. So hemmt ein synthetisches β -Thio-fructofuranosid des Mercaptoethanols, Fru-S-Me, Invertasen von *Aspergillus niger*, *Candida* sp. und *Saccharomyces cerevisiae* (Kiso *et al.*, 2003). Die Synthese dieses β -Thio-fructofuranosids erfolgte durch Transfructosylierung mittels β -Fructofuranosidase von Saccharose auf Mercaptoethanol (Nakano *et al.*, 2000).

3.11 Zielsetzung der Arbeit

Eine koordinierte Regulation von Photosynthese, Kohlenhydratmetabolismus und Abwehrverhalten konnte für verschiedene Pathosysteme beschrieben werden (Jang und Sheen, 1994; Herbers *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2004). Im Zentrum dieser Arbeit soll die Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydratmetabolismus und Pathogeninfektion für die Pflanze-Pathogen-Interaktionen zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas syringae* bzw. *Alternaria brassicicola* stehen.

Zunächst soll dafür eine Analyse der beiden Interaktionen auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Veränderungen der Photosynthese sollen mit Hilfe Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung aufgezeichnet werden. Die Methode ist dazu besonders geeignet, da sie wiederholte Aufnahmen am gleichen Pflanzenmaterial zulässt und für die Früherkennung von Krankheiten an Nutzpflanzen eingesetzt werden kann (Nedbal *et al.*, 2000; Chaerle *et al.*, 2007). Auf transkriptioneller Ebene soll nach einer Pathogeninfektion die Regulation der verschiedenen Gene ermittelt werden, auf posttranslationaler Ebene sollen die Aktivität von Invertasen, ihre Regulation durch endogene Invertaseinhibitoren und die Zuckerspiegel bestimmt werden.

In einem zweiten Aspekt dieser Arbeit soll mit Hilfe verschiedener funktioneller Ansätze die Rolle der Invertasen während einer Pathogeninfektion charakterisiert werden. In einem pharmakologischen Ansatz soll der zur Behandlung von Diabetes eingesetzte α -Glucosidaseinhibitor Acarbose zur Hemmung pflanzlicher Invertasen eingesetzt werden. Untersuchungen zur Regulation von Photosynthese, Kohlenhydratmetabolismus und Abwehrverhalten sollen nach gleichzeitiger Behandlung mit Acarbose und *P. syringae* durchgeführt werden. Da der Salicylsäure-vermittelte Signalweg der pflanzlichen Abwehr eine essentielle Komponente in der Abwehr von *P. syringae* darstellt, soll untersucht werden, ob Acarbose über eine Modulation dieses Abwehrweges wirkt.

In einem weiteren funktionellen Ansatz sollen mit Hilfe transgener Pflanzen, deren Invertaseaktivität posttranslational durch die Expression von Invertaseinhibitoren moduliert

wird, Untersuchungen zur Bedeutung der Invertasen in Planze-Pathogen-Interaktionen durchgeführt werden.

Da in verschiedenen Studien eine essentielle Funktion von Invertasen während der gesamten pflanzlichen Entwicklung nachgewiesen werden konnte (Miller und Chourey, 1992; Cheng und Chourey, 1997; Tang *et al.*, 1999; Goetz *et al.*, 2001; Heyer *et al.*, 2004), soll in einem dritten Aspekt die Bedeutung von Invertasen in der frühen Keimlingsentwicklung ermittelt werden.

4 Ergebnisse

In wissenschaftlichen Publikationen wird die Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas syringae* als Modellsystem in der Analyse von Pflanze-Pathogen-Interaktionen bezeichnet, da von beiden Interaktionspartnern die Sequenzen vollständig bekannt sind (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; Buell *et al.*, 2003). Während die Interaktion in Bezug auf die ausgelösten Abwehrmechanismen in der Pflanze gut charakterisiert wurde (Tao *et al.*, 2003), ist bisher nur wenig über die koordinierte Regulation von Photosynthese, Kohlenhydratstoffwechsel und Abwehr bekannt. Um Regulationsvorgänge im Gesamtkontext der Pflanze verstehen zu können, ist neben der Kenntnis der Abwehrmechanismen insbesondere die Kenntnis regulierter Vorgänge innerhalb des Primärmetabolismus wichtig. Es wurde daher zunächst eine Charakterisierung einer kompatiblen und einer inkompatiblen Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* und der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* durchgeführt. Verschiedene Pflanze-Pathogen-Interaktionen sollten untersucht werden, da bekannt ist, dass durch verschiedene Mikroorganismen unterschiedliches pflanzliches Abwehrverhalten ausgelöst werden kann (Thomma *et al.*, 2001a).

4.1 Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen

4.1.1 Phänotypische Charakterisierung

Die Infiltration von *A. thaliana* Col-0 mit dem virulenten Bakterienstamm DC3000 bzw. dem avirulenten Stamm avrRPM1 erfolgte mit einer Bakteriensuspension der Dichte 1×10^7 cfu/ml in ausgewählte Blätter. Eine Kontrollbehandlung erfolgte durch Infiltration mit 10 mM $MgCl_2$. Zum Zeitpunkt 24 h nach der Infiltration mit DC3000 konnte der Beginn der Ausbildung schwacher Läsionen beobachtet werden, wohingegen die Läsionen nach Infiltration von avrRPM1 bereits deutlich sichtbar waren. 48 h nach der Infiltration waren in beiden Interaktionen starke Nekrosen erkennbar (Abb. 2A und B). Teilweise konnte ein chlorotischer Rand beobachtet werden, der die Infektionsstelle umgab.

Infektionen mit *A. brassicicola* erfolgten durch Betropfen ausgewählter Blätter mit einer Sporensuspension der Dichte 5×10^5 Sporen/ml. Nach Inkubation der Pflanzen über Nacht bei 100 % Luftfeuchtigkeit konnten 24 h nach Infektion sehr schwache, 48 h nach Infektion deutliche Nekrosen beobachtet werden (Abb. 2C). Auch hier konnte zum Teil ein chlorotischer, die Infektionsstelle umgebender Rand beobachtet werden. Als

Kontrollbehandlung wurden Pflanzen mit H₂O anstelle der Sporensuspension betropft und unter gleichen Bedingungen wie die infizierten Pflanzen inkubiert.

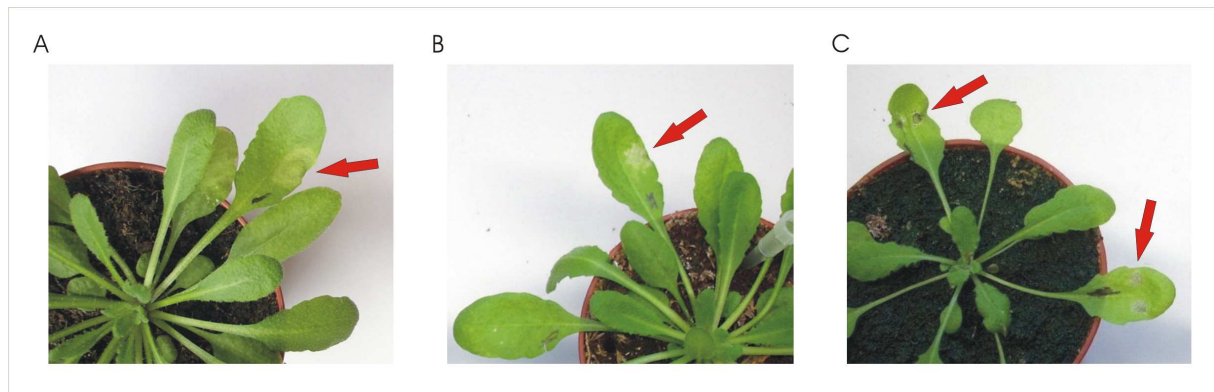


Abb. 2: Phänotypische Ausprägung von Nekrosen 48 h nach Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (A) bzw. *avrRPM1* (B) in einer Konzentration von 1×10^7 cfu/ml oder *A. brassicicola* (C) in einer Konzentration von 5×10^5 Sporen/ml.

4.1.2 Regulation der photosynthetischen Aktivität

Zur Untersuchung der Photosynthese in infizierten Pflanzen wurde die Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung gewählt. Es wurden die Parameter maximale Quantenausbeute des PSII (Fv/Fm), die effektive Quantenausbeute des PSII (Y(II)) und das nichtphotochemische Quenching (qN) betrachtet.

Zum Zeitpunkt 24 h nach einer Infiltration mit *avrRPM1* konnten deutliche Veränderungen in allen drei Parametern aufgenommen werden. Sowohl Fv/Fm als auch Y(II) sanken, wohingegen für qN eine komplexe Regulation dokumentiert werden konnte (Abb. 3A). Da die Veränderungen nur in den infizierten Blättern, nicht jedoch nach der Infiltration von MgCl₂ detektierbar waren, mussten sie auf das Pathogen zurückzuführen sein, ein Effekt der Infiltration selbst konnte ausgeschlossen werden. Ein interessanter Befund ist, dass die beobachteten Veränderungen in den photosynthetischen Parametern nur lokal innerhalb sowie direkt um die Infiltrationsstelle auftraten. Während die Parameter Fv/Fm und Y(II) von außen in Richtung des Infektionszentrums eine graduelle Abnahme zeigten, war das nichtphotochemische Quenching qN in den Randbereichen deutlich erniedrigt, wohingegen es im Infektionszentrum eher erhöht war. Da zum Zeitpunkt 24 h nach einer Infektion bereits phänotypisch nekrotisches Gewebe erkennbar war, musste ein sekundärer Schaden erfolgt sein.

Auch in der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* konnten 48 h nach einer Infiltration deutliche Veränderungen in allen drei Parametern aufgenommen werden. Die Quantenausbeuten Fv/Fm und Y(II) waren erniedrigt, wohingegen für qN keine eindeutige Regulation dokumentiert werden konnte (Abb. 3B). Da Veränderungen nur in infizierten

Bereichen, nicht jedoch nach der Behandlung mit H₂O beobachtbar waren, mussten diese auf den Pilz selbst zurückzuführen sein. Wie in der Interaktion mit *P. syringae* traten Veränderungen nur lokal innerhalb der Infektionsstelle auf. Im Gegensatz zu der Interaktion mit dem Bakterium ließ sich für die Parameter Fv/Fm und Y(II) im Infektionsbereich keine deutliche graduelle Abnahme beobachten. Die Messwerte für das nichtphotochemische Quenching waren im Vergleich zu den unbehandelten Blattbereichen teilweise erhöht und teilweise erniedrigt. Es konnte jedoch keine koordinierte Regulation festgestellt werden.

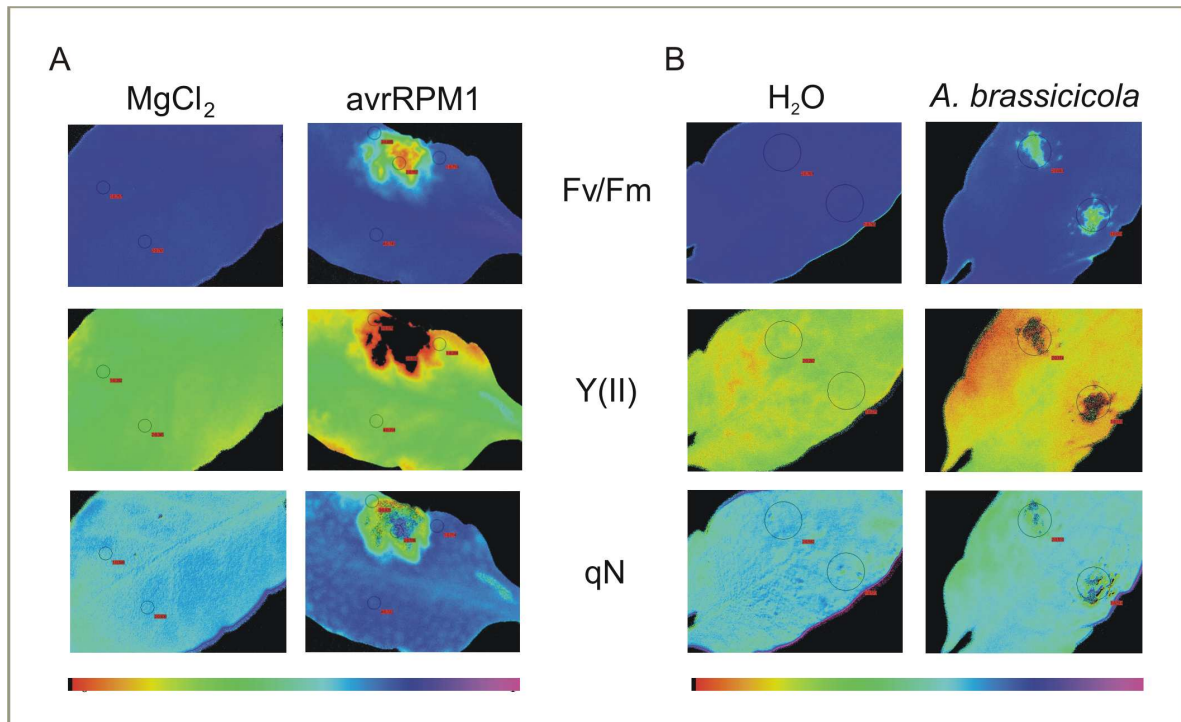


Abb. 3: Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenzparameter Fv/Fm, Y(II) und qN in Blättern von *A. thaliana* nach Pathogeninfektionen im Vergleich zu Kontrollbehandlungen. Veränderungen der Parameter wurden 24 h nach Infektion mit dem avirulenten Bakterienstamm avrRPM1 im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl₂ (A) oder 48 h nach Infektion mit *A. brassicicola* im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit H₂O (B) dokumentiert. Die roten Fähnchen zeigen die Mittelwerte aus den ausgewählten Bereichen für die einzelnen Parameter an. Die Falschfarbenskala reicht von 0.00 (schwarz) bis 1.00 (violett) (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

Da Pathogeninfektionen Veränderungen in verschiedenen Chlorophyllfluoreszenzparametern bewirkten, wurden weitere Versuche zur Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Infektion durchgeführt, zunächst wieder für die Interaktion mit *P. syringae*. Die gewählten Zeitpunkte orientierten sich am phänotypischen Verlauf einer Infektion. Der Zeitpunkt 3 h nach Infektion (1×10^7 cfu/ml) wurde gewählt, da weder in der kompatiblen noch in der inkompatiblen Interaktion sichtbare Symptome beobachtet werden konnten. Der zweite Messzeitpunkt erfolgte 24 h nach der Infektion (p. i.). Die Ausbildung von Nekrosen war zu diesem Zeitpunkt in der inkompatiblen Interaktion deutlich sichtbar, in der kompatiblen Interaktion begann 24 h

p. i. die Ausbildung der Nekrosen. Der dritte Zeitpunkt wurde so gewählt, dass in beiden Interaktionen starke Nekrosen sichtbar waren (48 h p. i.).

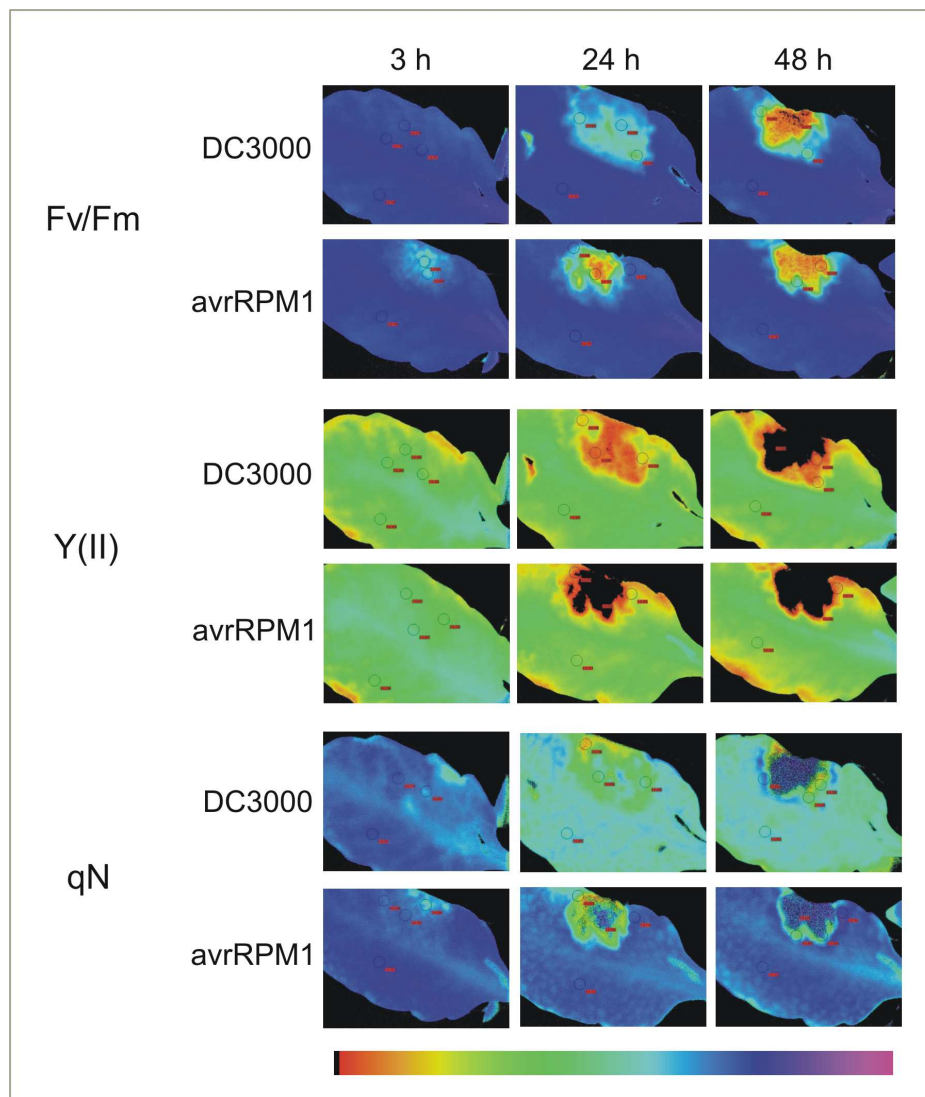


Abb. 4: Vergleich der Auswirkungen einer Infektion mit dem virulenten (DC3000) oder dem avirulenten (avrRPM1) Bakterienstamm von *P. syringae* auf die Chlorophyllfluoreszenzparameter Fv/Fm, Y(II) und qN. Blätter von *A. thaliana* wurden mit DC3000 bzw. avrRPM1 infiziert und zu den Zeitpunkten 3 h, 24 h und 48 h nach der Infektion analysiert. Die roten Fähnchen zeigen die Mittelwerte aus den ausgewählten Bereichen für die einzelnen Parameter an. Die Falschfarbenskala reicht von 0.00 (schwarz) bis 1.00 (violett) (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

Alle drei gemessenen Parameter sanken im Zeitverlauf einer Infektion. In der inkompatiblen Interaktion konnten Veränderungen in den Parametern Fv/Fm und qN, zum Teil auch beim Parameter Y(II), bereits vor dem Auftreten sichtbarer Symptome zum Zeitpunkt 3 h p. i. detektiert werden, was einen Einsatz der Chlorophyllfluoreszenz in der Früherkennung von Krankheiten prinzipiell ermöglichen würde (Abb. 4).

Zum Zeitpunkt 24 h p. i. war die Abnahme der photosynthetischen Aktivität in der inkompatiblen Interaktion stärker als in der kompatiblen Interaktion, die flächenmäßige

Ausdehnung war jedoch in beiden Interaktionen vergleichbar. Bis zum Zeitpunkt 48 h p. i. nahm die Photosyntheseaktivität in der inkompatiblen Interaktion im Gegensatz zur kompatiblen Interaktion nur noch geringfügig weiter ab. Dies hatte zur Folge, dass zum Zeitpunkt 48 h p. i. die Photosyntheseaktivität in der kompatiblen Interaktion auf ein ähnliches oder geringeres Niveau gesunken war wie in der kompatiblen Interaktion. Das nichtphotochemische Quenching zeigte im Infektionsverlauf ein komplexes Regulationsmuster. Nach einer Erniedrigung zum Zeitpunkt 24 h p. i. stieg q_N bis zum Zeitpunkt 48 h p. i. wieder an.

Um die Daten aus den Chlorophyllfluoreszenzmessungen nicht nur phänotypisch auszuwerten, wurde eine quantitative Analyse der Daten durchgeführt. Gleichzeitig sollte getestet werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an infiltrierten Bakterien und der Ausprägung der Symptome besteht. Dazu wurden Pflanzen mit drei verschiedenen Konzentrationen an Bakterien infiltriert und die Parameter F_v/F_m , $Y(II)$ und q_N nach 3 h und 24 h gemessen. Die infiltrierten Bereiche (AOI) von jeweils neun unabhängigen Pflanzen wurden markiert und die Mittelwerte dieser Flächen für die einzelnen Parameter durch das Programm ImagingWin berechnet. Die Auswertung mit Hilfe des Newman-Keuls-Tests nach der Varianzanalyse ANOVA ergab für die Bakterienkonzentration 1×10^6 cfu/ml zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen ($p < 0.001$) des Parameters F_v/F_m im Vergleich zur Kontrollbehandlung. Im Gegensatz dazu konnten nach Infiltration höherer Bakterienkonzentrationen (1×10^7 bzw. 1×10^8 cfu/ml) signifikante Änderungen im Vergleich zur Kontrollbehandlung hervorgerufen werden (Abb. 5A und C). Zu beiden Messzeitpunkten waren die Änderungen in F_v/F_m in der inkompatiblen Interaktion signifikant. In der komaptiblen Interaktion unterschieden sich die Messdaten nur zum Zeitpunkt 24 h p. i. signifikant von der Kontrolle.

Die effektive Quantenausbeute des PSII unterschied sich zum Zeitpunkt 3 h p. i. nur nach Infektion mit 1×10^8 cfu/ml avrRPM1 signifikant von der Kontrolle. Zum Zeitpunkt 24 h p. i. waren die Mittelwerte der AOIs in beiden Interaktionen für die mittlere und höchste Bakterienkonzentration jeweils signifikant niedriger als der Mittelwert der Kontrolle.

Aufgrund der komplexen Regulationsmuster für q_N (siehe Abb. 4) konnten innerhalb der statistischen Auswertung durch die Bildung von Mittelwerten über die gesamten infiltrierten Blattbereiche keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Kontrollen und den infizierten Geweben bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

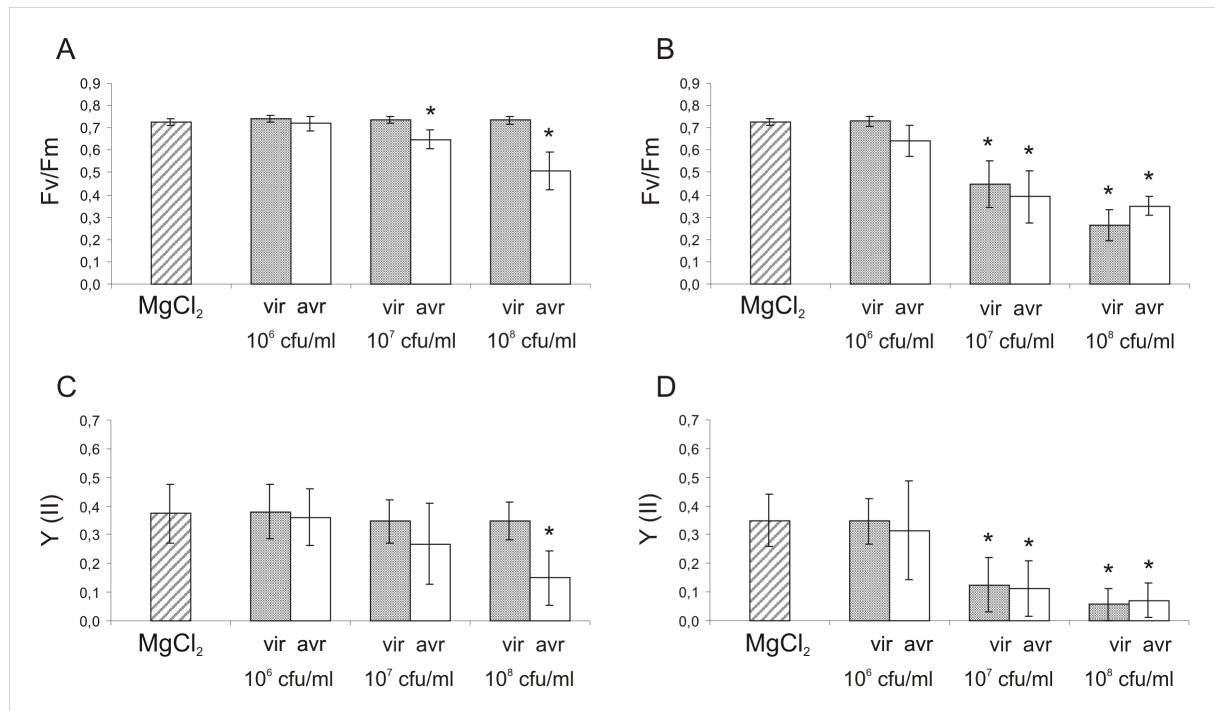


Abb. 5: Quantitative Analyse der zeitabhängigen Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenzparameter F_v/F_m und $Y(II)$ nach Infektion von *A. thaliana* mit *P. syringae*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus neun unabhängigen Wiederholungen, infiziert mit DC3000 (vir) bzw. avrRPM1 (avr) in verschiedenen Konzentrationen oder 10 mM $MgCl_2$. Die Analysen erfolgten 3 h (A, C) und 24 h (B, D) nach Infiltration. Die Sterne zeigen die signifikanten Änderungen ($p < 0.001$) im Vergleich zur Kontrolle im Newman-Keuls-Test an (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

Analog zur Interaktion mit *P. syringae* sollte auch für die Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* der zeitliche Verlauf einer Infektion beobachtet werden. Chlorophyllfluoreszenzmessungen vor dem Auftreten phänotypisch sichtbarer Symptome waren aufgrund der Notwendigkeit der Inkubation für 24 h unter 100 % Luftfeuchtigkeit nicht möglich. Erfolgte Messungen zu einem früheren Zeitpunkt, so mussten zunächst die noch feuchten Tropfen der Sporensuspension auf den Blättern entfernt werden. Es konnten keine Veränderungen in den infizierten Pflanzen gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Durch das frühzeitige Entfernen der Sporensuspension erfolgte bei weiterer Inkubation keine Infektion mehr, die Beobachtung eines Zeitverlaufs war demnach nicht mehr möglich. Erfolgte die erste Messung nach 24 h, so waren auf den infizierten Blättern bereits schwache Nekrosen erkennbar. Die Veränderungen waren vergleichbar mit denen in Abb. 3B, jedoch tendenziell etwas schwächer. Ein Fortschreiten der Infektion wie in der Interaktion mit DC3000 konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Auch eine Untersuchung der Abhängigkeit zwischen der Dichte der Sporensuspension und der Ausprägung der Symptome war nicht möglich, da eine geringer konzentrierte Sporensuspension (5×10^4 Sporen/ml) keine Infektion auslöste. Es wurden daher keine weiteren Chlorophyllfluoreszenzmessungen für diese Interaktion durchgeführt.

Um einen möglichen Einfluss des Parameters Licht auf den Infektionsverlauf der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* zu ermitteln, erfolgten weitere Versuche.

Es wurde zunächst getestet, ob die Beleuchtung der Pflanzen während einer Infektion einen Einfluss auf die verschiedenen Chlorophyllfluoreszenzparameter hat. Dazu wurden Blätter mit 10^7 cfu/ml avrRPM1 infiziert und nach 3 h Inkubation in Dunkelheit bzw. im Licht analysiert. Grundsätzlich konnten die gleichen Effekte gemessen werden, wobei die Veränderungen nach Inkubation im Licht tendenziell stärker waren als nach Inkubation in Dunkelheit (Abb. 6).

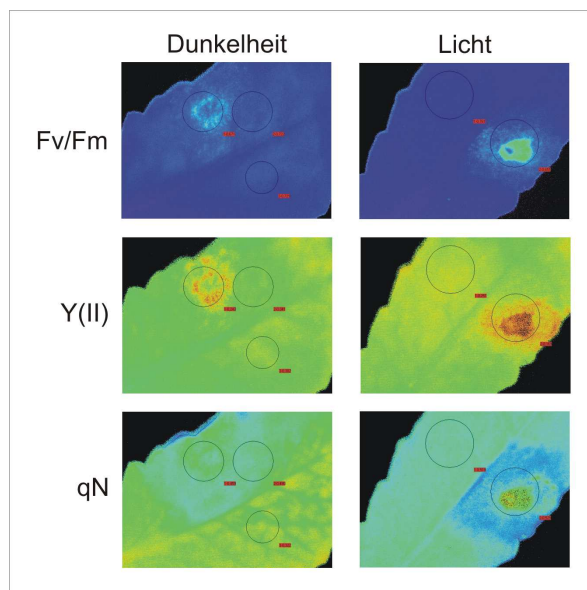


Abb. 6: Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenzparameter Fv/Fm, Y(II) und qN 24 h nach Infiltration des avirulenten Bakterienstammes avrRPM1 und anschließender Inkubation im Licht bzw. in Dunkelheit. Blätter von *A. thaliana* wurden mit avrRPM1 infiziert und 3 h nach Inkubation im Licht bzw. in Dunkelheit analysiert. Die roten Fähnchen zeigen die Mittelwerte aus den ausgewählten Bereichen für die einzelnen Parameter an. Die Falschfarbenskala reicht von 0.00 (schwarz) bis 1.00 (violett).

Um eine Aussage über die photosynthetische Kapazität und die momentane Lichtadaptation der infizierten Blattgewebe treffen zu können, wurden Lichtkurven der relativen Elektronentransportrate aufgenommen. Dazu wurden Pflanzen mit DC3000 (Abb. 7A) bzw. avrRPM1 (Abb. 7B) infiziert und nach 3 h analysiert. Auch hier konnten stärkere Effekte in der inkompatiblen Interaktion festgestellt werden. Daneben zeigten die Lichtkurven auch die Notwendigkeit einer gewissen Lichtstärke, um Unterschiede zwischen Kontrollen und infizierten Bereichen sowie zwischen den infizierten Blattbereichen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion sichtbar zu machen. Bei Werten der photosynthetisch aktiven Strahlung unterhalb von $50 \mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$, bei denen das Licht selbst limitierender Faktor des Elektronenflusses ist, waren die Elektronentransportraten für unbehandelte und infizierte Blattbereiche nicht signifikant unterschiedlich.

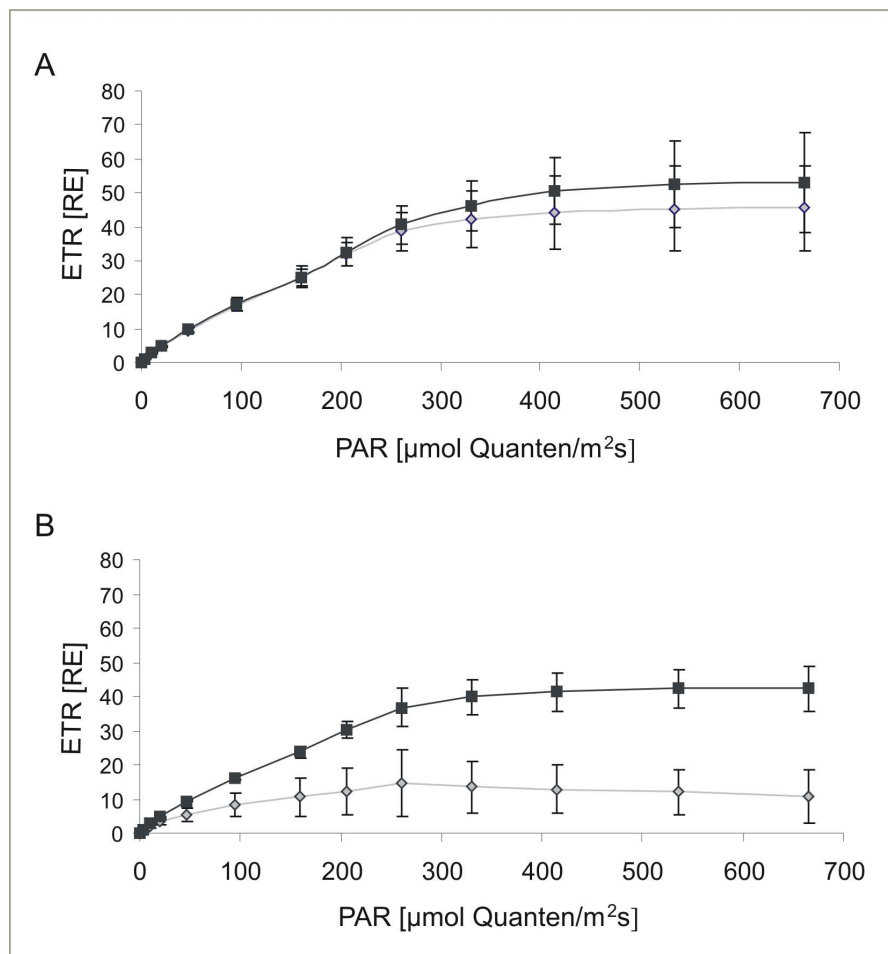


Abb. 7: Effekte der Infektionen mit einem virulenten oder avirulenten Bakterienstamm von *P. syringae* auf die Lichtkurven der Elektronentransportrate ETR. Blätter von *A. thaliana* wurden mit DC3000 (A) bzw. avrRPM1 (B) infiziert und nach einer Inkubation von 3 h die Lichtkurven bei steigender photosynthetisch aktiver Strahlung (PAR) aufgezeichnet. Die Angabe der ETR erfolgte in relativen Einheiten (RE). Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils acht unabhängigen Messungen \pm SD für jeweils unbehandelte (■) oder infizierte (◇) Blattbereiche (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

4.1.3 Koordinierte Regulation der Genexpression

Zur weiteren Charakterisierung der Pflanze-Pathogen-Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Die Regulation von Genen der Photosynthese, der pflanzlichen Abwehr und des Kohlenhydratmetabolismus wurde dabei analysiert. Als charakteristische Gene für die Licht- bzw. Dunkelreaktion wurde die Regulation von *Cab2* und *RbcS* untersucht (Abb. 8). Die konstitutiv starke Expression beider Gene sank nach einer Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm DC3000, jedoch interessanterweise nicht nach einer Infektion mit avrRPM1.

Die Expression der getesteten Gene für pflanzliches Abwehrverhalten, *Pal1* und *Pr1*, war in beiden Interaktionen induziert. In Übereinstimmung mit der Literatur (Dong *et al.*, 1991) war die maximale Induktion von *Pal1* zum Zeitpunkt 3 h p. i. erreicht. Die Expression von *Pr1*

hingegen war nur in der inkompatiblen Interaktion 3 h p. i. induziert, was mit der früheren Erkennung des avirulenten Bakterienstammes durch die Pflanze korreliert (Whalen *et al.*, 1991). In der kompatiblen Interaktion wurde eine Induktion erst 24 h p. i. detektiert. In Übereinstimmung mit der Literatur, die *Pr1* als „spätes“ Abwehrgen klassifiziert, blieben die Spiegel der mRNA in beiden Interaktionen bis zum Zeitpunkt 48 h nach der Infektion erhöht (Cao *et al.*, 1994; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Thomma *et al.*, 2001).

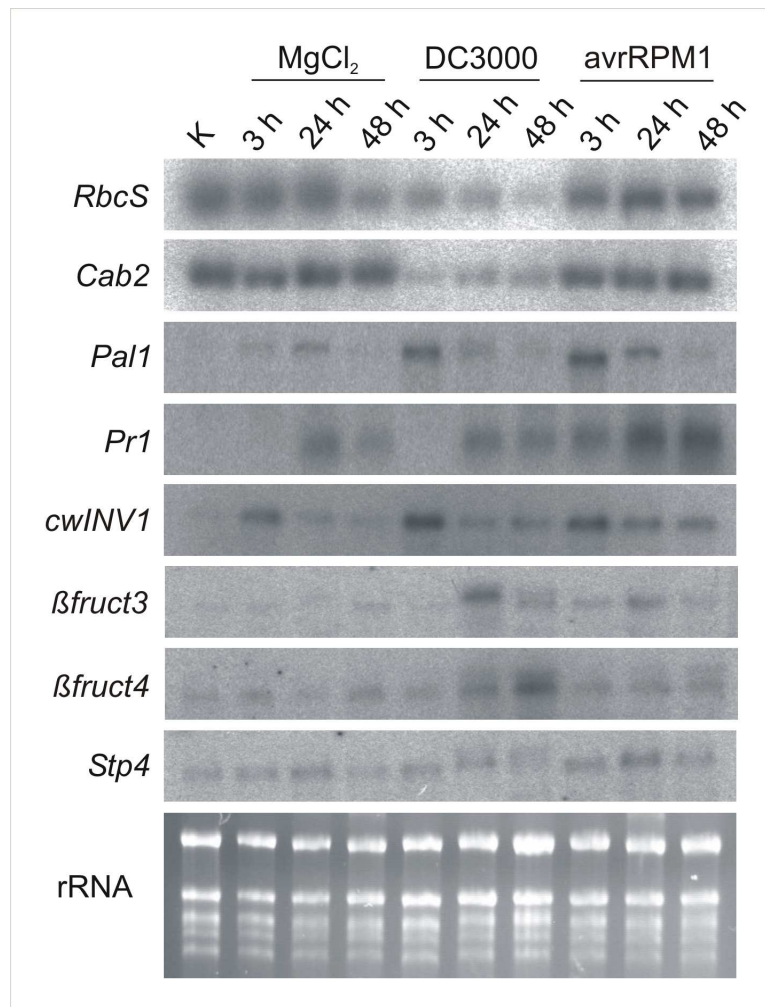


Abb. 8: Regulation der Genexpression in Blättern von *A. thaliana* nach Infektion mit einem virulenten (DC3000) oder avirulenten (avrRPM1) Bakterienstamm von *P. syringae*. Der Versuch wurde viermal wiederholt, ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. Es wurden 10 µg RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

Für die Zellwandinvertase *cwINV1* und den Hexosetransporter *Stp4* konnte in der Literatur eine Induktion durch pilzliche Pathogene gezeigt werden (Chou *et al.*, 2000; Fotopoulos *et al.*, 2003). Auch in der untersuchten Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* war die Invertase *cwINV1* induziert, was mit der postulierten Funktion von Zellwandinvertasen als PR-Proteine übereinstimmt (Roitsch *et al.*, 2003). Keine Regulation konnte für den

Hexosetransporter *Stp4* beobachtet werden. Da *in silico* Genexpressionsanalysen darauf hindeuteten, dass eine Regulation der vakuolären Invertasen nach einer Pathogeninfektion stattfindet (Zimmermann *et al.*, 2004), wurden die Gene *βfruct3* und *βfruct4*, die für vakuoläre Invertasen kodieren, mittels Northern Blot Analysen getestet. Abbildung 8 zeigt, dass beide Gene nach der Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm DC3000, jedoch nicht nach einer Infektion mit *avrRPM1* induziert werden. Die Induktion der *βfruct3* erfolgte allgemein früher und transienter als die Induktion der *βfruct4*.

Ein Vergleich zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion zeigt, dass sowohl Photosynthesegene als auch vakuoläre Invertasen nach Infektion mit dem virulenten, jedoch nicht mit dem avirulenten Bakterienstamm reguliert werden.

In Northern Blot Analysen zur Untersuchung der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* (10^5 Sporen/ml) konnte für keines der getesteten Gene eine eindeutig regulierte Genexpression dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Es wurden jeweils mindestens sechs unabhängige Versuche durchgeführt und die Regulation von *RbcS*, *Pr1* sowie *Stp4* untersucht. Die konstitutive Expression von *RbcS* wurde in einem von acht Versuchen durch die Infektion mit *A. brassicicola* im Vergleich zu der Kontrolle nicht beeinflusst, in drei Versuchen war die Expression durch die Kontrollbehandlung und die Infektion vergleichbar reprimiert und in vier Versuchen war die Repression nach einer Infektion stärker als nach der Kontrollbehandlung mit H₂O. Für *Pr1* konnten in zwei Versuchen keine Signale detektiert werden, in weiteren zwei Versuchen war eine vergleichbare Induktion nach der Kontrollbehandlung bzw. der Infektion erkennbar und in drei Versuchen war die Induktion nach Infektion mit dem Pilz stärker als in der Kontrolle. Für *Stp4* konnte in drei Versuchen eine schwache konstitutive Genexpression dokumentiert werden, in einem Versuch unregelmäßig verteilte Signale sowohl in den Kontrollen als auch in den infizierten Pflanzen und in zwei Versuchen eine Induktion nur in den infizierten Pflanzen. Da auch die Genexpressionsanalysen eindeutigen Daten liefern konnten, wurden weitere Untersuchungen zur Regulation des Kohlenhydratmetabolismus auf die Interaktion mit dem Bakterium *P. syringae* beschränkt.

4.1.4 Regulation des Kohlenhydratmetabolismus

Invertaseaktivitätstests wurden durchgeführt, um eine Aussage über die Aktivität der Enzyme *in planta* treffen zu können. In Übereinstimmung mit den Northern Blot Analysen war die Aktivität der vakuolären Invertasen in der kompatiblen Interaktion transient erhöht. Zum Zeitpunkt 3 h p. i. erfolgte zunächst ein Anstieg der Invertaseaktivität auf 193 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, im weiteren Zeitverlauf der Infektion sank die Aktivität jedoch wieder auf 137 % bzw. 124 % ab (Abb. 9B). In der inkompatiblen Interaktion war die Aktivität

der vakuolären Invertasen um 41 % zum Zeitpunkt 3 h p. i. bzw. um 15 % und 26 % zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h p. i. im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt.

Die Aktivität der extrazellulären Invertasen war in der kompatiblen Interaktion im Infektionsverlauf stufenweise um 1 %, 26 % bzw. 54 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt (Abb. 9A). In der inkompatiblen Interaktion war die Aktivität der extrazellulären Invertasen um 55 %, 48 % bzw. 60 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle erniedrigt (Messungen der Invertaseaktivität wurden von A. Gabler durchgeführt).

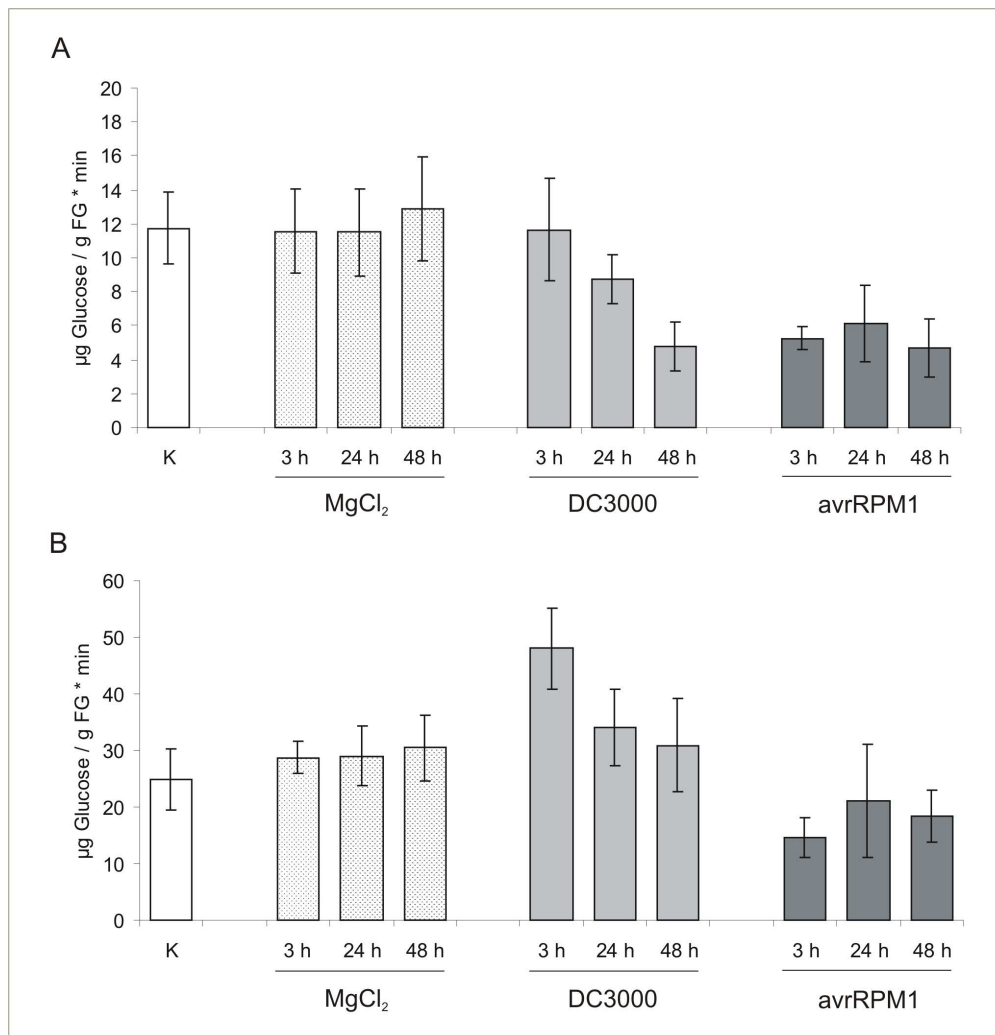


Abb. 9: Extrahierbare Aktivität extrazellulärer (A) und vakuolärer (B) Invertasen nach Infektion mit *P. syringae*. Blätter von *A. thaliana* wurden mit MgCl₂ infiltrierte oder dem virulenten (DC3000) oder avirulenten (avrRPM1) Bakterienstamm infiziert. Als Kontrolle wurde unbehandeltes Blattmaterial verwendet. Gezeigt sind die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten \pm SD. Der Versuch wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt (verändert nach Bonfig *et al.*, 2006).

Da Änderungen in der Invertaseaktivität direkten Einfluss auf die Zuckergehalte einer Pflanze haben können (Berger *et al.*, 2004; Jobic *et al.*, 2007), wurden die Gehalte löslicher Zucker in Blättern infizierter Pflanzen in dreifacher Wiederholung gemessen. Weder 24 h noch 48 h nach Infektion mit dem virulenten oder dem avirulenten Bakterienstamm konnten

unterschiedliche Zuckergehalte für Glucose, Fructose und Saccharose im Vergleich zu der Kontrollbehandlung mit MgCl_2 bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Zur genaueren Untersuchung der Regulation einzelner Invertaseisoenzyme während einer Pathogeninfektion standen Reporterlinien zur Verfügung, die die β -Glucuronidase unter Kontrolle der endogenen Promotoren für die sechs bekannten extrazellulären Invertasen bzw. Fructoexohydrolasen und die zwei vakuolären Invertasen exprimieren. Von jedem Konstrukt konnten mindestens zwei unabhängige Pflanzenlinien getestet werden. Die Reporterlinien wurden von T. Rausch zur Verfügung gestellt (siehe Kapitel 6.1.4). Alle Linien wurden mit den Bakterienstämmen DC3000 und avrRPM1 oder dem Pilz *A. brassicicola* bzw. mit MgCl_2 oder H_2O behandelt und 24 h (*P. syringae*) bzw. 48 h p. i. (*A. brassicicola*) die Nachweisreaktion auf die Bildung der β -Glucuronidase durch eine Farbreaktion geführt. Die Unterschiede zwischen den unabhängigen Pflanzenlinien eines Konstruktes waren ebenso groß wie die Unterschiede zwischen Pflanzenlinien mit verschiedenen Konstrukten (Daten nicht gezeigt). Die β -Glucuronidase war in keiner der Pflanzenlinien durch eine Pathogenbehandlung reproduzierbar induziert.

4.1.5 Regulation endogener Invertaseinhibitoren in *A. thaliana* nach Stressbehandlung

Neben den oben genannten Reporterlinien standen weitere Linien, die die β -Glucuronidase unter Kontrolle der Promotoren der endogenen Invertaseinhibitoren AtC/VIF1 (At1g47960), AtC/VIF2 (At5g64620) und AtC/VIF3 (At1g17130) exprimieren, zur Verfügung. In allen Pflanzenlinien konnte unabhängig von einer Behandlung eine starke Aktivität der β -Glucuronidase nachgewiesen werden. Die stärkste Aktivität wurde reproduzierbar in den beiden Linien mit dem Promotor von AtC/VIF2 verzeichnet (Abb. 10). Interessanterweise war in einigen der Infektionsstellen die Aktivität der β -Glucuronidase im Vergleich zum übrigen Blatt erniedrigt.

Diese Beobachtung führte zu der Fragestellung, ob die Aktivität von Invertasen während einer Pathogeninfektion möglicherweise gesteuert wird durch die regulierte Aktivität von Invertaseinhibitoren.

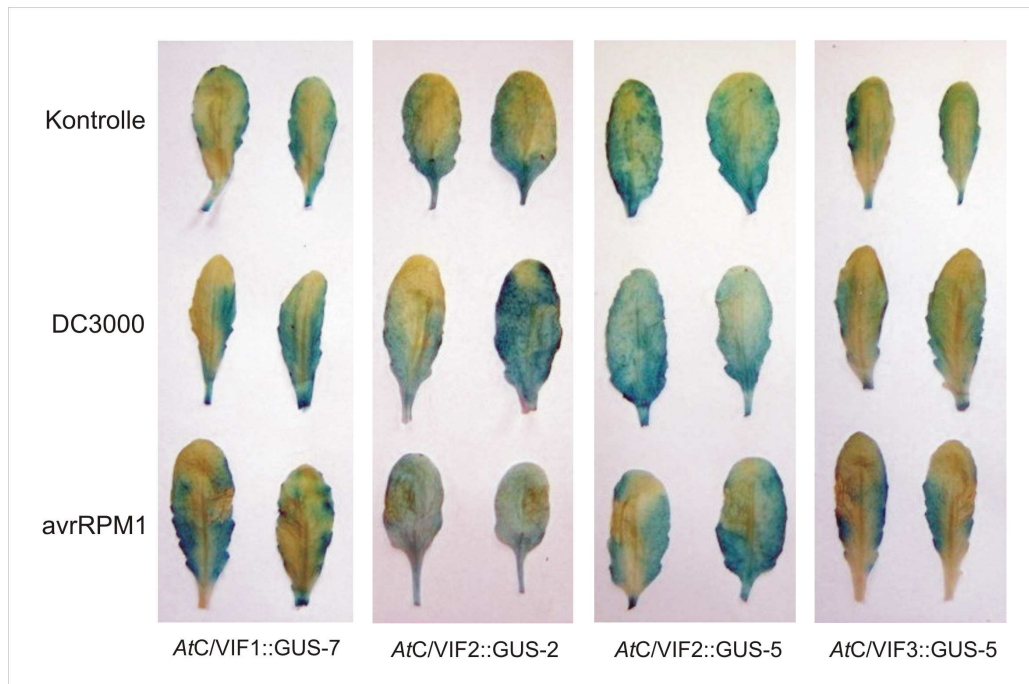


Abb. 10: Histologischer Nachweis der *uidA*-Expression in Blättern von *A. thaliana*. Die Reporterlinien exprimieren die β -Glucuronidase unter Kontrolle der Promotoren der endogenen Invertaseinhibitoren *AtC/VIF1*, *AtC/VIF2* oder *AtC/VIF3*. Blätter wurden mit $MgCl_2$, DC3000 oder *avrRPM1* infiltriert und 24 h nach der Behandlung gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen eines in zweifacher Wiederholung mit jeweils mindestens fünf unabhängigen Blättern durchgeführten Versuchs.

Eine neuere Untersuchung konnte zeigen, dass extrazelluläre und vakuoläre Invertasen in der Tat durch proteinogene Invertaseinhibitoren reguliert werden (Huang *et al.*, 2007). Da bisher keine Berichte über Wirkungen von Pathogenen auf die Regulation von endogenen Invertaseinhibitoren bekannt sind, sollte die Rolle von Invertaseinhibitoren in Pflanze-Pathogen-Interaktionen untersucht werden.

In silico Genexpressionsanalysen weisen auf eine spezifische und entwicklungsabhängige natürliche Regulation von Invertaseinhibitoren hin. Während der Blattentwicklung und –reifung sollte die Expression stark ansteigen. In Rosettenblättern sollte die Expression von *AtC/VIF2* am stärksten sein, gefolgt von *AtC/VIF1* und *AtC/VIF3*. In Northern Blot Analysen konnte für den Inhibitor *AtC/VIF1* in Übereinstimmung mit den *in silico* Daten eine schwache Expression in Blättern detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Expression des Inhibitors *AtC/VIF3* konnte nicht detektiert werden, da der Expressionslevel für die Sensitivität dieser Methode zu gering war (Daten nicht gezeigt). Deutliche Signale waren hingegen in den Northern Blot Analysen für *AtC/VIF2* detektierbar. Die *in silico* Genexpressionsanalysen sagten weiterhin voraus, dass die Expression von *AtC/VIF2* nach einer Infektion mit *P. syringae* sinken sollte. Auch dies konnte in Northern Blot Analysen bestätigt werden (Abb. 11A). Auch nach mechanischer Verwundung sowie durch die abiotischen Stressfaktoren Hitze und Kälte wurde die Expression stark reprimiert. Hitze- und Kältestress wurde erzeugt, indem Pflanzen vor der Probenernte jeweils entweder 24 h bei 37°C oder 4°C inkubiert

wurden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Wiederholungen erhalten. Der Anstieg der Invertaseaktivität nach einer Pathogeninfektion könnte demnach auf eine Repression der Invertaseinhibitoren zurückzuführen sein.

Um zu testen, ob eine Regulation der Invertaseinhibitoren nach einer Pathogeninfektion auch auf der Proteinebene stattfindet, wurde ein von B. Schäfer etabliertes Testsystem weiter optimiert. Die Eigenschaft, dass Invertaseinhibitoren ein Molekulargewicht zwischen 16 und 20 kD, Invertasen hingegen ein Molekulargewicht von etwa 70 kD besitzen, wurde für den Test ausgenutzt. Zur Trennung der beiden Proteine in einem Proteinrohextrakt wurden Ultrafiltrationsmembranen (Centricon® YM-30) eingesetzt. Die Trennung sollte bei einem Molekulargewicht von 30 kD erfolgen. Nach der Zentrifugation sollte die obere Fraktion (C_h) demnach Proteine mit einem Molekulargewicht von über 30 kD, also auch die Invertasen enthalten, während im gesammelten Durchfluss (C_l) Proteine mit geringerem Molekulargewicht vorliegen sollten, darunter auch die Invertaseinhibitoren. Messungen der Invertaseaktivität in der unteren Fraktion ergaben eine vernachlässigbare Aktivität zwischen 0,8 und 3,9 $\mu\text{g Glucose} / \text{g FG} \cdot \text{min}$, wohingegen in der oberen Fraktion zu den verschiedenen Messzeitpunkten Invertaseaktivitäten zwischen 115,6 und 214,4 $\mu\text{g Glucose} / \text{g FG} \cdot \text{min}$ gemessen wurden (Abb. 11B). Nach Herstellung von Mischextrakten aus der höher- und der niedermolekularen Proteinfraction konnten im Zeitverlauf (8 h, 24 h, 48 h) einer Infektion mit 10^8 cfu/ml DC3000 deutliche Veränderungen im Vergleich zu der Aktivität der unbehandelten Kontrolle festgestellt werden. Die relative Invertaseaktivität nach dem Mischen von C_h und C_l vor einer Infektion mit *P. syringae* war um 37,3 % und 8 h nach der Infektion um 36 % geringer als die Aktivität der höhermolekularen Proteinfraction C_h alleine. Bei fortschreitender Infektion wurde die Fraktion C_h durch die Zugabe der Proteinfraction C_l lediglich noch um 20,1 % gehemmt bzw. nach 48 h sogar um 9,9 % induziert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es nach einer Pathogeninfektion zur Repression von Invertaseinhibitoren bzw einer Derepression von Invertasen kommt.

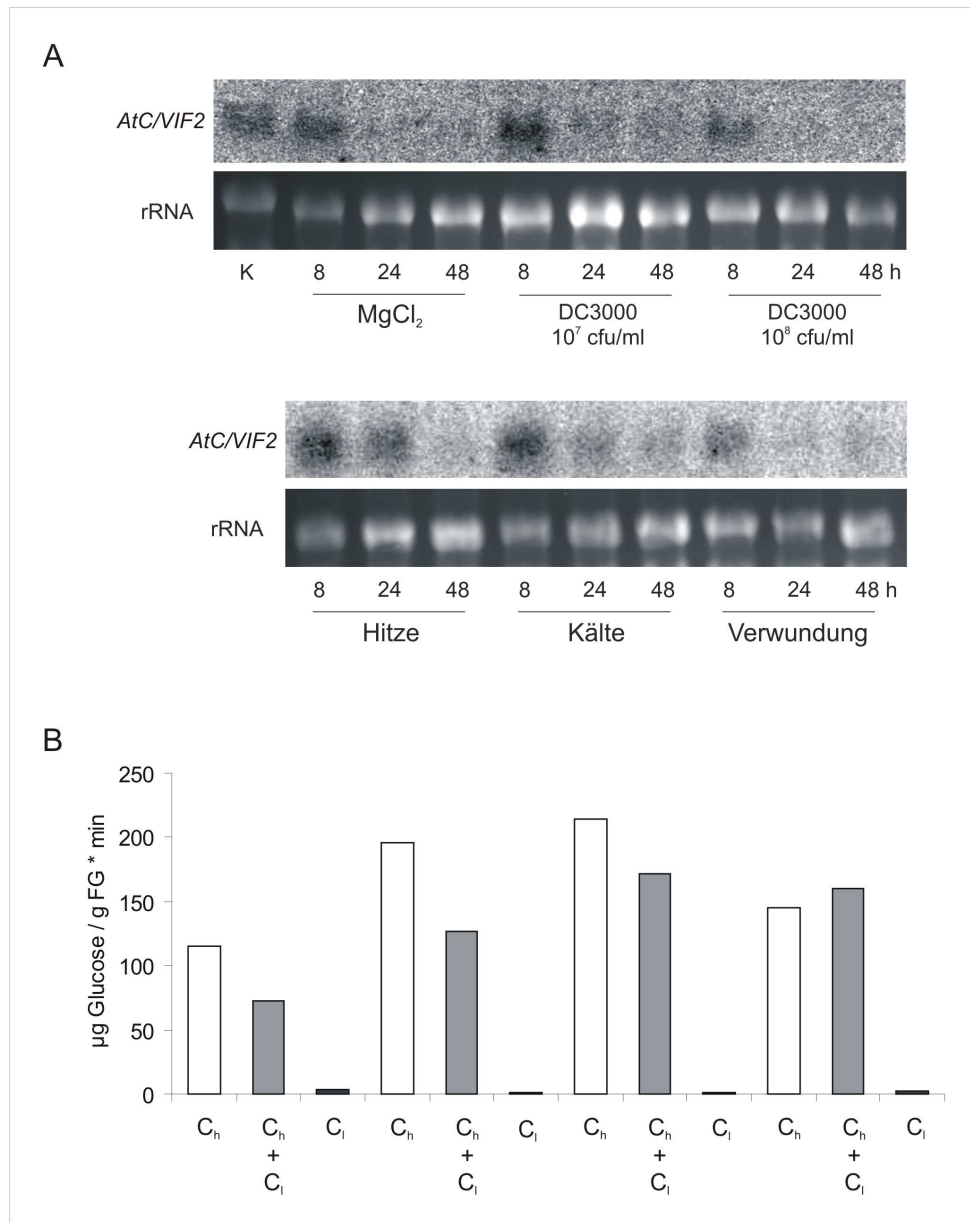


Abb. 11: Regulation der extrazellulärer Invertasen in *A. thaliana* durch proteinogene Invertaseinhibitoren. (A) Regulation der Genexpression von *AtC/VIF2* nach Infiltration von 10 mM $MgCl_2$, Infektion mit 10^7 cfu/ml oder 10^8 cfu/ml DC3000, Verwundung, Hitze- oder Kältebehandlung. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. Es wurden 10 µg RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. (B) Regulation der Invertaseaktivitäten nach einer Infektion mit 10^8 cfu/ml DC3000 über Veränderungen des Gehaltes an proteinogenen Invertaseinhibitoren. Nach Auftrennung eines Proteinrohextraktes durch Ultrafiltration (30 kD cutoff) wurden die Invertaseaktivitäten der höher- (C_h) und der niedermolekularen (C_i) Proteinfraction sowie der Mischextrakte aus C_h und C_i im Infektionsverlauf bestimmt. Gezeigt sind die Daten eines aus drei unabhängigen Versuchen mit ähnlichen Ergebnissen.

4.2 Untersuchungen zur Funktion von Invertasen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen durch Repression dieser Enzyme

Natürliche Regulationsvorgänge von Invertasen erfolgen während des gesamten Wachstums und der Entwicklung von Pflanzen. Ein wichtiger Kontrollmechanismus wird bereitgestellt über die posttranslationale Regulation mittels endogener Invertaseinhibitoren.

Um die Bedeutung der pflanzlichen Invertasen während der komplexen Regulationsvorgänge nach Pathogeninfektionen genauer analysieren zu können, sollte ihre Aktivität in verschiedenen funktionellen Ansätzen reprimiert werden. In einem Ansatz sollte die Aktivität von Invertasen durch chemische Inhibitoren gehemmt werden, in einem anderen Ansatz sollte in transgenen Ansätzen die Invertaseaktivität in Pflanzen durch Expression proteinogener Invertaseinhibitoren reprimiert werden.

4.2.1 Pharmakologischer Ansatz zur Inhibition von Invertasen

4.2.1.1 Vergleich der chemischen Inhibitoren β -Thio-fructofuranosid und Acarbose

Um eine Hemmung von Invertasen zu erzielen, wurden zwei Substanzen getestet, der in der Diabetesbehandlung eingesetzte α -Glucosidaseinhibitor Acarbose und ein synthetisches β -Thio-fructofuranosid des Mercaptoethanols, Fru-S-Me (zur Verfügung gestellt von H. Nakano, Osaka Municipal Technical Research Institute, Osaka, Japan). Im direkten Vergleich der Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass nach Zugabe der beiden Stoffe in gleicher Konzentration zu einem pflanzlichen Invertaseextrakt die Acarbose *in vitro* den stärkeren Hemmeffekt hatte (Abb. 12A). Zugabe von 10 mM Fru-S-Me bewirkte eine Hemmung der extrazellulären Invertasen um 12 %, Zugabe von 10 mM Acarbose eine Hemmung um 42 %. Eine Konzentration von 100 mM Acarbose hemmte die Invertaseaktivität vollständig (Daten nicht gezeigt, Messungen von A. Gabler durchgeführt).

Da die Acarbose die stärkere Wirkung auf Invertaseextrakte hatte, wurde sie als Invertaseinhibitor für die folgenden Untersuchungen zur Funktion von Invertasen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen ausgewählt. Weitere *in vitro* Tests zeigten außerdem, dass der Hemmeffekt der Acarbose konzentrationsabhängig war (Abb. 12B).

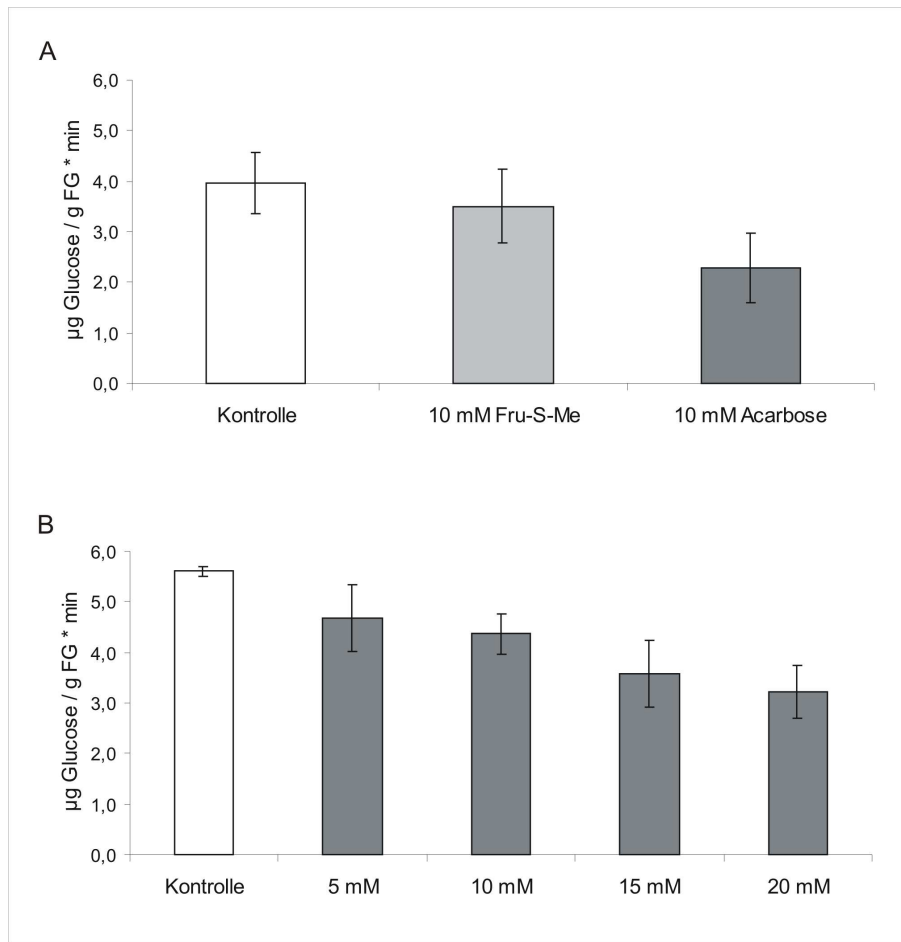


Abb. 12: Inhibition pflanzlicher Invertasen durch den synthetischen Inhibitor Fru-S-Me und den α -Glucosidaseinhibitor Acarbose. (A) Vergleich der Hemmeffekte von Fru-S-Me und Acarbose. (B) Konzentrationsabhängigkeit des Hemmeffektes der Acarbose auf pflanzliche Invertasen *in vitro*. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils mindestens drei unabhängigen Versuchen.

4.2.1.2 Wirkungen der Acarbose auf *P. syringae* und *A. thaliana*

Um Acarbose als Invertaseinhibitor einsetzen zu können, sollten zuvor mögliche Effekte der Acarbose auf die Bakterien sowie die Pflanzen ausgeschlossen werden.

Die Zugabe von 10 mM Acarbose zu Wachstumskulturen von *P. syringae* hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Bakterien (Daten nicht gezeigt).

Auch die Blätter von *A. thaliana* wiesen nach Infiltration einer wässrigen 10 mM Acarboselösung keine phänotypischen Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt), so dass Acarbose als Invertaseinhibitor für Untersuchungen zur Bedeutung der Invertasen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen verwendet werden konnte.

Zunächst sollte getestet werden, ob sich die Infektion von *A. thaliana* mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 bei gleichzeitiger Zugabe von Acarbose anders als eine Infektion ohne Zugabe von Acarbose manifestiert.

Abb. 13A zeigt, dass Blätter von *A. thaliana* eine erhöhte Sensitivität gegenüber der bakteriellen Infektion mit DC3000 (5×10^5 cfu/ml) aufweisen, wenn gleichzeitig Acarbose (10 mM) infiltriert wurde. Über einen Zeitverlauf von 72 h beobachtet, konnte phänotypisch eine schnellere und stärkere Symptomentwicklung festgestellt werden.

Nach Infiltration des avirulenten Bakterienstammes avrRPM1 (5×10^5 cfu/ml) \pm Acarbose konnten keine eindeutigen Tendenzen beobachtet werden. Neben Blättern mit erhöhter Sensitivität gegenüber der Pathogeninfektion durch die zusätzliche Infiltration von Acarbose gab es auch Pflanzen, die keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber der Infektion erkennen ließen (Daten nicht gezeigt). Es wurden daher keine weiteren Untersuchungen mit dem avirulenten Bakterienstamm durchgeführt.

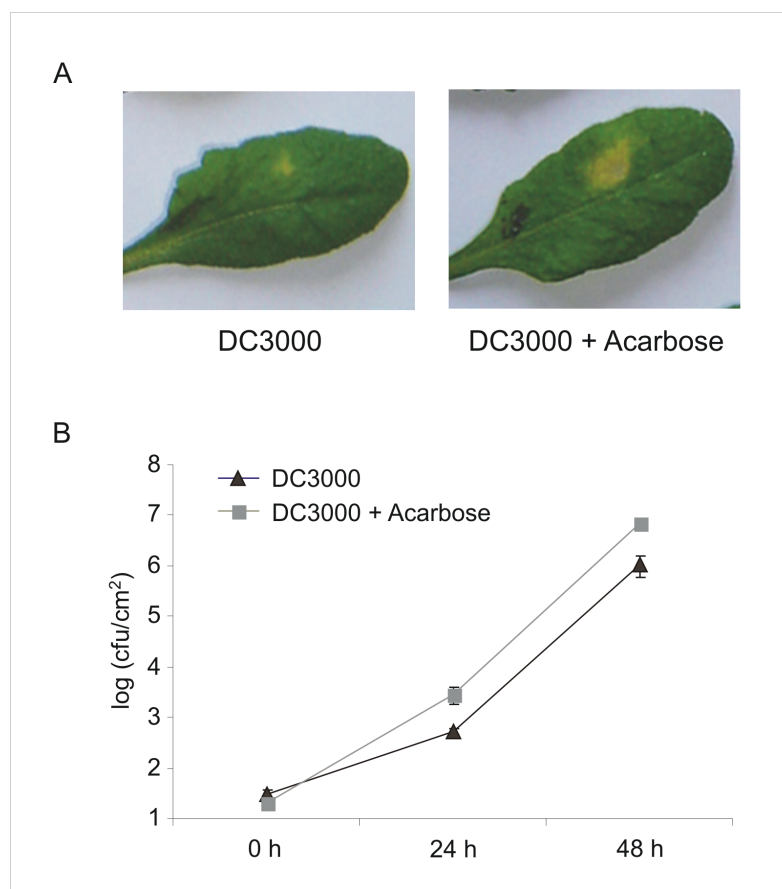


Abb. 13: Wirkungen der Acarbose auf das Wachstum von *P. syringae* in Blättern von *A. thaliana*. (A) Die Zugabe von 10 mM Acarbose zu der Bakteriensuspension führte zu einer früheren und verstärkten Entwicklung von Nekrosen im Vergleich zu den infizierten Blättern ohne Acarbose. Gezeigt sind zwei repräsentative Aufnahmen der Nekrosen 72 h nach Infektion mit 5×10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose aus fünf unabhängigen Versuchen. (B) Quantifizierung des Bakterienwachstums von DC3000 \pm 10 mM Acarbose durch Reisolierung. Gezeigt ist die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien eines repräsentativen Versuchs in Dreifachbestimmung nach Reisolierung aus infizierten Blättern von *A. thaliana* (Bakteriendichte 10^5 cfu/ml). Der Versuch wurde viermal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Das verstärkte und frühere Auftreten der Nekrosen in den Blättern, die zusätzlich mit Acarbose infiltriert wurden, korrelierte mit einem erhöhten Bakterienwachstum. Dies konnte durch Reisolierung der Bakterien aus den infizierten Blättern gezeigt werden. Direkt nach einer Infiltration wurde aus den Proben mit bzw. ohne Zusatz von Acarbose eine vergleichbare Anzahl an Bakterien reisoliert, jedoch war das Bakterienwachstum in den Proben mit Acarbose 24 h p. i. um Faktor 5,5 und 48 h p. i. sogar um Faktor 6,4 erhöht. Der Versuch wurde viermal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt, ein repräsentatives Experiment ist in Abb. 13B dargestellt.

Die erhaltenen Daten deuten auf eine erhöhte Sensitivität von *A. thaliana* gegenüber einer Infektion mit DC3000 hin, wenn die Invertaseaktivität der Pflanzen gehemmt wird.

4.2.1.3 Veränderungen des Primärmetabolismus durch Acarbose

Die Auswirkungen der Invertaseinhibition durch Acarbose auf den Primär- bzw. den Kohlenhydratmetabolismus in *A. thaliana* während einer Infektion mit DC3000 wurde im Folgenden auf verschiedenen Ebenen untersucht.

Veränderungen der Photosynthese wurden mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung erfasst. Es wurden dazu Blätter mit 10^6 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose infiltriert und der Infektionsverlauf über 72 h beobachtet. Veränderungen in den Photosyntheseparametern maximale Quantenausbeute und effektive Quantenausbeute des Photosystems II - Fv/Fm bzw. Y(II) - waren zumeist 48 h p. i. messbar. Die Veränderungen waren schneller messbar und insgesamt stärker in den Proben, die zusätzlich mit Acarbose infiltriert wurden. In Abb. 14A sind repräsentative Aufnahmen 72 h nach der Infektion abgebildet. Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Die Expression von Genen der Photosynthese (*RbcS*) und des Sink-Metabolismus (*cwINV1*, *Bfruct4*) sollte untersucht werden, um eine Aussage über eine mögliche Wirkung der Acarbose auf transkriptioneller Ebene treffen zu können. Die vakuoläre Invertase *Bfruct4* war zwar konstitutiv exprimiert, jedoch nicht durch die Infektion mit 10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose reguliert (Daten nicht gezeigt). Nach Infiltration von 10^5 cfu/ml DC3000 wurde das Gen *RbcS* unabhängig von der Zugabe von 10 mM Acarbose im Infektionsverlauf reprimiert (Abb. 14B). Ein gegenteiliger Effekt wurde für das Transkript der *cwINV1* gefunden und auch hier konnte kein Acarbose-Effekt beobachtet werden. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

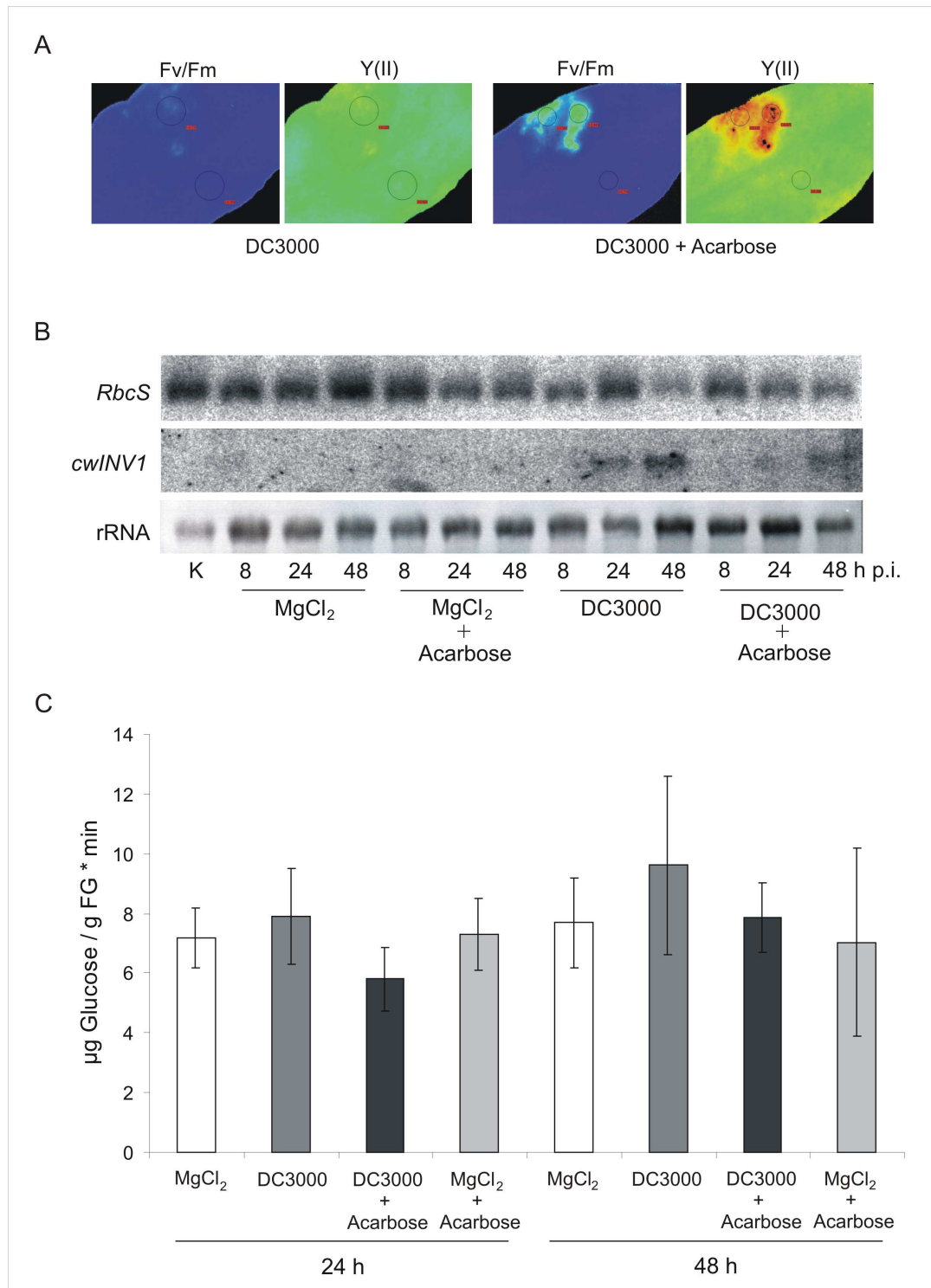


Abb. 14: Wirkungen der Acarbose auf die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus in *A. thaliana* während einer Pathogeninfektion. (A) Veränderungen der Chlorophyllfluoreszenzparameter Fv/Fm und Y(II) 72 h nach Infiltration von 10^6 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus drei unabhängigen Versuchen. Die roten Fähnchen zeigen die Mittelwerte aus den ausgewählten Bereichen für die einzelnen Parameter an. Die Falschfarbenskala reicht von 0.00 (schwarz) bis 1.00 (violett). (B) Regulation der Genexpression von *RbcS* bzw. *cwINV1* nach Infektion mit 10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose bzw. Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl₂ \pm 10 mM Acarbose. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. Es wurden 10 µg RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung durch Hybridisierung mit einer rRNA-Sonde kontrolliert. (C) Extrahierbare Aktivität der extrazellulären Invertasen nach Infektion mit 10 mM MgCl₂ \pm 10 mM Acarbose oder 10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose. Gezeigt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SD.

Da eine Wirkung der Acarbose auf die Invertaseaktivität *in vitro* gemessen wurde (siehe Kapitel 4.2.1.1), sollten auch mögliche Wirkungen der Acarbose auf die Aktivität der Invertasen *in planta* bestimmt werden. Nach Infiltration von 10 mM MgCl₂ ± 10 mM Acarbose oder 10⁵ cfu/ml DC3000 ± 10 mM Acarbose konnten keine signifikanten Effekte gemessen werden, jedoch war die Invertaseaktivität in den Proben, die mit Acarbose behandelt waren im Vergleich zu Proben, die mit DC3000 alleine infiziert wurden, tendenziell erniedrigt (Abb. 14C). Diese Tendenz wurde in fünf unabhängigen Experimenten beobachtet (Messungen durchgeführt von N. Muhammad).

Die Konzentrationen der löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose in Blättern, die mit 10 mM MgCl₂ ± 10 mM Acarbose oder 10⁵ cfu/ml DC3000 ± 10 mM Acarbose infiziert waren, waren in drei unabhängigen Versuchen während des Infektionsverlaufs nicht signifikant verändert. Messungen erfolgten 8 h, 24 h und 48 h nach den Behandlungen (Daten nicht gezeigt).

4.2.1.4 Charakterisierung der Abwehrreaktionen unter dem Einfluss der Acarbose

Da gezeigt werden konnte, dass Acarbose *per se* keine negative Wirkung auf das Bakterienwachstum hat (siehe Kapitel 4.2.1.2), wurde vermutet, dass die erhöhte Sensitivität gegenüber einer Infektion mit DC3000 in den Pflanzen, die mit Acarbose behandelt waren, auf einer negativen Wirkung der Acarbose auf die pflanzliche Abwehr beruhen könnte. Da der Salicylsäureweg der pflanzlichen Abwehr essentiell für die Abwehr einer Infektion mit *P. syringae* ist (Thomma *et al.*, 2001), sollte die Wirkung von Acarbose auf die Expression von Genen, die mit dem Salicylsäure-vermittelten Abwehrweg verknüpft sind und auf die Spiegel der Salicylsäure (SA) nach einer Infektion mit 10⁵ cfu/ml DC3000 bestimmt werden.

Die ausgewählten Gene der pflanzlichen Abwehr, *Pr1* und *Pr2*, waren nach einer Infektion mit DC3000 unabhängig von einer zusätzlichen Behandlung mit Acarbose etwa gleich stark induziert (Abb. 15A). Eine Induktion von *Pr1* konnte 24 h und 48 h p. i., eine deutliche Induktion von *Pr2* nur zum Zeitpunkt 48 h p. i. beobachtet werden. Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Die Konzentration an Salicylsäure war 8 h nach einer Infektion mit DC3000 schwach und 24 h p. i. im Vergleich zur Kontrolle stärker erhöht. Der Anstieg war jeweils in den Proben stärker, die zusätzlich mit Acarbose behandelt wurden (Abb. 15B). Der Effekt konnte jedoch auch in den Kontrollen beobachtet werden, die mit MgCl₂ ± 10 mM Acarbose behandelt wurden.

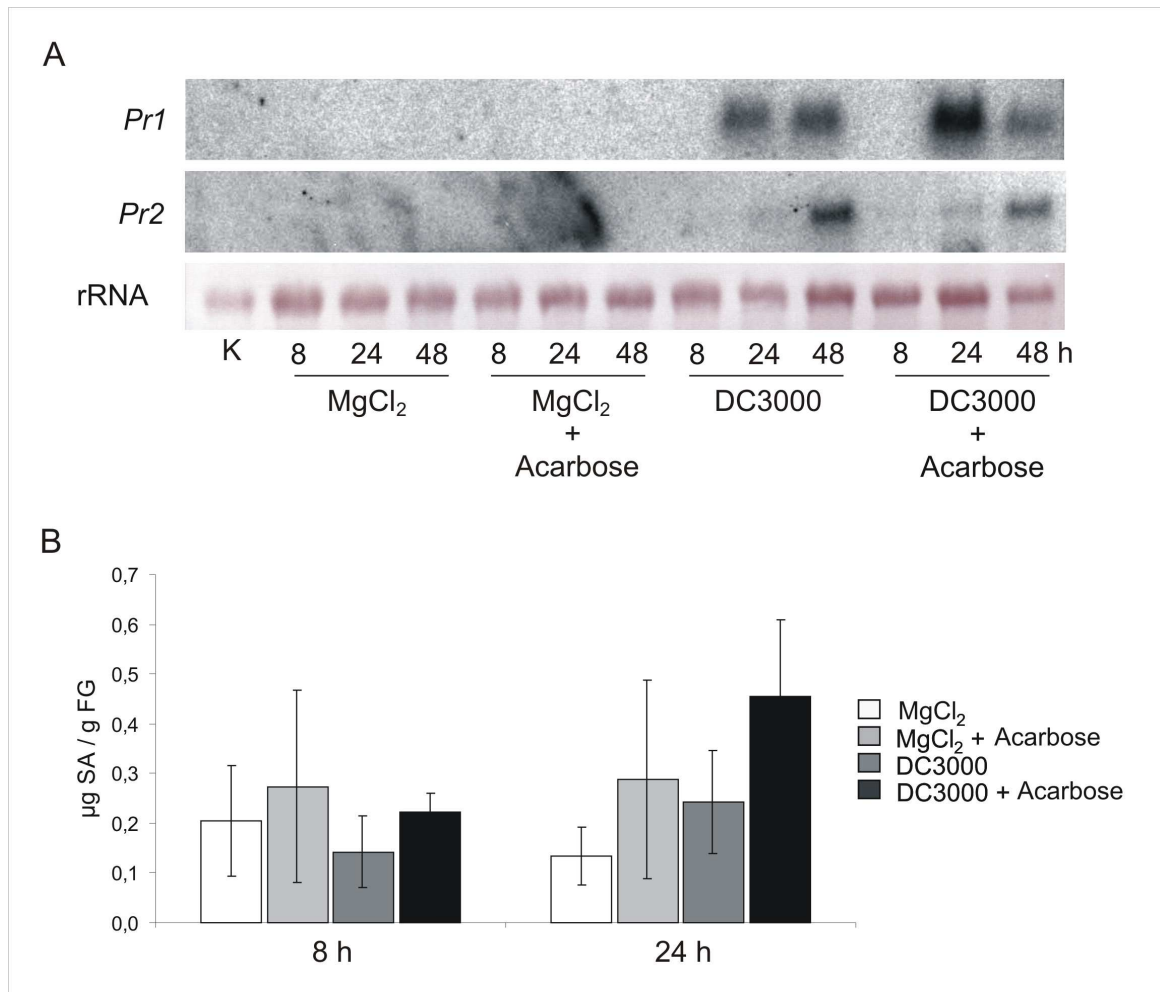


Abb. 15: Effekte der Acarbose auf den Salicylsäure-vermittelten Weg der pflanzlichen Abwehr. (A) Induktion der Genexpression von *Pr1* und *Pr2* erfolgte ausschließlich nach Infektion mit 10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose, die Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl₂ \pm 10 mM Acarbose induzierte keine Genexpression. Der Versuch wurde dreimal wiederholt, ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. Es wurden 10 µg RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. (B) Bestimmung der Salicylsäure (SA) nach Infektion mit 10^5 cfu/ml DC3000 \pm 10 mM Acarbose bzw. Kontrollbehandlung mit 10 mM MgCl₂ \pm 10 mM Acarbose. Gezeigt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten \pm SD.

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen und die Bestimmungen der SA-Gehalte deuteten darauf hin, dass die durch Acarbose erhöhte Sensitivität gegenüber einer Infektion mit DC3000 nicht auf einer Inhibition des Salicylsäure-vermittelten Abwehrweges beruht.

Für die funktionelle Analyse, ob der Salicylsäureweg der Abwehr in die Acarbose-vermittelte erhöhte Sensitivität involviert ist, wurden zwei Mutanten und eine transgene Pflanze von *A. thaliana* eingesetzt, die in der Salicylsäure-abhängigen Abwehr verändert sind. Die Mutante *sid2* mit einer Mutation in *Ics1* kann weder SA akkumulieren noch *Pr*-Gene exprimieren. Auch eine SAR kann infolge der Mutation nicht ausgebildet werden (Wildermuth *et al.*, 2001). Die transgene Pflanze *nahG* exprimiert die Salicylathydroxylase, welche SA zu Catechol abbaut. Es akkumuliert in der Folge ebenfalls keine SA (Gaffney *et al.*, 1993; Delaney *et al.*,

1994). Die Mutante *cpr6* exprimiert konstitutiv *Pr1* und weist konstitutiv erhöhte Salicylsäurespiegel auf (Clarke *et al.*, 1998).

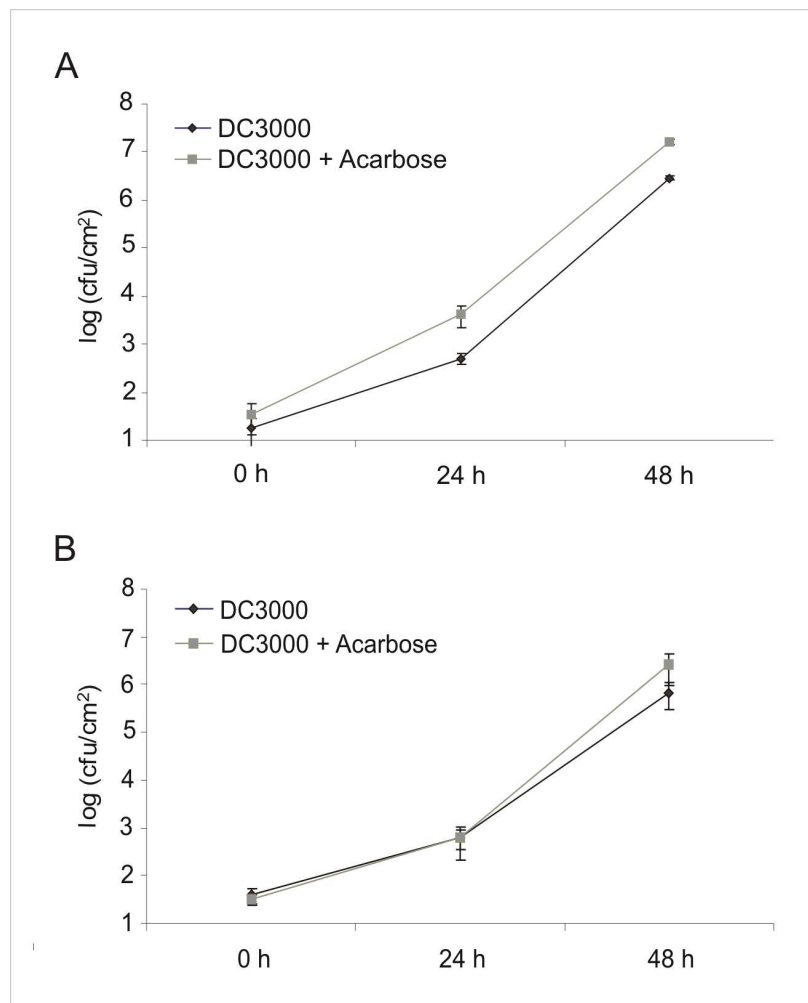


Abb. 16: Wirkungen der Acarbose auf das Wachstum von *P. syringae* in Mutanten von *A. thaliana*. Die Quantifizierung des Bakterienwachstums von DC3000 \pm 10 mM Acarbose erfolgte in *sid2* (A) sowie *cpr6* (B) durch Reisolierung. Gezeigt ist die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien eines repräsentativen Versuchs in Dreifachbestimmung nach Reisolierung aus infizierten Blättern von *A. thaliana* (Bakteriendichte 10^5 cfu/ml). Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Das Bakterienwachstum von DC3000 in der Mutante *sid2* war, wie erwartet, im Vergleich zum Wildtyp erhöht (Abb. 16A). Die zusätzliche Behandlung mit Acarbose bewirkte ein weiter erhöhtes Bakterienwachstum um Faktor 8,4 zum Zeitpunkt 24 h p. i. und um Faktor 5,6 zum Zeitpunkt 48 h p. i.. Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Es wurde erwartet, dass die transgene Pflanzenlinie *nahG* ähnliche Ergebnisse liefert wie *sid2*, da auch diese Pflanze keinen funktionellen Salicylsäureweg der pflanzlichen Abwehr besitzt. Die Annahme konnte jedoch nicht bestätigt werden. Sowohl ein erhöhtes Bakterienwachstum in Proben mit Acarbose als auch ein vergleichbares Bakterienwachstum zwischen Proben mit und ohne Acarbose wurden festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Die Mutante *cpr6* sollte aufgrund des konstitutiv aktivierten Salicylsäureweges pflanzlicher Abwehr resistenter gegenüber einer Infektion mit *P. syringae* sein. Dies konnte bestätigt werden. Jedoch war auch in dieser Mutante das Bakterienwachstum nach Zugabe von Acarbose zum Zeitpunkt 48 h p. i. um Faktor 3,9 im Vergleich zu Proben ohne Acarbose erhöht (Abb. 16B).

Acarbose erhöht demnach die Sensitivität gegenüber einer Infektion mit DC3000 sowohl in Pflanzen ohne intakten Salicylsäureweg als auch in Pflanzen mit konstitutiv aktiviertem Salicylsäureweg der pflanzlichen Abwehr.

4.2.2 Transgene Ansätze zur Inhibition von Invertasen

Parallel zur chemischen Inhibition von Invertasen wurde ein zweiter Ansatz zur Repression der Invertaseaktivität in Pflanzen verfolgt. Es wurden transgene Pflanzen mit reprimierter Invertaseaktivität durch die Expression proteinogener Invertaseinhibitoren erzeugt. Verschiedene Konstrukte aus jeweils einem Invertaseinhibitor unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors wurden dazu verwendet.

4.2.2.1 Invertaseinhibitoren aus *A. thaliana* unter Kontrolle synthetischer Pflanzenpromotoren

Die Auswahl der synthetischen pathogen- und wundinduzierbaren Promotoren erfolgte aufgrund der Tatsache, dass diese allein durch eine Pathogeninfektion induzierbar sind und daher keine chemischen Induktoren eingesetzt werden müssen. Erfolgt keine Pathogeninfektion oder Verwundung, sollten die Promotoren nicht induziert sein.

Drei Promotoren, bestehend jeweils aus Tetrameren verschiedener *cis*-regulatorischer Elemente, wurden für die Klonierung der Konstrukte ausgewählt, darunter der Promotor 4xJERE, der durch Jasmonate und verschiedene Elicitoren induzierbar ist („jasmonate and elicitor responsive element“, Menke *et al.*, 1999), der Promotor 4xS, der durch verschiedene pilzliche Elicitoren induzierbar ist (Kirsch *et al.*, 2000) und der Promotor 4xS/4xW2, welcher neben der Box S eine W-Box enthält. W-Boxen sind Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren (Rushton *et al.*, 1996) und werden als wichtige Gruppe *cis*-regulatorischer Elemente für pflanzliches Abwehrverhalten angesehen (Maleck *et al.*, 2000). Als Invertaseinhibitoren wurden zwei endogene Inhibitoren aus *A. thaliana* verwendet, *AtC/VIF1* und *AtC/VIF2*. Die Klonierungsstrategie, bestehend aus zwei Teilklonierungsschritten mit der anschließenden stabilen Transformation von *A. thaliana* Col-0 wurde in Bonfig (2004) beschrieben. Die Transformation von *A. thaliana* mit den Konstrukten 4xJERE::*AtC/VIF1*, 4xS::*AtC/VIF2* und 4xW2/4xS::*AtC/VIF1* erfolgte mit Hilfe der Methode des „Floral Dip“. Jedes der drei Konstrukte wurde dreimal unabhängig transformiert. Die von den transformierten Pflanzen

produzierten Samen wurden sterilisiert und auf geeignete Selektionsplatten ausgelegt. Lediglich 20 der steril ausgelegten ca. 17000 Samen keimten aus und erreichten das 4-Blatt-Stadium. Ein weiteres Wachstum über dieses Entwicklungsstadium hinaus konnte auch nach dem Umsetzen auf neue Selektionsplatten bzw. in Erde nicht beobachtet werden. Es konnten damit keine transgenen Pflanzen generiert werden.

4.2.2.2 Invertaseinhibitoren aus *A. thaliana* unter Kontrolle eines Estradiol-induzierbaren Promotors

Transgene Pflanzen von *A. thaliana*, die die Invertaseinhibitoren *AtC/VIF1* (pER8::*AtC/VIF1*) bzw. *AtC/VIF2* (pER8::*AtC/VIF2*) jeweils unter der Kontrolle eines Estradiol-induzierbaren Promotors (pER8) exprimieren (Zuo *et al.*, 2000), wurden von MC Gonzalez zur Verfügung gestellt. Zusätzlich war die Pflanzenlinie pER8::*CIN1* verfügbar, welche die Invertase *CIN1* aus *Chenopodium rubrum* exprimieren kann.

Zunächst wurde untersucht, ob nach Induktion des Promotors durch 50 µM β-Estradiol ähnliche phänotypische Effekte zu beobachten sind wie nach einer Pathogeninfektion unter Zugabe von Acarbose. Die Pflanzen wurden dafür mit *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 und mit *A. brassicicola* infiziert und der Infektionsverlauf phänotypisch dokumentiert. Es standen für das Konstrukt pER8::*AtC/VIF2* acht unabhängige Linien zur Verfügung (301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308), davon waren die Linien 302 und 303 homozygot und für das Konstrukt pER8::*AtC/VIF1* sechs unabhängige Linien (310, 312, 313, 315, 316, 317), von denen die Linien 313 und 315 homozygot waren. Für das Konstrukt pER8::*CIN* waren 8 unabhängige Linien verfügbar (318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325). Alle Pflanzenlinien wurden zunächst auf Selektionsmedium angezogen und nach ca. zwei Wochen in Erde umgesetzt. Die Infektionen erfolgten ca. drei Wochen nach dem Umsetzen durch Infiltration einer Suspension von DC3000 (10^6 cfu/ml) bzw. durch Applikation einer Sporensuspension von *A. brassicicola* (5×10^5 Sporen/ml) in Tropfenform. Der Infektionsverlauf in Pflanzen, die 24 h vor der Infektion induziert wurden und der Infektionsverlauf in nicht induzierten Pflanzen wurden über 72 h beobachtet.

Weder nach Infektion mit DC3000 noch nach Infektion mit *A. brassicicola* konnten Unterschiede in den phänotypischen Symptomen zwischen nicht induzierten und induzierten Pflanzenlinien mit dem Konstrukt pER8::*AtC/VIF2* festgestellt werden. Dies galt für alle acht getesteten Linien 301 bis 308. Abb. 17A zeigt eine repräsentative Linie nach Infektion mit DC3000. Der Versuch wurde für jedes Pathogen zweimal unabhängig voneinander mit jeweils mindestens drei unabhängigen Pflanzen durchgeführt.

In transgenen Pflanzen der Linien 310, 312, 315, 316 und 317 (pER8::*AtC/VIF1*) wurden die gleichen Beobachtungen für beide Pathogene in mindestens zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen dokumentiert. Lediglich die Linie 313 schien zunächst in zwei

unabhängigen Versuchen nach einer Induktion mit β -Estradiol sensitiver auf eine nachfolgende Infektion mit DC3000 zu reagieren. Zwei weitere unabhängige Versuche, in denen induzierte und nicht induzierte Pflanzen mit DC3000 infiziert wurden (Daten nicht gezeigt), konnten das zunächst erhaltene Ergebnis nicht bestätigen.

Auch in den Linien, die die Invertase CIN1 unter Kontrolle des Promotors pER8 exprimieren, konnte weder nach Infektion mit DC3000 noch nach Infektion mit *A. brassicicola* eine Änderung der Sensitivität zwischen induzierten und nicht induzierten Pflanzen dokumentiert werden. Die Linien wurden für jedes Pathogen mindestens zweimal unabhängig mit je mindestens drei Wiederholungen getestet (Daten nicht gezeigt).

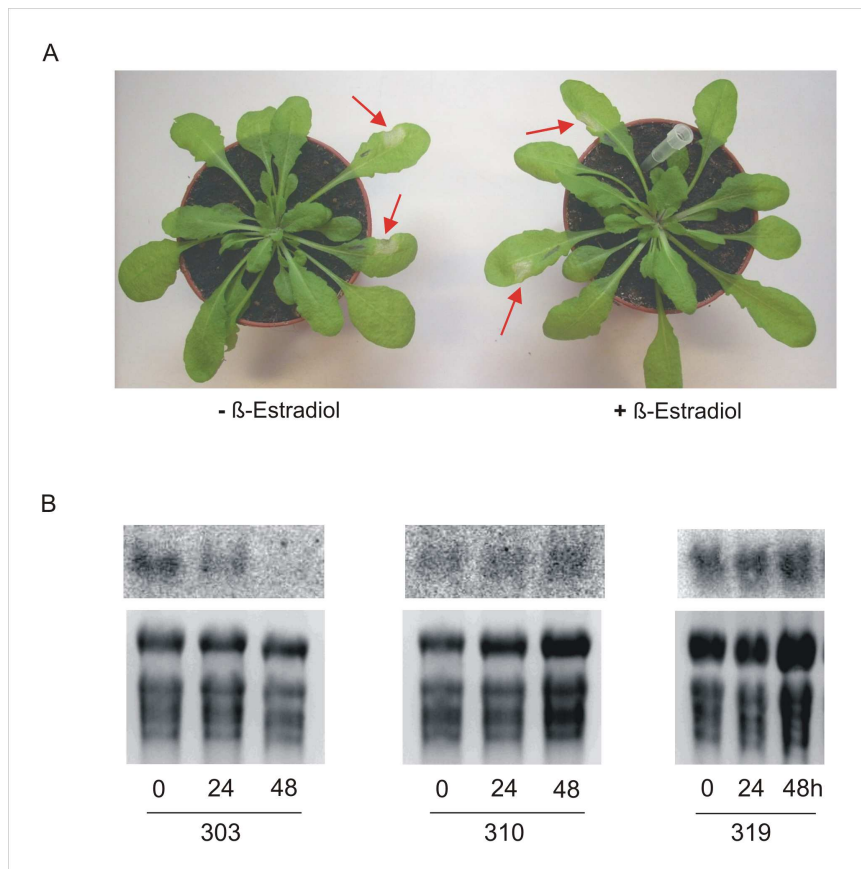


Abb. 17: Effekte der Induktion des Estradiol-induzierbaren Promotorsystems in den transgenen Linien pER8::*AtC/VIF2*, pER8::*AtC/VIF1* und pER8::*CIN1*. (A) Die Vorbehandlung von Blättern mit 50 μ M β -Estradiol führte in keiner der getesteten Linien zu signifikanten phänotypischen Veränderungen nach anschließender Infektion mit 10^6 cfu/ml DC3000 im Vergleich zu nicht vorbehandelten Blättern. Gezeigt ist eine repräsentative Linie (pER8::*AtC/VIF2*) 72 h nach der Infektion mit DC3000. (B) Regulation der Genexpression von *AtC/VIF2* (Linie 303), *AtC/VIF1* (Linie 310) bzw. *Cin1* (Linie 319) vor, sowie 24 h und 48 h nach Behandlung der Blätter mit 50 μ M β -Estradiol. Gezeigt ist jeweils ein repräsentativer Northern Blot für jedes der drei Konstrukte. Pro Konstrukt wurden mindestens drei unabhängige Linien in zwei- oder dreifacher Wiederholung getestet. Es wurden 10 μ g RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert.

Da zwischen induzierten und nicht induzierten Pflanzen keine Sensitivitätsunterschiede gegenüber einer Pathogeninfektion erkennbar waren, sollte mittels Northern Blot Analysen

getestet werden, ob das Promotorsystem an sich induzierbar ist und es infolge einer Behandlung von Blättern mit β -Estradiol zu einer Expression der Invertaseinhibitoren *AtC/VIF1* und *AtC/VIF2* bzw. der Invertase *CIN1* kommt. Jeweils mindestens drei verschiedene transgene Linien wurden dazu von jedem Konstrukt ausgewählt und die Induzierbarkeit des Promotors überprüft. Für das Konstrukt pER8::*AtC/VIF2* wurden die Linien 302, 303 und 306 getestet, für das Konstrukt pER8::*AtC/VIF1* die transgenen Linien 310, 312 und 313 und für das Konstrukt pER8::*CIN1* die Linien 319, 320, 323 und 324. Bei den transgenen Linien mit dem Konstrukt pER8::*CIN1* war der Promotor konstitutiv aktiv, da bereits in den unbehandelten Pflanzen starke Signale detektierbar waren, für die Linien mit den Konstrukten pER8::*AtC/VIF2* und pER8::*AtC/VIF1* kann dies nicht eindeutig bestätigt werden, da die beiden Invertaseinhibitoren endogen in den Pflanzen vorkommen und somit detektierte Signale nicht spezifisch zugeordnet werden können. Es wurde jedoch keine Induktion des Promotors beobachtet. Eine repräsentative Auswahl der durchgeführten Northern Blot Analysen ist in Abb. 17B gezeigt.

4.2.2.3 Der Invertaseinhibitor *NtCIF* aus *N. tabacum* unter Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors

Die transgenen Pflanzenlinien pER8::*AtC/VIF1* und pER8::*AtC/VIF2* zeigten, dass nicht zwischen endogenen Transkripten und synthetisierten Transkripten infolge der Induktion des Promotorsystems unterschieden werden konnte.

In dem nun verfolgten funktionellen Ansatz wurde der gut charakterisierte Invertaseinhibitor *NtCIF* aus *N. tabacum* (Greiner *et al.*, 1998; Krausgrill *et al.*, 1998; Horthorn *et al.*, 2004a) unter Kontrolle eines Dexamethason (DEX)-induzierbaren Promotorsystems in *A. thaliana* Col-0 exprimiert. Die Induzierbarkeit des Promotors konnte für *A. thaliana* beschrieben werden (Craft *et al.*, 2005; Moore *et al.*, 2006). Reporterlinien, welche die β -Glucuronidase unter Kontrolle dieses Promotors exprimieren, wurden von I. Moore (Department of Plant Sciences, University of Oxford, Oxford) zur Verfügung gestellt und auf Induzierbarkeit getestet. Dazu wurden Pflanzen angezogen und nach sechs Wochen durch Besprühen (20 μ M DEX) oder durch Infiltration (2 μ M bzw. 20 μ M DEX) induziert. Nach der Induktion wurde die *uidA*-Expression im Zeitverlauf dokumentiert, repräsentative Aufnahmen eines in zweifacher Wiederholung mit jeweils mindestens fünf unabhängigen Pflanzen durchgeführten Versuchs sind in Abb. 18 gezeigt.

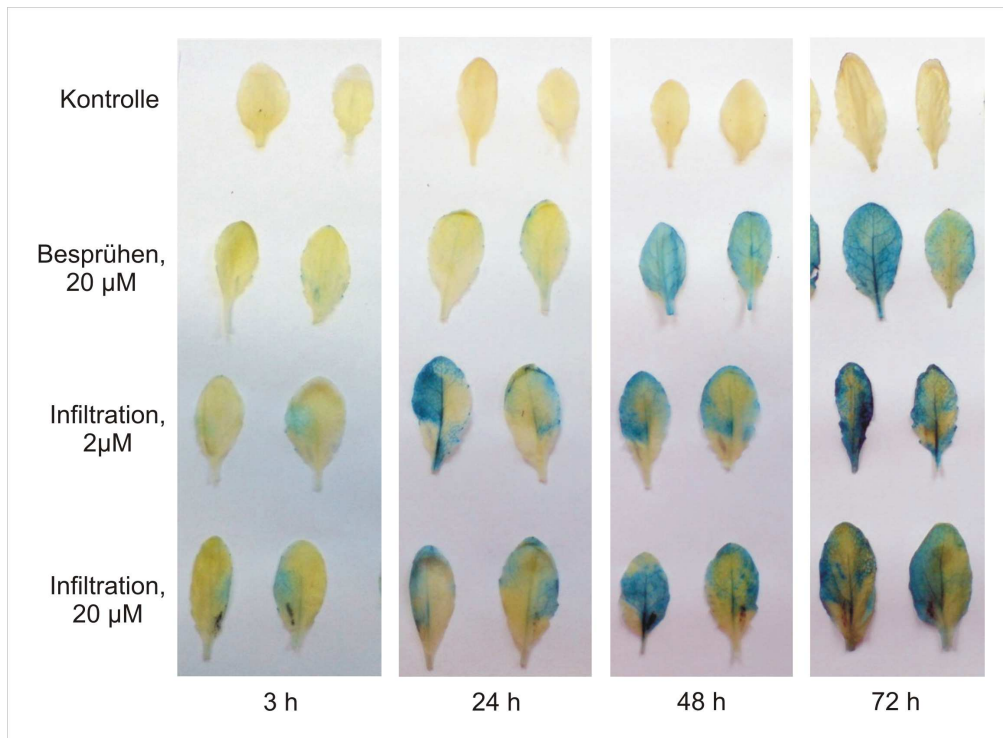


Abb. 18: Histologischer Nachweis der *uidA*-Expression in Blättern von *A. thaliana*. Die Reporterlinien exprimieren die β -Glucuronidase (GUS) unter Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors. Die Blätter wurden durch Besprühen (20 μ M) oder durch Infiltration (2 μ M bzw. 20 μ M) induziert und die GUS-Aktivität im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle über einen Zeitraum von 72 h dokumentiert. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen eines in zweifacher Wiederholung mit jeweils mindestens fünf unabhängigen Blättern durchgeführten Versuchs.

Das Konstrukt DEX::*NtCIF* wurde generiert (Klonierungsstrategie siehe Anhang, Abb. 30), indem zunächst der Invertaseinhibitor *NtCIF* mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I aus dem Plasmid pGemNTCI geschnitten wurde. Gleichzeitig wurde der binäre Vektor pV-TOP mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I aufgeschnitten. Das Plasmid pGemNTCI wurde von J. Hirsche zur Verfügung gestellt, der binäre Vektor pV-TOP mit dem Dexamethason-induzierbaren Promotor von I. Moore.

Nach Aufreinigung des Inhibitors *NtCIF* und des Vektors pV-TOP über ein Agarosegel und anschließender Dephosphorylierung des Vektors durch die alkalische Phosphatase CIAP wurde der Invertaseinhibitor in pV-TOP ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* transformiert und anschließend auf geeignete Selektionsplatten (LB_{Kan}) ausplattiert. 24 h nach der Transformation wurden mehrere Bakterienkolonien von den Selektionsplatten gepickt und in Flüssigmedium kultiviert. Nach Isolation der Plasmid-DNA aus diesen Kolonien wurde der Einbau der Gensequenz für *NtCIF* in den Vektor durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Sal*I überprüft. Kolonien, die nach Auftrennung der verdauten Plasmid-DNA in einem Agarosegel neben der Bande für den Vektor bei ca. 10 kb eine Bande der Größe 533 bp aufwiesen, waren transformiert. Eine der transformierten Kolonien wurde ausgewählt, erneut in Flüssigkultur angezogen und die erfolgreiche

Transformation durch eine Sequenzierung bestätigt (Ergebnis der Sequenzierung siehe Anhang, Abb. 31). Nach dieser Bestätigung wurde die Bakterienkultur in einem Volumen von 100 ml angezogen, eine Midi-Präparation durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA in kompetente Agrobakterien transformiert. Die Identifizierung transformierter *A. tumefaciens* erfolgte durch eine Färbung mit Benedicts-Reagenz und durch einen sogenannten „Colony Screen“ (Abb. 19A). Eine als positiv identifizierte Agrobakterienkolonie (Kolonie 2, *) wurde zur Transformation von *A. thaliana* in einem Volumen von 150 ml kultiviert. Die Aktivatorlinien des Dexamethason-induzierbaren Promotorsystems (4C-S5 oder 4C-S7, zur Verfügung gestellt von I. Moore) wurden mit Hilfe des „Floral Dip“ transformiert. Es erfolgten zwei unabhängige Transformationen mit jeweils ca. 12 Pflanzen.

Nach der Bildung von Samen in den transformierten Pflanzen wurden diese gesammelt, ca. zwei Wochen bei 4°C gelagert und steril auf geeignete Selektionsagarplatten (MS_{Hyg}) ausgelegt. Zwei bis drei Wochen nach der Keimung starben die Keimlinge aus nicht transformierten Samen ab, während sich die Keimlinge aus transformierten Samen weiter entwickelten.

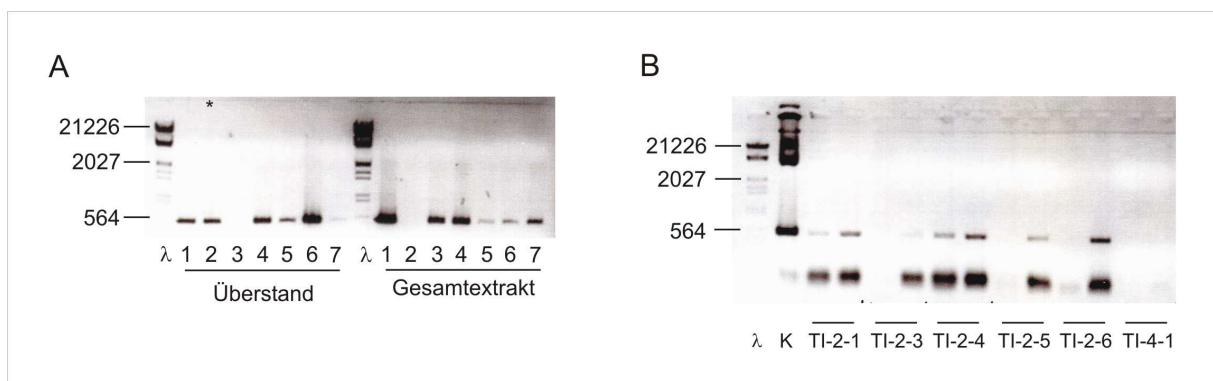


Abb. 19: Nachweis der DNA-Sequenz des Invertaseinhibitors *NtCIF* in *A. tumefaciens* bzw. *A. thaliana*. (A) Alle sieben getesteten Kolonien von *A. tumefaciens* zeigen nach Amplifikation mittels PCR entweder im Überstand des bakteriellen Lysats, im Gesamtextrakt oder in beiden Fraktionen die erwartete Bande für *NtCIF* bei 533 bp. Kolonie 2 (*) wurde für die Transformation von *A. thaliana* verwendet. (B) Von den getesteten sechs *A. thaliana* Pflanzen nach der Selektion weisen die Pflanzen TI-2-1, TI-2-3, TI-2-4, TI-2-5 und TI-2-6 die gewünschte Bande des Invertaseinhibitors bei 533 bp auf, in der Pflanze TI-4-1 konnte diese nicht amplifiziert werden. Als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (K) wurde Plasmid-DNA von pGemNTCI amplifiziert. Als Größenstandard wurde jeweils *EcoRI/HindIII* verdaute λ -DNA aufgetragen.

Aus der Pflanzentransformation I konnten zunächst 7 Pflanzen detektiert werden, die sich über das Keimlingsstadium hinaus entwickelten. Eine der Pflanzen produzierte keine Samen (TI-2-2). Von den verbliebenen sechs Pflanzen konnte für fünf (TI-2-1, TI-2-3, TI-2-4, TI-2-5 und TI-2-6) in einer PCR an isolierter genomischer DNA die gewünschte Bande des Invertaseinhibitors *NtCIF* amplifiziert werden (Abb. 19B). Eine Pflanze wurde nicht als transgen getestet (TI-4-1).

Aus der Transformation II entwickelten sich zunächst 19 Pflanzen über das Keimlingsstadium hinaus. Vier Pflanzen konnten nicht bis zur Samenproduktion kultiviert werden, sie starben vorher ab (TII-2, TII-3, TII-5 und TII-6). Von den 15 Pflanzen, die vermehrt werden konnten, wurden in einer PCR 13 Pflanzen positiv auf die Gensequenz des Invertaseinhibitors *NtCIF* getestet (TII-4, TII-7, TII-8, TII-9, TII-10, TII-11, TII-12, TII-13, TII-14, TII-15, TII-16, TII-18 und TII-19, Daten nicht gezeigt). In zwei Pflanzen konnte der Invertaseinhibitor *NtCIF* nicht amplifiziert werden (TII-1 und TII-17).

Die positiv getesteten Pflanzen wurden jeweils bis zur Samenproduktion kultiviert, die produzierten Samen der T2-Generation gesammelt und bei 4°C aufbewahrt.

Für Infektionsversuche nach der Induktion des Promotors wurden die transgenen Pflanzenlinien der T2-Generation zunächst auf Selektionsmedium angezogen und nach ca. zwei Wochen in Erde pikiert. Infektionen erfolgten drei bis vier Wochen nach dem Umsetzen durch Infiltration einer Bakteriensuspension von DC3000 (10^6 cfu/ml) oder durch Applikation einer Sporensuspension von *A. brassicicola* (5×10^5 Sporen/ml) auf die Blattoberfläche. Der Infektionsverlauf in Pflanzen, die 24 h vor der Infektion induziert wurden und der Infektionsverlauf in nicht induzierten Pflanzen wurden über 72 h beobachtet. Zunächst konnte in vier der fünf getesteten Pflanzenlinien aus Transformation I nach einer Infektion mit DC3000 eine Sensitivitätserhöhung in den induzierten Pflanzen beobachtet werden. Nekrosen entwickelten sich früher und stärker als in nicht induzierten Pflanzen. In drei Wiederholungen dieses Versuchs sowie in drei Versuchen, in denen induzierte und nicht induzierte Pflanzen mit *A. brassicicola* infiziert wurden, konnten keine Sensitivitätsunterschiede beobachtet werden. Auch nach Infektion der 13 Pflanzenlinien der Transformation II mit DC3000 oder *A. brassicicola* konnten keine Unterschiede im phänotypischen Krankheitsverlauf zwischen induzierten und nicht induzierten Pflanzen dokumentiert werden. Es erfolgten ebenfalls für beide Pathogene drei unabhängige Wiederholungen mit jeweils mindestens drei unabhängigen Pflanzen (Daten nicht gezeigt).

Analog zu den Pflanzen mit dem Estradiol-induzierbaren Promotorsystem wurde auch in diesen Pflanzenlinien mit Hilfe von Northern Blot Analysen getestet, ob das Promotorsystem *per se* durch Dexamethason induzierbar ist und es demnach zu einer Expression des Invertaseinhibitors *NtCIF* kommt. Es wurden alle fünf Pflanzenlinien der Transformation I in dreimaliger Wiederholung und die Linien TII-7 und TII-11 doppelt jeweils vor und 24 h und 48 h nach der Induktion mit 50 µM Dexamethason getestet. Bei den Pflanzenlinien aus Transformation I konnten keine Signale detektiert werden (Daten nicht gezeigt), die zwei getesteten Linien aus Transformation II waren induzierbar (Abb. 20A). Der Promotor der Linie TII-7 war in beiden Versuchswiederholungen nach 24 h, der Promotor der Linie TII-11 jeweils 24 h und 48 h nach der Induktion mit Dexamethason aktiv.

Da mit der Genkassette DEX::*NtCIF* gleichzeitig das *uidA*-Gen transformiert wurde (siehe Anhang, Abb. 30), konnte die Induzierbarkeit des Promotors auch über eine Färbung auf die Aktivität der β -Glucuronidase überprüft werden. Zu beiden Zeitpunkten nach der Induktion (24 h und 48 h) konnte eine starke Aktivität der β -Glucuronidase gezeigt werden (Abb. 20B). Die parallel zu diesen Linien getestete Aktivatorlinie 4C-S7 zeigte wie erwartet keine Aktivität der β -Glucuronidase (Daten nicht gezeigt). Auch für die Pflanzenlinien der Transformation I wurde der histologische Nachweis geführt. Im Gegensatz zu den Northern Blot Analysen, bei denen keine Signale detektiert werden konnten, waren die Ergebnisse der histologischen Färbung mit denen der Abb. 20B vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

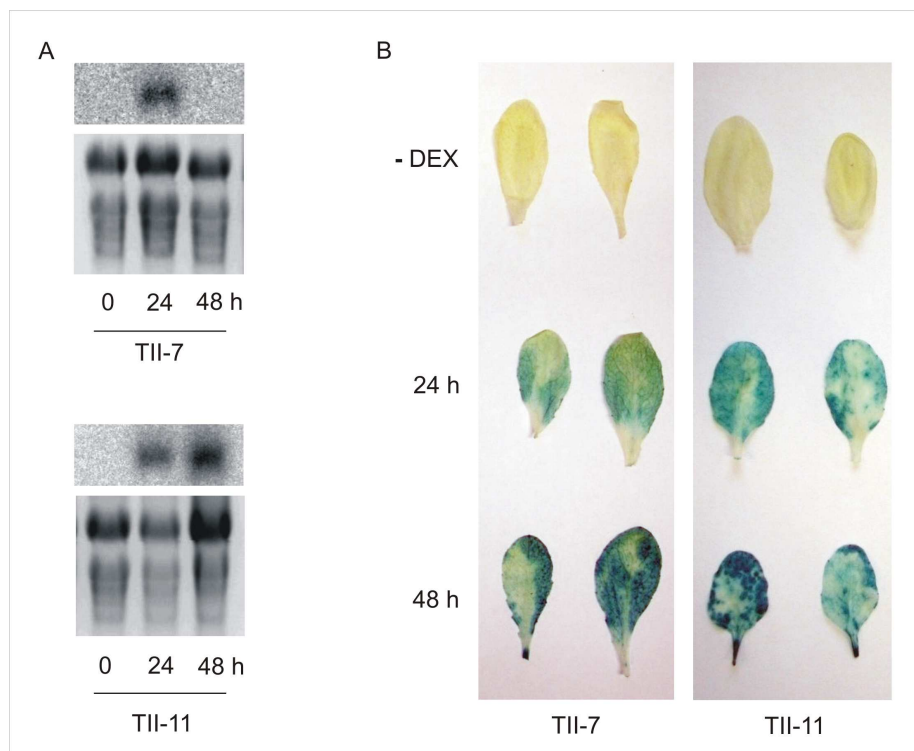


Abb. 20: Effekte der Induktion des Dexamethason-induzierbaren Promotors in transgenen Linien TII-7 und TII-11 (DEX::*NtCIF*). (A) Regulation der Genexpression von *NtCIF* nach Infiltration der Blätter mit 50 μ M Dexamethason. Gezeigt ist jeweils ein Northern Blot aus zwei Wiederholungen. Es wurden 10 μ g RNA jeder Probe auf das Gel geladen und die Beladung mittels Ethidiumbromid-Färbung kontrolliert. (B) Histologischer Nachweis der *uidA*-Expression in Blättern von *A. thaliana* vor (-DEX) und nach (24 h, 48 h) dem Besprühen der Blätter mit 50 μ M Dexamethason. Gezeigt sind jeweils zwei von drei unabhängigen Blättern für jeden der getesteten Zeitpunkte.

4.3 Bedeutung und Funktion von Invertasen während der Keimlingsentwicklung

Zur Untersuchung der Bedeutung von Invertasen während der Keimlingsentwicklung wurden die funktionellen Ansätze aus Kapitel 4.2.2.1 weiter verfolgt. Vermeintlich transgene Keimlinge von *A. thaliana*, die mit den Konstrukten 4xJERE::AtC/VIF1, 4xS::AtC/VIF2 und 4xW2/4xS::AtC/VIF1 transformiert worden waren, entwickelten sich nicht über das 4-Blatt-Stadium hinaus. Eine Selektionsplatte mit mehreren Keimlingen des transformierten Konstruktes 4xS::AtC/VIF2 ist in Abb. 21A gezeigt. Keimlinge, die mit den anderen beiden Konstrukten transformiert worden waren, hatten ein ähnliches phänotypisches Erscheinungsbild (Daten nicht gezeigt).

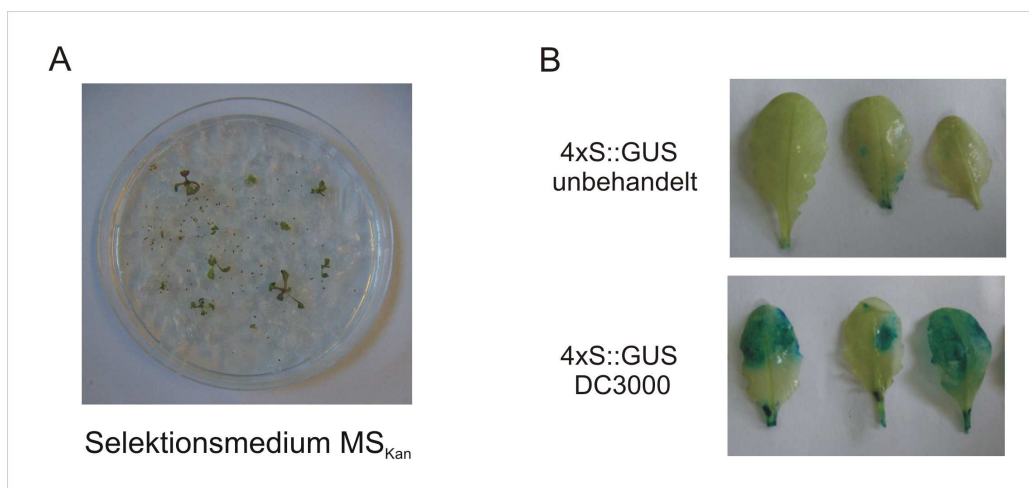


Abb. 21: (A) Arretierung des Wachstums von *A. thaliana* Keimlingen als Folge der Invertaseinhibitor-expression AtC/VIF2 unter Kontrolle des synthetischen Promotors 4xS. T1-Samen transformierter Pflanzen wurden sterilisiert und auf Selektionsmedium (MS_{Kan}) ausgelegt. Zwei Wochen nach der Keimung wurden die grünen Keimlinge verschiedener Platten auf einer Platte vereinigt und nach weiteren 7 Tagen fotografiert. (B) Expression des synthetischen Promotors 4xS nach Infiltration mit 10^8 cfu/ml DC3000. Pflanzen, die die β -Glucuronidase (GUS) unter Kontrolle des Promotors 4xS exprimieren, wurden ca. 6 Wochen nach der Aussaat infiziert und mittels Färbung auf die Aktivität der β -Glucuronidase getestet. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt, repräsentative Blätter sind gezeigt (verändert nach Bonfig *et al.*, 2007).

Über die Promotoren, die zur Generierung der Konstrukte verwendet wurden, war aus der Literatur eine niedrige konstitutive Expression sowie eine starke Induzierbarkeit nach Pathogeninfektionen bekannt (Rushton *et al.*, 2002). Die vorhergesagten Expressionsmuster wurden mit Hilfe von Reporterlinien überprüft, die die β -Glucuronidase unter Kontrolle dieser synthetischen Promotoren exprimieren. In Übereinstimmung mit den publizierten Daten konnte nur eine geringe Aktivität der β -Glucuronidase (GUS) in Rosettenblättern unbehandelter Pflanzen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu war eine stark induzierte *uidA*-Expression nach einer Infektion mit 10^8 cfu/ml DC3000 sichtbar. Abb. 21B zeigt

beispielhaft Blätter der Linie 4xS::GUS vor bzw. 24 h nach der Infektion mit DC3000. Für die Linien 4xJERE::GUS und 4xW2/4xS::GUS wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

Da eine Entwicklungsarretierung der Keimlinge im 4-Blatt-Stadium eintrat, wurde mit Hilfe der Reporterlinien untersucht, ob die Promotoren in diesem Entwicklungsstadium aktiv sind. Es konnte unter den *in vitro* Selektionsbedingungen (MS_{Kan}) eine sehr starke Aktivität in den Keimblättern aller Reporterlinien und den Wurzeln der Linie 4xW2/4xS::GUS detektiert werden. Auch Wurzeln von Keimlingen mit den Konstrukten 4xJERE::GUS und 4xS::GUS und primäre und sekundäre Blätter aller Reporterlinien zeigten eine starke *uidA*-Expression (Abb. 22).

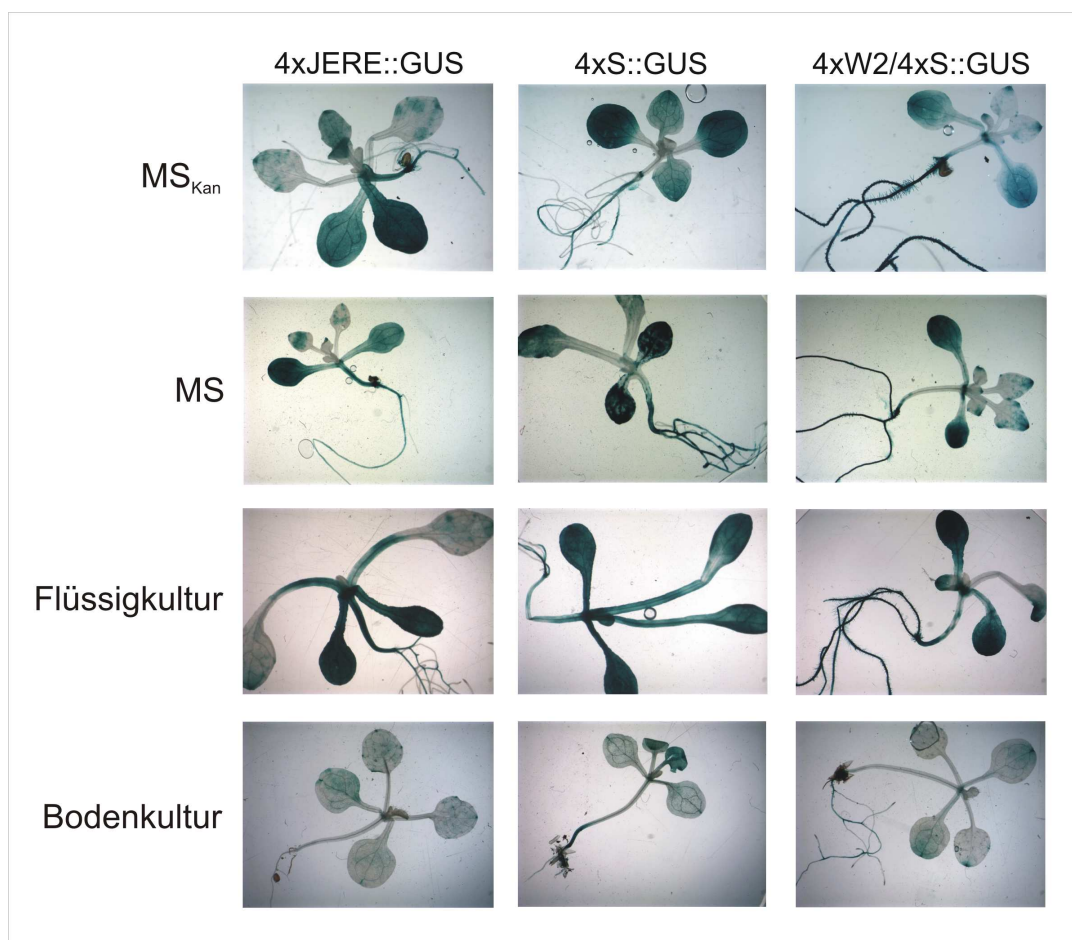


Abb. 22: Expression der synthetischen Promotoren 4xJERE, 4xS und 4xW2/4xS in Keimlingen nach Anzucht unter verschiedenen Anzuchtbedingungen. Keimlinge, die die β -Glucuronidase unter Kontrolle der drei Promotoren exprimieren, wurden auf Agarmedium mit bzw. ohne Selektionsantibiotikum, in Flüssigkultur oder auf Erdboden angezogen und nach 13 bis 15 Tagen durch eine Färbung auf die Aktivität der β -Glucuronidase getestet. Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt, repräsentative Keimlinge wurden ausgewählt und gezeigt (verändert nach Bonfig *et al.*, 2007).

Um zu untersuchen, ob die Aktivität der β -Glucuronidase auf den Wachstumsbedingungen beruht, wurden diese variiert. Zunächst wurden Keimlinge steril auf MS-Platten ohne Selektionsantibiotikum angezogen. Da das Ergebnis einer Färbung mit dem Ergebnis der Färbung nach Anzucht der Keimlinge auf Selektionsplatten mit Antibiotikum vergleichbar war, konnte ein Effekt des Antibiotikums auf die Aktivität der Promotoren ausgeschlossen werden. Da der Agar in den Selektionsplatten ein weiterer Faktor sein könnte, der die Promotoraktivität beeinflusst, wurden Keimlinge nach Anzucht in Flüssigmedium gefärbt. Es wurde eine zum Teil noch intensivere Färbung bei diesen Keimlingen beobachtet als bei Keimlingen, die auf Festmedium angezogen wurden. Auch Pflänzchen, die auf sterilem Zellstoff wuchsen, wiesen eine starke Färbung auf (Daten nicht gezeigt). Lediglich Keimlinge aller drei Reporterlinien, die auf Erde angezogen wurden, zeigten eine deutlich schwächere Färbung (Abb. 22).

Eine mögliche Erklärung dafür, dass die Keimlinge ihr Wachstum einstellten und abstarben, könnte der negative Einfluss der Expression der Invertaseinhibitoren auf das Wachstum während der Keimlingsentwicklung sein. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden transgene Tabakpflanzen eingesetzt (zur Verfügung gestellt von T. Fatima bzw. MC. Gonzalez), die endogene Invertaseinhibitoren unter der Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotors (Tet) exprimieren. Transgene Keimlinge der Pflanzenlinien Tet::*NtC1F* (68-14, 68-19 und 68-21) und Tet::*NtVIF* (83-5-2 und 83-6-14), wurden im Vergleich zum Wildtyp W38 analysiert. Um das Promotorsystem zu induzieren, wurde zunächst Chlorotetracyclin in Konzentrationen von 10, 20 oder 50 mg/l direkt in die Agarplatten gegeben. Da im Vergleich zu Kontroll-Agarplatten ohne Chlorotetracyclin bei den Agarplatten mit steigender Chlorotetracyclinkonzentration eine vollständige Inhibition der Keimung erkennbar war, wurde die Applikation des Induktors verändert: Agarplatten wurden ohne Chlorotetracyclin hergestellt. Das Wachstum von Wildtyp-Pflanzen und transgenen Linien war darauf vergleichbar. Chlorotetracyclin wurde mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette direkt auf die Keimblätter etwa 2 Wochen alter Keimlinge getropft. Für einen direkten Vergleich von induzierten und nicht induzierten Keimlingen wurde jeweils nur die Hälfte der Keimlinge einer Agarplatte behandelt, die zweite Hälfte diente als Kontrolle. Verschiedene Konzentrationen zwischen 10 und 200 mg/l Chlorotetracyclin wurden appliziert. Keine phänotypische Veränderung in behandelten Pflanzen des Wildtyps W38 und eine deutliche Wachstumsretardierung in transgenen Keimlingen wurde nach zwei- bis dreifacher Applikation von 100 mg/l Chlorotetracyclin erzielt. Alle getesteten transgenen Linien zeigten die Wachstumsretardierung und zudem ein Absinken des Chlorophyllgehaltes, wohingegen die in gleicher Weise behandelten Wildtypen phänotypisch nur geringfügig verändert waren.

Repräsentative Agarplatten mit induzierten und nicht induzierten Keimlingen von Wildtyp-Pflanzen W38 und der transgenen Linie 68-14 (Tet::*NtC1F*) sind in Abb. 23A gezeigt. Keimlinge der anderen getesteten Linien mit den transformierten Konstrukten Tet::*NtC1F* (68-19 und 68-21) bzw. Tet::*NtV1F* (83-5-2 und 83-6-14) hatten ein ähnliches Erscheinungsbild (Daten nicht gezeigt).

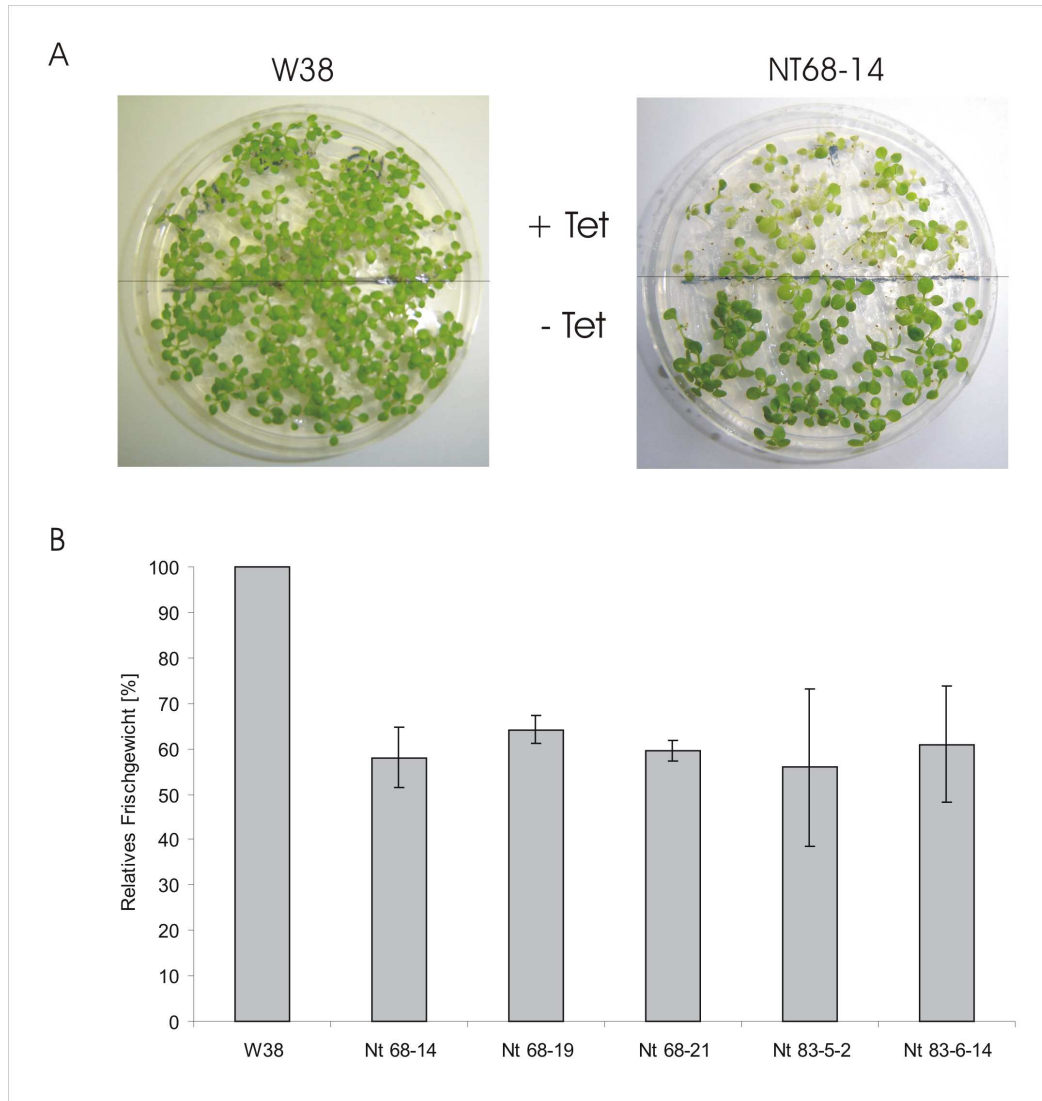


Abb. 23: Induktion von Invertaseinhibitoren unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems (Tet) während der Keimlingsentwicklung in transgenen Tabakpflanzen beeinflusst Wachstum und Phänotyp. (A) Phänotyp von Keimlingen des Wildtyps W38 und der transgenen Linie 68-14 (Tet::*NtC1F*) vor und nach der Behandlung mit Chlorotetracyclin. Samen wurden auf Agarplatten ausgelegt und nach 13 – 15 Tagen die Keimlinge je einer Plattenhälfte mehrfach mit Chlorotetracyclin betropft (+Tet). Unbehandelte Keimlinge derselben Platte dienten als Kontrolle (-Tet). (B) Frischgewicht von Keimlingen 7 Tage nach Applikation von Chlorotetracyclin. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von je 12 Keimlingen pro Platte (von 1 bis 3 Platten pro Experiment) der transgenen Tabakpflanzen mit den Tabakinvertaseinhibitoren *NtC1F* (68-14, 68-19, 68-21) und *NtV1F* (83-5-2, 83-6-14). Das Frischgewicht identisch behandelter Kontrollkeimlinge (W38) wurde gleich 100 % gesetzt. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen (verändert nach Bonfig *et al.*, 2007).

Eine statistische Analyse sieben Tage nach der Behandlung mit Chlorotetracyclin zeigte, dass die Induktion des Invertaseinhibitors zu einer Reduktion des Frischgewichtes zwischen 36 und 44 % im Vergleich zu den Kontrollkeimlingen führte (Abb. 23B). In Linie 68-14 betrug die Reduktion des Frischgewichtes 42 %, in Linie 68-19 36 %, in Linie 68-21 40 %, in Linie 83-5-2 44 % und in Linie 83-6-14 39 %. Da die behandelten Keimlinge der transgenen Linien nur noch blassgrün pigmentiert waren, wurden die Chlorophyllgehalte behandelter und unbehandelter Keimlinge bestimmt. Drei unabhängige Analysen ergaben, dass die Gehalte für Chlorophyll a und Chlorophyll b nach der Behandlung mit Chlorotetracyclin in den fünf transgenen Linien tendenziell stärker sanken als im Wildtyp W38, es gab jedoch zwischen den einzelnen Versuchen insbesondere im Wildtyp eine große Variationsbreite.

Die induzierbare Expression der Invertaseinhibitoren konnte unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen auch mit Hilfe von Northern Blot Analysen gezeigt werden. Ein Zeitverlaufsexperiment zeigt, dass die Expression der Invertaseinhibitoren *NtCIF* und *NtVIF* (Abb. 24A bzw. B) in den Linien 68-21 bzw. 83-6-14 spezifisch induziert wird. Keine Signale wurden in induzierten Wildtyp-Pflanzen detektiert (Daten nicht gezeigt).

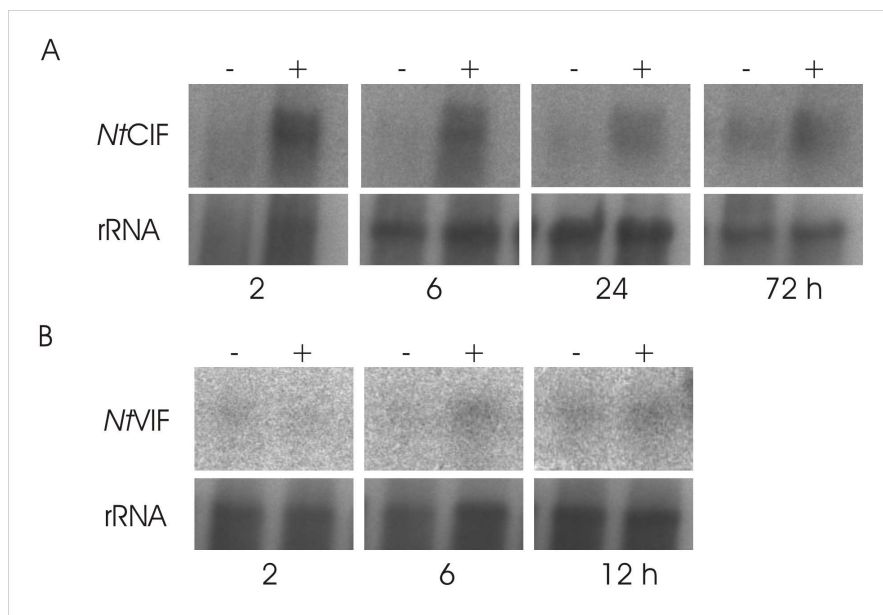


Abb. 24: Zeitverlauf des Effektes der Applikation von Chlorotetracyclin (+) auf die Expression des Invertaseinhibitors *NtCIF* (68-21, A) bzw. *NtVIF* (83-6-14, B) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (-). Jeweils ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. 10 µg RNA wurden pro Spur auf das Gel geladen und die Beladung durch Hybridisierung mit einer rRNA-Sonde kontrolliert (verändert nach Bonfig *et al.*, 2007).

Im Folgenden sollte getestet werden, ob durch die spezifische Induktion der Invertaseinhibitoren Veränderungen in den Konzentrationen der löslichen Zucker Glucose, Fructose und Saccharose ausgelöst werden. Eine Behandlung von Keimlingen der transgenen Linien

und der Wildtyp-Pflanzen mit Chlorotetracyclin führte nach 24 h und 72 h tendenziell zu einer Erniedrigung der Konzentrationen der löslichen Zucker, jedoch variierten die Ergebnisse stark (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis kann mit einer spezifisch lokalisierten Invertaseaktivität erklärt werden. In verschiedenen Studien konnte eine sehr spezifisch lokalisierte Invertaseaktivität in verschiedenen pflanzlichen Geweben mit Hilfe von *in situ* Färbungen dokumentiert werden (Godt und Roitsch, 1997; Roitsch und Ehness, 2000; Sergeeva *et al.*, 2006). *In situ* Färbungen an den Keimlingen der transgenen Linien vor und nach der Induktion des Promotors durch Chlorotetracyclin zeigten, dass nur in den Nodien der Keimlinge sowie in der Wurzelspitze eine Färbung detektierbar war. Es konnte jedoch keine Korrelation mit der induzierten Invertaseinhibitoraktivität und der damit erwarteten verringerten Invertaseaktivität in induzierten im Vergleich zu nicht induzierten Keimlingen hergestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Da die Ergebnisse aus den Versuchen mit den transgenen Tabaklinien die Hypothese bestätigen, dass ein normales Wachstum und eine normale pflanzliche Entwicklung ohne die Aktivität von Invertasen nicht möglich sind, wurde untersucht, ob sich die Notwendigkeit der Invertaseaktivität während der Keimlingsentwicklung in der Expression spezifischer Invertaseisoenzyme widerspiegelt.

In silico Genexpressionsanalysen (Zimmermann *et al.*, 2004) zeigten, dass die extrazelluläre Invertase *cwINV1* und die beiden vakuolären Invertasen *βfruct3* und *βfruct4* spezifisch während der Keimlingsentwicklung induziert sind (Abb. 25A, C, E), wohingegen die anderen extrazellulären Invertasen bzw. die beiden Fructanexohydrolasen in diesem Entwicklungsstadium nur auf einem geringen Niveau oder gar nicht exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Überprüfung der *in silico* gewonnenen Daten mittels Northern Blot Analysen konnte die Expression dieser drei Invertaseisoenzyme während der frühen Keimlingsentwicklung bestätigen (Abb. 25B, D, F). Eine Expression der beiden vakuolären Invertasen wurde früher und auf einem höheren Niveau detektiert als die Expression der extrazellulären Isoform. Die höchsten mRNA-Spiegel konnten im 4- bis 6-Blattstadium detektiert werden. Die spezifischen Expressionsmuster dieser drei Invertaseisoenzyme unterstützen die Hypothese, dass Invertasen eine bedeutende Rolle während der Keimlingsentwicklung besitzen.

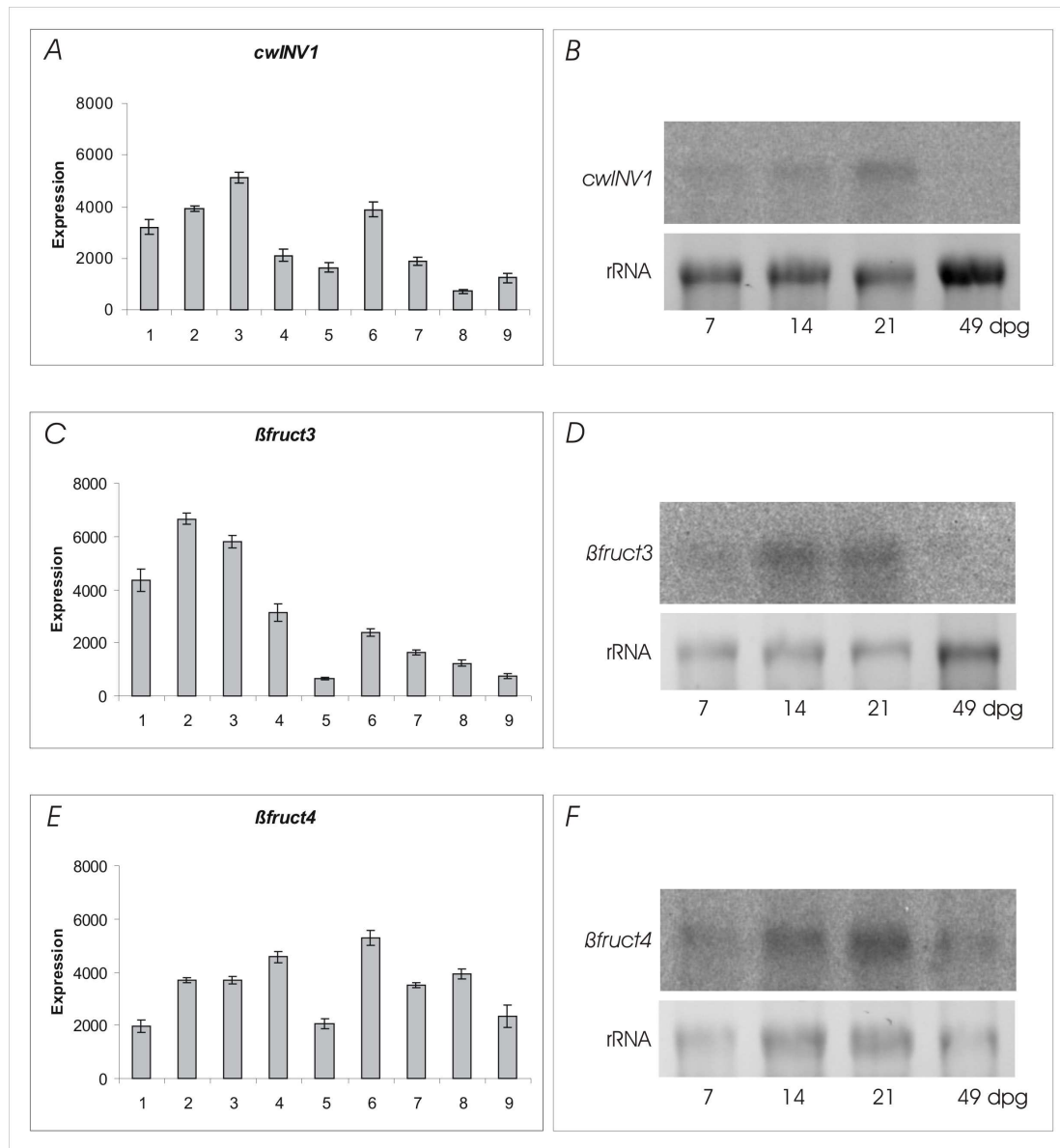


Abb. 25: Entwicklungsspezifische Expression extrazellulärer (*cwINV1*) und vakuolärer Invertasen (*βfruct3* und *βfruct4*) in *A. thaliana*. (A, C, E) *In silico* Genexpressionsanalysen der Invertasen während der Entwicklung. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SD von Affymetrix Genexpressionsanalysen. Die Entwicklungsstadien wurden in Boyes *et al.* (2001) definiert: (1): 1.0 – 5.9 dpg (Keimblätter), (2): 6.0 – 13.9 dpg (Keimlinge), (3): 14.0 – 17.9 dpg (Blätter junger Pflanzen), (4): 18.0 – 20.9 dpg (Rosettenblätter), (5): 21.0 – 24.9 dpg (Rosettenblätter), (6) 25.0 – 28.9 dpg. (Samenkapseln), (7): 29.0 – 35.9 dpg (Blüten), (8): 36.0 – 44.9 dpg (Blüten und junge Schoten), (9): 45.0 – 50.0 dpg (Schoten). (B, D, F) Genexpression der extrazellulären Invertase *cwINV1* und der vakuolären Invertasen *βfruct3* und *βfruct4* in verschiedenen Entwicklungsstadien. RNA wurde aus Keimlingen 7 dpg (Keimblätter), 14 dpg (4-Blatt-Stadium), 21 dpg (6-Blatt-Stadium) und aus Rosettenblättern 49 dpg isoliert. Ein repräsentativer Northern Blot ist gezeigt. 10 μ g RNA wurden pro Spur auf das Gel geladen und die Beladung durch Hybridisierung mit einer rRNA-Sonde kontrolliert (verändert nach Bonfig *et al.*, 2007).

4.4 Generierung verschiedener „Werkzeuge“ zur weiteren Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen

4.4.1 Erstellung eines Macroarrays zur Untersuchung der Beteiligung verschiedener Stoffwechselwege an einer Pathogeninfektion

Um ein noch genaueres Bild über die Beteiligung verschiedener Gene bzw. Genfamilien unterschiedlicher Stoffwechselwege an Pflanze-Pathogen-Interaktionen zu erhalten, wurden insgesamt 50 Gensonden für die Erstellung eines Macroarrays kloniert. Die ausgewählten Gene sind insbesondere beteiligt an der Photosynthese, der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus und der pflanzlichen Abwehr. Daneben wurden weitere Gene ausgewählt, die für sogenannte Haushaltsgene kodieren und konstitutiv in Pflanzen exprimiert sind.

Die Klonierungen erfolgten, indem zunächst an isolierter genomischer DNA oder cDNA Genfragmente mit Hilfe spezifischer Primer (siehe Kapitel 6.2.3.1) amplifiziert wurden. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte über Agarosegele mit Hilfe des Kits NcleoSpin® Extract wurden die Genfragmente in die Klonierungsvektoren pGEM-Teasy (Plasmid 1, Abb. 32 Anhang) oder pST-Blue1 (Plasmid 2, Abb. 33 Anhang) ligiert. Mit dem Ligationsansatz wurden kompetente *E. coli* transformiert und anschließend auf geeignete Selektionsplatten ausplattiert. 24 h nach der Transformation wurden mehrere Bakterienkolonien von den Selektionsplatten gepickt und in Flüssigmedium kultiviert. Nach Isolation der Plasmid-DNA aus diesen Kolonien wurde der Einbau des Genfragments durch einen Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen überprüft. Kolonien, die in einem Agarosegel zur Auftrennung der DNA-Fragmente nach dem Verdau neben der Bande für pGEM-Teasy bei 3015 bp bzw. 3851 bp für pST-Blue1 auch die gewünschte Bande des klonierten Genfragments in der entsprechenden Größe aufwiesen, waren erfolgreich transformiert. Jeweils eine ausgewählte Kolonie wurde erneut in Flüssigkultur angezogen und die Transformation mit Hilfe einer Sequenzierung bestätigt (ausgewählte Sequenziererergebnisse (Kennnummern mit * markiert) für Genfragmente jeder Klasse siehe Anhang, Abb. 34 bis 44). Als Sequenzierprimer konnten die in beiden Vektoren vorhandenen Promotoren T7 bzw. SP6 verwendet werden.

Übersichten über die klonierten Genfragmente einschließlich der Funktionen der Gene, der Kennnummern der Datenbank für *A. thaliana*, des verwendeten Klonierungsvektors, der verwendeten Art der DNA-Matrize, des entsprechenden Primer-Paares sowie der Größe des klonierten Fragmentes sind in den Tabellen 1, 2, 4, 6 und 8 aufgelistet:

Tab. 1: Klonierte Genfragmente konstitutiv exprimierter Gene für den Macroarray

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
Sam1	S-Adenosylmethionin-transferase	At1g02500	pGEM-T easy	genomische DNA	SAM1-for SAM1-rev	593
Hmg1/2	Transkriptionsfaktor	At1g04880 *	pGEM-T easy	cDNA	HMG1/2-for HMG1/2-rev	598
H4	Histon, Organisation der DNA in Nukleosomen	At1g07660	pGEM-T easy	genomische DNA	H4-for H4-rev	523
Ef1a	Translationelongationsfaktor	At1g07940	pGEM-T easy	genomische DNA	Ef1a-for Ef1a-rev	566
Gapdh	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Enzym der Glykolyse	At1g12900	pGEM-T easy	genomische DNA	GAPDH-for GAPDH-rev	500
Clh1	Chlorophyllase	At1g19670	pGEM-T easy	genomische DNA	CLH1-for CLH1-rev	594
Actin 2/8	strukturelle Komponente des Zytoskeletts	At3g18780/ At1g49240	pGEM-T easy	cDNA	AtACT 2/8 - F AtACT 2/8 - R	~ 500
Tufa	Translationelongationsfaktor	At4g20360 *	pGEM-T easy	genomische DNA	TUFA-for TUFA-rev	546
Ubq4	Proteolyse, Signalmolekül	At5g20620	pGEM-T easy	cDNA	UBQ4-for UBQ4-rev	582
Cbp20	Kappen-bindendes Protein der mRNA-Kappe	At5g44200	pGEM-T easy	cDNA	CBP20-for CBP20-rev	385

Für eine statistische Auswertung eines Macroarrays ist es notwendig, dass Daten aus verschiedenen Versuchen normalisiert bzw. dass Signalunterschiede ausgeschlossen werden können, die aufgrund unterschiedlicher mRNA-Konzentrationen auftreten. Hierzu benötigt man als Referenzen konstitutiv in einer Pflanze exprimierte Gene.

Da jedoch bekannt ist, dass auch Haushaltsgene natürlichen und insbesondere durch Stress induzierten Schwankungen unterliegen, wurden insgesamt zehn konstitutiv exprimierte Gene in den Macroarray aufgenommen. Diejenigen der ausgewählten und klonierten Gene, die keine Schwankungen in den Signalstärken aufweisen, können für eine spätere Normalisierung der Daten herangezogen werden.

Tab. 2: Klonierte Genfragmente photoynthetischer Gene für den Macroarray

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
psbP	Protein des PSII, Regulation des Sauerstoff bildenden Komplexes	At1g06680	pGEM-T easy	cDNA	psbP-for psbP-rev	670

Cab2	Chlorophyll A/B bindendes Protein des Lichtsammelkomplexes	At1g29920	pGEM-T easy	cDNA	Cab2-for Cab2-rev	571
Npq4	Pigment bindendes Protein assoziiert mit PSII, nichtphotochemisches Quenching	At1g44575	pGEM-T easy	cDNA	NPQ4-for NPQ4-rev	542
Lhb1b2	Chlorophyll A/B bindendes Protein des Lichtsammelkomplexes	At2g34420	pGEM-T easy	genomische DNA	LHB1B2-for LHB1B2-rev	618
petC	Rieske FeS-Zentrum des Cytochrom b6f Komplexes, photosynthetischer Elektronentransport	At4g03280	pGEM-T easy	cDNA	petC-for petC-rev	559
D1 (Psab)	Untereinheit der PSI bzw. PSII Reaktionszentren	AtCg00340	pGEM-T easy	genomische DNA	D1-for D1-rev	683
RbcL	Große Untereinheit der RuBisCo, CO ₂ -Fixierung	AtCg00490 *	pGEM-T easy	cDNA	RBCL-for RBCL-rev	576
petB	Untereinheit des Cytochrom b6f Komplexes, photosynthetischer Elektronentransport	AtCg00720 *	pGEM-T easy	genomische DNA	petB-for petB-rev	606

Neben den Genfragmenten von Genen der Photosynthese (Tab. 2) steht ein Genfragment der *RbcS* zur Verfügung (S. Berger, Tab. 3). Eine Regulation der *RbcS* nach einer Pathogeninfektion konnte bereits in verschiedenen Northern Blot Analysen gezeigt werden (siehe Kapitel 4.1.3, Abb. 8 bzw. 4.3.1.3, Abb. 14).

Tab. 3: Weitere Genfragmente photoynthetischer Gene

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
RbcS	Kleine Untereinheit der RuBisCo, CO ₂ -Fixierung	At1g67090	pBSC			~ 1800

Tab. 4: Klonierte Genfragmente von Genen des Kohlenhydratmetabolismus für den Macroarray

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
βfruct4	vakuoläre Invertase	At1g12240 *	pST-Blue1	genomische DNA	At1g12240-for At1g12240-rev	579
Gss	Stärkesynthese	At1g32900	pGEM-Teasy	genomische DNA	GSSII-for GSSII-rev	410
nINV2	cytosolische / neutrale Invertase	At1g35580	pGEM-Teasy	cDNA	nInv2-for nInv2-rev	576
cwINV3	6-Fructanexohydrolase	At1g55120 *	pST-Blue1	genomische DNA	At1g55120-for At1g55120-rev	723
βfruct3	vakuoläre Invertase	At1g62660	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g62660-for At1g62660-rev	569

Sus6	Saccharosesynthase / UDP-Glycosyltransferase	At1g73370	pGEM-Teasy	genomische DNA	SUS-1g73370-for SUS-1g73370-rev	551
Gpp	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase, Stärkesynthese	At2g21590	pGEM-Teasy	cDNA	GPP-for GPP-rev	637
cwINV4	Zellwand gebundene Invertase	At2g36190	pST-Blue1	genomische DNA	At2g36190-for At2g36190-rev	708
nINV6	cytosolische / neutrale Invertase	At3g06500	pGEM-Teasy	cDNA	nInv6-for nInv6-rev	576
cwINV5	Zellwand gebundene Invertase	At3g13784	pGEM-Teasy	genomische DNA	At3g13784-for At3g13784-rev	668
C/VIF3	Invertaseinhibitor	At3g17130	pGEM-Teasy	genomische DNA	At3g17130-for At3g17130-rev	514
Stp4	Saccharosetransporter	At3g19930	pGEM-Teasy	cDNA	STP4-for STP4-rev	591
Sus3	Saccharosesynthase / UDP-Glycosyltransferase	At4g02280 *	pGEM-Teasy	cDNA	SUS-4g02280-for SUS-4g02280-rev	479
Sps2	Saccharosephosphat-synthase	At5g11110	pGEM-Teasy	cDNA	SPS FOR 2 SPS REV 2	518
cwINV6	6- und 1-Fruktanexohydrolase	At5g11920	pGEM-Teasy	genomische DNA	cwINV6-for cwINV6-rev	599
Sps1	Saccharosephosphat-synthase	At5g20280	pGEM-Teasy	cDNA	SPS FOR 1 SPS REV 1	505
Sus1	Saccharosesynthase / UDP-Glycosyltransferase	At5g20830	pGEM-Teasy	genomische DNA	SUS-5g20830-for SUS-5g20830-rev	565
Sus5	Saccharosesynthase / UDP-Glycosyltransferase	At5g37180	pGEM-Teasy	genomische DNA	SUS-5g37180-for SUS-5g37180-rev	566
Stp3	Hexosetransporter	At5g61520	pGEM-Teasy	genomische DNA	STP3-for STP3-rev	617

Neben den Genfragmenten von Genen des Kohlenhydratmetabolismus (Tab. 4) wurden von MC Gonzalez (*C/VIF1* und *C/VIF2*) und J. Hirsche (alle weiteren Genfragmente der Tab. 5) kloniert. Eine Regulation des Invertaseinhibitors *C/VIF2* nach der Applikation verschiedener Stressfaktoren konnte in Northern Blot Analysen gezeigt werden (siehe Kapitel 4.2, Abb. 11).

Tab. 5: Weitere Genfragmente von Genen des Kohlenhydratmetabolismus

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
Stp2	Zuckertransporter	At1g07340	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g07340-for At1g07340-rev	626

C/VIF1	Invertaseinhibitor	At1g47960	pmcg2-4, pB-Ks(+)	genomische DNA	Atcwinh-1 Atcwinh-2	543
Suc1	Saccharosesymporter	At1g71880	pGEM- Teasy	genomische DNA	At1g71880-for At1g71880-rev	605
Stp10	Zuckertransporter	At3g19940	pGEM- Teasy	genomische DNA	At3g19940-for At3g19940-rev	746
cwINV2	Zellwand gebundene Invertase	At3g52600	pGEM- Teasy	genomische DNA	Ath2CW-EX3-F Ath2CW-EX3-R	1270
Tmt2	Tonoplasten- Monosaccharidtransporter	At4g35300	pGEM- Teasy	genomische DNA	At4g35300-for At4g35300-rev	647
Suc7	Saccharose-Protonen-Symporter	At5g06170	pGEM- Teasy	genomische DNA	At5g06170-for At5g06170-rev	648
Stp13	Zuckertransporter	At5g26340	pGEM- Teasy	genomische DNA	At5g26340-for At5g26340-rev	560
C/VIF2	Invertaseinhibitor 2	At5g64620	pmcg3-11, pB-Ks(+)	genomische DNA	Atvinh-1 Atvinh-2	503

Tab. 6: Klonierte Genfragmente pflanzlicher Abwehrgene für den Macroarray

Gen	Funktion	Kenn-nummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
Erf14	Transkriptionsfaktor, Ethylen abhängiger Signalweg	At1g04370	pGEM- Teasy	genomische DNA	ERF14-for ERF14-rev	398
Cad1	Oxidoreductase, Regulator des programmierten Zelltods	At1g29690	pGEM- Teasy	genomische DNA	CAD1-for CAD1-rev	613
4Cl1	4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1, Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels	At1g51680	pGEM- Teasy	genomische DNA	4CL1-for 4CL-rev	555
4Cl3	4-Cumarat:Coenzym A Ligase 1, Enzym des Phenylpropanoidstoffwechsels	At1g65060 *	pGEM- Teasy	genomische DNA	4CL3-for 4CL3-rev	598
Yls9	Regulator der Blattseneszenz und der Virusabwehr	At2g35980 *	pGEM- Teasy	genomische DNA	YLS9-for YLS9-rev	648
Bag6	Regulator der Apoptose	At2g46240	pGEM- Teasy	genomische DNA	BAG6-for BAG6-rev	616
Hel (=Pr4)	Hevein-ähnliches Protein, Induktion im Ethylen abhängigen Signalweg	At3g04720	pGEM- Teasy	cDNA	HEL-for HEL-rev	496
Bi-1	Baxinhibitor 1, Regulator der Apoptose	At5g47120	pGEM- Teasy	cDNA	ATBI-1-for ATBI-1-rev	968

Außer den in der Tabelle aufgeführten Genen (Tab. 6) stehen für die Erstellung des Macroarrays Genfragmente von 10 Thaumatin-Genen (alle W. Ali) sowie weiteren

Abwehrgenen (alle S. Berger) zur Verfügung (Tab. 7). Eine Regulation von *Pr1*, *Pr2* und *Pal1* nach einer Pathogeninfektion konnte in Northern Blot Analysen der bereits gezeigt werden (siehe Kapitel 4.1.3, Abb. 8 bzw. 4.3.1.4, Abb. 15).

Tab. 7: Weitere Genfragmente pflanzlicher Abwehrgene

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
Gst1	Glutathion-S-Transferase	At1g02930	pZIP-Lox1			540
	Thaumatococcoside	At1g19320	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g19320-F At1g19320-R	568
	Thaumatococcoside	At1g20030	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g20030-F At1g20030-R	322
	Thaumatococcoside	At1g70250	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g70250-F At1g70250-R	451
	Thaumatococcoside	At1g75030	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g75030-F At1g75030-R	448
	Thaumatococcoside	At1g75050	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g75050-F At1g75050-R	507
	Thaumatococcoside	At1g75800	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g75800-F At1g75800-R	425
Opr1	12-Oxophytodienoat-Reductase	At1g76680	pGEM-Teasy	genomische DNA	At1g76680-F At1g76680-R	549
Pr1	Abwehrgen "Pathogenesis-related"	At2g14610	pCR2.1			500
	Thaumatococcoside	At2g17860	pGEM-Teasy	genomische DNA	At2g17860-F At2g17860-R	403
Pal1	Phenylalaninammoniumlyase	At2g37040	-	genomische DNA		4000
Pad3	Cytochrom P450	At3g26830	pGEM-Teasy	genomische DNA	(Pad3-for/rev)	500
Lox2	Lipoxygenase	At3g45140	Zap			2200
Jrg21	Leucoanthocyanidin-dioxygenase	At3g55970		genomische DNA		1300
Pr2	Abwehrgen "Pathogenesis-related"	At3g57260	pCR2.1			500
Gst2	Glutathion-S-Transferase	At4g02520	pZIP-Lox1			345

Hpl1	Hydroperoxidlyase	At4g15440	pGEM-Teasy	genomische DNA	(Hpl-for/rev)	684
	Thaumatococcus	At4g24180	pGEM-Teasy	genomische DNA	At4g24180-F At4g24180-R	503
	Thaumatococcus	At4g36010	pGEM-Teasy	genomische DNA	At4g36010-F At4g36010-R	430
Eli3	NADP ⁺ -Oxidoreductase	At4g37990				3800
	Thaumatococcus	At4g38660	pGEM-Teasy	genomische DNA	At4g38660-F At4g38660-R	468
	Thaumatococcus	At4g38670	pGEM-Teasy	genomische DNA	At4g38670-F At4g38670-R	522
	Thaumatococcus	At5g02140	pGEM-Teasy	genomische DNA	At5g02140-F At5g02140-R	470
	Thaumatococcus	At5g24620	pGEM-Teasy	genomische DNA	At5g24620-F At5g24620-R	504
Aos	Allenoxidsynthase	At5g42650	pSpot			

Tab. 8: Klonierte Genfragmente von Genen anderer Stoffwechselwege für den Macroarray

Gen	Funktion	Kennnummer	Vektor	Matrize	Primer	PCR-Produkt (bp)
Pmei	Pektinmethylesteraseinhibitor	At1g62770 *	pGEM-Teasy	cDNA	At1g62770-for At1g62770-rev	490
CesA10	Cellulosesynthase	At2g25540	pGEM-Teasy	genomische DNA	CesA10-for CesA10-rev	531
CesA1	Cellulosesynthase	At4g32410 *	pGEM-Teasy	genomische DNA	CesA1-for CesA1-rev	559
CesA3	Cellulosesynthase	At5g05170	pGEM-Teasy	genomische DNA	CesA3-for CesA3-rev	559
CesA5	Cellulosesynthase	At5g09870	pGEM-Teasy	genomische DNA	CesA5-for CesA5-rev	612

Eine Anwendung des Macroarrays könnte für die Pflanzenlinien erfolgen, die den Invertaseinhibitor *NtCIF* unter Kontrolle des Dexamethason-induzierbaren Promotorsystems exprimieren. Da für die Pflanzen keine phänotypischen Unterschiede in der Sensitivität gegenüber Pathogeninfektionen gefunden werden konnten, stellt sich die Frage, welche Stoffwechselwege bzw. Gene innerhalb einer Pflanze bei gleichzeitiger Hemmung der Invertase und erfolgreicher Pathogeninfektion reguliert sind. Da für die Pflanzenlinien

DEX::NtCIF TII-7 und TII-11 die Induzierbarkeit des Promotorsystems bereits gezeigt werden konnte, kann die Anwendung des Macroarrays für diese Linien erfolgen.

4.4.2 Generierung fluoreszierender Bakterien der Art *Pseudomonas syringae*

Um eine Aussage über die Vermehrung von Bakterien in pflanzlichen Geweben nach einer Infektion treffen zu können, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine häufig verwendete, vielfach in der Literatur beschriebene und auch in dieser Arbeit angewandte Methode ist die Reisolierung der Bakterien aus dem infizierten Gewebe (Whalen *et al.*, 1991; Raacke *et al.*, 2006; Zheng *et al.*, 2007; Kapitel 4.2.1.2, Abb. 13 bzw. 4.2.1.4, Abb. 16). Eine weitere Möglichkeit, Informationen über die Ausbreitung von Bakterien in Pflanzen zu gewinnen, ist die Messung der Chlorophyllfluoreszenz. Über das Absinken der Photosynthese (Y(II) oder ETR) nach einer Pathogeninfektion können indirekt Rückschlüsse auf die Ausbreitung der Bakterien gezogen werden (siehe Kapitel 4.1.2, Abb. 3 und 4). Da die zuerst genannte Methode eine invasive und die zweitgenannte eine indirekte Nachweismöglichkeit darstellt, sollten in einem neuartigen Ansatz Bakterien mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) transformiert werden. Ein nicht invasiver und direkter Nachweis der Bakterien in pflanzlichem Gewebe durch Aufnahme der Fluoreszenz wäre dadurch möglich.

Um die Pflanze-Pathogen-Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* pv. *tomato* weiter zu charakterisieren, wurden die Bakterienstämme DC3000 und avrRPM1 transformiert.

4.4.2.1 Transformation von *P. syringae* mit dem Plasmid pUTgfp

Nach der Herstellung kompetenter Zellen der Bakterienstämme DC3000 und avrRPM1 wurden diese durch Elektroporation mit dem Plasmid pUTgfp (zur Verfügung gestellt von J. Jansson, Plasmid siehe Anhang, Abb. 45) transformiert. Transformierte Bakterienkolonien sollten für beide Stämme sowohl über eine positive Kanamycin-Resistenz auf Agarplatten als auch über die GFP-Fluoreszenz selektioniert werden.

Drei Tage nach der Elektroporation konnte auf den Selektionsplatten das Wachstum jeweils mehrerer Bakterienkolonien festgestellt werden. Es konnte jedoch auch nach mehrtägiger Aufbewahrung bei 4°C zur Erhöhung des Fluoreszenzsignals keinerlei GFP-Signal unter UV-Licht detektiert werden.

Ein zweiter Transformationsansatz mit einem anderen GFP-Plasmid wurde daher verfolgt.

4.4.2.2 Transformation von *P. syringae* mit dem Plasmid pPNptGreen

Die kompetenten Bakterienzellen des Stammes DC3000 sowie des Stammes avrRPM1 wurden in dem zweiten Ansatz mit dem Plasmid pPNptGreen (zur Verfügung gestellt von G. Beattie, Plasmid siehe Anhang, Abb. 46) elektroporiert und wiederum über eine

Kanamycinresistenz selektioniert. Auch hier konnten für beide transformierten Bakterienstämme jeweils mehrere Bakterienkolonien auf den Selektionsplatten detektiert werden. Im Gegensatz zum ersten Transformationsansatz konnte jedoch nach dieser Elektroporation eine grüne Fluoreszenz unter UV-Licht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die erfolgreich transformierten Bakterien wurden als DC3000gfp und avrRPM1gfp bezeichnet.

4.4.2.3 Vergleichende Infektion von *A. thaliana* mit fluoreszierenden und Wildtyp-Bakterien

Durch parallel erfolgende Infektionen von *A. thaliana* mit DC3000 und DC3000gfp bzw. avrRPM1 und avrRPM1gfp und anschließender Betrachtung unter UV-Licht konnte gezeigt werden, dass die Fluoreszenz von den Bakterien selbst stammt, da diese nur in Blättern nachweisbar war, die mit den transformierten Bakterien infiziert wurden. Die phänotypisch sichtbaren Krankheitssymptome unterschieden sich hingegen nach Infektion mit fluoreszierenden bzw. Wildtyp-Bakterien nicht (Daten nicht gezeigt). Um die Proliferation der Bakterien *in planta* nach einer Infektion verfolgen zu können, wurden Blätter von *A. thaliana* mit einer Bakteriendichte von 10^7 cfu/ml infiltriert und über vier Tage am Fluoreszenz-Binokular unter UV-Licht ausgewertet (alle Versuche durchgeführt von S. Hupp).

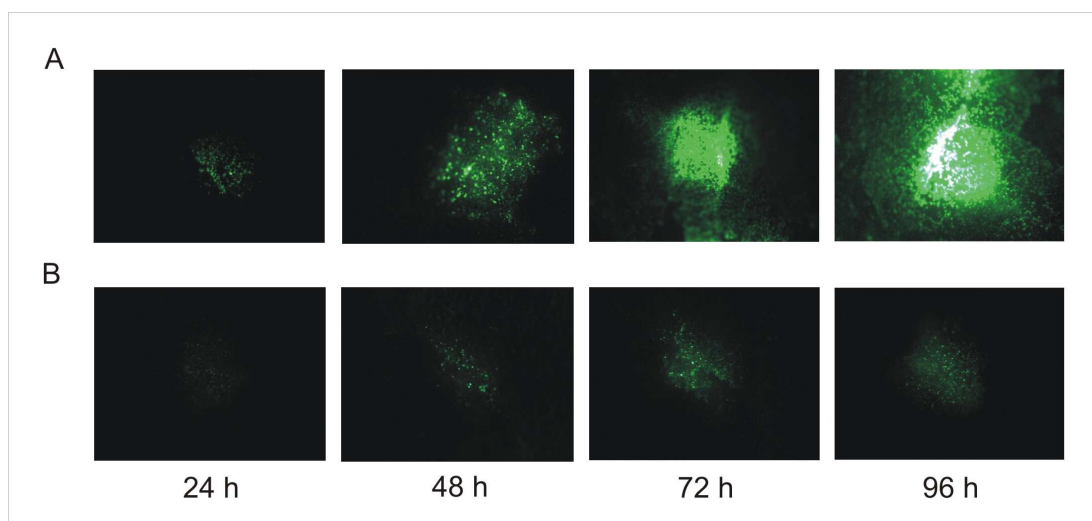


Abb. 26: Proliferation von DC3000gfp (A) und avrRPM1gfp (B) in *A. thaliana*. Blätter von *A. thaliana* wurden jeweils mit den fluoreszierenden Bakterien infiziert und die Vermehrung innerhalb des Blattgewebes über einen Zeitraum von 96 h am Fluoreszenz-Binokular beobachtet. Gezeigt sind die Aufnahmen eines repräsentativen Versuchs aus sechs durchgeführten Versuchen (verändert nach Hupp, 2006).

Wie erwartet, konnte nach Infiltration von DC3000gfp eine Vermehrung der Bakterien im Blattgewebe in Form einer Zunahme des Fluoreszenzsignals aufgezeichnet werden (Abb.

26A), in der inkompatiblen Interaktion nach Infiltration von *avrRPM1gfp* konnte hingegen über den gesamten Zeitverlauf nur ein sehr schwaches Fluoreszenzsignal detektiert werden (Abb. 26B, Versuche durchgeführt von S. Hupp). Wurden Bakteriensuspensionen einer geringeren Dichte (10^5 bzw. 10^6 cfu/ml) für eine Infektion verwendet, konnte insbesondere in der inkompatiblen Interaktion keinerlei Fluoreszenzsignal detektiert werden, da dieses aufgrund der niedrigen Bakterienkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag (Daten nicht gezeigt).

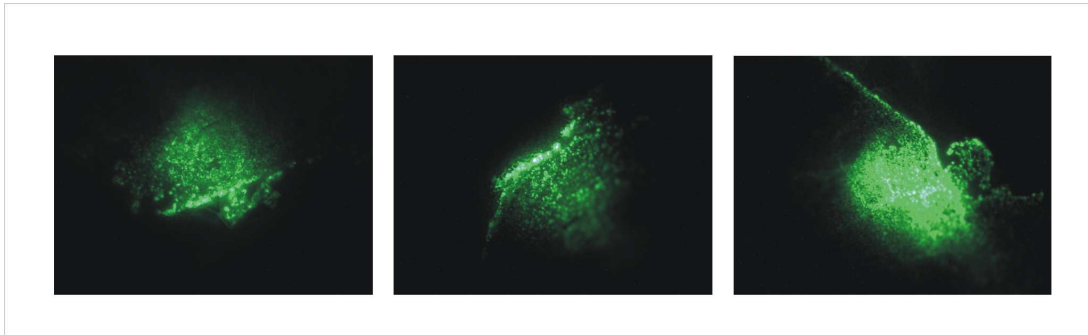


Abb. 27: Akkumulation von DC3000gfp nach einer Infektion von *A. thaliana* im Bereich der Blattadern. Gezeigt sind drei repräsentative Aufnahmen zwischen 72 h und 144 h nach einer Infektion. Die Beobachtung dieser spezifischen Lokalisation konnte jeweils zu verschiedenen Zeitpunkten in sechs unabhängigen Versuchen gemacht werden (verändert nach Hupp, 2006).

Bei der Verfolgung der kompatiblen Interaktion im Zeitverlauf konnte zu verschiedenen Zeitpunkten mehrfach beobachtet werden, dass eine Akkumulation der Bakterien insbesondere im Bereich der Blattadern erfolgt (Abb. 27).

4.4.2.4 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums

Zur Überprüfung der Annahme, dass die Zunahme der Fluoreszenz direkt mit der Vermehrung der Bakterien im Blattgewebe korreliert, wurden Blätter von *A. thaliana* mit 10^5 cfu/ml DC3000 bzw. DC3000gfp infiziert und unmittelbar nach erfolgter Infektion und 24 h, 48 h und 72 h p. i. reisoliert. Nach Inkubation auf geeigneten Selektionsplatten wurden die gewachsenen Bakterienkolonien ausgezählt. In Abb. 28A ist das Wachstum der Bakterien im Zeitverlauf (Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen) dokumentiert.

Eine schnelle und einfache Art der Quantifizierung des Wachstums der transformierten Bakterien wurde durch Messung der Fluoreszenz am Fluorometer ermöglicht (Abb. 28B). Die Messung der Fluoreszenz verschiedener Bakteriendichten zeigte über einen weiten Bereich einen linearen Anstieg (Versuche durchgeführt von S. Hupp)..

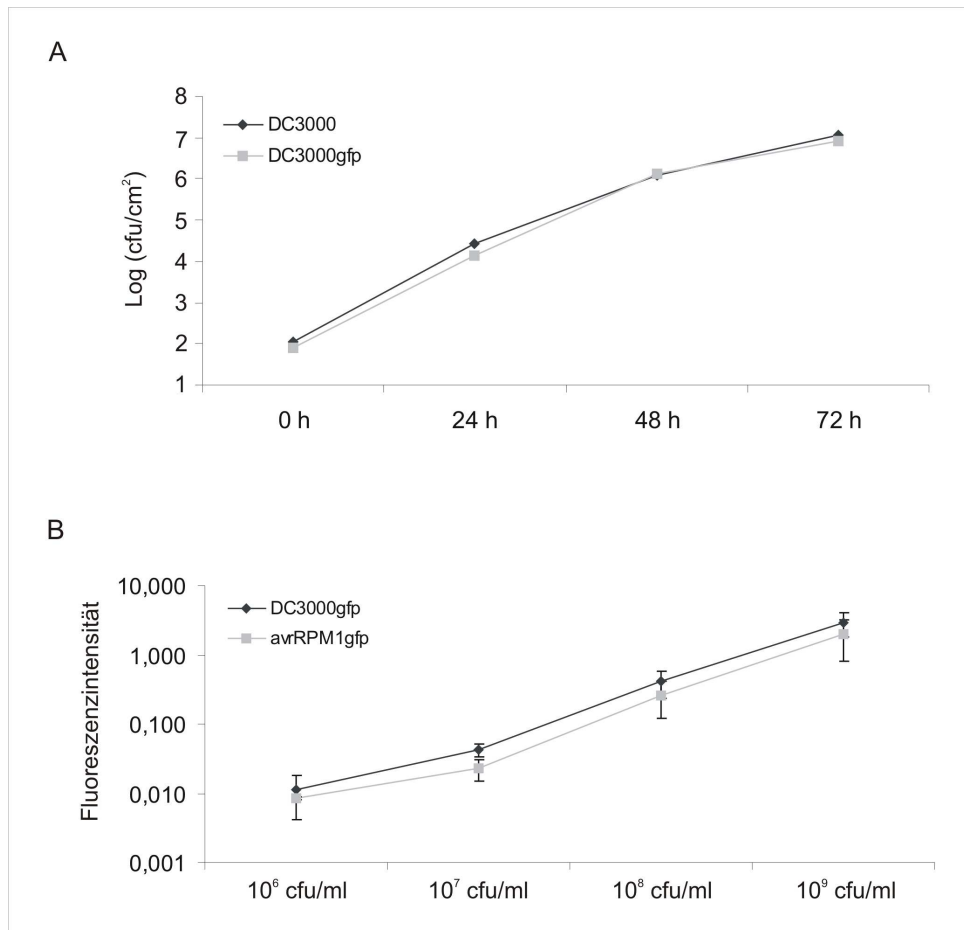


Abb. 28: Quantifizierung von *P. syringae*. (A) Die Quantifizierung des Bakterienwachstums von DC3000 bzw. DC3000gfp erfolgte durch Reisolierung aus infizierten Blättern von *A. thaliana*. Gezeigt ist die Anzahl der gewachsenen Bakterienkolonien eines repräsentativen Versuchs in Dreifachbestimmung (Bakteriendichte 10⁵ cfu/ml). Der Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. (B) Fluoreszenz der Suspensionen von DC3000gfp und avrRPM1gfp mit verschiedenen Bakteriendichten (10⁶ bis 10⁹ cfu/ml). Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen ± SD (verändert nach Hupp, 2006).

5 Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten belegen, dass eine durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren erfolgende, natürliche Regulation von Invertasen während des Wachstums und der Entwicklung, ebenso aber auch nach der Exposition gegenüber verschiedenen Stressfaktoren erfolgt. Invertasen nehmen damit, wie von Roitsch *et al.* (2003) beschrieben, eine Schlüsselrolle im pflanzlichen Metabolismus ein. Aufgrund des Einflusses auf die Produktion von Biomasse, Samen und Früchten ist die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus auch von wirtschaftlichem Interesse.

In der vorliegenden Studie wurde insbesondere die Regulation der Invertasen durch endogene, proteinogene Invertaseinhibitoren nach einer Pathogeninfektion untersucht. Dazu wurden zunächst die Pflanze-Pathogen-Interaktionen zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* und zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* charakterisiert.

5.1 Durch Pathogeninfektionen werden in Pflanzen gleichzeitig verschiedene Stoffwechselwege koordiniert reguliert

5.1.1 Pathogeninfektionen verursachen lokal innerhalb der Infektionsstellen einen Abfall photosynthetischer Prozesse.

Da Pflanzen unter natürlichen Bedingungen ständig einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt sind, werden Effekte auf den Kohlenhydratmetabolismus aufgrund von Regulationsprozessen infolge einer Pathogeninfektion und der Manipulation des Wirtsmetabolismus durch das Pathogen erwartet (Roitsch, 2004).

Abwehrreaktionen einer Pflanze auf verschiedene Pathogene unterscheiden sich in ihrer Art und dem zeitlichen Eintreten. Kompatible und inkompatible Interaktionen zwischen einem Pathogen und einer Pflanze unterscheiden sich ebenfalls, jedoch weniger in den Abwehrmechanismen selbst als vielmehr in ihrer zeitlichen Aktivierung nach einer Infektion sowie in der Fähigkeit des Pathogens zur Vermehrung innerhalb einer Pflanze (Staskawicz *et al.*, 1995; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Baker *et al.*, 1997; Penninckx *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Tao *et al.*, 2003). Ein Ziel der durchgeführten Arbeiten war es, die Effekte eines virulenten und eines avirulenten Bakterienstammes von *P. syringae* auf die Photosynthese zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigen, dass Photosynthese ausschließlich lokal in der infizierten Blatthälfte beeinträchtigt wird. Dieser Befund deckt sich weitgehend mit Daten aus der Literatur (Balachandran *et al.*, 1994b; Scholes und Rolfe, 1996; Chou *et al.*, 2000; Warabieda und Borkowska, 2004; Scharte *et al.*, 2005). Während die

photosynthetischen Parameter F_v/F_m und $Y(II)$ gewöhnlich nach einer Pathogeninfektion sinken, kann für das nichtphotochemische Quenching q_N abhängig von der Interaktion ein Anstieg oder ein Absinken beobachtet werden. In der untersuchten Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* wurde im Randbereich von Infektionsstellen ein Absinken beobachtet. Eine vergleichbare Regulation trat auch nach Infektionen mit dem Tabakmosaikvirus (Balachandran *et al.*, 1994a), dem Abutilonmosaikvirus (Lohaus *et al.*, 2000), dem Rübenmosaikvirus (Guo *et al.*, 2005) oder *P. coronata* (Scholes und Rolfe, 1996) auf. Im Gegensatz dazu konnte ein Anstieg von q_N nach einer Infektion mit *A. candida* (Chou *et al.*, 2000) sowie nach einer Infektion mit *B. cinerea* (Berger *et al.*, 2004) gemessen werden. Der Anstieg im Parameter q_N wird verursacht durch einen Sauerstoff-abhängigen Elektronenfluss, wenn die CO_2 -Fixierung des Calvin-Zyklus limitiert oder inhibiert ist (Schreiber, 2004). Das nichtphotochemische Quenching stellt einen Schutzmechanismus vor einem Übermaß an Lichtenergie dar. Ein Absinken von q_N weist oftmals auf eine Inhibition des primären Elektronentransportes hin. Dieser Prozess ist meist irreversibel und tritt in Zusammenhang mit einem Sekundärschaden aufgrund von Photoinhibition infolge von Lichtstress auf. Ein deutlicher Abfall der maximalen PSII-Quantenausbeute F_v/F_m (siehe Kapitel 4.1.2, Abb. 3A und 4) weist auf irreversible Schäden am PSII hin. Da die Versuche nicht unter Lichtstressbedingungen erfolgten, können Limitationen des Elektronentransportes selbst ausgeschlossen werden, vielmehr muss die Repression in F_v/F_m auf eine Inhibition in der Nähe der PSII-Reaktionszentren oder auf einen Sekundärschaden durch Photoinhibition zurückzuführen sein. Da weiterhin das Absinken von F_v/F_m auch nach Inkubation in Dunkelheit beobachtet werden konnte, muss gefolgert werden, dass eine Infektion mit *P. syringae* die PSII-Reaktionszentren direkt beeinträchtigt.

Die durchgeführten statistischen Analysen (siehe Kapitel 4.1.2, Abb. 5) bestätigen grundsätzlich die Ergebnisse der bildmäßigen Auswertung, jedoch bietet die Bildgebung durch ihre räumliche Auflösung im Gegensatz zu der integrierenden Statistik einen höheren Informationsgehalt. So konnten insbesondere die Veränderungen im Parameter q_N in der statistischen Analyse nicht dargestellt werden, da sowohl Bereiche mit erhöhtem als auch Bereiche mit erniedrigtem nichtphotochemischem Quenching innerhalb einer Infektionsstelle auftraten. Die Berechnung von Mittelwerten über die gesamte Infektionsstelle ließ dann keine Regulation erkennen. Dies zeigt klar den Nutzen der räumlichen Auflösung der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung, insbesondere bei der Detektion nur geringer Veränderungen in einer frühen Phase einer Pflanze-Pathogen-Interaktion.

5.1.2 Die Kinetik der Photosyntheseinhibition unterscheidet sich zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion

Eine inkompatible Interaktion ist gekennzeichnet durch eine schnelle Induktion von Abwehrreaktionen und durch eine räumliche Eingrenzung des Pathogens aufgrund der fehlenden Vermehrung in der Pflanze (Dong *et al.*, 1991; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Dangl und Jones, 2001). Zusammen mit der früheren Induktion der Abwehr konnten in der untersuchten inkompatiblen Interaktion auch früher Veränderungen in der Photosynthese gemessen werden (3 h p. i.) als in der kompatiblen Interaktion (24 h p. i.). Dies stimmt mit der früheren Erkennung des avirulenten Stammes durch die Pflanze überein (Whalen *et al.*, 1991). Da eine inkompatible Interaktion mit dem Auftreten einer HR verbunden ist, ist es wahrscheinlich, dass in Bereichen, in denen die Photosynthese bereits absinkt, der programmierte Zelltod initiiert wurde.

Zum Zeitpunkt 48 h nach der Infektion kann eine stärkere Repression von Fv/Fm und Y(II) in infizierten Bereichen der kompatiblen Interaktion gemessen werden. Dieser Befund lässt sich mit dem Wachstum und der fortschreitenden Ausbreitung der virulenten Bakterien innerhalb eines infizierten Blattes erklären.

Für beide Interaktionen konnten Veränderungen in Chlorophyllfluoreszenzparametern vor dem Auftreten phänotypisch sichtbarer Symptome gemessen werden. In der Literatur wird postuliert, dass ein Einsatz der Chlorophyllfluoreszenzmessungen für die Früherkennung von Infektionskrankheiten möglich ist (Balachandran und Osmond, 1994a; Nedbal *et al.*, 2000; Chaerle *et al.*, 2007). Die innerhalb dieser Arbeit gewonnenen Daten scheinen dies prinzipiell zu bestätigen mit der Einschränkung jedoch, dass Unterschiede zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion lediglich im Zeitverlauf, jedoch nicht in der Qualität auftraten, was einen Feldeinsatz der Methode für diese Interaktion erschweren würde, da im Freiland weder der exakte Infektionszeitpunkt noch die Konzentration an Pathogenen bekannt sind. Zur Identifikation spezifischer Signaturen, die eine Unterscheidung von kompatibler und inkompatibler Interaktion bzw. zwischen verschiedenen Pathogenen ermöglichen würden, sind weitere Analysen notwendig. Bereits gezeigt werden konnte, dass durch die Entwicklung neuer Algorithmen auch schwache und frühe Symptome einer Pathogeninfektion detektiert werden können (Berger *et al.*, 2007).

Durch verschiedene Mikroorganismen kann in Pflanzen unterschiedliches Abwehrverhalten ausgelöst werden (Thomma *et al.*, 2001). Die in der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* verwendeten Chlorophyllfluoreszenzparameter Fv/Fm, qN und Y(II) waren geeignet, um die Unterschiede zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion im Zeitverlauf zu zeigen. Die gleichen Parameter waren jedoch weniger gut geeignet für die Untersuchung der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola*, da keine Veränderungen von Parametern vor dem Auftreten phänotypisch sichtbarer Symptome

gemessen werden konnten, die Sensitivität der ausgewählten Parameter für diese Interaktion demnach zu gering war. Der am besten geeignete Chlorophyllfluoreszenzparameter ist demnach immer vom untersuchten System abhängig (Baker, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass durch die Etablierung neuer Chlorophyllfluoreszenzparameter die Sensitivität zur Detektion verschiedener Stressfaktoren erhöht werden kann. So konnten für verschiedene Untersuchungsansätze beispielsweise die Parameter $1-(F_i/F_p)$ (Barbagallo *et al.*, 2003), F_o/F_v (Mallick und Mohn, 2003) oder $AES = \Delta F/F_m' / \phi CO_2$ (Guo *et al.*, 2005) als sensitive Indikatoren etabliert werden. Eine Analyse mit Hilfe neu generierter Parameter könnte auch Aufschlüsse über regulatorische Vorgänge in der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *A. brassicicola* bringen.

5.1.3 Die Regulation der Source-Sink-Übergänge und des Abwehrverhaltens unterscheiden sich zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Chlorophyllfluoreszenzmessungen gab es zwischen kompatibler und inkompatibler Interaktion bei der Regulation der Expression photosynthetischer Gene auch qualitative Unterschiede. Nur nach Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm war die konstitutiv hohe Expression von *RbcS* und *Cab2* reprimiert und gleichzeitig die Expression der vakuolären Invertasen *β fruct3* und *β fruct4* induziert. Die Expression der Abwehrgene *Pal1* und *Pr1* und der Zellwand-gebundenen Invertase *cwINV1* war hingegen in beiden Interaktionen induziert. Es wurde weiterhin festgestellt, dass in der inkompatiblen Interaktion eine frühere und stärkere Expression von Abwehrgenen induziert wird als in der kompatiblen Interaktion. Dieser Unterschied konnte bereits in anderen Studien beschrieben werden (Vöisey und Slusarenko, 1989; Acharya *et al.*, 2007). Die Regulation der Genexpression in der kompatiblen Interaktion ist in Übereinstimmung mit der bekannten Literatur für die Abwehr, die Photosynthese und den Kohlenhydratmetabolismus koordiniert (Jang und Sheen, 1994; Herbers *et al.*, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Berger *et al.*, 2004). Eine Infektion mit *avrRPM1* dagegen führte nicht zu einer erkennbaren Regulation der photosynthetischen Gene. Diese differentielle Regulation spiegelt einen in einer Studie beschriebenen Effekt wider, dass eine Infektion mit dem virulenten Bakterienstamm ebenso wie eine Gabe an metabolisierbaren Zuckern in einer koordinierten Repression der photosynthetischen Gene bzw. Induktion der Abwehrgene resultiert. Eine Infektion mit dem avirulenten Bakterienstamm oder eine Gabe nicht metabolisierbarer Saccharoseisomere resultieren hingegen nicht in einer veränderten photosynthetischen Genexpression (Sinha *et al.*, 2002). Da keine Repression der Photosynthesegene nach einer Infektion mit *avrRPM1* eintritt, kann vermutet werden, dass die Pflanze eine solche Repression vermeidet. Da in einer inkompatiblen Interaktion nicht-

infizierte Gewebe auch später nicht von dem Pathogen befallen werden, besteht demzufolge keine Notwendigkeit zur Repression der Photosynthese. Offenbar werden also sowohl der avirulente Bakterienstamm als auch die Saccharoseisomere von Pflanzen spezifisch erkannt. In diesem Zusammenhang ist eine weitere wichtige Feststellung, dass durch die räumliche Auflösung der Photosynthese in der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung gezeigt werden konnte, dass die Repression der Photosynthese lokal auf die Infektionsstelle begrenzt war. Da zur Analyse der Genexpression jedoch die gesamten infizierten Blätter geerntet wurden, war auch die detektierte Genexpression über das gesamte Blatt integriert. Zur Lösung dieses Problems müsste die Genexpression in räumlicher Auflösung bestimmt werden.

Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen zeigen weiterhin, dass die Expression der Gene *RbcS* und *Cab2*, die in der Literatur als Indikatoren der Photosynthese beschrieben sind (Mouly und Roby, 1988; Berger *et al.*, 2004), nicht mit der tatsächlichen photosynthetischen Aktivität korrelieren müssen, da die Photosynthese in der vorliegenden Studie in beiden Interaktionen, die photosynthetische Genexpression jedoch nur in der kompatiblen Interaktion erniedrigt war.

Eine Diskrepanz konnte auch zwischen der Genexpression für die Zellwand gebundene Invertase *cwINV1* und der Aktivität der extrazellulären Invertasen verzeichnet werden. Eine Erklärung hierfür kann sein, dass die Aktivität eines Invertaseisoenzym ausgeglichen werden kann durch Induktion bzw. Repression der anderen Isoenzyme, die für Zellwandinvertasen kodieren. Für diese Deutung spricht, dass *A. thaliana Knock-out*-Pflanzen für die vier Zellwandinvertasen keinen abnormalen Wachstumsphänotyp aufweisen (Sherson *et al.*, 2003). Eine weitere mögliche Erklärung für die gefundene Diskrepanz ist, dass die Invertaseaktivität posttranslational durch Invertaseinhibitoren reguliert werden kann (Greiner *et al.*, 2000; siehe Kapitel 5.2.2).

Eine Induktion der Expression des Hexosetransporters *Stp4* und eine Induktion der extrazellulären Invertaseaktivität konnten nach Pathogeninfektionen bereits beschrieben werden (Chou *et al.*, 2000; Fotopoulos *et al.*, 2003; Swarbrick *et al.*, 2006), jedoch konnte in der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* keiner der beiden Effekte beobachtet werden. Als mögliche Erklärung kann angeführt werden, dass der Hexosetransport nur dann notwendig wird, wenn Saccharose extrazellulär durch Invertasen gespalten wird (Roitsch und Gonzalez, 2004), was wiederum bedeutet, dass die Induktion der Hexosetransporter keinen allgemeinen Abwehrmechanismus darstellt, jedoch mit einem Anstieg der extrazellulären Invertaseaktivität zusammenhängt.

Es kann somit als Fazit festgehalten werden, dass durch die unterschiedlichen Infektionsstrategien von Pathogenen verschiedene Wirkungen auf den Kohlenhydratmetabolismus, die Photosynthese und das pflanzliche Abwehrverhalten erzielt werden.

5.1.4 Ausblick: Durch den Einsatz verschiedener „Werkzeuge“ können Pflanze-Pathogen-Interaktionen einfacher und schneller untersucht werden

Der Einsatz verschiedener neuartiger bzw. optimierter Methoden kann in Zukunft helfen, während einer Pathogeninfektion ablaufende Regulationsmechanismen innerhalb des Kohlenhydratmetabolismus und der pflanzlichen Abwehr besser zu verstehen.

Das Design und die Anwendung eines Macroarrays kann Aufschluss über die Enzyme bzw. Stoffwechselwege geben, die während einer Pathogeninfektion reguliert sind. Der Vorteil der Methode liegt im Vergleich zu der herkömmlichen Methode der Northern Blot Analyse in der möglichen Betrachtung der Regulation mehrerer Hundert Gene zur gleichen Zeit. Macroarrays wurden bereits in verschiedenen Studien zur Untersuchung des pflanzlichen Metabolismus eingesetzt (Tranbarger *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2006; Agindotan und Perry, 2007; Tamaoki *et al.*, 2008). Ein Einsatz zur weiteren Charakterisierung der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae*, kombiniert mit transgenen Pflanzen mit veränderter Invertaseaktivität, wäre denkbar.

Der Einsatz fluoreszierender Bakterien bei der Untersuchung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen kann helfen, die genauen Ausbreitungswege während einer Infektion nachzuvollziehen. Ein ähnlicher Ansatz wurde auch in der unlängst veröffentlichten Arbeit von Fan *et al.* (2008) verfolgt, die verschiedene biolumineszierende Pathovaren von *P. syringae* herstellten. Sowohl in der Studie von Fan *et al.* (2008) als auch in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein einfacher Bioassay, entweder durch Messung der Biolumineszenz oder durch Messung der Fluoreszenz am Fluorometer (siehe Kapitel 4.4.2.4), die zeit- und kostenintensive Methode der Reisolierung von Bakterien aus infiziertem Blattmaterial ersetzen kann.

Nach Infektion von *A. thaliana* mit DC3000gfp konnte mehrfach eine bevorzugte Ansiedelung der Bakterien im Bereich der Blattadern beobachtet werden. Die Ursache hierfür könnte sein, dass eine bessere und schnellere Versorgung der Bakterien mit Nährstoffen in diesem Bereich möglich ist. Mit dieser Deutung stimmen die Beobachtungen von Leveau und Lindow (2001) überein, die beschrieben, dass ein Wachstum von *E. herbicola* auf Blättern von Bohnenpflanzen von der Verfügbarkeit der Zucker Fructose und Saccharose abhängig war. Die Möglichkeit, das Verfahren der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung auch für die Aufnahme der GFP- oder phenolischen Fluoreszenz zu nutzen, kann zur weiteren Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen beitragen. Eine Akkumulation autofluoreszierender, phenolischer Substanzen in Blättern von *A. thaliana* nach einer Infektion mit *P. syringae* wurde beschrieben (Soylu, 2006). Durch die Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung wird eine einfache, schnelle und nichtinvasive Methode bereitgestellt, die Bildung solcher phenolischen Substanzen zu verfolgen. Auch eine Aufnahme der GFP-Fluoreszenz

ist mit der gleichen Kamera möglich. Erste vergleichende Messungen nach Infektion von *A. thaliana* mit nicht markierten (DC3000) oder fluoreszierenden (DC3000gfp) Bakterien können innerhalb der Bereiche mit erniedrigter Photosynthese eindeutig die Existenz der fluoreszierenden Bakterien zeigen (Abb. 29). Es können damit in Zukunft in räumlicher Auflösung parallel Veränderungen in verschiedenen Chlorophyllfluoreszenzparametern und die Ausbreitung der Bakterien innerhalb einer Infektionsstelle im Zeitverlauf verfolgt werden.

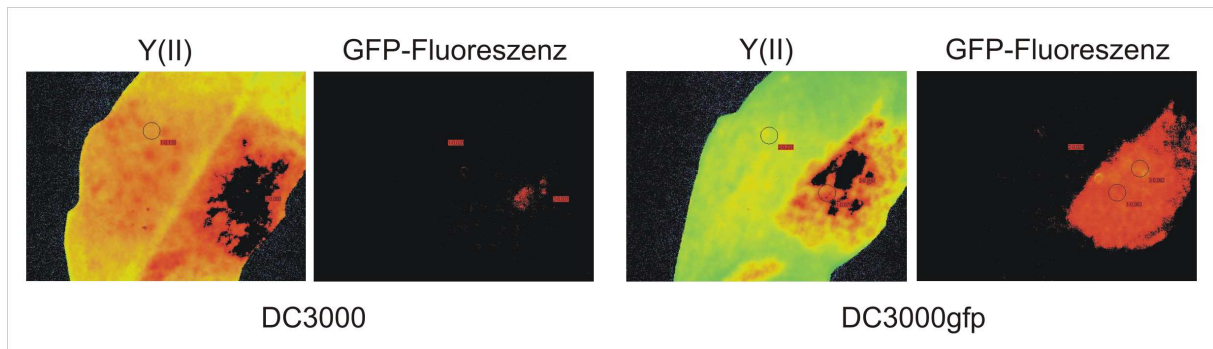


Abb. 29: Vergleich von Chlorophyllfluoreszenz (Darstellung der effizienten Quantenausbeute des PSII, Y(II)) und GFP-Fluoreszenz in Blättern von *A. thaliana* 24 h nach Infektion mit 10^8 cfu/ml DC3000 bzw. DC3000gfp. Die roten Fähnchen zeigen die Mittelwerte aus den ausgewählten Bereichen für die einzelnen Parameter an.

Auch die Weiterentwicklung der Geräte zur Aufnahme von Chlorophyllfluoreszenzparametern kann zur weiteren Charakterisierung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen beitragen. Durch die Entwicklung einer sogenannten Maxi-Version der Imaging-PAM ist es möglich, Photosynthese in Blättern größerer Pflanzen oder in ganzen Pflanzen zu messen. Eine Micro-Version der Imaging-PAM lässt mikroskopische Aufnahmen der Photosynthese auf der zellulären Ebene zu. Für kontinuierliche Aufnahmen von Chlorophyllfluoreszenzparametern unter Freilandbedingungen wurde die robuste und wasserresistente Monitoring-PAM entwickelt. Langzeitaufnahmen von Infektionsverläufen unter natürlichen Umweltbedingungen sind dadurch möglich (siehe www.walz.com).

Eine Kombination der Methode der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung mit Messungen der Blatttemperaturen konnte bereits erfolgreich zur Unterscheidung von verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen eingesetzt werden (Chaerle *et al.*, 2004, West *et al.*, 2005). Auch für die frühzeitige Detektion von Pathogeninfektionen konnten Temperaturmessungen erfolgreich eingesetzt werden (Chaerle *et al.*, 2004; Lindenthal *et al.*, 2005). Ein Einsatz dieser Methode für die in der vorliegenden Studie untersuchten Pflanze-Pathogen-Interaktionen wäre denkbar.

5.2 Die Regulation des Kohlenhydratmetabolismus spielt eine zentrale Rolle in Pflanze-Pathogen-Interaktionen

5.2.1 Die Aktivität von Zellwandinvertasen ist notwendig für die pflanzliche Abwehr

In einem pharmakologischen Ansatz konnte gezeigt werden, dass sich durch Inhibition der Aktivität von Zellwandinvertasen die Sensitivität gegenüber einer Infektion mit *P. syringae* erhöht.

Acarbose ist ein Pseudotetrasaccharid, das aus einer ungesättigten Aminocyclitol-Einheit, einer Desoxyhexose und einer Maltose besteht und die Aktivität von Glucoamylasen, α -Amylasen und anderen α -Glucosid-spezifischen Hydrolasen und Transferasen inhibieren kann (Legler, 1990; Sinnott, 1990; Svensson und Sierks, 1992; Sigurskjold *et al.*, 1994; Frandsen und Svensson 1998). Auch die Aktivität Zellwand gebundener Invertasen aus *A. thaliana* wird durch Acarbose inhibiert. Eine Konzentration von 10 mM Acarbose verursachte *in vitro* eine deutliche Repression der Invertaseaktivität. In dieser Konzentration bewirkte Acarbose keine Veränderungen des Wachstums von *P. syringae* in Flüssigkultur und keine sichtbaren Veränderungen in Blättern von *A. thaliana*.

Wurden Pflanzen jedoch gleichzeitig mit Acarbose und DC3000 behandelt, so konnte eine Sensitivitätserhöhung der Pflanzen gegenüber der Pathogeninfektion beobachtet werden. Phänotypisch waren stärkere Nekrosen erkennbar, was mit einem um etwa Faktor 6 erhöhten Bakterienwachstum in den infizierten und mit Acarbose behandelten Blättern korrelierte (siehe Kapitel 4.2.1.2, Abb. 13). Mit Hilfe der Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung konnte ein verstärktes Absinken der maximalen und der effizienten Quantenausbeute des PSII nach Infektion mit DC3000 und Acarbose im Vergleich zu einer Infektion mit DC3000 allein beobachtet werden (siehe Kapitel 4.2.1.3, Abb. 14). Beide Parameter stellen Indikatoren der photosynthetischen Effizienz dar und sind in Pflanze-Pathogen-Interaktionen häufig reprimiert (Chou *et al.*, 2000; Lohaus *et al.*, 2000; Berger *et al.*, 2004; Swarbrick *et al.*, 2006; siehe Kapitel 4.1.2, Abb. 3 und 4).

Interessanterweise konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der extrahierbaren Aktivität Zellwand gebundener Invertasen zwischen Blättern, die mit DC3000 oder DC3000 und Acarbose infiltriert worden waren, gemessen werden (siehe Kapitel 4.2.1.3, Abb. 14). Dennoch war die Invertaseaktivität in den Proteinextrakten mit Acarbose im Vergleich zu Extrakten ohne Acarbose tendenziell geringer. Eine Ursache für diese Beobachtung könnte darin bestehen, dass die Acarbose bei der Herstellung der Proteinextrakte aus den Blättern zu stark verdünnt wurde, um deutliche Effekte zu erzielen. Ein weiterer Grund könnte in der Kontrolle der Regulation der Aktivität Zellwand gebundener Invertasen durch endogene Invertaseinhibitoren liegen.

5.2.2 Die Repression der Invertaseinhibitor-Expression ist Teil der pflanzlichen Abwehr

Eine Regulation der Expression und/oder Aktivität von Invertasen während Pflanze-Pathogen-Interaktionen konnte in verschiedenen Studien beschrieben werden (Benhamou *et al.*, 1991; Chou *et al.*, 2000; Fotopoulos *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004; Swarbrick *et al.*, 2006; siehe Kapitel 4.1.4, Abb. 9). Der unerwartete Fund einer hohen extrahierbaren Invertaseaktivität auch in *Source*-Blättern, die keinem Stress ausgesetzt waren, wurde schon in der Literatur diskutiert (Kingston-Smith *et al.*, 1999). Da Invertasen charakteristische Enzyme des *Sink*-Metabolismus sind, Blätter jedoch *Source*-Gewebe darstellen, ist eine hohe extrahierbare Invertaseaktivität in Blättern unerwartet. Dazu kommt, dass die extrahierbare Aktivität nicht der tatsächlichen Aktivität *in planta* entsprechen muss, woraus wiederum abgeleitet werden kann, dass endogene Regulationsmechanismen (z. B. proteinogene Invertaseinhibitoren) die Aktivität der extrazellulären Invertasen beeinflussen (Pressey, 1994; Krausgrill *et al.*, 1998; Bate *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007). Bis heute ist die spezifische Funktion der Invertaseinhibitoren jedoch noch nicht vollständig verstanden. In *A. thaliana* sind drei Gene bekannt, die für Invertaseinhibitoren kodieren. Für den Genlokus des Invertaseinhibitors *AtC/VIF2* konnte in Northern Blot Analysen eine Regulation der Expression gezeigt werden: Die konstitutiv hohe Expression in unbehandelten Blättern, die auch in Reporterlinien (*AtC/VIF2::GUS*) beobachtbar war (siehe Kapitel 4.1.5, Abb. 10), wurde durch verschiedene biotische und abiotische Stressfaktoren vollständig inhibiert (siehe Kapitel 4.1.5, Abb. 11). Dieses Ergebnis bestätigte die *in silico* Genexpressionsanalysen (Zimmermann *et al.*, 2004). Wenn die Proteinspiegel der Invertaseinhibitoren nach einer Pathogeninfektion ähnlich wie die Transkriptspiegel erniedrigt werden, könnte eine Freisetzung der Invertase aus dem Invertase-Inhibitor-Komplex für eine verminderte Hemmung und auch den beobachteten vorübergehenden Anstieg der Invertaseaktivität nach einer Pathogeninfektion verantwortlich sein. Zur Überprüfung, ob die Aktivität der Invertaseinhibitoren in einer Pflanze nach einer Pathogeninfektion herabgesetzt war, wurden Invertasen und Invertaseinhibitoren in Proteinextrakten mittels Ultrafiltration nach dem Größenausschlussprinzip getrennt. Die höhermolekulare Fraktion enthielt die Invertasen. Durch Mischen der höhermolekularen Fraktion mit der niedermolekularen Fraktion, die die Invertaseinhibitoren enthielt, konnte ein Hemmeffekt auf die Invertaseaktivität gezeigt werden. In Mischextrakten mit der niedermolekularen Fraktion aus Pathogen-behandelten Proben war die Repression geringer. Diese indirekte Bestimmung der Invertaseinhibitoraktivität zeigte, dass die Aktivität der Inhibitoren ebenso wie ihre Expression nach einer Pathogeninfektion stark reprimiert wurde (siehe Kapitel 4.1.5, Abb. 10). Zunächst scheint die konstitutive Bildung von Invertase- und Invertaseinhibitorproteinen für die Pflanze sehr energieaufwendig zu sein. Jedoch ermöglicht eben diese Strategie einer Pflanze eine

schnelle Regulation auf posttranslationaler Ebene. Die verminderte Invertaseinhibitoraktivität könnte auf eine Degradation der Proteine zurückzuführen sein. Dies würde sich mit Beobachtungen aus der Literatur decken, in der der Ubiquitinierung und Proteindegredation eine kritische Rolle in der pflanzlichen Abwehr zugeordnet wird (Devoto *et al.*, 2003; Libault *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007).

Einfache Aktivitätsbestimmungen von Invertaseinhibitoren sind auch aus der Literatur bekannt. Dabei wurden Proteinrohextrakte erhitzt, um die Invertasen zu zerstören. Die Invertaseinhibitoren blieben aufgrund ihrer Thermostabilität aktiv (Matsushita und Uritani, 1976; Hothorn *et al.*, 2003). Nach Zugabe des hitzebehandelten Extraktes zu einem Invertaseproteinextrakt konnte dann, analog zu den in dieser Studie durchgeführten Messungen, die Stärke der Inhibition bestimmt werden.

Es kann abschließend folgende Hypothese aufgestellt werden: Setzt man voraus, dass durch Invertaseinhibitoren die pflanzliche Invertaseaktivität *in vivo* reprimiert wird und es zu einer Repression bzw. Degradation dieser Proteine infolge einer Stressbehandlung kommt, so führt dies in der Folge zu einem relativen Anstieg der tatsächlichen Invertaseaktivität. Wird dieser relative Anstieg der Invertaseaktivität wiederum in einem pharmakologischen Ansatz mit Hilfe von Acarbose inhibiert, so wird die Sensitivität der Pflanze gegenüber *P. syringae* erhöht.

5.2.3 Die Sensitivität gegenüber einer Pathogeninfektion bei Inhibition der Aktivität von Zellwandinvertasen ist unabhängig vom SA-vermittelten Signalweg pflanzlicher Abwehr

Die Infektion mit Pathogenen führt allgemein zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege pflanzlicher Abwehr, wobei der SA-vermittelte Signalweg den entscheidenden für die Abwehr von *P. syringae* darstellt (Schenk *et al.*, 2000; Thomma *et al.*, 2001; Katagiri *et al.*, 2002, Glazebrook, 2005). Es wäre deshalb möglich, dass die beobachtete Sensitivitätserhöhung gegenüber einer Pathogeninfektion bei gleichzeitiger Hemmung der Invertaseaktivität auf einer negativen Beeinflussung des SA-vermittelten Signalweges der pflanzlichen Abwehr beruht. Um dies zu überprüfen, wurde die Akkumulation von SA nach Infiltration von DC3000 mit und ohne Acarbose gemessen. Acarbose allein induzierte die Akkumulation von SA in Blättern von *A. thaliana* mit der Tendenz zu weiter erhöhten SA-Spiegeln bei zusätzlicher Infektion mit DC3000. Dass eine Infektion mit DC3000 keinen signifikanten Anstieg der SA-Spiegel verursachte, war in Abweichung zur bekannten Literatur (Summermatter *et al.*, 1994; Nawrath und Metraux, 1999). Dieser Befund kann jedoch dadurch erklärt werden, dass in der vorliegenden Arbeit eine sehr geringe Bakterienkonzentration für die Infektion verwendet wurde.

Die Induktion von Markergenen für die SA-vermittelte Abwehr, *Pr1* und *Pr2*, unterschied sich nicht zwischen Proben, die mit DC3000 allein oder mit DC3000 und Acarbose infiziert waren. Es wurde jeweils eine ähnlich starke Induktion nach einer Infektion detektiert. Zusammen mit dem Ergebnis, dass auch die Regulation der Gene *cwINV1* und *RbcS* unabhängig vom Vorhandensein der Acarbose erfolgte, gibt es demnach bisher kein Anzeichen dafür, dass ein Acarbose-Effekt auf transkriptioneller Ebene vorliegt. Zur Bestimmung von Genen oder Genfamilien, die am Acarbose-Effekt beteiligt sind, wäre auch hier der Einsatz des Macroarrays denkbar.

Um eine genauere Vorstellung über die Beteiligung des SA-vermittelten Abwehrweges zu erhalten, wurden zwei Mutanten der SA-vermittelten Abwehr eingesetzt, *sid2* und *cpr6*. Die Mutante *sid2* akkumuliert aufgrund einer Mutation im Gen *Ics1* keine SA, exprimiert keine *Pr*-Gene und bildet keine SAR aus (Nawrath und Metraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2001). Die Mutante *cpr6* zeigt konstitutive *Pr1*-Genexpression und besitzt konstitutiv erhöhte SA-Spiegel (Clarke *et al.*, 1998). In beiden Mutanten war das Bakterienwachstum in Anwesenheit von Acarbose erhöht (siehe Kapitel 4.2.1.4, Abb. 16). Wenn Acarbose über eine Modulation der SA-vermittelten Abwehrreaktionen wirkt, würde man erwarten, dass in Mutanten, die keine Salicylsäure produzieren können, kein Acarbose-Effekt auftritt. Da jedoch sowohl in der Mutante *cpr6* als auch insbesondere in der Mutante *sid2* ein Acarbose-Effekt dokumentiert werden konnte, muss dieser auf einem anderen Mechanismus beruhen.

5.2.4 Ausblick

Die Fähigkeit von Acarbose, als Invertaseinhibitor zu fungieren und damit den Kohlenhydratmetabolismus und die pflanzliche Abwehr während einer Pathogeninfektion zu beeinflussen, konnte in vorliegender Studie gezeigt werden. Durch Messungen der Salicylsäurespiegel, Northern Blot- und Mutantenanalysen konnte eine Beteiligung des SA-vermittelten Signalweges der Abwehr ausgeschlossen werden. Da die pflanzliche Abwehr ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Abwehrwegen darstellt (Thomma *et al.*, 2001; Glazebrook, 2005), könnten weiterführende Untersuchungen mit Mutanten anderer Signaltransduktionswege erfolgen. Eine Beteiligung des Jasmonsäure (JA)- oder Ethylen (ET)-vermittelten Signalweges der Abwehr wäre beispielsweise denkbar, denn auch für die Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. syringae* konnte bereits gezeigt werden, dass es Proteine gibt, deren Akkumulation vom JA- und ET-Signalweg, jedoch nicht vom SA-vermittelten Signalweg abhängt (La Camera *et al.*, 2005). Auch eine Bestimmung von Stickstoffmonoxid (NO) könnte in diesem Zusammenhang erfolgen, da beschrieben wurde, dass NO ein wichtiges Signalmolekül in Pflanze-Pathogen-Interaktionen darstellt und auch die Virulenz von Pathogenen beeinflussen kann (Mur *et al.*, 2006; Besson-Bard *et al.*, 2008).

Neben der Acarbose gibt es alternativ auch pflanzeigene Stoffe mit Glycosidase-Eigenschaften. Calystegine sind hydroxylierte Nortropanalkaloide, die Glycosidasen spezifisch hemmen können (Scholl *et al.*, 2001). Für Calystegine aus *Calystegia sepium* konnte weiterhin die Fähigkeit zur Invertaseinhibition nachgewiesen werden (Höke und Dräger, 2005). Auch wurde spekuliert, dass Calystegine eine Rolle in der Pflanzenabwehr spielen könnten (Höke und Dräger, 2005).

In ersten Versuchen konnte gezeigt werden, dass Calystegine trotz größerer Variabilität in den Ergebnissen Invertasen aus *A. thaliana in vitro* stärker hemmen als die Acarbose. Die Hemmwirkung von Miglitol auf Invertasen aus Tomate und Tabak *in vitro* war mit der Hemmwirkung von Acarbose vergleichbar oder etwas stärker (persönliche Mitteilung von N. Muhammad). Auch der Einsatz neuer Derivate des Glucosidaseinhibitors DMDP (2,5-Didesoxy-2,5-Imino-D-Mannitol) könnte erfolgen. Die inhibitorische Aktivität dieser Substanzen, auch gegenüber Invertasen, ist bekannt (Wrodnigg *et al.*, 2004). Eine starke Hemmung von Invertasen aus Tabak und *A. thaliana in vitro* konnte für DMDP sogar im mikromolaren Bereich gezeigt werden (persönliche Mitteilung von N. Muhammad). DMDP stellt damit den bisher potentesten Inhibitor dar. Eine analoge Studie zu den Untersuchungen mit Acarbose könnte neue Erkenntnisse in der Regulation des Kohlenhydratmetabolismus während Pathogeninfektionen liefern und damit helfen, grundlegende Mechanismen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen aufzuklären.

5.3 Induzierbare Promotorsysteme ermöglichen eine kontrollierte Genexpression

5.3.1 Induzierbare Promotorsysteme besitzen Vorteile, jedoch auch Limitationen

In dieser Arbeit wurden verschiedene induzierbare Promotorsysteme eingesetzt, um eine räumlich und zeitliche definierte Expression bestimmter Gene zu erzielen. Für *A. thaliana* wurden synthetische, pathogeninduzierbare Promotoren (siehe Kapitel 4.2.2.1), ein Estradiol-induzierbares (siehe Kapitel 4.2.2.2) sowie ein Dexamethason-induzierbares Promotorsystem (siehe Kapitel 4.2.2.3), in *N. tabacum* hingegen ein Tetracyclin-induzierbares Promotorsystem verwendet (siehe Kapitel 4.2).

Die Wahl eines geeigneten Promotors trägt entscheidend zur erfolgreichen Generierung transgener Pflanzen bei, insbesondere wenn toxische Wirkungen des Genprodukts oder negative Effekte auf die pflanzliche Entwicklung bekannt sind. Es steht eine Vielzahl von Promotoren zur Verfügung, die sich in ihrer Induzierbarkeit durch verschiedene Induktoren sowie in ihrem Expressionsverhalten unterscheiden (Gurr und Rushton, 2005; Oltmanns, 2005). Promotoren zeichnen sich typischerweise durch das Vorkommen verschiedener *cis-*

regulatorischer Elemente aus, die zusammen das spezifische Expressionsprofil für jedes Gen determinieren. Verschiedene Boxen sowie Transkriptionsfaktoren können wiederum an diese Elemente binden. So sind W-Boxen Bindestellen für WRKY-Transkriptionsfaktoren (Rushton *et al.*, 1996; Ülker und Somssich, 2004) und GCC-ähnliche Elemente Bindestellen für AP2-Domänen (Eulgem, 2005).

Kriterien für die Auswahl eines Promotors zur Expression eines Transgens sind insbesondere die Gewebespezifität, die Induzierbarkeit und die Stärke der vom Promotor vermittelten Expression. Man kennt Promotoren, die konstitutiv aktiv, gewebe- oder entwicklungspezifisch, durch biotische oder abiotische Faktoren oder durch Chemikalien induzierbar sind (Lessard *et al.*, 2002).

Gewebespezifische oder induzierbare Promotoren werden in neueren Studien häufig konstitutiv exprimierten Promotoren bei der Herstellung transgener Pflanzen vorgezogen (Padidam, 2003; Fischer *et al.*, 2004), da die konstitutive Expression eines Gens sich beispielsweise nachteilig auf das pflanzliche Wachstum und die Entwicklung auswirken (Kasuga *et al.*, 1999; Heil und Baldwin, 2002; Potenza *et al.*, 2004) oder die Anfälligkeit gegenüber einer Pathogeninfektion erhöhen kann (Stuiver und Custers, 2001; Potenza *et al.*, 2004). Durch den Einsatz gewebespezifischer Promotoren können toxische Effekte vermieden werden, die bei der Expression eines Transgens in bestimmten Geweben auftreten könnten (Lessard *et al.*, 2002).

Ein ideales induzierbares Promotorsystem sollte eine nur geringe Hintergrundexpression und eine starke Induzierbarkeit aufweisen. Des Weiteren sollte es durch einen weiten Konzentrationsbereich des entsprechenden Induktors induzierbar sein, schnell auf eine Induktion ansprechen sowie durch Wegnahme des Induktors auch wieder abschaltbar sein. Der Induktor selbst sollte eine nur geringe Toxizität und eine hohe Spezifität aufweisen (Gatz, 1997; Padidam, 2003). Bisher konnte kein induzierbares Promotorsystem beschrieben werden, das alle genannten Eigenschaften uneingeschränkt besitzt. Daher sollte der Einsatz eines bestimmten Promotors genau abgewogen und anhand des zu exprimierenden Gens, der Pflanzenart und der spezifischen Induktor-Applikation ausgewählt werden.

Der modulare Aufbau von Promotoren diente in verschiedenen Versuchsansätzen als Grundlage zur Herstellung synthetischer Promotoren mit optimierten Eigenschaften hinsichtlich der Pathogen- und Wundinduzierbarkeit (Rushton *et al.*, 2002). Die Expressionsprofile der verschiedenen Promotoren wurden in kompatiblen, inkompatiblen und Nichtwirtsinteraktionen getestet. Es konnten große Unterschiede hinsichtlich der Induzierbarkeit durch verschiedene Pathogene, der Schnelligkeit der Induktion und der Hintergrundexpression gezeigt werden. Ein Teil der Promotoren konnte durch Verwundung induziert werden (zur Übersicht siehe Gurr und Rushton, 2005). In der vorliegenden Studie wurden Konstrukte aus einem Invertaseinhibitor unter der Kontrolle von drei verschiedenen

synthetischen Promotoren für die Transformation von *A. thaliana* verwendet (siehe Kapitel 4.2.2.1). Aufgrund der Feststellung, dass putativ transgene Keimlinge sich nicht über das Keimlingsstadium hinaus entwickelten, wurden Untersuchungen zu einer möglichen Aktivität der Promotoren im frühen Keimlingsstadium durchgeführt. Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Reporterlinien konnte gezeigt werden, dass das Reportergen *uidA* unter Kontrolle dieser Promotoren in Keimlingen aus einer Gewebekultur sehr stark, in Keimlingen, die auf Erde angezogen wurden, nur schwach exprimiert ist (siehe Kapitel 4.3). Dies deutet auf eine Aktivierung der Promotoren durch eine Kombination aus Entwicklungsstadium und exogenen Faktoren hin. Damit konnte auch gezeigt werden, dass die Regulation der Genexpression ein komplexer Prozess ist, da auch die für die synthetischen Promotoren verwendeten kurzen regulatorischen Elemente keine eindeutig vorhersagbare Expression erlauben.

Ein Tetracyclin-induzierbares (in Form einer De-Repression) Promotorsystem konnte erfolgreich für den Einsatz in Tabakpflanzen generiert werden (Weinmann *et al.*, 1994). Auch in der vorliegenden Studie konnten Tabakpflanzen, die die Invertaseinhibitoren *NtCIF* oder *NtVIF* unter Kontrolle dieses Promotorsystems exprimieren, erfolgreich für verschiedene Untersuchungen eingesetzt werden (siehe Kapitel 4.3). Durch Applikation von Chlorotetracyclin konnte das System induziert und die Invertaseinhibitoren exprimiert werden. Im Gegensatz zu den synthetischen pathogeninduzierbaren Promotoren schien dieses Promotorsystem im nicht induzierten Zustand keine oder eine nur sehr geringe Expression zu zeigen, denn die *in vitro* angezogenen Keimlinge wiesen keinen aberranten Wachstumsphänotyp im Vergleich zu Kontrollkeimlingen auf. Ein Nachteil des Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems ist, dass dieses zwar erfolgreich in Tabak, Tomate und Kartoffel eingesetzt werden kann, jedoch ein Einsatz in *A. thaliana* nicht möglich ist. Damit Tetracyclin bzw. Chlorotetracyclin als Induktor des Promotorsystems wirken kann, muss dieses aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit mehrfach appliziert werden. Außerdem muss es für eine Wirksamkeit als Repressor in relativ hoher Konzentration appliziert werden. Für *A. thaliana* stellt eine Behandlung mit Tetracyclin in ausreichender Konzentration ein Gift dar. Dies äußert sich in einer veränderten photosynthetischen Leistungsfähigkeit der Pflanzen (Gatz, 1996; Gatz, 1997; Tang *et al.*, 2004).

Auch die erfolgreiche Entwicklung und der vielversprechende, erfolgreiche Einsatz eines durch Estradiol induzierbaren Promotorsystems (pER8) wurde in der Literatur beschrieben (Zuo *et al.*, 2000; Padidam, 2003). Es zeichnet sich demnach durch eine starke und schnelle Induzierbarkeit durch einen breiten Konzentrationsbereich des Induktors und eine geringe Hintergrundexpression aus. Im Gegensatz zum Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystem wurde es sowohl erfolgreich in Tabak als auch in *A. thaliana* eingesetzt (Zuo *et al.*, 2000). Die postulierten Eigenschaften der geringen Hintergrundexpression und der guten Induzierbarkeit waren bei den getesteten Pflanzen in der vorliegenden Studie jedoch nicht

erfüllt. In Northern Blot Analysen konnte gezeigt werden, dass das Promotorsystem schon vor der Applikation von β -Estradiol aktiv war (siehe Kapitel 4.2.2.2, Abb. 17). Es wurde spekuliert, dass ein Einsatz des Promotorsystems in Pflanzen mit hohen Spiegeln an Phytoöstrogenen nicht möglich ist (Zuo *et al.*, 2000). Zu den Phytoöstrogenen zählen insbesondere Isoflavone und Lignane. Da das Vorkommen von Isoflavonen in *A. thaliana* nachgewiesen werden konnte (Lapcik *et al.*, 2006), wäre es denkbar, dass bei den getesteten Pflanzen eine Induktion des Promotorsystems durch die Anwesenheit von endogen gebildeten Phytoöstrogenen ausgelöst wurde. Da die Ergebnisse der Northern Blot Analysen zusammen mit den Ergebnissen der Infektionsversuche dafür sprechen, dass keine Regulationsmöglichkeit des Systems besteht und zudem der Zeitpunkt der Induktion und der Induktor selbst nicht bekannt sind, war es für die Untersuchung der Bedeutung der Invertasen während der Regulationsvorgänge nach einer Pathogeninfektion nicht geeignet. Geeignet scheint dagegen der funktionelle Ansatz mit einem Dexamethason-induzierbaren Promotorsystem zu sein. Sowohl in den getesteten Reporterlinien als auch in den transgenen Pflanzen war keine Hintergrundexpression nachweisbar, jedoch war eine starke Induzierbarkeit möglich (siehe Kapitel 4.2.2.3, Abb. 18 und 20). Allerdings konnte die Induzierbarkeit in Northern Blot Analysen nicht für alle getesteten Linien gezeigt werden. Ebenso wie für das Estradiol-induzierbare Promotorsystem wurde auch für das Dexamethason-induzierbare System eine erfolgreiche Anwendung in Tabak und *A. thaliana* beschrieben (Samalova *et al.*, 2005; Craft *et al.*, 2005). Die Vorteile des Einsatzes des Dexamethason-induzierbaren Promotorsystems liegen nach Moore *et al.* (2006) in Möglichkeit der gesättigten Induktion unterhalb der Toxizitätsgrenze und der lokal möglichen Induktion. Endogene Induktoren sind nicht bekannt. Als Vorteil oder Nachteil kann der effiziente Transport des Dexamethasons durch die Pflanze nach einer Induktion und die relative Instabilität unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen betrachtet werden.

5.3.2 Ausblick: Eine Inhibition der Invertaseaktivität durch Expression eines Invertaseinhibitors in transgenen Ansätze ist möglich

Die Aktivität Zellwand gebundener Invertasen kann in Pflanzen posttranslational durch endogene Invertaseinhibitoren reguliert werden (Greiner *et al.*, 2000). Der Einsatz eines funktionellen transgenen Ansatzes zur Inhibition von Invertasen mit Hilfe von proteinogenen Invertaseinhibitoren hat im Vergleich zu der Generierung von KO-Mutanten den entscheidenden Vorteil, dass aufgrund der möglichen Ausbildung eines Komplexes mit allen Zellwand gebundenen und vakuolären Invertasen die Gesamtinvertaseaktivität einer Pflanze gehemmt werden kann. Beim Einsatz von KO-Mutanten, bei denen jeweils nur eine der Zellwand gebundenen Invertasen ausgeschaltet ist (Sherson *et al.*, 2003), können die anderen, noch funktionellen Invertasen die Aufgabe der ausgeschalteten Invertase

übernehmen. Die Folge ist, dass in diesen Pflanzen keine aberranten Wachstumsphänotypen beobachtbar sind (Sherson *et al.*, 2003). Durch den Einsatz von transgenen Pflanzen, die Invertaseinhibitoren unter der Kontrolle induzierbarer Promotoren exprimieren, kann dieses Problem umgangen werden.

Weitere Untersuchungen an diesen Pflanzen, die eine räumlich und zeitlich definierte Expression der Invertaseinhibitoren ermöglichen, können in Zukunft einen Beitrag dazu leisten, die zugrundeliegenden Regulationsmechanismen zwischen Kohlenhydratstoffwechsel und Abwehrverhalten bei Pathogeninfektionen zu verstehen.

5.4 Die Regulation von Invertasen spielt eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Entwicklung

5.4.1 Die Aktivität von Invertasen ist essentiell für eine normale Keimlingsentwicklung

A. thaliana, die mit Konstrukten aus einem synthetischen Promotor und einem Invertaseinhibitor transformiert wurden, entwickelten sich nicht über das Keimlingsstadium hinaus (siehe Kapitel 5.3.1). Die Expression der Invertaseinhibitoren aufgrund der konstitutiven Aktivität der Promotoren hatte negative Effekte auf das Wachstum und die Entwicklung der Keimlinge. Auch Sturm und Tang (1999) konnten beschreiben, dass eine dauerhafte Erniedrigung bestimmter Invertaseisoenzyme pflanzliches Wachstum und Entwicklung beeinträchtigt. Zucker werden als Nährstoffe nicht nur für das Wachstum, die Atmung und zur Akkumulation von Speichersubstanzen benötigt, sie stellen auch Signale für die Regulation der Genexpression dar (Koch, 1996; Ehness *et al.*, 1997; Rolland *et al.*, 2006). Eine strikte Regulation der pflanzlichen Invertaseaktivität ist daher notwendig. Der wichtigste Mechanismus für eine gewebe- und entwicklungsabhängige Expression sowie für eine Regulation der Invertasen auf exogene Faktoren hin ist die transkriptionelle Regulation. Verschiedene Stimuli wie Zuckermoleküle, Verwundung oder Pathogeninfektionen induzieren die Expression von Invertasen (Sturm und Chrispeels, 1990; Godt und Roitsch, 1997; Sinha *et al.*, 2002). Invertasen sind stabile Enzyme (Rausch und Greiner, 2004). Ihre Aktivität kann posttranslational mittels Invertaseinhibitoren reguliert werden (siehe Kapitel 4.1.5). Expression der Invertaseinhibitoren *AtC/VIF1* und *AtC/VIF2* unter Kontrolle der synthetischen Promotoren resultierte in der Arretierung der Entwicklung im 4-Blatt-Stadium (siehe Kapitel 4.3). Der gleiche Effekt liess sich in Keimlingen von *N. tabacum* nach ektopischer Induktion der Invertaseinhibitoren *NtCIF* und *NtVIF* unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems beobachten.

Die Inhibition von Invertasen hatte keinen spezifischen Effekt auf den Gehalt an löslichen Zuckern bzw. das Saccharose/Hexose-Verhältnis. Dieser Befund ist dadurch erklärbar, dass in Keimlingen und Stängeln die Invertaseaktivität sehr spezifisch lokalisiert ist. Durch *in situ* Färbungen konnte dies für verschiedene Pflanzenarten gezeigt werden (Godt und Roitsch, 1997; Roitsch und Ehness, 2000; Sergeeva *et al.*, 2006). Da zur Bestimmung der löslichen Zucker die gesamten Keimlinge geerntet wurden, waren aufgrund der nur lokal begrenzt auftretenden Invertaseaktivität keine Effekte detektierbar.

Die Inhibition des Wachstums der transgenen Keimlinge von *A. thaliana* und *N. tabacum* nach Induktion der Invertaseinhibitorexpression weist auf die wichtige Funktion von Invertasen während der Keimlingsentwicklung hin. Diese Annahme konnte bestätigt werden durch die Beobachtungen, dass Zellwand gebundene und vakuoläre Invertasen während der Keimlingsentwicklung stark exprimiert werden (siehe Kapitel 4.3, Abb. 25; Mitsunashi *et al.*, 2004) und auch die Aktivität der vakuolären Invertasen ansteigt (Mitsunashi *et al.*, 2004). Zudem konnte eine hohe *in vivo* Invertaseaktivität mittels *in situ* Färbungen in Keimlingen und Wurzeln von *A. thaliana* nachgewiesen werden (Sergeeva *et al.*, 2006). Die Ergebnisse, dass beide vakuolären Invertasen früher und stärker exprimiert werden als die Zellwand gebundene Invertase *cwINV1* und zudem ein Anstieg der vakuolären Invertaseaktivität mit der Keimung einhergeht, deutet auf eine maßgebliche Beteiligung der vakuolären Invertasen an der frühen Keimlingsentwicklung hin. Die Wirkung dieser Isoenzyme könnte darin bestehen, dass sie an der Mobilisierung der Saccharose aus dem Speicherorgan Vakuole beteiligt sind und zur Aufrechterhaltung des osmotischen Drucks während der Zellstreckung beitragen. Ihre spezifische Funktion wird weiter untermauert durch die Tatsache, dass keine transgenen Keimlinge selektiert werden konnten, die *AtC/VIF1* oder *AtC/VIF2* unter Kontrolle der synthetischen Promotoren exprimierten. Beide Inhibitoren hemmen vakuoläre Invertasen, der Inhibitor *AtC/VIF2* zusätzlich auch die Zellwandinvertasen (Link *et al.*, 2004).

Wurzeln stellen *Sink*-Gewebe dar und zeichnen sich daher durch eine hohe Invertaseaktivität aus (Roitsch *et al.*, 1995; Godt und Roitsch 1997; Sergeeva *et al.*, 2006). Eine bedeutende Funktion kommt in Wurzeln der Aktivität der vakuolären Invertasen zu (Sergeeva *et al.*, 2006). Da die synthetischen Promotoren unter *in vitro* Bedingungen stark in Wurzeln exprimiert waren, ist die Wirkung der Invertaseinhibitorexpression möglicherweise auf diesen Effekt zurückzuführen.

5.4.2 Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität pflanzlicher Invertasen einschließlich ihrer Regulation durch endogene Invertaseinhibitoren eine wichtige Komponente in der Abwehr von Pathogeninfektionen darstellt. Daneben konnte dargelegt werden, dass eine strenge

Regulation der Invertasen essentiell für eine normale Keimlingsentwicklung und das pflanzliche Wachstum ist.

Da in Zusammenhang mit der Regulation von Invertasen auch stets *Source-Sink*-Übergänge sowie die Kohlenhydratflüsse selbst stehen, bleibt zu untersuchen, ob die beobachteten Regulationsvorgänge auf transkriptioneller und Aktivitätsebene auch tatsächlich zu Veränderungen des metabolischen Status von Geweben und der Veränderung von Kohlenstoffflüssen führen. Insbesondere geeignet sind dazu nichtinvasive Methoden, beispielsweise die Markierung mit kurzlebigen ^{11}C -Isotopen, die NMR-Spektroskopie oder auch die Chlorophyllfluoreszenz-Bildgebung, da hier die ablaufenden Veränderungen über einen bestimmten Zeitraum beobachtet werden können (siehe Roitsch und Gonzalez, 2004). Mit Hilfe der bereits erwähnten Monitoring-PAM (siehe Kapitel 5.1.4) ist es möglich, natürliche Veränderungen in der Photosynthese während der gesamten pflanzlichen Entwicklung auch unter Freilandbedingungen zu dokumentieren.

Die Anwendung aller genannten Methoden ist speziell im komplexen Prozess der Keimlingsentwicklung interessant, da Keimlinge ein sich schnell änderndes Mosaik aus *Source*- und *Sink*-Geweben darstellen und damit Veränderungen auf morphologischer und physiologischer Ebene zu erwarten sind. Es kann dadurch ein Beitrag zum Verständnis der Basis der Produktion, der Verteilung und des Flusses von Assimilaten geleistet werden.

6 Material und Methoden

6.1 Material

6.1.1 Chemikalien, Enzyme, Verbrauchsmaterial und Laborgeräte

Handelsübliche Chemikalien für Puffer, Lösungen etc. wurden von den Herstellern AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

Weitere Chemikalien

[alpha-P32] dATP	Hartmann Analytic, Baunschweig
β-Estradiol	Serva, Heidelberg
Acarbose	Bayer, Leverkusen
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Segenetic, Borken
Dexamethason	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen
Potato Dextrose Agar	Difco, Detroit, USA
Potato Dextrose Broth	Difco, Detroit, USA
Proteose Peptone No.3	Difco, Detroit, USA
Serdolit MB-1 Harz	Serva, Heidelberg
Silwet L-77	Lehle Seeds, Round Rock, USA
TriFast™	peqLab, Erlangen

Antibiotika

Ampicillin	AppliChem, Darmstadt
Hygromycin	Genaxxon Bioscience, Biberach
Kanamycin	Roth, Karlsruhe
Rifampicin	Duchefa, Haarlem
Tetracyclin	AppliChem, Darmstadt

Enzyme und entsprechende Puffer

CIA-Phosphatase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Glucoseoxidase	AppliChem, Darmstadt
Klenow-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Peroxidase	AppliChem, Darmstadt
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	Segenetic, Borken
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

Kits

NucleoBond PC100 AX	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin ExtractII	Macherey-Nagel, Düren
pGEM-T Easy Vector System I	Promega, Madison, USA
MBI-Hexalabel-DNA Labelling Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HexaLabel™ DNA Labeling Kit	Fermentas, St. Leon-Rot
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas, St. Leon-Rot

Plasmide

pGEM-T-easy (Promega, Mannheim)

Dieser linearisierte Klonierungsvektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er weist eine Größe von 3015 bp auf und trägt an den 3'-Enden jeweils einen Thymidin-Überhang. Der Vektor enthält die T7 und SP6 RNA Polymerase Promotoren, welche eine MCS flankieren und das Gen für die Ampicillin-Resistenz.

pSTBlue-1 (Novagen, Madison, USA)

Dieser Klonierungsvektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet. Er besitzt eine Größe von 3851 bp und enthält die T7 und SP6 RNA Polymerase Promotoren, welche eine MCS flankieren. Weiterhin trägt er die Gene für die Ampicillin- sowie die Kanamycin-Resistenz.

pUTgfp

Das Plasmid pUTgfp wurde von Janet Jansson (Department of Microbiology, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden) zur Verfügung gestellt und zur Transformation von *P. syringae* DC3000 und avrRPM1 verwendet. Es hat eine Größe von 8400 bp und trägt die Gene für die Kanamycin- und die Ampicillin-Resistenz.

pPNptGreen

Das Plasmid pPNptGreen wurde von Gwyn Beattie (Department of Plant Pathology, Iowa State University, Iowa) zur Verfügung gestellt und zur Transformation von *P. syringae* DC3000 und avrRPM1 verwendet. Es hat eine Größe von 13199 bp und trägt das Gen für die Kanamycin-Resistenz.

pV-TOP

Die Klonierungsschritte zur Generierung des binären Plasmids pV-TOP erfolgten wie in Craft *et al.* (2005) beschrieben, basierend auf den Plasmiden pVKH18 und pOp^{BK}-GUS (Baroux *et al.*, 2005). Das Plasmid trägt die Gene für die Kanamycin-Resistenz für eine Selektion in Prokaryoten und für die Hygromycin-Resistenz für die Pflanzenselektion sowie das Gen für die β -Glucuronidase (GUS). Nur die in der MCS vorhandenen Schnittstellen für *Bam*HI und *Sal*I kommen einfach vor, daher wurden diese für die Klonierung verwendet.

Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Autoklaven	SANOclav LaM201; Wolf, Geislingen Tuttnauer Systec 2540 EIC und 5075 ELV
Autoradiographiekassette	Amersham International plc
Chromatographiepapier	Whatman 3 MM, Madison, USA
Elektroporator	Electroporator 2510, Eppendorf
ELISA-Platereader	Dynex Technologies MRX Tc Revelation
Fluoreszenz-Binokular	Leica MZ FL III, Bensheim
Kamera	SpotInsight Color Diagnostica, USA
UV-Licht	ebq 100, Leica, Bensheim
Fluorometer	Fluoroskan Ascent, Labsystems
Geldokumentationssystem	Mitsubishi Video Copy Processor P68E; LTF M/WL 310 nm; Kamera: CCD XC-ST50
Heiz- und Schüttelblöcke	Eppendorf Thermomixer <i>compact</i> , Eppendorf Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg
Homogenisierstäbchen	Mikropistille, Eppendorf, Hamburg
ImagingPAM	Model IMAG-K, Walz, Effeltrich
Inkubator (37°C)	Heraeus B6120

Inkubator (28°C)	Mytron, Memmert Modell 500
<i>In vitro</i> vent Boxen	Duchefa, RV Haarlem
Mikroskop	Leitz HM-Lux, Leitz Messtechnik, Wetzlar
MicroSpin™ S-200 HR Columns	Amersham-Buchler, Braunschweig
Nitrocellulosemembran	Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren
PCR-Geräte	HYBAID PCR Express und PCR Sprint, Ulm
Pflanzenanzuchtschränke	Binder KBW 240, KBW 400 und KBW 720, Thieme Labortechnik, Bensheim
Phosphorimager	BAS 2000, Fujix
Phosphorimagerfilm	Fujifilm Imaging Plate, BAS-IP MS 2025
Photometer	Gene Quant II, Pharmacia Biotech UV/Vis Spectrometer Lambda 2, Perkin Elmer Ultrospec 100pro, Amersham Biosciences
Schüttler	G2+G10 Gyrotory® Shaker; New Brunswick Scientific Company; Swip Endmund Bühler, SM 25, CH 4103 Bottmingen Vortex-2 Genie, Scientific Industries
Trockenschrank	Heraeus Typ T 5050
Wasserbadschüttler	Gyrotory® Water Bath Shaker MODEL G76, New Brunswick Scientific, Edison, N.J., USA JulaboEM, Thermomix MM, Braun, Melsungen
Zählkammer Jessen	Hartenstein, Würzburg
Weinkühlbox	KSW 346, Typ BC 50G, Bomann
Zentrifugen	Eppendorf Tischzentrifugen 5417R, 5415C und 5804R Jouan MR 23i, Thermo Scientific, Waltham

Weitere Verbrauchsmaterialien und Laborgeräte standen entsprechend der Standardausstattung eines molekularbiologischen Labors zur Verfügung.

Steriles Material

Pipettenspitzen, Pasteurpipetten, Duranflaschen, Kolben, Lösungen etc. wurden durch Autoklavieren bei 121 °C und 2 bar für 30 min steriliert.

Sterilisation nicht autoklavierbarer oder hitzeempfindlicher Lösungen erfolgte durch Serifiltration (Porengröße 0,2 µm).

Computersoftware und Internetadressen

Microsoft® Word 2003, Excel 2003 und PowerPoint 2003

Adobe Photoshop 7.0

CorelDraw 11

AIDA software

Vector NTI Suite 6.0

Spot Advanced Version 3.5.5

ImagingWin

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.arabidopsis.org>

www.genevestigator.ethz.ch

<http://www.walz.com>

6.1.2 Nährmedien

King's Medium B	40 g Proteose Peptone 3, 20 g Glycerin (87 %), nach dem Autoklavieren Zugabe von je 10 ml sterilem 10 % K ₂ HPO ₄ und 10 % MgSO ₄
LB-Medium LB-Agarplatten	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl (pH 7,0) LB-Medium, Zugabe von 15 g Bacto-Agar
MS-Agarplatten	4,4 g MS 222, 20 g Saccharose, 11 g Bacto-Agar (pH 5,7)
PDA-Medium PDA-Platten	12 g Potato Dextrose Broth 39 g Potato Dextrose Agar
Testplatten für Agrobakterien	10 g Lactose, 1 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Agar
YEB-Medium	5 g Beefextrakt, 5 g Pepton, 1 g Hefeextrakt, 5 g Saccharose, 0,5 g MgSO ₄ (pH 7,2)
YEB-Agarplatten	YEB-Medium, Zugabe von 15 g Bacto-Agar

Alle Angaben beziehen sich auf 1 l Gesamtvolumen.

<u>Antibiotika-Stocklösungen</u>	Endkonzentration
Ampicillin (100 mg/ml)	100 µg/ml
Hygromycin (30 mg/ml)	30 µg/ml
Kanamycin (100 mg/ml)	25 oder 100 µg/ml
Rifampicin (50 mg/ml)	50 µg/ml
Tetracyclin (5 mg/ml)	10 µg/ml

Die Medien wurden bei 121 °C und 2 bar für 25 min autoklaviert. Antibiotika und andere nicht autoklavierbare Komponenten wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen der Medien in den entsprechenden Konzentrationen zugefügt.

6.1.3 Bakterien- und Pilzstämme

Bakterien

Escherichia coli

E. coli DH5α (F⁻, endA1, hsdR17(r_k,m_r), supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, 080dlacZ[D]M15) wurden für alle Klonierungsarbeiten verwendet. Die Kultivierung erfolgte entweder auf LB-Agarplatten im Inkubator oder in LB-Medium im Schüttler bei jeweils 37 °C.

Agrobacterium tumefaciens

A. tumefaciens LBA4404 (Strp^r, Rif^r) wurden für die "Floral dip"-Transformation von *A. thaliana* verwendet. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte entweder auf YEB-Agarplatten im Inkubator oder in YEB-Medium im Wasserbadschüttler bei jeweils 28 °C.

Pseudomonas syringae pv. *tomato*

P. syringae pv. *tomato* DC3000 und DC3000avrRPM1 stammten von Brian Staskawicz (Department of Plant and Microbial Biology, Berkeley, USA).

Der virulente Bakterienstamm DC3000 trägt eine Resistenz gegenüber Rifampicin (50 mg/l), der avirulente Bakterienstamm DC3000avrRPM1 trägt eine Resistenz gegenüber Rifampicin (50 mg/l) sowie gegenüber Tetracyclin (10 mg/l).

Pilze*Alternaria brassicicola*

A. brassicicola MUCL 20297 wurde von Bart Thomma (Centre of Microbial and Plant Genetics, Leuven, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Hyaloperonospora parasitica

Die *H. parasitica* Kultivare NOCO und WELA wurden von Nikolaus Schlaich (Institut für Pflanzenphysiologie, RWTH Aachen) bezogen. Eine kompatible Interaktion liegt zwischen NOCO und *A. thaliana* Col-0 vor sowie zwischen WELA und Wei-0. Eine Kultivierung beider Isolate auf *A. thaliana* eds-1 ist ebenfalls möglich.

6.1.4 Pflanzen*Arabidopsis thaliana*

Col-0	Wildtyp Columbia-0
Wei-0	Wildtyp Weiningen-0
eds-1	Mutante "enhanced disease susceptibility 1" Erhöhte Suszeptibilität gegenüber <i>H. parasitica</i> (Parker <i>et al.</i> , 1996)
cpr6	Mutante "constitutive expresser of <i>Pr</i> genes 6" Konstitutive <i>Pr1</i> -Genexpression und konstitutiv erhöhte Salicylsäuremengen (Clarke <i>et al.</i> , 1998)
nahG	Transgene Pflanze <i>nahG</i> , Hintergrund Col-0 Expression der Salicylathydroxylase, welche SA zu Catechol abbaut (Gaffney <i>et al.</i> , 1993; Delaney <i>et al.</i> , 1994)
sid2	Mutante „SA induction deficient 2“ Mutation im Gen <i>Ics1</i> , keine Akkumulation von SA, keine Expression von <i>PR</i> -Genen, keine Ausbildung einer SAR (Wildermuth <i>et al.</i> , 2001)

Die Invertase- und Invertaseinhibitor-Reporterlinien wurden von Steffen Greiner bzw. Thomas Rausch (Heidelberg Institute for Plant Sciences, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

At3g13790prom::GUS/GFP-6	Promotor <i>AtcwINV1</i>	Hintergrund Col-0
At3g13790prom::GUS/GFP-7		
At3g13790prom::GUS/GFP-22		
At3g52600prom::GUS/GFP-1	Promotor <i>AtcwINV2</i>	Hintergrund Col-0
At3g52600prom::GUS/GFP-3		
At3g52600prom::GUS/GFP-6		
At1g55120prom::GUS/GFP-3	Promotor <i>AtcwINV3</i>	Hintergrund Col-0
At1g55120prom::GUS/GFP-7		
At1g55120prom::GUS/GFP-8		
At2g36190prom::GUS/GFP-1	Promotor <i>AtcwINV4</i>	Hintergrund Col-0
At2g36190prom::GUS/GFP-3		
At2g36190prom::GUS/GFP-21		
At3g13784prom::GUS/GFP-10	Promotor <i>AtcwINV5</i>	Hintergrund Col-0
At3g13784prom::GUS/GFP-18		
At3g13784prom::GUS/GFP-25		
At5g11920prom::GUS/GFP-1	Promotor <i>AtcwINV6</i>	Hintergrund Col-0
At5g11920prom::GUS/GFP-3		
At5g11920prom::GUS/GFP-7		
At1g62660prom::GUS/GFP-1	Promotor <i>Atβfruct3</i>	Hintergrund Col-0
At1g62660prom::GUS/GFP-3		

At1g12240prom::GUS/GFP-3 At1g12240prom::GUS/GFP-7	Promotor <i>Atβfruct4</i>	Hintergrund Col-0
At1g47960prom::GUS/GFP-3 At1g47960prom::GUS/GFP-7	Promotor <i>AtC/VIF1</i>	Hintergrund Col-0
At5g64620prom::GUS-2 At5g64620prom::GUS-5	Promotor <i>AtC/VIF2</i>	Hintergrund Ws
At3g17130prom::GUS/GFP-1 At3g17130prom::GUS/GFP-5	Promotor <i>AtC/VIF3</i>	Hintergrund Col-0

Die Reporterlinien mit den synthetischen Promotoren wurden von Imre Somssich (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Abteilung Biochemie, Köln) zur Verfügung gestellt.

4xJERE::GUS	Hintergrund Col-0
4xS::GUS	Hintergrund Col-0
4xW2/4xS::GUS	Hintergrund Col-0

Die Reporterlinien des Dexamethason-induzierbaren Promotorsystems und die Aktivatorlinien wurden von Ian Moore (Department of Plant Sciences, Oxford, UK) zur Verfügung gestellt.

pV-ipt 5-2	Kan ^r , Hyg ^r , homozygot für 35S>LhGR-N	Hintergrund Col-0
pV-ipt 5-3	exprimieren pOp6::GUS/IPT	
4C-S5	Kan ^r , homozygot für 35S>LhGR-N	Hintergrund Col-0
4C-S7		

Nicotiana tabacum

Für Versuche mit Tabakpflanzen wurden der Wildtyp W38 und verschiedene transgene Linien verwendet, die einen Invertaseinhibitor unter Kontrolle eines Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystem exprimieren. Die Pflanzen wurden von Tahira Fatima bzw. MariCruz Gonzalez zur Verfügung gestellt:

68-11, 68-14, 68-19, 68-21	(Tet::NtCIF)
83-2-1, 83-5-2, 83-6-14	(Tet::NtVIF)

6.2 Methoden

6.2.1 Arbeit mit Pathogenen

6.2.1.1 Anzucht von und Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

Pseudomonas syringae pv. *tomato* DC3000 und avrRPM1, sowie die transformierten Stämme DC3000gfp und avrRPM1gfp wurden auf Kings Medium B kultiviert. Dazu wurden die Bakterien aus einer Dauerkultur auf einer KB-Agarplatte mit geeigneten Antibiotika ausgestrichen, über Nacht bei 28°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Für die Durchführung von Infektionsversuchen mit *P. syringae* wurden die Bakterien zunächst in einer Flüssigkultur (3 ml) mit entsprechenden Antibiotika über Nacht in einem Wasserbad bei 28°C und 120 U/min inkubiert. Von dieser Kultur wurde 1 ml in eine Hauptkultur (50 ml) überführt. Nach 4 bis 5 h Wachstum bei 28°C und 120 U/min wurden die Bakterien bei 3500 rpm und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Pellet in 10 mM MgCl₂ resuspendiert und die

Suspension auf eine optische Dichte OD_{600} von 0,2 eingestellt, was einer Konzentration von 1×10^8 cfu/ml entsprach. Ausgehend von dieser Konzentration wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe die gewünschte Konzentration an Bakterien für einen Infektionsversuch eingestellt.

Eine Infektion erfolgte ca. 1 h nach Bewässern der Pflanzen, da zu diesem Zeitpunkt bei geöffneten Stomata ein leichtes Infiltrieren der Pflanzen möglich war. Die Infiltrationen von je ca. 20 μ l Bakteriensuspension oder entsprechender Kontrollen für einen Versuch wurden mit Hilfe einer 1 ml Insulinspritze ohne Spitze durch die Stomata in die Blattunterseite durchgeführt.

Die Anzahl der infizierten Blätter pro Pflanze und die Zeitpunkte der Probennahme waren vom jeweiligen Versuchsziel abhängig.

War eine Infiltration und der dadurch in einem Blatt erzeugte osmotische Stress unerwünscht, so wurden Blätter stattdessen durch Bepinseln der Unterseite mit Bakteriensuspension (nach Zugabe von 0,1% Tween 20) infiziert.

Für Versuche, in denen der Effekt von Acarbose getestet werden sollte, wurde diese in der Bakteriensuspension in der gewünschten Konzentration gelöst und mit den Bakterien koinfiltriert.

6.2.1.2 Nachweis des Bakterienwachstums

Reisolation aus Pflanzenmaterial

Die Bestimmung des Bakterienwachstums von *P. syringae* in *A. thaliana* erfolgte entsprechend dem Protokoll von Whalen *et al.* (1991). Jeweils 4 Blattscheiben in mindestens dreifacher Wiederholung wurden mit einem Korkbohrer (Durchmesser 1,4 cm) direkt nach einer Infektion, 24 h p. i. und 48 h p. i. aus den infizierten Bereichen der Blätter ausgestanzt und in 1 ml 10 mM $MgCl_2$ homogenisiert. Jeweils 100 μ l von zwei unterschiedlichen Verdünnungsstufen wurden auf LB-Agarplatten ausplattiert und die gewachsenen Bakterienkolonien nach 48 h Inkubation bei 28°C aus gezählt.

Fluoreszenz-Binokular

Zur Sichtbarmachung der Fluoreszenz transformierter *P. syringae* in Blättern von *A. thaliana* wurde ihr Wachstum nach der Infiltration unter dem Fluoreszenz-Binokular beobachtet. Dazu wurde ein Fluoreszenz-Binokular vom Lehrstuhl für Botanik I (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) zur Verfügung gestellt. Ein Infektionsverlauf konnte über mehrere Tage mit Hilfe von UV-Licht und einem speziellen GFP-3 Filter am Binokular

verfolgt werden. Bilder wurden mit der an Binokular montierten Kamera SpotInsight Color und dem Programm SpotAdvanced (Einstellungen: Exposition 5000 ms, gain 2 oder 4, γ 1,29) aufgenommen.

Fluorometer

Zur Quantifizierung des Bakterienwachstums am Fluorometer wurden jeweils 200 μ l Bakteriensuspension der Konzentrationen 1×10^5 bis 1×10^{10} cfu/ml in Doppelbestimmung vermessen (Anregung $\lambda = 485$ nm, Emissionsmessung $\lambda = 538$ nm). Als Kontrolle diente die Messung der nicht transformierten Bakterien.

6.2.1.3 Herstellung elektrokompetenter *P. syringae*

Zur Herstellung elektrokompetenter *P. syringae* wurden zunächst 500 μ l einer frischen Vorkultur in 500 ml LB-Flüssigmedium überimpft. Sobald die Bakterienkultur unter starkem Schütteln bis zu einer OD_{600} zwischen 0,5 und 0,7 gewachsen war, wurde sie für 15 min bei 3500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Zentrifugation wurde noch dreimal wiederholt und das Bakterienpellet nach jeweils sorgfältiger Abnahme des Überstandes zunächst in 500 ml, dann in 250 bzw. 125 ml und schließlich in 3 ml eiskaltem Glycerol (10 %) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension zu jeweils 200 μ l aliquotiert, die Reagiergefäße in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.2.1.4 Elektroporation

Zur Elektroporation wurden elektrokompetente Bakterien zunächst auf Eis aufgetaut. Zu 60 μ l der Bakteriensuspension wurden 1 bis 2 μ l der gewünschten Plasmid-DNA (2 bis 5 ng/ μ l) gegeben und der Ansatz luftblasenfrei in eine geeignete Küvette pipettiert. Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV im Elektroporator. Nach der Elektroporation wurde der Ansatz in ein neues Reagiergefäß gegeben, 1 ml Kings Medium B zugefügt und für 90 min bei 350 rpm und 28°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 3500 rpm und 4°C wurde 1 ml des Überstandes abgenommen, das Bakterienpellet resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Nach Inkubation für 2 bis 3 Tage bei 28°C konnten gewachsene Bakterienkolonien auf eine erfolgreiche Transformation durch Feststellung einer GFP-Fluoreszenz unter UV-Licht getestet werden.

6.2.1.5 Anzucht von und Infektion mit *Alternaria brassicicola*

Die Kultivierung von *A. brassicicola* erfolgte durch Überimpfen eines Stückes Pilzmyzel auf eine neue PDA-Platte. Nach dreiwöchigem Wachstum des Pilzes bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Platte bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

Zur Herstellung einer Sporensuspension für Infektionsversuche wurden sporulierende Pilzhyphe mit ca. 5 ml PD Broth Medium von einer PDA-Platte abgekratzt, durch eine Mullbinde filtriert und unter Zugabe einer entsprechenden Menge Wasser mit Hilfe einer Zählkammer am Mikroskop eine Sporendichte von 5×10^5 Sporen/ml eingestellt.

Die Infektion erfolgte, indem auf ein Blatt jeweils 2 Tropfen a 10 µl Sporensuspension gegeben wurden. Anschließend wurden die Pflanzen zur besseren Infektion über Nacht in angefeuchteten *In vitro* vent Boxen inkubiert. Die Anzahl der infizierten Blätter pro Pflanze und die Zeitpunkte der Probennahme waren vom jeweiligen Versuchsziel abhängig.

6.2.1.6 Kultivierung von und Infektion mit *Hyaloperonospora parasitica*

Da *H. parasitica* zur Gruppe der biotrophen Pathogene gehört, erfolgte eine Kultivierung ausschließlich auf pflanzlichem Material. Erfolgreiche Infektionen wurden an 2 bis 4 Wochen alten Pflänzchen erzielt. Die Bedingungen in den Weinschränken, unter denen die beiden Isolate NOCO und WELA kultiviert wurden, waren 9 h Licht und 15 h Dunkelheit sowie konstant zwischen 16 und 18°C. Am Ende eines Infektionszyklus (7 Tage nach einer Infektion) wurden die Sporen jedes Isolates geerntet, indem zur Beginn der Lichtperiode die gesamten Sproßteile von infizierten Pflänzchen abgeschnitten und die Sporen in eiskaltem Wasser von den Blättern gelöst wurden. Nach Filtration durch eine Mullbinde wurde die Sporensuspension mit Hilfe einer Airbrushpistole auf neue Pflänzchen gesprüht, und diese dann für einen neuen Infektionszyklus wiederum 7 Tage unter einer Haube inkubiert, welche mehrfach zur Aufrechterhaltung einer hohen Luftfeuchte mit Wasser eingesprüht wurde.

6.2.2 Arbeit mit pflanzlichem Material

6.2.2.1 Kultivation von Pflanzen

Arabidopsis thaliana

Samen homozygoter Linien wurden auf Erde, Samen heterozygoter Linien nach Sterilisation (siehe Kapitel 4.2.2.3) auf MS-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmarker ausgelegt. Die Keimlinge wurden 2 Wochen nach Aussaat in einzelne Töpfe (Durchmesser 7 cm) pikiert. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte in Pflanzenanzuchtschränken unter Kurztagbedingungen (9 Stunden Licht, 15 Stunden Dunkelheit) bei einer Temperatur von konstant 22°C.

Infektionsversuche mit den Pathogenen *P. syringae* und *A. brassicicola* (siehe Kapitel 6.2.1.1 bzw. 6.2.1.5) erfolgten an 5 bis 7 Wochen alten Pflanzen.

Die Induktion der Blütenbildung für Pflanzentransformationen oder zur Ernte von Samen erfolgte unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht, 8 Stunden Dunkelheit). Zur Samenernte wurden die Blütenstände nach der Reifung der ersten Schoten in Papiertüten gesteckt. Nach der vollständigen Abreifung der Blütenstände wurden die Samen mittels eines Siebes von anderen Pflanzenteilen gereinigt, in Reaktionsgefäße abgefüllt und vor einer erneuten Aussaat mindestens zwei Wochen bei 4 °C dunkel gelagert.

Nicotiana tabacum

Samen wurden nach Sterilisation auf MS-Agarplatten ausgelegt. Die Anzucht der Pflänzchen erfolgte in Pflanzenanzuchtschränken unter Kurztagbedingungen (9 h Licht, 15 h Dunkelheit) bei einer Temperatur von jeweils 22°C. 13 bis 15 Tage nach dem Auslegen der Samen wurden die Keimlinge für die Induktionsversuche verwendet. Diese erfolgten wie in Kapitel 6.2.2.4 beschrieben. Die weitere Inkubation bis zur Versuchsauswertung (Frischgewichtsbestimmung, Messung löslicher Zucker (siehe Kapitel 4.2.7.2) erfolgte unter den oben genannten Bedingungen.

6.2.2.2 Erzeugung transgener *A. thaliana*

A. thaliana wurden nach dem Protokoll des „Floral Dip“ von Clough und Bent (1998) transformiert. Hierzu wurden *A. tumefaciens*, welche das zu transformierende Plasmid enthielten, über Nacht in 200 ml YEB-Medium mit geeignetem Selektionsmarker bei 28°C angezogen. Nach Zentrifugation für 15 min bei 7000 rpm und 4°C wurde das Bakterienpellet in einer 5 %igen Saccharoselösung resuspendiert und eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellt. Nach Zugabe von 0,05 % Silwet L-77 wurden die Blütenstände von *A. thaliana* nach dem Entfernen bereits entwickelter Schoten für 10 s in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend in Frischhaltefolie gewickelt, um ein Austrocknen zu verhindern. Nach 24 h wurden die Folien entfernt und die Pflanzen bis zur Samenproduktion im Langtag weiterkultiviert.

Nach der Ernte der Samen erfolgte die Selektion auf transformierte Pflanzen mit Hilfe einer Antibiotika-Resistenz, die mit der gewünschten Genkassette transformiert wurde.

6.2.2.3 Sterile Aussaat von Samen

Arabidopsis thaliana

Zur Sterilisierung wurden Samen nach einer Behandlung für 90 s mit 70 % EtOH für 10 min mit Bleichlösung versetzt und die Reagiergefäße während der Behandlung mehrfach geschüttelt. Nach der Oberflächensterilisation in der Bleichlösung wurden die Samen fünfmal

mit sterilem H₂O gewaschen und dann auf MS-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum verteilt. Nach der Lagerung der Agarplatten über Nacht bei 4°C erfolgte das Auskeimen und die weitere Kultivierung unter Kurztagbedingungen. Putativ transgene Pflanzen (T1-Generation) konnten nach zwei bis drei Wochen Wachstum selektiert und auf neue MS-Agarplatten umgesetzt werden. Sieben Tage nach dem Umsetzen wurden die Pflänzchen in Erde pikiert und bis zur Samenproduktion kultiviert. Transgene Pflanzen der T2- oder T3-Generation wurden ca. zwei Wochen nach der Keimung in Erde pikiert.

Bleichlösung

6 % NaOCl, 0,01 % Tween 20

Nicotiana tabacum

Zur Sterilisation von Tabaksamen wurden diese nach einer Behandlung für 90 s mit 70 % EtOH für 10 min mit Bleichlösung versetzt und die Reagiergefäße während der Inkubation mehrfach geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen der Samen in sterilem H₂O wurden diese auf MS-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum gleichmäßig verteilt. Das Auskeimen und Wachstum der Keimlinge erfolgte im Kurztag bei 22°C.

Bleichlösung

1,5 % NaOCl, 0,01 % Tween 20

6.2.2.4 Induktion der Promotorsysteme der transgenen Pflanzenlinien

Transgene Pflanzenlinien, welche entweder den Estradiol-induzierbaren oder den Dexamethason-induzierbaren Promotor enthielten, wurden 24 h vor einer Pathogeninfektion mit einer Lösung aus 50 µM β-Estradiol bzw. 50 µM Dexamethason und 0,01 % Tween 20 induziert. Die Induktion erfolgte ca. 30 min nach Bewässerung der Pflanzen durch Besprühen der Blattunterseite ausgewählter Blätter.

Die Induktion der transgenen Tabakpflanzen mit dem Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystem erfolgte durch Betropfen der Keimlinge mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette. Tropfen einer 100 mg/l Chlorotetracyclin-Lösung wurden dazu direkt auf den Keimblättern platziert. Um die gewünschten Effekte zu erzielen, wurde die Behandlung zwei- bis dreimal innerhalb einer Woche durchgeführt.

6.2.3 Molekularbiologische Methoden

6.2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Eine Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierung von Gensequenzen und zum Nachweis transgener Pflanzen (siehe Kapitel 6.2.2.2) erfolgte mittels PCR. Als Matrize dienten Plasmid-DNA (siehe Kapitel 6.2.4.9), genomische DNA aus Pflanzen (siehe Kapitel 6.2.5.1) oder cDNA (siehe Kapitel 6.2.5.7). Benötigte Primer wurden mit der Software Vector

NTI generiert, als Polymerase wurde die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* eingesetzt.

Reaktionsansatz

Matrize	1 – 100 ng
Primer-for (100 pmol/μl)	1 μl
Primer-rev (100 pmol/μl)	1 μl
dNTP-Mix (10 mM)	1 μl
Taq (0,5 U/μl)	1 μl
10x PCR Puffer	2,5 μl
H ₂ O	ad 25 μl

Bei Verwendung von genomischer DNA als Matrize wurde die Konzentration an MgCl₂ von 1,5 mM (gewährleistet durch den PCR Puffer) auf 2 mM erhöht.

PCR-Programm

Anfangsdenaturierung	3 min	95 °C	} 35x
Denaturierung	45 s	94 °C	
Annealing	45 s	40 – 60 °C	
Elongation	30 s – 2 min	72 °C	
Finale Extension	8 min	72 °C	

Verwendete Primer für die Erstellung des Macroarrays

Name	Primersequenz (5' → 3')	Kennnummer	Annealing-Temperatur
SAM1-for SAM1-rev	GAC TTT TCT ATT CAC ATC TG GTT TCA TCG TGT TGG GTG	At1g02500	42°C
ERF14-for ERF14-rev	GAT CAA GGA GGT CGT AG TTA TTG CCT CTT GCC CAT	At1g04370	43°C
HMG1/2-for HMG1/2-rev	CTT ATC AAA CTC CGC AAC CAG TCG GAT TAG GGT TTA G	At1g04480	44°C
psbP-for psbP-rev	TCA CAC ACA AGG AGA GAA GAG A CAG ACA AGT AAT AGT AGG GTT TCC	At1g06680	52°C
H4-for H4-rev	GTG TAT CAA GTA AAG AGA TG CTC ATT AGA TTT TCT TAG CAC	At1g07660	40°C
Ef1a-for Ef1a-rev	GAA ATC ATC AAG GAG GTG TC GCA ATG TGA GAG GTG TGG	At1g07940	45°C
At1g12240-for At1g12240-rev	GCC TAC CCT GAA GAC CCC AAC CAT CAG AAG CCT CAC TAT CAG ACT CAC	At1g12240	51°C
GAPDH-for GAPDH-rev	GAT CAT AAA GGG TAC AAT G CAC TTC CAG TTA TTG GC	At1g12900	40°C
CLH1-for CLH1-rev	GGA GGG CAA GTG GAA GTG CTC CGC TTT TTC ACC CCA C	At1g19670	51°C
CAD-1-for CAD-1-rev	GTA ACT GTT GGG CGT AAG GCA ACG AAT ACT TCA CAC	At1g29690	42°C

Cab-2-for Cab-2-rev	GGA AAG GCT GTG AAC CT GGT CGG TAG CCA AAC	At1g29920	48°C
GSSII-for GSSII-rev	CTG ACC ATT CTT CTC CTC TGC GAA GTA GAG CAG TGT GCC AGT CA	At1g32900	48°C
nlnv2-for nlnv2-rev	GCT TGA TAC GCC TCT TTC CAT CCA TCA GCA CAA AGC AG	At1g35580	45°C
NPQ4-for NPQ4-rev	GCT CAA ACC ATG CTG CTT AC CTT TGA GAC CGA GGG CAG	At1g44575	50°C
4CL1-for 4CL1-rev	GGT GAT GGA GAA ACA GAG C GAT GAC TTC TGA TGC CTC G	At1g51680	53°C
At1g55120-for At1g55120-rev	GTC AAC TGG ATT TCA CAA CC GAG ACG ATT CAT TAA CCC AAC	At1g55120	52°C
At1g62660-for At1g62660-rev	CTA TCC TGA AGA CCC AAG CG GCT TCA CTG TCA GAT TCA CCG	At1g62660	51°C
At1g62770-for At1g62770-rev	GTT TAT TGT GTC TTC ATG CC CAC ACT TCG CTT CTC TGC	At1g62770	58°C
4CL3-for 4CL3-rev	CAT TGA CAT CCC TAA CCA C CTC CAT CTA CTT GTT GTG C	At1g65060	53°C
SUS-1g73370-for SUS-1g73370-rev	CTT GCG GAT AGA GAG AAA CC GAT GCG TTT GAG ACC ACC C	At1g73370	50°C
GPP-for GPP-rev	GAT TCT TCT TAC TCC TTT GCC GTA TGT TCT CAA TGT TCC TGT TC	At2g21590	49°C
CesA10-for CesA10-rev	GCT TGT GTT TCA TGC TGC CAG TGG TGG AAA CAA AGG	At2g25540	53°C
LHB1B2-for LHB1B2-rev	GCT TTG TCC TCC CCT GCC CCT TCA CCT TCA ACT CTG CG	At2g34420	52°C
YLS-9-for YLS-9-rev	GGC TGC TGA ACA ACC TCT C GTG GAG GTA GTT GTA GTT C	At2g35980	43°C
At2g36190-for At2g36190-rev	CTA CCA TCT CTT CTA CCA ATA TAA C GAA TCT TAA ACC CTC CCA AC	At2g36190	47°C
BAG-6-for BAG-6-rev	GTC AAA TGA GAC CAC AGG CTG TCT TGAT TCT GTA CC	At2g46240	40°C
HEL-for HEL-rev	CAA CAA TGC GGT CGT CAA G GGT AGT CAA CAA TGA GAT GG	At3g04720	45°C
nlnv6-for nlnv6-rev	CTG TAT CTG TGT CTC TGC G CCC CTG GAT CAT TAG CCG	At3g06500	46°C
At3g13784-for At3g13784-rev	TCA CGA TTC TCC CTA ATG GC CCT TCT TGA TGT TAT CTT TCT CCG	At3g13784	53°C
At3g17130-for At3g17130-for	CAT CCA CCG TCA CAT CAT TAC ACA GAA ATC GCC ACG TCA C	At3g17130	51°C
ACT2/8-F ACT2/8-R	GGT GAT GGT GTG TCT ACT GAG CAC AAT GTT AC	At3g18780/ At1g49240	48°C
STP4-for STP4-rev-2	GGT GGT CTC ATC TTC GGA TAC G GAT GAG AGA GTT GGG AGT GTC G	At3g19930	60°C
SUS-4g02280-for SUS-4g02280-rev	GTT GCG TTA GCC GTT AGA CC GTA TCT CCC CAT CCT TTC TC	At4g02280	58°C
petC-for petC-rev	CCC ACT TGT CAT CCT CCT C CAC ACT GCG TTG ATA CCG	At4g03280	51°C
TUFA-for TUFA-rev	GTA TCA CAA TCA ACA CTG C CAC GCC CTG TAG CCA CC	At4g20360	48°C
CesA1-for CesA1-rev	GGT TCA TTC TAC TCT TCA TC GAC ACC TCC TTT GCC ATT G	At4g32410	54°C
CBP20-for CBP20-rev	GCA AGC AAA GCT ATC AGC GCA AGC AAA GCT ATC AGC	At5g44200	44°C

CesA3-for CesA3-rev	GGT TTC TGT CTC TCT TTC CAG TTG ATT CCA CAT TCC	At5g05170	53°C
CesA5-for CesA5-rev	GAT GGA TGA GGG AAG GCA G CTT CAT GGC TCG GCG TTC	At5g09870	45°C
SPS2-for SPS2-rev	AAC ACC AAA GGA AGA ATG TCT CG TGC CCG TGA ATA GAA ACT GG	At5g11110	53°C
cwINV6-for cwINV6-rev	CAA CAA CAA ACA GCA AGT CAC CAT CTT CTT TGC TAT CAG TCT C	At5g11920	46°C
SPS1-for SPS1-rev	AAT CCC AAA ATT CCA CTT CTA ACC TTG GTT TGG TGC TTT CA	At5g20280	50°C
UBQ4-for UBQ4-rev	CAA TGT TAA GGC AAA GAT CC GTT GAC TCT TTT TGG ATG TTG	At5g20620	47°C
SUS-5g20830-for SUS-5g20830-rev	CTC AAG GAC AAG AAG AAG CCG CTC CTC AAT CCT CTG AAG CC	At5g20830	54°C
SUS-5g37180-for SUS-5g37180-rev	CGG TTA TTT AGT GGA CAA G CGT TTA TGC GTT GTA GCC	At5g37180	54°C
BI-for BI-rev	GTT TAT TTG ACC TTA TG CGA TTA CAA CTT CCA AG	At5g47120	39°C
STP3-for STP3-rev	TCA CTT TAG GAT CAC TGT TCC TC CTC CAA CGG AAA AAT CTC ACT C	At5g61520	49°C
D1(PSAB)-for D1(PSAB)-rev	GAA CTT TGG AAT CGG ACA C GAT GAA CCA AGA AAT CTC C	AtCg00340	45°C
RBCL-for RBCL-rev	CAC CAC AAA CAG AGA CTA AAG C CGT AGA CAT TCA TAA ACT GCT C	AtCg00490	53°C
petB-for petB-rev	GAG ATT CAG GCG ATT GC GGG ACC AGA AAT ACC TTG	AtCg00720	43°C

In pST-Blue1 wurden die Genfragmente von At1g12240, At2g36190 und At1g55120 kloniert. Für die Klonierungen aller weiteren Genfragmente wurde pGEM-Teasy verwendet.

Primer für die Klonierung DEX::*NtCIF*

Name	Primersequenz (5' -> 3')	Annealing-Temperatur
Ntcwinh-F	CTC CTC GAG GTC GAC ATG AAG AAT TTG ATT TTC	50°C
Ntcwinh-F2	GCC TCT AGA ATG AAG AAT TTG ATT TTC	50°C
Ntcwinh-R	GTT GGA TCC GAG CTC TCA CAA TAA ATT TCT GAC	50°C

Sequenzierprimer

Name	Primersequenz (5' -> 3')
SP6	ATT TAG GTG ACA CTA TAG AAT AC
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

6.2.4 Methoden für die Arbeit mit Bakterien

6.2.4.1 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen

Die verwendeten Typ-2-Restriktionsendonukleasen hydrolysieren DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen. Spalten diese die DNA symmetrisch, entstehen „glatte“ Enden, werden DNA-Sequenzen asymmetrisch gespalten, entstehen überhängende Enden.

Reaktionsansatz

DNA	0,5 – 15 µg
Enzym (10 U/µl)	1 – 2 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 – 3 µl
H ₂ O	ad 25 – 30 µl

Die Inkubationszeit der einzelnen Reaktionsansätze betrug zwei Stunden bis über Nacht im Temperaturoptimum der jeweils verwendeten Enzyme.

6.2.4.2 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um Religationen linearisierter Vektor-DNA ohne Einbau von DNA-Fragmenten in Ligations-Reaktionen auszuschließen, wurden 5'-endständige Phosphatreste mit Hilfe der Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase (CIAP) entfernt. Dazu wurden 15 µl eines Restriktionsansatzes mit je 2 µl CIAP und zugehörigem Puffer zunächst 30 min bei 37°C und anschließend 15 min bei 65°C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 1 µl CIAP und Inkubation für 15 min bei 37°C wurden die behandelten DNA-Fragmente über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 6.2.4.3) und die gewünschten Fragmente aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 6.2.4.4).

6.2.4.3 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente aus Restriktionen oder PCR-Reaktionen wurden mittels Agarosegelelektrophorese im elektrischen Feld bei 90 bis 120 V aufgetrennt.

Je nach Fragmentgröße der DNA wurden Agarosegele mit 0,8 – 1,5 % (w/v) Agarose in 1x TBE hergestellt, indem 0,8 bis 1,5 g Agarose durch Erhitzen in 100 ml TBE-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen mit 7,5 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt wurden. Nach dem Gießen und Erkalten des Agarosegels in einem Gelträger konnte es in einer Laufkammer mit 1x TBE mit den gewünschten Proben beladen werden, die zuvor mit 1/10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer versetzt wurden. Neben den Proben wurde stets ein DNA-Größenstandard aufgetragen, anhand dessen sowohl Größe als auch Menge der aufgetrennten DNA-Fragmente abgeschätzt werden konnte. Hierzu diente mit *HindIII* und *EcoRI* verdaute λ-DNA. Die Banden wurden unter dem UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

DNA-Ladepuffer

60% Glycerin, 20 mM EDTA, 0,3% Xylencyanol, 0,3% Bromphenolblau

TBE (5x)

0,445 M Tris, 0,445 M H₃BO₃, 0,1 M EDTA (pH 8,3)

6.2.4.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Klonierung von DNA-Sequenzen bzw. zur Herstellung von DNA-Sonden für Northern Blot Analysen wurden benötigte DNA-Fragmente entsprechender Größe mit einem Skalpell unter UV-Licht aus den Agarosegelen ausgeschnitten und entsprechend der Anleitung mit Hilfe des Kits NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) in einem Endvolumen von 15 – 25 µl eluiert.

6.2.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase konnten freie 3'-OH-Enden mit 5'-Phosphatenden restringierter DNA-Fragmente kovalent verbunden werden.

Für eine Ligation wurden 25 ng Vektor-DNA mit dem gewünschten DNA-Fragment, welches im molaren Verhältnis von 3:1 zur Vektor-DNA zugegeben wurde, 1 U T4-DNA-Ligase und 1 µl T4-DNA-Ligase Puffer in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert.

Mit diesem Ligationsansatz wurden im Anschluss kompetente *E. coli* transformiert.

6.2.4.6 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

Kompetente Zellen wurden benötigt, um Klonierungs- und Expressionsplasmide in Bakterien transformieren und dauerhaft exprimieren zu können.

E. coli

Für Klonierungen wurden chemisch kompetente *E. coli* vom Typ DH5α verwendet. Die Bakterien wurden dazu in 3 ml LB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. 500 µl dieser Kultur wurden in 50 ml LB-Flüssigmedium überimpft und das weitere Wachstum kontrolliert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 wurde die Kultur 10 min bei 2500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml kaltem 100 mM Calciumchlorid resuspendiert und 40 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 2500 rpm und 4°C wurde das Pellet in 5 ml kaltem 100 mM Calciumchlorid resuspendiert und für 2 bis 3 Stunden auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml Glycerin wurde der Ansatz in Aliquots zu je 200 µl schockgefroren und bei -80°C gelagert.

A. tumefaciens

Kompetente *A. tumefaciens* wurden für die Transformation mit binären Plasmiden und die anschließende Pflanzentransformation benötigt. Zur Herstellung kompetenter *A. tumefaciens* vom Typ LBA4404 wurden diese in 3 ml YEB-Flüssigmedium angeimpft und über Nacht bei 28°C im Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Kultur wurde in 100 ml YEB-Flüssigmedium überimpft und weitere 4 h bei 28°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 20 min bei 5000 rpm und 4°C wurde das Pellet in 5 ml kaltem TE resuspendiert, 10 min unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und das Pellet in 7 ml YEB-Flüssigmedium resuspendiert. Nach Zugabe von 1,4 ml Glycerin wurden Aliquots zu je 200 µl schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

6.2.4.7 Transformation von Bakterien mittels Hitzeschock*E. coli*

Für die Transformation kompetenter *E. coli* wurden diese nach dem Auftauen auf Eis mit 1 ng/µl Kontrollplasmid oder 10 µl eines Ligationsansatzes versetzt und anschließend zunächst 20 min auf Eis, dann 90 s bei 42°C und wieder 90 s auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 800 µl LB-Flüssigmedium wurde der Ansatz 1 h bei 400 rpm und 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 2 min bei 6000 rpm wurden 850 µl des Überstandes verworfen, das Pellet resuspendiert, 30 µl bzw. 120 µl der Suspension auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

A. tumefaciens

Kompetente *A. tumefaciens* wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 bis 2 µg Plasmid-DNA vermischt und im Wechsel je 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Flüssigmedium wurde der Ansatz für 3 bis 4 h bei 300 rpm und 28°C geschüttelt. Nach Zentrifugation für 2 min bei 6000 rpm wurden 900 µl des Überstandes verworfen, das Pellet resuspendiert, die Suspension auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert und 2 bis 3 d bei 28°C inkubiert.

Der Nachweis einer erfolgreichen Transformation von *E. coli* erfolgte über eine Plasmid-Minipräparation (siehe Kapitel 6.2.4.9) mit anschließender Restriktion (siehe Kapitel 6.2.4.1), der Nachweis einer erfolgreichen Transformation von *A. tumefaciens* über einen „Colony Screen“ (siehe Kapitel 6.2.4.8).

6.2.4.8 Identifizierung transformierter *A. tumefaciens* mittels „Colony screen“

Einzelkolonien einer Transformation wurden in 3 ml YEB-Flüssigmedium über Nacht im Schüttler bei 28 °C angezogen. Je 500 µl der Bakteriensuspensionen wurden in

Reaktionsgefäßen 5 min bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterien-Pellets mit 500 µl H₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurden die Bakterien in 500 µl H₂O resuspendiert und 10 min bei 95 °C aufgeschlossen. Nach Inkubation für 5 min auf Eis wurden die lysierten Bakterien 15 min bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert und die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. In eine PCR konnten entweder der bakterielle Gesamtextrakt nach der Lyse oder die Überstände nach der Zentrifugation eingesetzt werden.

Reaktionsansatz

Bakterienlysat	7,5 – 15 µl
Primer-for (100 pmol/µl)	1 µl
Primer-rev (100 pmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl
Taq (0,5 U/µl)	1 µl
10x Puffer	2,5 µl
H ₂ O	ad 25 µl

Der Nachweis, dass es sich bei den Kolonien der Transformation um Agrobakterien handelt, konnte mit einer spezifischen Farbreaktion geführt werden. Dazu wurden die in der PCR positiv getesteten Kolonien auf eine Testplatte für Agrobakterien ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Nach Überschichtung der Platte mit Benedicts-Reagenz und Inkubation für 30 bis 60 min bei RT konnte bei den Agrobakterienkolonien die Bildung einer orange-roten Färbung beobachtet werden. Agrobakterien können aus der Lactose in den Testplatten Ketolactose herstellen, welche mit den Kupferionen des Benedicts-Reagenz reagiert und die charakteristische orange-rote Färbung des CuO entstehen lässt. Handelt es sich nicht um Agrobakterien, tritt kein Farbumschlag auf.

Benedicts-Reagenz

173 g Na-Citrat und 100 g Na₂CO₃ in 700 ml H₂O lösen,
17,2 g CuSO₄ in 200 ml H₂O lösen, Vereinigen der Lösungen, ad 1 l

6.2.4.9 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Plasmid-Minipräparation

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurde die Methode der alkalischen Lyse angewandt. Hierbei wurden zunächst 1,5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung 2 wurde vorsichtig gemischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 150 µl Lösung 3 zugegeben. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis mit anschließender Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß

überführt und die darin enthaltene DNA mit 600 µl Isopropanol in einem weiteren Zentrifugationsschritt (15 min, 13000 rpm, 4 °C) pelletiert. Nach dem Waschen des Pellets mit 70 % EtOH wurde dieses getrocknet und in 20 µl H₂O und 0,5 µl RNase A (2 mg/ml) gelöst.

Lösung 1

50mM Glukose, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0)

Lösung 2

0,2 N NaOH, 1 % SDS

Lösung 3

5 M KAc (pH 4,8)

Plasmid-Midipräparation

Zur Gewinnung größerer Mengen qualitativ hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der Kit NucleoBond PC100 AX (Macherey-Nagel) entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet.

6.2.4.10 Konservierung von Bakterien

Vorübergehende Aufbewahrung von Bakterien auf Agarplatten erfolgte bei 4°C, zur längerfristigen Konservierung der Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 150 µl einer Bakterienkultur mit 650µl sterilem Glycerin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

6.2.4.11 Quantifizierung von DNA und RNA

Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren erfolgte durch photometrische Messungen bei 260 nm. Die Absorption von 1 entsprach einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA.

Die Quantifizierung isolierter Plasmid-DNA, genomischer DNA oder Gesamt-RNA wurde in einer 1:100 Verdünnung an einem entsprechenden Spektrophotometer durchgeführt.

6.2.4.12 Sequenzierung von DNA

Sequenzierungen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) am Lehrstuhl für Botanik I (Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) mit einem Li-COR DNA-Sequencer 4200 (LI-COR Biosciences, Bad Homburg) durchgeführt.

6.2.5 Molekularbiologische Methoden an Pflanzenmaterial

6.2.5.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von DNA wurden 100 mg Pflanzenmaterial im gefrorenen Zustand gemörsert, 400 µl Edwards-Puffer zugegeben, geschüttelt und die Probe 30 bis 60 min bei 65°C inkubiert. Nach Extraktion der Probe mit 400 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 12000 rpm. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chloroform erneut extrahiert, unter gleichen Bedingungen zentrifugiert und die obere Phase wiederum in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 800 µl 2-Propanol und 150 µl 5 M NaCl wurde die DNA ausgefällt, das nach Zentrifugation (10 min, 13000 rpm, 4°C) entstandene Pellet mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl H₂O und 0,5 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert.

Edwards-Puffer

200 mM Tris (pH 8,0), 25 mM EDTA (pH 8,0), 250 mM NaCl, 0,5 % SDS, 1 % β-Mercaptoethanol

6.2.5.2 Präparation von Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial

Zur Isolierung von RNA wurden 100 mg Pflanzenmaterial im gefrorenen Zustand homogenisiert, mit 1 ml TriFast® versetzt, geschüttelt und kurz auf Eis gelagert. Nach Inkubation der Proben für 5 min bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Proben 15 s geschüttelt und anschließend für 10 min bei 12000 rpm und 16°C zentrifugiert. Die Ausfällung der RNA durch 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte nach dem Überführen der wässrigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, welches 600 µl 2-Propanol enthält. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C wurden Polysaccharide aus dem RNA-Pellet entfernt, indem dieses für 10 min bei 12000 rpm in 700 µl LiCl geschüttelt wurde. Nach erneuter Pelletierung für 10 min bei 13000 rpm und Raumtemperatur wurde die RNA in 500 µl 85 %igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert, getrocknet und in 20 µl H₂O_{DEPC} aufgenommen. Das Lösen der RNA erfolgte durch Inkubationen von 30 min auf Eis und 15 min bei 65°C.

H₂O_{DEPC}

0,1 % DEPC, über Nacht Raumtemperatur, autoklavieren

6.2.5.3 RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in denaturierenden Agarosegelen. Für ein 1,2 %iges Gel wurden 1,2 g Agarose in 62,2 ml H₂O durch Erhitzen gelöst und nach Zugabe von 20 ml 5x RNA-Laufpuffer und 17,8 ml Formaldehyd (37 %) in einen Gelträger gegossen. Anschließend wurden jeweils ca. 10 µg RNA mit 10 µl RNA-Ladepuffer versetzt,

10 min auf 65 °C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis auf das Gel geladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in 1x RNA-Laufpuffer für 1,5 bis 2 h bei 80 V. Zur Kontrolle der Beladung des Gels wurde dieses unter UV-Licht fotografiert.

RNA-Ladepuffer

76 µl 5x RNA-Laufpuffer, 126 µl Formaldehyd, 378 µl Formamid,
76 µl 10x DNA-Ladepuffer, 5 µl Ethidiumbromid (5mg/ml)

RNA-Laufpuffer (5x)

200 mM MOPS, 50 mM NaAc, 5 mM EDTA, 0,1 % DEPC (pH 7,0)

6.2.5.4 RNA-Transfer (Northern Blot)

Der Transfer der RNA auf Nitrocellulosemembran erfolgte über Nacht mittels Kapillarblot. Ein in 20x SSC getränkter Schwamm wurde zunächst mit einer Lage Whatman-Papier, dann dem RNA-Gel, der Membran, weiteren vier Lagen Whatman-Papier und schließlich mehreren Lagen Zellstoff belegt und mit einem Gewicht von 1kg beschwert. Nach Abbau der Anordnung wurde der Transfer der RNA auf die Membran unter UV-Licht kontrolliert und die RNA durch zweistündiges Backen bei 80°C auf der Membran fixiert.

SSC (20x)

3 M NaCl, 300 mM Na-Citrat (pH 7,0)

6.2.5.5 Markierung von DNA-Fragmenten mit ³²P

Die radioaktive Markierung der DNA-Sonden erfolgte nach Anleitung des Hexalabel™ DNA Labelling Kit (MBI-Fermentas). Es wurden 80 – 150 ng der gewünschten Sonden-DNA für eine Reaktion eingesetzt.

Zur Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde der Ansatz 2 min bei 720 x g und RT über MicroSpin™ S-200 HR Säulen (Amersham) zentrifugiert. Unmittelbar vor der Hybridisierung wurden die Sonden 10 min bei 95°C denaturiert und danach sofort für mindestens 3 min auf Eis abgekühlt.

6.2.5.6 Hybridisierung und Auswertung

Ausgewählte Membranen wurden bei 42°C für mindestens 60 min in 50 ml Prähybridisierungslösung im Wasserbadschüttler (300 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die denaturierte, radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Wasserbadschüttler bei 42°C.

Das Entfernen überschüssiger, unspezifisch gebundener Sonden-DNA von den Membranen erfolgte durch zweimaliges Waschen für jeweils 10 min in Waschlösung I, gefolgt von zweimaligem Waschen der Membranen für jeweils 10 min in Waschlösung II, jeweils bei 42°C im Wasserbadschüttler. Nach Einwickeln der Membranen in Frischhaltefolie wurde ein

Screen des Phosphorimagersystems aufgelegt. Die Dauer der Exposition richtete sich dabei nach der Stärke der Sonde. Die Signalauswertung erfolgte nach 3 h bis 5 d durch den BAS-Reader des Phosphorimagersystems.

Denhardts (50x)

1 % Polyvinylpyrrolidon K 30, 1 % BSA, 1 % Ficoll 400

Hybridisierungslösung

50 % Formamid, 5x SSC, 5x Denhardts, 0,1 % SDS, 5 mM EDTA, 100 µg/ml DNA aus Lachssperma

Waschlösung I

2x SSC, 0,1 % SDS

Waschlösung II

0,2x SSC, 0,1 % SDS

6.2.5.7 Herstellung von cDNA aus isolierter RNA

Um kodierende DNA-Sequenzen zu vervielfältigen, wurde zunächst Gesamt-RNA aus Pflanzen (siehe Kapitel 6.2.5.2) isoliert. Diese wurde dann nach Angaben des Herstellers mit dem "RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit" (Fermentas) in cDNA umgeschrieben.

6.2.5.8 Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in *N. tabacum*

Zur Bestimmung des Chlorophyllgehaltes mit Hilfe der sogenannten Aceton-Methode nach Porra *et al.* (1989) wurden jeweils 250 mg Keimlinge von *N. tabacum* in einer Probe vereint, mit 1 ml 80 % Aceton versetzt und mit einem Pistill zerkleinert. Der Ansatz wurde im Anschluss über Nacht im Dunkeln inkubiert und dabei mehrfach durchmischt. Nach dem Abzentrifugieren der Probe wurde der Überstand für die Bestimmung von Chlorophyll a sowie Chlorophyll b bei 645 nm (A^{645}) bzw. 663 nm (A^{663}) photometrisch vermessen. Die Berechnung der Chlorophyllgehalte a und b erfolgte nach den Formeln:

$$\text{Chlorophyll a [mg/ml]} = A^{663} \times 0,0127 - A^{645} \times 0,00269$$

$$\text{Chlorophyll b [mg/ml]} = A^{645} \times 0,0229 - A^{663} \times 0,00468$$

6.2.6 Proteinbiochemische Methoden

6.2.6.1 Invertaseaktivitäts-Test

In planta

Zur Bestimmung der Invertaseaktivität in Blattmaterial von *Arabidopsis* wurden 0,5 g Pflanzenmaterial in gefrorenem Zustand homogenisiert, 1 ml Homogenisationspuffer zugegeben und 20 min bei 1000 rpm und 4°C geschüttelt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 10000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und getrennt aufbewahrt. Dieser diente der Herstellung der löslichen Enzymfraktion (R-Extrakt). Das Pellet wurde dreimal mit

destilliertem H₂O gewaschen und in 1 ml Hochsalzpuffer resuspendiert (Z-Extrakt). Beide Enzymfraktionen wurden daraufhin für zwei bis zehn Stunden gegen 12,5 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) bei 4°C dialysiert.

Die Aktivität der vakuolären sowie Zellwand gebundenen Invertasen wurde mit Hilfe des Glucoseoxidase-Tests (GOD-Test) bei einem pH von 4,5 gemessen. In Abwandlung der Methode von Sung *et al.* (1989) erfolgte dieser durch 30 min leichtes Schütteln (350 rpm) der Proben bei 26°C und einer Saccharose-Konzentration von 1 mM. Die Bestimmung der in der Spaltungsreaktion freigesetzten Menge an Glucose erfolgte nach Zugabe eines fünffachen Überschusses an GOD-Reagenz (Gesamtvolumen 250 µl) in Mikrotiterplatten im ELISA-Platereader bei 595 nm gegen einen Kontrollwert. Die absolute Glucosekonzentration wurde mit Hilfe einer Glucosereferenzgerade von 0 – 10 µg Glucose ermittelt.

Hochsalzpuffer

200 mM Hepes, 3 mM MgCl₂, 15 mM EDTA, 2% Glycerol, 0,1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 1 M NaCl

Homogenisationspuffer

200 mM Hepes, 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 2% Glycerol, 0,1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin

GOD-Reagenz

0,1 M KPO₄-Puffer (pH 7,0), 0,8 U/ml Meerrettich Peroxidase, 10 U/ml Glucoseoxidase aus *Aspergillus niger*, 0,8 mg/ml ABTS

In vitro

Die Bestimmung der Inhibition der Invertaseaktivität durch die Invertaseinhibitoren Fru-S-Me und Acarbose wurde mit Hilfe eines *in vitro* Tests durchgeführt. Dazu wurden in verschiedenen Konzentrationen sowohl die β-Thiofructanoside (10 und 20 mM) als auch Acarbose (0, 5, 10, 15, 20 bzw. 100 mM) zu einem Reaktionspuffer, bestehend aus 0,5 M KPO₄ (pH 4,5) und 1 mM Saccharose, zugegeben. Nach Zusatz von 30 µl eines Z-Extraktes erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 26°C. Die Bestimmung der Menge freigesetzter Glucose wurde wie für den Invertaseaktivitätstest *in planta* (siehe oben) durchgeführt.

6.2.6.2 Bestimmung der Aktivität endogener Invertaseinhibitoren

Um die Regulation der Invertaseaktivität durch proteinogene endogene Inhibitoren in *A. thaliana* zu bestimmen, wurden zunächst Z-Extrakte wie für den Invertaseaktivitätstest beschrieben (siehe Kapitel 6.2.6.1) hergestellt.

Nach der Dialyse über Nacht wurden Invertasen und Invertaseinhibitoren mittels Größenausschluss durch Ultrafiltration getrennt, indem die Proteinextrakte in einem Centrikon® YM-30 (Millipore, Billerica, USA) 40 bis 45 min (abhängig von der jeweiligen Probe) bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert wurden. Die Ausschlussgröße lag bei 30 kD, so dass die Invertasen in der höhermolekularen Fraktion, die Invertaseinhibitoren in der

niedermolekularen Fraktion vorlagen. Die Invertaseaktivität der höhermolekularen Fraktion (C_h), der niedermolekularen Fraktion (C_l) sowie einer Mischung aus beiden Fraktionen ($C_h + C_l$, 10facher Überschuss der niedermolekularen Fraktion) wurden wie oben beschrieben (siehe Kapitel 6.2.6.1) bestimmt.

6.2.7 Analytische Methoden

6.2.7.1 Bestimmung der Salicylsäuregehalte

Salicylsäuremessungen wurden von Jürgen Zeier (Lehrstuhl für Botanik II, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) durchgeführt und erfolgten nach dem Protokoll von Zeier *et al.* (2004).

Dazu wurden 250 mg gefrorenes Blattmaterial in gefrorenem Zustand homogenisiert, 1 ml 90 % Methanol zugegeben und für 10 min bei 40°C extrahiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 12000 rpm wurde das Pellet erneut für 10 min bei 40°C in 100 % Methanol extrahiert. Die Überstände beider Extraktionen wurden vereinigt und unter einem schwachen N_2 -Strom bei 40°C getrocknet. Der Rückstand wurde in 1,5 ml 0,1 M HCl resuspendiert. Als interner Standard wurden 100 ng p-Hydroxybenzoesäure (HB) zugegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 12000 rpm wurde der wässrige Überstand dreimal mit 2 ml Cyclopentan/Ethylacetat (1:1) extrahiert. Die Extrakte wurden vereinigt und unter N_2 -Strom bei 40°C getrocknet. Der Rückstand wurde in 200 μ l Chloroform gelöst und durch Zugabe von 20 μ l Pyridin und BSTFA (N,N-Bis-trimethylsilyltrifluoroacetamid, Macherey-Nagel, Düren) für die Gaschromatographie derivatisiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte im Gaschromatographen (GC 8000 Top series, CE Instruments, Mailand, Italien), ausgestattet mit einer Kieselglas-Kapillarsäule mit einem inneren Durchmesser von 0,32 mm und einer Schichtdicke von 0,1 mm (DB-1, Fisons, Folsom, USA). Verbunden mit einem MD1000 Massenspektrometer-Detektor (CE Instruments) erfolgte die quantitative Bestimmung von Salicylsäure nach Elektronenstoß-Ionisation (70 eV) unter Berücksichtigung des Verhältnisses von Masse zu Ladung (m/z 267), des internen Standards und des experimentell bestimmten Korrekturfaktors.

6.2.7.2 Bestimmung der Gehalte löslicher Zucker

Für die Bestimmungen von Glucose, Fructose und Saccharose in Pflanzenmaterial wurden zunächst 100 mg Material in gefrorenem Zustand homogenisiert und 900 μ l H_2O zugegeben. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm und 4°C wurde der Überstand abgenommen und 10 min bei 100°C gekocht. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde ein geeignetes Aliquot (700 μ l) einer 1:10-Verdünnung mit 70 mg Serdolit MB-1 Harz

(Serva) versetzt, welches Aminosäuren bindet, die die Messung der Zucker stören können, sofern sie gleiche Retentionszeiten besitzen.

Die Messungen wurden von Eva Wirth (Lehrstuhl für Botanik I, Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften, Würzburg) durchgeführt. Proben wurden in Dreifachbestimmung über isokratische Ionenchromatographie am Dionex 4500i Chromatographie-System (Idstein) mit gepulster amperometrischer Detektion (PAD) gemessen.

Als Standard wurde eine Mischung aus 0,05 mM Mannitol, Arabinose, Glucose, Fructose und Saccharose nach Vorbehandlung analog zu den Proben mit Serdolit MB-1 Harz eingesetzt und nach jeder fünften Probe in den Autosampler des Systems eingefügt.

6.2.8 Histologische Methoden

6.2.8.1 Nachweis der β -Glucuronidaseaktivität mittels X-Gluc

In Reporterlinien, die das für die β -Glucuronidase kodierende Gen *uidA* transformiert wurden, konnte eine Farbreaktion zur Analyse der Aktivität und Spezifität der verwendeten Promotoren genutzt werden. Die Stärke der entstehenden Färbung, welche auf der Spaltung und anschließenden Oxidation des zugegebenen Substrates X-Gluc durch die β -Glucuronidase beruht, lässt dabei Rückschlüsse auf die Promotoraktivität in einzelnen Geweben zu. Bei dem Reaktionsprodukt handelt es sich um unlösliches Indigo.

Zunächst wurden zur Aktivierung der Promotoren die gewünschten Pflanzengewebe mit entsprechenden Stimuli behandelt. Anschließend wurde das gewünschte Pflanzengewebe über Nacht bei 37°C im Dunkeln in Färbelösung inkubiert. Um vorhandenes Chlorophyll zu entfernen und die Proben zu konservieren, wurde die Färbelösung durch 70 %iges EtOH ersetzt und dieses mehrfach bis zur vollständigen Entfärbung gewechselt. Zur Dokumentation der Färbung wurden die Blätter fotografiert.

Natriumphosphatpuffer (NaP_i)
50 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄ (pH 7,0)

Färbelösung
5 mg X-Gluc lösen in 50 μ l DMF, Zugabe von 10 ml 50 mM NaP_i (pH 7,0)

6.2.8.2 Invertase *in situ* Färbung

Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das von Doehlert und Felker (1987) beschriebene Protokoll. Basierend auf einer Reihe von gekoppelten Redox-Reaktionen wird dabei ein unlösliches blaues Formazan-Präzipitat freigesetzt.

Keimlinge von *N. tabacum* wurden zunächst in Multiwell-Platten 15 min bei RT im Dunkeln in je 1 ml der Färbelösung inkubiert. Die Färbelösung enthielt 0,4 M Natriumphosphatpuffer (pH 6,0), 25 U GOD (Glucoseoxidase), 0,024 % NBT, 0,014 % PMS und 1 % Saccharose. Als Negativkontrollen wurden Proben ohne Zugabe von Saccharose inkubiert. Anschließend

wurde die Färbelösung abgenommen, die Keimlinge dreimal mit H₂O gewaschen, 4 %ige Formaldehyd-Lösung (in Natriumphosphatpuffer) zur Konservierung hinzugegeben und die erzielte Färbung unter dem Binokular ausgewertet. Die Aufbewahrung der Keimlinge erfolgte bei 4°C.

Natriumphosphatpuffer (NaP_i)
0,4 M Na₂HPO₄, 0,4 M NaH₂PO₄ (pH 6,0)

6.2.9 Chlorophyllfluoreszenzmessungen

Zur Untersuchung der räumlich-zeitlichen Veränderungen photosynthetischer Parameter kann die nicht-invasive Methode der bildgebenden Chlorophyllfluoreszenz-Messung eingesetzt werden (Schreiber, 2004).

Chlorophyllfluoreszenz wurde mit Hilfe einer Imaging-PAM (Walz) mit folgenden technischen Spezifikationen gemessen: Messlicht, aktinisches Licht und Sättigungspulse wurden von 12 Luxeon 3W Royal Blue LEDs (Peakwellenlänge 450nm; Emissionsfilter mit Kurzpasskante bei 470nm) erzeugt. Das Licht für Absorbtivitätsmessungen wurde von 4 Rot-LEDs (Peakwellenlänge 650nm) und 4 NIR-LEDs (Peakwellenlänge 780nm) generiert. Die Lichtintensitäten am gemessenen Objekt betragen für das Messlicht (Intensitätsstellung 3, Messfrequenz 1) maximal 0,4 $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$, für das aktinische Licht (Intensitätsstellung 20) maximal 1570 $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$ und für die Sättigungspulse (Stellung 10) maximal 3000 $\mu\text{mol Quanten/m}^2\text{s}$. Die CCD-Kamera vom Typ schwarz-weiss C-Mount wurde im 10-Bit-Modus bei 30 Frames/s betrieben. Der zugehörige CCD-Chip der Grösse 1/3" hatte 640 x 480 Pixel Auflösung. Das Objektiv Cosmicar/Pentax F1.2, f=12 mm war im festen Arbeitsabstand von 39 mm zum gemessenen Objekt angebracht. Die abgebildete Fläche eines gemessenen Objekts betrug maximal 17 x 22 mm. Der Detektor-Filter-Schieber zur wahlweisen Messung von Chlorophyll- oder phenolischer bzw. GFP-Fluoreszenz bestand für die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz aus einem Langpassfilter mit einer Kante bei 645 nm.

Messungen erfolgten in der Software ImagingWin.exe (Walz) nach einem voreingestellten Messprotokoll.

Die Aufnahme der aktuellen Fluoreszenz (F_t) erfolgte dabei fortlaufend. In Abwesenheit von aktinischem Licht wurde zunächst die minimale Fluoreszenz ($F_t=F_0$), nach Applikation eines sättigenden Lichtpulses die maximale Fluoreszenz der Messobjektes in dunkeladaptiertem Zustand bestimmt. Aus diesen beiden Parametern wurde automatisch die maximale PSII-Quantenausbeute (F_v/F_m) durch das Programm ImagingWin berechnet. Für verschiedene Pflanzenarten wurde gezeigt, dass F_v/F_m im nicht-gestressten Zustand bei etwa 0,83 liegt (Björkman und Demmig, 1987). Liegt der Wert darunter, so ist dies ein Indikator für

Photoinhibition bzw. Schädigung des PSII durch eine vorausgegangene Stresseinwirkung (Krause und Weis, 1991).

In Anwesenheit aktinischen Lichtes wurden dann die aktuelle Fluoreszenz ($F_t=F$) und die maximale Fluoreszenz im lichtadaptierten Zustand (F_m') bestimmt, aus denen die effektive Quantenausbeute ($Y(II) = [F_m' - F_t] / F_m' = \Delta F / F_m'$) abgeleitet wurde, welche ein Maß für die Effizienz der PSII-Reaktionszentren darstellt (Maxwell und Johnson, 2000). Weiterhin konnte eine Kalkulation der linearen Elektronentransportrate ETR und somit eine Einschätzung der gesamten photosynthetischen Kapazität einer Pflanze *in vivo* durchgeführt werden: $ETR = Yield \times PPF D (\mu mol \text{ Quanten} / m^2 s) \times 0,5 \times \text{Absorptivität}$ (Genty *et al.*, 1989).

Erfolgt eine Energieabgabe nach starker Bestrahlung einer Pflanze nicht in Form photochemischer Prozesse, sondern z.B. durch Wärmeabgabe, so kann dies durch den Parameter $q_N = (F_m - F_m') / (F_m - F_o')$ („nichtphotochemisches Quenching“) dargestellt werden (Krause und Weis, 1991).

Die Aufnahmen der Fluoreszenzparameter wurden mit Hilfe eines Falschfarbensystems angezeigt, welches auf einer Skala von 0,000 (schwarz) bis 1,000 (violett) reichte. Nach Aufnahme einer Kinetik wurden bestimmte Bereiche des Messobjektes, sogenannte „areas of interest“ (AOI) definiert, über die in einer angezeigten Markierung die Mittelwerte für den ausgewählten Parameter berechnet und als Zahlenwert dargestellt wurden.

7 Anhang

Herstellung des Konstruktes DEX::*NtC1F* zur Transformation von *A. thaliana*

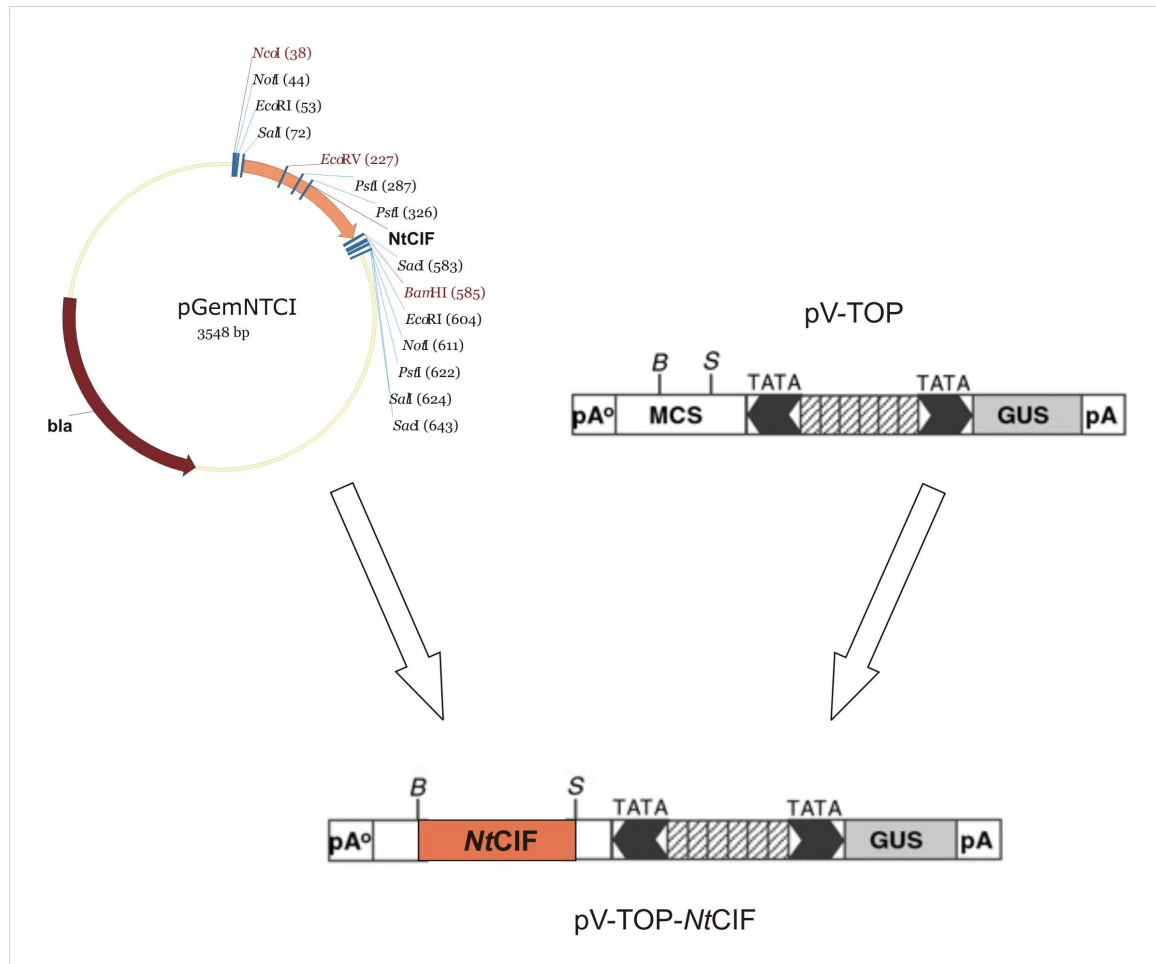


Abb. 30: Klonierungsstrategie für das Konstrukt DEX::*NtC1F* zur Transformation von *A. thaliana*. *NtC1F* wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Sal*I aus dem Plasmid pGemNTCI ausgeschnitten. Der binäre Vektor pV-TOP wurde über beiden in der MCS („multiple cloning site“) hervorgehobenen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme B = *Bam*HI und S = *Sal*I geöffnet und der Invertaseinhibitor *NtC1F* eingefügt, so dass das binäre Plasmid pV-TOP-*NtC1F* für die Pflanzentransformation entstand.

Sequenz des Invertaseinhibitors *NtC1F* aus *N. tabacum* in pV-TOP

```

Query 27  CTAACGATGTTTCTGACTATATTACTACAAACAAACGCCAATAATCTAGTAGAACTACA 86
          |||
Sbjct 68  CTAACGATGTTTCTGACTATATTACTACAAACAAACGCCAATAATCTAGTAGAACTACA 127

Query 87  TGCAAAAACACACCAAATTACCAACTTTGTCTGAAAACCTCTGCTTTTCGGACAAACGAAGT 146
          |||
Sbjct 128  TGCAAAAACACACCAAATTACCAACTTTGTCTGAAAACCTCTGCTTTTCGGACAAACGAAGT 187

Query 147  GCAACAGGGGATATCACAACGTTGGCACTAATTATGGTCGATGCAATAAAAAGCTAAAGCT 206
          |||
Sbjct 188  GCAACAGGGGATATCACAACGTTGGCACTAATTATGGTCGATGCAATAAAAAGCTAAAGCT 247

```

```

Query 207 AATCAGGCTGCAGTGACAATTTTCGAAACTCCGGCATTTCGAATCCCCCTGCAGCTTGAAA 266
          |||
Sbjct 248 AATCAGGCTGCAGTGACAATTTTCGAAACTCCGGCATTTCGAATCCCCCTGCAGCTTGAAA 307

Query 267 GGTCCTTTGAAAACTGTGCCTTTTCATATAAGGTAATTTTAACAGCAAGTTTGCCTGAA 326
          |||
Sbjct 308 GGTCCTTTGAAAACTGTGCCTTTTCATATAAGGTAATTTTAACAGCAAGTTTGCCTGAA 367

Query 327 GCAATTGAAGCATTGACAAAAGGAGATCCAAAATTTGCTGAAGATGGAATGGTAGGTTCA 386
          |||
Sbjct 368 GCAATTGAAGCATTGACAAAAGGAGATCCAAAATTTGCTGAAGATGGAATGGTAGGTTCA 427

Query 387 TCTGGAGATGCACAAGAATGTGAGGAGTATTTCAAGGGTAGTAAATCACCATTTTCTGCA 446
          |||
Sbjct 428 TCTGGAGATGCACAAGAATGTGAGGAGTATTTCAAGGGTAGTAAATCACCATTTTCTGCA 487

Query 447 TTAAATATAGCAGTTCATGAACTTTCTGATGTTGGGAGAGCTATTGTCAGAAATTTATTG 506
          |||
Sbjct 488 TTAAATATAGCAGTTCATGAACTTTCTGATGTTGGGAGAGCTATTGTCAGAAATTTATTG 547

Query 507 TGA 509
          |||
Sbjct 548 TGA 550

```

Abb. 31: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 893 bits (483), Identities = 483/483 (100%), Gaps = 0/483 (0%) Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer Ntchlnh-F.

Grundschema der Plasmide für den Macroarray

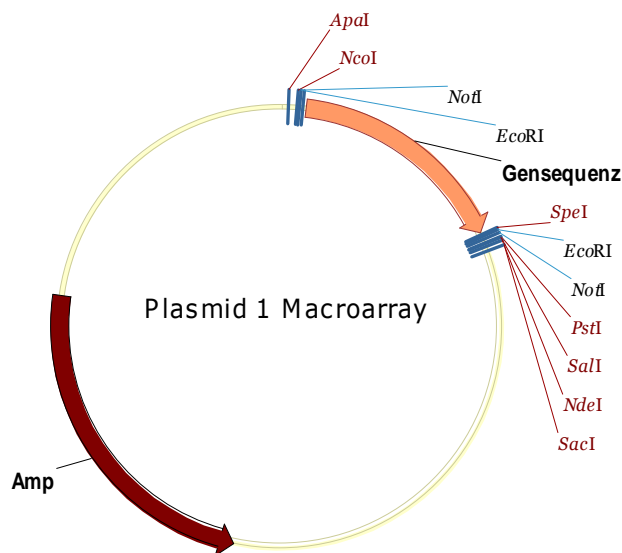


Abb. 32: Klonierungsvektor pGEM-Teasy mit beliebiger Gensequenz. Für die Erstellung eines Macroarrays wurden Genfragmente aus den Klassen Photosynthese, Kohlenhydratmetabolismus und Abwehr sowie verschiedene Haushaltsgene amplifiziert und in die MCS ligiert.

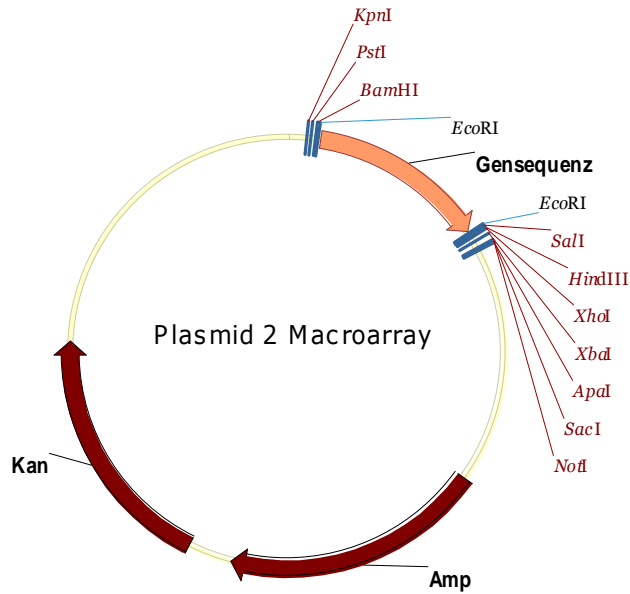


Abb. 33: Klonierungsvektor pST-Blue1 mit beliebiger Gensequenz. Für die Erstellung eines Macroarrays wurden Genfragmente von Genen des Kohlenhydratmetabolismus amplifiziert und in die MCS ligiert.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *Hmg1/2* (At1g04880) in pGEM-Teasy

```

Query: 59  ttcttatcaaactccgcaacagagtcatgggtgtcctccagaacactctgaacatttctgc 118
          |||
Sbjct: 737  ttcttatcaaactccgcaacagagtcatgggtgtcctcccgaacactctgaacatttctgc 796

Query: 119  caatcctcagggggttgcaggaggagtaacaaaacgccgtaggagaagaagaatcaga 178
          |||
Sbjct: 797  caatcctcagggggttgcaggaggagtaacaaaacgccgtaggagaagaagaatcaga 856

Query: 179  gatcaaaagacgtgatcctgatcatccaaaacccaacagaagtggttataacttctttt 238
          |||
Sbjct: 857  gatcaaaagacgtgatcctgatcatccaaaacccaacagaagtggttataacttctttt 916

Query: 239  cgcagagcagcagcgcgagacttaaacgcttcatcctggtaaggatagggatatcagcag 298
          |||
Sbjct: 917  cgcagagcagcagcgcgagacttaaacgcttcatcctggtaaggatagggatatcagcag 976

Query: 299  gatgattggtgagctatggaacaagctgaatgaagacgaaaaattg 344
          |||
Sbjct: 977  gatgattggtgagctatggaacaagctgaatgaagacgaaaaattg 1022

```

Abb. 34: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 559 bits (282), Identities = 285/286 (99%), Gaps = 0/286 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *βfruct4* (At1g12240) in pST-Blue1

```

Query: 57  ttgcctaccctgaagacccaacgaccacttctgttgaaatgggtcaagttcccgggga 116
          |||
Sbjct: 715  ttgcctaccctgaagacccaacgaccacttctgttgaaatgggtcaagttcccgggga 774

Query: 117  acccggttctagtagcctccgcccggatcctccctaaggacttccgtgacccaacgactg 176
          |||
Sbjct: 775  acccggttctagtagcctccgcccggatcctccctaaggacttccgtgacccaacgactg 834

```

```

Query: 177  catggaagacatcagaaggaaaatggcggatcacgattgggtccaagctcaacaaaactg 236
          |||
Sbjct: 835  catggaagacatcagaaggaaaatggcggatcacgattgggtccaagctcaacaaaactg 894

Query: 237  gaatctcactcgtgtacgacacaatcgactttaaacatacgagaaacttgacacattgt 296
          |||
Sbjct: 895  gaatctcactcgtgtacgacacaatcgactttaaacatacgagaaacttgacacattgt 954

Query: 297  tgcaccgagttcccaacactggaatgtgggagtggttgacttttaccgggtgtctaaga 356
          |||
Sbjct: 955  tgcaccgagttcccaacactggaatgtgggagtggttgacttttaccgggtgtctaaga 1014

Query: 357  ctgctggcaatgggcttgacacatcggatcaatggaccggatgaagcatatcgtgaagg 416
          |||
Sbjct: 1015 ctgctggcaatgggcttgacacatcggatcaatggaccggatgaagcatatcgtgaagg 1074

Query: 417  ctacatggacgacacgaggttcgatcattatgctgtaggcacgtatttcgattcaaacg 476
          |||
Sbjct: 1075 ctacatggacgacacgaggttcgatcattatgctgtaggcacgtatttcgattcaaacg 1134

Query: 477  gaacatggatccccgatgatcctactatcgatggtgggatgactgccagtataagatatg 536
          |||
Sbjct: 1135 gaacatggatccccgatgatcctactatcgatggtgggatgactgccagtataagatatg 1194

Query: 537  attacgaaagtctatgcttcaaagtcgttttacgaccagaacaagggtcgaagagtct 596
          |||
Sbjct: 1195 attacgaaagtctatgcttcaaagtcgttttacgaccagaacaagggtcgaagagtct 1254

Query: 597  tgtggagttggattggtgagtcctgatagtgaggcttctgatg 638
          |||
Sbjct: 1255 tgtggagttggattggtgagtcctgatagtgaggcttctgatg 1296

```

Abb. 35: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 1138 bits (574), Identities = 580/582 (99%), Gaps = 0/582 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *cw/NV3* (At1g55120) in pST-Blue1

```

Query: 48  gagacgattcattaacccaacccacaagatccttcgtttttaacatcatcgtaaaacg 107
          |||
Sbjct: 1016 gagacgattcattaacccaacccacaagatccttcgtttttaacatcatcgtaaaacg 957

Query: 108  ttttcgacgcgtaaatatttcccgtaaatctaacctcggagctgattcgttttgcacaaacc 167
          |||
Sbjct: 956  ttttcgacgcgtaaatatttcccgtaaatctaacctcggagctgattcgttttgcacaaacc 897

Query: 168  caagatccggtacgtaaacatccttctcacgatcataactcccaatcgtgtaataatcat 227
          |||
Sbjct: 896  caagatccggtacgtaaacatccttctcacgatcataactcccaatcgtgtaataatcat 837

Query: 228  gcaatgtctcaatcaaaactcactttaagcacatgcttaatcccattctcaccaaccgacg 287
          |||
Sbjct: 836  gcaatgtctcaatcaaaactcactttaagcacatgcttaatcccattctcaccaaccgacg 777

Query: 288  acgtttctacaccgtccgatccggtatcgaaaccgggaaaaaatcaggacattcccaca 347
          |||
Sbjct: 776  acgtttctacaccgtccgatccggtatcgaaaccgggaaaaaatcaggacattcccaca 717

Query: 348  ttccgggtaagtcttcgtaaatgtaaaggcttcattgattgctgctccagttgaagaaatctc 407
          |||
Sbjct: 716  ttccgggtaagtcttcgtaaatgtaaaggcttcattgattgctgctccagttgaagaaatctc 657

Query: 408  tgcttttgtaagaatcgtaaatcctcgtcgatcgccgctcgagcttccgacgattactc 467
          |||
Sbjct: 656  tgcttttgtaagaatcgtaaatcctcgtcgatcgccgctcgagcttccgacgattactc 597

```

```

Query: 468 gccattctccgtcacgtccaagccacgcgggtggtcggatcacgaa 512
          |||
Sbjct: 596 gccattctccgtcacgtccaagccacgcgggtggtcggatcacgaa 552

```

Abb. 36: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 922 bits (465), Identities = 465/465 (100%), Gaps = 0/465 (0%), Strand=Plus/Minus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *Pmei* (At1g62770) in pGEM-Teasy

```

Query: 58 gtttattgtgtcttcatgccaaccacccaatatccatcactatgcgtgcacacactctc 117
          |||
Sbjct: 150 gtttattgtgtcttcatgccaaccacccaatatccatcactatgcgtgcacacactctc 209

Query: 118 tgcttacgccaccaagatccgccacaacaatgaccaagatctcgcccagactgctctcat 177
          |||
Sbjct: 210 tgcttacgccaccaagatccgccacaacaatgaccaagatctcgcccagactgctctcat 269

Query: 178 catcagcttggctcgagccaaatccgttactatcttcgctcgccaaactaaccaaagagac 237
          |||
Sbjct: 270 catcagcttggctcgagccaaatccgttactatcttcgctcgccaaactaaccaaagagac 329

Query: 238 accaaaatttaaacgtagggaaatctagcaatcaaagattgcatcgaagtgctaggcaa 297
          |||
Sbjct: 330 accaaaatttaaacgtagggaaatctagcaatcaaagattgcatcgaagtgctaggcaa 389

Query: 298 tagcgtggaccggtagctcaatcggttaaggaacttgctcgagctggtcatgctgtggc 357
          |||
Sbjct: 390 tagcgtggaccggtagctcaatcggttaaggaacttgctcgagctggtcatgctgtggc 449

Query: 358 tagtgagaacttcatgtggaaaatgagtaacggttcaaacatgggtcagtgccgctttgac 417
          |||
Sbjct: 450 tagtgaggacttcatgtggaaaatgagtaacggttcaaacatgggtcagtgccgctttgac 509

Query: 418 ggacgagacaacgtgtctagatggattctcagaacgagccatgggaggcaaagtcaaaag 477
          |||
Sbjct: 510 ggacgagacaacgtgtctagatggattctcagaacgagccatgggaggcaaagtcaaaag 569

Query: 478 actgattcgggtataaggtgggttcacgtggctcaagtcactagcaatgctcttgctttggt 537
          |||
Sbjct: 570 actgattcgggtataaggtgggttcacgtggctcaagtcactagcaatgctcttgctttggt 629

Query: 538 taatcagtttgagagaagcgaagtgtgaa 567
          |||
Sbjct: 630 taatcagtttgagagaagcgaagtgtgaa 659

```

Abb. 37: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 1003 bits (506), Identities = 509/510 (99%), Gaps = 0/510 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *4C/3* (At1g65060) in pGEM-Teasy

```

Query: 15 ttgacatccctaaccacctccctctccacacttactgcttcgaaaaactctcatctgttt 74
          |||
Sbjct: 170 ttgacatccctaaccacctccctctccacacttactgcttcgaaaaactctcatctgttt 229

Query: 75 ccgacaagccttgtctcatcggttggctccaccgggaaaagctacgc-tacc---aaacac 130
          |||
Sbjct: 230 ccgacaagccttgtctcatcggttggctccaccgggaaaagctacacctacggcgaaacac 289

Query: 131 acctaactctgtcggagagtcgcttccgggttatacaagttaggtatcagaaaaggtgacg 190
          |||
Sbjct: 290 acctaactctgtcggagagtcgcttccgggttatacaagttaggtatcagaaaaggtgacg 349

```

```

Query: 191 tcatcatgatccttctccaaaactcagccgagttcgttttctccttcatgggtgcttcca 250
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 350 tcatcatgatccttctccaaaactcagccgagttcgttttctccttcatgggtgcttcca 409

Query: 251 tgatcggagccgtctcaaccaccgcaaaccctttctacacttctcaagagctttataaac 310
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 410 tgatcggagccgtctcaaccaccgcaaaccctttctacacttctcaagagctttataaac 469

Query: 311 agcttaaactcttccggagccaaactcataatcactcactctcaatacgtcgataaactta 370
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 470 agcttaaactcttccggagccaaactcataatcactcactctcaatacgtcgataaactta 529

Query: 371 aaaacctcggagaaaacctcacgctgaccactaccgatgaaccaacaccggagaattgtc 430
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 530 aaaacctcggagaaaacctcacgctgatcactaccgatgaaccaacaccggagaattgtc 589

Query: 431 taccattctcgacactcatcaccgacgacgaaacaaaccatttcaagaaaccgtcgata 490
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 590 taccattctcgacactcatcaccgacgacgaaacaaaccatttcaagaaaccgtcgata 649

Query: 491 tcggc-gtgacgatgcggc-gcgttaccattctcatcgga 529
          ||||| |||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct: 650 tcggcggtgacgatgcggcggcggttaccattctcatcgga 690

```

Abb. 38: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 934 bits (471), Identities = 512/521 (98%), Gaps = 6/521 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *YsI9* (At2g35980) in pGEM-Teasy

```

Query: 59  gtggaggtagttgtagttccgtttgaggtagttaaaggaagccttagatcatcgcaatca 118
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 697  gtggaggtagttgtagttccgtttgaggtagttaaaggaagccttagatcatcgcaatca 638

Query: 119  accttaggcttaatcctcctaaactcaagtcaccaagcttaaacctaacctaaagcctg 178
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 637  accttaggcttaatcctcctaaactcaagtcaccaagcttaaacctaacctaaagcctg 578

Query: 179  aacttgatctctatatgtgtatacaccggatatacctctccgcggtttaaagtcctagactgt 238
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 577  aacttgatctctatatgtgtatacaccggatatacctctccgcggtttaaagtcctagactgt 518

Query: 239  ccggcggtaaaaataacaagggttttggccttggaacggtgggtgtgagaacgggtgtgttt 298
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 517  ccggcggtaaaaataacaagggttttggccttggaacggtgggtgtgagaacgggtgtgttt 458

Query: 299  ttgtgtccttgatagaaaggagttaacgtgatggtactaaaccgctttccctcgtagtag 358
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 457  ttgtgtccttgatagaaaggagttaacgtgatggtactaaaccgctttccctcgtagtag 398

Query: 359  gcatgagcttcgatcctatcgtagtagagtccgatcctcttggttggttacggacagga 418
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 397  gcatgagcttcgatcctatcgtagtagagtccgatcctcttggttggttacggacagga 338

Query: 419  acagtgagggctaggttataccttaaaatggtgtccggggaagtgtggtcaaagcgggta 478
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 337  acagtgagggctaggttataccttaaaatggtgtccggggaagtgtggtcaaagcgggta 278

Query: 479  agggacgcatcggtcacgtgaaacttgatggcacgaggtcggacgatgagccagaagatg 538
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 277  agggacgcatcggtcacgtgaaacttgatggcacgaggtcggacgatgagccagaagatg 218

Query: 539  agagcggctacgccgaggatgacaataagggatgatgattactttgacgaataagctgagg 598
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 217  agagcggctacgccgaggatgacaataagggatgatgattactttgacgaataagctgagg 158

```



```

Query: 599 aggcagcagccacagccacgaccgtgccacgctcggtagtagcctttgggagctggtggt 658
          |||
Sbjct: 157 aggcagcagccacagccacgaccgtgccacgctcggtagtagcctttgggagctggtggt 98

Query: 659 gggactgatggaccgtagaaggcgccattgagaggttgttcagcagcca 707
          |||
Sbjct: 97  gggactgatggaccgtagaaggcgccattgagaggttgttcagcagcca 49

```

Abb. 39: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 1287 bits (649), Identities = 649/649 (100%), Gaps = 0/649 (0%), Strand=Plus/Minus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *Sus3* (At4g02280) in pGEM-Teasy

```

Query: 60  gtatctccccatcctttctcaaaaccattccttgcaacgcgtattcgaattccgagaac 119
          |||
Sbjct: 973  gtatctccccatcctttctcaaaaccattccttgcaacgcgtattcgaattccgagaac 914

Query: 120  ggagtttcttgtgaaagcttagagatatgatccttctgctttactaagctggatttgaagc 179
          |||
Sbjct: 913  ggagtttcttgtgaaagcttagagatatgatccttctgctttactaagctggatttgaagc 854

Query: 180  ctagatatgctttgaaatccgatcattcaacatcaacggatgacctttgtacttatgaact 239
          |||
Sbjct: 853  ctagatatgctttgaaatccgatcattcaacatcaacggatgacctttgtacttatgaact 794

Query: 240  ctaaggaaatcaagcagaggctccaagcaatccttgttacggaacataacagaggacaag 299
          |||
Sbjct: 793  ctaaggaaatcaagcagaggctccaagcaatccttgttacggaacataacagaagacaag 734

Query: 300  tgacgattcagaaactgaactccattaccaatcgaagacgaacgagaaggacgtggcacg 359
          |||
Sbjct: 733  tgacgattcagaaactgaactccattaccaatcgaagacgaacgagaaggacgtggcacg 674

Query: 360  tctgcgttaaagagctcgaatcaagctcaagacaaaaagggtcactattaggtccatca 419
          |||
Sbjct: 673  tctgcgttaaagggctcgaatcaagctcaagacaaaaagggtcactattaggtccatca 614

Query: 420  acgagttcttctttgaaacgaagatactcagtgactgttaattgttcaacacttagctcg 479
          |||
Sbjct: 613  acgagttcttctttgaaacgaagatactcagagactgttaattgttcaacacttagctcg 554

Query: 480  aagacattaacacgaacatattcccaaaccaggctcttgggtctaacggctaacgcaaca 539
          |||
Sbjct: 553  aagacattaacacgaacatattcccaaaccaggctcttgggtctaacggctaacgcaaca 494

Query: 540  a 540
          |
Sbjct: 493  a 493

```

Abb. 40: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 922 bits (465), Identities = 477/481 (99%), Gaps = 0/481 (0%), Strand=Plus/Minus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *Tufa* (At4g20360) in pGEM-Teasy

```

Query: 47  gtatcacaatcaacactgctactgttgagtacgagactgagaatcgtcactacgctcacg 106
          |||
Sbjct: 464  gtatcacaatcaacactgctactgttgagtacgagactgagaatcgtcactacgctcacg 523

Query: 107  ttgattgtcctggtcacgctgattacgtaagaatatgattaccggagctgcacagatgg 166
          |||
Sbjct: 524  ttgattgtcctggtcacgctgattacgtaagaatatgattaccggagctgcacagatgg 583

```

```

Query: 167  acggagctatcctcgttggttccggcgccgatggtcctatgcctcagactaaagagcata 226
          |||
Sbjct: 584  acggagctatcctcgttggttccggcgccgatggtcctatgcctcagactaaagagcata 643

Query: 227  tccttttggttaagcagggttggtgctcctgatatggttggttcttaacaatgaggatc 286
          |||
Sbjct: 644  tccttttggttaagcagggttggtgctcctgatatggttggttcttaacaatgaggatc 703

Query: 287  aagtagatgatgcagagttgctagagctcgttgagcctgaggttcgtgagcctctctcgt 346
          |||
Sbjct: 704  aagtagatgatgcagagttgctagagctcgttgagcctgaggttcgtgagcctctctcgt 763

Query: 347  cttatgaat- -acggtgatgaaattccg 374
          |||
Sbjct: 764  cttatgaat- -taacggtgatgaaattccg 792

```

Abb. 41: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 605 bits (305), Identities = 324/329 (98%), Gaps = 1/329 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *CesA1* (At4g32410) in pGEM-Teasy

```

Query: 56   ttggttcattctactcttcatctcaattgctgtgactgggatcctggagctgagatggag 115
          |||
Sbjct: 2956  ttggttcattctactcttcatctcaattgctgtgactggaatcctggagctgagatggag 3015

Query: 116  cgggtgtgagcattgaggattggtggaggaacgagcagttctgggtcattggtggcacatc 175
          |||
Sbjct: 3016  cgggtgtgagcattgaggattggtggaggaacgagcagttctgggtcattggtggcacatc 3075

Query: 176  cgcccatcttttctgctgtcttccaaggtctacttaaggttcttgctggtatcgacaccaa 235
          |||
Sbjct: 3076  cgcccatcttttctgctgtcttccaaggtctacttaaggttcttgctggtatcgacaccaa 3135

Query: 236  cttcaccgttacatctaaagccacagacgaagatggggat- -tttgcagaactctacatctt 295
          |||
Sbjct: 3136  cttcaccgttacatctaaagccacagacgaagatggggat- -tttgcagaactctacatctt 3195

Query: 296  caaatggacagctcttctcattccaccaaccaccgctcctacttgtgaacctcataggcat 355
          |||
Sbjct: 3196  caaatggacagctcttctcattccaccaaccaccgctcctacttgtgaacctcataggcat 3255

Query: 356  tgtggctggtgtctcttatgctgtaaacagtggctaccagtcgtgggtcgccttttcgg 415
          |||
Sbjct: 3256  tgtggctggtgtctcttatgctgtaaacagtggctaccagtcgtgggtcgccttttcgg 3315

Query: 416  gaagctcttcttcgccttatgggttattgcccacatctctacccttcttgaaaggtctgtt 475
          |||
Sbjct: 3316  gaagctcttcttcgccttatgggttattgcccacatctctacccttcttgaaaggtctgtt 3375

Query: 476  gggaaagacaaaaccgaacaccaaccatcgtcattgtctggtctgttcttctcgcctccat 535
          |||
Sbjct: 3376  gggaaagacaaaaccgaacaccaaccatcgtcattgtctggtctgttcttctcgcctccat 3435

Query: 536  cttctcgttgctttgggtca-gatcaatccctt- -gtggacgccaatccaatgccaacaa 594
          |||
Sbjct: 3436  cttctcgttgctttgggtcaggatcaatccctt- -gtggacgccaatccaatgccaacaa 3495

Query: 595  cttcaatggcaaag 608
          |||
Sbjct: 3496  cttcaatggcaaag 3509

```

Abb. 42: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 1074 bits (542), Identities = 552/554 (99%), Gaps = 1/554 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *RbcL* (AtCg00490) in pGEM-Teasy

```

Query: 57  tcaccacaaacagagactaaagcaagtgttgggttcaaagctgggtgttaaagagtataaa 116
          |||
Sbjct: 4   tcaccacaaacagagactaaagcaagtgttgggttcaaagctgggtgttaaagagtataaa 63

Query: 117 ttgacttactataactcctgaatatgaaaccaaggatactgatatcttggcagcattccga 176
          |||
Sbjct: 64 ttgacttactataactcctgaatatgaaaccaaggatactgatatcttggcagcattccga 123

Query: 177 gtaactcctcaacctggagttccacctgaagaagcaggggctgcggtagctgctgaatct 236
          |||
Sbjct: 124 gtaactcctcaacctggagttccacctgaagaagcaggggctgcggtagctgctgaatct 183

Query: 237 tctactggtacatggacaactgtgtggaccgatgggcttaccagccttgatcgttacaaa 296
          |||
Sbjct: 184 tctactggtacatggacaactgtgtggaccgatgggcttaccagccttgatcgttacaaa 243

Query: 297 ggacgatgctaccacatcgagcccgttccaggagaagaaactcaatttattgcgatgta 356
          |||
Sbjct: 244 ggacgatgctaccacatcgagcccgttccaggagaagaaactcaatttattgcgatgta 303

Query: 357 gcttatcccttagaccttttgaagaagggttcggttactaacatgttacctcgattgtg 416
          |||
Sbjct: 304 gcttatcccttagaccttttgaagaagggttcggttactaacatgttacctcgattgtg 363

Query: 417 ggtaatgtatttgggttcaaagccctggctgctctacgtctagaggatctgcaatccct 476
          |||
Sbjct: 364 ggtaatgtatttgggttcaaagccctggctgctctacgtctagaggatctgcaatccct 423

Query: 477 cctgcttataactaaaacttt-caaggaccacctcatggtatccaagttgaaagagataaa 535
          |||
Sbjct: 424 cctgcttataactaaaactttccaaggaccacctcatggtatccaagttgaaagagataaa 483

Query: 536 ttgagcaagtatggacgtcccctattaggatgtactattaaacaaaattgggggttatcc 595
          |||
Sbjct: 484 ttgacaagtatggacgtcccctattaggatgtactattaaacaaaattgggggttatcc 543

Query: 596 gcg-aaaactatggtagagcagtttatgaatgtctacg 632
          |||
Sbjct: 544 gcgaaaaactatggtagagcagtttatgaatgtctacg 581

```

Abb. 43: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 1106 bits (558), Identities = 575/578 (99%), Gaps = 2/578 (0%), Strand=Plus/Plus), Sequenzierprimer T7.

Sequenz des klonierten Genfragments aus *petB* (AtCg00720) in pGEM-Teasy

```

Query: 1   cgtatcattaggaatgcattaacataaagacggccgtaagaagaggtaatacaaaaagtg 60
          |||
Sbjct: 620 cgtatcattaggaatgcattaacataaagacggccgtaagaagaggtaatacaaaaagtg 561

Query: 61  tgtaaaactataaaaaacgagtcgaaagtggattgtccaacactagcacttccgcgtaataat 120
          |||
Sbjct: 560 tgtaaaactataaaaaacgagtcgaaagtggattgtccaacactagcacttccgcgtaataat 501

Query: 121 tctacaagaggtgatcctattaccggaatagcgtcaggtacacctgttacaattttgacc 180
          |||
Sbjct: 500 tctacaagaggtgatcctattaccggaatagcgtcaggtacacctgttacaattttgacc 441

Query: 181 gcccaataaccaatttgatcccaaggtaaagaataacctggttacaccaaagatgcggtc 240
          |||
Sbjct: 440 gcccaataaccaatttgatcccaaggtaaagaataacctggttacaccaaagatgcggtc 381

Query: 241 aatacaccagaaccacaccagtaaccaagtttaattcgcgagggttttttaaaccaccg 300
          |||
Sbjct: 380 aatacaccagaaccacaccagtaaccaagtttaattcgcgagggttttttaaaccaccg 321

```

```

Query: 301 gtgaggatatacacgaaatacgtgcaggatcatcattaggaacctatcacttgccgacca 360
          |||
Sbjct: 320 gtgaggatatacacgaaatacgtgcaggatcatcattagga-ccatcacttgccgacca 262

Query: 361 tcgatgaactgatcgga-taaccaaccaaagttagcttcagtca-tattta-tgaacaga 417
          |||
Sbjct: 261 tcgatgaactgatcggattaaaccaaccaaagttagcttcagtcattatatattgaacaga 202

Query: 418 agcaaaagcttca-ttacgggttgacggt 445
          |||
Sbjct: 201 agcaaaagcttcagtaacgggttgacggt 173

```

Abb. 44: Sequenzvergleich mit Hilfe des Blast-Algorithmus (Score = 795 bits (401), Identities = 442/449 (98%), Gaps = 5/449 (1%), Strand=Plus/Minus), Sequenzierprimer T7.

Plasmide zur Transformation von *P. syringae*

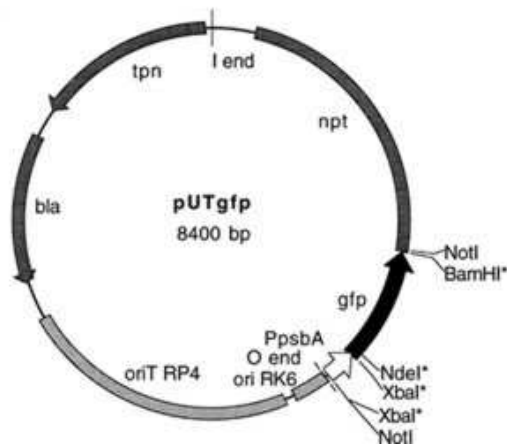


Abb. 45: Schema des Plasmids pUTgfp. Es enthält die Gensequenzen für die Resistenzen gegenüber Kanamycin (npt) und Ampicillin (bla) und hat eine Gesamtgröße von 8400 bp. Innerhalb der MCS kommen die mit * markierten Restriktionsschnittstellen mehrfach vor. Die gfp-Kassette wurde über die *NotI*-Schnittstellen eingefügt und man erhielt das Plasmid pUTgfp (Tombolini *et al.*, 1997).

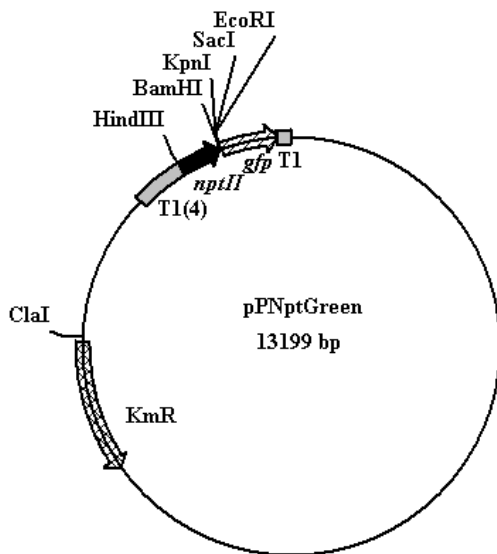


Abb. 46: Schema des Plasmids pPNptGreen. Es enthält die Gensequenz für die Resistenz gegenüber Kanamycin (nptII) und hat eine Gesamtgröße von 13199 bp. Die Klonierung des Plasmids erfolgte wie in Axtell und Beattie (2002) beschrieben.

8 Literatur

Acharya BR, Raina S, Maqbool SB, Jagadeeswaran G, Mosher SL, Appel HM, Schultz JC, Klessig DF, Raina R (2007) Overexpression of CRK13, an *Arabidopsis* cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Journal* 50: 488-499

Agindotan B, Perry KL (2007) Macroarray detection of plant RNA viruses using randomly primed and amplified complementary DNAs from infected plants *Phytopathology* 97: 119-127

Agrios GN (1997) *Plant Pathology*. Academic press, 4th edition

Alfano JR, Collmer A (1997) The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, avr proteins, and death. *Journal of Bacteriology* 179: 5655-5662

Alfano JR, Collmer A (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* 42: 385-414

Almeida DPF, Huber DH (1999) Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: a potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiologia Plantarum* 105: 506-512

Andersen MN, Asch F, Wu Y, Jensen CR, Naested H, Mogensen VO, Koch KE (2002) Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. *Plant Physiology* 130: 591-604

Anderson RS, Ewing EE, Senesac AH (1980) Inhibition of potato tuber invertase by an endogenous inhibitor. *Plant Physiology* 66: 451-456

Asano N, Nash RJ, Molyneux RJ, Fleet GW (2000) Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron: Asymmetry* 11: 1645-1680

Baker NR (2008) Chlorophyll fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* 59: 726-733

Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733

Baker NR, Rosenqvist E (2004) Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany* 55: 1607-1621

Balachandran S, Osmond CB (1994) Susceptibility of tobacco leaves to photoinhibition following infection with two strains of tobacco mosaic virus under different light and nitrogen nutrition regimes. *Plant Physiology* 104: 1051-1057

Balachandran S, Osmond CB, Daley PF (1994a) Diagnosis of the earliest strain-specific interactions between tobacco mosaic virus and chloroplasts of tobacco leaves in vivo by means of chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 104: 1059-1065

Balibrea-Lara ME, Gonzalez-Garcia MC, Fatima T, Ehness R, Lee TK, Proels R, Tanner W, Roitsch T (2004) Extracellular invertase is an essential component of cytokinin-mediated delay of senescence. *The Plant Cell* 16: 1276-1287

Barbagallo RP, Oxborough K, Pallet KE, Baker NR (2003) Rapid, noninvasive screening for perturbations of metabolism and plant growth using chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology* 132: 485-493

Baroux C, Blanvillain R, Betts H, Batoko H, Craft C, Martinez A, Gallois P, Moore I (2005) Predictable activation of tissue-specific expression from a single transgene locus using the pOp/LhG4 transactivation system in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 3: 91-101

- Bartak M, Hajek J, Vrablikova H, Dubova J** (2004) High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *Plant Biology* 6: 333-341
- Bate NJ, Niu X, Wang Y, Reimann KS, Helentjaris TG** (2004) An invertase inhibitor from maize localizes to the embryo surrounding region during early kernel development. *Plant Physiology* 134: 246-254
- Bekkouche K, Daali Y, Cherkaoui S, Veuthey J, Christen P** (2001) Calystegine distribution in some solanaceous species. *Phytochemistry* 58: 455-462
- Belkhouja R, Morales F, Abadia A, Gomez-Aparisi J, Abadia J** (1994) Chlorophyll fluorescence as a possible tool for salinity tolerance screening in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Physiology* 104: 667-673
- Bender CL, Alarcon-Chaidez F, Gross DC** (1999) *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 266-292
- Benhamou N, Grenier J, Chrispeels MJ** (1991) Accumulation of β -fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiology* 97: 739-750
- Berger S, Benediktyova Z, Matous K, Bonfig K, Mueller MJ, Nedbal L, Roitsch T** (2007) Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797-806
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T** (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419-428
- Besson-Bard A, Pugin A, Wendehenne D** (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59: 21-39
- Bilger W, Johnsen T, Schreiber U** (2001) UV-excited chlorophyll fluorescence as a tool for the assessment of UV-protection by the epidermis of plants. *Journal of Experimental Botany* 52: 2007-2014
- Björkman O, Demmig B** (1987) Photon yield of O_2 evolution and chlorophyll fluorescence at 77k among vascular plants of diverse origins. *Planta* 170: 489-504
- Blee KA, Anderson AJ** (1998) Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *The Plant Journal* 16: 523-530
- Bonfig K** (2004) Wechselwirkungen zwischen Kohlenhydratmetabolismus und Pathogeninfektion am Beispiel der Interaktion von *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas syringae*. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg
- Bowling SA, Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X** (1997). The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The Plant Cell* 9: 1573-1584
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth stage-based phenotypic analysis of *Arabidopsis*: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell* 13: 1499-1510
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R** (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, ASPB, Rockville, MD 1102ff.
- Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q, Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russel D, Berry K, Utterback T, van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng W, Ramos AR, Alfano JR,**

- Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer A** (2003) The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC 3000. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 10181-10186
- Büttner D, Bonas U** (2002) Getting across—bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. EMBO Journal 21: 5313–5322
- Burch LR, Davies HV, Cuthbert EM, Machray GC, Hedley P, Waugh R** (1992) Purification of soluble invertase from potato. Phytochemistry 6: 1901-1904
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, Dong X** (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. The Plant Cell 6: 1583-1592
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, Volko S, Dong X** (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. The Cell 88: 57-63
- Chaerle L, Hagenbeek D, De Bruyne E, Valcke R, Van Der Straeten D** (2004) Thermal and chlorophyll-fluorescence distinguish plant-pathogen interactions at an early stage. Plant and Cell Physiology 45: 887-896
- Chaerle L, Lenk S, Hagenbeek D, Buschmann C, van der Straeten D** (2007) Multicolor fluorescence imaging for early detection of the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. Journal of Plant Physiology 164: 253-262
- Cheng WH, Chourey PS** (1999) Genetic evidence that invertase-mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon partitioning and normal seed development in maize. Theoretical and Applied Genetics 98: 485-495
- Chou H, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD** (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. Molecular Plant Pathology 1: 99-113
- Clarke JD, Liu Y, Klessig DF, Dong X** (1998) Uncoupling *PR* gene expression from NPR1 and bacterial resistance: Characterisation of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. The Plant Cell 10: 557-569
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal 16: 735-743
- Conrath U, Thulke O, Katz V, Schwindling S, Kohler A** (2001) Priming as a mechanism in induced systemic resistance of plants. European Journal of Plant Pathology 107: 113-119
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. Trends in Plant Science 7: 210-216
- Conrath U, Beckers GJM, Flors V, Garcia-Agustin P, Jakab G, Mauch F, Newman MA, Pieterse CMJ, Poinssot B, Pozo MJ, Pugin A, Schaffrath U, Ton J, Wendehenne D, Zimmerli L, Mauch-Mani B** (2006) Priming: getting ready for battle. Molecular Plant Microbe Interactions 19: 1062-1071
- Cornelis G, van Gijsegem F** (2000) Assembly and function of type III secretion systems. Annual Review of Microbiology 54: 735-774
- Craft J, Samalova M, Baroux C, Townley H, Martinez A, Jepson I, Tsiantis M, Moore I** (2005) New pOp/LhG4 vectors for stringent glucocorticoid-dependent transgene expression in *Arabidopsis*. The Plant Journal 41: 899-918
- Dangl JL, Holub EH, Debener T, Lehnackers H, Ritter C, Crute I** (1992) Genetic definition of loci involved in *Arabidopsis*-pathogen interactions. In Methods in *Arabidopsis* Research (Koncz C, Chua N-H and Schell J, eds.) Singapore: World Scientific

- Dangl JL, Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, van Laere A, Van den Ende W** (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertases but are fructan exohydrolases (FEHs) with different substrate specificities. *Plant, Cell and Environment* 28: 432-443
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250
- Desveaux D, Singer AU, Dangl JL** (2006) Type III effector proteins: doppelgangers of bacterial virulence. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 376-382
- Devoto A, Muskett PR, Shirasu K** (2003) Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 307-311
- Doehlert DC, Felker FC** (1987) Characterization and distribution of invertase activity in developing maize (*Zea mays*) kernels. *Physiologia Plantarum* 70: 51-57
- Dong X** (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 316-323
- Dong X, Mindrinos M, Davis KR, Ausubel FM** (1991) Induction of *Arabidopsis* defense genes by virulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *The Plant Cell* 3: 61-72
- Dräger B** (2004) Chemistry and biology of calystegines. *Natural Product Reports* 21: 211-223
- Ehness R, Roitsch T** (1997) Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium rubrum* by cytokinins. *The Plant Journal* 11: 539-548
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch T** (1997) Glucose and stress independently regulate *source* and *sink* metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *The Plant Cell* 9: 1825-1841
- Eulgem T** (2005) Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends in Plant Science* 10: 71-78
- Fan J, Crooks C, Lamb C** (2008) High-throughput quantitative luminescence assay of the growth *in planta* of *Pseudomonas syringae* chromosomally tagged with *Photobacterium luminescens luxCDABE*. *The Plant Journal* 53: 393-399
- Felix G, Duran JD, Volko S, Boller T** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* 18: 265-276
- Feussner I, Wasternack C** (2002) The Lipoxygenase Pathway. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 53: 275-297
- Feys IF, Parker JE** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* 16: 449-455
- Fischer R, Stoger E, Schillberg S, Christou P, Twyman RM** (2004) Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 152-158
- Flexas J, Escalona JM, Evain S, Gulias J, Moya I, Osmond CB, Medrano H** (2002) Steady-state chlorophyll fluorescence (Fs) measurements as tool to follow variations of net CO₂ assimilation and stomata conductance during water-stress in C₃ plants. *Physiologia Plantarum* 114: 231-240
- Flor H** (1955) Host-parasite interactions in flax rust- its genetics and other implications. *Phytopathologie* 45: 680- 685

- Förschler A, Portz C, Schmitz-Eiberger M, Steiner U, Noga G** (2003) Minderung von pilzlichem Pathogenbefall im organischen Obstbau durch Zufuhr von Antioxidantien. Landwirtschaftliche Fakultät der Universität Bonn, Schriftenreihe des Lehr- und Forschungsschwerpunktes USL 113
- Fotopoulos V, Gilbert MJ, Pittman JK, Marvier AC, Buchanan AJ, Sauer N, Hall JL, Williams LE** (2003) The monosaccharide transporter gene, *AtSTP4*, and the cell-wall invertase, *Atβfruct1*, are induced in *Arabidopsis* during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 132: 821-829
- Frandsen TP, Svensson B** (1998) Plant α -glucosidases of the glucoside hydrolase family 31: molecular properties, substrate specificity, reaction mechanism, and comparison with family members of different origin. *Plant Molecular Biology* 37: 1-13
- Fridman E, Zamir D** (2003) Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato, potato, and *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 131: 603-609
- Fryer MJ, Oxborough K, Martin B, Ort DR, Baker NR** (1995) Factors associated with depression of photosynthetic quantum efficiency in maize at low growth temperature. *Plant Physiology* 108: 761-767
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negretto D, Nye G, Uknes S, Ward E, Kessmann H, Ryals J** (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754-756
- Gatz C** (1996) Chemically inducible promoters in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 168-172
- Gatz C** (1997) Chemical control of gene expression. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 89-108
- Gatz C, Lenk I** (1998) Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* 3: 352-358
- Geigenberger P, Stitt M** (1993) Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tubers and other plant tissues. *Plant Physiology* 189: 329-339
- Geissmann M, Frey T, Ruffner H** (1991) Occurrence and properties of acidic invertases in cultures of *B. cinerea*. *Mycological Research* 95: 1321-1327
- Genty B, Briantais JM, Baker NR** (1989) The relationship between quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92
- Glazebrook J** (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 280-286
- Glazebrook J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43: 205-227
- Glazebrook J, Ausubel FM** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8955-8959
- Glazebrook J, Rogers EE, Ausubel FM** (1997) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense responses. *Annual Reviews of Genetics* 31: 547-569
- Godt DE, Roitsch T** (1997) Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* 115: 273-282
- Goel AK, Lundberg D, Torres MA, Matthews R, Akimoto-Tomiyama C, Farmer L, Dangl JL, Grant SR** (2008) The *Pseudomonas syringae* type III Effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 361-370

- Goetz M, Godt DE, Roitsch T** (2000) Tissue-specific induction of the mRNA for an extracellular invertase isoenzyme of tomato by brassinosteroids suggests a role for steroid hormones in assimilate partitioning. *The Plant Journal* 22: 515-522
- Goetz M, Godt DE, Guivarch A, Kahmann U, Chriqui D, Roitsch T** (2001) Induction of male sterility in plants by metabolic engineering of the carbohydrate supply. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 6522-6527
- Goetz M, Roitsch T** (1999) The different pH-optima and substrate specificities of extracellular and vacuolar invertases are determined by a single amino acid substitution. *The Plant Journal* 20: 707-711
- Gomez-Gomez L, Felix G, Boller T** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18: 277-284
- Gomez-Gomez L** (2004) Plant perception systems for pathogen recognition and defence. *Molecular Immunology* 41: 1055-1062
- Gomez-Gomez L, Boller T** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5: 1003-1011
- Govindjee, Nedbal L** (2000) The chlorophyll fluorescence imaging and its application in plant science and technology. *Photosynthetica* 38: 481-482
- Grant SR, Fisher EJ, Chang JH, Mole BM, Dangl JL** (2006) Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Genetics* 60: 425-449
- Greiner S, Koester U, Lauer K, Rosenkranz H, Vogel R, Rausch T** (2000) Plant invertase inhibitors: expression in cell culture and during plant development. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 807-814
- Greiner S, Krausgrill S, Rausch T** (1998) Cloning of a tobacco apoplasmic invertase inhibitor. Proof of function of the recombinant protein and expression analysis during plant development. *Plant Physiology* 116: 733-742
- Guo DP, Guo YP, Zhao JP, Liu H, Peng Y, Wang QM, Chen JS, Rao GZ** (2005) Photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in leaves of stem mustard (*Brassica juncea* var. *tsatsai*) after turnip mosaic virus infection. *Plant Science* 168: 57-63
- Gurr SJ, Rushton PJ** (2005) Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express it? *Trends in Biotechnology* 23: 283-290
- Guttman DS, Vinatzer BA, Sarkar SF, Ranall MV, Kettler G, Greenberg JT** (2002) A functional screen for the type III (Hrp) secretome of the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Science* 295: 1722-1726
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hauck P, Thilmony R, He SY** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8577-8582
- Heath MC** (2000a) Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334
- Heath MC** (2000b). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 315-319
- Heil M, Baldwin IT** (2002) Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* 7: 61-67
- Heil M, Kost C** (2006) Priming of indirect defences. *Ecology Letters* 9: 813-817

- Heyer AG, Raap M, Schroeer B, Marty B, Willmitzer L** (2004) Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 161-169
- Herbers K, Meuwly P, Frommer WB, Metraux JP, Sonnewald U** (1996) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793-803
- Herbers K, Takahata Y, Melzer M, Mock HP, Hajirezaei M, Sonnewald U** (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology* 1: 51-59
- Heuck CJ** (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 379-433
- Hill R, Schreiber U, Gademann R, Larkum AWD, Kühl M, Ralph PJ** (2004) Spatial heterogeneity of photosynthesis and the effect of temperature-induced bleaching conditions in three species of corals. *Marine Biology* 144: 633-640
- Hirano SS, Upper CD** (2000) Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* - a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 624-653
- Höke D, Dräger B** (2004) Calystegines in *Calystegia sepium* do not inhibit fungal growth and invertase activity but interact with plant invertase. *Plant Biology* 6: 206-213
- Holub EB, Beynon JL, Crute IR** (1994) Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7: 223-239
- Hothorn M, Bonneau F, Stier G, Greiner S, Scheffzek K** (2003) Bacterial expression, purification and preliminary X-ray crystallographic characterization of the invertase inhibitor *Nt*-CIF from tobacco. *Acta Crystallographica D* 59: 2279-2282
- Hothorn M, D'Angelo I, Marquez JA, Greiner S, Scheffzek K** (2004a) The invertase inhibitor *Nt*-CIF from tobacco: a highly thermostable four-helix bundle with an unusual N-terminal extension. *Journal of Molecular Biology* 335: 987-995
- Hothorn M, Wolf S, Aloy P, Greiner S, Scheffzek K** (2004b) Structural insights into the target specificity of plant invertase and pectin methylesterase inhibitory proteins. *The Plant Cell* 16: 3437-3447
- Huang LF, Bock P, Davis JM, Koch KE** (2007) Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *Functional Plant Biology* 34: 499-507
- Humbeck K, Krupinska K** (2003) The abundance of minor chlorophyll a/b-binding proteins CP29 and LHCl of barley (*Hordeum vulgare* L.) during leaf senescence is controlled by light. *Journal of Experimental Botany* 54: 375-383
- Hunt S** (2002) Measurements of photosynthesis and respiration in plants. *Physiologia Plantarum* 117: 314-325
- Hupp S** (2006) Interaktion von *Arabidopsis thaliana* und *Pseudomonas syringae*: Autofluoreszenzmarkierung und Levansucraseaktivität des Pathogens. Diplomarbeit. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg
- Isla MI, Vattuone MA, Ordonez RM, Sampietro AR** (1999) Invertase activity associated with the walls of *Solanum tuberosum* tubers. *Phytochemistry* 50: 525-534
- Jakobek JL, Smith JA, Lindgren PB** (1993) Suppression of bean defense responses by *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 5: 57-63

- Jang JC, Sheen J** (1994) Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6: 1665–1679
- Jang JC, Sheen J** (1997) Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* 2: 208-214
- Jaynes TA, Nelson OE** (1971) An invertase inactivator in maize endosperm and factors affecting inactivation. *Plant Physiology* 47: 629-634
- Jobic C, Boisson AM, Gout E, Rascle C, Fevre M, Cotton P, Bligny R** (2007) Metabolic processes and carbon nutrient exchanges between host and pathogen sustain the disease development during sunflower infection by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Planta* 226: 251-265
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Kagan IA, Hammerschmidt R** (2002) *Arabidopsis* ecotype variability in camalexin production and reaction to infection by *Alternaria brassicicola*. *Journal of Chemical Ecology* 28: 2121-2140
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291
- Katagiri F, Thilmony R, He SY** (2002) The *Arabidopsis thaliana* – *Pseudomonas syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists
- Kautsky H, Hirsch A** (1931) Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften* 19: 964
- Kim JY, Mahe A, Brangeon J, Prioul JL** (2000) A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiology* 124: 71-84
- Kingston-Smith AH, Walker RP, Pollock CJ** (1999) Invertase in leaves: conundrum or control point? *Journal of Experimental Botany* 50: 735-743
- Kirsch C, Logemann E, Lippok B, Schmelzer E, Hahlbrock K** (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated *CMPG1* gene in *Petroselinum crispum*. *The Plant Journal* 26: 1–12
- Kiso T, Hamayasu K, Fujita K, Hara K, Kitahata S, Nakano H** (2003) Inhibition of β -fructofuranosidases and α -Glucosidases by synthetic thio-fructofuranoside. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67: 1719-1724
- Koch E, Slusarenko AJ** (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *The Plant Cell* 2: 437-445
- Koch KE** (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annual Reviews of Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 509-540
- Koch KE, Wu Y, Xu J** (1996) Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *Journal of Experimental Botany* 47: 1179-1185
- van Kooten O, Snel JFH** (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* 25: 147-150
- Kramer DM, Johnson G, Kiirats O, Edwards GE** (2004) New fluorescence parameters for the determination of Q_A redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthesis Research* 79: 209-218
- Krause GH, Weis E** (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annual Reviews of Physiology and Plant Molecular Biology* 42: 313-349

- Krause GH, Jahns P** (2003) *Pulse Amplitude Modulated Chlorophyll Fluorometry and its Application in Plant Science*. In: Green, B.R., Parson, W.W. (Hrsg.): *Light-Harvesting antennas in Photosynthesis*, Kluwer Academic Publishers, Niederlande, 2003: 373-399
- Krausgrill S, Greiner S, Koster U, Vogel R, Rausch T** (1998) In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operates as a regulatory switch of cell wall invertase. *The Plant Journal* 13: 275-280
- Krishnan H, Pueppke SG** (1990) Cherry fruit invertase: partial purification, characterization and activity during fruit development. *Journal of Plant Physiology* 135: 662-666
- La Camera S, Geoffroy P, Samaha H, Ndiaye A, Rahim G, Legrand M, Heitz T** (2005) A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 44: 810-825
- Lapcik O, Honys D, Koblowska R, Mackova Z, Vitkova M, Klejdus B** (2006) Isoflavonoids are present in *Arabidopsis thaliana* despite the absence of any homologue to known isoflavonoid synthases. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 106-114
- Lauer K** (2006) *Nt-VIF – ein proteinogener Inhibitor der vakuolären Invertasen in Tabak*. Dissertation. Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Heidelberg
- Lee HI, Leon J, Raskin I** (1995) Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 4076-4079
- Lee HS, Sturm A** (1996) Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot. *Plant Physiology* 112: 1513-1522
- Legler G** (1990) Glycoside hydrolases: mechanistic information from studies with reversible and irreversible inhibitors. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 71: 319-384
- Leipner J, Oxborough K, Baker NR** (2001) Primary sites of ozone-induced perturbations of photosynthesis in leaves: identification and characterization in *Phaseolus vulgaris* using high resolution chlorophyll fluorescence imaging. *Journal of Experimental Botany* 52: 1689-1696
- Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ** (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metabolic Engineering* 4: 67-79
- Leveau JHJ, Lindow SE** (2001) Appetite of an epiphyte: Quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98: 3446-3453
- Levitt J** (1980) *Responses of Plants to Environmental Stresses*, Vol.1 Academic Press. New York
- Libault M, Wan J, Czechowski T, Udvardi M, Stacey G** (2007) Identification of 118 *Arabidopsis* transcription factor and 30 ubiquitin-ligase genes responding to chitin, a plant-defense elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 900-911
- Lichtenthaler HK, Miede JA** (1997) Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress. *Trends in Plant Science* 2: 316-320
- Lichtenthaler HK** (1998) The Stress concept in plants: An introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851: 187-198
- Lindenthal M, Steiner U, Dehne HW, Oerke EC** (2005) Effect of downy mildew development on transpiration of cucumber leaves visualized by digital infrared thermography. *Phytopathology* 95: 233-240
- Link M, Rausch T, Greiner S** (2004) In *Arabidopsis thaliana*, the invertase inhibitors AtC/VIF1 and 2 exhibit distinct target enzyme specificities and expression profiles. *FEBS Letters* 573: 105-109

- Lohaus G, Heldt HW, Osmond CB** (2000) Infection with phloem limited *Abutilon* mosaic virus causes localized carbohydrate accumulation in leaves of *Abutilon striatum*: Relationships to symptom development and effects on chlorophyll fluorescence quenching during photosynthetic induction. *Plant Biology* 2: 161-167
- Lorenzini G, Guidi L, Nali C, Soldatini GF** (1999) Quenching analysis in poplar clones exposed to ozone. *Tree Physiology* 19: 607-612
- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgen A, Schmid J, Lawton K, Dangl JL, Dietrich RA** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics* 26: 403–410
- Mallick N, Mohn FH** (2002) Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55: 64-69
- Matsushita K, Uritani I** (1976) Isolation and characterization of acid invertase inhibitor from sweet potato. *The Journal of Biochemistry* 3: 633-639
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ** (1994) Downy mildew of *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis-an Atlas of Morphology and Development* (Bowman J ed.), pp. 414-417. New York: Springer
- Maude RB, Humpherson-Jones FM** (1980) Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot (*Alternaria brassicicola*) and grey leaf spot (*Alternaria brassicae*) of *Brassicas*. *Annals of Applied Biology* 95: 311-319
- Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668
- Mazzinghi P, Agati G, Fusi F** (1994) Interpretation and physiological significance of blue-green and redvegetation fluorescence. *Institute of Electrical and Electronics Engineers Xplore* 1: 640-642
- Meng Q, Siebke K, Lippert P, Baur B, Mukherjee U, Weis E** (2001) Sink-source transition in tobacco leaves visualized using chlorophyll fluorescence imaging. *New Phytologist* 151: 585-595
- Menke FLH, Champion A, Kijne JW, Memelink J** (1999) A novel jasmonate- and elicitor-responsive element in the periwinkle secondary metabolite biosynthetic gene *Str* interacts with a jasmonate- and elicitor-inducible AP2-domain transcription factor, ORCA2. *The EMBO Journal* 18: 4455–4463
- Miller ME, Chourey PS** (1992) The maize invertase-deficient miniature-1 seed mutation is associated with aberrant pedicel and endosperm development. *The Plant Cell* 4: 297-305
- Mitsuhashi W, Sasaki S, Kanazawa A, Yang YY, Kamiya Y, Toyomasu T** (2004) Differential expression of acid invertase genes during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 68: 602–608
- Molyneux RJ, Pan YT, Goldmann A, Tepfer DA, Elbein AD** (1993) Calystegins, a novel class of alkaloid glycosidase inhibitors. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 304: 81-88
- Moore I, Samalova M, Kurup S** (2006) Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *The Plant Journal* 45: 651-683
- Morales F, Cerovic ZG, Moya I** (1994) Characterization of blue-green fluorescence in the mesophyll of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves affected by iron-deficiency. *Plant Physiology* 106: 127-133
- Morales F, Cartelat A, Álvarez-Fernández A, Moya I, Cerovic ZG** (2005) Time-resolved spectral studies of blue-green fluorescence of artichoke (*Cynara cardunculus* L. Var. *Scolymus*) leaves: Identification of chlorogenic acid as one of the major fluorophores and age-mediated change. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 9668 –9678
- Morris D, Arthur ED** (1984) Invertase and auxin-induced elongation in internodal segments of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 23: 2163-2167

- Mouly A, Roby D** (1988) Decrease in messenger RNA coding for the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in sunflower plants infected with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiology and Biochemistry* 26: 165–172
- Mur LAJ, Carver TLW, Prats E** (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany* 57: 489-505
- Nakano H, Murakami H, Shizuma M, Kiso T, de Araujo TL, Kitahata S** (2000) Transfructosylation of thiol group by β -fructofuranosidases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64: 1472-1476
- Nakano T, Suzuki K, Ohtsuki N, Tsujimoto Y, Fujimura T, Shinshi H** (2006) Identification of genes of the plant-specific transcription-factor families cooperatively regulated by ethylene and jasmonate in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research* 119: 407-413
- Nawrath C, Metraux JP** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *The Plant Cell* 11: 1393-1404
- Nedbal L, Soukupova J, Kaftan D, Whitmarsh J, Trtilek M** (2000) Kinetic imaging of chlorophyll fluorescence using modulated light. *Photosynthesis Research* 66: 3-12
- Nguyen-Quoc B, Foyer CH** (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany* 52: 881-889
- Nickstadt A, Thomma BPHJ, Feussner I, Kangasjärvi J, Scheel D, Berger S** (2004) The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Molecular Plant Pathology* 5: 425-434
- Obenland DM, Simmen U, Boller T, Wiemken A** (1993) Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *Plant Physiology* 101: 1331-1339
- Oltmanns H** (2005) Funktionsanalyse der Linker-Histon Genfamilie aus *Arabidopsis thaliana* mit doppelsträngiger RNA und Expressionsanalyse gewebespezifischer Promotoren aus der Zuckerrübe. Dissertation. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig
- Oxborough K** (2004) Imaging of chlorophyll fluorescence: theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of Experimental Botany* 55: 1195-1205
- Padidam M** (2003) Chemically regulated gene expression in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 169-177
- Palmer HJ, Paulson KE** (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutrition Reviews* 55: 353-361
- Parker JE, Holub EB, Frost LN, Falk A, Gunn ND, Daniels MJ** (1996) Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *The Plant Cell* 8: 2033–2046
- Pattanamahakul P, Strange RN** (1999) Identification and toxicity of *Alternaria brassicicola*, the causal agent of dark leaf spot disease of *Brassica* species grown in Thailand. *Plant Pathology* 48: 749-755
- Pelleschi S, Guy S, Kim JY, Pointe C, Mahe A, Barthes L, Leonardi A, Prioul JL** (1999) *lvr2*, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene-specific expression under water stress. *Plant Molecular Biology* 39: 373-380
- Penninckx IA, Thomma BP, Buchala A, Metraux JP, Broekaert WF** (1998) Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 10: 2103-2113
- Peterson RB, Aylor DE** (1995) Chlorophyll fluorescence induction in leaves of *Phaseolus vulgaris* infected with bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Plant Physiology* 108: 163-171

- Petnicki-Ocwieja T, Schneider DJ, Tam VC, Chancey ST, Shan L, Jamir Y, Schechter LM, Janes MD, Buell CR, Tang X, Collmer A, Alfano JR** (2002) Genomewide identification of proteins secreted by the Hrp type III protein secretion system of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 99: 7652-7657
- Pieterse CMJ, van Wees SCM, van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, van Loon LC** (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. The Plant Cell 10: 1571-1580
- Pieterse CMJ, van Loon LC** (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. Trends in Plant Science 4: 52-58
- Pfündel EE** (2003) Action of UV and visible radiation on chlorophyll fluorescence from dark-adapted grape leaves (*Vitis vinifera* L.). Photosynthesis Research 75: 29-39
- Porra RJ, Thompson WA, Kriedemann PE** (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. Biochimica et Biophysica Acta 975: 384-394
- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C** (2004) Invited review: Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: Promoters used in plant transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 40: 1-22
- Pressey R** (1967) Invertase inhibitor from potatoes: purification, characterization and reactivity with plant invertases. Plant Physiology 42: 1780–1786
- Pressey R** (1968) Invertase inhibitors from red beet, sugar beet, and sweet potato roots. Plant Physiology 43: 1430–1434
- Pressey R** (1994) Invertase inhibitor in tomato fruit. Phytochemistry 36: 543-546
- Preston GM** (2000) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. Molecular Plant Pathology 1: 263-275
- Proels RK, Hause B, Berger S, Roitsch T** (2003) Novel mode of hormone induction of tandem tomato invertase genes in floral tissues. Plant Molecular Biology 52: 191-201
- Quirino BF, Bent AF** (2003) Deciphering host and pathogen virulence: the *Arabidopsis*/*Pseudomonas* interaction as a model. Molecular Plant Pathology 4: 517-530
- Raacke IC, van Rad U, Mueller MJ, Berger S** (2006) Yeast increases resistance in *Arabidopsis* against *Pseudomonas syringae* and *Botrytis cinerea* by salicylic acid-dependent as well as – independent mechanisms. Molecular Plant Microbe Interactions 19: 1138-1146
- Rascher U, Hütt MT, Siebke K, Osmond B, Beck F, Lüttge U** (2001) Spatiotemporal variation of metabolism in a plant circadian rhythm: The biological clock as an assembly of coupled individual oscillators. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 98: 11801-11805
- Rausch T and Greiner S** (2004) Plant protein inhibitors of invertases. Biochimica et Biophysica Acta 1696: 253-261
- Rauscher MD** (2001). Co-evolution and plant resistance to natural enemies. Nature 411: 857-864
- Rogers EE, Glazebrook J, Ausubel FM** (1996) Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. Molecular Plant Microbe Interactions 9: 748-757
- Rohacek K** (2002) Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. Photosynthetica 40: 13-29

- Roitsch T** (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198-206
- Roitsch T** (2004) Plant responses to stress: Source-sink regulation by stress. *Encyclopedia of plant and crop sciences*, Marcel Dekker Inc., New York, 1010-1013
- Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK** (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54: 513-524
- Roitsch T, Bittner M, Godt DE** (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analog and tissuespecific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology* 108: 285-294
- Roitsch T, Ehneß R** (2000) Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation* 32: 359–367
- Roitsch T, Ehness R, Goetz M, Hause B, Hofmann M, Sinha AK** (2000) Regulation and function of extracellular invertase from higher plants in relation to assimilate partitioning, stress responses and sugar signalling. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 815-825
- Roitsch T, Gonzalez MC** (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606–613
- Roitsch T, Tanner W** (1995) Cell Wall Invertase: Bridging the Gap. *Botanica Acta* 109: 90-93
- Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J** (2006) Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 675–709
- Rosenkranz H, Vogel R, Greiner S, Rausch T** (2001) In wounded sugar beet (*Beta vulgaris* L.) tap-root, hexose accumulation correlates with the induction of a vacuolar invertase isoform. *Journal of Experimental Botany* 52: 2381-2385
- Ross HA, McRae D, Davies HV** (1996) Sucrolytic enzyme activities in cotyledons of the Faba bean. Developmental changes and purification of alkaline invertase. *Plant Physiology* 111: 329-338
- Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, Lippok B, Somssich I** (2002) Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *The Plant Cell* 14: 749-762
- Rushton PJ, Torres JT, Parniske M, Wernert P, Hahlbrock K, Somssich IE** (1996) Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *The EMBO Journal* 15: 5690–5700
- Russell AW, Critchley C, Robinson SA, Franklin LA, Seaton GGR, Chow WS, Anderson JM, Osmond CB** (1995) Photosystem II regulation and dynamics of the chloroplast D1 protein in *Arabidopsis* leaves during photosynthesis and photoinhibition. *Plant Physiology* 107: 943-952
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD** (1996) Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809-1819
- Salin M** (1987). Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Plant Physiology* 72: 681-689
- Samalova M, Brzobohaty B, Moore I** (2005) pOp6/LhGR: a stringently regulated and highly responsive dexamethasone-inducible gene expression system for tobacco. *The Plant Journal* 41: 919-935
- Sampietro AR, Vattuone MA, Prado FE** (1980) A regulatory invertase from sugar cane leafsheaths. *Phytochemistry* 19: 1637-1642
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467

- Sauer N** (2007) Molecular physiology of higher plant sucrose transporters. *FEBS Letters* 581: 2309-2317
- Scharte J, Schön H, Weis E** (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell & Environment* 28: 1421-1435
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Sommerville SC, Manners JM** (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 11655-11660
- Scholes JD, Rolfe SA** (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta* 199: 573-582
- Scholl Y, Höke D, Dräger B** (2001) Calystegines in *Calystegia sepium* derive from the tropane alkaloid pathway. *Phytochemistry* 58: 883-889
- Schreiber U** (2004) Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview. In: Papageorgiou G, Govindjee (eds) Chlorophyll a fluorescence. A signature of photosynthesis. Springer, Dordrecht, pp 279-319
- Schwimmer S, Makower RU, Romem ES** (1961) Invertase and invertase inhibitor in potato. *Plant Physiology* 36: 313-316
- Selye H** (1936) A syndrome produced by various nucuous agents. *Nature* 138: 32-34
- Sergeeva LI, Keurentjes JJB, Bentsink L, Vonk J, Van der Plas LHW, Koornneef M, Vreugdenhil D** (2006) Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 2994-2999
- Shah J** (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 365-371
- Sherson SM, Alford HL, Forbes SM, Wallace G, Smith SM** (2003) Roles of cell-wall invertases and monosaccharide transporters in the growth and development of *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 54: 525-531
- Sigurskjold BW, Berland CR, Svensson B** (1994) Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by displacement titration calorimetry. *Biochemistry* 33: 10191-10199
- Sinha AK, Hofmann MG, Romer U, Kockenberger W, Elling L, Roitsch T** (2002) Metabolizable and non-metabolizable sugars activate diVerent signal transduction pathways in tomato. *Plant Physiology* 28: 1480-1489
- Sinnott ML** (1990) Catalytic mechanisms of enzymic glycosyl transfer. *Chemical Reviews* 90: 1171-1202
- Slusarenko AJ, Schlaich NL** (2003) Downy mildew of *Arabidopsis thaliana* caused by *Hyaloperonospora parasitica* (formerly *Peronospora parasitica*). *Molecular Plant Pathology* 4: 159-170
- Soylu S** (2006) Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathovars of *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* 170: 942-952
- Staskawicz BJ, Ausubel FM, Baker BJ, Ellis JG, Jones JDG** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667
- Stober F, Lichtenthaler HK** (2005) Studies on the constancy of the blue and green fluorescence yield during the chlorophyll fluorescence induction kinetics (Kautsky effect). *Radiation and Environmental Biophysics* 32: 357-365
- Stuiver MH, Custers JHHV** (2001) Engineering disease resistance in plants. *Nature* 411: 865-868

- Sturm A** (1999) Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. *Plant Physiology* 121: 1-7
- Sturm A, Chrispeels MJ** (1990) cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *The Plant Cell* 2: 1107-1119
- Sturm A, Tang GQ** (1999) The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science* 4: 401-407
- Summermatter K, Meuwly P, Mölders W, Métraux JP** (1994) Salicylic acid levels in *Arabidopsis thaliana* after treatments with *Pseudomonas syringae* or synthetic inducers. *Acta Horticulturae* 381: 367-370
- Sung SJS, Xu DP, Black CC** (1989) Identification of actively filling sucrose sinks. *Plant Physiology* 89: 1117-1121
- Svensson B, Sierks MR** (1992) Role of the aromatic side chains in the binding of substrates, inhibitors, and cyclomalto-oligosaccharides to the glucoamylase from *Aspergillus niger* probed by perturbation difference spectroscopy, chemical modification, and mutagenesis. *Carbohydrate Research* 227: 29-44
- Swarbrick PJ, Schulze-Lefert P, Scholes JD** (2006) Metabolic consequences of susceptibility and resistance in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell & Environment* 29: 1061-1076
- Takahashi S, Tamashiro A, Sakihama Y, Yamamoto Y, Kawamitsu Y, Yamasaki H** (2002) High-susceptibility of photosynthesis to photoinhibition in the tropical plant *Ficus microcarpa* L. f. cv. Golden Leaves. *BMC Plant Biology* 2: 2
- Tamaoki M, Freeman JL, Pilon-Smits EAH** (2008) Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146: 1219-1230
- Tambussi EA, Bartoli CG, Guiamet JJ, Beltrano J, Araus JL** (2004) Oxidative stress and photodamage at low temperatures in soybean (*Glycine max* L. Merr.) leaves. *Plant Science* 167: 19-26
- Tang GQ, Luscher M, Sturm A** (1999) Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning. *The Plant Cell* 11: 177-189
- Tang W, Luo X, Samuels V** (2004) Regulated gene expression with promoters responding to inducers. *Plant Science* 166: 827-834
- Tang X, Ruffner HP, Scholes JD, Rolfe SA** (1996) Purification and characterization of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 198: 17-23
- Tao Y, Xie X, Chen W, Glazebrook J, Chang H, 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*. *The Plant Cell* 15: 317-330
- Tepfer D, Goldmann A, Pamboukdjian N, Maille M, Lepingle A, Chevalier D, Denarie J, Rosenberg C** (1988) A plasmid of *Rhizobium meliloti* 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of *Calystegium sepium*. *Journal of Bacteriology* 170: 1153-1161
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796-815
- Thilmony R, Underwood W, He SY** (2006). Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli*. *The Plant Journal* 46: 34-53
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{CO11} complex during jasmonate signalling. *Nature* 448: 661-665

- Thomas H** (2001) Acarbose-Metabolismus in *Actinoplanes* sp. SE50/110. Dissertation, Bergische Universität Gesamthochschule Wuppertal, Wuppertal
- Thomma BPHJ, Eggermont K, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Vogelsang R, Cammue BPA, Broekaert WF** (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defence-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 95: 15107-15111
- Thomma BPHJ, Nelissen I, Eggermont K, Broekaert WF** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. The Plant Journal 19: 163-171
- Thomma BPHJ, Penninckx IA, Broekaert WF, Cammue BP** (2001) The complexity of disease signaling in *Arabidopsis*. Current Opinion in Immunology 13: 63-68
- Thomma BPHJ, Tierens KFM, Penninckx IAMA, Mauch-Mani B, Broekaert WF, Cammue BPA** (2001a) Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways. Plant Physiology and Biochemistry 39: 673-680
- Thomma BPHJ** (2003) *Alternaria* ssp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology 4: 225-236
- Tombolini R, Unge A, Davey ME, de Bruijn FJ, Jansson JK** (1997) Flow cytometric and microscopic analysis of GFP-tagged *Pseudomonas fluorescens* bacteria FEMS Microbiology Ecology 22: 17-28
- Tranbarger TJ, Al-Ghazi Y, Muller B, Teyssendier de la Serve B, Dumas P, Touraine B** (2003) Transcription factor genes with expression correlated to nitrate-related root plasticity of *Arabidopsis thaliana*. Plant, Cell and Environment 26: 459-469
- Trouverie J, Chateau-Joubert C, Thevenot C, Jacquemot MP, Prioul JL** (2004) Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. Planta 219: 894-905
- Tsuji J, Jackson EP, Gage DA, Hammerschmidt R, Somerville SC** (1992) Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Physiology 98: 1304-1309
- Tymowska-Lalanne Z, Schwebel-Dugue N, Lecharny A, Kreis M** (1996) Expression and cis-acting elements of the *Atβfruct1* gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a cell wall invertase. Plant Physiology and Biochemistry 34: 431-442
- Tymowska-Lalanne Z, Kreis M** (1998) The plant invertases: Physiology, biochemistry and molecular biology. Advances in Botanical Research 28: 71-117
- Ülker B, Somssich IE** (2004) WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. Current Opinion in Plant Biology 7: 491-498
- Van den Ende W, Michiels A, De Roover J, Verhaert P, Van Laere A** (2000) Cloning and functional analysis of chicory root fructan 1-exohydrolase I (1-FEH I): a vacuolar enzyme derived from a cell-wall-invertase ancestor? Mass fingerprint of the 1-FEH I enzyme. The Plant Journal 24: 447-456
- van Hulten M, Pelser M, van Loon LC, Pieterse CMJ, Ton J** (2006) Costs and benefits of priming for defense in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 103: 5602-5607
- van Wees SCM, de Swart EAM, van Pelt JA, van Loon LC, Pieterse CMJ** (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 97: 8711-8716

- Vasconsuelo A, Boland R** (2007) Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant Science* 172: 861-875
- Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG, Memelink J** (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters* 21: 467-479
- Vijn I, Smeekens S** (1999) Fructan: more than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351-360
- Voegelé RT, Wirsel S, Moll U, Lechner M, Mendgen K** (2006) Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 625-634
- Vöisey CR, Slusarenko A** (1989) Chitinase mRNA and enzyme activity in *Phaseolus vulgaris* (L.) increase more rapidly in response to avirulent than to virulent cells of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 403-412
- Walter A, Rascher U, Osmond B** (2003) Transitions in photosynthetic parameters of midvein and interveinal regions of leaves and their importance during leaf growth and development. *Plant Biology* 6: 184-191
- Warabieda W, Borkowska B** (2004) Chlorophyll a fluorescence as a diagnostic tool for assessment of apple resistance against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch.). *EJPAU* 7: Horticulture
- Wasternack C** (2007) Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697
- Wehmeier U** (2004) Acarbose, ein therapeutisch eingesetzter Wirkstoff: Biosynthese und Funktion. *BIOspektrum* 1: 34-36
- Weil M, Krausgrill S, Schuster A, Rausch T** (1994) A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an *in-vitro* inhibitor of the cellwall isoform of acid invertase. *Planta* 193: 438-445
- Weil M, Rausch T** (1990) Cell wall invertase in tobacco crown gall cells enzyme properties and regulation by auxin. *Plant Physiology* 94: 1575-1581
- Weinmann P, Gossen M, Hillen W, Bujard H, Gatz C** (1994) A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants. *The Plant Journal* 5: 559-569
- Weiss U, Edwards JM** (1980) The biosynthesis of aromatic compounds. New York/Chichester: Willey-Interscience, 728
- West JD, Peak D, Peterson JQ, Mott KA** (2005) Dynamics of stomatal patches for a single surface of *Xanthium strumarium* L. leaves observed with fluorescence and thermal images. *Plant, Cell, and Environment* 28: 633-641
- Westman AL, Kresovich S, Dickson MH** (1999) Regional variation in *Brassica nigra* and other weedy crucifers for disease reaction to *Alternaria brassicicola* and *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Euphytica* 106: 253-259
- Whalen MC, Innes RW, Bent AF, Staskawicz BJ** (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *The Plant Cell* 3: 49-59
- Wildermuth MC, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM** (2001) Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 414: 562-565
- Wobus U, Weber H** (1999) Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry* 380: 937-944

- Wright D, Baldwin B, Shephard M, Scholes J** (1995) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 237-253
- Wrodnigg TM, Diness F, Gruber C, Häusler H, Lundt I, Rupitz K, Steiner AJ, Stütz AE, Tarling CA, Withers SG, Wölfler H** (2004) Probing the aglycon binding site of a β -glucosidase: a collection of C-1-modified 2,5-dideoxy-2,5-imino-D-mannitol derivatives and their structure–activity relationships as competitive inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12: 3485-3495
- Wykoff DD, Davies JP, Melis A, Grossman AR** (1998) The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 117: 129-139
- Xu J, Avigne WT, McCarty DR, Koch KE** (1996) A similar dichotomy of sugar modulation and developmental expression affects both paths of sucrose metabolism: Evidence from a maize invertase gene family. *The Plant Cell* 8: 1209-1220
- Yamaguchi H** (2002) Chaperone-like functions of *N*-glycans in the formation and stabilization of protein conformation. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* 14: 127–139
- Yang Y, Shah J, Klessig DF** (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes & Development* 11: 1621-1639
- Zhao Y, Thilmony R, Bender CL, Schaller A, He SY, Howe GA** (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal* 36: 485-499
- Zheng Z, Mosher SL, Fan B, Klessig DF, Chen Z** (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BioMed Central Plant Biology* 7: 2
- Zhu JY, Albert HH, Moore PH** (2000) Differential expression of soluble acid invertase genes in the shoots of high-sucrose and low-sucrose species of *Saccharum* and their hybrids. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 193-199
- Zeier J, Pink B, Mueller MJ, Berger S** (2004) Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and *PR-1* accumulation. *Planta* 219: 673-683
- Zimmermann P, Hirsch-HoVmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiology* 136: 2621–2632
- Zrenner R, Schuler K, Sonnewald U** (1996) Soluble acid invertase determines the hexose-to-sucrose ratio in cold-stored potato tubers. *Planta* 198: 246-252
- Zuo J, Niu, QW, Chua NH** (2000). An estrogen receptor–based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal* 24: 265–273

Veröffentlichungen

Bonfig K, Muhammad N, Sinha A, Berger S, Zeier J, Gabler A, Roitsch T (2008) Release of invertase inhibition in source leaves is part of the plant defence response, in Vorbereitung

Hennig A, Bonfig K, Roitsch T, Warzecha H (2007) Production of the recombinant outer surface protein A (OspA) in tobacco chloroplasts leads to thylakoid localization and loss of photosynthesis. *The FEBS Journal* 274: 5749-5758

Bonfig K, Berger S, Fatima T, Gonzalez M, Roitsch T (2007) Metabolic control of seedling development by invertases. *Functional Plant Biology* 34: 508-516 ©

Die Publikation steht bei CSIRO PUBLISHING als Originalveröffentlichung zum Abruf zur Verfügung: <http://www.publish.csiro.au/nid/103/issue/3377.htm>

Bonfig K, Schreiber U, Gabler A, Roitsch T, Berger S (2006) Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* 225: 1-12 ©

Die Publikation steht beim Springer-Verlag als Originalveröffentlichung zum Abruf zur Verfügung: <http://www.springerlink.com/>

Bonfig K, Roitsch T (2006) Erhöhung der Pathogenresistenz durch Förderung der gewebsspezifischen Versorgung mit Kohlenhydraten. In: Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (Ed.) *Gentechnik für Umwelt und Verbraucherschutz*: 17-28

Bonfig K, Roitsch T (2006) Chlorophyll-Fluoreszenz-Bildgebung – Stoffwechselforgänge bei Pflanzen sichtbar machen. *BioForum* 29: 22-24

Berger S, Benediktyová Z, Matouš K, Bonfig K, Nedbal L, Roitsch T (2006) Visualization of early and late plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: Differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797-806

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Roitsch danke ich für die Betreuung meines Projektes, dem steten Interesse an meiner Arbeit und für die Ermöglichung der Teilnahme an Fachtagungen und Kongressen.

Herrn Prof. Dr. Werner Kaiser danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ebenso möchte ich allen Wissenschaftlern danken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, indem sie Versuchsdaten oder Material beisteuerten oder sich an der Auswertung der Ergebnisse beteiligten, insbesondere Gwyn Beattie, Werner Kaiser, Ian Moore, Thomas Rausch, Ulrich Schreiber, Nikolaus Schlaich, Imre Somssich und Jürgen Zeier.

Mein herzlicher Dank gilt Susanne, Thomas, Tahira, Andrea, MariCruz, Christine, Jörg, Sabrina, Taekyung, Nasseem, Joachim, Barbara, Martin, Alok und Eva sowie allen weiteren jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern und Praktikanten des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie. Vielen vielen Dank, lieber TomTom!

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kubeczka danke ich für die vielen netten Gespräche.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und Chris!

„Ich bin immer noch verwirrt, aber auf einem höheren Niveau.“

Enrico Fermi

Lebenslauf

Katharina Barbara Bonfig

Geburtsdatum: 07.03.1980
Geburtsort: Bad Neustadt a. d. Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch

Hochschulstudium/Promotionsstudium

seit 02/2005 Promotion am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

03/2007 – 02/2008 Assoziierte Kollegiatin des Graduiertenkollegs 1342 „Molekulare und funktionelle Analyse Lipid-basierter Signaltransduktionssysteme“

10/1999 – 12/2004 Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Abschluss: Diplom-Biologin Univ.

04/2003 – 06/2003 Forschungsaufenthalt am Institute of Systems Biology and Ecology an der Academy of Sciences of the Czech Republic, Nové Hradý, Tschechien

Schulische Ausbildung

09/1990 – 06/1999 Gymnasium Bad Königshofen
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1986 – 07/1990 Grundschule Saaletal

Ehrenwörtliche Erklärung

gemäß § 4 Abs. 3 Ziff 3, 5 und 8
der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich habe bisher noch keinen akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

.....
Katharina B. Bonfig