



**Laser Mikrodisektion als Tool für
gewebespezifische Expressionsanalysen in Pflanzen:
Methodik und Anwendung**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades

angefertigt am

Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie und Biophysik

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Christina Larisch

geboren in Mellrichstadt

Würzburg 2011

Eingereicht am: 15. Dezember 2011

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Wolfgang Rössler
erster Gutachter:	Prof. Dr. Rainer Hedrich
zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Heinz Rennenberg

Tag des Promotionskolloquiums: 23. März 2012

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die durch ihre Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein persönlicher Dank gilt dabei besonders

Dr. Peter Ache für die gute Betreuung während meiner Doktorarbeit, für die Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die Anregungen zur Bearbeitung und Weiterentwicklung von Thema und Technik,

Prof. Dr. Rainer Hedrich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Arbeitsgruppe am Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg anfertigen zu können, die Bereitschaft, sich als Gutachter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen, sowie die Zwischenfinanzierungen,

Prof. Dr. Heinz Rennenberg für die Bereitschaft, sich als Gutachter dieser Dissertation zur Verfügung zu stellen,

Susanne Michel für die Einführung in die LMPC-Technik und dafür, dass sie auch in München meine Hilferufe noch gehört hat,

„meinen“ TAs, Elke, Brigitte und Maria, die nie die Geduld mit mir und meinem Projekt verloren haben, auch wenn sie lernen mussten, wie lang 3,5 min sein können,

allen meinen HiWis für die Ausdauer beim Probensammeln, meist im Dunkeln sitzend, sowie die unzähligen Sudokus,

der Infiltrationskolonne, die nie daran geglaubt hat, dass es irgendwann wirklich ein „letztes Mal“ gibt,

der Mittagessens- und Kaffeepausenrunde für die skurrilen und lehrreichen Diskussions-themen, die schöne Zeit zusammen und dafür, dass sie einen stets motiviert haben und immer einen Grund zum Lachen lieferten,

allen Kollegen und ehemaligen Mitarbeitern des Julius-von-Sachs-Instituts für das freundliche Arbeitsklima und ihre stete Hilfsbereitschaft,

allen fleißigen Helfern für das Korrekturlesen dieser Arbeit, in der das Wort Restriktions-enzym zur Enttäuschung eines Korrektors nicht auftaucht, sowie

meiner Familie und meinen Freunden für die jahrelange Unterstützung und den Rückhalt vor, während und (hoffentlich) nach dieser Arbeit.



1. Einleitung	1
1.1 LMPC – Lasermicrodissection and Pressure Catapulting	1
1.1.1 Laser Mikrodisektion an Pflanzen	1
1.1.2 PALM® MicroBeam	3
1.1.3 Gewebespezifische Expressionsanalysen in Pflanzen.....	6
1.2 Abwehrreaktionen bei Pflanzen	7
1.2.1 Basale und Gen-für-Gen-Resistenz	7
1.2.2 Systemische Resistenz	10
1.2.3 Phloem-mobile Signale	14
1.2.4 Jasmonsäure	16
1.2.5 Age-related Resistance (ARR)	18
1.3 Pappel – ein Modell für baumspezifische Fragestellungen	19
1.3.1 Die Pappel als Modellorganismus.....	19
1.3.2 Dormanz und Reaktivierung des Wachstums.....	19
1.3.3 Holzstrahlen	21
1.3.4 Charakteristika verschiedener Jahreszeiten	24
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	30
2. Material und Methoden	31
2.1 Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC)	31
2.1.1 Einbetten des Pflanzenmaterials	31
2.1.2 Herstellung und Vorbereitung der Dünnschnitte für die LMPC	34
2.1.3 LMPC.....	36
2.2 Infiltration von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit <i>Pseudomonas</i>.....	39
2.2.1 Kultivierung der Bakterien und Verdünnung des Inokulums.....	39
2.2.2 Infiltration	40
2.2.3 Ernten des Pflanzenmaterials	41
2.2.4 Zeitreihenexperimente	41
2.2.5 Überprüfung der Effizienz der SAR	42

2.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)	43
2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA aus eingebettetem und mikrodisektiertem Pflanzenmaterial.....	43
2.3.2 Isolation der Gesamt-RNA aus frischem Pflanzenmaterial	43
2.3.3 Überprüfung der RNA-Qualität	44
2.3.4 DNase-Verdau, Fällung und Reverse Transkription.....	45
2.3.5 mRNA-Amplifikation.....	46
2.4 Verfahren mit Desoxyribonucleinsäuren (DNA)	48
2.4.1 Quantitative Echtzeit-PCR (engl.: quantitative real time-PCR, qPCR)	48
2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese	51
2.4.3 DNA-Elution aus einem Agarose-Gel.....	51
2.5 Mikroarray-Analysen	52
2.5.1 Durchführung	52
2.5.2 Auswertung	53
2.6 Lösungen und Medien	54
3. Ergebnisse	55
3.1 Überprüfung der RNA-Qualität während der einzelnen Schritte des LMPC-Prozesses	55
3.1.1 Ethanol-Essigsäure-Fixierung	55
3.1.2 Paraffineinbettung und Färbung	56
3.1.3 LMPC-Dauer.....	57
3.1.4 Liquid CoverGlass	57
3.2 Differentielle Genexpression im Phloem von <i>Arabidopsis</i> während der Immunantwort auf eine Pathogeninfektion	59
3.2.1 Änderungen im Transkriptom des Phloems 24 Stunden nach Infektion mit <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> (<i>P.st</i>).....	59
3.2.2 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums	62
3.2.3 Zeitreihen-Experimente.....	65
3.2.4 Wiederholung der LMPC-Arrays.....	67

3.3 Saisonale Änderungen im Expressionsprofil von Pappel-Holzstrahlen	69
3.3.1 Mikroarray-Analysen – Qualität und Mapping	70
3.3.2 Top 500 – MapMan.....	72
3.3.3 Pathway-Analysen.....	74
3.3.4 Markergene im Jahresgang.....	80
3.3.5 Vergleich von Metabolit- und Expressionsmustern.....	83
4. Diskussion	86
4.1 Die Methode der Laser Mikrodisektion	86
4.1.1 Optimierung der Methode.....	86
4.1.2 Vor- und Nachteile der Methode.....	88
4.1.3 <i>Arabidopsis</i> Phloemareale	89
4.1.4 Pappel-Holzstrahlen.....	90
4.2 Signalweiterleitung im Phloem von <i>Arabidopsis</i> während der Antwort auf eine Infektion mit <i>Pseudomonas</i>.....	91
4.2.1 Mikroarray-Analysen des Phloemtranskriptoms 24 hpi	91
4.2.2 Zeitreihenexperimente	94
4.2.3 Individuelle Phloem-LMPC-Mikroarrays	96
4.3 Die zentrale Rolle der Pappel-Holzstrahlen während der saisonalen Umsteuerung	98
4.3.1 Bioinformatische Analyse der generierten Datensätze	98
4.3.2 Metabolitanalysen	100
4.3.3 Markergene im Jahresgang.....	101
4.3.4 Modell der saisonalen Abläufe	105
4.4 Methodisches Fazit	108
5. Zusammenfassung	111
6. Summary.....	113
7. Literaturverzeichnis.....	115

8. Anhang	132
8.1 Primersequenzen	132
8.1.1 <i>Arabidopsis</i> qPCR-Primer.....	132
8.1.2 Pappel qPCR-Primer	133
8.1.3 oligo-dT ₍₂₅₎	133
8.2 Ergebnisse der qPCR-Messungen der <i>Arabidopsis</i>-Zeitreihen.....	134
8.2.1 Blütenstiele (IS) infiltrierter Pflanzen	134
8.2.2 systemische Blätter (SL) infiltrierter Pflanzen	136
8.3 MapMan-Analyse der Pappel Top 500-Gene	138
8.3.1 Im Sommer induzierte physiologische Gruppen	138
8.3.2 In der späten Ruhephase induzierte physiologische Gruppen	139
8.4 Liste saisonal differenziell exprimierter Gene (Pappel)	140
8.5 λPst Marker.....	142
8.6 verwendete Materialien	143
8.6.1 verwendete Chemikalien.....	143
8.6.2 verwendete Kits.....	145
8.6.3 verwendetes Zubehör	146
8.6.4 verwendete elektronische Geräte.....	147
8.7 Abbildungsverzeichnis	148
8.8 Tabellenverzeichnis	149

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad C elsius
λ	Lambda, Wellenlänge
µg	M ikro g ramm
µl	M ikro l iter
µm	M ikro m eter
A	A denin
<i>A. th</i>	A rabidopsis th aliana
<i>A. thaliana</i>	A rabidopsis th aliana
ABA	Abscisinsäure (engl.: a bscisic a cid)
AG	A ktiengesellschaft
AGI	engl.: A rabidopsis G enome I nitiative
ARR	alterserworbene Resistenz (engl.: a ge- r elated r esistance)
<i>avr</i>	A virulenz
bp	B asen p aare
bzgl.	b ezü g lich
bzw.	b ezieun g s w eise
C	C ytosin
ca.	c irca
cDNA	komplementäre DNA (engl.: c omplementary d esoxyribonucleic a cid)
cfu	engl.: c olony f orming u nits
cm	Zenti m eter
Co. KG	C ompagnie K ommanditgesellschaft
Col-0	C olumbia- 0 (<i>A. th</i> Ecotyp)
C _T	Schwellenwert-Zyklus (engl.: t hreshold c ycle)
d. h.	d as h eißt
DEPC	D iethyl p yro c arbonat
DMSO	D imethyl s ulfo x id
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl.: d esoxyribonucleic a cid)
dpi	Tage nach Inokulation (engl.: d ays p ast i noculation)
engl.	e nglisch
ET	E thylen
<i>et al.</i>	und andere (lat.: e t a lii)
etc.	und so weiter (lat.: e t c etera)
ETI	engl.: e ffector- t riggered i mmunity
FC	Induktionsfaktor (engl.: f old c hange)
fg	F emtogramm
FG	F risch g ewicht
fwd	engl.: f or w ard
g	G ramm
G	G uanin
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²), engl.: standard g ravity
GC/MS	G aschromatographie mit M assens p ektrometrie
gesRNA	G esamt- R NA
ggf.	g egebenen f alls
GmbH	G esellschaft m it b eschränkter H aftung
GO	engl.: G ene O ntology
GSEA	„ G ene S et E nrichment“- A nalysen
GSF	S ephadex® G elfiltration

GSNOR	GSNO-Reduktase (GSNO = S-Nitrosoglutathion)
GUS	β - Glukuronidase
h	Stunde (lat.: h ora)
hpi	Stunden nach Inokulation (engl.: h ours p ost i noculation)
HR	hypersensitive Antwort/Reaktion (engl.: h ypersensitive r esponse)
i. e.	nämlich (lat.: i d e st)
inkl.	inkl usive
IS	Blütenstiel (engl.: i nflorescence s talk)
ISL	Blütenstielblätter (engl.: i nflorescence s talk l eaves)
ISR	induzierte systemische Resistenz (i nduced s ystemic r esistance)
JA	Jasmonsäure (engl.: j asmonic a cid)
K ⁺	K aliumion
KB	K ing's B roth
KEGG	K yoto E ncyclopedia of G enes and G enomes
kg	K ilogramm
l	L iter
lat.	l ateinisch
LCM	engl.: L aser C apture M icrodissection
LMD	L aser M ikro d issektion
LMPC	L aser M icrodissection and P ressure C atapulting
log	L ogarithmus
logFC	L ogarithmus zur Basis 2 des Induktionsfaktors (engl.: f old c hange)
LPC	engl.: L aser P ressure C atapulting
LTP	L ipid- T ransfer- P rotein
M	M olar
MAMPs	engl.: m icrobe- a ssociated m olecular p atterns
MAP	M itogen- a ktiviertes P rotein
MAPK	M itogen- a ktiviert e P rotei n kinase
MeSA	Methylsalizylsäure (engl.: m ethyl s alicylic a cid)
mg	M illigramm
min	M inuten
miRNA	m ikro- R NA
ml	M illiliter
mm	M illimeter
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: m essenger r ibonucleic a cid)
MW	M egawatt
nm	N anometer
nM	N anomolar
nt	N ukleotide
OD ₆₀₀	o ptische D ichte bei $\lambda = 600$ nm
OPDA	12-oxo-Phytodiensäure (engl.: <i>cis</i> (+) 12-oxo-phyto dienoic a cid)
<i>P. can</i>	P opulus x c anescens
<i>P. canescens</i>	P opulus x c anescens
<i>P.st</i>	P seudomonas s yringae pv. t omato
PAMPs	engl.: p athogen- a ssociated m olecular p atterns
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: p olymerase c hain r eaction)
PEN	P olyethylen- N aphthalat
pg	P icogramm
PM	P rimermix
PR	engl.: p athogenesis r elated
PRR	engl.: p attern r ecognition r eceptors

PTI	engl: p attern- t riggered i mmunity
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (engl.: q uantitative real time PCR)
R	R esistenz
rev	engl.: r everse
rif	R ifampicin
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: r ibon <u>u</u> cleic a cid)
RNase	R ibon <u>u</u> kle a se
ROS	reaktive Sauerstoffverbindungen (engl.: r eactive o xxygen s pecies)
RQI	engl.: R NA q uality i ndicator
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl.: r ibosomal r ibon <u>u</u> cleic a cid)
RT	R aum t emperatur
RT	R everse T ranskriptase/ R everse T ranskription
S	S vedberg
SA	Salizylsäure (engl.: s alicylic a cid)
SAR	systemisch erworbene Resistenz (engl.: s ystemic a cquired r esistance)
SD	Standardabweichung (engl.: s tandard d eviation)
siRNA	engl.: s mall i nterfering RNA
SL	systemische Blätter (engl.: s ystemic l eaves)
SNO	S-Nitrosothiol (Summenformel: R- SNO mit R = organische Gruppe)
sog.	s ogenannt
Std	S tandard
T	T ymidin
TAIR	t he A rabidopsis I nformation R esource
Tm	Annealing-Temperatur (engl.: m elting t emperature)
U	Einheit (engl.: U nit)
u. a.	u nter A nderem
UK	Vereinigtes Königreich (engl.: U nited K ingdom)
ÜN	ü ber N acht
USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl.: U nited S tates of A merica)
UV	u ltraviolett
V	V olt
v. a.	v or a llem
v/v	v olume per v olume (Volumenprozent)
vgl.	v ergleiche
vs.	gegen(über) (lat.: v ersus)
w/v	w eight per v olume (Gewichtsprozent)
z. B.	zum B eispiel
z. T.	zum T eil

1. Einleitung

1.1 LMPC – Lasermicrodissection and Pressure Catapulting

Die Laser Mikrodissektion (LMD) ist eine vielseitig einsetzbare Technik, die es ermöglicht, Gewebeteile oder einzelne Zellen eines bestimmten Typs aus heterogenen Gewebeschnitten zu isolieren ohne sie dabei zu beschädigen. Die isolierten Zellen können dann beispielsweise zur Analyse der in ihnen enthaltenen Transkripte, ihres Proteoms oder ihres Metaboloms verwendet werden. Im tierischen und humanmedizinischen Bereich findet diese Technik bereits seit längerer Zeit erfolgreich Anwendung. Besonders in der Krebsforschung spielt sie eine wichtige Rolle. Sie wird dabei sowohl für Analysen der Expressionsprofile (Wild *et al.*, 2005) als auch des Proteoms (Wulfskuhle *et al.*, 2001) eingesetzt. Es wurden bereits erfolgreiche Studien an jeweils 300-500 (DNA), 500-1.000 (RNA) bzw. 1.000-30.000 (Proteine) mikrodissektierten Zellen veröffentlicht (Wittliff and Erlander, 2002). Während DNA und RNA amplifiziert werden können, ist diese Möglichkeit bei der Untersuchung des Proteoms oder Metaboloms nicht gegeben, deshalb ist besonders hier die Materialmenge limitierend (Cowherd *et al.*, 2004).

Die Laser Mikrodissektion hat gegenüber anderen Methoden einige Vorteile: Sie ist einfach durchzuführen, beinhaltet keine schwierige manuelle Manipulation, und das Gewebe behält seine ursprüngliche Morphologie bei, was eine mikroskopische Verifizierung des isolierten Materials ermöglicht (Emmert-Buck *et al.*, 1996). Darüber hinaus können mehrere verschiedene Zellareale aus einem Gewebeschnitt isoliert werden, ohne die Probe insgesamt zu beschädigen oder eine Stressantwort auszulösen (Inada and Wildermuth, 2005).

1.1.1 Laser Mikrodissektion an Pflanzen

Asano und Mitarbeiter waren Anfang des Jahrtausends die Ersten, die die Technik auch an – zunächst monokotylen – Pflanzen anwendeten (Asano *et al.*, 2002). Ihnen gelang es, aus isolierten Reis-Phloemzellen eine cDNA-Bibliothek zu generieren. Allerdings

wurde das in Aceton fixierte Pflanzenmaterial von Asano und Mitarbeitern kryoeingebettet, und anschließend wurden an einem Kryostat Gefrierschnitte erstellt. Diese Vorgehensweise ist aber nicht für alle Pflanzen und Fragestellungen geeignet.

Die meisten der nachfolgenden Arbeiten fokussierten sich ebenfalls auf Monokotyledonen. Die Fixierungsmethoden waren dabei unter Verwendung von Formaldehyd oder Glutaraldehyd stark vernetzend („cross-linking“), durch Ethanol-Essigsäure- bzw. Aceton-Mischungen präzipitierend („non-cross-linking“) oder auf Gefrierschnitten basierend. „Cross-linking“ Fixiermittel, wie das in pathologischen Instituten für klinische Proben routinemäßig eingesetzte Formalin, führten allerdings zu hochgradig fragmentierten Nukleinsäuren (Burgemeister *et al.*, 2003). Außerdem reagiert Formaldehyd mit RNA, ebenso wie mit DNA, unter Bildung von *N*-Methylol ($N\text{-CH}_2\text{OH}$) gefolgt von einem elektrophilen Angriff, der eine Methylenbrücke zwischen Aminogruppen erzeugt, was die für nachfolgende Expressionsanalysen notwendige Reverse Transkription erschwert (Srinivasan *et al.*, 2002). Der Einsatz von Formalin und Aldehyden resultiert zwar gerade wegen der starken Vernetzung in einer besseren Morphologie, setzt aber insgesamt die Extrahierbarkeit der RNA herab (Day *et al.*, 2006). Deshalb sind für RNA-Analysen präzipitierende Fixierungsschritte wie die Farmer-Lösung (Ethanol-Essigsäure) deutlich besser geeignet, da sie zu höheren Ausbeuten führen und in Verbindung mit einer Paraffineinbettung die Morphologie gut erhalten (Kerk *et al.*, 2003). Dies wurde bereits Ende des letzten Jahrtausends von Goldsworthy und Mitarbeitern für tierische Gewebe (Mäuseleber) gezeigt, wobei die Kryoeinbettung grundsätzlich höhere RNA-Konzentrationen lieferte als eine Paraffineinbettung (Goldsworthy *et al.*, 1999). Für einige Gewebe der Maus (u. a. Leber, Lunge und Niere) stellte sich eine Fixierung mit Methacarn (60 % Methanol, 30 % Chloroform, 10 % Eisessig) gefolgt von einer Paraffineinbettung als am besten geeignet für RNA-Analysen heraus (Kim *et al.*, 2003).

Nutzten Asano *et al.* die LMD-Technik noch zur direkten Generierung einer cDNA-Bibliothek, wurde bereits im darauffolgenden Jahr erstmalig die erfolgreiche Kombination von LMD, RNA-Amplifikation und umfassenden Genexpressionsanalysen an pflanzlichen Geweben (Koleoptilen von Maiskeimlingen) publiziert (Nakazono *et al.*, 2003). Das in dieser Arbeit eingesetzte Protokoll vereinte Farmer-Fixierung und Kryoeinbettung.

Da für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Expressionsanalysen keine der bisher beschriebenen Methoden zufriedenstellende Ergebnisse lieferte, wurden Modifikationen und Optimierungen aller Schritte des gesamten LMPC-Prozesses durchgeführt. Das resultierende Protokoll, eine Fixierung mit abgewandelter Farmer-Lösung in Kombination mit einer Paraffineinbettung, ist im Material und Methoden-Teil (siehe 2.1) ausführlich beschrieben.

1.1.2 PALM® MicroBeam

Für die Laser Mikrodissektion existieren diverse Methoden und Geräte. Das erste wurde bereits 1996 am National Cancer Institute (Maryland, USA) vom Team um Liotta, Bonner und Emmert-Buck (Emmert-Buck *et al.*, 1996) entwickelt. Bereits ein Jahr nach Veröffentlichung war dieses Gerät, weiterentwickelt von NCI & Arcturus Engineering (Kalifornien, USA), kommerziell erhältlich (Pinzani *et al.*, 2006). Je nach Hersteller unterscheidet sich die LMD-Vorgehensweise. Prinzipiell existieren drei verschiedene Kategorien:

- (I) die Laserablation, bei der nicht erwünschte Regionen zerstört oder entfernt werden, um dann das verbleibende Gewebe mechanisch zu sammeln;
- (II) die mechanische Separierung der Zellen von Interesse aus den histologischen Schnitten unter manueller Steuerung des Geräts;
- (III) eine thermoplastische Transferfolie, die auf den Schnitten platziert wird und dann durch Laserpulse mit dem Zielgewebe verbunden wird, was dazu führt, dass das Zielgewebe selektiv abgezogen und für molekulare Analysen verwendet werden kann (Bonner *et al.*, 1997).

Tabelle 1 im Review-Artikel von Day *et al.* gibt einen Überblick über die verschiedenen Hersteller und deren LMD-Systeme (Day *et al.*, 2005). Diese sind z. T. bei Pinzani *et al.* in Abbildung 1 illustriert (Pinzani *et al.*, 2006).

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete LMPC PALM® MicroBeam-System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland; Abbildung 1-1) ist der Kategorie II zuzuordnen.

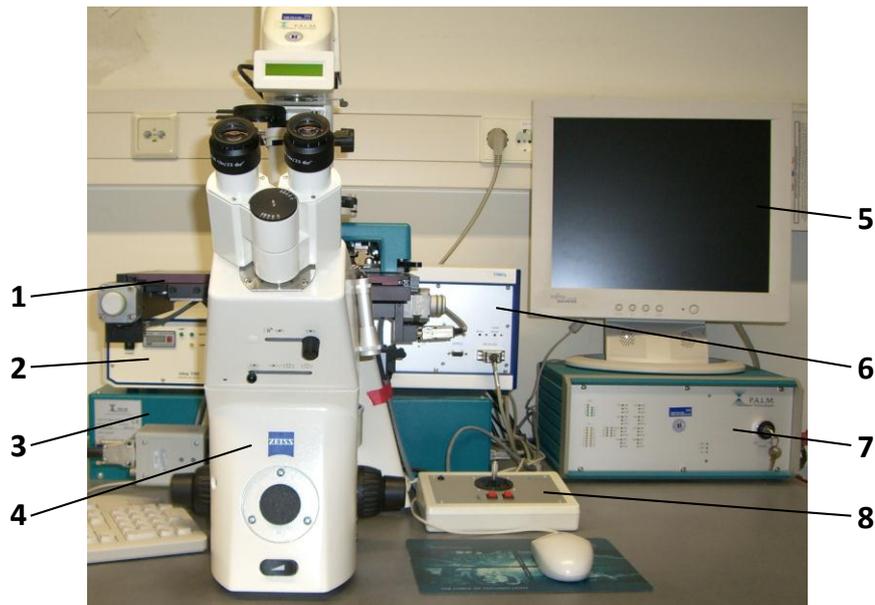


Abbildung 1-1: Das PALM® MicroBeam-System. Aufbau des Setups: **(1)** RoboStage, **(2)** UV-Lampe, **(3)** Festkörperlaser, **(4)** inverses Mikroskop Axiovert 200 M, **(5)** Bildschirm zur Visualisierung, **(6)** Steuereinheit des Lasers, **(7)** zentrale Steuereinheit, **(8)** Joystick zur Steuerung des CapMovers.

Der Vorteil dieser Technik gegenüber der Laser Capture Microdissection (LCM, Kategorie III) ist die Möglichkeit, die Zielzellen vor dem Katapultieren durch einen Laserschnitt vom umgebenden Gewebe zu trennen, was kontaminationsfreie Proben gewährleistet (Westphal *et al.*, 2002). Neuere LCM-Geräte besitzen allerdings zusätzlich einen UV-Laser zum Schneiden des Gewebes vor dem eigentlichen Sammeln über die thermoplastische Folie, um eben diese Kontaminationsfreiheit zu erreichen. Darüber hinaus entwickelt der für die LMPC verwendete, gepulste UV-A-Laser ($\lambda = 355 \text{ nm}$) im Gegensatz zum Infrarotlaser der LCM keine Wärme.

Abbildung 1-2 zeigt schematisch den Strahlengang des Lasers im PALM® MicroBeam. Der Laserstrahl wird durch das Objektiv gelenkt und auf die Probe fokussiert. Durch die rechnergesteuerte Bewegung der RoboStage mit dem darauf fixierten Objektträger schneidet der Laser entlang einer zuvor definierten Linie durch das Gewebe („Cut“). Mittels eines finalen Laserpulses außerhalb der Fokusebene wird das separierte Gewebeareal nach oben katapultiert („LPC“). Die für die LMPC verwendeten Objektträger sind mit einer dünnen PEN (Polyethylen-Naphthalat)-Membran überzogen, die zusammen mit dem Gewebe geschnitten und katapultiert wird. Während des Katapultierens fungiert diese PEN-Membran als Stütze für die ausgeschnittenen Areale. Membran und Gewebe werden dann in einem über dem Objektträger positionierten

Sammelgefäß aufgefangen, indem sie an einer entsprechenden Beschichtung oder aber einem Flüssigkeitstropfen haften bleiben. Der Vorteil hierbei ist, dass über eine „Checkpoint“-Position mikroskopisch überprüft werden kann, ob das Gewebestück vollständig in das Gefäß katapultiert wurde. Das Katapultieren von Gewebe von Glasobjektträgern ist ebenfalls möglich. Allerdings werden hierbei nur Bruchstücke und keine kompletten Areale katapultiert, was eine visuelle Verifizierung erschwert und aufgrund der bei pflanzlichen Zellwänden benötigten höheren Energie für Expressionsanalysen nur bedingt geeignet ist.

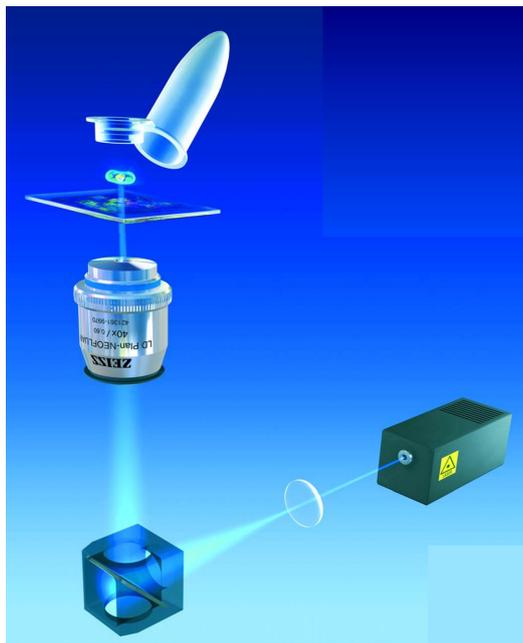


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Laser-Strahlengangs im PALM® MicroBeam. Der Laser wird auf das Objekt fokussiert und schneidet dort Areale oder einzelne Zellen aus, die dann durch einen weiteren defokussierten Laserpuls in den Deckel eines über den Objektträger positioniertes Sammelgefäß katapultiert werden. (Abbildung © 04/10 Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland)

Auch wenn die Energie des Lasers ($> 10 \text{ MW/cm}^2$) stark genug ist, Gewebe zu durchtrennen, ist es auf Grund seiner gezielten Fokussierung – der Fokusbereich beträgt lediglich $< 1 \mu\text{m}$ – dennoch möglich, auch lebende Zellen zu separieren und im Anschluss an die LMPC zu rekultivieren, ohne dass dieser Vorgang die Proliferationsrate der Zellen beeinflusst (Stich *et al.*, 2003). Es konnte sogar ein lebender Organismus, der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, mittels des PALM® MicroBeam-Lasers katapultiert werden, ohne dabei Schaden zu nehmen (Quelle: Video-Demonstration, LCM-Workshop, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland).

1.1.3 Gewebespezifische Expressionsanalysen in Pflanzen

Nachdem in der vorliegenden Arbeit die LMPC-Technik soweit optimiert worden war, dass damit gewebespezifische Expressionsanalysen an (dikotylen) Pflanzen durchgeführt werden konnten, wurden verschiedene physiologische Fragestellungen an zwei unterschiedlichen Pflanzenarten untersucht. Dabei lag es nahe, die beiden Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* (krautig, einjährig) und Pappel (holzige, mehrjährig) zu verwenden.

Bei der krautigen Pflanze *Arabidopsis thaliana* wurden mobile Signale während der systemischen Resistenzantwort der Pflanze auf eine Infektion mit einem Pathogen analysiert. Hierfür bot sich das Phloem an, da es innerhalb der Pflanze den einzigen Weg darstellt, einen Langstreckentransport von Botenstoffen zu ermöglichen, dessen Geschwindigkeit die der normalen Diffusion übersteigt. Darüber hinaus wurden bereits LMD-Studien an Phloemzellen publiziert, z. B. bei der Kartoffel (Yu *et al.*, 2007). Der Blütenstiel wurde gewählt, weil dort das Phloem leicht zugänglich ist. Außerdem erlaubten vorangegangene Experimente, ebenfalls an *Arabidopsis*-Blütenstielen, einen direkten Vergleich (Deeken *et al.*, 2008).

Ein Hauptmerkmal von Bäumen ist neben der Holzbildung die Saisonalität. Hierbei sollte die LMPC dazu eingesetzt werden, die Funktion der Holzstrahlen während der Umsteuerung zwischen den Jahreszeiten herauszuarbeiten. Die Saisonalität betreffenden Aspekte lassen sich an krautigen Pflanzen wie *Arabidopsis* nur bedingt untersuchen. So sollte gezeigt werden, dass das optimierte LMPC-Protokoll nicht nur an völlig unterschiedlichen pflanzlichen Materialien zur Anwendung kommen kann, sondern dass es auch eingesetzt werden kann, um sehr unterschiedliche physiologische Fragestellungen bearbeiten zu können.

1.2 Abwehrreaktionen bei Pflanzen

Im Gegensatz zu Säugetieren besitzen Pflanzen kein körpereigenes adaptives Immunsystem mit mobilen Zelltypen, sondern sind stattdessen auf die angeborene Abwehr jeder Zelle und systemische Signale, die von den Infektionsstellen ausgehen, angewiesen (Jones and Dangl, 2006). Chemische Abwehrreaktionen stellen dabei das Hauptmerkmal des pflanzlichen angeborenen Immunsystems dar (Iriti and Faoro, 2009). Die phytochemischen Verbindungen, deren Synthese aus den Hauptachsen des sekundären Metabolismus hervorgeht, i. e. dem Phenylpropanoid-, Isopenoid- und Alkaloidsyntheseweg, sind dabei nicht nur in die Pathogenabwehr, sondern auch in die Toleranz gegenüber abiotischem Stress involviert (Iriti and Faoro, 2009). Das pflanzliche Immunsystem wird über ein komplexes und bislang nicht vollständig verstandenes Signalnetzwerk gesteuert (McClung, 2011), dessen verschiedenen Komponenten im Folgenden näher erläutert werden.

1.2.1 Basale und Gen-für-Gen-Resistenz

Pflanzen können – genauso wie tierische Zellen – potentielle Pathogene erkennen, indem sie PAMPs (engl.: pathogen-associated molecular patterns) über Rezeptoren in der Plasmamembran (PRRs, engl.: pattern recognition receptors) wahrnehmen (Zipfel and Felix, 2005). Bei diesen PAMPs handelt es sich um vom Pathogen stammende Moleküle wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycane, bakterielles Flagellin oder Mannan aus Hefen (Ausubel, 2005). Diese Verbindungen werden allerdings auch von nicht-pathogenen Organismen synthetisiert, weswegen der Ausdruck „pathogen-associated“ eigentlich unzutreffend ist, und der Begriff MAMP (engl.: microbe-associated molecular pattern) eine präzisere Benennung darstellt (Ausubel, 2005). Diese Form der Abwehr über die unspezifische Erkennung von Elicitoren wird als basale Resistenz bezeichnet.

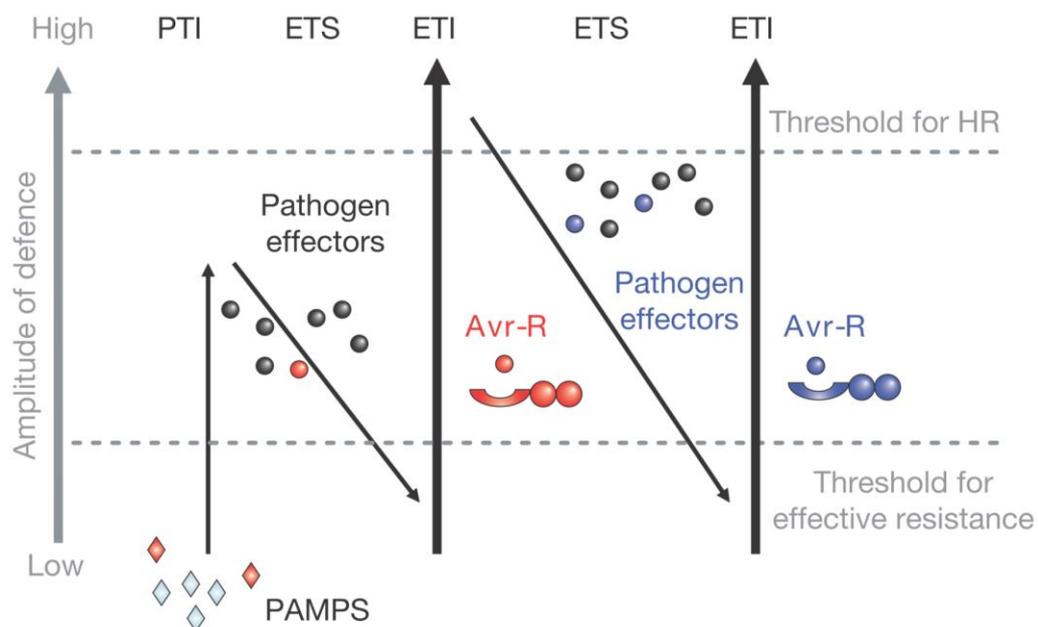
Darüber hinaus bringt jeder phytopathogene Bakterienstamm über sein Typ III-Sekretionssystem 15-30 verschiedene Effektorproteine (Virulenzfaktoren) in die Wirtszellen ein, die zur Virulenz des Pathogens beitragen, indem sie Funktionen eukaryotischer Zellen imitieren oder inhibieren (Jones and Dangl, 2006). Gegenüber einem bestimmten Pathogen resistente Pflanzen sind in der Lage, dessen Effektoren

spezifisch zu erkennen. Die Interaktionen von Pflanzen und Pathogenen werden dabei durch spezifische Wechselwirkungen zwischen diesen pathogenen Avirulenz (*avr*)-Genlozi und Allelen des korrespondierenden pflanzlichen Resistenz (*R*)-Genlokus reguliert, wobei die größte Klasse von *R*-Genen für sog. NB-LRR-Proteine (engl.: nucleotide-binding site plus leucine-rich repeat) kodiert (Dangl and Jones, 2001). Durch ihre verwandten Effektoren aktiviert lösen diese NB-LRR-Proteine eine Folge von pflanzlichen Abwehrreaktionen aus, die das Pathogenwachstum beeinträchtigen (Axtell and Staskawicz, 2003). Dazu zählen die Verstärkung der Zellwände, die Produktion von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, engl.: reactive oxygen species), die Induktion von PR (engl.: pathogenesis-related)-Proteinen sowie eine Form des programmierten Zelltods, die hypersensitive Antwort (HR, engl.: hypersensitive response) (Axtell and Staskawicz, 2003). Nur wenn die zusammenpassenden *R*- und *avr*-Gene in Wirtspflanze und Pathogen vorhanden sind, kann die Pflanze eine Resistenz ausbilden, fehlt eines von beiden oder ist inaktiv, ist eine Erkrankung der Pflanze die Folge (Dangl and Jones, 2001). Da über diese Gen-für-Gen-Resistenz meist nur eine bestimmte Rasse oder ein bestimmtes Isolat eines Pathogens erkannt wird, stellt dieser Weg eine rassenspezifische Resistenz dar. Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass die lediglich etwa 175 NB-LRR-Proteine und -Proteinfragmente, für die das *Arabidopsis*-Genom kodiert, ausreichen, um die Virulenzfaktoren aller potentiellen Pathogene direkt zu erkennen (Mackey *et al.*, 2003). Tatsächlich konnte eine direkte Bindung der Effektorproteine an die NB-LRR-Proteine nur in wenigen Fällen nachgewiesen werden (Jia *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006). Dagegen sprechen immer mehr Daten für eine indirekte Art der Pathogenerkennung aufgrund der Wirkung von Effektorproteinen in den Wirtszellen (Bonas and Lahaye, 2002).

Zur Beschreibung dieses zweigleisigen angeborenen Immunsystems postulierten Jones und Dangl das in Abbildung 1-3 dargestellte Zick-Zack-Modell, das in vier Phasen eingeteilt werden kann (Jones and Dangl, 2006):

- In Phase 1 erkennen Pflanzen PAMPs/MAMPs über PRRs, wodurch eine PTI (engl.: PAMP-triggered immunity) ausgelöst wird, die eine weitere Kolonisierung der Pflanze durch das Pathogen blockieren kann.

- In Phase 2 setzen erfolgreiche Pathogene Effektormoleküle frei, die zur Virulenz des Pathogens beitragen. Diese Effektoren können störend in die PTI eingreifen, was in einer ETS (engl.: effector-triggered susceptibility) resultiert.
- Phase 3 ist das direkte oder indirekte Erkennen dieser Effektormoleküle durch die entsprechenden NB-LRR-Proteine der Pflanze, was zur ETI (engl.: effector-triggered immunity) und damit verbundener Resistenz sowie der HR am Infektionsort führt.
- In Phase 4 passen sich die Pathogene durch Selektion an, um die ETI durch weitere oder den Verlust alter Effektorproteine zu umgehen, woraufhin sich die Pflanzen ihrerseits durch die Entwicklung neuer Resistenzproteine weiter anpassen und erneute ETI erreicht werden kann.



Jones and Dangl, 2006

Abbildung 1-3: Zick-Zack-Modell des pflanzlichen Immunsystems. Die PAMP-induzierte Immunität (PTI) führt nicht zur HR und kann durch pathogene Effektoren abgewendet werden (ETS). Die Effektor-vermittelte Immunität (ETI) stellt eine stärkere Abwehrreaktion dar, die eine HR auslöst. Auch diese ETI kann durch weitere Effektoren umgangen werden, was wiederum zu Krankheitssymptomen führt. Durch die Entwicklung neuer Resistenzproteine können diese ebenfalls erkannt werden, und es kommt erneut zur Resistenz. (Abbildung aus Jones and Dangl, 2006)

Dabei hängen PTI und ETI allerdings zumindest in einigen Fällen von den gleichen Elementen der Signalmaschinerie ab, und zwar bei der durch das bakterielle Flagellinfragment flg22 ausgelösten PTI und der durch den *Pseudomonas syringae* Effektor AvrRpt2 ausgelösten ETI, was im Falle einer Verallgemeinerung dafür spricht,

dass sich die Hauptunterschiede zwischen PTI und ETI nicht aufgrund der unterschiedlichen Natur der Signale ergeben, sondern durch die Unterschiede in Bezug auf die Nutzung der gemeinsamen Signalketten (Katagiri and Tsuda, 2010). Allerdings sind dabei die während der ETI aktivierten Immunantworten länger und stabiler ausgeprägt als während der PTI (Tsuda and Katagiri, 2010).

Wang und Mitarbeiter konnten kürzlich eine funktionale Verbindung der circadianen Uhr und der pflanzlichen Immunität zeigen, indem sie in *Arabidopsis* Gene identifizierten, die an der R-Gen-vermittelten Resistenz gegen den Falschen Mehltau beteiligt sind und durch den circadianen Regulator CCA1 (CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1) kontrolliert werden. Auf diese Weise können die Pflanzen eine Infektion in der Morgendämmerung, wenn pilzliche Pathogene normalerweise ihre Sporen ausstreuen, „vorhersehen“ und die Immunantwort gemäß der Perzeption verschiedener pathogener Signale bei der Infektion regulieren (Wang *et al.*, 2011). Über diese vorbeugende Expression der Abwehrgene zum wahrscheinlichsten Zeitpunkt einer Pathogeninfektion kann der Nachteil einer kontinuierlichen Expression der Abwehrgene (Heil and Baldwin, 2002) aufgewogen werden (McClung, 2011). Der Zusammenhang zwischen innerer Uhr und Immunantwort konnte auch außerhalb des Pflanzenreiches, z. B. für *Drosophila* (McDonald and Rosbash, 2001) und den Menschen (Berger, 2008) gezeigt werden.

1.2.2 Systemische Resistenz

Neben den örtlich begrenzten Abwehrreaktionen, die u. a. durch die HR sichtbar werden, weisen Pflanzen auch systemische Resistenzmechanismen auf. Infolge einer lokalen primären Infektion kommt es innerhalb der ganzen Pflanze zur Ausbildung dieser systemischen Resistenz mit einem breiten Wirkspektrum, die nicht spezifisch für das befallende Pathogen ist. Die dazu benötigten systemischen Signalmoleküle (siehe 1.2.3) werden vermutlich über die Leitbündel transportiert, wobei flüchtige organische Verbindungen ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen können. Langstreckensignale können dabei die Abwehrmechanismen entweder direkt aktivieren oder durch das Vorbereiten der Pflanze zu deren stärkerer und schnellerer Induktion führen (Heil and Ton, 2008).

Salizylsäure (SA, engl.: salicylic acid), Jasmonsäure (JA, engl.: jasmonic acid) und Ethylen (ET) akkumulieren als Antwort auf eine Infektion mit einem Pathogen oder auch Verletzung durch Herbivore, was die Aktivierung verschiedener und teilweise überlappender Gruppen von Abwehrgenen veranlasst (Pieterse and van Loon, 2004). Bisher wurden zwei Arten systemischer Resistenz beschrieben, die erworbene systemische Resistenz (SAR, engl.: systemic acquired resistance; Ryals *et al.*, 1996) und die zur SAR phänotypisch ähnliche, induzierte systemische Resistenz (ISR, engl.: induced systemic resistance; van Loon *et al.*, 1998). In den folgenden Abschnitten wird auf diese beiden Phänomene näher eingegangen.

a) Systemic acquired Resistance (SAR)

Bei der SAR handelt es sich um eine induzierbare Abwehrreaktion der Pflanze, bei der eine vorausgehende Infektion eines Blattes mit einem Pathogen in den nichtinfizierten Geweben Resistenz auslöst (Hunt *et al.*, 1996). Nach der Ausbildung nekrotischer Läsionen, entweder als Teil der HR oder als Krankheitssymptom, wird der SAR-Signalweg angeschaltet (Ryals *et al.*, 1996). Weder der Translokationsweg, noch die Identität des dafür notwendigen mobilen Langsteckensignals (siehe 1.2.3) konnten bisher mit Sicherheit bestimmt werden, auch wenn Hinweise dafür sprechen, dass parallel zur Signalweiterleitung über das Phloem auch Signale über das Xylem oder durch flüchtige organische Verbindungen über die Luft verbreitet werden können (van Bel and Gaupels, 2004).

Die SAR kann von anderen Resistenzantworten durch das Spektrum der Pathogenabwehr und den mit ihr verbundenen Änderungen in der Genexpression unterschieden werden (Ryals *et al.*, 1996). Die Ausbildung der SAR ist stets mit der erhöhten Produktion von SA und der Expression von *PR*-Genen verknüpft (Ryals *et al.*, 1996). Die gesteigerte *PR*-Proteinsynthese tritt sowohl in lokalen als auch in systemischen Geweben auf (Durrant and Dong, 2004).

Die Anreicherung von SA führt zur Translokation von NPR1 (NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED PROTEINS 1) in den Nukleus, wo es mit Mitgliedern der TGA-Familie von bZIP-Transkriptionsfaktoren interagiert und die Bindung dieser Faktoren an SA-responsive-Elemente in den Promotoren von *PR*-Genen fördert

(Eckardt, 2003). TGA Transkriptionsfaktoren umfassen eine Multigenfamilie von trans-regulatorischen Proteinen, die generell an der Entwicklung, der Abwehr und an Schutzreaktionen von Pflanzen beteiligt sind (Johnson *et al.*, 2008). Die Wirkungsweise dieser NPR1-TGA-Interaktion kann wie folgt beschrieben werden: NPR1 liegt in seiner inaktiven Form durch intermolekulare Disulfidbrücken als Oligomer im Cytoplasma vor (Mou *et al.*, 2003). Der SAR-Induktion und dem SA-Anstieg folgt ein initialer „oxidative burst“ und eine damit verbundene reduzierende Umgebung in der Zelle, wodurch NPR1 über die Reduktion seiner Disulfidbrücken in die monomere Form umgewandelt wird und so in den Nukleus gelangen kann, um dort die SAR-bezogene Genexpression zu regulieren (Mou *et al.*, 2003). TGA1 liegt in *Arabidopsis*-Blättern ebenfalls in einer oxidierten Form vor, wobei seine Reduktion auch durch den SA-Spiegel kontrolliert wird, und erst die reduzierte Form mit NPR1 interagieren kann, was in Folge die DNA-Bindungsaktivität von TGA1 verstärkt (Després *et al.*, 2003). NPR1 bindet außerdem an TGA2-Monomere, wobei die daraus resultierende Dimerisierung von TGA2 zur gleichzeitigen Dissoziation von NPR1 führt, gefolgt von einer Bindung von TGA2 an Promotorsequenzen der pflanzlichen Abwehrgene, wie z. B. an die aktivierende LS7-Sequenz von *PR1* (Johnson *et al.*, 2008). Allerdings sind NPR1 und seine Interaktionspartner nicht die einzigen Regulatoren der SA-responsiven *PR*-Genexpression und SAR (Pieterse and van Loon, 2004).

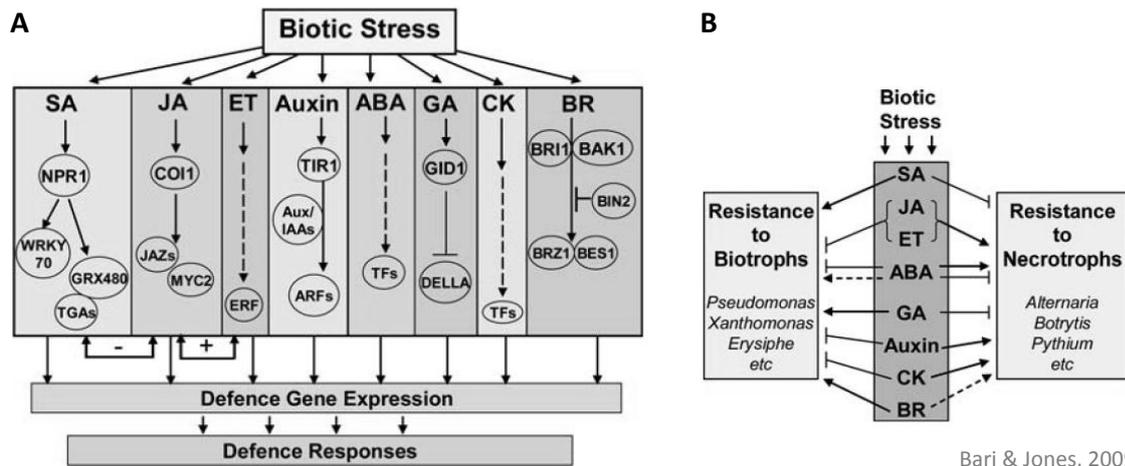
b) Induced systemic Resistance (ISR)

Wie bei der SAR handelt es sich auch bei der ISR um eine Form der systemischen Resistenz, die dazu führt, dass die Resistenzantwort bei einem erneuten Befall der Pflanze beschleunigt und verstärkt auftritt (van Loon *et al.*, 1998). Die Ausbildung einer ISR ist im Gegensatz zur SAR nicht mit der Aktivierung von *PR*-Genen verbunden und unabhängig von SA, benötigt aber funktionierende JA- und ET-Signalwege (Pieterse *et al.*, 1998). Sowohl SAR als auch ISR erfordern die Aktivität des *NPR1*-Gens, auch als *NIM1* bezeichnet, da Pflanzen, die in diesem Genlocus Mutationen enthalten in der Fähigkeit beeinträchtigt sind, eine effektive SAR oder ISR auszubilden (Després *et al.*, 2000). NPR1 ist auch für den antagonistischen Effekt von SA auf den JA-abhängigen Signalweg verantwortlich, da die JA-vermittelte Genexpression durch SA-aktiviertes NPR1 im Cytosol negativ reguliert wird (Spoel *et al.*, 2003). Diese andersartige Funktion von NPR1

im Cytosol ist auch abhängig von ET, das allerdings gleichzeitig die NPR1-abhängige Expression des SA-responsiven Markergens *PR1* potenziert (Leon-Reyes *et al.*, 2009). Zusammen mit der unterschiedlichen Lokalisation dieser beiden Wirkungsweisen (Cytosol vs. Nukleus) führt dies zur Hypothese, dass das ET-Signal vermehrt NPR1 in den Nukleus umlagert, wodurch weniger NPR1 im Cytosol für den SA-JA-Antagonismus verbleibt (Leon-Reyes *et al.*, 2009).

Insgesamt werden die Resistenzantworten in Pflanzen von einer Vielzahl an Hormonen gesteuert, wobei die Signalwege z. T. antagonistisch oder synergistisch miteinander kommunizieren, um der Pflanze die Möglichkeit zu geben, ihre Immunantwort exakt regulieren zu können (Pieterse *et al.*, 2009). Abbildung 1-4 (Bari and Jones, 2009) gibt einen Überblick über die verschiedenen an biotischen Stressreaktionen beteiligten Phytohormone und deren Signalwege (A) sowie deren regulatorische Funktion auf die pflanzliche Resistenzantwort gegenüber biotrophen und nekrotrophen Pathogenen (B). Eine effektive Abwehr von biotrophen Pathogenen, die sich von lebendem Gewebe ernähren, ist größtenteils durch den programmierten Zelltod der Wirtszellen und die Aktivierung des SA-Weges bedingt (Glazebrook, 2005). Nekrotrophe Pathogene dagegen profitieren vom Tod der Wirtszellen, die sie sogar aktiv zerstören, um sich dann von den Überresten zu ernähren, so dass das Wachstum solcher Mikroben durch die SA-vermittelte Abwehr nicht limitiert wird, sondern durch einen anderen Weg der Immunantwort, der über JA- und ET aktiviert wird (Glazebrook, 2005). Obwohl diese Unterscheidung grundlegend richtig ist, unterliegt die tatsächliche Situation einer weitaus komplexeren Regulation (Glazebrook, 2005), was in Abbildung 1-4 an der Fülle der an der Abwehr beteiligten Hormonsignalwege deutlich wird.

Generell sind z. B. JA-vermittelte Signalwege eher an der Regulation der Herbivoren-Abwehr beteiligt, während der SA-Weg mit den Abwehrreaktionen gegen Pathogene verbunden ist (Smith *et al.*, 2009). Allerdings gibt es viele Ausnahmen von diesen Rahmenbedingungen und immer mehr Ergebnisse sprechen dafür, dass die Interaktion zwischen den JA- und SA-Signalwegen eine entscheidende Rolle bei der Feinabstimmung der Abwehrreaktionen spielt (Smith *et al.*, 2009).



Bari & Jones, 2009

Abbildung 1-4: Pflanzliche Hormonsignalwege als Antwort auf biotischen Stress.

(A) Durch biotischen Stress werden Spiegel verschiedener Phytohormone geändert, wodurch es zu Änderungen in der Genexpression und Aktivierung von Abwehrreaktionen kommt. Ein Plus kennzeichnet positive Interaktion, ein Minus negative. ABA: Abscisinsäure, GA: Giberellin, CK: Cytokinin, BR: Brassinosteroide. (B) Beteiligung der verschiedenen Hormone an der positiven (Pfeil) oder negativen (blockierte Linien) Regulation pflanzlicher Resistenz gegenüber biotrophen und nekrotrophen Pathogenen. (Abbildung aus Bari and Jones, 2009)

1.2.3 Phloem-mobile Signale

Das Phloem spielt eine zentrale Rolle bei der Ernährung, Entwicklung und Abwehr der Pflanze, indem es Nährstoffe, Signalmoleküle und Abwehrstoffe durch vaskuläre Pflanzen transportiert (Turgeon and Wolf, 2009). Signale können dabei über den Transport von Proteinen, Hormonen, aber auch Transkripten vermittelt werden (Yu *et al.*, 2007). Neben mRNAs spielen vermutlich auch mikro-RNAs (miRNAs) und siRNAs (engl.: small interfering RNAs) eine Rolle in diesem Informationsnetzwerk (Kehr and Buhtz, 2008).

Während der Resistenzausbildung sind die Signalmoleküle SA, JA und ET wichtig für die Signalweiterleitung. Dies konnte durch Pflanzen gezeigt werden, die in der Antwort auf eines dieser Signale beeinträchtigt sind und dadurch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer Vielzahl virulenter Pathogene oder Insekten zeigten (Ton *et al.*, 2002 und Referenzen darin).

Obwohl SA für die SAR-Ausbildung notwendig ist, handelt es sich dabei nicht um das mobile induzierende Signal, was in Grafting-Experimenten mit transgenen NahG-Tabakpflanzen, die eine bakterielle SA-Hydroxylase exprimierten, gezeigt werden konnte

(Vernooij *et al.*, 1994). Worum es sich bei dem mobilen Signal handelt, das ausgehend von der Infektionsstelle vermutlich durch das Phloem weitergeleitet wird, um die systemische Resistenz zu etablieren, ist immer noch Gegenstand der Forschung. In den vergangenen Jahren haben sich verschiedene Moleküle als aussichtsreiche Kandidaten hervorgetan, darunter das SA-Derivat Methylsalizylat (MeSA), Jasmonsäure selbst, ein noch undefinierter, von Glycerolipiden abgeleiteter Faktor sowie eine Gruppe von Peptiden, die an der grundlegenden Zell-zu-Zell-Übermittlung von Abwehrsignalen beteiligt ist (Vlot *et al.*, 2008). Obwohl bisher schon viele pflanzliche Moleküle als mobile Faktoren vorgeschlagen wurden, erfüllen die meisten von ihnen nicht alle Kriterien, die für die zeitliche Abfolge von Regulierung und Wirkungsweise während der systemischen Resistenz verlangt werden (Parker, 2009).

MeSA wird einerseits bei Tabak als mobiles SAR-Signal angesehen (Park *et al.*, 2007), andererseits zeigen Studien, dass die Produktion von MeSA in *Arabidopsis* nicht essentiell für die Ausbildung der SAR ist (Attaran *et al.*, 2009). Dies spricht dafür, dass in verschiedenen Pflanzen die Resistenzausbildung durchaus unterschiedlich reguliert sein kann.

Jung und Mitarbeiter konnten Azelainsäure im Phloemsaft von *Arabidopsis thaliana* identifizieren, die durch Pathogene induziert wird und Eigenschaften eines mobilen, Resistenz-fördernden Signals aufweist. Mutationsstudien zeigten dann, dass AZI1 (AZELAIC ACID INDUCED 1) für die lokale Entstehung, Modifikation und Translokation eines mobilen SAR-Signals entscheidend ist (Jung *et al.*, 2009). Wie auch bei DIR1, das bereits als eine SAR-Komponente identifiziert wurde (Maldonado *et al.*, 2002), handelt es sich bei AZI1 wahrscheinlich um ein Mitglied einer Familie von Lipid-Transfer-Proteinen (LTPs). Bei dem zugehörigen mobilen Signal könnte es sich demnach um ein modifiziertes Lipid oder auch Lipopeptid handeln (Xia *et al.*, 2004; Huffaker *et al.*, 2006).

NO und NO-verbundene Metabolite wie S-Nitrosothiole (SNOs) könnten ebenfalls eine Rolle bei der SAR spielen. Rustérucci und Mitarbeiter schlossen aus ihren Experimenten, dass die Aktivität der S-Nitrosoglutathion-Reduktase (GSNOR) an der SAR-Ausbildung beteiligt ist (Rustérucci *et al.*, 2007). Da sie schon vorher die GSNOR-Lokalisation in Phloem-Geleitzellen und Xylem-Parenchymzellen von *Arabidopsis* zeigen konnten

(Espunya *et al.*, 2006), liegt die Vermutung nahe, dass deren Rolle mit dem SAR-Signal-Transport durch das Vaskulärsystem verknüpft sein könnte (Rustérucci *et al.*, 2007).

Immer mehr Anhaltspunkte sprechen auch für eine Beteiligung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade an der Resistenzantwort in Pflanzen (Zhang *et al.*, 2007). Die MAP-Kinase-Kinase 7 (MKK7), deren Expression in Blättern infizierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen auf die vaskulären Gewebe beschränkt zu sein scheint, wirkt als positiver Regulator sowohl der basalen, als auch der systemischen Resistenz der Pflanze, da die Ausbildung beider Zustände durch eine Reduktion der *MKK7*-mRNA-Level beeinträchtigt wird, und die Aktivierung von MKK7 allem Anschein nach ausreicht, das mobile Signal der SAR zu generieren (Zhang *et al.*, 2007).

Die experimentellen Analysen an infizierten *Arabidopsis*-Pflanzen in der vorliegenden Arbeit sollten einen weiteren Beitrag zur Charakterisierung Phloem-mobiler Signale während der Ausbildung einer systemischen Resistenz leisten.

1.2.4 Jasmonsäure

Die Jasmonsäure (JA) ist ein wichtiges Phytohormon, das an der Abwehrreaktion und der Resistenzsignalweiterleitung beteiligt ist, aber nicht an der Ausbildung der SAR (van Bel and Gaupels, 2004). Zusammen mit Ethylen ist sie für die Etablierung der ISR verantwortlich (Pieterse *et al.*, 1998).

Jasmonsäure und ihr Methylester Methyljasmonat (MeJA) sind von Linolensäure abgeleitete, Cyclopentanon-basierende Verbindungen, die im Pflanzenreich weit verbreitet sind (Creelman and Mullet, 1997). Diese Pflanzenhormone sind an der Regulation einer Vielzahl von Prozessen beteiligt, darunter Entwicklung, Seneszenz, Sekundärmetabolismus, sowie der Antwort auf Verwundung und Pathogenbefall (Guerineau *et al.*, 2003). Sie können z. B. Schritte in der Fruchtreifung, der Produktion überlebensfähiger Pollen, dem Wurzelwachstum, der Rankenverwindung und der pflanzlichen Resistenz gegen Insekten und Pathogene modulieren (Creelman and Mullet, 1997). Die JA-Synthese als Antwort auf eine Verwundung ist eine sehr schnelle Reaktion, bereits weniger als drei Minuten nach Verwundung kann JA in Blättern nachgewiesen werden, die von der Verwundungsstelle entfernt liegen (Gfeller *et al.*, 2010).

Abbildung 1-5 skizziert die Jasmonsäurebiosynthese ausgehend von der Linolensäure. Die ersten Schritte finden dabei in den Plastiden statt, der weitere OPDA (12-oxo-Phytodiensäure)-Metabolismus dann in den Peroxisomen (Gfeller *et al.*, 2010). Obwohl es neben *Oxophytodiensäure Reduktase 3 (OPR3)* in *Arabidopsis* noch zwei weitere *OPR*-Gene, *OPR1* und *OPR2*, gibt, deren Transkription u. a. durch Verwundung induziert wird (Biesgen and Weiler, 1999), ist die für die JA-Biosynthese relevante Isoform *OPR3* (Schaller *et al.*, 2000).

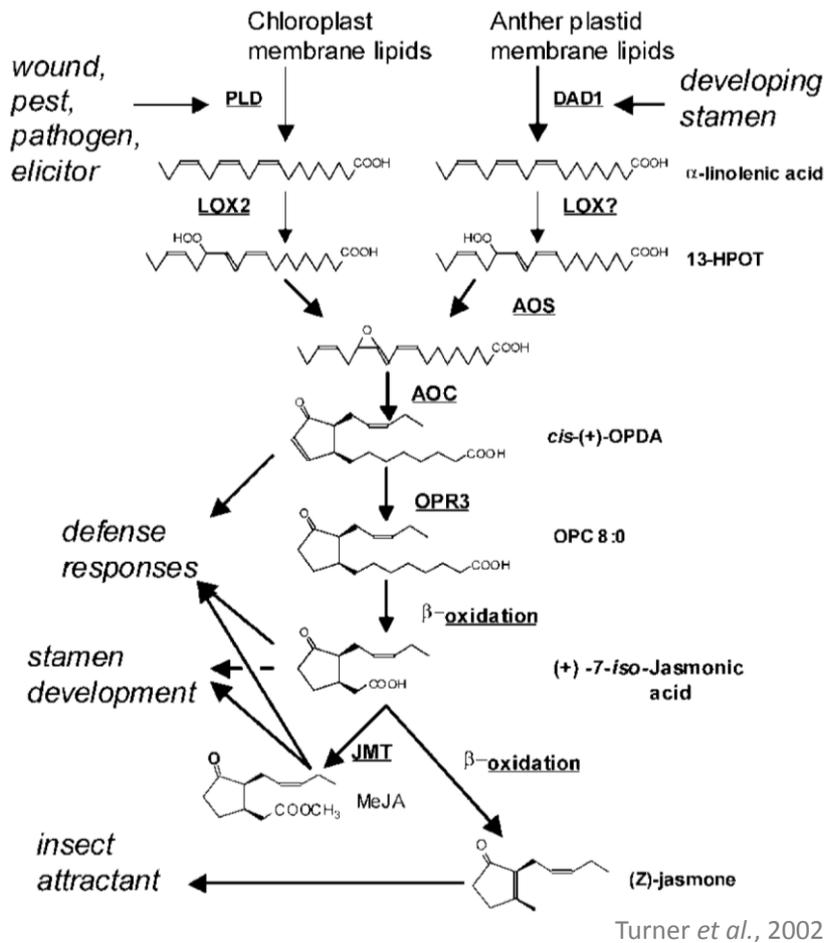


Abbildung 1-5: Biosyntheseweg der Jasmonsäure. Enzyme sind unterstrichen, Intermediate fett sowie Ein- und Ausgangswege kursiv dargestellt. (Abbildung aus Turner *et al.*, 2002)

Coronatin ist ein bakterielles Phytotoxin mit einer zu JA ähnlichen biologischen Aktivität (Creelman and Mullet, 1997). Coronatin erhöht nicht den endogenen JA-Spiegel (Koch *et al.*, 1999), sondern induziert JA-abhängige Gene unabhängig davon (Kramell *et al.*, 2000). Einige *Pseudomonas syringae*-Stämme können Coronatin synthetisieren, das JA imitiert und SA-vermittelte Abwehrreaktionen gegen biotrophe Pathogene unterdrückt (Zhao *et al.*, 2003; Brooks *et al.*, 2005).

1.2.5 Age-related Resistance (ARR)

Wenn ältere Blätter oder Pflanzen eine erhöhte Resistenz oder erniedrigte Suszeptibilität gegenüber Pathogenen zeigen, wird diese Form der Resistenz oft als altersbedingte Resistenz (engl.: age-related resistance, ARR) bezeichnet (Kus *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurden diesem Phänomen aber auch andere Namen gegeben, wie z. B. „ontogenetische Resistenz“, „entwicklungsabhängige Resistenz“, „ausgereifte Keimling Resistenz“ oder auch „adulte Keimling Resistenz“ (Whalen, 2005). Diese Vielfalt an Bezeichnungen spiegelt die Tatsache wider, dass verschiedene Arbeitsgruppen diese Resistenzform unabhängig voneinander untersucht haben (Develey-Rivière and Galiana, 2007). Die ARR konnte in einer Reihe von Pflanzenarten beobachtet werden und unterscheidet sich von der SAR- oder ISR-Antwort (Kus *et al.*, 2002). Während der ARR in *Arabidopsis* sind *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P.st*)-induzierte chlorotische Krankheitssymptome vermindert, eine HR-ähnliche Antwort ist nicht zu beobachten und das Wachstum virulenter *P.st* ist um das Zehn- bis Hundertfache herabgesetzt (Kus *et al.*, 2002).

Die Akkumulation von SA im Interzellularraum ist entscheidend für die Ausbildung der ARR (Cameron and Zaton, 2004). Darüber hinaus ist in *Arabidopsis* die ARR gegenüber *P.st* nicht nur mit diesem SA-Anstieg, sondern auch mit dem Übergang zum Blühen verbunden (Carviel *et al.*, 2009). Die Expression der *PR*-Gene und ein funktioneller SAR-Weg sind dagegen nicht erforderlich (Kus *et al.*, 2002). Gene, die zur ARR beitragen, sind z. B. *IAP1* (IMPORTANT FOR THE ARR PATHWAY 1), zwei pflanzenspezifische Transkriptionsfaktoren der NAC-Familie, eine UDP-Glukose-Glukosyltransferase sowie eine Cytidin-Deaminase (Carviel *et al.*, 2009).

Im Allgemeinen werden Col-0-Pflanzen ab dem Übergangszeitpunkt zur Blüte, unter Kurztagbedingungen im Alter von etwa sechs Wochen, für eine ARR-Ausbildung empfänglich (Kus *et al.*, 2002). Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen waren wegen der Nutzung des Langstreckenphloems im Blütenstiel im Durchschnitt zwölf Wochen alt und hatten demnach bereits eine ARR ausgebildet. Dadurch verminderte sich das bakterielle Wachstum in der Pflanze, und hinzukommende Resistenzen wurden schwächer ausgebildet als in jüngeren Pflanzen.

1.3 Pappel – ein Modell für baumspezifische Fragestellungen

1.3.1 Die Pappel als Modellorganismus

Die Gattung *Populus* umfasst etwa 30 Spezies, die sich alle in der nördlichen Hemisphäre finden und einige der schnellsten Wachstumsraten aufweisen, die in gemäßigten Breiten an Bäumen beobachtet wurden (Taylor, 2002). Die Westliche Balsam-Pappel (*Populus trichocarpa*) war der erste Baum, dessen – mit etwa 5×10^8 bp relativ kleines – Genom komplett sequenziert wurde (Tuskan *et al.*, 2006). Dies ist nur einer der Gründe dafür, dass die Pappel weltweit als Modellorganismus eingesetzt wird, wenn es darum geht, die für verholzte Pflanzen einzigartigen Prozesse wie Dormanz oder sekundäre Holzbildung zu verstehen (Taylor, 2002). Diese Vorgänge sind an krautigen Modellpflanzen, wie z. B. *Arabidopsis thaliana*, nur bedingt untersuchbar. So wurden viele xylembildende Gene aus *Arabidopsis* auch in holzbildenden Geweben der Kiefer nachgewiesen (Allona *et al.*, 1998), was zeigt, dass einfaches sekundäres Wachstum und Holzbildung zumindest teilweise gleiche Mechanismen nutzen. Des Weiteren konnten Gene, die in *Arabidopsis* das Blühen kontrollieren, auch in transgenen *Populus tremula x tremuloides* vorzeitig die Blüte induzieren (Weigel and Nilsson, 1995). Trotzdem können typische Fragen zu Saisonalität, Holzbildung etc. nicht allein über Studien an *Arabidopsis* beantwortet werden. Mehrjährige Pflanzen dagegen ermöglichen die Bearbeitung dieser speziellen Fragestellungen, die in einjährigen Pflanzen gar nicht oder über z. T. völlig anders regulierte physiologische Prozesse ablaufen.

1.3.2 Dormanz und Reaktivierung des Wachstums

Mehrjährige Pflanzen und insbesondere Bäume unterscheiden sich von einjährigen Pflanzen dadurch grundlegend, dass sie eine lange Lebensspanne haben und aus dem vaskulären Kambium sekundäres Xylem, auch Holz genannt, bilden können (Taylor, 2002). Für diese Holzbildung sind u. a. die Verfügbarkeit und die Aufnahme von Mineralnährstoffen entscheidend, die starken saisonalen Schwankungen unterliegen, weswegen die Holzbildung und damit auch das Wachstum an die Jahreszeiten gekoppelt sind, und die Pflanzen Saisonalität zeigen.

Besonders bei Laubbäumen wechseln sich Phasen aktiven Wachstums und Dormanz ab. Zwischen diesen beiden Zuständen kommt es zu erheblichen physiologischen Umsteuerungen, die vielfältige Bereiche des Baumes betreffen, darunter Morphologie, Metabolitgehalte, Hormone und die zugehörige Genexpression. Die an den Übergängen zwischen Wachstum und Dormanz beteiligten Prozesse unterliegen einem verflochtenen regulatorischen Netzwerk. An der Kontrolle des Knospenaufbrechens muss beispielsweise ein koordiniertes Zusammenspiel von exogenen Reizen, wie Tageslänge und Temperatur, und endogenen Signalen, wie verschiedenen Hormonen, beteiligt sein (Taylor, 2002). Generell ist über die Prozesse, die zum Brechen der Winterruhe führen, weit weniger bekannt, als über die Auslösung der Dormanz.

Diese Umsteuerung hin zur Dormanz ist ebenfalls abhängig von Tageslänge und Temperatur. Die Perzeption der Tageslänge erfolgt hierbei über Phytochrom A, wobei die photoperiodische Antwort durch dessen Expressionslevel reguliert wird, die wiederum den Metabolismus von Gibberellinen und Indol-3-Essigsäure beeinflussen (Olsen *et al.*, 1997). Das *CO/FT (CONSTANS/FLOWERING LOCUS T)*-Modul reguliert neben der Blüte (siehe 1.3.4 a) auch die durch die kurzen Tage im Herbst induzierte Wachstumseinstellung sowie den Beginn der Knospenruhe (Böhlenius *et al.*, 2006). Für eine Steuerung der Dormanz über die Tageslänge spricht auch die Tatsache, dass der Zeitpunkt der Knospenruhe stark mit dem Standort und insbesondere der geografischen Breite korreliert, da dieser durch das Verpflanzen eines Genotyps auf einen anderen Breitengrad deutlich verschoben wird (Rohde *et al.*, 2011). Diese breitengradabhängigen Muster können über Satellitenbilddauswertungen beobachtet werden, indem sich einerseits das Grünwerden der Vegetation ab März kontinuierlich nordwärts bewegt, und sich andererseits der Beginn der Dormanz ab dem späten September gen Süden ausbreitet (Zhang *et al.*, 2004). Allerdings zeigen viele Studien, dass hierbei auch die Temperatur eine entscheidende Rolle spielt. Auf Grund des Temperaturanstiegs in der nördlichen Hemisphäre von 0,8 °C seit den frühen 1970er Jahren hat sich die Wachstumsphase in Europa und Asien zwischen 1981 und 1999 um 18, in Nordamerika im gleichen Zeitraum um zwölf Tage verlängert (Zhou *et al.*, 2001). Dieser Effekt zeigt sich auch im Vergleich von ländlichen und urbanen Gebieten. In Städten ist die Temperatur gegenüber der natürlichen Vegetation des Umlandes um 1-3 °C höher.

Infolgedessen beginnt das Ergrünen in Städten im Durchschnitt 4-9 Tage früher, und das Einsetzen der Dormanz ist um 2-16 Tage verzögert (Zhang *et al.*, 2004). Dass Temperatur- und photoperiodische Signale bei der Einstellung des Wachstums, dem Einsetzen der Knospenruhe und der Dauer der Knospenbildung ebenfalls zusammenspielen, konnten Rohde und Mitarbeiter an Pappeln zeigen (Rohde *et al.*, 2011).

Bei der Pappel setzt die Blüte normalerweise zwischen Ende Februar und Anfang März ein, der Blattaustrieb meist erst Ende April. Es ist allerdings zu erwarten, dass die ersten Vorbereitungen für das Beenden der Dormanz im Frühjahr schon deutlich vor dem Aufbrechen der (Blüten-)Knospen stattfinden, während der Baum rein äußerlich noch in der Ruhephase zu sein scheint.

1.3.3 Holzstrahlen

Bei der Saisonalität kommt den Holzstrahlen eine besondere Rolle zu. Diese Strahlen sind in Holzquerschnitten bereits gut zu erkennen. Sie fungieren in Bäumen nicht nur als radiale Transportwege für organische und anorganische Verbindungen, sondern auch als Hauptspeicherort (Sauter, 2000).

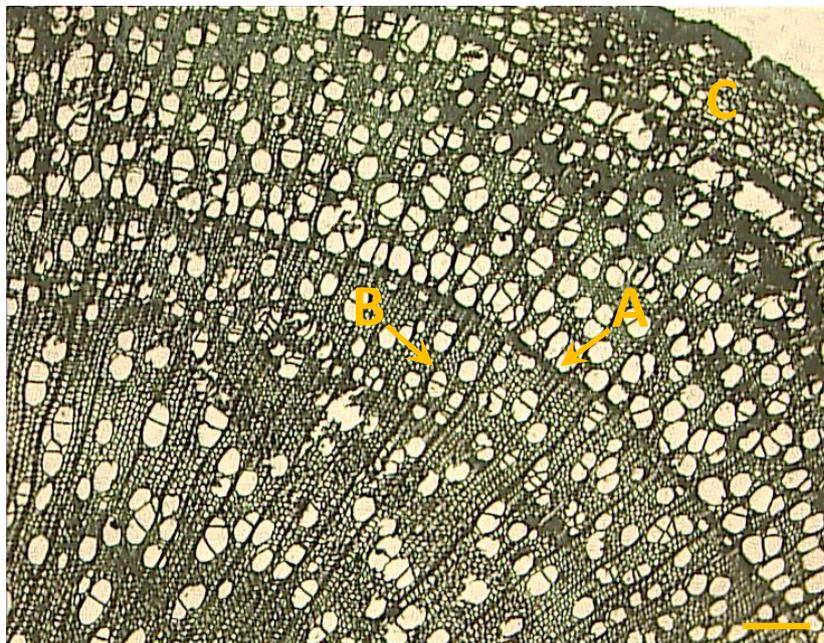


Abbildung 1-6: Lichtmikroskopische Aufnahme eines *P.can* Holzquerschnitts. A: Jahresgrenze, B: Holzstrahl, C: kambialer Bereich inklusive Phloem; die Rinde wurde vor der Einbettung manuell entfernt. Größenbalken entspricht 150 μm .

Zusammen mit dem Phloem als vertikaler Achse stellen die Strahlen den kambialen Bereichen und dem sich entwickelnden Holz besonders während der aktiven Wachstumsphase Mineralstoffe und Metabolite zur Verfügung. Durch ihren Kontakt zu Siebröhren repräsentieren sie außerdem einen Übergangsweg von Phloem zu Xylem. Zusätzlich zu dieser bidirektionalen Transportfunktion haben die Strahlen speziell im Winter auch eine Speicherfunktion. Das vertikale Xylemparenchym ist dabei mit dem horizontalen Strahlenparenchym verbunden, was zum Aufbau eines dreidimensionalen Speichernetzwerkes führt (Höll, 2000). Insbesondere in Pappeln sind axiale Xylemparenchymzellen selten, weswegen in diesen Bäumen die winterliche Speicherfunktion auf die Strahlzellen und den Holzapoplasten beschränkt ist (Sauter, 2000).

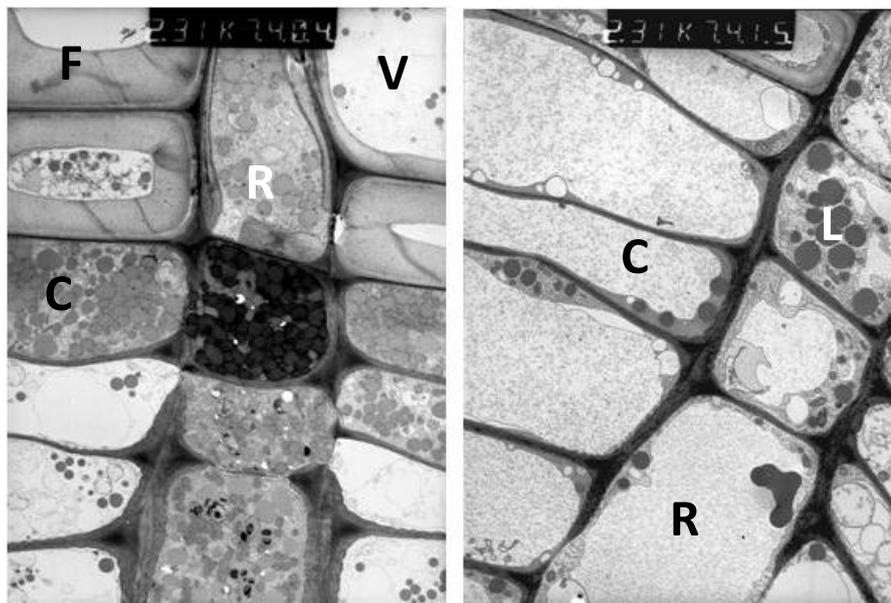


Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *P.can* Strahlzellen. Links: späte Ruhephase (Februar), rechts: aktive Wachstumsphase (Juli). R: Strahlzelle (ray cell), F: Tracheide (fiber), V: Trachee (vessel), C: kambiale Zelle, L: Fettröpfchen (Lipids); Vergrößerung: 2.300x. (Abbildung © Dr. Silke Lautner und Prof. Dr. Jörg Fromm, Zentrum Holzwirtschaft, Universität Hamburg)

Abbildung 1-7 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von Holzquerschnitten im Bereich eines Strahls. Es sind deutlich die saisonalen Unterschiede zu erkennen. Während im Sommer (rechts) eine starke Vakuolisierung und viel endoplasmatisches Retikulum zu sehen sind, zeigen sich die Strahlzellen der späten Ruhephase (links) dicht gefüllt mit Speicherstoffen, darunter Lipide, Stärke und Polyphenole. Dies untermauert die saisonal unterschiedliche Funktion der Strahlen: Während der Reaktivierung im Frühjahr findet die Umlagerung der in den Strahlen gespeicherten

Reservestoffe in Richtung des Kambiums und der sich entwickelnden Blätter und Holzbereiche statt. Zur Zeit des aktiven Holzwachstums werden dann Photoassimilate horizontal (Strahlen) und vertikal (Phloem) von source-Geweben (Blättern) zu sink-Geweben (Kambium, Holzdifferenzierungszone, Mark, Wurzeln) transportiert. Im Herbst werden die gleichen Transportwege genutzt, um Nährstoffe und Metabolite wieder zurück zu den Speicherorten in den Strahlen und im Holz zu bringen.

Strahlencellen mit direktem Kontakt zu Tracheen werden als Kontaktzellen bezeichnet (siehe Abbildung 1-8). Der Teil der Zellwand in Berührung mit den Tracheen weist eine andere Struktur auf. Sie bildet viele Faltungen, um die Oberfläche zu vergrößern. Der komplette Transport zwischen Strahlen und Holzapoplast findet über diese Kontaktzonen statt. So konnten Arend *et al.* zeigen, dass PTORK, ein Kaliumabgabekanal, stets dort exprimiert wird, wo die Strahlencellen mit den Tracheen den engsten Kontakt haben (Arend *et al.*, 2005). Die Hauptaufgabe von PTORK scheint die herbstliche Verschiebung von Kalium aus den Blättern über die Strahlen in den Holzapoplasten zu sein. Im Frühjahr muss dann ein anderer Transporter das Kalium in Richtung neuer Blätter remobilisieren. Diese Art der Speicherung und Rückgewinnung betrifft sehr wahrscheinlich zahlreiche Nährstoffe und bestätigt damit die außerordentliche Rolle der Holzstrahlen bei der saisonalen Umsteuerung der Baumphysiologie.

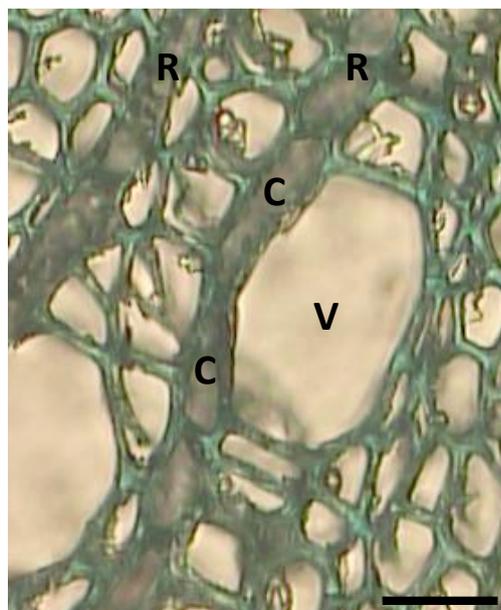


Abbildung 1-8: Lichtmikroskopische Aufnahme des *P.can* Holzes im Bereich zweier Strahlen. Zellwände sind mit Toluidinblau angefärbt. R: Strahl (ray), V: Trachee (vessel), C: Kontaktzelle (contact cell). Größenbalken entspricht 20 μm .

1.3.4 Charakteristika verschiedener Jahreszeiten

Die Saisonalität der Bäume spiegelt sich in ihrer Physiologie wider. Zu den verschiedenen Jahresphasen laufen unterschiedliche, für die jeweilige Jahreszeit charakteristische Prozesse ab. Typisch für das Frühjahr, also das Ende der Dormanz, sind die Blüte und der Blattaustrieb. Während der Phase des aktiven Wachstums vom Sommer bis hinein in den Herbst wird vermehrt Holz gebildet. Diese Holzbildung geht einher mit einer erhöhten Lignifizierung, d. h. Einlagerung von Ligninen in die Zellwände.

Im Folgenden sollen diese Beispiele für Charakteristika der verschiedenen Jahreszeiten näher erläutert werden.

a) Blühinduktion

Pappeln sind mehrjährige Pflanzen mit einer Lebenspanne von bis zu mehreren hundert Jahren und einer langen juvenilen Phase (Braatne *et al.*, 1996). Sie beginnen nach spätestens sieben bis zehn Jahren jährlich zu blühen (An *et al.*, 2011). Generell kann das Alter, ab dem Bäume blühen, bei verschiedenen Arten stark variieren, z. B. ein Jahr bei der Weide, durchschnittlich sechs bei Pappeln oder sechzig Jahre bei Eichen (Taylor, 2002).

Die photoperiodische Blühinduktion ist ein systemischer Prozess, der die Translokation eines floralen Stimulus von den Blättern zum apikalen Sprossmeristem erfordert, so dass dieses die Bildung von Blättern einstellt und stattdessen die Blütenentwicklung initiiert (Corbesier and Coupland, 2006). Im Allgemeinen beinhalten die initialen Schritte der Blütenbildung zwei Klassen von sukzessiv wirkenden regulatorischen Genen, sog. Meristemidentitätsgene, die die Aktivierung der Blüten kontrollieren und innerhalb der aufbrechenden Blütenprimordien exprimiert werden, sowie der drei Klassen homöotischer Gene, die später wirken, um die Identität der einzelnen Blütenorgane zu bestimmen, und jeweils nur in ganz bestimmten Bereichen innerhalb der Blüte exprimiert werden (Parcy *et al.*, 1998). Um das Zusammenspiel dieser drei Klassen zu beschreiben, wurde das sog. ABC-Modell vorgeschlagen (Coen and Meyerowitz, 1991). Die ABC-Gene werden etwa zwei Tage nachdem die Blüte induziert wurde in

bestimmten, überlappenden Mustern in der sich entwickelnden Blüte exprimiert (Busch *et al.*, 1999).

Das Expressionsmuster floraler homöotischer Gene in *Arabidopsis thaliana* hängt ähnlich von der Wirkung von Meristemidentitätsgenen wie dem Transkriptionsfaktor LEAFY (LFY) ab, der bestimmt, ob ein Meristem Blüten anstelle von Blättern und Sprossen ausbildet (Busch *et al.*, 1999). Er ist also an der Transition eines Sprossmeristems zu einem Blütenmeristem beteiligt (Weigel *et al.*, 1992). In *Arabidopsis* bindet das kernlokalisierte LEAFY-Protein an Sequenzen in den Enhancern verschiedener floraler homöotischer Gene, darunter APETALA1 (AP1) (Maizel *et al.*, 2005). AP1 hat eine zusätzliche Funktion als weiterer Regulator der Meristemidentität, wobei diese Funktion nicht von LEAFY abhängt (William *et al.*, 2004). LEAFY ist in allen Landpflanzen zu finden, die sich in den vergangenen 400 Millionen Jahren entwickelt haben, wobei sowohl sein C- als auch sein N-Terminus je eine hoch konservierte Region enthalten (Maizel *et al.*, 2005). Im Moos *Physcomitrella patens* kontrolliert LEAFY generelle Aspekte des Lebenszyklus, während er in Angiospermen spezifisch das Schicksal der Blüten während der reproduktiven Phase induziert (Maizel *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu vielen anderen Transkriptionsfaktoren, lässt sich LEAFY nicht einer Genfamilie zuordnen, denn alle bisher untersuchten Spezies enthalten scheinbar nur ein voll funktionsfähiges Homolog pro haploidem Genom (Busch *et al.*, 1999).

Die Blütenbildung steht genau wie die Beendigung der Dormanz unter der Kontrolle hormoneller Auslöser sowie Tageslänge und Temperatur, die in *Arabidopsis* dazu führen, dass die Expression von LEAFY als ein Schlüsselfaktor dieser Signalperzeption induziert wird (Chae *et al.*, 2008). Abbildung 1-9 gibt eine schematische Darstellung des regulatorischen Netzwerkes, das in *Arabidopsis thaliana* die Blütenbildung kontrolliert. In den photoperiodischen Weg ist darüber hinaus auch noch TERMINAL FLOWER 2 (TFL2) als Repressor von FT involviert (Kotake *et al.*, 2003).

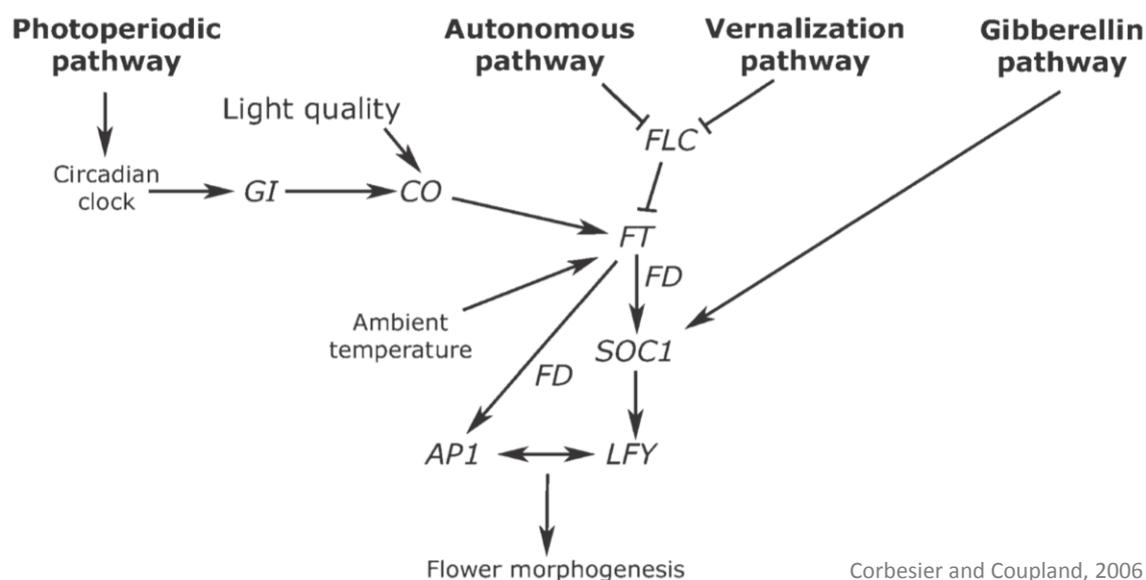


Abbildung 1-9: Regulatorisches Modell der Blütenbildung in *Arabidopsis thaliana*.

Der photoperiodische Weg fördert das Blühen speziell unter Langtag-Bedingungen, Gibberellin dagegen besonders unter Kurztag-Bedingungen. Die Wege laufen in der transkriptionellen Kontrolle von *FT* und *SOC1* zusammen, die wiederum die Expression der Meristemidentitätsgene *AP1* und *LFY* induzieren. (Abbildung aus Corbesier and Coupland, 2006)

Auch zur Blühinduktion bei Pappel werden immer mehr Ergebnisse publiziert. Als erstes wurde eine Rolle in Bäumen für das primären Blütenmeristemidentitätsgen *LFY* nachgewiesen, da in transgenen Espen durch dessen konstitutive und ubiquitäre Expression die Blütezeit von Jahren auf Monate verkürzt werden konnte (Weigel and Nilsson, 1995). Darüber hinaus sind Gene der *FLOWERING LOCUS T (FT)*- und *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*-Familie in zahlreichen Pflanzenarten für die Kontrolle der Umschaltung zwischen vegetativem und reproduktivem Wachstum als wichtig bekannt (Igasaki *et al.*, 2008). *TFL1* beeinflusst dabei im Zusammenspiel mit *CENTRORADIALIS (CEN)* den Blühbeginn, die Identität axialer Meristeme und das Brechen der Dormanz in *Populus* (Mohamed *et al.*, 2010). Das regulatorische *CONSTANS (CO)/FT*-Modul, das in einjährigen Pflanzen die Blütezeit in Abhängigkeit von Variationen der Tageslänge kontrolliert, kontrolliert in Espenbäumen das Blühen und darüber hinaus die Kurztag-induzierte Einstellung des Wachstums sowie die Knospenruhe im Herbst (Böhlenius *et al.*, 2006). Das zum Blütezeit-Gen *FT* aus *Arabidopsis* verwandte Pappel Gen *FLOWERING LOCUS T2 (FT2)* kontrolliert das erstmalige und saisonale Blühen in Pappel (Hsu *et al.*, 2006). Die Expression von *FT* und seinen Homologen beschleunigt den Beginn der Blüte in einigen Pflanzenarten, darunter Pappel (*Populus* spp.) (Zhang *et al.*, 2010).

Detailliertere Studien konnten zeigen, dass dabei die Kreisläufe des reproduktiven und vegetativen Wachstums in der mehrjährigen Pappel durch die transiente Expression der funktionell voneinander abweichenden Paraloge *FT1* und *FT2* koordiniert werden, wobei *FT1*, ausgelöst durch niedrigere Temperaturen, die Reproduktion veranlasst, während das vegetative Wachstum als Antwort auf wärmere Temperaturen und längere Tage in der Wachstumsphase durch *FT2* gefördert wird (Hsu *et al.*, 2011).

b) Lignin

Typisch für die aktive Wachstumsphase im Sommer ist die Holzbildung, die in Verbindung mit einer gesteigerten Ligninsynthese steht, da das neu gebildete Holz durch Lignin verstärkt wird. Diese Ligninablagerung ist einer der finalen Schritte der Xylem-differenzierung und findet hauptsächlich während der sekundären Zellwandverdickung statt (Bhuiyan *et al.*, 2009a). Im Allgemeinen beinhaltet die Holzdifferenzierung vier Hauptschritte: Expansion der Zellen, Ablagerung einer dicken, vielschichtigen sekundären Zellwand, die Lignifizierung und das Absterben der Zellen (Plomion *et al.*, 2001). Während das Holz, also das sekundäre Xylem, dabei aus dem vaskulären Kambium hervorgeht, das eine undifferenzierte Schicht meristematischer Zellen ist (Mellerowicz *et al.*, 2001), scheint für die Synthese der Ligninmonomere das Phloem eine Schlüsselrolle zu spielen (Emiliani *et al.*, 2011).

Lignine sind phenolische Makromoleküle, die aus verschiedenen Monomeruntereinheiten (Monolignolen) zusammengesetzt sind. Sie werden in die pflanzliche Zellwand eingelagert und führen so zur Verholzung (Lignifizierung) des Gewebes. Pflanzliche Zellen sind von einer starren Zellwand umgeben, die im Allgemeinen aus Cellulose, Hemicellulose, Pektin, Proteinen und/oder Lignin besteht, wobei ihre Zusammensetzung je nach Zelltyp variiert (Zhong and Ye, 2007). Lignine finden sich in speziellen Zelltypen von Gefäßpflanzen, hauptsächlich in denen mit sekundär verdickten Zellwänden, die in den Wassertransport oder die Vermittlung mechanischer Stabilität involviert sind (Zhao and Dixon, 2011). Trockenholz besteht aus 30 % Lignin, 40 % Cellulose und 30 % Hemicellulose, womit Lignin nach Cellulose der zweithäufigste Naturstoff auf der Erde ist (Heldt, 2003). Lignin vermittelt nicht nur Stabilität, Druckfestigkeit und Hydrophobizität

(Bonawitz and Chapple, 2010), sondern spielt auch eine wichtige Rolle zum Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen (Bhuiyan *et al.*, 2009b).

Wie bei allen Phenylpropanoiden zweigt die Ligninsynthese vom primären Methabolismus durch die Deaminierung von Phenylalanin ab, wobei Zimtsäure gebildet wird (Bonawitz and Chapple, 2010). Dieser erste Schritt wird von der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert. Der letzte Schritt der Ligninmonomersynthese ist die Reduzierung der Zwischenprodukte durch die Cinnamylalkohol-Dehydrogenase (CAD) zu den Monolignolen Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol.

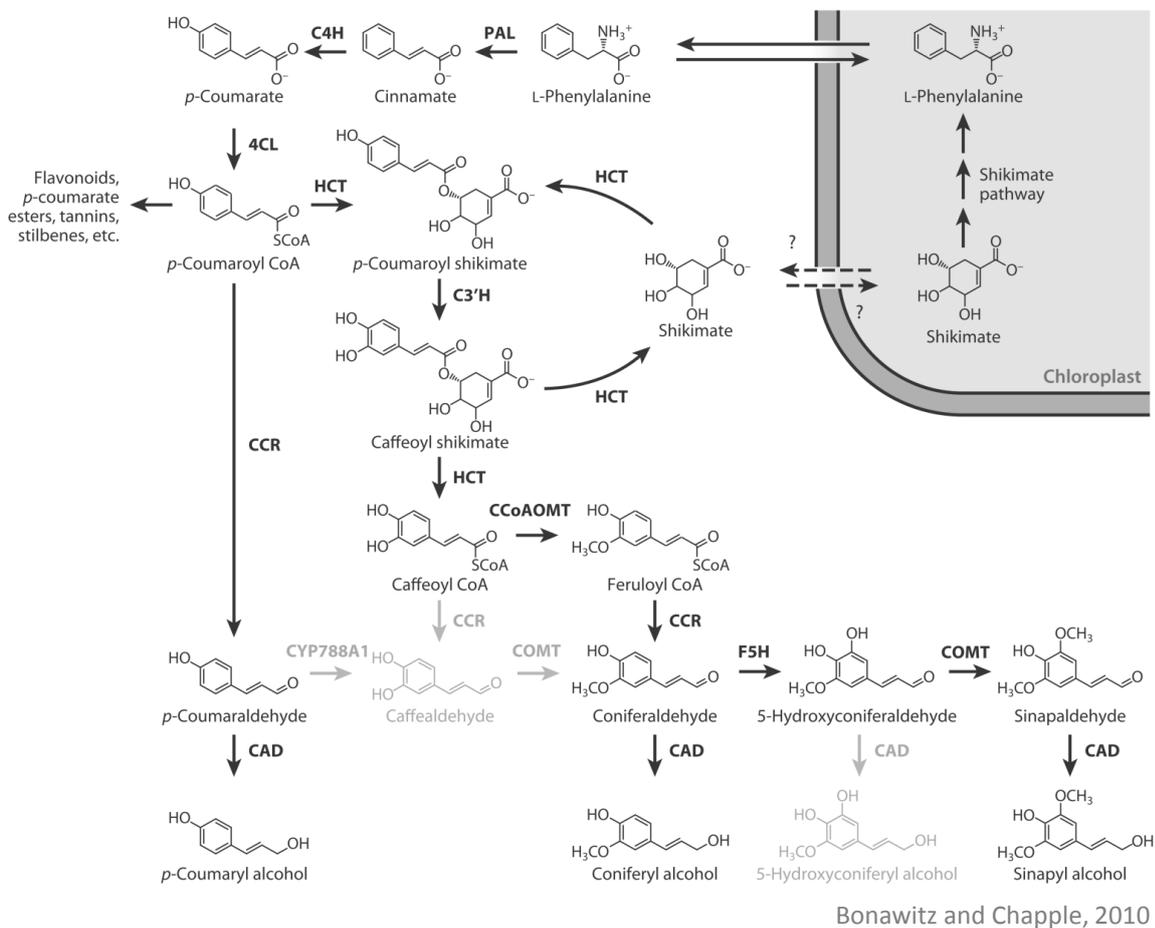


Abbildung 1-10: Monolignolbiosynthese über den Phenylpropanoidweg. Grau dargestellt sind Enzyme und Intermediate, die vermutlich in Wildtyp-Pflanzen nicht signifikant zur Ligninbiosynthese beitragen, aber in einigen Mutanten oder transgenen Pflanzen wichtig sein könnten. (Abbildung aus Bonawitz and Chapple, 2010)

Die synthetisierten Monolignole werden entweder putativ in der Vakuole gespeichert oder in den Apoplast transportiert (Boerjan *et al.*, 2003). Für diesen Transport wären eine Sekretion über Vesikel und/oder ABC-Transporter in der Plasmamembran denkbar (Samuels *et al.*, 2002; Ehlting *et al.*, 2005). Aktuelle Studien an Vesikeln von *Arabidopsis* Plasma- und vakuolären Membranen sprechen dafür, dass der Transport von Lignin-Vorläufern durch ABC-Transporter vermittelt wird (Miao and Liu, 2010).

Die Monolignol-Bausteine werden extrazellulär im Apoplasten zu Lignin-Makromolekülen polymerisiert. Dabei bestehen die Lignine der Angiospermen hauptsächlich aus Guaiacyl (G)- und Syringyl (S)-Einheiten, deren Vorläufer die Coniferyl- und Sinapylalkohole sind (Lapierre *et al.*, 2004).

Für die Fichte (*Picea abies*) konnte gezeigt werden, dass die Expressionslevel verschiedener Gene des Phenylpropanoidwegs, darunter auch PAL1, während der Spätholzbildung ansteigen, was damit zusammenpasst, dass die Lignifizierung des sich entwickelnden Xylems im Spätherbst stattfindet (Emiliani *et al.*, 2011). Auch für die Pappel ist ein PAL1-Anstieg zur Zeit der Spätholzbildung zu erwarten.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl die LMPC-Technik mittlerweile im tierischen und medizinischen Bereich routinemäßig eingesetzt wird, hat sie sich in der Pflanzenphysiologie noch immer nicht als Standardmethode etabliert.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag deshalb auf der Optimierung dieser Technik an Pflanzen. Anschließend sollte die LMPC für zwei physiologische Fragestellungen an gänzlich verschiedenen Pflanzen eingesetzt werden:

- LMPC-isolierte *Arabidopsis thaliana* Phloemzellen sollten über Mikroarrays auf transkriptioneller Ebene Aufschluss über Phloem-mobile Signale in Folge einer Infektion mit einem Pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) geben. Dies sollte Signalweiterleitungsprozesse während der systemischen Resistenzreaktion der Pflanze aufzeigen.
- Holzstrahlen scheint eine wichtige Funktion bei der Regulation umsteuernder Prozesse zwischen den Jahreszeiten zuzukommen. Daher sollten saisonale Unterschiede der genomweiten Expressionsmuster von LMPC-angereicherten *Populus x canescens* Holzstrahlzellen analysiert werden. So sollte die unterschiedliche Funktion der Strahlen im jahreszeitlichen Verlauf herausgearbeitet werden. Dabei lag besonders der Übergang von Dormanz zum aktiven Wachstum im Fokus.

2. Material und Methoden

2.1 Laser Microdissection and Pressure Catapulting (LMPC)

Die Methode der Laser Mikrodissektion ist eine vielfältig einsetzbare, leistungsstarke Technik. Mit ihr lassen sich u. a. Expressionsanalysen gewebe- oder zelltypspezifisch durchführen.

Das zu untersuchende Pflanzenmaterial muss dafür zunächst fixiert und eingebettet werden, um so die Stabilität und Unversehrtheit des Transkriptoms zu gewährleisten, sowie das Herstellen von Dünnschnitten für die LMPC unter höchstmöglichem Morphologieerhalt zu ermöglichen. Das aus diesen Dünnschnitten via LMPC gesammelte Gewebematerial kann im Anschluss für die RNA-Isolation verwendet werden. Nach einem optionalen Amplifikationsschritt der mRNA können über Mikroarrays oder qPCR Expressionsmuster analysiert werden.

2.1.1 Einbetten des Pflanzenmaterials

a) Vorbereiten des Pflanzenmaterials

Blütenstängel infiltrierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen (siehe 2.2) wurden mittels einer scharfen Rasierklinge in etwa 10 mm lange Stücke geschnitten. Für die saisonalen Holzproben von *Populus x canescens* wurden 1 ½- bis 2 ½-jährige Äste mit Hilfe einer Rasierklinge und eines Gummihammers in ca. 5 mm lange Stücke zerteilt, und es wurde die Rinde vom Holz entfernt. Falls die so entstandenen Astscheiben einen zu großen Durchmesser für die Einbettformen besaßen (> 0,5 cm), wurden sie halbiert oder geviertelt. Beim Zuschneiden des Pflanzenmaterials wurde möglichst zügig gearbeitet, um RNA-Degradation und stressbedingte Änderungen im Transkriptom zu verhindern.

b) Fixierung

Zur Fixierung wurden die *Arabidopsis*-Blütenstielstücke sofort in 20 ml-Rollrandgläser, die Pappel-Astscheiben in 50 ml-Reaktionsgefäße mit dem mindestens zehnfachen Volumen einer frisch angesetzten 5:1-Mischung Ethanol:Eisessig überführt. Bei dem für die LMPC verwendeten Ethanol handelte es sich stets um mit 1 % MEK vergälltes Ethanol

(Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Nach einer 10- bis 15-minütigen Vakuum-Infiltration mit zweimaligem Lösungswechsel wurde das Pflanzenmaterial in frischer Fixierlösung über Nacht (≈ 16 h) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Das Gewebe wurde dann mit 70%igem Ethanol (1x 20 min, RT) und 96%igem Ethanol (2x 20 min, RT) entwässert. Anschließend erfolgte eine schrittweise Überführung des Materials über verschiedene Ethanol-Roticlear[®] (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)-Mischungen (3:1, 1:1, 1:3, jeweils 30 min, RT) in reines Roticlear[®] (30 min, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$). Die Zeitangaben für die Inkubation in den jeweiligen Lösungen sind dabei Mindestangaben.

c) Einbettung

Da sich Blütenstiel und Holz in ihrer jeweiligen Beschaffenheit und Härte unterscheiden, wurden zum Einbetten zwei verschiedene Paraffinwachse verwendet: für *Arabidopsis* ein weiches „low-melt“-Paraplast[®] (Plano, Wetzlar, Deutschland) mit einem Schmelzpunkt von $47\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und für die Pappel ein festeres Paraplast[®] (Paraplast[®] regular, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) mit einem Schmelzpunkt von etwa $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zu einem späteren Zeitpunkt war das „low-melt“-Paraplast von Plano nicht mehr erhältlich, deshalb wurde von da an für die *Arabidopsis*-Proben das Paraplast X-TRA[®] (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) mit einem Schmelzpunkt von $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwendet.

Zur Herstellung einer gesättigten Paraplast[®]/Roticlear[®]-Lösung wurde ein 50 ml-Reaktionsgefäß zu zwei Dritteln mit dem jeweiligen Paraplast[®] befüllt, das mit Roticlear[®] übergossen wurde. Nach Schmelzen des Paraplasts[®] in einem $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad (TW2.03, LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland) wurde das reine Roticlear[®] auf dem Pflanzenmaterial durch diese gesättigte Lösung ersetzt. Es folgte eine weitere Inkubation über Nacht (≈ 16 h), dieses Mal bei $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Brutschrank (UM 100, Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland).

Am nächsten Tag wurde das mit Paraplast[®] gesättigte Roticlear[®] gegen reines, geschmolzenes Paraplast[®] ausgetauscht. Über den Tag verteilt wurde das Paraplast[®] mehrfach durch frisches Paraplast[®] ersetzt, bis das Roticlear[®] vollständig ausgewaschen war. Um das Paraplast[®] zu verflüssigen bzw. auf den Proben flüssig zu halten, wurde dabei im Brutschrank oder in einem Wasserbad (WNB 10, Memmert GmbH & Co. KG,

Schwabach, Deutschland) gearbeitet – immer bei der dem jeweiligen Paraplast® entsprechenden Temperatur. Für eine bessere Durchdringung des Pflanzenmaterials mit dem Paraplast® wurde es mit flüssigem Paraplast® vakuumfiltriert. Dabei wurde ein vorgeheizter Metallblock verwendet, der von der Werkstatt des Julius-von-Sachs-Instituts angefertigt wurde. Da dieser aber nur Aussparungen für 1,5 ml-Reaktionsgefäße und Rollrandgläser besitzt, wurden die Pappel-Astscheiben während der Paraplast®-Wechselschritte aus den 50 ml-Reaktionsgefäßen in solche Gläschen überführt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Gläschen vor der Infiltration nur zur Hälfte mit Paraplast® gefüllt, die Pflanzenstücke aber trotzdem bedeckt waren. Nach der Vakuum-Infiltration wurde das Paraplast® ein letztes Mal ausgetauscht, und das Gewebe in dem geschmolzenen Paraplast® über Nacht (≈ 16 h) im Brutschrank bei der dem jeweiligen Paraplast entsprechenden Temperatur inkubiert.

Zum Abschluss der Einbettung wurden die Pflanzenstücke in dafür geeigneten Formen mit frischem flüssigem Paraplast® mit Hilfe von Präpariernadeln senkrecht ausgerichtet. Jeweils drei *Arabidopsis*-Blütenstielstücke wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß platziert. Bei den Pappel-Astscheiben kamen je nach Größe ein bis zwei Stücke in 1,5 ml-, 2,5 ml- oder 10 ml-Reaktionsgefäße. Bei den 1,5 ml-Reaktionsgefäßen, die im Gegensatz zu den 2,5 ml- und 10 ml-Gefäßen unten spitz zulaufen, wurde noch eine runde Plastikscheibe (d = 6 mm) als Platzhalter in die Spitze eingesetzt, damit man eine ebene Abschlussfläche erhielt (siehe Abbildung 2-1). Es wurde darauf geachtet, dass zum finalen Einbetten in den Formen frisches Paraplast® verwendet wurde, das nur einmal verflüssigt worden war.



Abbildung 2-1: Einbettung von *P.can* Holz in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen. Es wurden kleine Plastikscheiben verwendet, um in den 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für die Platzierung der Pappel-Aststücke eine gerade Abschlussfläche zu erreichen.

d) Lagerung

Um Rissbildung im Wachs zu vermindern, wurden die Formen nach der Einbettung langsam abgekühlt, d. h. zunächst auf Raumtemperatur (RT), dann 3-4 h bei 4 °C und ÜN bei -20 °C. Die Lagerung der vollständig ausgehärteten Paraplast®-Blöcke erfolgte bei -80 °C.

2.1.2 Herstellung und Vorbereitung der Dünnschnitte für die LMPC

a) Herstellung der Dünnschnitte

Für die LMPC wurden mittels eines Rotationsmikrotoms (RM2165, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) von dem eingebetteten Material Dünnschnitte hergestellt. Dabei betrug die Schnittdicke bei *P. canescens*-Astscheiben 10 µm und bei *A. thaliana*-Blütenstielen 20 µm. Zum Schneiden wurden Einwegmesser (Typ 819, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet, die zuvor mit RNase-ExitusPlus™ (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 70%igem Ethanol gereinigt worden waren. Beim Schneiden der Blütenstiele („low melt“-Paraplast®, Paraplast X-TRA®) wurden das Messer und die Halterung für die Probenblöcke mittels Trockeneis in speziell angefertigten Halterungen (Werkstatt des Julius-von-Sachs-Instituts) gekühlt. An warmen Tagen (> 28 °C) wurde dieses Kühlsystem auch beim Schneiden der Pappelproben (Paraplast® regular) verwendet. Die Schnitte wurden mit einer autoklavierten 200 µl-Pipettenspitze auf spezielle LMPC-geeignete Objektträger (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland) überführt und bei 56 °C („low melt“-Paraplast®, Paraplast X-TRA®) bzw. 60 °C (Paraplast® regular) auf diese aufgeschmolzen. Ein üblicherweise zur Streckung der Schnitte verwendeter Wassertropfen hätte zu erheblichen Einbußen in der RNA-Qualität geführt (Cai and Lashbrook, 2006). Darüber hinaus hätte sich die RNA verschiedener Areale durch Auswaschung vermischen können. Die verwendeten Objektträger waren mit einer dünnen PEN (Polyethylen-Naphthalat)-Membran überzogen, die sich mit dem Laser schneiden lässt und während der LMPC als Stütze für die ausgeschnittenen Areale fungierte. Zusätzlich wurden die Objektträger mit SigmaCote® (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) vorbehandelt, um

eine bessere Haftung der Schnitte auf der Membran zu erreichen. Dazu wurden 150 μ l SigmaCote® auf die Objektträger gegeben, das bei Raumtemperatur evaporierte.

Die Objektträger mit den aufgeschmolzenen Dünnschnitten konnten mehrere Tage bei -20 °C in einer Trockenbox, mit Silicagel als Trocknungsmittel, ohne RNA-Konzentrations- und Qualitätsverlust gelagert werden.

b) Entparaffinieren

Um aus den Dünnschnitten via LMPC Areale isolieren zu können, musste zuerst das Paraplast® entfernt werden. Dazu wurden die Schnitte auf dem Objektträger mit 150 μ l Histo-Clear™ (National Diagnostics, Atlanta, USA) überschichtet. Nach 3-5 min wurde die Lösung vorsichtig entfernt ohne dabei die Membran zu beschädigen. Diese Inkubation wurde bei *Arabidopsis* 9x und bei Pappel 13x wiederholt. Anschließend wurde der Objektträger dreimal mit je 150 μ l Ethanol gespült und kurz (< 2 min) bei RT getrocknet.

c) Färben der Schnitte

Zum besseren Erkennen der morphologischen Strukturen wurden die Dünnschnitte auf dem Objektträger angefärbt. Da der Laserstrahl durch die Färbung besser absorbiert wurde, konnte außerdem die während der LMPC benötigte Laserenergie deutlich reduziert werden.

Zum Färben wurden die Schnitte mit 150 μ l einer gesättigten Toluidinblau-Ethanol-Lösung überschichtet. Die Lösung wurde kurz bei 14.100 x g abzentrifugiert, um eine Kontamination mit ungelösten Farbkristallen zu vermeiden. Überschüssiger Farbstoff wurde nach dem Eintrocknen der Lösung bei RT mit Ethanol ausgewaschen. Bei *Arabidopsis* wurde mit 1-3x 150 μ l Ethanol gespült, bei den Pappelproben wurde so oft mit Ethanol gespült, bis sich kein Farbstoff mehr aus den Schnitten löste.

Die Schnitte wurden anschließend bei 37 °C < 5 min auf einem Heizblock (Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK) getrocknet.

d) Liquid CoverGlass

Da Pappelholz im Gegensatz zu den *Arabidopsis*-Blütenstielen ein sehr hartes Material ist, lösten sich die Dünnschnitte bereits während des Entparaffinierens vom Objektträger bzw. rollten sich nach dem Trocknen. Teilweise hafteten die Schnitte sogar so schlecht auf den Objektträgern, dass sie schon durch deren leichtes Bewegen nicht mehr auf diesen verblieben. Um die Schnitte möglichst plan zu bekommen und auf dem Objektträger zu halten, wurde dieser mit PALM® Liquid CoverGlass N (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland) besprüht. Anschließend wurde mit einem, mit RNase ExitusPlus™ und 70%igem Ethanol gereinigten Glasstab über die Schnitte gerollt. Die mit Liquid CoverGlass überschichteten Objektträger wurden grundsätzlich direkt für die LMPC verwendet.

2.1.3 LMPC

Die LMPC wurde an einem PALM® MicroBeam-System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Bei der verwendeten Software handelte es sich um die PALM® RoboSoftware 2.2-0103 (DE).

a) Sammeln von Phloem- bzw. Holzstrahl-Arealen

Um mittels LMPC ausschließlich das jeweils gewünschte Gewebe zu isolieren, wurden auf den entsprechenden Querschnitten mit Hilfe der Gerätesoftware pro Durchgang ca. 50-70 Areale angezeichnet. Dabei wurde darauf geachtet, etwas größer als das eigentliche Phloem bzw. breiter als die Holzstrahlen anzuzeichnen, da durch die relativ hohe Energie des Lasers ein breiter Schnitt entstand, und die RNA direkt an der Schnittkante zerstört wurde. Die Areale wurden mit der Einstellung 1-2x RoboLPC in den Deckel des Sammelgefäßes (MicroTube 500, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland) katapultiert, in dem sich 5 µl RLT-Puffer (siehe 2.3.1) befanden. Die Energie betrug dabei für das Schneiden (Cut) $\leq 60\%$ und wurde für das Katapultieren (LPC) automatisch um 16 Prozentpunkte erhöht. Dauerte das Sammeln der angezeichneten Areale länger als 20-30 min, wurden 3 µl DEPC-H₂O in den Deckel pipettiert, um ein Eintrocknen des Flüssigkeitstropfens zu vermeiden.

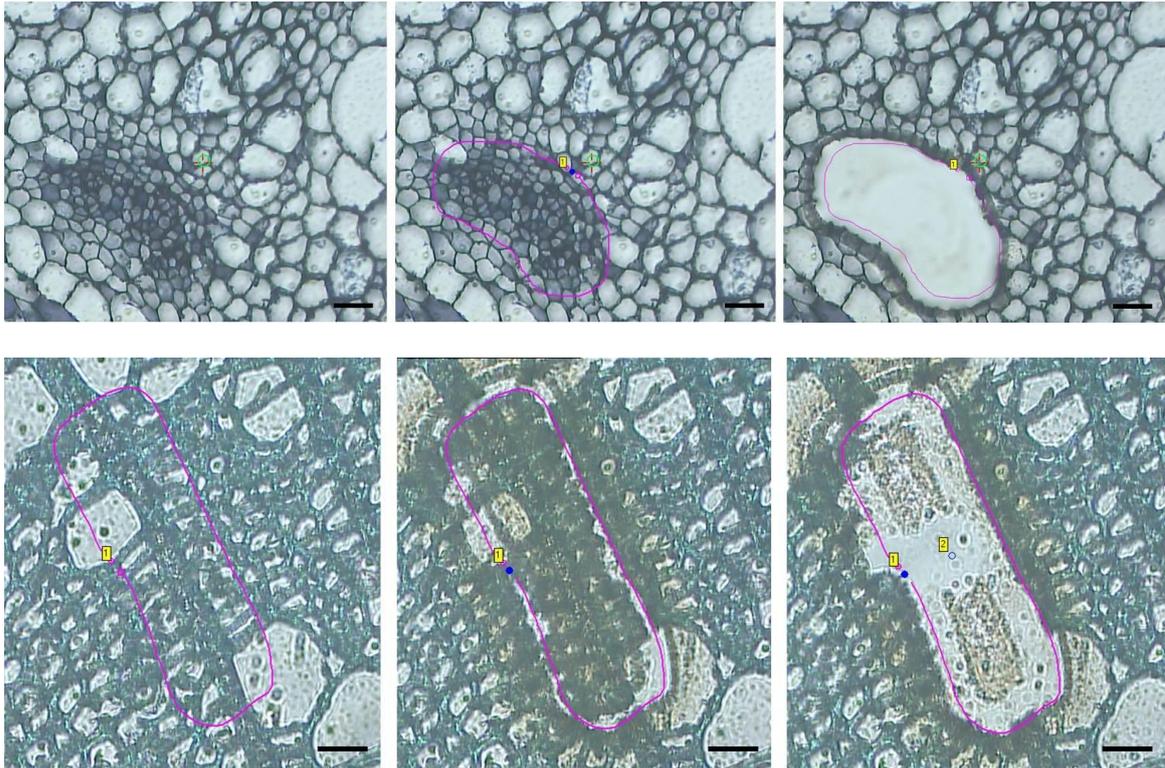


Abbildung 2-2: Mikroskopische Aufnahmen von *A.th*-Blütenstiel- (obere Reihe) und *P.can*-Holzquerschnitten (untere Reihe). Angezeichnet und geschnitten wurde jeweils eine Phloem- bzw. Strahlen-Region; wenn die Stücke nicht (wie im oberen Fall) mit der Einstellung RoboLPC in den Deckel flogen, musste (wie im unteren Fall) nachgeschnitten bzw. das Katapultieren mit einem manuell ausgelösten Laserpuls erzwungen werden. Größenbalken entsprechen 20 μm .

Das gesammelte Material im Deckel des Probengefäßes wurde in das Gefäß zentrifugiert (2 min, $> 10.000 \times g$). Der Deckel wurde zusätzlich mit 10 μl RLT-Puffer gespült (2 min, $> 10.000 \times g$). Die einzelnen Proben wurden bis zur weiteren Benutzung auf Trockeneis bzw. bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Wenn eine Gesamtfläche von $2.000.000 \mu\text{m}^2$ (*Arabidopsis*) bzw. $5.000.000 \mu\text{m}^2$ (Pappel) präpariert war, dann wurden die einzelnen Proben zusammengeführt, das Volumen mit RLT-Puffer auf 350 μl aufgefüllt, und die RNA isoliert (vgl. 2.3.1).

b) Sammeln von „Holzresten“ (angereicherte Strahlen)

Bei den Pappelholzproben war es unmöglich, ausreichend RNA aus den gesammelten Holzstrahl-Arealen zu isolieren. Deshalb wurde dazu übergegangen, „Holzreste“ zu sammeln. Bei Pappeln stellen fast ausschließlich Strahlzellen den noch lebenden Teil des ausdifferenzierten Holzes dar. Das axiale Parenchym kann in diesem Fall vernachlässigt werden, da es nur einen marginalen Teil darstellt (siehe Tabelle 2-1).

Tabelle 2-1: Prozentuale Zusammensetzung des Holzes einiger Baumarten. Tabellenauszug aus Panshin and de Zeeuw (1980). Angaben in Prozent des Gesamtvolumens.

Spezies	Gefäße	Fasern	Strahlen	axiales Parenchym
<i>Acer rubrum</i>	18,0	68,0	13,3	0,1
<i>Carya pecan</i>	7,7	55,0	26,4	10,9
<i>Magnolia acuminata</i>	38,6	47,3	13,9	0,2
<i>Populus deltoides</i>	33,0	53,1	13,7	0,2
<i>Populus</i>	33,8	55,0	11,1	0,1
<i>Quercus velutina</i>	14,1	37,3	31,4	17,2
<i>Ulmus americana</i>	48,0	34,7	11,3	6,0

Deshalb wurde von Pappelholzquerschnitten mittels der Laser Mikrodisektion der äußere, sich noch differenzierende Teil, das Phloem und das Kambium, sowie der innere Markbereich abgetrennt. Der mittlere Teil, der als einzige lebende, und somit RNA-beinhaltende Zellen die Strahlen (und axiales Parenchym) enthält, konnte nun inklusive der Objektträger-Membran mit einer RNase-freien Pinzette abgenommen werden (Abbildung 2-3).

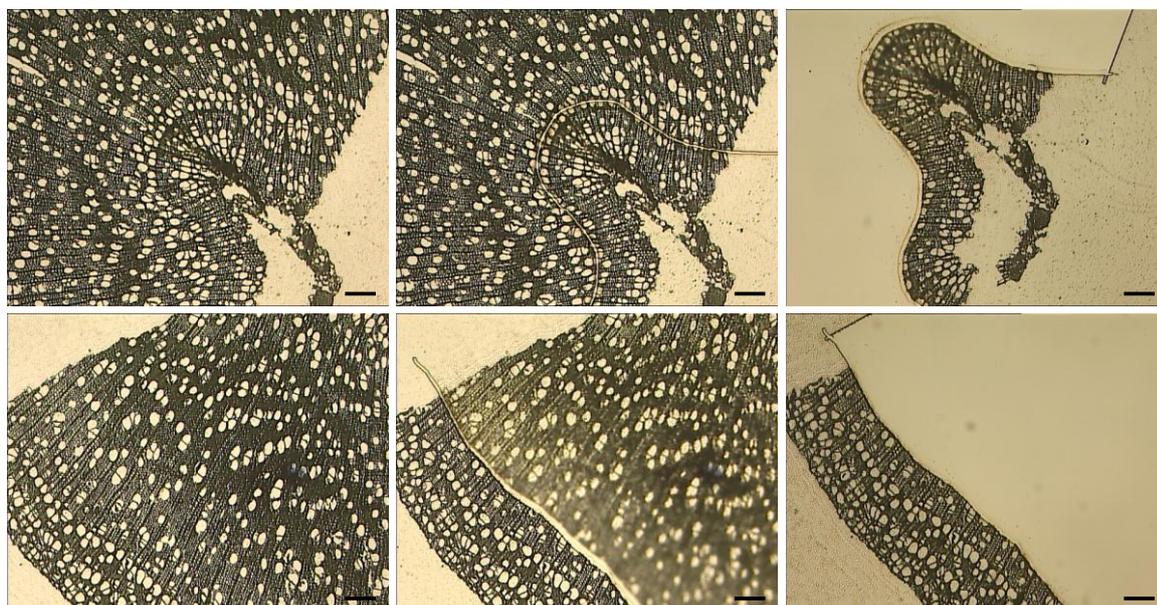


Abbildung 2-3: Sammeln von „Holzresten“. Die Bilderabfolge stellt von links nach rechts die einzelnen Schritte dar; obere Reihe: Entfernen des Marks; untere Reihe: Entfernen der Differenzierungszone inkl. Phloem und kambialer Bereiche. Größenbalken entsprechen 150 µm.

2.2 Infiltration von *Arabidopsis thaliana* mit *Pseudomonas*

Die Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit virulenten und avirulenten *Pseudomonas*-Stämmen erfolgte über deren Infiltration in die Blätter der Pflanze. Die *A.th*-Pflanzen (Ökotyp Columbia-0, Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Loughborough, UK) wurden unter den beim jeweiligen Experiment angegebenen Bedingungen angezogen und kultiviert.

2.2.1 Kultivierung der Bakterien und Verdünnung des Inokulums

Virulente *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P.st*) DC3000 (Rifampicin-resistent) und/oder avirulente *P.st* DC3000 *avrB* (Rifampicin- und Kanamycin-resistent) bzw. *P.st* DC3000 *avrRpm1* (Rifampicin- und Tetracyclin-resistent) wurden aus Glycerinstocks auf KB-Agar-Platten mit passendem Antibiotikum fraktionell ausgestrichen und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Tabelle 2-2 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antibiotika und ihre eingesetzten Mengen.

Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika. Übersicht der verwendeten Stockkonzentrationen (c_{Stock}), der Lösungsmittel sowie der jeweiligen Endkonzentrationen im Bakterienmedium (c_{End}).

Antibiotikum	c_{Stock} [mg/ml]	in	c_{End} [µg/ml]
Rifampicin	50	DMSO	50
Kanamycin	50	H ₂ O	50
Tetracyclin	5	H ₂ O	5

Pro Platte wurde eine Einzelkolonie in 4 ml KB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) überführt und ÜN bei 28 °C möglichst waagrecht geschüttelt. 1-2 ml dieser Vorkultur wurden in 50-100 ml KB-Medium (mit entsprechendem Antibiotikum) gegeben und unter Schütteln bei 28 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,1-0,2 bei 28 °C inkubiert. Die optische Dichte der Bakteriensuspension bei 600 nm (OD₆₀₀) wurde am Novaspec III Spektralphotometer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gemessen. Die Bakterien wurden pelletiert (10 min, 1.500 x g, 4 °C), mit 10 mM MgCl₂ gewaschen (10 min, 1.500 x g, 4 °C) und in einer kleinen Menge (ca. 5 ml) 10 mM MgCl₂ resuspendiert. Anschließend wurde durch Zugabe von weiterem 10 mM MgCl₂ die OD₆₀₀ auf 0,2 ($\approx 2 \times 10^8$ cfu/ml, cfu = engl.: colony forming unit) eingestellt. Je nach

Verwendung des Inokulums wurde diese Lösung mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 0,002 ($\approx 2 \times 10^6$ cfu/ml) oder 0,001 ($\approx 10^6$ cfu/ml) verdünnt.

2.2.2 Infiltration

Das *P.st*-Inokulum mit der eingestellten OD₆₀₀ wurde mit Hilfe einer 2 ml- oder 5 ml-Spritze durch die Stomata auf der Unterseite von *A.th* Col-0-Blättern in den Apoplasten druckinfiltriert. Es wurde jeweils so viel Flüssigkeit infiltriert, dass das komplette Blatt durchsichtig-nass erschien. Pro Pflanze wurden, wenn nicht anders angegeben, vier Blätter infiltriert.



Abbildung 2-4: Infiltration einer blühenden *Arabidopsis*-Pflanze mit *Pseudomonas*.
Die Bakteriensuspension wurde mittels einer Spritze durch die auf der Blattunterseite gelegenen Stomata in den Apoplasten druckinfiltriert.

Vor der Infiltration wurden die Pflanzen gegossen und für mehrere Stunden mit durchlöcherten Plastiktüten abgedeckt. So wurde die lokale Luftfeuchtigkeit erhöht, was zu einer vollständigen Öffnung der Stomata führte, und die Durchdringung des Gewebes mit dem Inokulum erleichterte.

Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Pflanzen nach der Infiltration noch für einige Stunden im Licht standen, da sonst eine Ausbildung der SAR nicht oder nicht vollständig möglich ist (Zeier *et al.*, 2004).

2.2.3 Ernten des Pflanzenmaterials

Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infiltration wurde das Pflanzenmaterial geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Pro Pflanze wurden jeweils vier lokale und vier systemische Blätter sowie der Haupt-Blütenstiel geerntet. Bis zur weiteren Verarbeitung (RNA-Isolation) wurde das Pflanzenmaterial bei -80 °C gelagert. Für die Laser Mikrodisektion wurden ggf. je Pflanze ca. zehn 1 cm-Blütenstielstücke direkt fixiert (siehe 2.1.1).

2.2.4 Zeitreihenexperimente

Um den Zeitpunkt zu bestimmen, zu dem die Expression bestimmter Markergene nach einer Infektion der Pflanzen mit *P.st* ansteigt, wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt. Pro Behandlung und Wiederholung (n) wurden zehn bis elf Pflanzen infiltriert. Zum Kontrollzeitpunkt 0 und jeweils 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36(, 42) und 48 Stunden nach der Infiltration wurden die Pflanzen geerntet (siehe 2.2.3), und das Pflanzenmaterial wurde für die RNA-Isolierung und qPCR-Analysen verwendet.

Insgesamt wurden fünf verschiedene Zeitreihen durchgeführt. Tabelle 2-3 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Experimente.

Tabelle 2-3: Übersicht über die durchgeführten Zeitreihen-Experimente. *A.th*-Pflanzen wurden mit virulenten und avirulenten *P.st* in der jeweiligen Dichte (OD_{600}) sowie $MgCl_2$ als Kontrolle infiltriert. Zu zehn bzw. elf verschiedenen Zeitpunkten nach der Infiltration wurden die Pflanzen geerntet.

#	Ökotyp	Inokulum [OD_{600}]	Tageslänge	Zeitpunkte
I	Col-0	0,2	12 h	10
II	Col-0	0,2	12 h	11
III	WS	0,2	16 h	11
IV	Col-0	0,002	16 h	11
V	Col-0	0,002	12 h	11

2.2.5 Überprüfung der Effizienz der SAR

Ob und in welchem Maße die Pflanzen eine SAR ausbilden, wurde mittels einer cfu-Bestimmung überprüft.

Dazu wurden jeweils vier Blätter von *A.th* Col-0-Pflanzen wie unter 2.2 beschrieben mit 2×10^6 cfu/ml *P.st* *avrRpm1* ($OD_{600} = 0,002$) bzw. 10 mM $MgCl_2$ als Kontrolle infiltriert. 2 dpi (engl.: days post inoculation) erfolgte eine zweite Infiltration mit 2×10^6 cfu/ml *P.st* ($OD_{600} = 0,002$) in vier weitere, systemische Blätter (SL, engl.: systemic leaves). Bei blühenden Pflanzen wurden zusätzlich sechs Blütenstielblätter (ISL, engl.: inflorescence stalk leaves) mit 10^6 cfu/ml *P.st* ($OD_{600} = 0,001$) infiltriert.

3 dpi wurden die Blätter der zweiten Infiltration abgeschnitten und mit 70%igem Ethanol und sterilisiertem H_2O gewaschen. Aus den SL wurden sechs Blattscheiben (\varnothing 4 mm) ausgestochen, aus den ISL sechs kleine Rechtecke ($A \approx 10 \text{ mm}^2$) ausgeschnitten, und das Frischgewicht (FG) bestimmt. Die Blattstücke wurden mit zwei Keramikugeln (Precellys® Keramik-Kit 1.4 mm, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und 100 μ l sterilisiertem H_2O in einer Schwingmühle (MM300, Retsch GmbH, Haan, Deutschland) homogenisiert (2x 1 min, 25 1/s). Die Bakteriensuspension wurde auf 1 ml aufgefüllt und in einer Verdünnungsreihe auf KB rif-Agar-Platten ausplattiert (jeweils 10 μ l). Nach zwei Tagen bei 28 °C wurden die Kolonien ausgezählt und die cfu/mg FG bestimmt.

2.3 Verfahren mit Ribonukleinsäuren (RNA)

Bei allen Arbeiten mit RNA wurde darauf geachtet, möglichst RNase-frei zu arbeiten. Alle verwendeten Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. Die Materialien aus Plastik wurden vor Benutzung autoklaviert, und die verwendeten Glas- bzw. Porzellan-Gefäße hitzesterilisiert (2 h bei 220 °C), um eventuell anhaftende RNasen zu inaktivieren.

2.3.1 Isolation der Gesamt-RNA aus eingebettetem und mikrodisektiertem Pflanzenmaterial

Die Isolation der Gesamt-RNA aus eingebettetem und mikrodisektiertem Probenmaterial erfolgte mittels des RNeasy Micro Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland). Mit diesem Kit ist es möglich, aus weniger als 5 mg Gewebe bzw. weniger als 5×10^5 Zellen bis zu 45 µg RNA in einem Elutionsvolumen von 10-14 µl zu isolieren. Daher eignet es sich besonders gut zur Aufarbeitung von mikrodisektiertem Material. Es beruht auf der Kombination einer Guanidin-Isothiocyanat-Lyse und einer Silica-Membran-basierten Nukleinsäure-Aufreinigung. Um einen eventuellen Materialverlust durch Bindung der Nukleinsäuren an die Kunststoffoberflächen der Reaktionsgefäße und Pipettenspitzen zu vermindern, wurde zu jedem Zeitpunkt mit RNase-/DNase-freien low-binding-Reaktionsgefäßen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und -Spitzen (Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) gearbeitet.

Die Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Allerdings wurde auf die Zugabe der poly-A-Carrier-RNA verzichtet, da diese bei einer eventuell nachfolgenden Amplifikation der mRNA stören würde. Darüber hinaus wurde das Pflanzenmaterial in RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol vor der eigentlichen Isolation für 20-30 Minuten im Überkopfschüttler (Hartenstein, Würzburg, Deutschland) inkubiert.

2.3.2 Isolation der Gesamt-RNA aus frischem Pflanzenmaterial

Die Isolation der Gesamt-RNA aus frischem Pflanzenmaterial erfolgte mittels des E.Z.N.A.[®] Plant RNA Kits (Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA). Mit diesem Kit können aus 10-100 mg Pflanzenmaterial bis zu 100 µg Gesamt-RNA in einem Elutionsvolumen

von 40-50 µl isoliert werden. Dieses Kit beruht ebenfalls auf einer Kombination einer Puffer-vermittelten Lyse und einer Silica-Membran-basierten Nukleinsäure-Aufreinigung.

Für die RNA-Isolation wurde das Pflanzenmaterial zunächst mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff gemörsert. Etwa 100 mg wurden dann zusammen mit zwei Keramikugeln (siehe 2.2.5) in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben und zweimal für je 1 min bei 25 1/s in einer mittels flüssigem Stickstoff gekühlten Schwingmühle weiter homogenisiert.

Die Isolation erfolgte nach Herstellerangaben (Protokoll für Standard-Proben). Eluiert wurde in 2x 20 µl DEPC-H₂O. Die Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Die RNA wurde kurzfristig bei -20 °C gelagert. Langfristig wurde sie bei -80 °C aufbewahrt.

2.3.3 Überprüfung der RNA-Qualität

Die Qualität aller RNA-Proben wurde mittels Kapillarelektrophorese überprüft. Dafür wurden das Experion™ Automated Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland; Software Version 3.0) und das Experion™ RNA HighSens Analysis Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) verwendet. Da das hierfür benötigte RNA-Volumen nur 1 µl beträgt und die Sensitivität der RNA HighSens-Chips mit 100 pg/µl bis 5 ng/µl sehr hoch ist, ermöglicht dieses System die qualitative Analyse auch kleinster RNA-Mengen. Der Auftrennungsbereich beträgt dabei 100-6.000 Basen.

In einem Lauf konnte einerseits die Konzentration bestimmt werden, andererseits ließen sich über die Größe und Lage der ribosomalen Peaks Rückschlüsse auf die Qualität der geprüften RNA ziehen. So sollte der 28S rRNA-Peak deutlich größer sein als der 18S rRNA-Peak (Ratio [28S/18S] > 1,5). Außerdem sollten die typischen pflanzlichen 16S und 23S rRNA-Peaks deutlich sichtbar sein. Die 5S und 5,8S rRNAs waren als ein Peak zu erkennen. Eine zusätzliche Angabe der RNA-Qualität lieferte der von der Software berechnete RQI (engl.: RNA Quality Indicator), dessen Wert zwischen 10 (intakte RNA) und 1 (stark degradierte RNA) liegen konnte.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3.4 DNase-Verdau, Fällung und Reverse Transkription

Für die qPCR (siehe 2.4.1) musste die mRNA in cDNA umgeschrieben werden. Bei der qPCR würde genomische DNA stören, weil die Primer in der Regel nicht zwischen genomischer DNA und cDNA unterscheiden können. Die in den RNA-Isolations-Kits verwendeten Silica-Membranen binden wiederum alle Nukleinsäuren, und genomische DNA, die während der Isolation durch auftretende Scherkräfte fragmentiert wird, ist in isolierter Gesamt-RNA immer enthalten. Deshalb müssen diese DNA-Spuren vor der Reversen Transkription durch einen DNase-Verdau entfernt werden.

Dafür wurden je 2,5 µg gesRNA eingesetzt und mit 1 U einer RNase-freien DNase I (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) im zugehörigen Reaktionspuffer für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Reaktionsansatz wurde zur Stabilisierung der RNA noch 1 U/µl Reaktionsvolumen RiboLock™ RNase-Inhibitor zugegeben (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland).

Danach war es notwendig, die RNA zu fällen. Dafür wurde der Reaktionsansatz mit DEPC-H₂O auf 100 µl aufgefüllt. Durch Zugabe von 1/10 Volumen NH₄Ac (5 M in 100 mM EDTA) und 2/3 Volumen Isopropanol wurde die RNA gefällt. Als Fällungshilfe wurde 1 µl Glycogen (RNA grade, 20 mg/ml, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben. Die RNA wurde pelletiert (20.000 x g, 4 °C, > 30 min), mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen (20.000 x g, 4 °C, > 20 min), bei 37 °C getrocknet und in 8 µl DEPC-H₂O resuspendiert.

Zur cDNA-Synthese wurde eine M-MLV Reverse Transkriptase (Promega, Madison, USA) verwendet.

Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription.

5x Puffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
oligo-dT-Primer (100 µM)	0,4 µl
RNA	6,7 µl

Der Reaktionsansatz wurde 2 min bei 70 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,4 µl (= 80 U) der Reversen Transkriptase wurde für eine Stunde bei 42 °C inkubiert.

Die Lagerung der cDNA erfolgte für kurze Zeit bei -20 °C und für längere Zeitspannen bei -80 °C.

2.3.5 mRNA-Amplifikation

Für einige Applikationen war es notwendig, die aus den LMPC-Proben erhaltenen geringen RNA-Mengen (meist etwa 1 ng/μl) zu amplifizieren. Dabei sollte, im Gegensatz zu herkömmlichen Amplifikationsmethoden, nicht fragmentierte, sondern Vollängen-RNA hergestellt werden. Dafür stand zunächst das BD-SMART™ mRNA amplification kit (BD Biosciences, Clontech, Heidelberg, Deutschland) mit einem modifizierten Protokoll zur Verfügung. Da das darin enthaltene Reverse Transkriptase-Enzym, die PowerScript™ Reverse Transcriptase, später aus lizenzrechtlichen Gründen nicht mehr verkauft wurde, und alle Tests mit anderen RT-Enzymen unbefriedigende Ergebnisse lieferten, wurde ab diesem Zeitpunkt auf ein anderes Kit (SenseAmp Plus amplification kit, Genisphere, Hatfield, USA) gewechselt.

Alle Schritte beider Amplifikationsprotokolle wurden in Thermocyclern mit Deckelheizung durchgeführt, die je nach Temperatur des Inkubationsschritts auf 70 °C oder 110 °C eingestellt wurde. Außerdem wurde stets mit RNase-/DNase-freien low-binding-Reaktionsgefäßen und -Spitzen gearbeitet, um einen Materialverlust durch Bindung der Nukleinsäuren an die Kunststoffoberflächen zu vermindern.

a) BD-SMART™ mRNA amplification kit

Die Amplifikation wurde dadurch erreicht, dass die mRNA in doppelsträngige cDNA umgeschrieben wurde, die dann *in vitro* wieder in senseRNA transkribiert wurde. Zusätzlich zum Protokoll des Herstellers wurde vor der *in vitro*-Transkription noch ein PCR-Schritt eingefügt, um eine weitere Voramplifikation zu erreichen. Für diesen Schritt wurden die im Kit enthaltenen Primer verwendet, der „T7 extension primer“ und der „PCR Primer II A“. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 2-5 und Tabelle 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-5: Reaktionsansatz für die Voramplifikations-PCR. BD-SMART™ mRNA amplification kit.

Reaktionsansatz der RT	9,75 µl
H ₂ O	71,0 µl
BD-Advantage 2 PCR Puffer	10,0 µl
50x dNTPs	2,0 µl
T7 Extension Primer	2,0 µl
RNase H	1,0 µl
Advantage Polymerase Mix	2,0 µl
PCR Primer II A	2,0 µl

Tabelle 2-6: PCR-Programm für die Voramplifikation. BD-SMART™ mRNA amplification kit.

37 °C	15 min	x1
95 °C	2 min	
95 °C	30 sec	x10
60 °C	1 min	
68 °C	10 min	

b) SenseAmp Plus amplification kit

Dieses Kit lieferte wie auch das BD SMART™ amplification kit Vollängen-*sense*-RNA. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, allerdings wurden für die Erststrang-cDNA-Synthese statt der zwei mitgelieferten Primer 2 µl des oligo-dT-Primers (100 µM, 1:15 verdünnt, Sequenz: siehe Anhang) eingesetzt.

2.4 Verfahren mit Desoxyribonucleinsäuren (DNA)

2.4.1 Quantitative Echtzeit-PCR (engl.: quantitative real time-PCR, qPCR)

Um die Expression bestimmter Gene zu quantifizieren, wurden die entsprechenden Transkripte mittels qPCR analysiert. Über die kontinuierliche Detektion der Fluoreszenz eines DNA-Doppelstrang-spezifischen Farbstoffs, die proportional zur gebildeten DNA-Menge ansteigt, kann sowohl die Kinetik als auch das Produkt einer PCR-Reaktion quantitativ dargestellt werden (Rasmussen *et al.*, 1998). Des Weiteren ermöglicht die Methode durch eine nachgeschaltete Schmelzpunktanalyse zwischen dem spezifischen Produkt und sekundären Produkten zu differenzieren.

Für die qPCR wurde wie oben beschrieben die Gesamt-RNA (oder ggf. auch die mRNA) isoliert. Die daraus synthetisierte cDNA wurde 20fach mit tRNA-H₂O verdünnt, da die Puffer nicht kompatibel sind. Geringer konzentrierte Proben wurden ggf. auch weniger verdünnt (\geq fünffach). Bei tRNA-H₂O handelte es sich um HPLC-H₂O (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), das mit 10 ng/ μ l tRNA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) versetzt wurde, um Probenverlust durch Bindung niedrig konzentrierter cDNA an die Gefäßwände zu unterbinden.

a) Primerdesign und qPCR

Die qPCR-Analyse erfolgte entweder in einem LightCycler (LightCycler® 2.0 Carousel-based Instrument, Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland; Software Version 3.5) oder einem Realplex (Mastercycler® ep realplex², Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland; Software Version 2.2) mit dem ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix (Thermo Scientific Abgene, Epsom, UK). In Tabelle 2-7 ist der Standard-Reaktionsansatz aufgelistet. Allerdings musste bei weniger effektiven Primern die eingesetzte Primermenge auf 0,24 μ l (600 nM Endkonzentration) verdoppelt werden, um ein befriedigendes Amplifikationsergebnis zu erreichen.

Tabelle 2-7: Standard-Reaktionsansatz (20 µl) für die qPCR.

ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix	10,0 µl
Primer fwd (50 µM)	0,12 µl
Primer rev (50 µM)	0,12 µl
HPLC-H ₂ O	7,76 µl
Template	2,0 µl

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt. Die Primer wurden mit der LightCycler Probe Design Software, Version 1.0 (Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) und der OLIGO Primer Analysis Software Version 7 (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, USA) designt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die optimale Primerlänge von 17-18 nt und eine Produktlänge von 200-500 bp eingehalten wurden. Außerdem sollten die Annealing-Temperaturen der jeweiligen Primerpaare zwischen 55 °C und 60 °C liegen. Die optimalen Annealing-Temperaturen (siehe Anhang) wurden für jedes Primerpaar mittels eines Temperaturgradienten bestimmt.

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von TIB Molbiol (TIB Molbiol GmbH, Berlin, Deutschland) bezogen und waren GSF aufgereinigt (Sephadex® Gelfiltration).

Tabelle 2-8 zeigt das Standard-qPCR-Programm. Da es sich bei dem Polymerase-Enzym des ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix um ein sog. Hot Start-Enzym handelte, diente der erste Schritt des qPCR-Programms, eine 15minütige initiale Denaturierung bei 95 °C, der Enzymaktivierung.

Tabelle 2-8: Standard-Cycler-Programm für die qPCR.

„Hot Start“	95 °C	15 min	
Denaturierung	95 °C	15 sec	x 40-45
Primer-Annealing	Primer-spezifisch	20 sec	
Elongation	72 °C	20 sec	
Detektion	79 °C	10 sec	
Schmelzpunktanalyse	95 °C	10 sec	
	60 °C	15 sec	
	ΔT_m (60° C→95 °C)	[0,3 °C/sec]	
	95 °C	5 sec	
Ende	40 °C	2 min	

b) Standardherstellung und Berechnung der Molekülzahlen

Für die Herstellung der Standardreihen der einzelnen Transkripte wurden die gelelektrophoretisch überprüften Produkte mehrerer qPCR-Ansätze vereinigt und mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt (NanoDrop 2000c Spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). Anschließend wurde für den Standard #1 (Std1) die Konzentration auf 10 ng/µl eingestellt. Ausgehend von dieser Konzentration wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (siehe Tabelle 2-9).

Tabelle 2-9: Herstellung der Standardreihen für die qPCR.

# Std	Verdünnung	in	≈ Konzentration
1	einstellen auf 10 ng/µl	HPLC-H ₂ O	10 ng/µl
3	198 µl + 2 µl von Std1	HPLC-H ₂ O	100 pg/µl
5	198 µl + 2 µl von Std3	HPLC-H ₂ O	1 pg/µl
7	198 µl + 2 µl von Std5	tRNA-H ₂ O	10 fg/µl
8	180 µl + 20 µl von Std7	tRNA-H ₂ O	1 fg/µl
9	180 µl + 20 µl von Std8	tRNA-H ₂ O	0,1 fg/µl
10	180 µl + 20 µl von Std9	tRNA-H ₂ O	0,01 fg/µl

Diese Standardreihen wurden benutzt, um neue Primer zu testen, und um Eichgeraden zu erhalten, mit denen über die in den Proben gemessene Fluoreszenz bzw. den C_T-Wert (engl.: threshold cycle) der Proben die Ausgangsmenge des jeweiligen Transkripts ermittelt werden konnte.

Für die Messung wurden die Standards #7-#10 eingesetzt. Der C_T-Wert des Std7 sollte zwischen 18 und 20 liegen, und der Abstand der C_T-Werte der einzelnen Standards sollte mit etwa 3,5 dem Faktor 10 der Konzentrationsunterschiede entsprechen. Die Lagerung der Standards erfolgte bei 4 °C.

Für die Berechnung der Molekülzahlen wurden die gemessenen Produktmengen auf das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen Aktin normiert und so die Anzahl der Moleküle eines bestimmten qPCR-Produkts pro 10.000 Molekülen Aktin bestimmt.

Bei nicht eindeutigen Ergebnissen wurden die qPCR-Produkte zusätzlich zur Schmelzpunktanalyse mittels Elektrophorese in einem Agarose-Gel überprüft (siehe 2.4.2).

2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Alle für diese Arbeit verwendeten Agarose-Gele waren 3%ig (Universal-Agarose, Bio&SELL e. K., Feucht bei Nürnberg, Deutschland) in TBE- oder TAE-Puffer. Die DNA wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 µl/100 ml Gel) oder GelGreenTM Nucleic Acid Stain (5 µl/100 ml Gel, Biotium Inc., Hayward, USA) sichtbar gemacht. Den Proben wurde vor dem Beladen des Gels die entsprechende Menge an 5x DNA-Probenpuffer zugesetzt. Die Auftrennung der Proben im Gel erfolgte bei 70-100 V. Als Größenstandard wurde PstI-verdaute λ-Phagen-DNA (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) als Marker verwendet (siehe Anhang). Die Dokumentation der Gele erfolgte unter UV-Licht an einem Gel iX Imager (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland).

2.4.3 DNA-Elution aus einem Agarose-Gel

Einige der qPCR-Primer lieferten mehrere Fragmente als Produkt. In diesem Fall war es für die Standardherstellung notwendig, die qPCR-Produkte mehrerer Ansätze zu vereinigen und auf einem 3%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufzutrennen. Anschließend wurde die der jeweils richtigen Größe entsprechende Bande ausgeschnitten und das Fragment aus dem Gel eluiert. Die Elution erfolgte mittels des QIAquick[®] Gel Extraction Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration des aufgereinigten qPCR-Produkts wurde am NanoDrop 2000c photometrisch bestimmt und zur Herstellung einer Standardreihe (2.4.1) verwendet.

2.5 Mikroarray-Analysen

Die Expressionsprofile verschieden behandelte Pflanzen bzw. von Proben unterschiedlicher Jahreszeiten wurden über Mikroarray-Analysen ermittelt.

2.5.1 Durchführung

Die Hybridisierung der GeneChips® (Affymetrix, Santa Clara, USA) und die erste Auswertung der Fluoreszenzsignale, u. a. die Angabe der „detection calls“, erfolgte durch die Microarray Facility Tübingen. Diese „detection calls“ werden benutzt, um festzustellen, ob das Transkript eines Gens detektiert werden kann (Liu *et al.*, 2002). Für die Berechnung der „detection calls“, i. e. „absent“ (A), „present“ (P) oder „marginal“ (M), implementiert die Affymetrix „Microarray Suite Version 5“-Software (MAS5) einen nicht-parametrischen, statistischen Test („Wilcoxon signed rank test“), ob die „perfect match“-Proben der Probenpaare ein signifikant höheres Hybridisierungssignal aufweisen als die korrespondierenden „mismatch“-Proben (McClintick and Edenberg, 2006). Somit ist der „present call“ ein statistisch abgeleiteter Schwellenwert, der die relative Verlässlichkeit widerspiegelt, mit der das betrachtete Transkript mit einem entsprechenden „detection p-value“, also auf einem Level signifikant über dem Hintergrundsignal, tatsächlich in der getesteten RNA-Probe vorhanden ist (Seo and Hoffman, 2006).

Für die Hybridisierung der Mikroarrays werden normalerweise Gesamt-RNA-Proben zwischen 1 und 5 µg („One-Cycle Protocol“) oder 50 ng bis 1 µg („Two-Cycle Protocol“) benötigt. Über das „Two-Cycle-Protocol“ war es aber trotzdem möglich, auch die niedriger konzentrierten, LMPC-generierten Proben zu markieren und diese anschließend mit „Arabidopsis ATH1 Genome Array“- oder „Poplar Genome Array“-GeneChips® zu hybridisieren.

2.5.2 Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten inklusive des Pappel-Mappings und der Erstellung von Listen differenziell exprimierter Gene sowie die Durchführung der „Gene Set Enrichment“-Analysen (GSEA) erfolgten am Lehrstuhl für Bioinformatik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg durch Dr. Tobias Müller und Dr. Dr. Marcus Dittrich.

Für die Listung differenzieller Gene muss sowohl der adjusted p-value als auch der logFC betrachtet werden. Der adjusted p-value gibt die Wahrscheinlichkeit für ein Gen an, falsch positiv zu sein, also nur durch Zufall differenziell exprimiert zu erscheinen. Nur Gene, deren adjusted p-value unterhalb der gewählten Grenze von 5 % lag, d. h. kleiner als 0,05 war, wurden als signifikant betrachtet. Der logFC ist der Logarithmus zur Basis 2 des „Fold Change“ (FC), also des Induktionsfaktors. Im Allgemeinen gelten nur Gene als differenziell exprimiert, die mindestens zweifach induziert ($FC \geq 2$) bzw. reprimiert ($FC \leq 0,5$) sind.

Die erste grafische Darstellung der Auswertung ist meist ein sog. Ordinationsplot. In einem solchen Koordinatensystem repräsentiert der Abstand der einzelnen Proben auf den beiden Achsen die Übereinstimmung der Expressionsmuster, wobei die Prozentangaben an den Achsen den Grad der Abweichung quantifizieren. Das bedeutet, dass die Proben in ihrem Expressionsmuster umso ähnlicher sind, je deutlicher sie in der Grafik zusammen gruppieren.

2.6 Lösungen und Medien

Agarose-Gel (3 %):	Agarose	12 g
	1x TBE/TAE	400 ml
	aufkochen und abkühlen lassen, dann	
	Ethidiumbromid	4 µl oder
	GelGreen	20 µl
dazugeben; bei 60 °C lagern		
DEPC-H₂O:	H ₂ O	
	DEPC	0,1 % (v/v)
	ÜN rühren, dann autoklavieren	
5x DNA-Probenpuffer:	Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
	Xylencyanol	0,25 % (w/v)
	EDTA	100 mM
	Glycerin	50 %
	für GelGreen-Gele diesen Probenpuffer 1:4 verdünnen	
Fixierlösung:	Ethanol	80 % (v/v)
	Eisessig	20 % (v/v)
KB-Medium: (<u>K</u>ing's <u>B</u>roth <u>M</u>edium)	Proteose Peptone No.3	10 g
	Glycerol	1 % (v/v)
	K ₂ HPO ₄	8 mM
	pH auf 7,2 einstellen	
	(+ 7,5 g Agar-Agar, Kobe I, für KB-Platten)	
	H ₂ O	add. 497 ml
	autoklavieren	
	+ 6 mM MgSO ₄ (3 ml einer sterilfiltrierten 1 M Stocklösung)	
10 mM MgCl₂:	verdünnt aus MgCl ₂ -Lösung (1 M)	
25x TAE:	Tris	484 g
	Essigsäure	114,2 ml
	Titriplex II	74,4 g
	pH > 8,0; anschließend filtrieren (Nutsche)	
10x TBE: (<u>T</u>ris-<u>B</u>orat-<u>E</u>DTA-Puffer)	Tris	900 mM
	Borsäure	900 mM
	EDTA, pH 8,0	20 mM
	pH ≈ 8,3; anschließend filtrieren (Nutsche)	

3. Ergebnisse

3.1 Überprüfung der RNA-Qualität während der einzelnen Schritte des LMPC-Prozesses

Der Weg vom frischen Pflanzenmaterial über die Einbettung und LMPC bis hin zur isolierten RNA umfasst viele Schritte, die über einen langen Zeitraum ablaufen. Um die Qualität der RNA während der einzelnen Prozesse überprüfen zu können, wurden nach den einzelnen Schritten Proben entnommen, die Gesamt-RNA isoliert, und diese mittels Experion™ qualitativ analysiert.

3.1.1 Ethanol-Essigsäure-Fixierung

Der erste Schritt des LMPC-Prozesses ist die Fixierung der RNA. Hierbei ist es wichtig, dass die RNA gut fixiert wird, während gleichzeitig die Morphologie des Gewebes bestehen bleibt. Cox und Mitarbeiter erklärten z. B. modifiziertes Methacarn (acht Teile Methanol plus ein Teil Eisessig) zum Fixierungsmittel der Wahl, wenn das Transkriptom analysiert werden soll, da es die Morphologie und RNA-Qualität in Kombination am besten konservierte (Cox *et al.*, 2006). In vorangegangenen Instituts-internen Experimenten lieferte allerdings eine Fixierlösung mit einem Ethanol zu Essigsäure-Verhältnis von 5:1 optimale Ergebnisse.

In Abbildung 3-1 sind Elektropherogramme von Gesamt-RNAs zu sehen, die aus *Arabidopsis*-Blütenstielen vor und nach der Fixierung isoliert wurden.

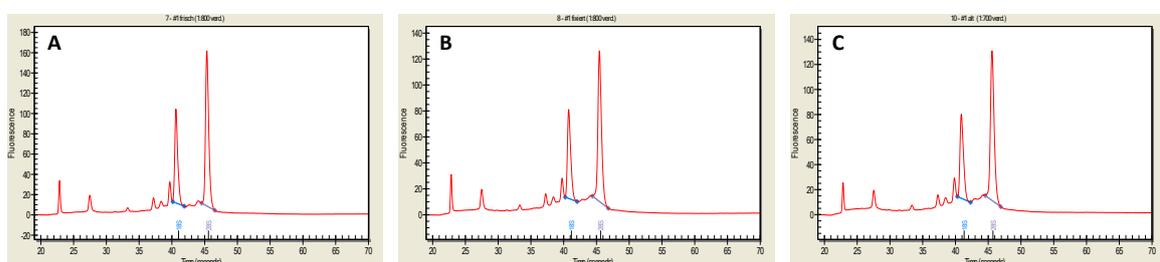


Abbildung 3-1: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus *A.th* Col-0-Blütenstielen. (A) Aus frischem Pflanzenmaterial, $c = 0,86 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,62, RQI = 9,2; (B) nach Fixierung bei 4 °C (ÜN), $c = 0,81 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,65, RQI = 9,0; (C) nach 60-tägiger Lagerung in 96 % Ethanol bei 4 °C, $c = 0,70 \mu\text{g}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,72, RQI = 9,1.

Im Vergleich der Elektropherogramme A und B ist deutlich zu erkennen, dass keine signifikanten Unterschiede auftraten, die Ethanol-Essigsäure-Fixierung also die RNA-Qualität nicht beeinträchtigte. Auch eine lange Lagerung des Pflanzenmaterials in Ethanol bei 4 °C hatte keinen schädigenden Einfluss auf die RNA (Abbildung 3-1 C).

3.1.2 Paraffineinbettung und Färbung

Das Pflanzenmaterial wurde nach der Fixierung in flüssiges Paraffin eingebettet, jeweils bei der für die Art des Paraplasts spezifischen Temperatur. Wie in Abbildung 3-2 A an einer entparaffinierten *A.th*-Blütenstielquerschnittprobe (1x 20 µm) zu sehen ist, blieb die RNA-Qualität auch während der Paraffineinbettung konstant.

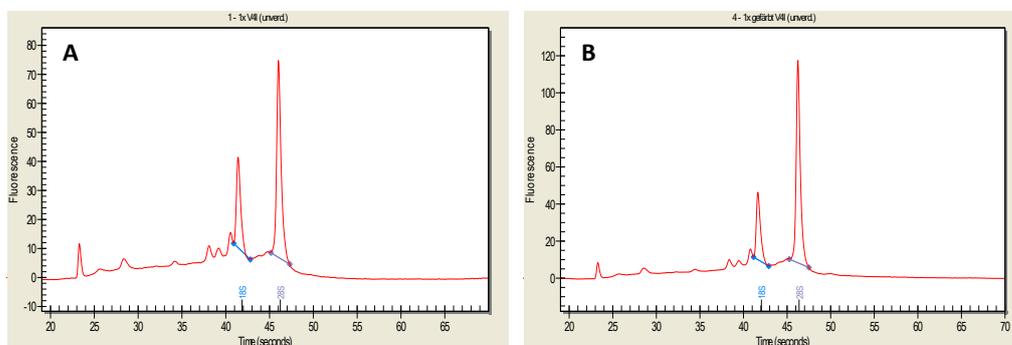


Abbildung 3-2: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus je einem entparaffinierten *A.th*-Blütenstielquerschnitt (1x 20 µm). (A) Nicht gefärbt, $c = 1,04 \text{ ng}/\mu\text{l}$; Ratio [28S/18S] = 2,10, RQI = 8,4; (B) mit Toluidinblau angefärbt, $c = 1,12 \text{ ng}/\mu\text{l}$ Ratio [28S/18S] = 2,72, RQI = 8,7.

Die Gewebeschnitte wurden vor der eigentlichen LMPC gefärbt, um das Schneiden des Gewebes mit dem Laser zu erleichtern. Abbildung 3-2 B zeigt, dass die Toluidinblau-Färbung ebenfalls zu keiner Beeinträchtigung der RNA-Qualität führte. Auch die RNA-Ausbeute blieb annähernd gleich.

3.1.3 LMPC-Dauer

Für das Sammeln von Probenmaterial mittels LMPC wurde pro Tag meist nur ein Membranobjektträger mit Gewebequerschnitten benutzt. Ob ein ganzer Tag bei Raumtemperatur und ständiger Erwärmung durch die Mikroskoplampe einen Einfluss auf die RNA-Qualität hatte, wurde geprüft, indem abends Schnitte abgenommen wurden und die Gesamt-RNA isoliert wurde. Abbildung 3-3 zeigt das Elektropherogramm dieser RNA. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass es zu keiner Qualitätseinbuße kam.

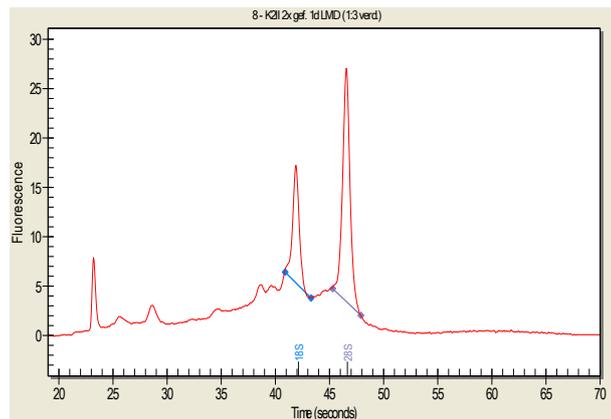


Abbildung 3-3: Elektropherogramm einer Gesamt-RNA aus entparaffinierten und gefärbten *A.th*-Blütenstielquerschnitten (2x 20 µm) nach einem Tag Laser Mikrodissektion. $c = 0,99 \text{ ng}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 2,09, RQI = 8,4.

3.1.4 Liquid CoverGlass

Bei den Holzquerschnitten von Pappel war es ohne eine weitere Behandlung nicht möglich, mittels LMPC Material zu sammeln, da die Schnitte entweder wellig auflagen oder gar nicht auf den Membranobjektträgern haften blieben. Deswegen wurden die Holzproben zusätzlich mit Liquid CoverGlass überschichtet, das vom Hersteller eigentlich dafür vorgesehen war, Kontraste zu verbessern. Darüber hinaus verblieben durch dessen harzige Struktur die Querschnitte plan auf dem Objektträger. Für Liquid CoverGlass wurde beschrieben, dass es keinen Einfluss auf die RNA-Qualität oder -Konzentration hat (Micke *et al.*, 2004). Wie in Abbildung 3-4 allerdings deutlich zu erkennen ist, konnte dies in diesem Fall nicht bestätigt werden. Die Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch eine entsprechende Behandlung um 35-50 % vermindert (Vergleich Kontrollen A und C gegen B und D). Meist wurde die Qualität ebenfalls schlechter, was in Abbildung 3-4 D am deutlich niedrigeren RQI-Wert (engl.: RNA Quality Indicator,

siehe 2.3.3) zu sehen ist. Eine zusätzliche Homogenisierung der Gewebeschnitte mittels Schwingmühle trug nicht zu einer Verbesserung bei (nicht gezeigt).

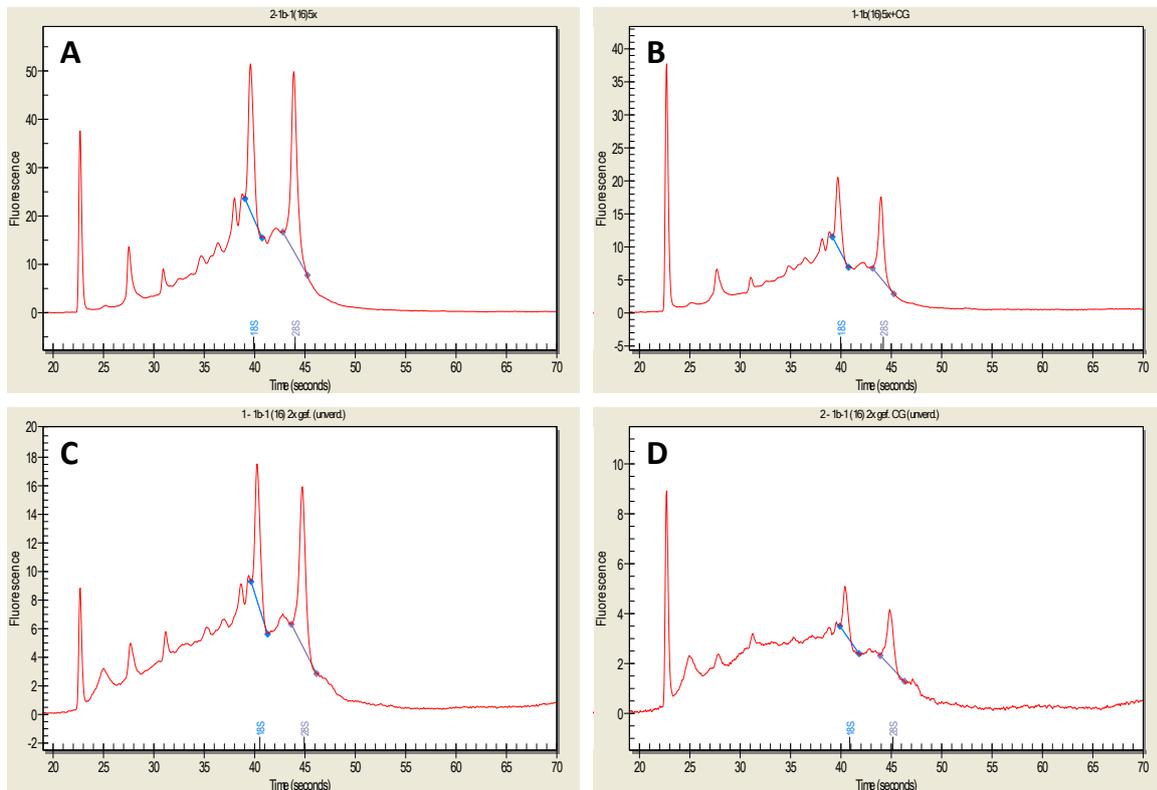


Abbildung 3-4: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus entparaffinierten, gefärbten *P. can*-Holzquerschnitten mit und ohne Behandlung mit PALM® Liquid CoverGlass N (CG). (A) 5x 10 µm, ohne CG, $c = 1,58 \text{ ng}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,29, RQI = 8,1; (B) 5x 10 µm, mit CG, $c = 0,78 \text{ ng}/\mu\text{l}$; Ratio [28S/18S] = 1,19, RQI = 8,1; (C) 2x 10 µm, ohne CG, $c = 0,71 \text{ ng}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,33, RQI = 7,7; (D) 2x 10 µm, mit CG, $c = 0,34 \text{ ng}/\mu\text{l}$, Ratio [28S/18S] = 1,49, RQI = 3,7.

Eine Bearbeitung der Pappelholzproben ohne eine Behandlung der Querschnitte mit Liquid CoverGlass war allerdings unmöglich, weswegen es trotzdem weiter verwendet werden musste. Alternative Ansätze, wie z. B. die Behandlung der Membranobjektträger mit poly-L-Lysin oder deren Bestrahlung mit UV-Licht, führten zu keiner besseren Haftung der Holzquerschnitte auf der Membranoberfläche.

3.2 Differentielle Genexpression im Phloem von *Arabidopsis* während der Immunantwort auf eine Pathogeninfektion

3.2.1 Änderungen im Transkriptom des Phloems 24 Stunden nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*P.st*)

Die Immunantwort der Pflanzen ist systemisch, d. h. ausgehend vom Infektionsort wird ein bislang noch nicht vollständig beschriebenes Signal zur Auslösung einer Immunisierung an die restlichen Teile der Pflanze gesendet. Findet eine Langstreckensignalweiterleitung statt, ergibt sich die Hypothese, dass diese im Phloem der Pflanze erfolgt, wobei auch flüchtige organische Verbindungen eine Rolle spielen können (Heil and Ton, 2008). Deshalb wurde auf transkriptioneller Ebene untersucht, welche Änderungen im Phloem einer *A.th*-Pflanze als Reaktion auf eine Infektion mit *Pseudomonas* auftreten. Hierfür wurde zuerst das Phloem-Transkriptom 24 Stunden nach Infektion (hpi, engl.: hours post inoculation) über Mikroarrays analysiert.

Jeweils vier 11-14 Wochen alte *A.th* Col-0-Pflanzen wurden mit virulenten *P.st* DC3000 ($OD_{600} \approx 0,2$), avirulenten *P.st* DC3000 *avrB* ($OD_{600} \approx 0,2$) bzw. 10 mM $MgCl_2$ (Kontrolle) infiltriert. 24 hpi wurden von allen Pflanzen Blütenstielproben zum Einbetten genommen, mittels LMPC von jeder Probe ca. $1-2 \times 10^6 \mu m^2$ Phloemareale gesammelt, und die Gesamt-RNA wurde isoliert. Die Amplifikation und das Markieren der RNA-Proben erfolgte durch die Microarray Facility Tübingen. Von jeder Behandlung wurden die drei besten Proben mit Affymetrix ATH1-GeneChips® hybridisiert.

Die Auswertung der Mikroarray-Daten wurde am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg durchgeführt. Abbildung 3-5 zeigt den Ordinationsplot (siehe 2.5.2) dieser Mikroarrays. Die mit avirulenten *P.st* behandelten Proben gruppieren mit den Kontrollproben, was darauf hindeutet, dass eine SAR-Antwort entweder nicht induziert wurde oder zu diesem Zeitpunkt (24 hpi) nicht sichtbar war. Bei den mit virulenten *P.st* behandelten Proben wies Probe b02 starke Ähnlichkeit zu den avirulenten Proben und Kontrollen auf. Deshalb wurden für die weitere Analyse nur die Proben b03 und b04 verwendet (im Vergleich mit *P.st* avirulent/Kontrolle).

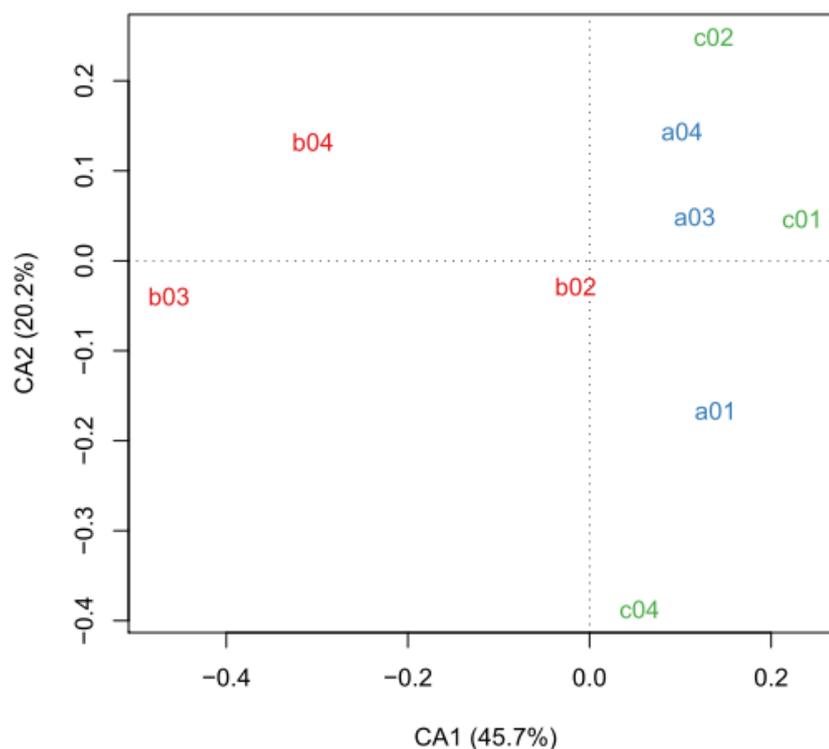


Abbildung 3-5: Ordinationsplot der *Arabidopsis*-Mikroarrays (24 hpi). Blau (a): avirulent (*P.st* DC3000 *avrB*), rot (b): virulent (*P.st* DC3000), grün (c): Kontrolle (10 mM MgCl₂). (Abbildung © Bioinformatik Würzburg)

Die Mikroarray-Analyse identifizierte 9.714 Gene, die im Phloem exprimiert wurden, unter der Bedingung eines „present calls“ (siehe 2.5.1) in allen drei Kontrollen.

Der Vergleich zwischen den mit virulenten *P.st* behandelten Proben und den Kontrollen ergab 255 Gene mit einem adjusted p-value $\leq 0,05$. Von diesen 255 Genen hatten 219 einen positiven logFC und 36 einen negativen. Unter der Bedingung, dass nur die Gene als reguliert galten, die mindestens zweifach induziert bzw. reprimiert waren, fanden sich 183 Gene differentiell exprimiert. 168 davon waren induziert ($FC \geq 2$) und nur 15 reprimiert ($FC \leq 0,5$).

Diese 183 differentiell exprimierten Gene wurden mittels MapMan (Thimm *et al.*, 2004) verschiedenen physiologischen Gruppen zugeordnet (Abbildung 3-6). Da durch diese Software Gene teilweise mehreren oder nicht den exakt passenden Gruppen zugeteilt werden, wurde die Einteilung im Anschluss noch einmal überprüft, und Gene wurden ggf. manuell in andere Gruppen verschoben.

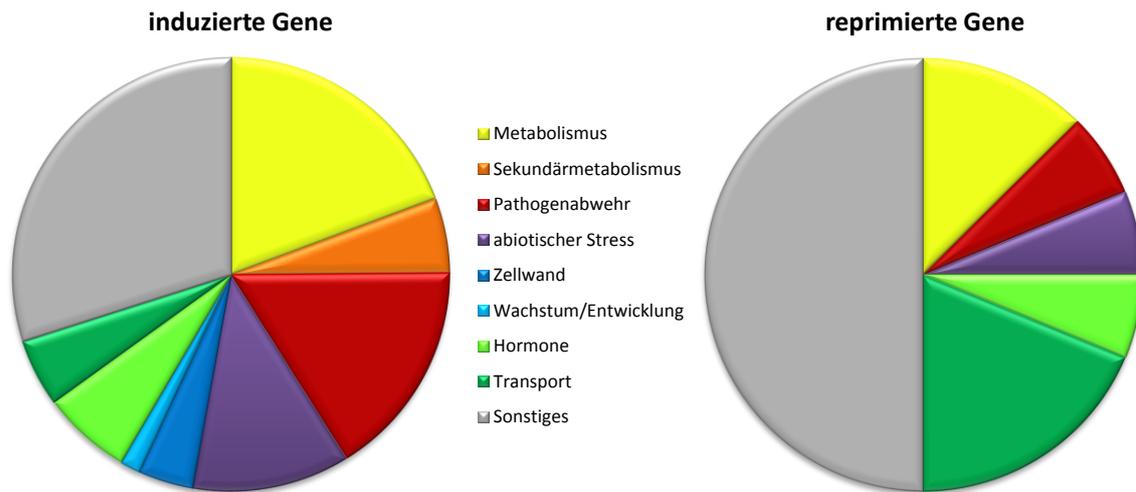


Abbildung 3-6: MapMan-Gruppierung der 183 differenziell exprimierten Gene. 168 Gene waren induziert ($FC \geq 2$) und nur 15 reprimiert ($FC \leq 0,5$). Einige Gene wurden mehreren physiologischen Gruppen zugeordnet.

Eine der größten induzierten Gruppen stand wie erwartet in direktem Zusammenhang mit Abwehr- und Stress-Reaktionen. Die meisten reprimierten Gene repräsentierten Transporter und Metabolismus-bezogene Proteine. Dies legt die Hypothese nahe, dass nach einer Infektion Transport und Metabolismus zur Beeinträchtigung des Wachstums und der Verbreitung des Pathogens herabgesetzt werden.

Die Isolierung der Phloemzellen über LMPC war kontaminationsfrei, da über die Mikroarray-Analysen keine mesophyllspezifischen Transkripte wie z. B. *CA1* (*carbonic anhydrase 1*, At3g01500, 259161_at) (Kerk *et al.*, 2003) detektiert werden konnten. Phloemspezifische Gene dagegen wurden exprimiert, so z. B. das für den Saccharose-Proton-Symporter AtSUC2 (At1g22710, 264204_at) (Truernit and Sauer, 1995) oder den Prolintransporter AtProT1 (At2g39890, 267358_at) (Rentsch *et al.*, 1996; Grallath *et al.*, 2005).

Die Reproduzierbarkeit der LMPC-Technik wurde durch einen Vergleich der Mikroarray-Daten mit früheren Arbeiten (Deeken *et al.*, 2008) geprüft. In diesen wurde bereits mittels LMPC aus *Arabidopsis* Phloemzellen RNA isoliert und für Mikroarray-Analysen verwendet. Des Weiteren wurde auch RNA aus dem Phloensaft mittels Mikroarrays analysiert. Abbildung 3-7 zeigt diesen Vergleich.

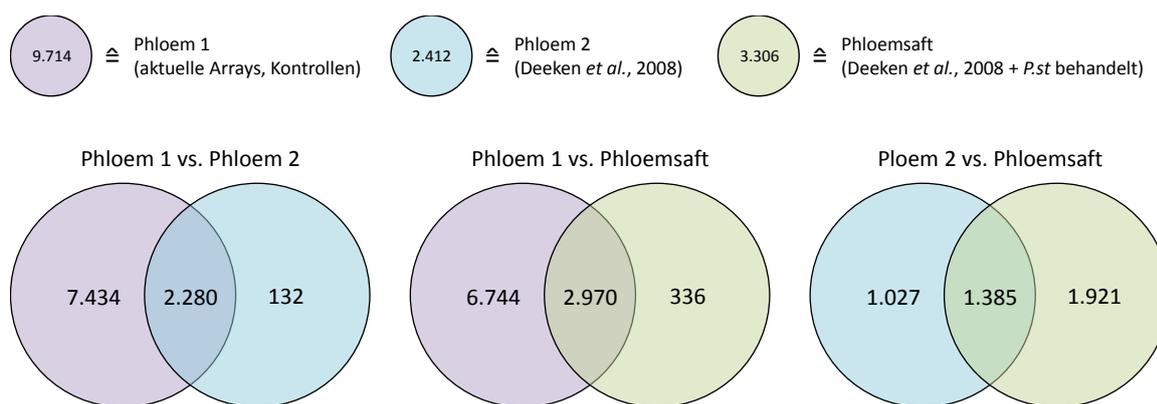


Abbildung 3-7: Vergleich der verschiedenen Mikroarray-Daten. Phloem 1: Gene, die auf den Mikroarrays der vorliegenden Arbeit in allen drei Kontrollen einen „present call“ aufwiesen. Phloem 2 und Phloemsaft: Mikroarray-Daten aus Deeken *et al.* (2008); die Abweichungen zu den publizierten Zahlen ergeben sich aufgrund des unterschiedlich gesetzten p-values ($p \leq 0,01$ bei Deeken *et al.* und $p \leq 0,05$ in vorliegender Arbeit).

Die Reproduzierbarkeit der LMPC-Technik zeigte sich in einer sehr guten Übereinstimmung der beiden LMPC-Phloem-Proben (Phloem 1 und Phloem 2), da sich 95 % von Phloem 2 in Phloem 1 wiederfanden. Unter den restlichen 5 % waren außerdem viele Gene, die in den neuen Array-Daten nur zwei statt drei „present calls“ in den Kontrollen hatten. Änderte man das bisherige Ausschlusskriterium (3x „present“), dann weitete sich die Überlappung noch aus. In Phloem 1 waren mit fast 10.000 Genen viermal so viele Gene wie in Phloem 2 repräsentiert. Demnach wiesen die generierten Proben eine sehr hohe Qualität auf, und die Optimierung der LMPC-Technik hatte zu einer deutlichen Verbesserung der RNA-Ausbeute geführt. Darüber hinaus war nun auch die Anzahl der Gene, die nur im Phloemsaft und nicht im Phloem exprimiert werden, mit 336 wesentlich kleiner und damit realistischer als die 1.921 bei Deeken *et al.* beschriebenen.

3.2.2 Quantifizierung des bakteriellen Wachstums

Die mit *Pseudomonas* behandelten Pflanzen aus 3.2.1, insbesondere die mit avirulenten *P.st* infiltrierten, zeigten auf transkriptioneller Ebene keine Anzeichen dafür, dass zu diesem Zeitpunkt eine SAR ausgelöst worden bzw. sichtbar war.

In den meisten Arbeiten, in denen die Infiltration von *Arabidopsis*-Pflanzen mit *Pseudomonas* zur Analyse systemischer Resistenzantworten erfolgte, wurden die lokalen

und systemischen Blätter von nicht blühenden und deutlich jüngeren Pflanzen betrachtet. In dieser Arbeit hingegen wurden die Blütenstiele untersucht. Deshalb wurde über verschiedene Infiltrationsexperimente getestet, ob in blühenden Pflanzen und in Blütenstielen überhaupt eine systemische Resistenz ausgelöst wird. Dies erfolgte über die Bestimmung der cfu (engl.: colony forming units).

Für diese und alle nachfolgenden Experimente wurde der avirulente Bakterienstamm gewechselt. Statt wie bisher *P.st* DC3000 *avrB* wurden nun *P.st* DC3000 *avrRpm1* verwendet. Dies dürfte allerdings auf die Ausbildung der SAR keinen Einfluss haben. Sowohl die Freisetzung von AvrB als auch von AvrRpm1 durch *P.st* resultiert in der Phosphorylierung von RIN4, das dadurch vom RIN4-gebundenen RPM1-Resistenzprotein erkannt wird, was zur Aktivierung einer RPM1-abhängigen Resistenzantwort führt (Axtell and Staskawicz, 2003). Somit verwenden beide Effektorproteine denselben Signalweg.

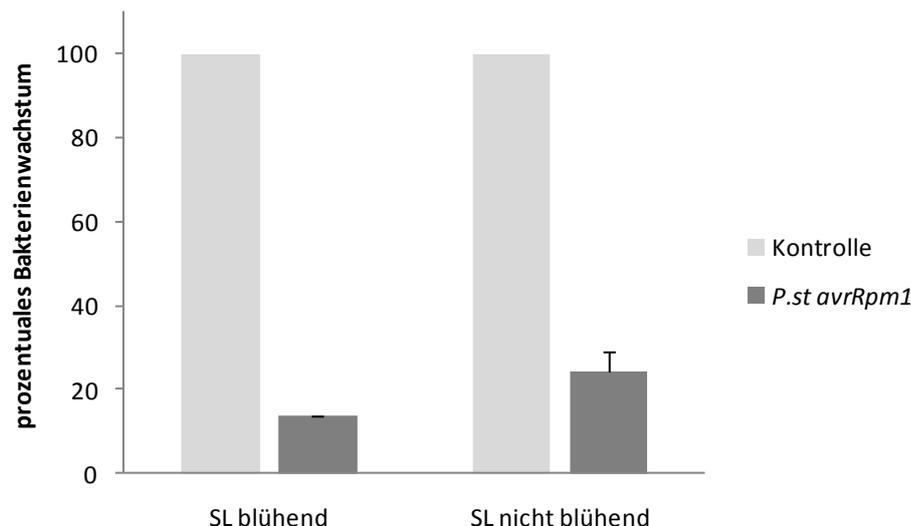


Abbildung 3-8: Effizienz der SAR-Antwort in (nicht) blühenden *Arabidopsis* Col-0. Pro Pflanze wurden vier Blätter mit 10 mM $MgCl_2$ (Kontrolle) bzw. 2×10^6 cfu/ml *P.st avrRpm1* infiltriert. 2 dpi erfolgte eine zweite Infiltration mit 2×10^6 cfu/ml *P.st* in vier weiter Blätter. In diesen systemischen Blättern (SL) wurde 3 dpi das bakterielle Wachstum in cfu/mg FG quantifiziert. $n = 3$, \pm SD.

Wie in Abbildung 3-8 zu sehen ist, waren auch blühende Pflanzen noch in der Lage, eine SAR-Antwort auszubilden. Diese Antwort fiel sowohl in blühenden als auch nicht blühenden Pflanzen mit einem Faktor von ungefähr fünf deutlich geringer aus als üblich (10-100fach). Die Ursache dafür war das Alter der in diesem Experiment verwendeten Pflanzen von 13-18 Wochen. Mit zunehmendem Alter der Pflanze sinkt die Stärke der SAR-Antwort, da die Pflanzen im Lauf der Zeit eine sog. ARR (altersbedingte Resistenz,

engl.: *age-related resistance*) ausbilden, wodurch sie bereits eine erhöhte Resistenz gegenüber Pathogenen zeigen (Kus *et al.*, 2002).

Da der Blütenstiel nicht direkt mit *Pseudomonas* infiltriert werden konnte, wurde stattdessen das bakterielle Wachstum in Blütenstielblättern untersucht. Zeigte sich in diesen eine systemische Resistenz, so musste auch im Blütenstiel eine SAR ausgelöst worden sein. Über die benötigte optische Dichte (OD_{600}) des für Infiltrationsexperimente verwendeten Inokulums herrscht keine einheitliche Meinung. In verschiedenen Arbeiten wurden unterschiedliche Bakteriendichten eingesetzt (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Übersicht über in anderen Arbeiten verwendete Inokula und deren OD_{600} . Die Angabe cfu pro ml definiert die der OD_{600} entsprechenden Bakterienkonzentration. In der letzten Spalte ist aufgeführt, für welches Experiment das verdünnte Inokulum jeweils eingesetzt wurde.

Publikation	OD_{600}	cfu/ml	Experiment
Truman <i>et al.</i> , 2007	0,0001	10^5	cfu-Bestimmung
Truman <i>et al.</i> , 2007	0,2	2×10^8	RNA, Metabolite, Reporter
Attaran <i>et al.</i> , 2009	0,01	10^7	cfu-Bestimmung
Kiefer and Slusarenko, 2003	0,05	5×10^7	cfu-Bestimmung
Laird <i>et al.</i> , 2004	0,0006	6×10^5	cfu-Bestimmung

Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Maß der Resistenzantwort in systemischen Blättern umgekehrt proportional zur OD_{600} des verwendeten Inokulums verhält (Mishina and Zeier, 2007b). Deshalb wurden im folgenden Experiment nicht nur die Blütenstielblätter untersucht, sondern auch zwei verschiedene OD_{600} (0,2 und 0,002) für die primäre Infiltration getestet. Abbildung 3-9 veranschaulicht das Ergebnis der zugehörigen cfu-Bestimmung.

Es ist deutlich zu erkennen, dass in den Blütenstielblättern, und daher wohl auch im Blütenstiel selbst, eine SAR ausgebildet worden war. Das Experiment zeigte darüber hinaus, dass auch für dieses Gewebe die bereits bekannte Beobachtung galt, dass das Maß der Resistenzantwort mit niedrigerer OD_{600} zunimmt.

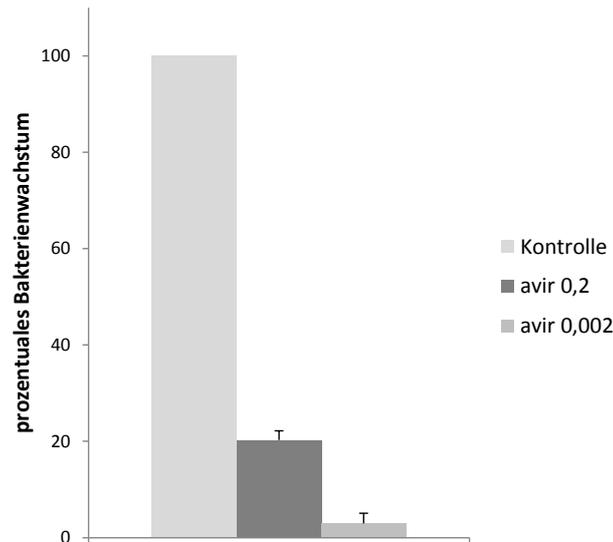


Abbildung 3-9: Effizienz der SAR-Antwort in *Arabidopsis Col-0*-Blütenstielblättern. Pro Pflanze wurden vier Blätter mit 10 mM $MgCl_2$ (Kontrolle), 2×10^8 cfu/ml *P.st avrRpm1* (avir 0,2) bzw. 2×10^6 cfu/ml *P.st avrRpm1* (avir 0,002) infiltriert. 2 dpi erfolgte eine zweite Infiltration mit 10^6 cfu/ml *P.st* in sechs Blütenstielblätter. In diesen wurde 3 dpi das bakterielle Wachstum in cfu/mg FG quantifiziert. $n = 3 \pm SD$.

Um die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit mit vorherigen via LMPC generierten Daten vergleichen zu können, wurde die Inokulation in allen bisherigen Experimenten mit einer Bakteriendichte von 0,2 durchgeführt. Durch die ARR bedingt befindet sich die Stärke der SAR-Antwort in den blühenden Pflanzen aber per se auf einem niedrigen Level. Deshalb wurden die weiteren Experimente mit einer geringeren OD_{600} von 0,002 durchgeführt, um eine deutlichere Antwort zu erhalten.

3.2.3 Zeitreihen-Experimente

Bei den Arrays aus 3.2.1 zeigte sich in den mit avirulenten Bakterien behandelten Proben auf transkriptioneller Ebene kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen. Um zu untersuchen, ob dies am ungünstig gewählten Zeitpunkt lag, wurde das Experiment als Zeitreihe wiederholt, diesmal jedoch mit kompletten Blütenstielsegmenten. Dabei durfte allerdings nicht vernachlässigt werden, dass die Querschnittfläche eines *Arabidopsis*-Blütenstiels nur zu etwa 3 % aus Phloemarealen besteht. Aus diesem Grund war ein direkter Vergleich der LMPC-Mikroarray-Daten mit den qPCR-Daten aus den Zeitreihen nur bedingt möglich, da ein im Phloem deutlich ausgeprägtes Signal im kompletten Querschnitt leicht überdeckt werden konnte.

Für die Zeitreihen-Experimente wurden verschiedenen *A.th* Col-0-Pflanzen mit virulenten *P.st* DC3000 und avirulenten *P.st* DC3000 *avrRpm1* sowie 10 mM MgCl₂ als Kontrolle infiltriert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach der Infiltration wurden Proben für die RNA-Isolation genommen. Im Anschluss erfolgte die Analyse des Expressionsverlaufs bestimmter Markergene mittels qPCR. Parallel dazu erfolgten auch qPCR-Messungen dieser Markergene in den systemischen Blättern dieser infiltrierten Pflanzen.

Die Ergebnisse von vier Wiederholungen aus den Zeitreihe IV und V (siehe 2.2.4) sind im Anhang aufgeführt (siehe 8.2). Bei diesen zeigte sich starke Varianz in Antwort und Expressionsverlauf. Wenn überhaupt, wiesen die meisten der in den Blütenstielen gemessenen Markergene einen für jede Pflanze individuellen Expressionsanstieg in einem Zeitfenster von 30-42 hpi auf. Abbildung 3-10 veranschaulicht dies exemplarisch.

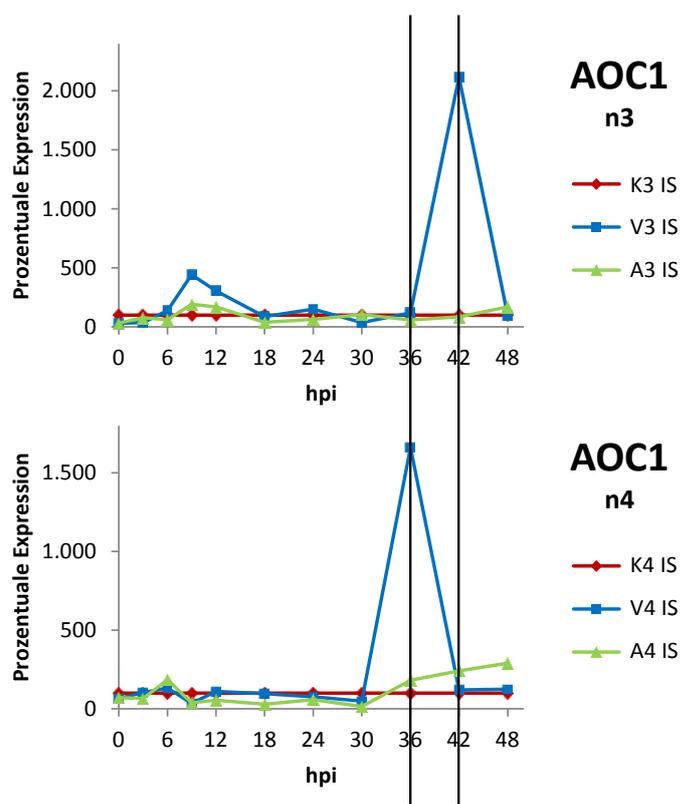


Abbildung 3-10: qPCR-Messungen in Blütenstielen (IS) von Zeitreihen infiltrierter *A.th*-Pflanzen. Die AOC1-Expression in den mit virulenten (V, blau) und avirulenten (A, grün) *P.st* behandelten Proben ist prozentual auf die Kontrollen (K, rot) berechnet. Schwarze Linien markieren die Verschiebung des Expressionsmaximums um sechs Stunden zwischen den virulenten Proben der Wiederholungen n3 und n4.

3.2.4 Wiederholung der LMPC-Arrays

Wie sich in den Zeitreihen-Experimenten (vgl. 3.2.3) herausstellte, konnte für eine Immunantwort im Blütenstiel-Phloem kein einheitlicher Zeitpunkt definiert werden. Deshalb wurde für die Wiederholung der LMPC-Mikroarrays aus 3.2.1 der Zeitpunkt nicht einheitlich festgelegt, sondern anhand der Markergene (siehe 8.2.1) für jede Wiederholung einzeln bestimmt. Dabei ergab sich anhand des Expressionsverlaufs für die Wiederholungen n1 und n3 der Zeitpunkt 42 hpi sowie für n2 und n4 30 hpi. Mit Proben dieser Zeitpunkte wurden erneut mittels LMPC Phloemareale gesammelt, und mit der daraus isolierten RNA Mikroarrays hybridisiert.

Eine erste Auswertung der Mikroarray-Daten, die erneut am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg durchgeführt wurde, lieferte den in folgender Abbildung dargestellten Ordinationsplot (siehe 2.5.2).

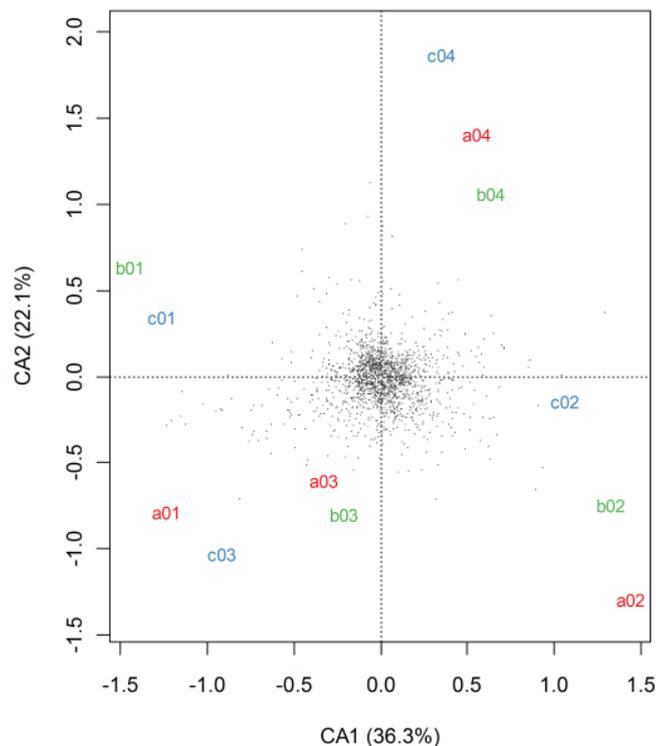


Abbildung 3-11: Ordinationsplot der *Arabidopsis*-Mikroarrays. Rot (a): Kontrolle (10 mM MgCl₂), grün (b): virulent (*P.st* DC3000), blau (c): avirulent (*P.st* DC3000 avrRptm1). Erntezeitpunkte: 42 hpi (01, 03), 30 hpi (02, 04). (Abbildung © Bioinformatik Würzburg)

In diesem ist deutlich zu erkennen, dass nicht die jeweiligen Behandlungen, sondern die Proben der einzelnen Wiederholungen gruppierten. Zudem ist auffällig, dass die 30 hpi- und 42 hpi-Proben gruppierten. Diese beiden Probensets wurden zu unterschiedlichen Tageszeiten geerntet (30 hpi: 18 Uhr, 42 hpi: 6 Uhr), d. h. dass viele Gene in ihrer Expression einen Tagesgangverlauf zeigten. Erweiterte man die Auswertung unter Einbeziehung dieses Aspektes um zwei Dimensionen, so erhielt man ein anderes Bild, das dem der ersten Mikroarrays in Abbildung 3-5 sehr ähnlich ist (Abbildung 3-12).

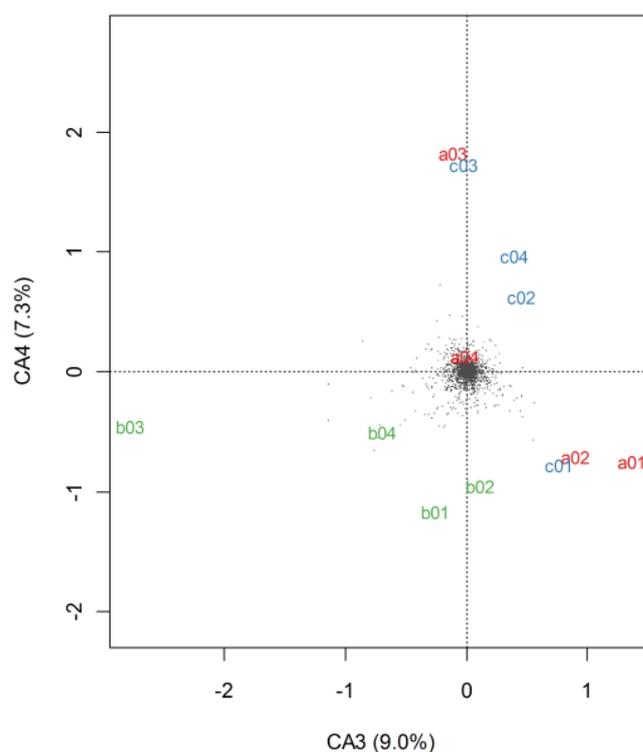


Abbildung 3-12: Ordinationsplot der *Arabidopsis*-Mikroarrays. Rot (a): Kontrolle (10 mM MgCl₂), grün (b): virulent (*P.st* DC3000), blau (c): avirulent (*P.st* DC3000 avrRptm1). Erntezeitpunkte: 42 hpi (01, 03), 30 hpi (02, 04). (Abbildung © Bioinformatik Würzburg)

Hier ist wieder die Trennung der virulenten Proben (b, grün) von den Kontrollen (c, blau) abzulesen, während das Expressionsmuster der mit avirulenten *Pseudomonas* behandelten Proben (a, rot) erneut nicht von dem der Kontrollen differierte.

Die finale Analyse der Daten inklusive der Erstellung einer Liste differenziell regulierter Gene sowie die Validierung der Mikroarrays über qPCR stehen noch aus.

3.3 Saisonale Änderungen im Expressionsprofil von Pappel-Holzstrahlen

Ziel der Arbeiten an Pappel war es, saisonale Unterschiede im Expressionsprofil der Holzstrahlencellen von *Populus x canescens* zu untersuchen. So sollten die verschiedenen Funktionen der Holzstrahlen im Jahresverlauf analysiert werden. Besonders die Prozesse, die während der Umsteuerung von Dormanz über die Reaktivierung zur Wiederaufnahme des aktiven Wachstums im Sommer ablaufen, sollten dabei detaillierter betrachtet werden.

Bei einem ersten Ansatz, in dem mittels Laser Mikrodisektion die Strahlencellen isoliert wurden, war die Qualität der hybridisierten Mikroarrays nicht ausreichend für eine statistisch verlässliche Auswertung der Daten. Das Signal der Proben war nicht signifikant vom Hintergrund unterscheidbar. Dies lag darin begründet, dass es selbst mit der optimierten Methode, die bei *Arabidopsis* erfolgreich angewendet werden konnte, nicht möglich war, aus Strahlencellen genug RNA entsprechender Qualität zu isolieren.

Aus diesem Grund wurde ein alternativer Ansatz gewählt. Der lebende Teil des Pappelholzes besteht fast ausschließlich aus Strahlencellen. Diese stellen 11-14 % des Holzes dar, während das axiale Parenchym mit unter einem Prozent nur einen sehr geringen Teil einnimmt (Panshin and de Zeeuw, 1980). Daher war es naheliegend, mithilfe der Laser Mikrodisektion von entrindeten Querschnitten alle noch lebenden Bereiche, i. e. Kambium, Differenzierungszone und Mark, vollständig abzutrennen und nur den dazwischenliegenden Teil für die RNA-Isolation zu verwenden. Das Resultat war eine angereicherte Strahlen-RNA in ausreichender Qualität und Quantität für die Hybridisierung von Mikroarrays.

3.3.1 Mikroarray-Analysen – Qualität und Mapping

Von *Populus x canescens*-Bäumen (Standort: Göttingen, Deutschland, 51°33' N, 9°57' O) wurden in der späten Ruhephase, i. e. 12. Februar 2007, und in der aktiven Wachstumsphase im Sommer, i. e. 29. Juli 2008, Proben für die Einbettung genommen. Im oben beschriebenen inversen Ansatz wurden von Proben beider Zeitpunkte via LMPC angereicherte Strahlen isoliert. Die daraus generierte RNA wurde mit Pappel-Mikroarray-Chips hybridisiert.

Die Auswertung der Mikroarray-Daten inklusive des weiter unten im Text beschriebenen Mappings erfolgte am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg. Die erste Qualitätsanalyse sprach dafür, dass eine statistisch verlässliche Auswertung möglich war. Abbildung 3-13 zeigt den Ordinationsplot (siehe 2.5.2) der Mikroarrays. Erwartungsgemäß gruppierten die Sommerproben und die der späten Ruhephase zusammen.

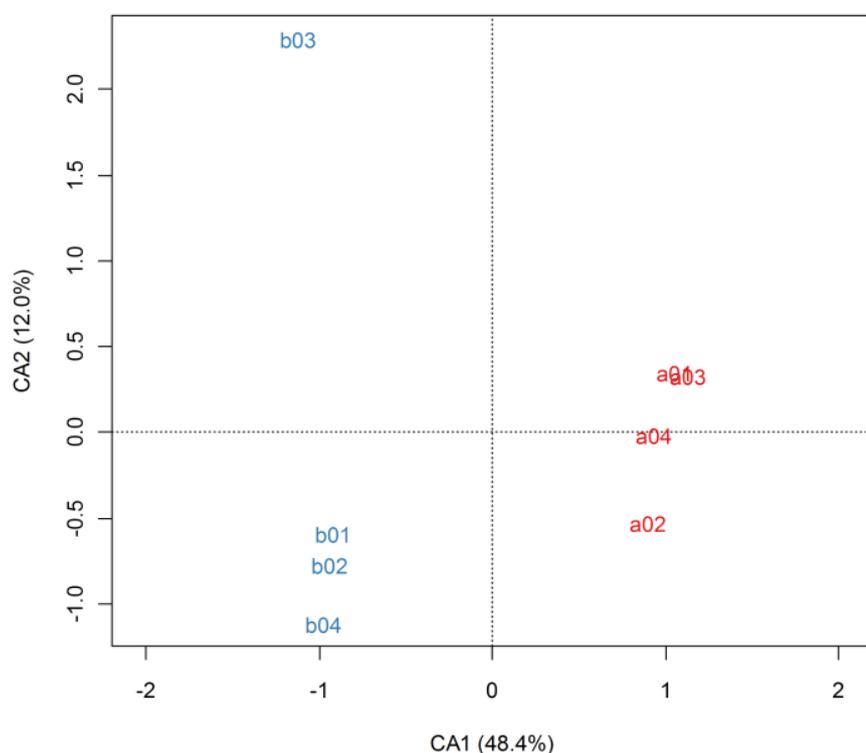


Abbildung 3-13: Ordinationsplot der Pappel-Mikroarrays. Rot (a) – Sommer, 29. Juli 2008, Temperatur: 21,6 °C (min. 15,8 °C, max. 31,5 °C); Bodentemperatur: 12,8 °C/18,9 °C; Niederschlag: 42,2 mm; blau (b) – späte Ruhephase, 12. Februar 2007, Temperatur: 5,9 °C (min. 3,9 °C, max. 7,6 °C); Bodentemperatur: 0,0 °C/-3,4 °C; Niederschlag: 6,6 mm. (Abbildung © Bioinformatik Würzburg)

Die Probe b03 wich vom Scaling Faktor, der „present call“-Rate und den Korrelationskoeffizienten von den übrigen Proben ab. Obwohl sie nach der Normalisierung nicht mehr auffällig erschien, gruppierte sie im Ordinationsplot (Abbildung 3-13) nicht gut mit den Proben b01, b02 und b04. Allerdings entfiel dieser Effekt bei Betrachtung der Top 5 % varianzstärkster Gene, so dass alle Proben der späten Ruhephase zusammen gruppierten (nicht gezeigt). Deshalb wurde Probe b03 trotzdem in die weiteren Analysen mit einbezogen, da die Abweichungen hauptsächlich die nicht signifikanten Gene betrafen.

Eine erste Analyse der Mikroarray-Daten lieferte etwa 7.000 differenziell exprimierte Gene, davon jeweils die Hälfte induziert bzw. reprimiert (adjusted p-value $\leq 0,05$, FC ≥ 2). Diese hohe Zahl war der Tatsache geschuldet, dass im Hinblick auf die aktive Wachstumsphase im Sommer und die späte Ruhephase zwei physiologisch gänzlich verschiedene Zustände der Pflanze betrachtet wurden, was sich auch in der Genexpression widerspiegelte.

Da das Pappelgenom zwar sequenziert, aber im Gegensatz zu *Arabidopsis* noch nicht vollständig und vor allem nicht einheitlich annotiert ist, wurden die Pappel-Gene zunächst mit *Arabidopsis*-AGI-Codes abgeglichen, um die Mikroarray-Daten differenzierter analysieren zu können. Dies erfolgte durch ein BLAST Mapping, wie es von PLEXdb (<http://www.plexdb.org>) angewendet wird (Dash *et al.*, 2011). Dadurch konnten 43.057 ($\approx 70\%$) der 61.251 Probe Sets auf den Affymetrix Pappel-Arrays einem AGI-Code zugeordnet werden. Vice versa bedeutete dies, dass etwa 30 % der Probe Sets auf dem Pappel-Chip in allen weiteren Analysen nicht berücksichtigt werden konnten. Wurden mehrere Probe Sets durch denselben AGI-Code erfasst, so wurde nur das jeweils Varianzstärkste weiter verwendet. Insgesamt lieferte das Mapping 15.365 unterschiedliche AGI-Codes. Mit adjusted p-value $\leq 0,05$ und FC ≥ 2 als Ausschlusskriterien fanden sich dabei 2.001 Gene im Sommer induziert und 1.969 in der späten Ruhephase. Erhöhte man das Ausschlusskriterium auf FC ≥ 3 , so waren 1.407 Gene im Sommer induziert und 1.148 in der späten Ruhephase.

Die Anzahl der in der späten Ruhephase induzierten Gene korrespondierte im Hinblick auf die Größenordnung ungefähr mit anderen kürzlich veröffentlichten Array-Analysen (Ko *et al.*, 2011). In dieser Arbeit wurden Astproben einjähriger *Populus trichocarpa*-

Pflanzen auf transkriptionelle und biochemische Unterschiede zwischen Winter/Dormanz und Sommer/aktivem Wachstum untersucht. Die Array-Analysen lieferten 3.237 Gene, die in den Winter/Dormanz-Proben mit einem FC ≥ 3 induziert waren (davon 2.550 mit AGI-Code-Übereinstimmung). In den Sommer/aktives Wachstum-Proben fanden die Autoren 7.270 Gene induziert (davon 6.004 mit AGI-Code-Übereinstimmung). Der zahlenmäßige Unterschied in den Sommerproben konnte dadurch erklärt werden, dass zu diesem Zeitpunkt in den kambialen und sich differenzierenden Zellen auf transkriptioneller Ebene viele Prozesse ablaufen, die mit den angereicherten Strahlen-Proben nicht erfasst wurden. Darüber hinaus zeigten die Daten von Ko *et al.* eine so starke Varianz, dass ein weitergehender Vergleich mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten unmöglich war.

3.3.2 Top 500 – MapMan

Für einen ersten Überblick über die Mikroarray-Daten wurden die 500 am stärksten regulierten Gene (mit AGI-Code-Übereinstimmung) betrachtet. Davon waren 294 Gene im Sommer und 206 in der späten Ruhephase induziert. Die Top 500-Gene wurden einer MapMan-Analyse unterworfen (Thimm *et al.*, 2004), wobei dabei zwei der im Sommer induzierten Gene in zwei unterschiedliche Kategorien eingeordnet wurden, d. h. im Sommer wurden 296 Gene guppiert. In Abbildung 3-14 sind nur die Kategorien dargestellt, in denen im Sommer und/oder in der späten Ruhephase mindestens einmal eine zweistellige Zahl an Genen eingruppiert war. Außerdem blieben die nicht annotierten Gene unberücksichtigt. Das bedeutet, dass in die Abbildung von den 294 bzw. 296 Genen im Sommer nur 193 (= 65,7 % bzw. 65,2 %) und von den 206 Genen in der späten Ruhephase nur 115 (= 55,8 %) mit einbezogen wurden.

Die vollständige Übersicht der Kategorien der Top 500-Gene ist im Anhang (siehe 8.3) in Form von Tortendiagrammen zu finden.

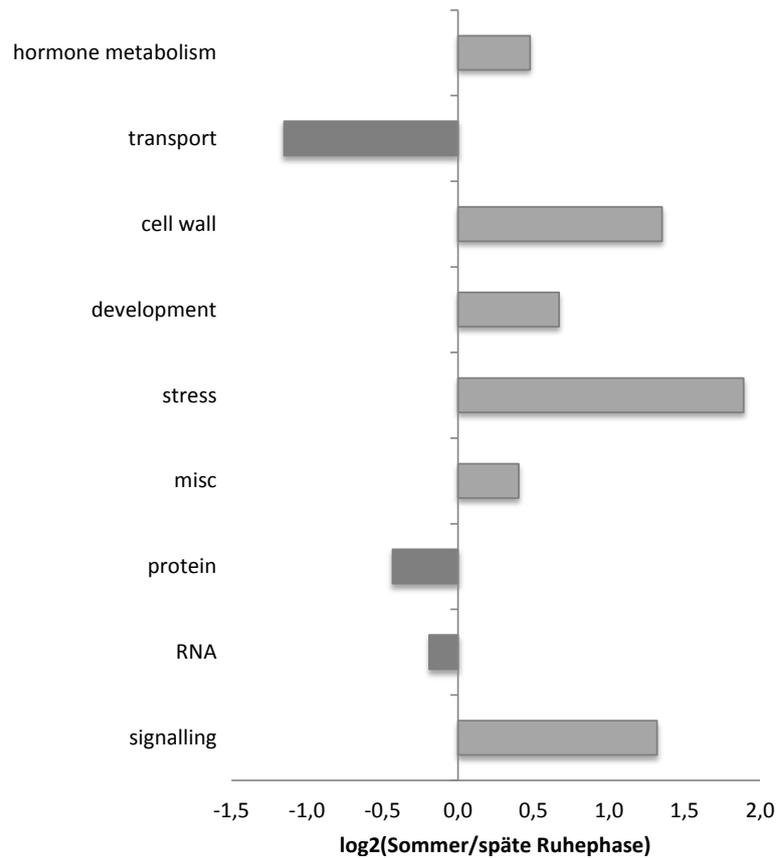


Abbildung 3-14: Die 500 am stärksten regulierten Gene, gruppiert mit MapMan. Negative Werte: in der späten Ruhephase induziert, positive Werte: im Sommer induziert; nur Kategorien mit mindestens einer zweistelligen Zahl an Genen sind dargestellt, ohne nicht annotierte Gene.

Die Kategorien Stress, Signalweiterleitung, Zellwand, Entwicklung und Hormonmetabolismus waren im Sommer stärker vertreten als in der späten Ruhephase. Den größten Unterschied dabei zeigte die Kategorie Stress. Insbesondere Pappeln sind während der aktiven Wachstumsphase im Sommer vielen biotischen wie abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt, die zu Signalweiterleitung über die Strahlen und Aktivierung von stressinduzierten Genen führen. Darüber hinaus wird im Sommer vermehrt Holz gebildet, was sich in Zellwandbildung, Zellentwicklung und Hormonaktivität widerspiegelte. Die während der späten Ruhephase induzierten Kategorien Transport, Protein und RNA deuteten darauf hin, dass in dieser Jahresphase die Reaktivierung schon begonnen hatte.

3.3.3 Pathway-Analysen

Die große Zahl an differenziell exprimierten Genen erschwerte eine Einzelanalyse der Gene. Bei ausschließlicher Betrachtung der Top 500-Liste wäre ein Großteil der differenziellen Gene nicht erfasst worden. Deshalb war es notwendig, bioinformatisch nach Stoffwechselwegen zu suchen, die insgesamt zwischen Sommer und später Ruhephase unterschiedlich reguliert waren. Diese „Gene Set Enrichment“-Analysen (GSEA) erfolgten am Lehrstuhl für Bioinformatik der Universität Würzburg. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: eine Analyse über die KEGG-Pathways (= Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg/>) und eine erweiterte Analyse über GO (= Gene Ontology, <http://www.geneontology.org/>) (Ashburner *et al.*, 2000). Letztere wurde auf die biologischen Prozesse beschränkt. Für die Durchführung solcher GSEA existieren zwei unterschiedliche Herangehensweisen:

- der „self-contained“ (ROAST) Ansatz (Wu *et al.*, 2010), der die Expression der in den Stoffwechselwegen annotierten Gene zwischen den Bedingungen vergleicht sowie
- der „competitive“ (ROMER) Ansatz (Majewski *et al.*, 2010), der die verschiedenen Gensets nicht nur zwischen den Bedingungen, sondern auch gegeneinander vergleicht.

Obwohl beide Wege für die GSEA eingesetzt wurden, sind im Folgenden stets nur die Ergebnisse der kompetitiven ROMER-Analyse aufgeführt, da diese einen Fokus auf die am stärksten regulierten Stoffwechselwege erlaubt.

a) KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

In der nicht pflanzenspezifischen KEGG-Datenbank waren zum Zeitpunkt der Auswertung 2.707 Gene in 115 verschiedenen Stoffwechselwegen eingruppiert. Von den 15.365 Probe Sets mit AGI-Code-Übereinstimmung auf dem Pappel-Chip fanden sich 2.063 unter den in der KEGG-Datenbank annotierten Stoffwechselweggenen wieder. Dies entsprach einer Abdeckung von 76,2 % der KEGG-Stoffwechselweggene, aber nur 13,4 % der Probe Sets mit AGI-Code-Übereinstimmung auf dem Chip (Abbildung 3-15 A). Von den Top 500-Genen waren unter diesen 2.063 nur 95 (19 %) repräsentiert (Abbildung 3-15 B). Allerdings war umgekehrt ein sehr großer Prozentsatz der 2.063

Gene ($\approx 95\%$) nicht unter den Top 500-Genen vertreten (Abbildung 3-15 B). Daran war zu erkennen, dass die zusätzliche KEGG-Analyse einerseits mehr Informationen lieferte als die alleinige Betrachtung der Top 500-Genen. Allerdings wurde andererseits ein Großteil der am stärksten regulierten Gene durch die KEGG-Analyse nicht abgedeckt.

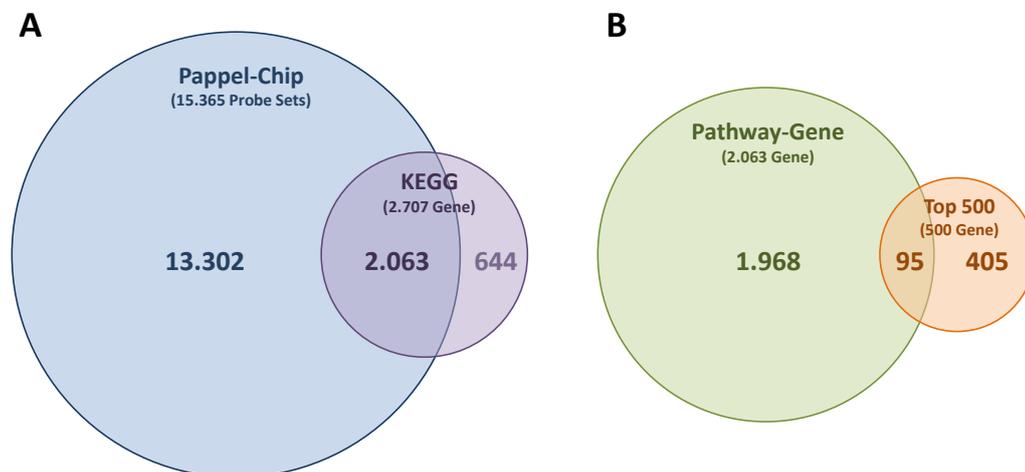


Abbildung 3-15: Übersicht über die Anzahl der Gene in der KEGG-Analyse. (A) Die Abdeckung der in der KEGG-Datenbank annotierten Stoffwechselweggene betrug 76,2 %, die der Gene auf dem Pappel-Chip (mit AGI-Code-Übereinstimmung) dagegen nur 13,4 %; **(B)** die 2.063 Pathway-Gene, also die Gene, die sowohl auf dem Pappel-Chip als auch in der KEGG-Datenbank repräsentiert waren, deckten nur 19 % der Gene der Top 500-Liste ab, wobei sich 95 % der Pathway-Gene nicht unter den Top 500 wiederfanden.

Trotz der geringen Überlappung der Anzahl der Gene waren die Ergebnisse der kompetitiven KEGG-Analyse nach ROMER grundsätzlich mit denen der Top 500-MapMan-Analyse vergleichbar, da sich ähnliche Stoffwechselwege differenziell reguliert zeigten (Abbildung 3-16).

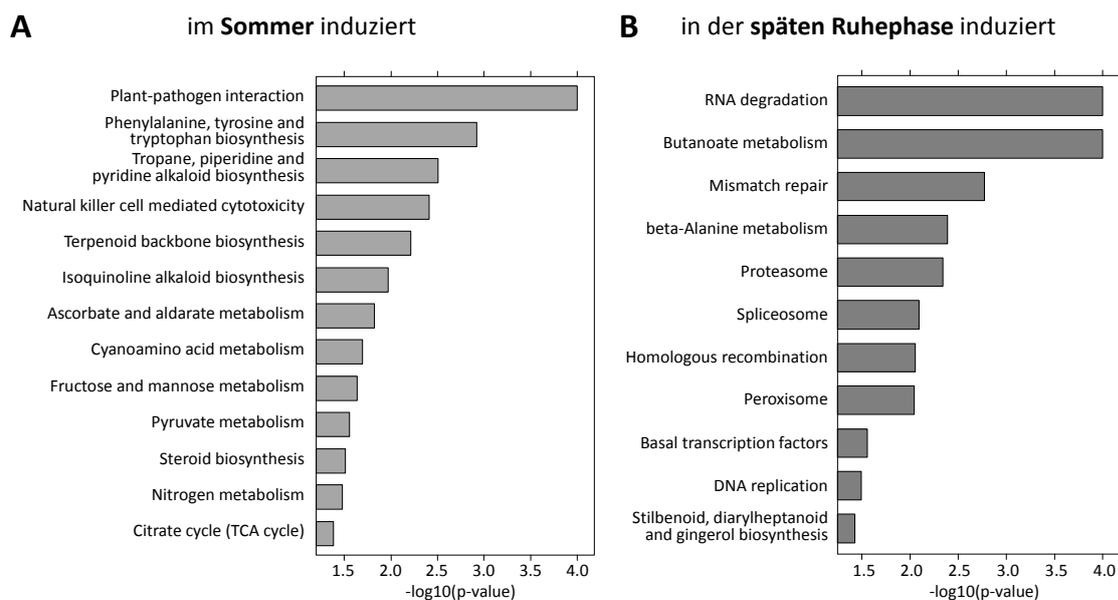


Abbildung 3-16: Übersicht über die differenziell exprimierte KEGG-Stoffwechselwege. Kompetitive Analyse nach ROMER; die Balkenlänge entspricht dem Grad der Signifikanz; **(A)** im Sommer induzierte Stoffwechselwege; **(B)** in später Ruhephase induzierte Stoffwechselwege. (Abbildung © Bioinformatik Würzburg)

Im Sommer waren wiederum v. a. Stoffwechselwege angeschaltet, die im Zusammenhang mit Pathogenantwort, Energiegewinnung, Biosynthese und Metabolismus stehen. Die stärkste Induktion wies dabei die Pathogenantwort auf. Pappeln werden während der aktiven Wachstumsphase im Sommer besonders häufig von Pathogenen befallen, was sich in der Induktion des zugehörigen Stoffwechselweges (Plant-pathogen interaction) niederschlägt. Sowohl an der Resistenz gegenüber Pathogenen als auch an der Toleranz gegenüber abiotischem Stress sind phytochemische Verbindungen beteiligt, die über verschiedenste Stoffwechselwege synthetisiert werden, darunter die Hauptachsen des sekundären Metabolismus wie der Phenylpropanoid-, Isoprenoid- und Alkaloidsyntheseweg (Iriti and Faoro, 2009). Darüber hinaus sind in die Stressantwort Kinasen und andere Proteine involviert, die mit der Zytotoxizität, Steroidbiosynthese (Bishop and Koncz, 2002), Terpenoidgerüstbiosynthese (Iriti and Faoro, 2009) und dem anti-oxidativen Metabolismus (Noctor, 2006) in Verbindung stehen. Diese Aspekte spiegeln sich z. T. in den in der KEGG-Analyse induzierten Stoffwechselwegen wider.

Der am zweithöchsten induzierte Stoffwechselweg der Phenylalanin, Tyrosin- und Tryptophanbiosynthese ist neben der Proteinbiosynthese im Allgemeinen auch mit der Ligninbiosynthese verbunden, da Lignin ein Produkt des Phenylpropanoid-Wegs ist,

wobei die Ligninsynthese vom primären Metabolismus durch die Deaminierung von Phenylalanin abzweigt (Bonawitz and Chapple, 2010). Lignin wird im Sommer verstärkt für die Holzbildung benötigt.

Bei den weiteren im Sommer induzierten Stoffwechselwegen fällt beispielsweise der Ascorbat- und Aldaratmetabolismus auf. Ascorbat ist ein Antioxidanz und schützt vor oxidativen Schäden sowie vor Schäden durch Ozon (Smirnoff, 1996), die vermehrt im Sommer auftreten können. Die induzierte Steroidbiosynthese passt ebenfalls zur Erwartung, da Steroide nicht nur die strukturelle Grundlage der Brassinosteroide und Membranbestandteil sind, sondern auch die pflanzliche Entwicklung modulieren können (Fujioka and Yokota, 2003). Brassinosteroide sind wie tierische Steroide notwendig für ein normales Wachstum, Reproduktion und Entwicklung der Pflanze (Haubrick and Assmann, 2006). Sie sind sowohl an der Zellstreckung als auch an der Zellteilung beteiligt (Cheon *et al.*, 2010).

In den Proben der späten Ruhephase zeigte sich, wie bereits in der Top 500-Liste, durch Stoffwechselwege wie RNA-Degradation, DNA-Replikation, Proteasom, Spliceosom, Mismatch repair etc., dass die Reaktivierung des Wachstums im Frühjahr bereits eingesetzt hatte. Die Induktion des β -Alaninmetabolismus spricht für die verstärkte Bildung von Spermin und Spermidin, die beide Vorläufer von β -Alanin sind. Besonders in Bäumen sind beide an dem Aufbrechen der Knospen, der Entwicklung der Blätter und dem Sprosswachstum beteiligt (Fromm *et al.*, 1997; Santanen and Simola, 2007).

Durch die Auswertung über die KEGG-Datenbank konnte nur ein Bruchteil der gesamten Gene des Pappel-Chips erfasst werden, weswegen die KEGG-Analyse genauso wie die alleinige Betrachtung der Top 500-Gene nicht ausreichend war. Deshalb wurde die Auswertung der Mikroarray-Daten um eine Analyse über Gene Ontology erweitert.

b) GO – Gene Ontology

Die Gene Ontology (GO)-Datenbank ist mit insgesamt 3.216 Pathways erheblich umfangreicher als KEGG. Darüber hinaus berücksichtigt sie im Gegensatz zur hauptsächlich auf tierischen und humanen Datensätzen basierenden KEGG-Datenbank auch pflanzenspezifische Stoffwechselwege. Trotz der Beschränkung der GO-Analyse auf die biologischen Prozesse war die Abdeckung der Probe Sets auf dem Pappel-Chip (mit

AGI-Code-Übereinstimmung) mit fast 90 % deutlich größer als bei der KEGG-Analyse (13,4 %). In die finale Analyse flossen allerdings nur 1.075 Stoffwechselwege mit ein, die 6.196 Gene beinhalteten. Stoffwechselwege mit mehr als 200 Genen (z. B. metabolische Prozesse) wurden als zu unspezifisch bzw. Wege mit weniger als zehn Genen als zu spezifisch aus der Analyse entfernt.

Abbildung 3-17 gibt eine Übersicht über die aus der GO-Analyse resultierenden differentiell regulierten Stoffwechselwege.

Auch hier fanden sich im Sommer wieder viele Stoffwechselwege induziert, die im Zusammenhang mit Abwehrreaktionen, dem Immunsystem, metabolischen Prozessen, der Zellwand oder der Transkriptionsregulation standen.

In der späten Ruhephase traten zum einen wieder viele mit RNA, DNA, Peroxisom etc. verknüpfte Stoffwechselwege hervor. Zum anderen waren im Unterschied zu den bisherigen Analysen (MapMan, KEGG) bei der GO-Auswertung auch pflanzenspezifische Pathways repräsentiert, die die Samenentwicklung und Gametogenese oder auch direkt den Photoperiodismus und die Blühinduktion betrafen. So zeigte sich auch bei dieser Auswertung, dass die Reaktivierung in der späten Ruhephase schon begonnen hatte, und zusätzlich zu den bisherigen Daten, dass offensichtlich auch die Blüte bereits induziert worden war.

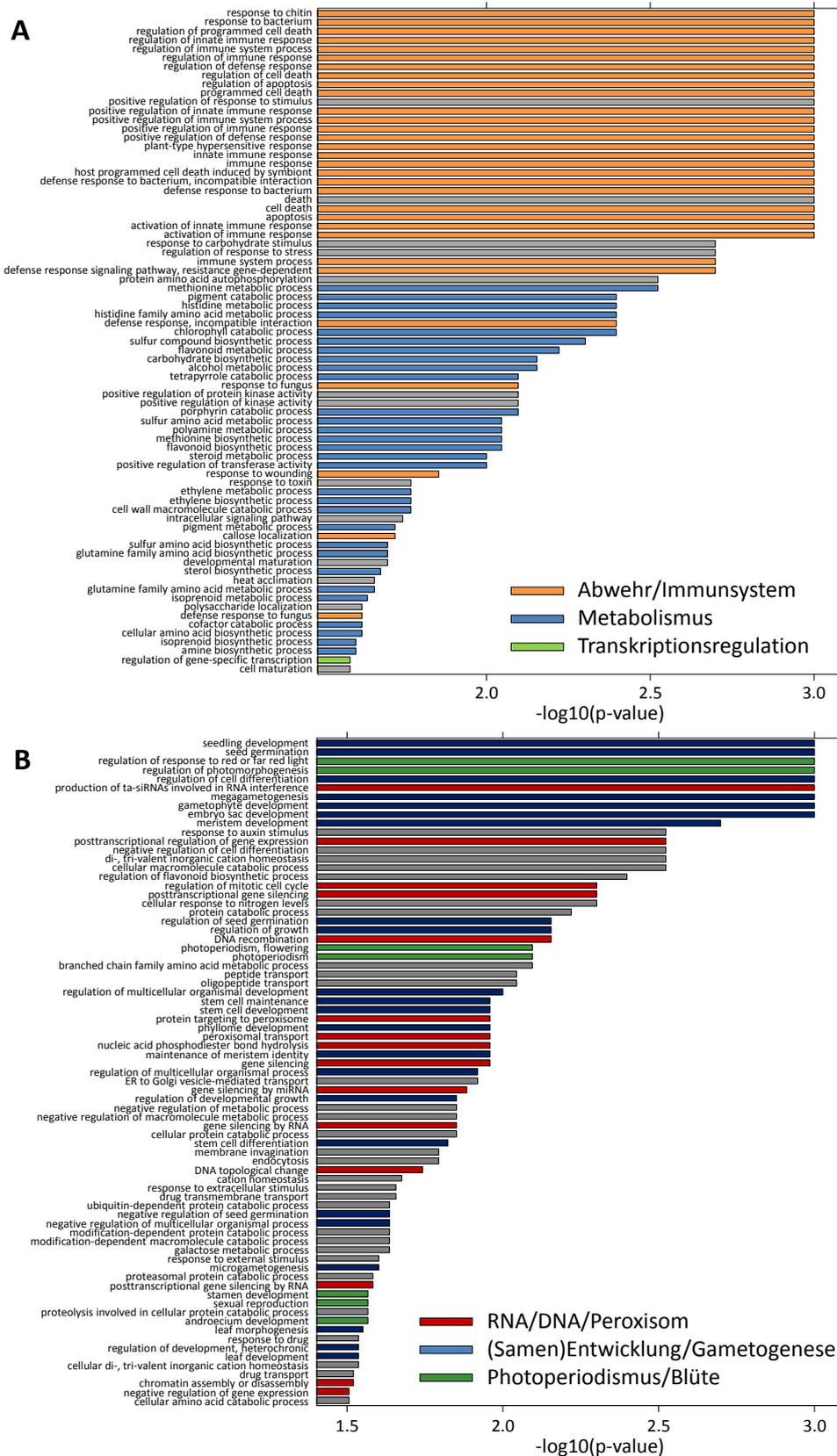


Abbildung 3-17: Differenziell exprimierte GO-Stoffwechselwege. Analyse auf biologische Prozesse beschränkt, kompetitiv nach ROMER; die Balkenlänge entspricht dem Grad der Signifikanz; **(A)** im Sommer induzierte Stoffwechselwege; **(B)** in später Ruhephase induzierte Stoffwechselwege. (Abbildung in Kooperation mit der Bioinformatik Würzburg)

3.3.4 Markergene im Jahresgang

a) Markergene

Um die Ergebnisse aus den Pathway-Analysen auf molekularer Ebene detaillierter und quantitativ zu betrachten, wurden für beide Jahreszeiten exemplarische Stoffwechselwege mit zugehörigen Markergenen ausgewählt und deren Expressionsmuster im Jahresverlauf untersucht. Dafür standen zwei komplette Jahresgänge von entrindeten *P. can* Holzproben zur Verfügung (Wildhagen *et al.*, 2010).

Im Hinblick auf saisonale physiologische Zustände ist im Sommer für Bäume die Ligninbiosynthese charakteristisch (siehe 1.3.4 b). Bei der Synthese der Ligninmonomere stellt PAL (phenylalanine ammonia lyase) das initiale Enzym und CAD (cinnamyl alcohol dehydrogenase) das finale Enzym dar. Beide fanden sich auf den Mikroarrays im Sommer induziert. Außerdem war der Transkriptionsfaktor MYB58, von dem zumindest für *Arabidopsis* bekannt ist, dass er an der Regulation der Ligninbiosynthese beteiligt ist (Zhou *et al.*, 2009), im Sommer induziert. Deshalb wurden PAL1, CAD1 und MYB58 als Markergene ausgewählt und über qPCR im Jahresgang geprüft.

Ebenfalls repräsentativ für den Sommer sind die Photosynthese und die daran gekoppelte Stickstofffixierung. Die Schlüsselenzyme der Stickstofffixierung, NIA1 (Nitratreduktase) und NIR1 (Nitritreduktase), waren im Sommer deutlich induziert, was für eine vermehrte Stickstofffixierung im Sommer spricht.

Bei den Proben der späten Ruhephase fielen besonders die Stoffwechselwege im Zusammenhang mit der Blühinduktion und weiteren reproduktiven Ereignissen auf. Die Blühinduktion ist bei *Arabidopsis* umfangreich beschrieben. Bei der Pappel ist dieses Netzwerk noch nicht im selben Umfang erforscht (siehe 1.3.4 a). Bekannt ist allerdings, dass sowohl der *flowering locus T* (FT) sowie *Terminal flower 2* (TFL2) eine entscheidende Rolle spielen. Beide Gene erschienen auf den Mikroarrays in der späten Ruhephase induziert. *Leafy* (LFY) dagegen war nicht zu finden. Das konnte daran liegen, dass dieses Gen zum Zeitpunkt der Probennahme noch nicht bzw. nicht mehr exprimiert wurde, oder aber daran, dass LFY in den Holzstrahlen nicht exprimiert wird. Alle drei Gene (FT, TFL2 und LFY) wurden als Marker gewählt.

Als Positivkontrolle diente der Kaliumkanal PTORK, für den der jahreszeitliche Expressionsverlauf bereits aus früheren Arbeiten bekannt war (Langer, 2003), obwohl er auf den Arrays nicht differenziell exprimiert erschien.

Der zeitliche Verlauf der Genexpression der Markergene wurde mittels qPCR in zwei Jahrgängen untersucht. Tabelle 3-2 gibt eine Übersicht über die analysierten Gene.

Tabelle 3-2: Liste der in den Jahrgang-Proben via qPCR gemessenen Gene. Zugehörige Affymetrix-IDs (Affy-ID), GeneBank Accession Numbers (gb), AGI-Code-Übereinstimmungen (AGI), Annotationen, Induktionsfaktoren (logFC und FC) sowie Calls auf den Arrays (je vier Proben für Sommer und späte Ruhephase, S-W). n.d.: nicht differenziell reguliert, **S**: im Sommer induziert, **W**: in der späten Ruhephase induziert; **P**: present, **M**: marginal, **A**: absent.

Name	Affy-ID	gb	AGI	Annotation	logFC	FC	S-W
PtPAL1	PtpAffx.1672.3.A1_a_at	CV271667	At2g37040	AtPAL1, pal1 (Phenylalanine ammonia lyase 1)	4,01	16,1 ^S	PPPP-PAAA
PtCAD1	Ptp.5683.1.S1_s_at	AI161886	At1g72680	AtCAD1, CAD1; cinnamyl-alcoholdehydrogenase	1,87	3,7 ^S	PPPP-AAAA
PtMYB58	PtpAffx.35610.2.S1_at	CA823180	At1g16490	AtMYB58, MYB58 (MYB domain protein 58)	1,45	2,7 ^S	PPPP-AAAA
PtLFY	PtpAffx.3588.1.A1_s_at PtpAffx.212932.1.S1_at	DN484119 pmmna25300	At5g61850	LFY, LFY3, floral meristem identity control protein LEAFY	n.d.	n.d.	AAAA-MAAA AAAA-AAAA
PtFT	PtpAffx.86450.1.S1_at	AB110612.1	At1g65480	FT (Flowering Locus T), PEBP	-6,71	104,7 ^W	AAAA-PPPP
PtTFL2	PtpAffx.144850.1.S1_at	AJ769562	At5g17690	TFL2 (Terminal Flower 2), LHP1	-1,54	2,9 ^W	PPPP-PPPP
PtNIA1	Ptp.5930.1.S1_s_at	BU816698	At1g77760	NIA1, GNR1, NR1; nitrate reductase 1	5,89	59,3 ^S	PPPP-PPAP
PtNIR1	PtpAffx.25006.1.S1_at	CV237671	At2g15620	NIR1, NIR, ATHNIR; nitrite reductase 1	5,94	61,4 ^S	PPPP-AAAP
PTORK	Ptp.123.1.S1_at	CV277426	At3g02850	SKOR (Stelar K ⁺ outward rectifier)	n.d.	n.d.	APAP-AAAA

b) qPCR-Messungen

Die im jahreszeitlichen Verlauf untersuchte Gesamt-RNA stammte aus entrindeten Holzproben, d. h. diese Proben enthielten neben RNA aus den Strahlen auch die RNA aus Kambium, Differenzierungszone und Mark. In Abbildung 3-18 sind die qPCR-Ergebnisse des ersten Jahrgangs grafisch dargestellt. In den einzelnen Messreihen zeigten sich z. T. starke saisonale Schwankungen. Der zweite Jahrgang lieferte ähnliche Ergebnisse (nicht gezeigt).

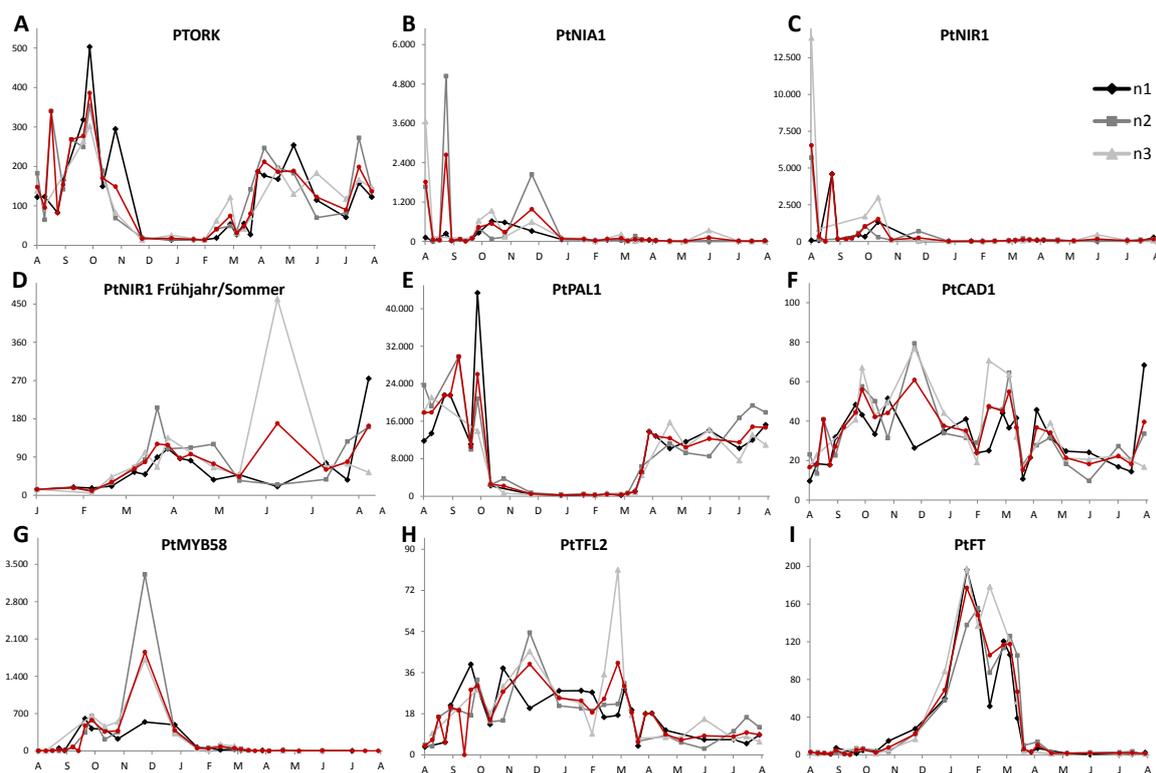


Abbildung 3-18: Ergebnisse der qPCR-Messungen im Jahresgang #1. y-Achse: relative Expression, d. h. Moleküle pro 10.000 Molekülen Aktin; es sind jeweils nur die Datenpunkte eingezeichnet, bei deren zugehöriger cDNA der Aktin-Zyklus < 25 war; rote Linien: Mittelwerte.

Als Positivkontrolle verlief die Expression des auswärtsgerichteten Kaliumkanals PTORK wie erwartet. Sie war im Winter kaum nachweisbar, während sie im Sommer und ein weiteres Mal im Herbst kurz vor Blattabwurf deutlich anstieg (Abbildung 3-18 A).

Die Markergene der Stickstoffassimilation, PtNIA1 und PtNIR1, zeigten beide ihre Expressionsmaxima während der Spätholzbildung (Abbildung 3-18 B und C), wobei bereits zu Beginn der aktiven Wachstumsphase ein leichter Anstieg sichtbar war (Abbildung 3-18 D). Der Ausschlag im August bestätigte die etwa 60fache sommerliche Induktion beider Gene in den Mikroarray-Daten.

Bei den Ligninbiosynthesegenen wies das initiale Enzym PtPAL1 eine stark erhöhte Expression im Spätsommer auf (Abbildung 3-18 E). Diese stieg bereits ab dem Beginn der Wachstumsphase leicht an und hielt ihr Maximum bis zur Spätholzbildung im Herbst. Das finale Enzym PtCAD1 hingegen zeigte nur leichte jahreszeitliche Schwankungen ohne sichtbare saisonale Regulation (Abbildung 3-18 F). Entgegen dem Mikroarray-Ergebnis

(dreifache Induktion im Sommer) zeigte PtMYB58 einen starken Expressionsanstieg im Winter (Abbildung 3-18 G).

Bei den Blühinduktionsgenen zeigte der FT-Antagonist PtTFL2 kaum einen Anstieg und war auch nur schwach exprimiert (Abbildung 3-18 H). Der Expressionsanstieg von PtFT dagegen war deutlich ausgeprägt und reichte bis in das Frühjahr hinein, um dort kurz vor Aufbrechen der Blattknospen abrupt abzufallen (Abbildung 3-18 I). Sowohl PtTFL2 als auch PtFT waren im Sommer nicht exprimiert. Der hohe PtFT-Anstieg während der späten Ruhephase korrelierte mit der Induktion des Gens auf den Mikroarrays, i. e. ein 100facher Anstieg in den Proben der späten Ruhephase.

LFY-Transkripte konnten über den ganzen Jahresverlauf nicht detektiert werden (nicht gezeigt), was die Hypothese stützt, dass dieses Gen nicht in den Holzstrahlen exprimiert wird.

3.3.5 Vergleich von Metabolit- und Expressionsmustern

Dr. Henning Wildhagen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Heinz Rennenberg (Albert-Ludwigs-Universität Freiburg) analysierte in den gleichen saisonalen Holzproben, die auch zur Generierung der Mikroarray-Proben verwendet wurden (siehe 3.3.1), die Metabolitgehalte. Die Ergebnisse seiner Messungen sind in Abbildung 3-19 aufgeführt. Die dafür verwendeten Abkürzungen entsprechen dabei Fruktose (Fruc), Glukose (Gluc), Maltotriose (Maltotr), myo-Inositol (myo-Inos), Saccharose (Sucr), L-Aspartat (Asp), γ -Aminobuttersäure (GABA), L-Glutamin (Gln), L-Glutamat (Glu), Pyroglutamat (PGlu), Threonin (Thr), Ethanolamin (Eth), L-Glycin (Gly), Ornithin (Orn) und L-Serin (Ser).

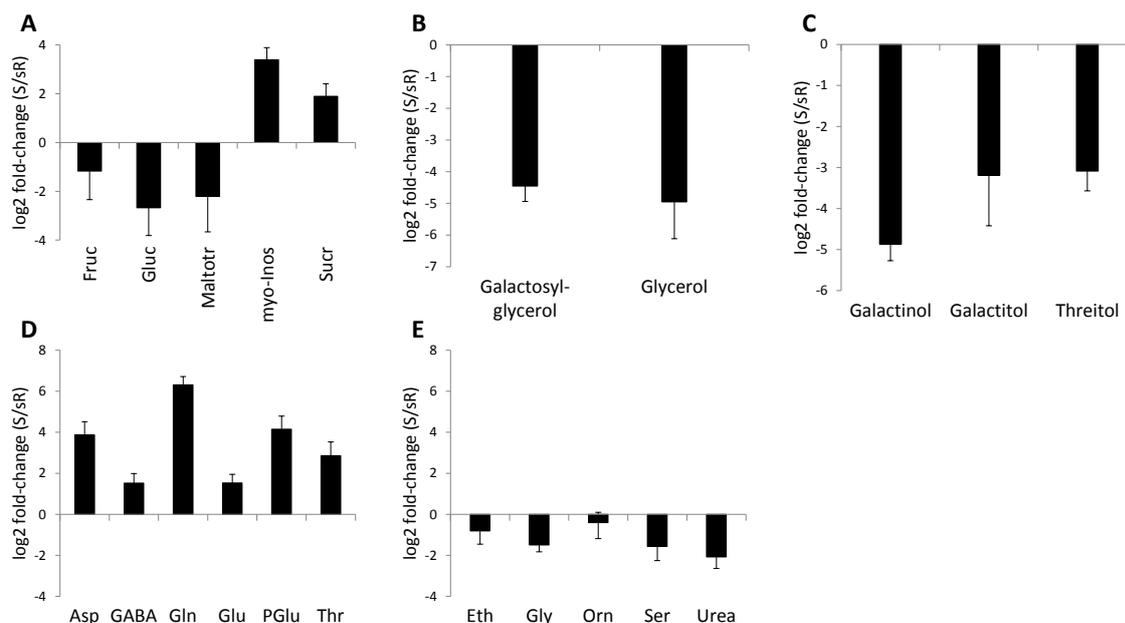


Abbildung 3-19: Bestimmung der Metabolitgehalte in den saisonalen Holzproben über GC/MS-Messungen. Positive Werte: höherer Gehalt im Sommer (S); negative Werte: höherer Gehalt in später Ruhephase (sR). **(A)** Zucker, **(B)** Glycerin und Derivate, **(C)** Zuckeralkohole, **(D-E)** Aminosäuren. Induktionsfaktoren wurden über Mittelwert und Standardfehler von drei bis sechs Pflanzen pro Erntezeitpunkt berechnet. Die Messungen wurden von Dr. Henning Wildhagen durchgeführt.

Diese Daten ließen sich zum Teil mit den Ergebnissen der Mikroarray-Analysen zur Deckung bringen. Abbildung 3-19 A zeigt, dass die Konzentrationen von Monosacchariden (Fructose, Glucose) während der späten Ruhephase und der Saccharosegehalt im Sommer höher waren. Dies deutete zum einen auf einen vermehrten (Reserve-)Zuckerabbau in der späten Ruhephase hin, zum anderen werden die Photoassimilate im Sommer als Saccharose transportiert. Die Mikroarray-Daten lieferten eine Bestätigung des vermehrten Zuckerabbaus über die starke Induktion einer Invertase (PtpAffx.163121.1.S1_at, gb: BU873063, cell wall invertase 2, logFC = -7,9) in der späten Ruhephase. Auch einige für den Stärkeabbau verantwortliche Amylasen waren in der späten Ruhephase induziert.

Die Zunahme des Glyceringehalts (Abbildung 3-19 B) während der späten Ruhephase spricht für einen vermehrten Fettabbau zur Energiegewinnung, wodurch Glycerin und Fettsäuren frei werden.

Der Anstieg der Zuckeralkohole während der späten Ruhephase (Abbildung 3-19 C) steht im Zusammenhang mit dem Gefrierschutz. Passend dazu war das Enzym GolS2, das

Galaktinol aus UDP-Galaktose und myo-Inositol synthetisiert, in der späten Ruhephase induziert (PtpAffx.3724.1.A1_at, gb: CV239209, galactinol synthase 2, logFC = -4,2).

Der höhere Gehalt an Aminosäuren im Sommer (Abbildung 3-19 E) wies darauf hin, dass diese während der Wintermonate in Form von sog. Bark Storage-Proteinen gespeichert werden. Deren Transkripte fanden sich allerdings in den Mikroarrays nicht differenziell exprimiert. Das lag vermutlich darin begründet, dass die Proteine zum Zeitpunkt der Probennahme im Winter bereits synthetisiert waren (siehe Wildhagen *et al.*, 2010). Die Aminosäure mit dem ausgeprägtesten Konzentrationsanstieg im Sommer war Glutamin, was als deutlicher Hinweis auf die Stickstofffixierung während der aktiven Wachstumsphase gewertet werden darf. Dementsprechend fanden sich Enzyme, die an der Stickstoffassimilation beteiligt sind, wie die Nitratreduktase, Nitritreduktase und Glutaminsynthetase, im Sommer induziert.

4. Diskussion

4.1 Die Methode der Laser Mikrodisektion

4.1.1 Optimierung der Methode

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit stand die Optimierung der LMPC-Technik für pflanzliche Gewebe im Fokus. Die Laser Mikrodisektion an Pflanzen wurde erstmals im Jahre 2002 von Asano *et al.* beschrieben. Das verwendete Protokoll unterschied sich allerdings deutlich von dem in vorliegender Arbeit angewendeten. Am Julius-von-Sachs-Institut der Universität Würzburg war bereits ein auf einer Ethanol-Essigsäure-Fixierung sowie Paraffineinbettung basierendes Protokoll entwickelt worden (Ivashikina *et al.*, 2003; Deeken *et al.*, 2008), das allerdings nur teilweise zufriedenstellende Ergebnisse lieferte. So war z. B. auf den via LMPC generierten *Arabidopsis*-Phloem-Mikroarrays (Deeken *et al.*, 2008) ein in allen vegetativen Geweben konstitutiv exprimiertes Gen für das Mikrofilament Aktin (AtACT2, At3g18780, 257749_at) nicht nachzuweisen, wohingegen es auf den Mikroarrays der vorliegenden Arbeit detektiert werden konnte.

Anfangs konnte die Qualität der isolierten RNA während der einzelnen Schritte des LMPC-Prozesses aufgrund ihrer geringen Konzentration ausschließlich über qPCR kontrolliert werden. Diese Methode erfasste aber nur einzelne Transkripte und gab keinen Aufschluss über die Qualität der gesamten Probe. Eine deutliche Verbesserung bot das auf der LabChip-Technologie basierende „Experion™ Automated Electrophoresis System“ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland). Hiermit war es nun möglich, Kleinstmengen an RNA elektrophoretisch zu überprüfen, wobei das [28S/18S]-Verhältnis der ribosomalen RNAs und der RQI (engl.: RNA Quality Indicator)-Wert als Qualitätsindikatoren dienten (siehe 2.3.3). Mittels dieser Analyseverfahren war es nun möglich, alle Schritte der LMPC weiter zu optimieren. Dabei erwiesen sich drei Aspekte als ausschlaggebend für Qualität und Ausbeute:

- Die Zeit, die die Proben hohen Temperaturen ausgesetzt waren. Der Gebrauch eines Wasserbades statt eines Wärmeschanks zum Verflüssigen des Paraffins erlaubte ein erheblich zügigeres Arbeiten, was sich positiv auf die RNA-Qualität auswirkte.

- Das Lösungsmittel. Laut Herstellerangaben konnten als Paraffin-Lösungsmittel Roticlear® und Histo-Clear™ gleichwertig eingesetzt werden. Tests mit den beiden Lösungsmitteln ergaben jedoch, dass sich Roticlear® deutlich besser zum Einbetten eignete. Die Einbettung mit Roticlear® resultierte in einer etwa zehnfach höheren RNA-Konzentration als die mit Histo-Clear™ (nicht gezeigt). Roticlear® verdampfte deutlich schneller, wodurch weniger Rückstände im Paraffin verblieben, und dieses daher weniger oft gewechselt werden musste. Histo-Clear™ zeigte bessere Lösungseigenschaften, weshalb es beim Entparaffinieren das Paraffin leichter entfernte. Selbst mikroskopisch nicht sichtbare Paraffin-Reste hätten die RNA-Isolation beeinträchtigen können. Deshalb wurde zum Entparaffinieren stets Histo-Clear™ verwendet. Außerdem wurde im Vergleich zum vorherigen Protokoll die Zahl der Waschungen verdoppelt, um alle Spuren von Paraffin sicher zu entfernen.
- Die Stabilisierung der RNA. Anfangs wurde aus dem via LMPC gesammelten Material täglich mRNA über Dynabeads® (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) isoliert. Dafür wurde das Pflanzenmaterial direkt in den für die Extraktion verwendeten Lysis-binding-Puffer katapultiert. Die mRNA mehrerer Tage wurde dann vereinigt, gefällt und amplifiziert. Dieses Vorgehen führte zu hohen RNA-Verlusten. Bessere Ergebnisse wurden erzielt, wenn das Probenmaterial in RLT-Puffer (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) gesammelt wurde, und die einzelnen Proben sofort auf Trockeneis und dann bei -80° C gelagert wurden. Für die RNA-Isolation wurden die einzelnen Proben dann vereinigt, und die Gesamt-RNA mittels des RNeasy Micro Kits (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland) isoliert. Dies führte zu erheblich höheren RNA-Ausbeuten in besserer Qualität. Im Vergleich zum Lysis-binding-Puffer enthält der RLT-Puffer Chemikalien (u. a. Guanidiniumthiocyanat), die die RNA deutlich besser stabilisieren. Weitergehende Versuche wie Zugabe von RNase-Inhibitor (RiboLock™ RNase Inhibitor, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) zum Lysis-binding-Puffer oder die Verwendung von RNAlater (QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland), einem RNA stabilisierenden Reagenz, als Sammelpuffer führten zu keiner Verbesserung. Deshalb wurde das Material stets in RLT-Puffer gesammelt, und die RNA über das RNeasy Micro Kit isoliert.

In der Summe führten diese Veränderungen dazu, dass die RNA-Ausbeute und -Qualität trotz kleinerer Probenmenge und geringeren Zeitaufwands erheblich verbessert werden konnten. Darüber hinaus konnte auf die RNA-Voramplifikation (Deeken *et al.*, 2008), zumindest bei Mikroarray-Experimenten, verzichtet werden. Die Methode war damit sowohl für den Einsatz an *Arabidopsis* als auch an Pappel bereit.

4.1.2 Vor- und Nachteile der Methode

Während der Laser Mikrodisektion wird das Probenmaterial allein mittels des Lasers separiert und in entsprechende Sammelgefäße katapultiert. So kann ein Einbringen von Kontaminationen durch die manuelle Handhabung des Materials verhindert werden. Dies könnte allerdings schon beim Vorbereiten der Proben geschehen. Der anfängliche Fixierungsschritt erlaubt eine schnelle Konservierung des Transkriptoms direkt im Zustand der Probennahme. Bei der Protoplastierung, mit der es ebenfalls möglich ist, zelltypspezifisch zu isolieren (e. g. Schließzellen), kann es demgegenüber leicht zur unkontrollierten Induktion z. B. stressbezogener Gene kommen.

Eine weitere Methode für transkriptionelle Analysen ist die zelltypspezifische RNA-Isolation über markierte Ribosomen (Mustroph *et al.*, 2009). Ein häufiger Kritikpunkt an Untersuchungen der Gesamt- oder mRNA ist, dass dabei alle Transkripte erfasst werden, und nicht nur die, die auch wirklich zu Proteinen translatiert werden. Isoliert man mittels der von Mustroph *et al.* beschriebenen Methode das Translatom über markierte Ribosomen mit der daran gebundenen, sich in Translation befindlichen mRNA, umgeht man dieses Problem. Allerdings sind für diese Präparationsmethode erhebliche Mengen an Pflanzenmaterial notwendig. Für die Durchführung der LMPC reichen dagegen kleinste Materialmengen aus, z. B. bei *Arabidopsis* 1,5 cm Blütenstiel für die Phloempräparation.

Der größte Nachteil der LMPC ist eindeutig der Zeitaufwand. Bereits das Einbetten der Proben verläuft über mehrere Tage. Darüber hinaus müssen noch Dünnschnitte hergestellt und diese anschließend entparaffiniert werden. Obwohl die Zeit, die zur Probengenerierung benötigt wird, durch die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Optimierungsschritte erheblich reduziert werden konnte, muss immer noch pro Probe

mindestens ein Tag veranschlagt werden (siehe 4.1.3). Die Durchführung der Mustroph-Methode ist allerdings ebenfalls sehr aufwändig und dauert mehrere Tage.

4.1.3 *Arabidopsis* Phloemareale

Die unter 4.1.1 beschriebenen Optimierungsschritte führten dazu, dass die benötigte Arealgröße bei *Arabidopsis* um 60-80 % reduziert werden konnte. Musste vorher eine Fläche von $5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ gesammelt werden, um genügend Material für die Hybridisierung eines Mikroarrays zu erhalten, waren nun $1-2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ausreichend. Somit war es möglich, innerhalb eines Tages eine Probe zu generieren. Zum Vergleich: Für die bei Deeken *et al.* (2008) publizierten Daten wurde noch etwa eine Woche pro Probe benötigt. Außerdem musste die isolierte RNA nicht mehr einer Voramplifikation unterzogen werden. Dadurch entfiel auch die Notwendigkeit einer zusätzlichen, mit Materialverlust verbundenen Fällung der RNA zur Einengung des Volumens.

Die Methode wurde in dieser Arbeit an *Arabidopsis thaliana* zur Isolation von Phloemarealen angewendet. Der Vergleich der Mikroarray-Daten mit den Deeken-Daten von 2008 (siehe 3.2.1) zeigte, dass nun fast viermal so viele Gene im Phloem detektiert wurden wie zuvor, wobei allerdings 95 % der alten Daten ebenfalls in den aktuellen wiederzufinden waren. Dies spricht für die Verbesserung und die Reproduzierbarkeit der LMPC-Technik.

Mit dem entwickelten Protokoll ist es nun möglich, verschiedene Gewebe von *Arabidopsis* transkriptionell zu analysieren. Ob damit aber zukünftig Einzelzellanalysen durchgeführt werden können, bleibt fraglich. Die Morphologie wird bei der Paraffineinbettung zwar auf der Ebene ganzer Gewebe sehr gut konserviert, allerdings ist es z. T. schwierig, optisch zwischen einzelnen Zelltypen zu unterscheiden. Das bedeutet, große, eindeutig identifizierbare Zellen können separat isoliert werden. Je kleiner aber Zellen sind, desto schwieriger wird dies.

Eine Möglichkeit dennoch einzelne Zellen zu erkennen, stellt eine Markierung der interessierenden Zellen dar. Die Markierungsmethode muss dabei allerdings kompatibel zum verwendeten Einbettungsprotokoll sein. So eignete sich z. B. eine GUS (β -Glukuronidase)-Färbung (Jefferson *et al.*, 1987) zur Hervorhebung gewünschter Areale nicht,

da die RNA während der Färbung degradiert wurde, aber nach der Fixierung eine GUS-Färbung nicht mehr möglich war (nicht gezeigt).

4.1.4 Pappel-Holzstrahlen

Bei Pappel gestaltete sich die Anwendung der LMPC-Technik komplizierter. Da die Holzstrahlen in der Pappel einreihig vorliegen, war es nahezu unmöglich, diese ohne zu große Kontaminationen unbeschädigt zu isolieren. Des Weiteren ist die RNA-Isolation bedingt durch die im Holz enthaltenen Substanzen, wie z. B. Polyphenole und Lignine, stets anspruchsvoller als aus nicht verholzten Teilen der Pflanze. Obwohl im Vergleich zu *Arabidopsis* mehr als die doppelte Materialmenge gesammelt wurde, blieben RNA-Menge und -Qualität trotz verschiedener Isolationsmethoden unbefriedigend. Ein Wechsel zu Längsschnitten, in denen die Strahlzellen besser zu erkennen und leichter zu isolieren waren, anstelle von Querschnitten, führte ebenfalls zu keiner Verbesserung (nicht gezeigt).

Der inverse Ansatz, bei dem die lebenden Teile wie Kambium, Differenzierungszone und Mark mittels des Lasers abgetrennt wurden, und nur der dazwischenliegende Teil für die RNA-Isolation eingesetzt wurde, konnte dagegen erfolgreich angewendet werden. Die aus diesen angereicherten Strahlen generierte RNA war im Vergleich zur reinen Strahlen-RNA von guter Qualität und ausreichender Konzentration für die Hybridisierung von Mikroarrays – ebenfalls wieder ohne die Notwendigkeit einer Voramplifikation.

Sowohl für *Arabidopsis* als auch für Pappel konnten somit Protokolle entwickelt werden, die generell einsetzbar sind. Im Folgenden soll nun die spezifische Anwendung der LMPC zum Studium pflanzenphysiologischer Fragestellungen diskutiert werden.

4.2 Signalweiterleitung im Phloem von *Arabidopsis* während der Antwort auf eine Infektion mit *Pseudomonas*

Die induzierte Immunantwort auf Pathogenbefall bei Pflanzen ist systemisch. Ausgehend vom Ort der Infektion versetzt sie die Pflanze in einen Zustand erhöhter Resistenz. Die Natur des daran beteiligten, weitergeleiteten Signals ist immer noch nicht vollständig geklärt, obwohl verschiedene Möglichkeiten diskutiert werden, darunter auch das flüchtige Methyljasmonat. Für einen Hinweis zur Identifikation Phloem-mobiler Signale wurden Änderungen der Genexpression in mittels LMPC isolierten Phloemzellen von Blütenstielen infizierter *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen analysiert.

4.2.1 Mikroarray-Analysen des Phloemtranskriptoms 24 hpi

Es wurde bereits beschrieben, dass 24 Stunden nach einem Pathogenbefall die Expression der *PR*-Gene ansteigt (Mishina and Zeier, 2007a). Deshalb wurde dieser Zeitpunkt zur Probennahme für die Durchführung der ersten Mikroarrays gewählt. Eine systemische Immunantwort (SAR) sollte zu diesem Zeitpunkt ausgelöst worden sein, und ein mobiles Resistenzsignal gerade oder aber immer noch sichtbar sein. Auch für die Freisetzung von MeJA konnte ein Anstieg 24 hpi gezeigt werden (Attaran *et al.*, 2009). Für die Mikroarray-Analysen wurden Pflanzen mit einer Kontrolllösung (10 mM MgCl₂) sowie virulenten und avirulenten *P.st* (OD₆₀₀ = 0,2) infiziert.

Entgegen der Erwartung zeigten die mit avirulenten *P.st* behandelten Proben kein von den Kontrollen divergierendes Expressionsmuster (Abbildung 3-5). Dies legte die Vermutung nahe, dass zum Zeitpunkt der Probennahme (24 hpi) keine SAR induziert wurde bzw. diese nicht (mehr) sichtbar war. Die mit virulenten *P.st* (OD₆₀₀ = 0,2) infizierten Proben dagegen wiesen als Reaktion auf die Pathogeninfektion ein gegenüber den Kontrollen differenzielles Expressionsmuster auf. Dies spricht dafür, dass in diesen Pflanzen eine Immunantwort ausgelöst worden war.

Die Expression der Gene *PR1*, *PR2* und *PR5* (engl.: pathogenesis related) wird durch eine Infektion mit einem Pathogen stark induziert (Uknes *et al.*, 1992), weshalb sie als SAR-Markergene betrachtet werden können. Keines der drei Gene konnte auf den

Mikroarrays der Kontrollen oder der avirulenten Proben detektiert werden. Allerdings waren auch auf den Mikroarrays der virulenten Proben, die eine Immunantwort zeigten, nicht alle drei SAR-Markergene präsent. Lediglich *PR2* wies in einer der Proben einen „present call“ auf. Dieses Ergebnis widerspricht der gängigen Meinung, dass die SAR innerhalb von 24 Stunden in Form der *PR*-Genexpression deutlich wird. Möglicherweise werden aber auch alle drei getesteten Gene nicht nennenswert im Phloem exprimiert, sondern erst – durch das mobile Signal induziert – in systemischen Geweben synthetisiert.

Aus den Mikroarray-Daten ließen sich grundsätzliche Rückschlüsse ziehen. So wurden alle Gene als im Phloem exprimiert betrachtet, die in den drei Kontroll-Proben einen „present call“ aufwiesen. Bei diesen 9.714 Genen durfte nicht vernachlässigt werden, dass die Kontrollen ebenfalls infiltriert worden waren. Bei der Infiltration kommt es leicht zu Verletzungen des Gewebes, wodurch bereits verschiedene Stressgene induziert werden können.

In der Arbeit von Deeken *et al.* (2008) wurden 2.412 Gene im Phloem identifiziert und mit den 3.306 Phloemsaftgenen nach Pathogenbefall verglichen. Dabei stellten sich 1.385 dieser Gene als stationär und 1.921 als mobil heraus. Die Zahl der mobilen Transkripte erschien bereits damals zu hoch, die für die im Phloem exprimierten Gene dagegen zu niedrig. Die durch die neuen Mikroarrays im Phloem identifizierten 9.714 Transkripte entsprachen eher den Erwartungen. Der Vergleich der aktuellen Phloem-Genliste mit den Phloemsaft-Genen von Deeken *et al.* (2008) identifizierte 336 Gene als Phloem-mobil. Auch diese Zahl ist im Vergleich zu den vorherigen 1.921 mobilen Genen deutlich realistischer. Nur sieben der aktuell nach Behandlung mit virulenten *P.st* induzierten Phloem-Gene waren auch unter den mobilen 336 zu finden (Tabelle 4-1). Von diesen scheinen wiederum fast alle in Verbindung mit dem Jasmonsäure (JA, engl.: *jasmonic acid*)-Signalweg zu stehen.

Tabelle 4-1: Liste der sieben im Phloemsaft exprimierten und in den LMPC-Proben induzierten Gene. AGI: AGI-Code-Übereinstimmung, FC: FoldChange (Faktor der Induktion), Calls auf Arrays: absent (A), present (P).

AGI	FC	Annotation	Calls auf Arrays
At1g19670	3,9	ATCLH1 (CORONATINE-INDUCED PROTEIN 1)	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAA
At2g34600	2,8	JAZ7/TIFY5B (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 7)	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAA
At2g38240	5,5	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAA
At3g25760	2,2	AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1)	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: APP
At3g44860	2,5	FAMT (FARNESOIC ACID CARBOXYL-O-METHYL-TRANSFERASE); S-adenosyl-methionine-dependent methyltransferase/farnesoic acid O-methyltransferase	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAA
At5g13220	7,1	JAS1/JAZ10/TIFY9 (JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN 10)	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAP
At5g38120	2,2	4-coumarate-CoA ligase family protein/ 4-coumaroyl-CoA synthase family protein	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAP

Der JA-Weg wird interessanterweise eher mit der ISR als mit der SAR in Verbindung gebracht (Pieterse *et al.*, 1998). Auf der Suche nach möglichen Kandidaten für mobile Signale wurde nach Genen des JA-Syntheseweges (siehe Abbildung 1-5) in den Mikroarrays gesucht. Als Antwort auf eine Infektion mit *P.st* waren von diesen wiederum nur drei, AOC1/2 und AOC4, erhöht, die beide eher am Ende des JA-Biosyntheseweges zu finden sind (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Gene des JA-Synthesewegs sowie deren Expression auf den Mikroarrays 24 hpi. AGI: AGI-Code-Übereinstimmung, FC: FoldChange (Faktor der Induktion), Calls auf Arrays: absent (A), present (P), marginal (M).

AGI	FC	Annotation	Calls auf Arrays
AT1G55020	-	LOX1 (Lipoxygenase 1); lipoxygenase	avir: MAA, vir: PPA, Kontr.: PPP
AT3G45140	-	LOX2 (LIPOXYGENASE 2)	avir: AAA, vir: AAP, Kontr.: AAA
AT1G17420	-	LOX3 (Lipoxygenase 3)	avir: MAA, vir: APP, Kontr.: AAA
AT1G72520	-	lipoxygenase, putative; LOX4	avir: AAA, vir: PPP, Kontr.: AAP
AT5G42650	-	AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE); hydro-lyase/oxygen binding	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: PPP
AT3G25760	2,2	AOC1 (ALLENE OXIDE CYCLASE 1)	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: APP
AT3G25770		AOC2 (ALLENE OXIDE CYCLASE 2)	
AT3G25780	-	AOC3 (ALLENE OXIDE CYCLASE 3)	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: PPP
AT1G13280	3,0	AOC4 (ALLENE OXIDE CYCLASE 4)	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: PPP
AT2G06050	-	OPR3 (OPDA-REDUCTASE 3); 12-oxophytodienoate reductase	avir: PPP, vir: PPP, Kontr.: PPP

Aufgrund dieser beiden Beobachtungen ist es sehr wahrscheinlich, dass unter den beschriebenen experimentellen Bedingungen 24 Stunden nach Infektion im Phloem von *Arabidopsis* nicht SAR-, sondern eher ISR-verbundene Signale ausgelöst worden waren, was zu folgender Hypothese führte: Die JA-Synthese findet nicht vollständig im Phloem

statt. Es ist bereits bekannt, dass der JA-Spiegel im Phloem als Reaktion auf einen Pathogenbefall ansteigt (Truman *et al.*, 2007). Dies deutet darauf hin, dass Intermediate nach LOX (Lipoxygenase) lokal in das Phloem geladen werden, wo sie transportiert und kontrolliert von AOC1, 2 und 4 zu JA umgewandelt werden. Am Wirkort wird dann JA als fertig prozessiertes Signal aus dem Phloem entlassen. Die Fähigkeit des Phloems zur JA-Synthese wird auch der Nachweis der AOC-Expression in Leitgeweben von Tomate gestützt (Hause *et al.*, 2000).

Darüber hinaus gibt es auch Hinweise dafür, dass die Intermediate des JA-Synthesewegs charakteristische Aktivitäten zeigen, eine E3-Ubiquitin-Ligase wahrscheinlich die meisten JA-vermittelten Antworten in *Arabidopsis* reguliert, und der JA-Signalweg mit anderen Resistenz-Signalwegen interagiert (Turner *et al.*, 2002). Der Expressionsanstieg der AOC-Gene als Reaktion auf die Pathogen-Infektion führt zu einem erhöhten OPDA-Spiegel. Neben den Jasmonaten besitzt auch OPDA verschiedene Signaleigenschaften, z. B. bei der Rankenwindung (Blechert *et al.*, 1999), der Expression spezifischer Gene (Kramell *et al.*, 2000) oder aber bei der Bildung flüchtiger organischer Verbindungen (Koch *et al.*, 1999), die auch eine Rolle bei der Resistenzantwort der Pflanze spielen. LOX, AOS und AOC konnten in Siebröhren von Tomate nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass diese Zellen die Fähigkeit zur OPDA-Bildung besitzen (Hause *et al.*, 2003).

4.2.2 Zeitreihenexperimente

Das Fehlen der Anzeichen für eine Induktion der SAR war unerwartet. Verschiedene Faktoren könnten eine mögliche Ursache dafür darstellen. Obwohl gezeigt wurde, dass es auch in blühenden Pflanzen zu einer Immunisierung kommt (Abbildung 3-8), könnte diese durch das hohe Alter der Pflanzen bedingt über andere Signalwege vermittelt werden als in jüngeren Pflanzen. Außerdem wurden in dieser Arbeit hauptsächlich die Blütenstiele betrachtet, und nicht die systemischen Blätter, was ebenfalls wieder zur Beobachtung anderer Mechanismen führen kann. Ferner wäre es denkbar, dass unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eventuell ein anderer Zeitpunkt gewählt werden muss. Daher wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt, allerdings nicht an LMPC-isolierten Phloemarealen, sondern an ganzen Blütenstielen. Für Markergene, die nicht zwangsweise spezifisch im Phloem exprimiert werden (siehe *PR*-Gene), sollten sich

dennoch Aussagen treffen lassen. So sollte ein neuer Zeitpunkt für Mikroarray-Experimente ermittelt werden, an dem entweder die SAR- oder ISR-Markergene am stärksten induziert worden waren.

a) qPCR-Messungen

Zur Konkretisierung des Zeitpunkts der maximalen Resistenzantwort in *Arabidopsis*-Blütenstielen wurden qPCR-Messungen in Proben verschiedener Zeitpunkte nach Infiltration mit dem Pathogen bzw. einer Kontrolllösung durchgeführt. Eine Übersicht über die analysierten Markergene, die zugehörigen Primer und die AGI-Codes ist im Anhang zu finden (siehe 8.1.1). In den Ergebnissen dieser Zeitreihen-Messungen (siehe 8.2.1) zeigte sich, dass die Resistenzantwort nicht synchronisiert war, sondern für jede Pflanze individuell ablief. Einige der Daten waren analog zu denen aus den Mikroarrays 24 hpi, jedoch gab es zu diesem Zeitpunkt bei anderen Pflanzen auch Unterschiede in der Genexpression. Dies lag vermutlich in der erwähnten Individualität der Resistenzantwort begründet. Auch sollte berücksichtigt werden, dass das Phloem nur etwa drei Prozent der Querschnittsfläche des Blütenstiels einnimmt. Die Ergebnisse der qPCR-Messungen der Zeitreihen konnten also nicht uneingeschränkt mit denen der Mikroarrays verglichen werden. Ein im Phloem schwaches Signal konnte leicht durch höhere Expression im kompletten Blütenstiel überdeckt werden. D. h. wenn ein Gen phloemspezifisch exprimiert bzw. reguliert wurde, trat es ggf. in den Messungen der kompletten Blütenstiele nicht hervor.

Die Auswertung gestaltete sich schwierig, da auch die Kontrollen nicht immer einheitliche Werte zeigten. Bei signifikanten Messungen, d. h. bei entsprechend hoher Molekülzahl, passenden Kontrollen und einem sichtbaren zeitlichen Verlauf, wurde deutlich, dass SAR-assoziierte Gene – wenn überhaupt – eher zu einem frühen Zeitpunkt induziert worden waren, während die JA vermittelte ISR dagegen später stattfand.

Von den *PR*-Genen wurde besonders die *PR1*-Expression umfangreich als verlässlicher Marker für die Ausbildung einer SA-vermittelten Resistenz eingesetzt (Laird *et al.*, 2004). *PR1* fand sich allerdings weder auf den Mikroarrays im Phloem, noch in den Zeitreihenexperimenten im Blütenstiel signifikant exprimiert. In systemischen Blättern dagegen war es präsent und zeigte einen durch *Pseudomonas* vermittelten frühen

Expressionsanstieg nach etwa 3-6 h. Das führte zu dem Schluss, dass PR1 nicht an der Signalweiterleitung beteiligt, aber für die Auslösung der SAR mitverantwortlich ist.

b) experimentelle Problematik

Die Durchführung der Zeitreihen-Experimente warf u. a. durch das hohe Alter der Pflanzen bedingt diverse Schwierigkeiten auf. Die Pflanzen konnten nicht steril angezogen werden und waren daher im Gewächshaus bzw. der Klimakammer ubiquitär vorhandenen Pathogenen ausgesetzt. Deshalb zeigten einige Pflanzen – obwohl makroskopisch kein Befall erkennbar – bereits zu Beginn des jeweiligen Experiments einen stressbedingten Anstieg der Resistenzgene. Bei diesen Pflanzen zeigte sich kein oder ein völlig anderer zeitlicher Verlauf nach Infektion mit *P.st* als bei Pflanzen ohne anfänglichen Befall. Teilweise traf dies auch auf die Kontrollpflanzen zu, so dass in den zugehörigen Zeitreihen die Induktion nicht in Bezug zu den Kontrollen gesetzt werden konnte. Darüber hinaus fiel auch das Maß der Immunisierung aufgrund der bereits ausgebildeten altersbedingten Resistenz (ARR) geringer aus als bei jüngeren, nicht blühenden Pflanzen. Ebenfalls schwierig war es, genügend Pflanzen im gleichen Entwicklungsstadium zur Verfügung zu haben, da selbst bei großen Ansätzen starke Variationen auftraten. So zeigte sich, dass, auch wenn alle Pflanzen gleich alt und zum gleichen Zeitpunkt pikiert worden waren, die Ausbildung eines Blütenstiels teilweise um mehrere Wochen variieren konnte. Deswegen mussten pro Experiment mehrere hundert Pflanzen angezogen werden.

4.2.3 Individuelle Phloem-LMPC-Mikroarrays

Der in den Zeitreihen-Experimenten zutage getretene individuelle Verlauf der Resistenzantwort machte es notwendig, die erneuten Phloem-LMPC-Proben für jede Wiederholung zu einem eigens festgelegten Zeitpunkt durchzuführen. Anhand der Ergebnisse der qPCR-Messungen in den Blütenstielen (siehe 8.2.1) wurden jeweils die Zeitpunkte gewählt, zu denen die meisten der Markergene ihre Expressionsmaxima aufwiesen. Für die Wiederholungen 01 und 03 ergab sich so der Zeitpunkt 42 hpi, für 02 und 04 dagegen 30 hpi. Des Weiteren wurde die OD_{600} der Inokula von vorher 0,2 auf 0,002 reduziert, um eine höhere Resistenzantwort zu erreichen (vgl. Abbildung 3-9), da

das Maß einer Antwort in blühenden Pflanzen durch die ARR bedingt per se niedriger als bei jüngeren Pflanzen ist. Mit diesen Proben wurden wiederum Mikroarrays hybridisiert. Hierbei sollten – im Vergleich zu den ersten Arrays – deutlichere Differenzen zwischen den einzelnen Behandlungen sichtbar werden.

Eine erste Auswertung der Expressionsmuster führte allerdings zu dem Bild, dass die Wiederholungen, aber auch die jeweiligen Erntezeitpunkte gruppierten (Abbildung 3-11). Aufgrund der verschiedenen Zeitpunkte der Probennahmen (30 hpi: 18 Uhr, 42 hpi: 6 Uhr) ließ sich dieses Ergebnis dadurch erklären, dass viele Gene in ihrer Expression einen Tagesgang aufweisen bzw. lichtabhängig reguliert werden, was natürlich auch auf den Mikroarrays zum Ausdruck kommen musste. Da die Anzahl der zeit- und lichtabhängigen Gene sehr wahrscheinlich deutlich über der der Pathogen-induzierten Gene lag, traten letztere bei der Auswertung zunächst in den Hintergrund. Unter bioinformatischer Einbeziehung dieser Tatsache wurde die Auswertung noch einmal erweitert und lieferte nun eine den ersten Mikroarrays ähnliche Gruppierung der mit virulenten *P.st* behandelten Proben gegenüber den Kontrollen und den mit avirulenten *P.st* behandelten Proben (Abbildung 3-12).

Hierbei zeigte sich die große Bedeutung der Bioinformatik für derartig komplexe Mikroarray-Analysen. Ohne die Anwendung modernster bioinformatischer Methoden wäre eine schlüssige Auswertung der Daten unmöglich.

Eine abschließende Analyse der Daten sowie die Validierung der Ergebnisse über qPCR stehen noch aus.

4.3 Die zentrale Rolle der Pappel-Holzstrahlen während der saisonalen Umsteuerung

Bäume zeigen im Gegensatz zu einjährigen krautigen Pflanzen Saisonalität. Diese ist an die klimatischen Jahreszeiten gekoppelt. Im Sommer, während des aktiven Wachstums, muss der ganze Baum mit Nährstoffen und Wasser versorgt werden, und die Photoassimilate werden von source-Geweben zu sink-Geweben transportiert, wobei die Blätter und die holzbildenden Bereiche den größten Bedarf haben. Darüber hinaus sind Bäume und insbesondere Pappeln während des Sommers vermehrt biotischen und abiotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Im Winter dagegen, während der Ruhephase, stehen die Speicherung von Reservestoffen sowie die Aufrechterhaltung der minimalen, für das Überleben notwendigen Prozesse im Vordergrund. In den Übergangsphasen zwischen diesen beiden physiologischen Extremen finden komplexe Prozesse statt, die die Umsteuerung zwischen aktivem Wachstum und Dormanz sowie vice versa koordinieren. Bei all diesen Prozessen nehmen die Holzstrahlen als radiale Transport- und Speicherschnittstelle eine zentrale und entscheidende Stellung ein.

Ziel dieses Teils der Arbeit war es, grundlegende, an der Kontrolle der Saisonalität beteiligte Mechanismen herauszuarbeiten. Dazu sollten Mikroarray-Analysen LMPC-angereicherter Strahlenproben zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, i. e. der aktiven Wachstumsphase im Sommer (Juli) und der späten Ruhephase (Februar), durchgeführt werden.

4.3.1 Bioinformatische Analyse der generierten Datensätze

Die Betrachtung zweier physiologisch so unterschiedlicher Entwicklungszustände lieferte erwartungsgemäß eine sehr hohe Zahl an differenziell exprimierten Genen. Vor dem Mapping waren etwa 7.000 Gene differenziell exprimiert, davon jeweils die Hälfte im Sommer bzw. in der späten Ruhephase induziert. Die Top 500-Liste ließ zwar einen ersten Überblick zu, für eine aussagekräftige Analyse war aber die alleinige Betrachtung dieser Liste, oder einzelner Gene nicht geeignet. Deshalb wurden die differentiell

regulierten Gene mit modernsten bioinformatischen Methoden und unter Zuhilfenahme verschiedener Datenbanken signifikant regulierten Stoffwechselwegen zugeordnet.

Im Sommer traten dabei genau die erwarteten Stoffwechselwege hervor, die mit der Pathogenabwehr, dem Photosynthese-abhängigen Zuckerstoffwechsel oder der für Bäume während der Wachstumsphase typischen Ligninbiosynthese in Zusammenhang standen. In der späten Ruhephase fielen Stoffwechselwege in Verbindung mit allgemeiner Genaktivität, Reproduktion und bemerkenswerterweise bereits der Blühinduktion auf. Obwohl morphologisch noch in der Ruhephase, zeigten diese erhöhten Aktivitäten, dass die Reaktivierung der gespeicherten Signal- und Nährstoffe, besonders im Hinblick auf die bevorstehende Pappelblüte (Anfang bis Mitte März), weit vor dem Blattaustrieb (Mitte bis Ende April) schon eingesetzt hatte. Zu dieser Zeit werden also bereits Speicherstoffe aus dem Holz, bei Pappel hauptsächlich aus den Strahlen, remobilisiert, Hormone oder deren Vorstufen freigesetzt, und entsprechende Signale über Strahlen und Phloem zu den Knospen transportiert.

Der Vergleich mit Daten eines anderen saisonalen Experiments (Ko *et al.*, 2011) lieferte nur partiell Übereinstimmungen. In dieser Arbeit wurden Astproben einjähriger *Populus trichocarpa*-Pflanzen transkriptionell und biochemisch auf saisonale Unterschiede untersucht. Die Größenordnung der als differenziell exprimiert identifizierten Gene korrelierte mit den Mikroarray-Daten der vorliegenden Arbeit (siehe 3.3.1), wobei Gene z. T. unterschiedlich reguliert waren. Dies lässt sich entweder durch den Zeitpunkt der Probennahme (12. Dezember vs. 12. Februar) oder aber die Tatsache begründen, dass in den Astproben bei Ko *et al.* auch die in den angereicherten Strahlenproben entfernten Bereiche, wie Rinde, Kambium, Differenzierungszone etc., enthalten waren, was sich durchaus in einer unterschiedlichen Physiologie und damit einer anderen Genexpression äußern kann. Ein detaillierterer Vergleich beider Datensätze wurde angestrebt. Die Gegenüberstellung von Mikroarray-Daten verschiedener Experimente ist allerdings wegen der zumeist unterschiedlichen Bedingungen bei der Durchführung und besonders bei der Hybridisierung der Mikroarrays stets problematisch. Hinzu kam, dass die Varianz der Daten von Ko *et al.* aufgrund der geringen Zahl der Wiederholungen ($n = 1-2$) sehr hoch war. Ein fundierter Vergleich der beiden Datensätze war somit ausgeschlossen.

4.3.2 Metabolitanalysen

Die Ergebnisse der Metabolitanalysen (siehe 3.3.5) korrelierten sehr gut mit denen der Mikroarray- und qPCR-Analysen. Eine Übersicht einiger passend zu den Metabolitgehalten regulierten Gene ist im Anhang zu finden (siehe 8.4).

Die Metabolitgehalte in der späten Ruhephase machten deutlich, dass zu diesem Zeitpunkt noch der Frostschutz im Winter im Vordergrund stand, zu erkennen am höheren Gehalt an Zuckeralkoholen. Passend dazu fand sich das Enzym *GolS2* induziert, das die Bildung von UDP-Galaktose katalysiert. Diese Induktion von *GolS2* liefert auch eine Erklärung für die erhöhte myo-Inositol-Konzentration im Sommer, da dieser Zucker im Winter für die Galaktinolsynthese benötigt wurde.

Darüber hinaus wurden während der späten Ruhephase zur Energiegewinnung verstärkt Speicherlipide abgebaut, was zu einem Anstieg des Glyceringehaltes sowie der Freisetzung von Fettsäuren führte. Der Abbau dieser Fettsäuren steht im Zusammenhang mit dem Glyoxylatzyklus, der seinerseits an der Bildung von Glukose beteiligt ist und somit wichtig für anaplerotische Funktionen ist. Von 97 am Fettsäuremetabolismus beteiligten Genen, die auf den Mikroarrays detektiert werden konnten, blieben 59 nicht reguliert und weiter 14 waren im Sommer induziert. Unter den 20 in der späten Ruhephase induzierten Genen fanden sich u. a. zwei Isocitratlyasen, was für die hohe Aktivität des Glyoxylatzyklus während dieser Jahresphase spricht.

Im Sommer war im Vergleich zur späten Ruhephase ein deutlicher Anstieg der Aminosäuregehalte, insbesondere von Glutamin, zu beobachten. Ebenso waren die Transkripte der für die Stickstoffassimilation notwendigen Enzyme Nitratreduktase, Nitritreduktase und Glutaminsynthetase im Sommer induziert. Dies deutet darauf hin, dass die Stickstofffixierung während der späten Ruhephase noch nicht wieder angeschaltet ist, was die Hypothese stützt, dass der gesamte Stickstoffbedarf für die Entwicklung reproduktiver Organe, Knospen und Blätter eher über die gespeicherten Stickstoffvorräte gedeckt wird als über die Gewinnung von neuem Stickstoff über die Wurzeln (Rennenberg *et al.*, 2010).

4.3.3 Markergene im Jahresgang

Die Mikroarray-Daten basierten auf zwei Zeitpunkten. Für einen vollständigen Überblick über die Abläufe der Prozesse während der jahreszeitlichen Umsteuerung waren diese allerdings nicht ausreichend. Deshalb wurden die Transkriptmengen ausgewählter Markergene in Jahresgängen von entrindeten Holzproben (Wildhagen *et al.*, 2010) mittels qPCR verfolgt. Hierbei wurden Gene ausgewählt, die auf den Mikroarrays deutlich differentiell reguliert waren und gleichzeitig als typisch für die jeweilige Jahreszeit bzw. den jeweils induzierten Stoffwechselweg erachtet wurden. Als Markergene wurden bzgl. der Ligninbiosynthese PtPAL1, PtCAD1 und PtMYB58, bzgl. der Blühinduktion PtLFY, PtFT, PtTLF2, bzgl. der Stickstofffixierung PtNIA1 und PtNIR1 sowie bzgl. des Kaliumtransports PTORK ausgewählt (Übersicht in Tabelle 3-2). In den Messungen zeigten sich saisonale Schwankungen, die gut mit den Mikroarray-Daten übereinstimmten, z. T. aber einer komplexen zeitlichen Koordination unterlagen (siehe Abbildung 3-19).

a) Ligninbiosynthese

Von den zwei analysierten Genen des Ligninbiosynthesewegs (siehe 1.3.4 b) zeigte nur das initiale Enzym PtPAL1 einen jahreszeitlichen Verlauf. Bereits während der Frühholzbildung stieg die Expression ab März/April deutlich an, erreichte ihr Maximum allerdings erst im Spätsommer zur Zeit der Spätholzbildung. Dies deutete darauf hin, dass während dieser Zeit die finale Lignifizierung zum Schutz des Holzes in der Ruhephase stattfindet, während dies im Frühholz noch in geringerem Umfang geschieht.

Das in den Mikroarrays vierfach induzierte letzte Enzym der Monolignolsynthese, PtCAD1, schwankte über den Jahresverlauf um einen Mittelwert ohne signifikante Maxima. Der erhöhte Wert in den Arrays der Sommerproben war deshalb eher auf eine dieser Schwankungen zurückzuführen. Diese Beobachtungen legten die Hypothese nahe, dass die Ligninbiosynthese über den Eingang in den Syntheseweg reguliert wird und nicht über deren Ausgang.

Ein weiterer Hinweis für die Lignifizierung während der aktiven Wachstumsphase zeigte sich in der KEGG-Analyse, in der die Phenylalanin-, Tyrosin- und Tryptophanbiosynthese

im Sommer induziert erschienen (Abbildung 3-16). Dies steht mit der Ligninbildung in Verbindung, weil Phenylalanin das Ausgangsprodukt für die Synthese der Ligninmonomere, Coumaryl-, Coniferyl- und Sinapylalkohol, ist (Boerjan *et al.*, 2003).

Obwohl von *Arabidopsis* bekannt ist, dass u. a. AtMYB58 an der Regulation der Ligninbiosynthese beteiligt ist (Zhou *et al.*, 2009), zeigte PtMYB58 einen ausgeprägten Anstieg im frühen Winter bis in den Januar. Wahrscheinlich ist, dass MYB58 in Pappel eine andere Funktion als in *Arabidopsis* hat. In der Tat konnte an *Populus trichocarpa* für PtrMYB3 und PtrMYB20, beides funktionale Orthologe der *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren AtMYB46 und AtMYB83 (und nicht AtMYB58), eine Beteiligung an der Bildung der sekundären Zellwand, d. h. an den Biosynthesewegen von Cellulose, Xylan und Lignin, gezeigt werden (McCarthy *et al.*, 2010). Studien an transgenen Pappeln, die ein *PttMYB21a*-antisense-Konstrukt trugen, deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor PttMYB21a, der die größte Übereinstimmung zu AtMYB52 zeigt, als Repressor der Caffeoyl-Coenzym A-O-Methyltransferase (CCoAOMT) fungieren könnte (Karpinska *et al.*, 2004). Tabelle 1 in der Arbeit von Zhao *et al.* (2011) listet einige der an der Regulation der Ligninbiosynthese beteiligten MYB-Transkriptionsfaktoren verschiedener Spezies auf. Von diesen MYB-Proteinen wird vermutet, dass sie die Expression von Genen des Phenylpropanoidwegs induzieren, indem sie an AC *cis*-Elemente der Promotoren binden (Zhong and Ye, 2007).

Entgegen dem in der qPCR gemessenen Expressionsverlauf fand sich das zu PtMYB58 gehörige Probe Set auf den Mikroarrays im Sommer induziert und während der späten Ruhephase nicht exprimiert (viermal einen „absent call“). Somit widersprechen sich in diesem Fall die Ergebnisse der qPCR- und Mikroarray-Analysen.

b) Stickstoffassimilation

Anders als in den meisten Waldbäumen findet die Stickstoffassimilation in Pappeln nicht nur in den Wurzeln, sondern auch in den Blättern statt, wobei die Regulation des Assimilationsverhältnisses von Blatt zu Wurzel verschiedenen Umweltfaktoren unterliegt, z. B. photoperiodisch gesteuert wird (Black *et al.*, 2002; Gessler *et al.*, 2004). Darüber hinaus ist offenbar sogar im Holz die Enzymausstattung für die Stickstoffassimilation vorhanden, da die Transkripte der daran beteiligten Enzyme NIA1 und NIR1 in den

angereicherten Strahlen detektiert werden konnten. Ihre Expression stieg ab dem Austrieb und dann besonders im Spätsommer stark an.

Anfangs wurde vermutet, dass sowohl NIA1 als auch NIR1 an der Synthese von Bark Storage Proteinen (BSPs) beteiligt seien. Diese Hypothese ist allerdings unwahrscheinlich, da NIA1 und NIR1 ihre Expressionsmaxima im späten August aufwiesen, BSP1 und BSP2 dagegen, gemessen in denselben Holzproben, im November (Wildhagen *et al.*, 2010).

Der Expressionsverlauf von NIA1 und NIR1 spricht allerdings dafür, dass während der Spätholzbildung der allgemeine Stickstoffverbrauch im Holz aufgrund des hohen Bedarfs an Aminosäuren, sowohl für die Zellteilung als auch die Sekundärwandbildung und Lignifizierung, stark erhöht ist und über eine lokale Assimilation gedeckt wird.

c) Blühinduktion

Im Gegensatz zur Pappel ist die Blühinduktion für *Arabidopsis* bereits sehr gut beschrieben. Allerdings ist auch für die Pappel bekannt, dass sowohl der Flowering Locus T (FT), als auch sein Antagonist Terminal Flower 2 (TFL2) eine zentrale Rolle während der Blühinduktion spielen (Brunner and Nilsson, 2004; Böhlenius *et al.*, 2006). Die Transkripte beider Gene erschienen auf den Mikroarrays in der späten Ruhephase induziert, FT dabei in deutlich höherem Maße (hundertfach) als TFL2 (dreifach). Dieses Ergebnis spiegelte sich auch in den Jahresgängen wider. Während die Expression von FT zu Beginn der Dormanz stark anstieg, um dann nach Erreichen des Maximums zum Blühbeginn deutlich vor dem Aufbrechen der Blattknospen schlagartig zurückzugehen, zeigte TFL2 nur einen marginalen Expressionsanstieg während der Wintermonate. Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass das FT-Protein, zumindest in *Arabidopsis*, eine zentrale Rolle bei der Blühinduktion einnimmt und eine wichtige Komponente des lange gesuchten „Florigens“ darstellt, also dem systemischen Signal, das über das Phloem zum apikalen Sprossmeristem transportiert wird, wo es die Umschaltung von Blatt- zu Blütenbildung induziert (Turck *et al.*, 2008).

Am Ende der Signalkaskade steht LFY (siehe Abbildung 1-9). LFY-Transkripte waren weder auf den Mikroarrays detektierbar, noch über den ganzen Jahresverlauf (nicht gezeigt). Daher ist zu vermuten, dass dieses Gen nicht in den Holzstrahlen exprimiert

wird. Für *Arabidopsis* konnte eine LFY-Expression in meristematischen Geweben gezeigt werden (Sessions *et al.*, 2000). Auch Studien an Pappel lokalisierten PtLFY-Transkripte hauptsächlich in floralen Meristemen und sich entwickelnden Blüten von männlichen und weiblichen Pflanzen (Rottmann *et al.*, 2000). An und Mitarbeiter fanden PtLFY in männlichen und weiblichen Knospen von September bis Februar durchgehend stabil exprimiert (An *et al.*, 2011), was in etwa dem Zeitraum entspricht, in dem in den qPCR-Analysen in der vorliegenden Arbeit FT induziert war.

Zusammengenommen führen diese Ergebnisse zu folgendem Bild: Das Signal zur Blütenbildung wird, ausgelöst durch hormonelle Reize sowie Tageslänge und Temperatur (Chae *et al.*, 2008), vom Ort der Perzeption vermittelt von FT über das Phloem und die Strahlen an die meristematischen Zellen weitergeleitet, wo LFY als eine Art „developmental switch“ ausreicht, um in lateralen Sprossmeristemen von Pappel die Blütenbildung auszulösen (Weigel and Nilsson, 1995).

d) Kaliumtransport

Während des Übergangs vom aktiven Wachstum zur Dormanz kommt es über die Strahlen zu massiven Umlagerungen von Nährstoffen aus den Blättern in das Holz, der gegengerichtete Transport findet während der Reaktivierung des Wachstums im Frühjahr statt (Langer *et al.*, 2002; Arend *et al.*, 2005).

Der in den Kontaktzellen der Holzstrahlen – das sind die Strahlencellen, die direkt an eine Trachee grenzen – exprimierte auswärtsgerichtete Kaliumkanal PTORK zeigte in den Jahresgängen den bereits bekannten Verlauf mit einer kaum vorhandenen Expression im Winter und einem deutlichen Anstieg zu Beginn der aktiven Wachstumsphase (Langer, 2003). Aufgrund der hohen Anzahl an Zeitpunkten konnte der Verlauf in der vorliegenden Arbeit allerdings erheblich besser aufgelöst werden, wodurch ein nochmaliger extremer Anstieg im Herbst vor Einsetzen der Blattseneszenz sichtbar wurde. Dieses Ergebnis untermauerte die ursprüngliche Hypothese, dass PTORK im Herbst für den Transport von Kalium aus den Blättern über die Strahlen in das Holz verantwortlich ist, wo es bis zum Frühjahr gespeichert wird. Bei Arend *et al.* (2005) wurde PTORK neben der polaren Lokalisation in den Kontaktzellen (in Richtung der Gefäße) auch in sich differenzierenden Tracheiden gefunden. Es wurde angenommen,

dass der Kanal demnach auch eine wichtige Rolle bei der Differenzierung und dem Zelltod der Tracheiden spielt. Im Jahresgang zeigte PTORK ein fast identisches Expressionsmuster wie PAL. Man könnte also vermuten, dass sowohl Kaliumrückgewinnung aus dem Blättern als auch der Abschluss der Holzbildung mit finaler sekundärer Zellwandbildung, Lignifizierung und Absterben der Tracheiden wichtige Prozesse bei der Umsteuerung in Richtung Dormanz darstellen.

Umgekehrt spielt PTORK vermutlich bei der Wiederaufnahme des aktiven Wachstums im Frühjahr eine Rolle, indem er Kalium aus den Strahlen in Richtung des Kambiums transportiert, wo es zum Turgoraufbau und dem dadurch ermöglichten Streckungswachstum benötigt wird. Insgesamt sind Kaliumionen (K^+) an vielen Aspekten der Xylognese beteiligt (Ache *et al.*, 2010), z. B. an der Differenzierung des Xylems (Wind *et al.*, 2004). So konnte gezeigt werden, dass in Ästen und Stamm sowie Knospen von Pappel starke saisonale Schwankungen der kambialen K^+ -Konzentration auftreten (Arend *et al.*, 2002; Langer *et al.*, 2004).

4.3.4 Modell der saisonalen Abläufe

Die Daten der qPCR-Analysen zeigten für die meisten der Markergene deutliche saisonale Verläufe, deren Extrema einer detaillierten Koordination zu unterliegen schienen. PtNIA1 und PtNIR1 erreichten ihr Maximum identisch in der zweiten Augushälfte. Die Speicherung von Kalium und Entwicklung der Tracheiden, angezeigt durch die Expression von PTORK (Arend *et al.*, 2005), trat zusammen mit der erhöhten Ligninbildung, der PtPAL1-Expression entsprechend, während der Spätholzbildung ab Mitte September auf. Auch die Blühinduktion (PtFT) zeigte einen stark koordinierten Verlauf.

Unter Einbeziehung dieser und bereits publizierter Daten lässt sich ein erstes Modell saisonaler Umsteuerungsprozesse postulieren (Abbildung 4-1).

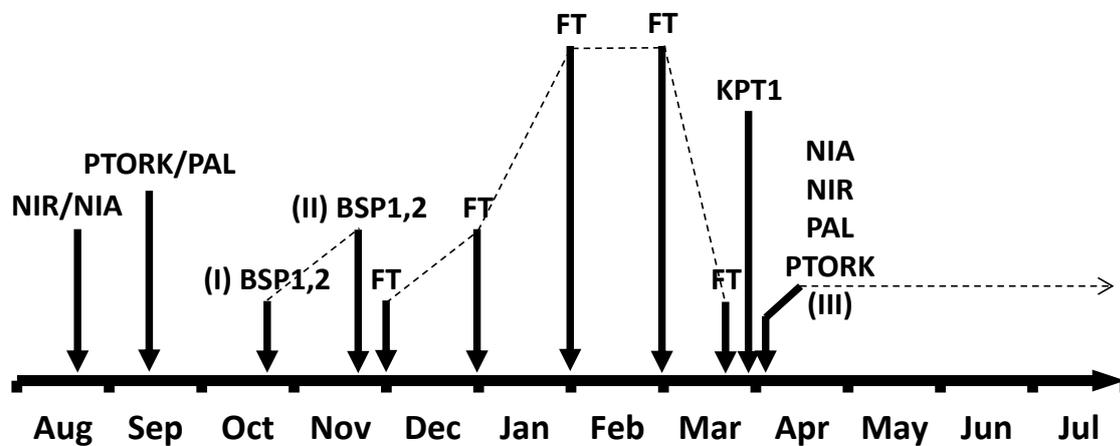


Abbildung 4-1: Zeittafel saisonaler Transkriptlevel. Die Pfeile kennzeichnen starke transiente Induktion, gestrichelte Linien Expressionsmuster über einen Zeitraum. (I) erste sichtbare Zeichen der Blattseneszenz, (II) Abschluss des Blattabwurfs, (III) Aufbrechen der (Blatt-)Knospen.

Im Zeitraum der Spätholzbildung findet vermehrt die Aufnahme von Stickstoff statt (NIA/NIR). Dies deutet darauf hin, dass besonders in dieser Jahreszeit Stoffwechselprozesse versorgt werden müssen, darunter der Abschluss der Holzdifferenzierung und die beginnende Speicherung von Nähr- und Reservestoffen. Als weitere Vorbereitung auf die Dormanz kommt es zur Lignifizierung des ausdifferenzierten Holzes (PAL) sowie der Einlagerung von Kalium aus den Blättern über die Strahlen in das Holz (PTORK) (Arend *et al.*, 2002; Langer *et al.*, 2004). Diese Vorgänge finden von Mitte September bis Mitte Oktober statt. Direkt danach setzt die Seneszenz ein (I), die im Abwurf der Blätter resultiert (II). Genau in diesem Zeitraum erreichen die Transkriptlevel von BSP1 und 2 ihre Maxima (Wildhagen *et al.*, 2010). Ende November beginnt dann die eigentliche Dormanz. Ab diesem Zeitpunkt steigt die FT-Expression an und erreicht ihr Maximum Anfang Februar. Die Expression bleibt bis nach der Blüte Anfang März hoch, um dann kurz vor der Blattknospenöffnung (III) steil abzufallen. Genau zu diesem Zeitpunkt wiederum steigt die Expression des Kaliumaufnahme Kanals KPT1 in den Knospen stark an, was als Ausdruck des initialen Streckungswachstums vor Beginn der Knospenöffnung gedeutet wurde (Langer *et al.*, 2004). Damit beginnt wieder die aktive Wachstumsphase, in der Proteine wie NIA, NIR, PAL und PTORK ebenfalls eine Rolle spielen. Die scharfen Expressionsmaxima der verschiedenen untersuchten

Transkripte weisen aber deutlich auf stark koordinierte Prozesse während der Umsteuerungsphasen zwischen Blüte, aktivem Wachstum und Ruheperiode hin.

Anhand der Zeittafel lässt sich aber auch ablesen, wie verlässlich die Mikroarray-Datenbank die saisonalen Unterschiede in den Holzstrahlen widerspiegelt. Insbesondere der Übergang von der Dormanz in die aktive Wachstumsphase im Frühjahr kann über die Expressions- und Metabolitmuster aussagekräftig analysiert werden.

Mit Hilfe dieser Datensätze sollte es nun möglich sein, die komplexen Stoffwechselwegmuster spezifischen Ereignissen während der saisonalen Restrukturierung zuzuordnen.

Ein großer Teil der Daten zur Saisonalität der Holzstrahlen wurde in dem zur Publikation eingereichten Manuskript zusammengefasst. Mit einigen Anpassungen entsprechen dabei die Abbildungen 1-7, 3-14, 3-16, 3-18, 3-19 und 4-1 den Figures im Text des Manuskripts, sowie die Abbildungen 3-15 und 3-17, die Tortendiagramme unter 8.3 und die Tabelle unter 8.4 der Supplemental Data dazu.

Die Daten der Pappel-Mikroarrays sind im Gene Expression Omnibus (GEO) von NCBI (Edgar *et al.*, 2002) hinterlegt und sind über die „GEO Series accession number“ GSE33977 zugänglich (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE33977>). Die Daten werden nach Veröffentlichung der Publikation freigeschaltet.

4.4 Methodisches Fazit

Die vielseitige und leistungsstarke Methode der Laser Mikrodisektion ist, abhängig von Fragestellung und Probenmaterial, besser als andere Verfahren dazu geeignet, schwer zugängliche Zellen zu analysieren. Allerdings lieferten Publikationen zur Transkriptomanalyse mittels der LMD bisher nur bedingt zufriedenstellende Resultate. Während bei monokotylen Pflanzen mit ihren meist großlumigen Zellen z. T. Erfolge erzielt wurden (Asano *et al.*, 2002; Nakazono *et al.*, 2003), konnten insbesondere bei der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* die Daten wegen zu geringer RNA-Ausbeuten und schwieriger Präparationsbedingungen eher nicht überzeugen. Viele Amplifikationsmethoden erzeugen systematische Fehler, deren Häufigkeit mit abnehmender RNA-Konzentration ansteigt (Stirewalt *et al.*, 2004). Bei der Amplifikation von RNA-Kleinstmengen besteht das Problem, dass sich die Verteilung der Transkripte durch die präferierte Vervielfältigung kleinerer oder häufigerer Moleküle verschiebt oder es zu starker Fragmentierung kommt, was beides zu unzuverlässigen qPCR- und Mikroarray-Ergebnissen führt. Diese Beobachtung wurde oftmals bestätigt (Casson *et al.*, 2005), und in Folge dessen wurde sogar ein Set an LCM-Mikroarray-Daten zur Embryogenese wieder aus der GENEVESTIGATOR Datenbank entfernt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen nun an den Beispielen von *Arabidopsis* und Pappel, dass die Laser Mikrodisektion an Pflanzenmaterial reproduzierbar angewendet werden kann – und das ohne die Notwendigkeit einer Voramplifikation.

Wie die hier beschriebenen Experimente deutlich machen, erfordert die Laser Mikrodisektion an verschiedenen Pflanzen oder auch unterschiedlichen Geweben spezifische methodische Anpassungen. Nach entsprechender Optimierung der hier vorgestellten Protokolle sollte es allerdings grundsätzlich möglich sein, die Methode für Untersuchungen der meisten Pflanzen und Gewebe einzusetzen. Als limitierend erweisen sich dabei derzeit aber noch Analysen von Einzelzellen oder einzelligen Geweben, wie z. B. Endodermis oder Bündelscheidenzellen. Dies liegt hauptsächlich darin begründet, dass bei Pflanzen – im Gegensatz zu tierischen Zellen und Zellkulturen, an denen die Laser Mikrodisektion gut etabliert ist – der Zellverband einerseits durch die Zellwände erheblich fester ist als in tierischen Geweben. Andererseits kann sich

innerhalb pflanzlicher Gewebe die Materialhärte sogar von Zelltyp zu Zelltyp drastisch ändern. Durch diese speziellen Eigenarten lassen sich pflanzliche Zellen sowohl am Mikrotom als auch mit dem Laser viel schwerer schneiden und kontaminationsfrei isolieren.

Dieses Problem könnte eventuell durch die Etablierung anderer Einbettmethoden umgangen werden, die ohne Paraffin auskommen und es ggf. ermöglichen, Einzelzellbereiche sauber aufzulösen und so der Präparation zugänglich zu machen. Allerdings ist z. B. die Kryoeinbettung für pflanzliche Gewebe nur bedingt geeignet, da die großen Vakuolen während des Gefrier-Auftau-Prozesses nur schwer stabilisiert werden können, und eine Zerstörung der Vakuolen zu erheblichen Einbußen in der Gewebemorphologie führt (Inada and Wildermuth, 2005). Die Morphologie muss allerdings besonders gut konserviert werden, da für die Laser Mikrodisektion keine Deckgläschen verwendet werden können, was das Erkennen von Gewebestrukturen zusätzlich erschwert (Kehr, 2003). Alle Mikrodisektionsmethoden haben durch die Notwendigkeit der physischen Zugänglichkeit der Gewebeoberfläche das Problem der suboptimalen mikroskopischen Visualisierung (Pinzani *et al.*, 2006). Dem kann entgegengewirkt werden, indem mit einem optischen Diffusor gearbeitet wird oder die Schnitte mit Xylen, Ethanol bzw. Liquid CoverGlass (siehe 2.1.2 d) überschichtet werden (Micke *et al.*, 2004). Abgewandelte Kryo-Protokolle wurden zwar bereits erfolgreich an Reis (Asano *et al.*, 2002) und Mais (Nakazono *et al.*, 2003) angewendet. Letztere verwendeten Saccharose als Gefrierschutz zur Minderung der Eiskristallbildung und somit verbesserten Konservierung der Morphologie. Diese Protokolle müssten aber für andere Organismen und Gewebe wie *Arabidopsis*-Blätter, bei denen die klassische Kryoeinbettung nicht zufriedenstellend funktioniert hat, erst noch getestet werden (Inada and Wildermuth, 2005).

Darüber hinaus sind auch die Methoden der linearen RNA-Amplifikation noch immer nicht ausreichend fortgeschritten, um kleinste RNA-Mengen, wie sie bei Einzelzellpräparationen anfallen, für z. B. genomweite Transkriptomanalysen aufzubereiten. Um einzelne Bereiche aus der genomischen DNA über PCR zu amplifizieren, wird z. T. nur eine Zelle benötigt. So konnte aus einem einzelnen mikrodisektierten Chloroplast die Spacer-Region zwischen den *trnT*- und *trnF*-Genen

von *Nicotiana tabacum* vervielfältigt werden (Meimberg *et al.*, 2003). Für globale Analysen auf transkriptioneller Ebene werden allerdings immer noch größere Materialmengen benötigt. Die RNA-Menge, die aus via LMPC isolierten Zellen gewonnen werden kann, ist proportional zur Zahl der gesammelten Zellen und gleichzeitig abhängig von der Gewebequelle und dem zu analysierenden Zelltyp (Kerk *et al.*, 2003). Für Studien an verschiedenen Stadien von *A.th*-Embryonen waren z. B. 100-200 Zellen für RNA-Extraktion, Amplifikation und Hybridisierung von Mikroarrays ausreichend (Spencer *et al.*, 2007). Es sollte daher eher möglich sein, Einzelzellen aus jüngeren, sich noch entwickelnden Pflanzenteilen (z. B. Hypokotyl, Wurzel) zu untersuchen, in denen auf transkriptioneller Ebene mehr Prozesse ablaufen als in älteren, vollständig ausdifferenzierten Zellen, und somit die Zahl der vorhandenen Transkripte insgesamt höher ist. Unabhängig von der gewählten Amplifikations-Strategie ist der kritische Schritt stets die Reverse Transkription, während der bereits eine erste Verzerrung der ursprünglichen mRNA-Population auftreten kann, sei es durch die fehlende „proofreading“-Aktivität, die Bildung höherer RNA-Strukturen, Präferenzierung von Sequenzen oder interne oligo(A)-Abschnitte (Kenzelmann *et al.*, 2004). Aber nur wenn RNA-Isolation und -Amplifikation optimale Resultate liefern, können transkriptionelle Studien durchgeführt werden, denn die Qualität der eingesetzten RNA ist das Hauptkriterium für die Aussagekraft und die Reproduzierbarkeit nachfolgender Analysen, wie z. B. der qPCR (Bustin and Nolan, 2004). Darüber hinaus ist es entscheidend, dass für Vergleiche der Expressionsmuster alle Proben gleich amplifiziert wurden (Day *et al.*, 2007).

Mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ansätzen konnte die Laser Mikrodisektion an Pflanzen einen großen Schritt weitergebracht werden. Reproduzierbare Transkriptomanalysen der Präparate sind nun möglich. Neben der Weiterentwicklung dieser Methodik wird die Zukunft zeigen müssen, ob weitere Anwendungsbereiche für die Laser Mikrodisektion an Pflanzen erschlossen werden können. Hierzu gibt es bereits erste Ansätze, die sich mit der Laser Mikrodisektions-gestützten Analyse von Monosacchariden (Angeles *et al.*, 2006), Proteinen (Schad *et al.*, 2005a) oder Metaboliten (Schad *et al.*, 2005b; Li *et al.*, 2007) beschäftigen. Es ist also noch viel Potenzial für die Pflanzenforschung in der Methode enthalten.

5. Zusammenfassung

Die Laser Mikrodissektion konnte in der vorliegenden Arbeit als geeignetes Tool für Expressionsanalysen pflanzlicher Gewebe weiterentwickelt werden. Nach einer umfangreichen Optimierung der Technik und Anpassung an die jeweiligen Gegebenheiten der zu analysierenden pflanzlichen Gewebe konnten unterschiedliche physiologische Fragestellungen an verschiedenen Pflanzen bearbeitet werden.

Methodische Fortschritte

Bei den Arbeiten an infiltrierten *Arabidopsis*-Pflanzen zeigten sich die methodischen Verbesserungen besonders deutlich:

- i. Die Zeit der Probengenerierung konnte um 60-80 % reduziert werden, wobei gleichzeitig die Qualität und Quantität der isolierten RNA erheblich verbessert wurden.
- ii. Dadurch konnte auf die in Deeken *et al.* (2008) beschriebene Voramplifikation, die stets zum Verlust niedrig exprimierter Gene führt, verzichtet und eine deutlich größere Zahl an im Phloem exprimierten Genen identifiziert werden.
- iii. Dass dabei 95 % der bei Deeken *et al.* beschriebenen Phloem-Gene wiedergefunden wurden, zeigt die hohe Reproduzierbarkeit der LMPC-Technik, die durch die Optimierung erreicht werden konnte.

Pathogenantwort im *Arabidopsis*-Phloem

- iv. Die Laser Mikrodissektion konnte entsprechend i-iii eingesetzt werden, um Phloem-Proben von *Arabidopsis*-Blütenstielen nach Pathogenbefall zu sammeln.
- v. Bei der Suche nach entsprechenden Phloem-mobilen Signalen, die in systemischen Geweben zur Auslösung der SAR führen, zeigte sich, dass im Phloem der *Arabidopsis*-Blütenstiele v. a. der Jasmonsäureweg angeschaltet wird. SAR-Marker fanden sich kaum induziert.

- vi. Im Vergleich der Mikroarray- und qPCR-Ergebnisse wird deutlich, dass mittels LMPC die Vorgänge im Phloem deutlich besser aufgelöst werden können, da die Untersuchungen an kompletten Blütenstielen deutliche Abweichungen gegenüber den Phloem-Arrays aufwiesen.

Die Analysen der Mikroarrays sowie die zugehörigen Zeitreihenexperimente sind noch nicht abgeschlossen.

Pappel-Holzstrahlen als Schaltstelle der saisonalen Umsteuerung

- vii. Die Laser Mikrodisektion kann alternativ auch in einem inversen Ansatz angewendet werden.
- viii. Über auf diese Weise angereicherte Holzstrahlen der Pappel war es möglich, tiefgreifende Einblicke in die Saisonalität der Pappel zu erlangen.
- ix. Zusammen mit Metabolit- und qPCR-Analysen lieferten diese Ergebnisse einen zeitlichen Ablaufplan der zugrundeliegenden physiologischen Prozesse, insbesondere bei der Umsteuerung von der Dormanz zur Wiederaufnahme des aktiven Wachstums im Frühjahr.

6. Summary

In this dissertation, the Laser Microdissection could be further improved for usage as an adequate tool for expression analyses of plant tissues. Following a large optimization of the technique itself and an adaptation to the conditions of the plant tissues to be analyzed, different physiological questions could be processed using distinct plant species.

Methodic improvements

Especially while working with infiltrated *Arabidopsis* plants the methodic improvements were visible:

- i. The time for sample-generation could be decreased by 60-80 %, at the same time quality and quantity of the isolated RNA could be significantly enhanced.
- ii. By this the in Deeken *et al.* (2008) described pre-amplification step, which always leads to loss of low expressed genes, could be omitted, and a considerable higher number of phloem-expressed genes could be identified.
- iii. Finding 95 % of the in Deeken *et al.* specified genes in the new list demonstrates the high reproducibility of the LMPC-technique which could be achieved by the optimization.

Pathogen response in the *Arabidopsis* phloem

- iv. The Laser Microdissection could be used accordingly to i-iii to collect phloem-samples of *Arabidopsis* inflorescence stalks after a pathogen infection.
- v. By searching for corresponding phloem-mobile signals that lead to an induction of SAR in systemic tissues it appeared that predominantly the jasmonic acid pathway activated in the phloem of *Arabidopsis* inflorescence stalks. SAR-marker genes were hardly induced.
- vi. Comparison of the microarray- and qPCR-data revealed that LMPC shows the processes in the phloem more specific, because analyses of complete inflorescence stalks showed explicit differences to the phloem-microarrays.

Analyses of the microarrays as well as the corresponding time course experiments are not yet completed.

Poplar wood rays as switch point of seasonal remodeling

- vii. Alternatively, the Laser Microdissection can be used in an inverted approach.
- viii. By this approach enriched poplar wood rays allowed deep insight into seasonality of poplar.
- ix. Together with metabolite- and qPCR-analyses these results provided a timetable of underlying physiological processes, especially during the remodeling from dormancy to resumption of active growth in spring.

7. Literaturverzeichnis

- Ache, P., Fromm, J., Hedrich, R.** (2010). Potassium-dependent Wood Formation in Poplar: seasonal Aspects and environmental Limitations. *Plant Biology* **12**[2], 259-267
- Allona, I., Quinn, M., Shoop, E., Swope, K., Cyr, S. S., Carlis, J., Riedl, J., Retzel, E., Campbell, M. M., Sederoff, R., Whetten, R. W.** (1998). Analysis of Xylem Formation in Pine by cDNA Sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**[16], 9693-9698
- An, X.-M., Wang, D.-M., Wang, Z.-L., Li, B., Bo, W.-H., Cao, G.-L., Zhang, Z.-Y.** (2011). Isolation of a *LEAFY* homolog from *Populus tomentosa*: Expression of *PtLFY* in *P. tomentosa* floral Buds and *PtLFY*-IR-mediated Gene Silencing in Tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Plant Cell Reports* **30**[1], 89-100
- Angeles, G., Berrio-Sierra, J., Joseleau, J. P., Lorimier, P., Lefebvre, A., Ruel, K.** (2006). Preparative Laser Capture Microdissection and single-Pot Cell Wall Material Preparation: a novel Method for Tissue-specific Analysis. *Planta* **224**[1], 228-232
- Arend, M., Weisenseel, M. H., Brummer, M., Osswald, W., Fromm, J. H.** (2002). Seasonal Changes of Plasma Membrane H⁺-ATPase and endogenous Ion Current during cambial Growth in Poplar Plants. *Plant Physiology* **129**[4], 1651-1663
- Arend, M., Stinzinger, A., Wind, C., Langer, K., Latz, A., Ache, P., Fromm, J., Hedrich, R.** (2005). Polar-localised Poplar K⁺ Channel capable of Controlling electrical Properties of Wood-forming Cells. *Planta* **223**[1], 140-148
- Asano, T., Masumura, T., Kusano, H., Kikuchi, S., Kurita, A., Shimada, H., Kadowaki, K.** (2002). Construction of a specialized cDNA Library from Plant Cells isolated by Laser Capture Microdissection: toward comprehensive Analysis of the Genes expressed in the Rice Phloem. *The Plant Journal* **32**[3], 401-408
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., Davis, A. P., Dolinski, K., Dwight, S. S., Eppig, J. T., Harris, M. A., Hill, D. P., Issel-Tarver, L., Kasarskis, A., Lewis, S., Matese, J. C., Richardson, J. E., Ringwald, M., Rubin, G. M., Sherlock, G.** (2000). Gene Ontology: Tool for the Unification of Biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature Genetics* **25**[1], 25-29
- Attaran, E., Zeier, T. E., Griebel, T., Zeier, J.** (2009). Methyl Salicylate Production and Jasmonate Signaling are not essential for Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**[3], 954-971
- Ausubel, F. M.** (2005). Are innate immune Signaling Pathways in Plants and Animals conserved? *Nature Immunology* **6**[10], 973-979

- Axtell, M. J., Staskawicz, B. J.** (2003). Initiation of *RPS2*-specified Disease Resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed Elimination of RIN4. *Cell* **112**[3], 369-377
- Bari, R., Jones, J.** (2009). Role of Plant Hormones in Plant Defence Responses. *Plant Molecular Biology* **69**[4], 473-488
- Berger, J.** (2008). Advances in Chronohaematology. *Journal of Applied Biomedicine* **6**[2], 65-72
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., King, J.** (2009a). Gene Expression Profiling and Silencing reveal that Monolignol Biosynthesis plays a critical Role in Penetration Defence in Wheat against Powdery Mildew Invasion. *Journal of Experimental Botany* **60**[2], 509-521
- Bhuiyan, N. H., Selvaraj, G., Wei, Y., King, J.** (2009b). Role of Lignification in Plant Defense. *Plant Signaling & Behavior* **4**[2], 158-159
- Biesgen, C., Weiler, E. W.** (1999). Structure and Regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related Genes encoding 12-Oxophytodienoic Acid-10,11-Reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **208**[2], 155-165
- Bishop, G. J., Koncz, C.** (2002). Brassinosteroids and Plant Steroid Hormone Signaling. *The Plant Cell* **14 Suppl**, S97-S110
- Black, B. L., Fuchigami, L. H., Coleman, G. D.** (2002). Partitioning of Nitrate Assimilation among Leaves, Stems and Roots of Poplar. *Tree Physiology* **22**[10], 717-724
- Blechert, S., Bockelmann, C., Füßlein, M., v. Schrader, T., Stelmach, B., Niesel, U., Weiler, E. W.** (1999). Structure-Activity Analyses reveal the Existence of two separate Groups of active Octadecanoids in Elicitation of the Tendril-Coiling Response of *Bryonia dioica* Jacq. *Planta* **207**[3], 470-479
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M.** (2003). Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology* **54**[1], 519-546
- Böhlenius, H., Huang, T., Charbonnel-Campaa, L., Brunner, A. M., Jansson, S., Strauss, S. H., Nilsson, O.** (2006). CO/FT Regulatory Module controls Timing of Flowering and seasonal Growth Cessation in Trees. *Science* **312**[5776], 1040-1043
- Bonas, U., Lahaye, T.** (2002). Plant Disease Resistance triggered by Pathogen-derived Molecules: refined Models of specific Recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**[1], 44-50
- Bonawitz, N. D., Chapple, C.** (2010). The Genetics of Lignin Biosynthesis: Connecting Genotype to Phenotype. *Annual Review of Genetics* **44**[1], 337-363

- Bonner, R. F., Emmert-Buck, M., Cole, K., Pohida, T., Chuaqui, R., Goldstein, S., Liotta, L. A.** (1997). Laser Capture Microdissection: Molecular Analysis of Tissue. *Science* **278**[5342], 1481-1483
- Braatne, J. H., Rood, S. B., Heilman, P. E.** (1996). Life History, Ecology and Conservation of riparian Cottonwoods in North America. In: Stettler, R. F., Bradshaw, H. D., Heilman, P. E. and Hinckley, T. M. (Eds.), *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation, Part I, Chapter 3*, pp 57-85. NRC Research Press, National Research Council of Canada, Ottawa. 0-660-16506-6
- Brooks, D. M., Bender, C. L., Kunkel, B. N.** (2005). The *Pseudomonas syringae* Phytotoxin Coronatine promotes Virulence by overcoming Salicylic Acid-dependent Defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**[6], 629-639
- Brunner, A. M., Nilsson, O.** (2004). Revisiting Tree Maturation and floral Initiation in the Poplar functional Genomics Era. *New Phytologist* **164**[1], 43-51
- Burgemeister, R., Gangnus, R., Haar, B., Schutze, K., Sauer, U.** (2003). High Quality RNA retrieved from Samples obtained by Using LMPC (Laser Microdissection and Pressure Catapulting) Technology. *Pathology - Research and Practice* **199**[6], 431-436
- Busch, M. A., Bomblies, K., Weigel, D.** (1999). Activation of a floral homeotic Gene in *Arabidopsis*. *Science* **285**[5427], 585-587
- Bustin, S. A., Nolan, T.** (2004). Pitfalls of quantitative Real-Time Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. *Journal of Biomolecular Techniques* **15**[3], 155-166
- Cai, S., Lashbrook, C. C.** (2006). Laser Capture Microdissection of Plant Cells from Tape-transferred Paraffin Sections promotes Recovery of structurally intact RNA for global Gene Profiling. *The Plant Journal* **48**[4], 628-637
- Cameron, R. K., Zaton, K.** (2004). Intercellular Salicylic Acid Accumulation is important for Age-related Resistance in *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae*. *Physiological and molecular Plant Pathology* **65**[4], 197-209
- Carviel, J. L., Al-Daoud, F., Neumann, M., Mohammad, A., Provart, N. J., Moeder, W., Yoshioka, K., Cameron, R. K.** (2009). Forward and reverse Genetics to identify Genes involved in the Age-related Resistance Response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **10**[5], 621-634
- Casson, S., Spencer, M., Walker, K., Lindsey, K.** (2005). Laser Capture Microdissection for the Analysis of Gene Expression during Embryogenesis of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **42**[1], 111-123
- Chae, E., Tan, Q. K.-G., Hill, T. A., Irish, V. F.** (2008). An *Arabidopsis* F-box Protein acts as a transcriptional Co-Factor to regulate floral Development. *Development* **135**[7], 1235-1245

- Cheon, J., Park, S.-Y., Schulz, B., Choe, S.** (2010). *Arabidopsis* Brassinosteroid Biosynthetic Mutant *dwarf7-1* exhibits slower Rates of Cell Division and Shoot Induction. *BMC Plant Biology* **10**[1], 270
- Coen, E. S., Meyerowitz, E. M.** (1991). The War of the Whorls: genetic Interactions controlling Flower Development. *Nature* **353**[6339], 31-37
- Corbesier, L., Coupland, G.** (2006). The Quest for Florigen: a Review of recent Progress. *Journal of Experimental Botany* **57**[13], 3395-3403
- Cowherd, S., Espina, V., Petricoin Iii, E., Liotta, L.** (2004). Proteomic Analysis of human Breast Cancer Tissue with Laser-Capture Microdissection and Reverse-Phase Protein Microarrays. *Clinical Breast Cancer* **5**[5], 385-392
- Cox, M. L., Schray, C. L., Luster, C. N., Stewart, Z. S., Korytko, P. J., Kn, M. K., Paulauskis, J. D., Dunstan, R. W.** (2006). Assessment of Fixatives, Fixation, and Tissue Processing on Morphology and RNA Integrity. *Experimental and molecular Pathology* **80**[2], 183-191
- Creelman, R. A., Mullet, J. E.** (1997). Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**[1], 355-381
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G.** (2001). Plant Pathogens and integrated Defence Responses to Infection. *Nature* **411**[6839], 826-833
- Dash, S., Van Hemert, J., Hong, L., Wise, R. P., Dickerson, J. A.** (2011). PLEXdb: Gene Expression Resources for Plants and Plant Pathogens. *Nucleic Acids Research*, PMID: 22084198
- Day, R. C., Grossniklaus, U., Macknight, R. C.** (2005). Be more specific! Laser-assisted Microdissection of Plant Cells. *Trends in Plant Science* **10**[8], 397-406
- Day, R. C., McNoe, L. A., Macknight, R. C.** (2006). Transcript Analysis of Laser microdissected Plant Cells. *Physiologia Plantarum* **129**, 267-282
- Day, R. C., McNoe, L., Macknight, R. C.** (2007). Evaluation of global RNA Amplification and its Use for high-Throughput Transcript Analysis of Laser-Microdissected Endosperm. *International Journal of Plant Genomics* **2007**, Article ID 61028
- Deeken, R., Ache, P., Kajahn, I., Klinkenberg, J., Bringmann, G., Hedrich, R.** (2008). Identification of *Arabidopsis thaliana* Phloem RNAs provides a Search Criterion for Phloem-based Transcripts hidden in complex Datasets of Microarray Experiments. *The Plant Journal* **55**[5], 746-759
- Després, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E., Fobert, P. R.** (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 Protein enhances the DNA binding Activity of a Subgroup of the TGA Family of bZIP Transcription Factors. *The Plant Cell* **12**[2], 279-290

- Després, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., Fobert, P. R.** (2003). The *Arabidopsis* NPR1 Disease Resistance Protein is a novel Cofactor that confers Redox Regulation of DNA Binding Activity to the basic Domain/Leucine Zipper Transcription Factor TGA1. *The Plant Cell* **15**[9], 2181-2191
- Develey-Rivière, M.-P., Galiana, E.** (2007). Resistance to Pathogens and Host developmental Stage: a multifaceted Relationship within the Plant Kingdom. *New Phytologist* **175**[3], 405-416
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B., Ellis, J. G.** (2006). Direct Protein Interaction underlies Gene-for-Gene Specificity and Coevolution of the Flax Resistance Genes and Flax Rust Avirulence Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**[23], 8888-8893
- Durrant, W. E., Dong, X.** (2004). Systemic Acquired Resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**[1], 185-209
- Eckardt, N. A.** (2003). A new Twist on Systemic Acquired Resistance: Redox Control of the NPR1-TGA1 Interaction by Salicylic Acid. *The Plant Cell* **15**[9], 1947-1949
- Edgar, R., Domrachev, M., Lash, A. E.** (2002). Gene Expression Omnibus: NCBI Gene Expression and Hybridization Array Data Repository. *Nucleic Acids Research* **30**[1], 207-210
- Ehltng, J., Mattheus, N., Aeschliman, D. S., Li, E., Hamberger, B., Cullis, I. F., Zhuang, J., Kaneda, M., Mansfield, S. D., Samuels, L., Ritland, K., Ellis, B. E., Bohlmann, J., Douglas, C. J.** (2005). Global Transcript Profiling of primary Stems from *Arabidopsis thaliana* identifies Candidate Genes for missing Links in Lignin Biosynthesis and transcriptional Regulators of Fiber Differentiation. *The Plant Journal* **42**[5], 618-640
- Emiliani, G., Traversi, M. L., Anichini, M., Giachi, G., Giovannelli, A.** (2011). Transcript Accumulation Dynamics of Phenylpropanoid Pathway Genes in the maturing Xylem and Phloem of *Picea abies* during Latewood Formation. *Journal of Integrative Plant Biology* **53**[10], 783-799
- Emmert-Buck, M. R., Bonner, R. F., Smith, P. D., Chuaqui, R. F., Zhuang, Z., Goldstein, S. R., Weiss, R. A., Liotta, L. A.** (1996). Laser Capture Microdissection. *Science* **274**[5289], 998-1001
- Espunya, M. C., Díaz, M., Moreno-Romero, J., Martínez, M. C.** (2006). Modification of intracellular Levels of Glutathione-dependent Formaldehyde Dehydrogenase alters Glutathione Homeostasis and Root Development. *Plant, Cell & Environment* **29**[5], 1002-1011
- Fromm, J., Meyer, A. J., Weisenseel, M. H.** (1997). Growth, Membrane Potential and endogenous Ion Currents of Willow (*Salix viminalis*) Roots are all affected by Abscisic Acid and Spermine. *Physiologia Plantarum* **99**[4], 529-537

- Fujioka, S., Yokota, T.** (2003). Biosynthesis and Metabolism of Brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* **54**[1], 137-164
- Gessler, A., Kopriva, S., Rennenberg, H.** (2004). Regulation of Nitrate Uptake at the whole-Tree Level: Interaction between Nitrogen Compounds, Cytokinins and Carbon Metabolism. *Tree Physiology* **24**[12], 1313-1321
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E. E.** (2010). Jasmonate Biochemical Pathway. *Science Signaling* **3**[109], cm3
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense against biotrophic and necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**[1], 205-227
- Goldsworthy, S. M., Stockton, P. S., Trempus, C. S., Foley, J. F., Maronpot, R. R.** (1999). Effects of Fixation on RNA Extraction and Amplification from Laser Capture microdissected Tissue. *Molecular Carcinogenesis* **25**[2], 86-91
- Grallath, S., Weimar, T., Meyer, A., Gumy, C., Suter-Grotemeyer, M., Neuhaus, J.-M., Rentsch, D.** (2005). The AtProT Family. Compatible solute Transporters with similar Substrate Specificity but differential Expression Patterns. *Plant Physiology* **137**[1], 117-126
- Guerineau, F., Benjdia, M., Zhou, D. X.** (2003). A Jasmonate-responsive Element within the *A. thaliana vsp1* Promoter. *Journal of Experimental Botany* **54**[385], 1153-1162
- Haubrick, L. L., Assmann, S. M.** (2006). Brassinosteroids and Plant Function: some Clues, more Puzzles. *Plant, Cell & Environment* **29**[3], 446-457
- Hause, B., Stenzel, I., Miersch, O., Maucher, H., Kramell, R., Ziegler, J., Wasternack, C.** (2000). Tissue-specific Oxylipin Signature of Tomato Flowers: Allene Oxide Cyclase is highly expressed in distinct Flower Organs and vascular Bundles. *The Plant Journal* **24**[1], 113-126
- Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Miersch, O., Wasternack, C.** (2003). Enzymes of Jasmonate Biosynthesis occur in Tomato Sieve Elements. *Plant & Cell Physiology* **44**[6], 643-648
- Heil, M., Baldwin, I. T.** (2002). Fitness Costs of induced Resistance: emerging experimental Support for a slippery Concept. *Trends in Plant Science* **7**[2], 61-67
- Heil, M., Ton, J.** (2008). Long-Distance Signalling in Plant Defence. *Trends in Plant Science* **13**[6], 264-272
- Heldt, H. W.** (2003). Pflanzenbiochemie. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin. 3-8274-1330-3
- Höll, W.** (2000). Distribution, Fluctuation and Metabolism of Food Reserves in the Wood of Trees. In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (Eds.), Cell and molecular

- Biology of Wood Formation, 1st Ed., pp 347-362. BIOS Scientific Publishers Ltd. 1-85996-123-1
- Hsu, C.-Y., Liu, Y., Luthe, D. S., Yuceer, C.** (2006). Poplar *FT2* shortens the juvenile Phase and promotes seasonal Flowering. *The Plant Cell* **18**[8], 1846-1861
- Hsu, C.-Y., Adams, J. P., Kim, H., No, K., Ma, C., Strauss, S. H., Drnevich, J., Vandervelde, L., Ellis, J. D., Rice, B. M., Wickett, N., Gunter, L. E., Tuskan, G. A., Brunner, A. M., Page, G. P., Barakat, A., Carlson, J. E., W. dePamphilis, C., Luthe, D. S., Yuceer, C.** (2011). FLOWERING LOCUS T Duplication coordinates reproductive and vegetative Growth in perennial Poplar. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**[26], 10756-10761
- Huffaker, A., Pearce, G., Ryan, C. A.** (2006). An endogenous Peptide Signal in *Arabidopsis* activates Components of the innate Immune Response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**[26], 10098-10103
- Hunt, M. D., Ryals, J. A., Reinhardt, D.** (1996). Systemic Acquired Resistance Signal Transduction. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**[5-6], 583-606
- Igasaki, T., Watanabe, Y., Nishiguchi, M., Kotoda, N.** (2008). The *FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1* Family in Lombardy Poplar. *Plant & Cell Physiology* **49**[3], 291-300
- Inada, N., Wildermuth, M. C.** (2005). Novel tissue preparation method and cell-specific marker for laser microdissection of *Arabidopsis* mature leaf. *Planta* **221**[1], 9-16
- Iriti, M., Faoro, F.** (2009). Chemical Diversity and Defence Metabolism: how Plants cope with Pathogens and Ozone Pollution. *International Journal of Molecular Science* **10**[8], 3371-3399
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N., Hedrich, R.** (2003). Isolation of *AtSUC2* Promoter-GFP-marked Companion Cells for Patch-Clamp Studies and Expression Profiling. *The Plant Journal* **36**[6], 931-945
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., Bevan, M. W.** (1987). GUS Fusions: Beta-Glucuronidase as a sensitive and versatile Gene Fusion Marker in higher Plants. *The EMBO Journal* **6**[13], 3901-3907
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., Valent, B.** (2000). Direct Interaction of Resistance Gene and Avirulence Gene Products confers Rice Blast Resistance. *The EMBO Journal* **19**[15], 4004-4014
- Johnson, C., Mhatre, A., Arias, J.** (2008). NPR1 preferentially binds to the DNA-inactive Form of *Arabidopsis* TGA2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1779**[10], 583-589
- Jones, J. D. G., Dangl, J. L.** (2006). The Plant Immune System. *Nature* **444**[7117], 323-329

- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J. T. (2009). Priming in systemic Plant Immunity. *Science* **324**[5923], 89-91
- Karpinska, B., Karlsson, M., Srivastava, M., Stenberg, A., Schrader, J., Sterky, F., Bhalerao, R., Wingsle, G. (2004). MYB Transcription Factors are differentially expressed and regulated during secondary vascular Tissue Development in hybrid Aspen. *Plant Molecular Biology* **56**[2], 255-270
- Katagiri, F., Tsuda, K. (2010). Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**[12], 1531-1536
- Kehr, J. (2003). Single Cell Technology. *Current Opinion in Plant Biology* **6**[6], 617-621
- Kehr, J., Buhtz, A. (2008). Long Distance Transport and Movement of RNA through the Phloem. *Journal of Experimental Botany* **59**[1], 85-92
- Kenzelmann, M., Klaren, R., Hergenbahn, M., Bonrouhi, M., Grone, H. J., Schmid, W., Schutz, G. (2004). High-Accuracy Amplification of nanogram total RNA Amounts for Gene Profiling. *Genomics* **83**[4], 550-558
- Kerk, N. M., Ceserani, T., Tausta, S. L., Sussex, I. M., Nelson, T. M. (2003). Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. *Plant Physiology* **132**[1], 27-35
- Kiefer, I. W., Slusarenko, A. J. (2003). The Pattern of Systemic Acquired Resistance Induction within the *Arabidopsis* Rosette in Relation to the Pattern of Translocation. *Plant Physiology* **132**[2], 840-847
- Kim, J. O., Kim, H. N., Hwang, M. H., Shin, H. I., Kim, S. Y., Park, R. W., Park, E. Y., Kim, I. S., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Lian, J. B., Stein, G. S., Choi, J. Y. (2003). Differential Gene Expression Analysis using Paraffin-embedded Tissues after Laser Microdissection. *Journal of cellular Biochemistry* **90**[5], 998-1006
- Ko, J.-H., Prassinis, C., Keathley, D., Han, K.-H. (2011). Novel Aspects of transcriptional Regulation in the Winter Survival and Maintenance Mechanism of Poplar. *Tree Physiology* **31**[2], 208-225
- Koch, T., Krumm, T., Jung, V., Engelberth, J., Boland, W. (1999). Differential Induction of Plant Volatile Biosynthesis in the Lima Bean by early and late Intermediates of the Octadecanoid-Signaling Pathway. *Plant Physiology* **121**[1], 153-162
- Kotake, T., Takada, S., Nakahigashi, K., Ohto, M., Goto, K. (2003). *Arabidopsis* TERMINAL FLOWER 2 Gene encodes a Heterochromatin Protein 1 Homolog and represses both FLOWERING LOCUS T to regulate Flowering Time and several floral homeotic Genes. *Plant & Cell Physiology* **44**[6], 555-564
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B., Wasternack, C. (2000). Octadecanoid-derived Alteration of Gene Expression and the "Oxylipin Signature" in stressed Barley Leaves. Implications for different Signaling Pathways. *Plant Physiology* **123**[1], 177-188

- Kus, J. V., Zaton, K., Sarkar, R., Cameron, R. K.** (2002). Age-related Resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated Defense Response to *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* **14**[2], 479-490
- Laird, J., Armengaud, P., Giuntini, P., Laval, V., Milner, J. J.** (2004). Inappropriate Annotation of a Key Defence Marker in *Arabidopsis*: will the real *PR-1* please stand up? *Planta* **219**[6], 1089-1092
- Langer, K., Ache, P., Geiger, D., Stinzinger, A., Arend, M., Wind, C., Regan, S., Fromm, J., Hedrich, R.** (2002). Poplar Potassium Transporters capable of Controlling K^+ Homeostasis and K^+ -dependent Xylogenesis. *The Plant Journal* **32**[6], 997-1009
- Langer, K.** (2003). K^+ -Homöostase und kaliumabhängige Xylogenese in *Populus tremula* L. x *Populus tremuloides* Michx. Dissertation, Bayerische Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
- Langer, K., Levchenko, V., Fromm, J., Geiger, D., Steinmeyer, R., Lautner, S., Ache, P., Hedrich, R.** (2004). The Poplar K^+ Channel KPT1 is associated with K^+ Uptake during stomatal Opening and Bud Development. *The Plant Journal* **37**[6], 828-838
- Lapierre, C., Pilate, G., Pollet, B., Mila, I., Leplé, J.-C., Jouanin, L., Kim, H., Ralph, J.** (2004). Signatures of Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase Deficiency in Poplar Lignins. *Phytochemistry* **65**[3], 313-321
- Leon-Reyes, A., Spoel, S. H., De Lange, E. S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Millenaar, F. F., Welschen, R. A. M., Ritsema, T., Pieterse, C. M. J.** (2009). Ethylene modulates the Role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling. *Plant Physiology* **149**[4], 1797-1809
- Li, S. H., Schneider, B., Gershenzon, J.** (2007). Microchemical Analysis of Laser-microdissected Stone Cells of Norway Spruce by cryogenic Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Planta* **225**[3], 771-779
- Liu, W.-m., Mei, R., Di, X., Ryder, T. B., Hubbell, E., Dee, S., Webster, T. A., Harrington, C. A., Ho, M.-h., Baid, J., Smeekens, S. P.** (2002). Analysis of high Density Expression Microarrays with signed-Rank Call Algorithms. *Bioinformatics* **18**[12], 1593-1599
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Dangl, J. L.** (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a Target of the Type III Virulence Effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated Resistance. *Cell* **112**[3], 379-389
- Maizel, A., Busch, M. A., Tanahashi, T., Perkovic, J., Kato, M., Hasebe, M., Weigel, D.** (2005). The floral Regulator *LEAFY* evolves by Substitutions in the DNA Binding Domain. *Science* **308**[5719], 260-263
- Majewski, I. J., Ritchie, M. E., Phipson, B., Corbin, J., Pakusch, M., Ebert, A., Busslinger, M., Koseki, H., Hu, Y., Smyth, G. K., Alexander, W. S., Hilton, D. J., Blewitt, M. E.** (2010). Opposing Roles of polycomb repressive Complexes in hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Blood* **116**[5], 731-739

- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J., Cameron, R. K.** (2002). A putative Lipid Transfer Protein involved in Systemic Resistance Signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**[6905], 399-403
- McCarthy, R. L., Zhong, R., Fowler, S., Lyskowski, D., Piyasena, H., Carleton, K., Spicer, C., Ye, Z.-H.** (2010). The Poplar MYB Transcription Factors, PtrMYB3 and PtrMYB20, are involved in the Regulation of secondary Wall Biosynthesis. *Plant & Cell Physiology* **51**[6], 1084-1090
- McClintick, J., Edenberg, H.** (2006). Effects of Filtering by present Call on Analysis of Microarray Experiments. *BMC Bioinformatics* **7**[1], 49
- McClung, C. R.** (2011). Plant biology: Defence at Dawn. *Nature* **470**[7332], 44-45
- McDonald, M. J., Rosbash, M.** (2001). Microarray Analysis and Organization of circadian Gene Expression in *Drosophila*. *Cell* **107**[5], 567-578
- Meimberg, H., Thalhammer, S., Brachmann, A., Muller, B., Eichacker, L. A., Heckl, W. M., Heubl, G.** (2003). Selection of Chloroplasts by Laser Microbeam Microdissection for single-Chloroplast PCR. *Biotechniques* **34**[6], 1238-1243
- Mellerowicz, E. J., Baucher, M., Sundberg, B., Boerjan, W.** (2001). Unravelling Cell Wall Formation in the woody Dicot Stem. *Plant Molecular Biology* **47**[1-2], 239-274
- Miao, Y. C., Liu, C. J.** (2010). ATP-binding Cassette-like Transporters are involved in the Transport of Lignin Precursors across Plasma and vacuolar Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**[52], 22728-22733
- Micke, P., Bjornsen, T., Scheidl, S., Stromberg, S., Demoulin, J. B., Ponten, F., Ostman, A., Lindahl, P., Busch, C.** (2004). A fluid Cover Medium provides superior Morphology and preserves RNA Integrity in Tissue Sections for Laser Microdissection and Pressure Catapulting. *Journal of Pathology* **202**[1], 130-138
- Mishina, T. E., Zeier, J.** (2007a). Bacterial non-Host Resistance: Interactions of *Arabidopsis* with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiologia Plantarum* **131**[3], 448-461
- Mishina, T. E., Zeier, J.** (2007b). Pathogen-associated molecular Pattern Recognition rather than Development of Tissue Necrosis contributes to bacterial Induction of Systemic Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **50**[3], 500-513
- Mohamed, R., Wang, C.-T., Ma, C., Shevchenko, O., Dye, S. J., Puzey, J. R., Etherington, E., Sheng, X., Meilan, R., Strauss, S. H., Brunner, A. M.** (2010). *Populus* CEN/TFL1 regulates first Onset of Flowering, axillary Meristem Identity and Dormancy Release in *Populus*. *The Plant Journal* **62**[4], 674-688
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X.** (2003). Inducers of Plant systemic acquired Resistance regulate NPR1 Function through Redox Changes. *Cell* **113**[7], 935-944

- Mustroph, A., Zanetti, M. E., Jang, C. J. H., Holtan, H. E., Repetti, P. P., Galbraith, D. W., Girke, T., Bailey-Serres, J.** (2009). Profiling Translatomes of discrete Cell Populations resolves altered cellular Priorities during Hypoxia in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**[44], 18843-18848
- Nakazono, M., Qiu, F., Borsuk, L. A., Schnable, P. S.** (2003). Laser-Capture Microdissection, a Tool for the global Analysis of Gene Expression in specific Plant Cell Types: Identification of Genes expressed differentially in epidermal Cells or vascular Tissues of Maize. *The Plant Cell* **15**[3], 583-596
- Noctor, G.** (2006). Metabolic Signalling in Defence and Stress: the central Roles of soluble Redox Couples. *Plant, Cell & Environment* **29**[3], 409-425
- Olsen, J. E., Junttila, O., Nilsen, J., Eriksson, M. E., Martinussen, I., Olsson, O., Sandberg, G., Moritz, T.** (1997). Ectopic Expression of Oat Phytochrome A in hybrid Aspen changes critical Daylength for Growth and prevents Cold Acclimatization. *The Plant Journal* **12**[6], 1339-1350
- Panshin, A. J., de Zeeuw, C.** (1980). Textbook of Wood Technology. 4th Edition, McGraw-Hill Book Company. 0-07-048441-4
- Parcy, F., Nilsson, O., Busch, M. A., Lee, I., Weigel, D.** (1998). A genetic Framework for floral Patterning. *Nature* **395**[6702], 561-566
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F.** (2007). Methyl Salicylate is a critical mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* **318**[5847], 113-116
- Parker, J. E.** (2009). The Quest for Long-Distance Signals in Plant Systemic Immunity. *Science Signaling* **2**[70], pe31
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., van Loon, L. C.** (1998). A novel Signaling Pathway controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**[9], 1571-1580
- Pieterse, C. M. J., van Loon, L. C.** (2004). NPR1: the Spider in the Web of induced Resistance Signaling Pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**[4], 456-464
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M.** (2009). Networking by small-Molecule Hormones in Plant Immunity. *Nature chemical Biology* **5**[5], 308-316
- Pinzani, P., Orlando, C., Pazzagli, M.** (2006). Laser-assisted Microdissection for Real-Time PCR Sample Preparation. *Molecular Aspects of Medicine* **27**[2-3], 140-159
- Plomion, C., Leprovost, G., Stokes, A.** (2001). Wood Formation in Trees. *Plant Physiology* **127**[4], 1513-1523

- Rasmussen, R., Morrison, T., Herrmann, M., Wittwer, C.** (1998). Quantitative PCR by continuous Fluorescence Monitoring of a Double Strand DNA specific Binding Dye. *Biochemica* **2**, 8-11
- Rennenberg, H., Wildhagen, H., Ehltng, B.** (2010). Nitrogen Nutrition of Poplar Trees. *Plant Biology* **12**[2], 275-291
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., Frommer, W. B.** (1996). Salt Stress-induced Proline Transporters and Salt Stress-repressed broad Specificity Amino Acid Permeases identified by Suppression of a Yeast Amino Acid Permease-targeting Mutant. *The Plant Cell* **8**[8], 1437-1446
- Rohde, A., Bastien, C., Boerjan, W.** (2011). Temperature Signals contribute to the Timing of photoperiodic Growth Cessation and Bud Set in Poplar. *Tree Physiology* **31**[5], 472-482
- Rottmann, W. H., Meilan, R., Sheppard, L. A., Brunner, A. M., Skinner, J. S., Ma, C., Cheng, S., Jouanin, L., Pilate, G., Strauss, S. H.** (2000). Diverse Effects of Overexpression of LEAFY and PTLF, a Poplar (*Populus*) Homolog of LEAFY/FLORICAULA, in transgenic Poplar and *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **22**[3], 235-245
- Rustérucci, C., Espunya, M. C., Díaz, M., Chabannes, M., Martínez, M. C.** (2007). S-Nitrosoglutathione Reductase affords Protection against Pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143**[3], 1282-1292
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *The Plant Cell* **8**[10], 1809-1819
- Samuels, A. S., Rensing, K. R., Douglas, C. D., Mansfield, S. M., Dharmawardhana, D. D., Ellis, B. E.** (2002). Cellular Machinery of Wood Production: Differentiation of secondary Xylem in *Pinus contorta* var. *latifolia*. *Planta* **216**[1], 72-82
- Santanen, A., Simola, L.** (2007). Polyamine Levels in Buds and Twigs of *Tilia cordata* from Dormancy Onset to Bud Break. *Trees - Structure and Function* **21**[3], 337-344
- Sauter, J. J.** (2000). Photosynthate Allocation to the vascular Cambium: Facts and Problems. In: Savidge, R. A., Barnett, J. R. and Napier, R. (Eds.), *Cell and molecular Biology of Wood Formation*, 1st Edition, pp 71-83. BIOS Scientific Publishers Ltd. 1-85996-123-1
- Schad, M., Lipton, M. S., Giavalisco, P., Smith, R. D., Kehr, J.** (2005a). Evaluation of two-dimensional Electrophoresis and LC-MS/MS for Tissue-specific Protein Profiling of Laser-microdissected Plant Samples. *ELECTROPHORESIS* **26**[14], 2729-2738
- Schad, M., Mungur, R., Fiehn, O., Kehr, J.** (2005b). Metabolic Profiling of Laser microdissected vascular Bundles of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **1**[1], 2

- Schaller, F., Biesgen, C., Müssig, C., Altmann, T., Weiler, E. W.** (2000). 12-Oxophytodienoate Reductase 3 (OPR3) is the Isoenzyme involved in Jasmonate Biosynthesis. *Planta* **210**[6], 979-984
- Seo, J., Hoffman, E.** (2006). Probe set Algorithms: is there a rational best Bet? *BMC Bioinformatics* **7**[1], 395
- Sessions, A., Yanofsky, M. F., Weigel, D.** (2000). Cell-Cell Signaling and Movement by the floral Transcription Factors LEAFY and APETALA1. *Science* **289**[5480], 779-782
- Smirnoff, N.** (1996). The Function and Metabolism of Ascorbic Acid in Plants. *Annals of Botany* **78**[6], 661-669
- Smith, J. L., De Moraes, C. M., Mescher, M. C.** (2009). Jasmonate- and Salicylate-mediated Plant Defense Responses to Insect Herbivores, Pathogens and parasitic Plants. *Pest Management Science* **65**[5], 497-503
- Spencer, M. W. B., Casson, S. A., Lindsey, K.** (2007). Transcriptional Profiling of the *Arabidopsis* Embryo. *Plant Physiology* **143**[2], 924-940
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Van Pelt, J. A., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L. C., Dong, X., Pieterse, C. M. J.** (2003). NPR1 modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-dependent Defense Pathways through a novel Function in the Cytosol. *The Plant Cell* **15**[3], 760-770
- Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S.** (2002). Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids. *American Journal of Pathology* **161**[6], 1961-1971
- Stich, M., Thalhammer, S., Burgemeister, R., Friedemann, G., Ehnle, S., Lüthy, C., Schütze, K.** (2003). Live Cell Catapulting and Recultivation. *Pathology - Research and Practice* **199**[6], 405-409
- Stirewalt, D. L., Pogossova-Agadjanyan, E. L., Khalid, N., Hare, D. R., Ladne, P. A., Salatorra, O., Zhao, L. P., Radich, J. P.** (2004). Single-stranded linear Amplification Protocol results in reproducible and reliable Microarray Data from Nanogram Amounts of starting RNA. *Genomics* **83**[2], 321-331
- Taylor, G.** (2002). *Populus: Arabidopsis* for Forestry. Do we need a Model Tree? *Annals of Botany* **90**[6], 681-689
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L. A., Rhee, S. Y., Stitt, M.** (2004). MapMan: A User-driven Tool to display Genomics Data Sets onto Diagrams of metabolic Pathways and other biological Processes. *The Plant Journal* **37**[6], 914-939

- Ton, J., De Vos, M., Robben, C., Buchala, A., Métraux, J.-P., van Loon, L. C., Pieterse, C. M. J.** (2002). Characterization of *Arabidopsis* enhanced Disease Susceptibility Mutants that are affected in systemically induced Resistance. *The Plant Journal* **29**[1], 11-21
- Truernit, E., Sauer, N.** (1995). The Promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 Sucrose-H⁺ Symporter Gene directs Expression of β -Glucuronidase to the Phloem: Evidence for Phloem Loading and Unloading by SUC2. *Planta* **196**[3], 564-570
- Truman, W., Bennett, M. H., Kubigsteltig, I., Turnbull, C., Grant, M.** (2007). *Arabidopsis* systemic Immunity uses conserved Defense Signaling Pathways and is mediated by Jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**[3], 1075-1080
- Tsuda, K., Katagiri, F.** (2010). Comparing Signaling Mechanisms engaged in Pattern-triggered and Effector-triggered Immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **13**[4], 459-465
- Turck, F., Fornara, F., Coupland, G.** (2008). Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T moves Center Stage. *Annual Review of Plant Biology* **59**, 573-594
- Turgeon, R., Wolf, S.** (2009). Phloem Transport: cellular Pathways and molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **60**[1], 207-221
- Turner, J. G., Ellis, C., Devoto, A.** (2002). The Jasmonate Signal Pathway. *The Plant Cell* **14**[Suppl 1], S153-S164
- Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A., Schein, J., Sterck, L., Aerts, A., Bhalerao, R. R., Bhalerao, R. P., Blaudez, D., Boerjan, W., Brun, A., Brunner, A., Busov, V., Campbell, M., Carlson, J., Chalot, M., Chapman, J., Chen, G. L., Cooper, D., Coutinho, P. M., Couturier, J., Covert, S., Cronk, Q., Cunningham, R., Davis, J., Degroeve, S., Dejardin, A., Depamphilis, C., Detter, J., Dirks, B., Dubchak, I., Duplessis, S., Ehlting, J., Ellis, B., Gendler, K., Goodstein, D., Gribskov, M., Grimwood, J., Groover, A., Gunter, L., Hamberger, B., Heinze, B., Helariutta, Y., Henrissat, B., Holligan, D., Holt, R., Huang, W., Islam-Faridi, N., Jones, S., Jones-Rhoades, M., Jorgensen, R., Joshi, C., Kangasjarvi, J., Karlsson, J., Kelleher, C., Kirkpatrick, R., Kirst, M., Kohler, A., Kalluri, U., Larimer, F., Leebens-Mack, J., Leple, J. C., Locascio, P., Lou, Y., Lucas, S., Martin, F., Montanini, B., Napoli, C., Nelson, D. R., Nelson, C., Nieminen, K., Nilsson, O., Pereda, V., Peter, G., Philippe, R., Pilate, G., Poliakov, A., Razumovskaya, J., Richardson, P., Rinaldi, C., Ritland, K., Rouze, P., Ryaboy, D., Schmutz, J., Schrader, J., Segerman, B., Shin, H., Siddiqui, A., Sterky, F., Terry, A., Tsai, C. J., Uberbacher, E., Unneberg, P., Vahala, J., Wall, K., Wessler, S., Yang, G., Yin, T., Douglas, C., Marra, M., Sandberg, G., Van de, P. Y., Rokhsar, D.** (2006). The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**[5793], 1596-1604
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J.** (1992). Acquired Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **4**[6], 645-656

- van Bel, A. J., Gaupels, F.** (2004). Pathogen-induced Resistance and Alarm Signals in the Phloem. *Molecular Plant Pathology* **5**[5], 495-504
- van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M., Pieterse, C. M. J.** (1998). Systemic Resistance induced by Rhizosphere Bacteria. *Annual Review of Phytopathology* **36**, 453-483
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J.** (1994). Salicylic Acid is not the translocated Signal responsible for inducing Systemic Acquired Resistance but is required in Signal Transduction. *The Plant Cell* **6**[7], 959-965
- Vlot, A. C., Klessig, D. F., Park, S. W.** (2008). Systemic Acquired Resistance: the elusive Signal(s). *Current Opinion in Plant Biology* **11**[4], 436-442
- Wang, W., Barnaby, J. Y., Tada, Y., Li, H., Tor, M., Caldelari, D., Lee, D.-u., Fu, X.-D., Dong, X.** (2011). Timing of Plant Immune Responses by a central circadian Regulator. *Nature* **470**[7332], 110-114
- Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D. R., Yanofsky, M. F., Meyerowitz, E. M.** (1992). *LEAFY* controls floral Meristem Identity in *Arabidopsis*. *Cell* **69**[5], 843-859
- Weigel, D., Nilsson, O.** (1995). A developmental Switch sufficient for Flower Initiation in diverse Plants. *Nature* **377**[6549], 495-500
- Westphal, G., Burgemeister, R., Friedemann, G., Wellmann, A., Wernert, N., Wollscheid, V., Becker, B., Vogt, T., Knüchel, R., Stolz, W., Schütze, K.** (2002). Noncontact Laser Catapulting: a basic Procedure for functional Genomics and Proteomics. *Methods in Enzymology Volume* **356**, 80-99
- Whalen, M. C.** (2005). Host Defence in a developmental Context. *Molecular Plant Pathology* **6**[3], 347-360
- Wild, P. J., Herr, A., Wissmann, C., Stoehr, R., Rosenthal, A., Zaak, D., Simon, R., Knuechel, R., Pilarsky, C., Hartmann, A.** (2005). Gene Expression Profiling of progressive Papillary noninvasive Carcinomas of the urinary Bladder. *Clinical Cancer Research* **11**[12], 4415-4429
- Wildhagen, H., Dürr, J., Ehling, B., Rennenberg, H.** (2010). Seasonal Nitrogen Cycling in the Bark of field-grown Grey Poplar is correlated with meteorological Factors and Gene Expression of Bark Storage Proteins. *Tree Physiology* **30**[9], 1096-1110
- William, D. A., Su, Y., Smith, M. R., Lu, M., Baldwin, D. A., Wagner, D.** (2004). Genomic Identification of direct Target Genes of *LEAFY*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**[6], 1775-1780
- Wind, C., Arend, M., Fromm, J.** (2004). Potassium-dependent cambial Growth in Poplar. *Plant Biology* **6**[1], 30-37

- Wittliff, J. L., Erlander, M. G.** (2002). Laser Capture Microdissection and its Applications in Genomics and Proteomics. *Methods in Enzymology* **Volume 356**, 12-25
- Wu, D., Lim, E., Vaillant, F., Asselin-Labat, M.-L., Visvader, J. E., Smyth, G. K.** (2010). ROAST: Rotation Gene Set Tests for complex Microarray Experiments. *Bioinformatics* **26**[17], 2176-2182
- Wulfkuhle, J. D., McLean, K. C., Paweletz, C. P., Sgroi, D. C., Trock, B. J., Steeg, P. S., Petricoin Iii, E. F.** (2001). New Approaches to Proteomic Analysis of Breast Cancer. *Proteomics* **1**[10], 1205-1215
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R. A., Lamb, C.** (2004). An extracellular aspartic Protease functions in *Arabidopsis* Disease Resistance Signaling. *The EMBO Journal* **23**[4], 980-988
- Yu, Y., Lashbrook, C., Hannapel, D.** (2007). Tissue Integrity and RNA Quality of Laser Microdissected Phloem of Potato. *Planta* **226**[3], 797-803
- Zeier, J., Pink, B., Mueller, M. J., 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**[4], 673-683
- Zhang, H., Harry, D. E., Ma, C., Yuceer, C., Hsu, C.-Y., Vikram, V., Shevchenko, O., Etherington, E., Strauss, S. H.** (2010). Precocious Flowering in Trees: the *FLOWERING LOCUS T* Gene as a Research and Breeding Tool in *Populus*. *Journal of Experimental Botany* **61**[10], 2549-2560
- Zhang, X., Friedl, M. A., Schaaf, C. B., Strahler, A. H.** (2004). Climate controls on Vegetation phenological Patterns in northern mid- and high Latitudes inferred from MODIS Data. *Global Change Biology* **10**[7], 1133-1145
- Zhang, X., Dai, Y., Xiong, Y., DeFraia, C., Li, J., Dong, X., Mou, Z.** (2007). Overexpression of *Arabidopsis* MAP Kinase Kinase 7 leads to Activation of Plant basal and Systemic Acquired Resistance. *The Plant Journal* **52**[6], 1066-1079
- Zhao, Q., Dixon, R. A.** (2011). Transcriptional Networks for Lignin Biosynthesis: more complex than we thought? *Trends in Plant Science* **16**[4], 227-233
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., Howe, G. A.** (2003). Virulence Systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial Speck Disease in Tomato by targeting the Jasmonate Signaling Pathway. *The Plant Journal* **36**[4], 485-499
- Zhong, R., Ye, Z.-H.** (2007). Regulation of Cell Wall Biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **10**[6], 564-572
- Zhou, J., Lee, C., Zhong, R., Ye, Z. H.** (2009). *MYB58* and *MYB63* are transcriptional Activators of the Lignin biosynthetic Pathway during secondary Cell Wall Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **21**[1], 248-266

- Zhou, L., Tucker, C. J., Kaufmann, R. K., Slayback, D., Shabanov, N. V., Myneni, R. B.** (2001). Variations in northern Vegetation Activity inferred from Satellite Data of Vegetation Index during 1981 to 1999. *Journal of Geophysical Research* **106[D17]**, 20069-20083
- Zipfel, C., Felix, G.** (2005). Plants and Animals: a different Taste for Microbes? *Current Opinion in Plant Biology* **8[4]**, 353-360

8. Anhang

8.1 Primersequenzen

Bei den Primern für die qPCR entspricht die Angabe des Primermixes (PM) der eingesetzten Endkonzentration: PM 6 $\hat{=}$ 300 nM

PM 12 $\hat{=}$ 600 nM

PM 18 $\hat{=}$ 900 nM

Es sind jeweils die Sequenzen der forward (fwd) und reverse (rev) Primer in 5'→3'-Richtung, die Länge des entstehenden Fragments in bp (cDNA) und der Bereich der Annealing-Temperatur in °C (Tm) angegeben, bei den *Arabidopsis* qPCR-Primern auch AGI-Codes nach TAIR (AGI).

8.1.1 *Arabidopsis* qPCR-Primer

Primer	Sequenz [5'→3']	cDNA	PM	Tm [°C]	AGI
Act2/8	fwd GGT GAT GGT GTG TCT rev ACT GAG CAC AAT GTT AC	435	6	52-62	At3g18780 At1g49240
AOC1	fwd AAA CGC ATT CAG CTT TAG rev GGT ACC GGA GTT CCT ATG	381	6	48-62	At3g25760
AOS	fwd CCA TAC ATT TAG TCT ACC AC rev GCT AAT CGG TTA TGA ACT TG	243	6	48-62	At5g42650
AZI1	fwd TCC TCC ACC CCG TCC TTC rev GTA TGC ATA ATG GAT ATT	357	6	48-60	At4g12470
JAZ10	fwd GGA GAT TAT CAA ATC GCT rev TGG TCT TAG AGT GGT CG	325	12	62	At5g13220
LOX2	fwd GTA CGT CTG ACG ATA CC rev TCT GGC GAC TCA TAG AA	398	6/12	52-62	At3g45140
OPR3	fwd GCA GAG TAT TAT GCT CAA C rev GAG GTT TCG GGT ACT TCA C	322	6	48-64	At2g06050
PDF1.2	fwd TGC GGA AAC AGT AAT G rev TTA TTG TAA CAA CAA CGG	243	6	51-60	At5g44420
PR1	fwd TCT AAG GGT TCA CAA CCA G rev CGC AGC GTA GTT GTA GTT A	232	6	48-66	At2g14610
PR2	fwd TGA ATC TCT ACC CTT ACT rev ATT TTT AAA TAC GCT TAC	472	6	49-57	At3g57260
PR5	fwd GCG GTC TAA GAT GTA AC rev AAC CCG ACT GTA TCT AA	470	6	48-62	At1g75040
VSP1	fwd ATC ATA AAC TTC GAC ACG rev CTC TAA CCA CGA CCA GTA	264	12	62	At5g24780

8.1.2 Pappel qPCR-Primer

Primer		Sequenz [5'→3']	cDNA	PM	Tm [°C]
PtAct	fwd	CCC AGA AGT CCT CTT	130	12	48-52
	rev	ACT GAG CAC AAT GTT AC			
PtCAD1	fwd	TAC AAA GGG TGG ATA TTC	308	6	50-60
	rev	GCT AGA TCG GAT GTA TCA			
PtFT	fwd	AGA GAA TAT TTG CAC TGG	251	6	50-52
	rev	CTC TGG CAG TTG AAA TAA			
PtLFY V3	fwd	GGT GTT TAG GTA TGC C	287	6	50-62
	rev	CAT AAC AAA GTT GAC GGA			
PtMYB58 V2	fwd	AAG CTG GTA ATT TAT ACA C	274	12	48-60
	rev	CAA GTA ATT TAT CCA CCG			
PtNIA1	fwd	ATC AGA CGA TAC TCT GG	231	6	50-62
	rev	GCC TCT CTT TTA CCT GTT C			
PtNIR1 V3	fwd	GGA TTC AGG TCA GAA GTA	355	6	54-62
	rev	CCA ACC CTT GCA TGA G			
PTORK	fwd	TGA TGA AGC TCG TAT TG	229	12	46-52
	rev	GTA ACC ACC TGA AGA TT			
PtPAL1 V2	fwd	ACT GTT AGT CAT GTA TCC	384	6	47-62
	rev	CTC CCT CAC AAA CTT GTA			
PtTFL2 V2	fwd	GGG CTC TGC ATT ATC CCT C	325	6	48-52
	rev	TCA ATG TTA GGA ATT GCT C			

8.1.3 oligo-dT₍₂₅₎

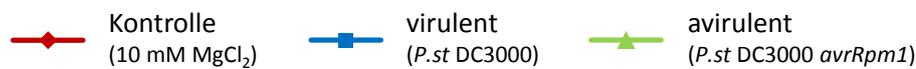
5'- TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN - 3'

wobei V = A/C/G und N = A/C/G/T

8.2 Ergebnisse der qPCR-Messungen der *Arabidopsis*-Zeitreihen

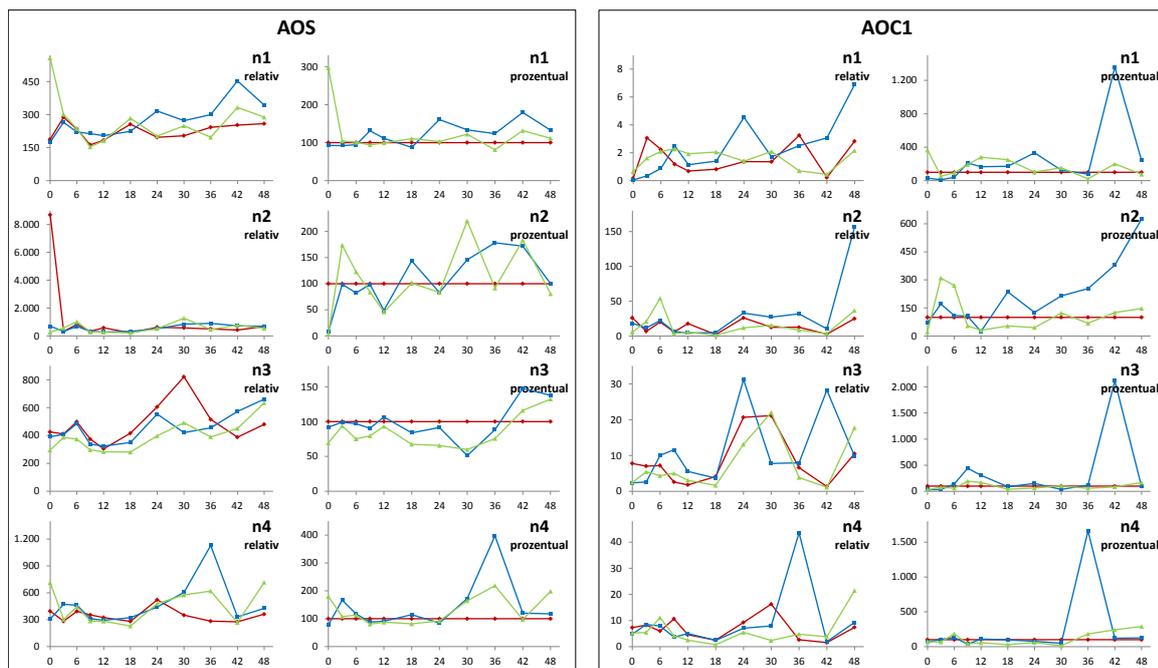
Dargestellt sind hier jeweils nur die Ergebnisse der Zeitreihen, von denen im Anschluss Blütenstiele für die Wiederholung der *Arabidopsis* LMPC-Mikroarrays (siehe 3.2.4) verwendet wurden. Die Wiederholung n1 entstammt dabei der Zeitreihe IV, die Wiederholungen n2-n4 gehören zur Zeitreihe V (siehe 2.2.4).

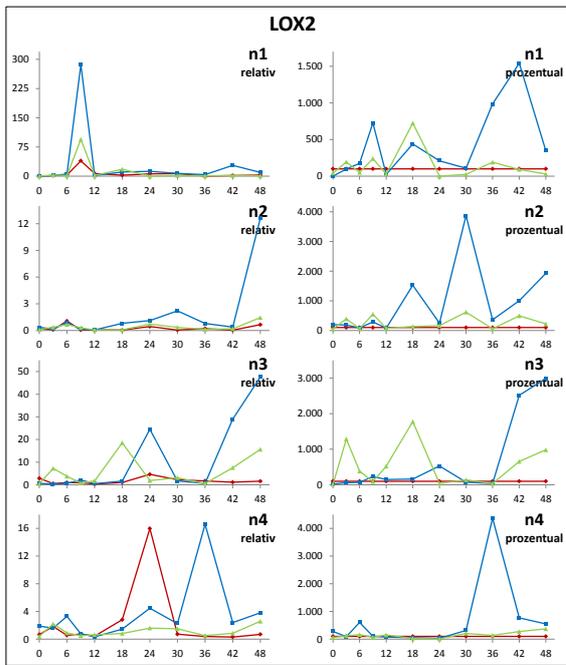
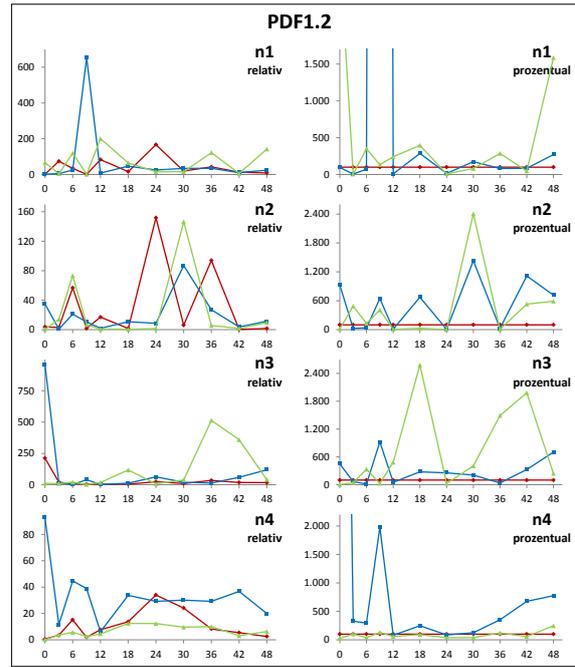
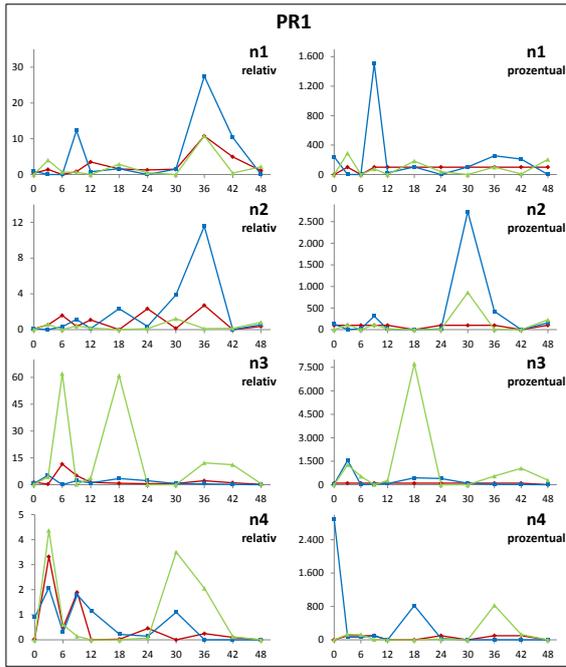
8.2.1 Blütenstiele (IS) infiltrierter Pflanzen



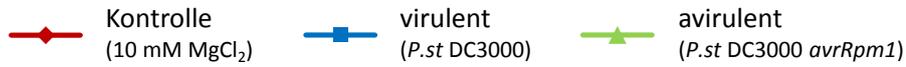
x-Achse: hpi

y-Achse: relative Expression (Moleküle/10.000 Molekülen Aktin)
prozentual (bezogen auf Kontrolle)



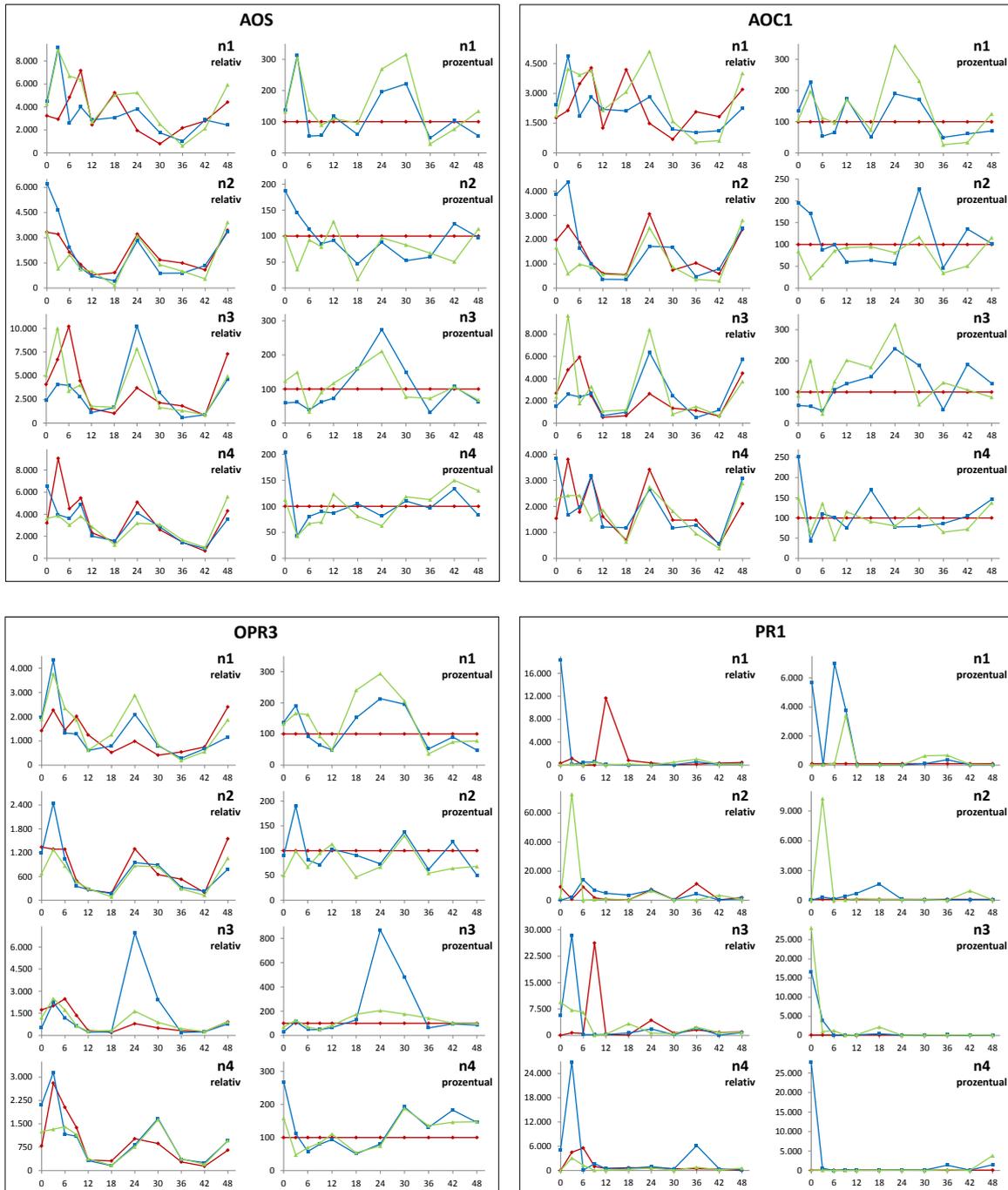


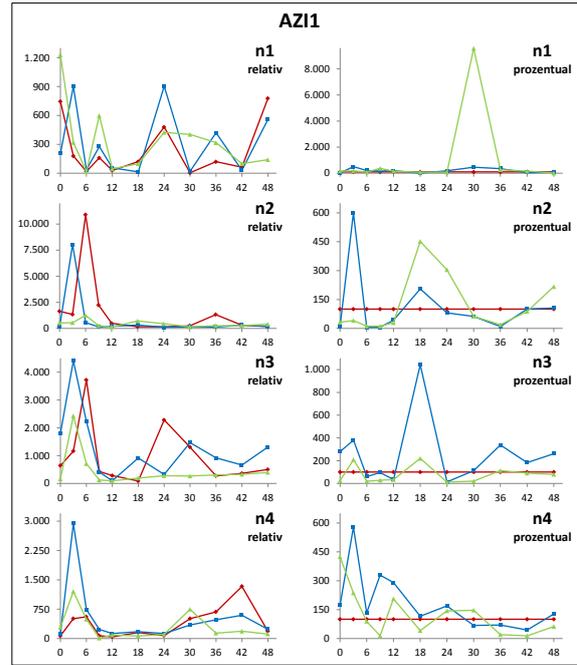
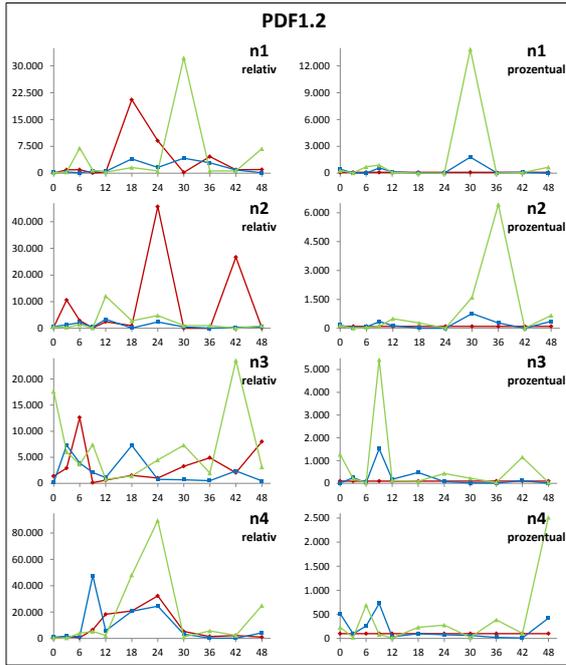
8.2.2 systemische Blätter (SL) infiltrierter Pflanzen



x-Achse: hpi

y-Achse: relative Expression (Moleküle/10.000 Molekülen Aktin)
prozentual (bezogen auf Kontrolle)

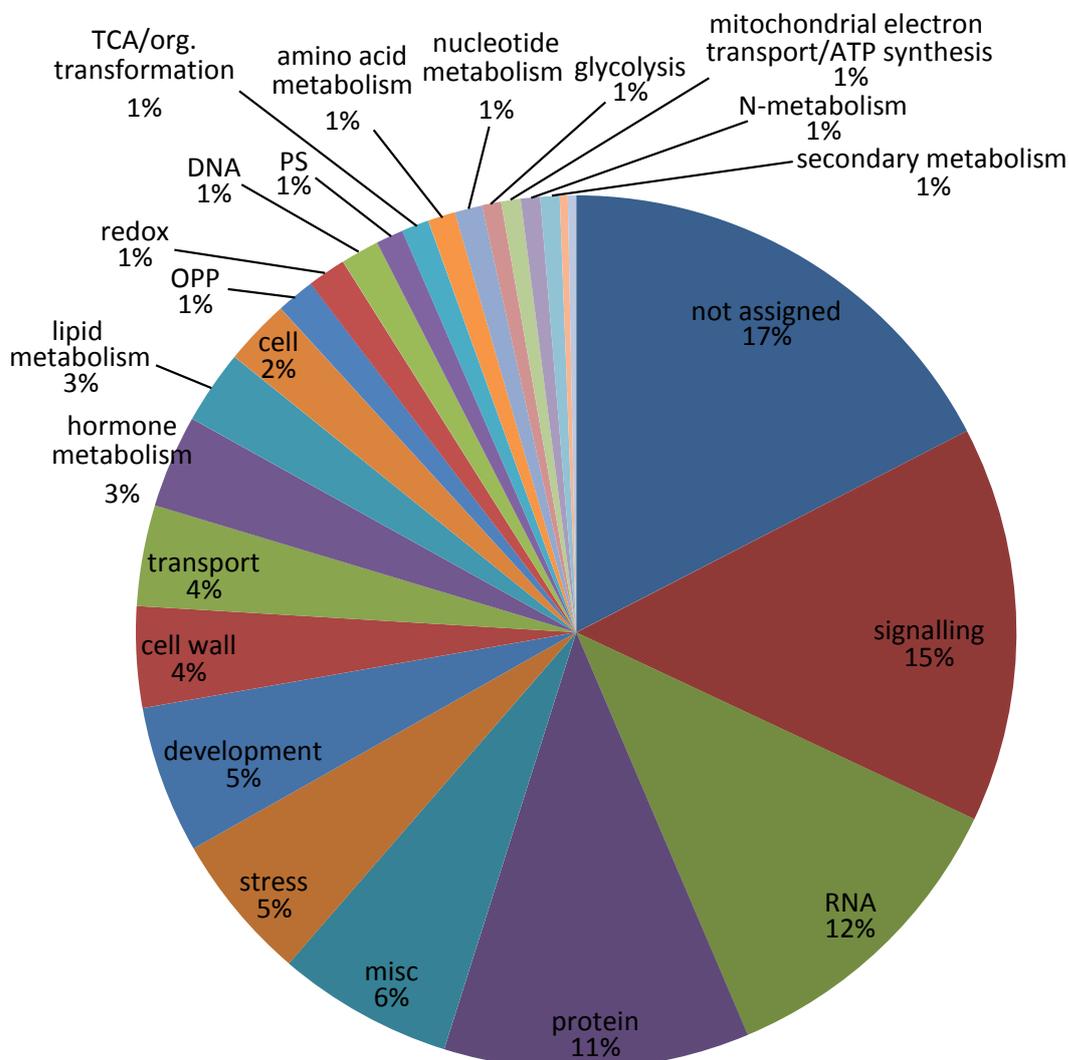




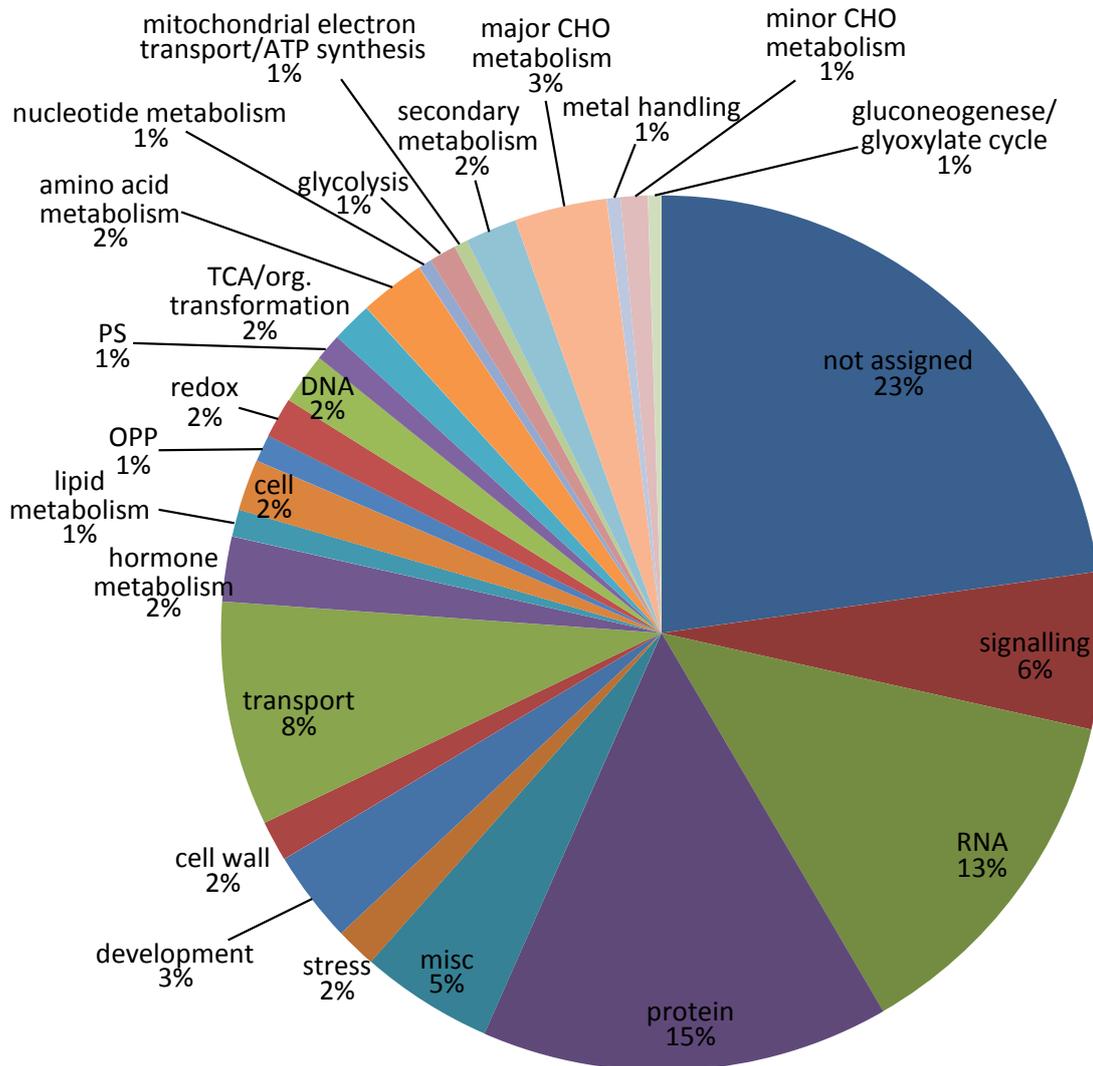
8.3 MapMan-Analyse der Pappel Top 500-Gene

Die 500 am stärksten regulierten Gene (mit AGI-Code-Übereinstimmung) der saisonalen Pappel-Holzstrahlen-Mikroarrays wurden mittels MapMan verschiedenen physiologischen Gruppen zugeordnet. Zwei der 294 im Sommer induzierten Gene wurden dabei in zwei unterschiedliche Kategorien eingeordnet, d. h. die Prozentangaben im Sommer beziehen sich auf 296 Gene, die der späten Ruhephase auf 206.

8.3.1 Im Sommer induzierte physiologische Gruppen



8.3.2 In der späten Ruhephase induzierte physiologische Guppen



8.4 Liste saisonal differenziell exprimierter Gene (Pappel)

Die Expression einiger der auf den saisonalen Pappel-Holzstrahlen-Mikroarrays differenziell exprimierten Transkripte konnte mit den Ergebnissen der Metabolit-Analyse (siehe Abbildung 3-19) im Zusammenhang gebracht werden. In folgender Tabelle sind jeweils die Affymetrix-Namen der Probe Sets (Affy-ID) mit den zugehörigen AGI-Code-Übereinstimmungen (AGI), die Beschreibung des Gens (Annotation), die Induktionsfaktoren (logFC und FC) und die entsprechenden p-values (adj.P.Val) angegeben.

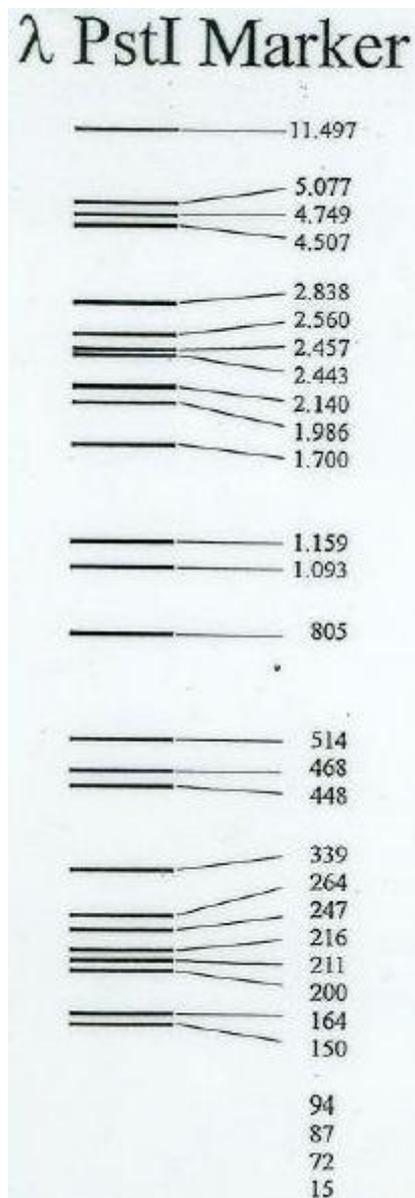
Bei den Induktionsfaktoren bedeutet ein blauer Wert ($FC < 0,5$) in der späten Ruhephase induziert und ein roter Wert ($FC > 2$) im Sommer induziert.

Die Gene in der Liste können den physiologischen Gruppen Stärke- und Zuckermetabolismus (**gelb**), Fettsäuremetabolismus (**grün**), Gefrierschutz (**blau**) sowie Stickstoffassimilation (**orange**) zugeordnet werden.

Affy-ID	AGI	Annotation	logFC	FC	adj.P.Val
PtpAffx.163121.1.S1_at	At3g52600	AtcwiNV2 AtcwiNV2 (Arabidopsis thaliana cell wall invertase 2); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds chr3:19507080-19509273 REVERSE	-7,89	0,004	4,70E-07
PtpAffx.2015.1.S1_s_at	At3g21720	ICL ICL (ISOCITRATE LYASE); catalytic/isocitrate lyase chr3:7652789-7655873 REVERSE	-5,32	0,03	3,03E-05
PtpAffx.2015.1.S1_s_at	At3g21720	ICL ICL (ISOCITRATE LYASE); catalytic/isocitrate lyase chr3:7652789-7655873 REVERSE	-5,32	0,03	3,03E-05
Ptp.5816.1.S1_at	At5g62360	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein chr5:25040699-25041310 FORWARD	-4,95	0,03	6,86E-04
Ptp.5279.1.S1_at	At4g17090	CT-BMY, BAM3, BMY8 CT-BMY (CHLOROPLAST BETA-AMYLASE); beta-amylase chr4:9605266-9607250 REVERSE	-4,66	0,04	6,60E-05
PtpAffx.3724.1.A1_at	At1g56600	AtGolS2 AtGolS2 (Arabidopsis thaliana galactinol synthase 2); transferase, transferring glycosyl groups / transferase, transferring hexosyl groups	-4,19	0,05	2,66E-03
Ptp.7022.1.S1_at	At5g03860	MLS MLS (MALATE SYNTHASE); malate synthase chr5:1032276-1034527 REVERSE	-4,13	0,06	4,52E-04
PtpAffx.103096.1.S1_at	At4g34860	beta-fructofuranosidase, putative / invertase, putative / saccharase, putative / beta-fructosidase, putative chr4:16609955-16612019 REVERSE	-3,87	0,07	9,10E-05
PtpAffx.93131.1.S1_at	At1g69830	ATAMY3, AMY3 AMY3 (ALPHA-AMYLASE-LIKE 3); alpha-amylase chr1:26288518-26293003 REVERSE	-3,85	0,07	1,10E-05
PtpAffx.18295.2.A1_s_at	At3g04120	GAPC, GAPC-1, GAPC1 GAPC1 (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-3,05	0,12	3,94E-03
PtpAffx.18295.2.A1_s_at	At3g04120	GAPC, GAPC-1, GAPC1 GAPC1 (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C SUBUNIT 1); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	-3,05	0,12	3,94E-03
Ptp.3421.2.S1_s_at	At4g29010	AIM1 AIM1 (ABNORMAL INFLORESCENCE MERISTEM); enoyl-CoA hydratase chr4:14297312-14302016 REVERSE	-3,03	0,12	1,20E-04
PtpAffx.141421.1.S1_at	At5g20280	ATSPS1F ATSPS1F (sucrose phosphate synthase 1F); sucrose-phosphate synthase/transferase, transferring glycosyl groups chr5:6844994-6849997 REVERSE	-3,00	0,12	5,60E-03
PtpAffx.212918.1.S1_s_at	At5g04360	ATPU1, ATLDA, PU1 ATLDA (LIMIT DEXTRINASE); alpha-amylase / limit dextrinase/pullulanase chr5:1221566-1228399 FORWARD	-2,94	0,13	4,85E-05
PtpAffx.26085.1.S1_at	At5g27600	LACS7, ATLACS7 LACS7 (LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 7); long-chain-fatty-acid-CoA ligase / protein binding chr5:9742616-9746795 FORWARD	-2,88	0,14	2,18E-03
PtpAffx.23657.1.S1_s_at	At4g02280	SUS3, ATSUS3 SUS3 (sucrose synthase 3); UDP-glycosyltransferase / sucrose synthase / transferase, transferring glycosyl groups chr4:995166-998719 FORWARD	-2,85	0,14	3,92E-03
PtpAffx.44916.2.A1_at	At1g09020	SNF4, ATSNF4 SNF4 (HOMOLOG OF YEAST SUCROSE NONFERMENTING 4); protein kinase activator chr1:2900149-2904212 REVERSE	-2,46	0,18	2,78E-04
PtpAffx.3761.4.S1_at	At5g18670	BMY3, BAM9 BMY3; beta-amylase / catalytic / cation binding chr5:6226138-6227999 FORWARD	-2,40	0,19	1,48E-03
PtpAffx.208467.1.S1_at	At3g06810	IBR3 IBR3 (IBA-RESPONSE 3); acyl-CoA dehydrogenase / oxidoreductase chr3:2146534-2150654 FORWARD	-2,36	0,20	2,20E-03
Ptp.1540.1.S1_a_at	At2g05710	aconitate hydratase, cytoplasmic, putative / citrate hydro-lyase / aconitase, putative chr2:2141591-2146350 FORWARD	-2,24	0,21	5,67E-04
Ptp.1540.1.S1_a_at	At2g05710	aconitate hydratase, cytoplasmic, putative / citrate hydro-lyase / aconitase, putative chr2:2141591-2146350 FORWARD	-2,24	0,21	5,67E-04
PtpAffx.52508.1.S1_x_at	At1g79550	PGK PGK (PHOSPHOGLYCERATE KINASE); phosphoglycerate kinase chr1:29924347-29926295 REVERSE	-2,05	0,24	2,74E-04

Affy-ID	AGI	Annotation	logFC	FC	adj.P.Val
PtpAffx.52508.1.S1_x_at	At1g79550	PGK PGK (PHOSPHOGLYCERATE KINASE); phosphoglycerate kinase chr1:29924347-29926295 REVERSE	-2,05	0,24	2,74E-04
PtpAffx.8465.1.S1_at	At1g62760	invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein chr1:23237574-23238512 REVERSE	-2,01	0,25	1,17E-02
PtpAffx.111009.1.S1_at	At4g16210	ECHIA, E-COAH-2 ECHIA (ENOYL-COA HYDRATASE/ISOMERASE A); catalytic chr4:9176864-9177978 REVERSE	-1,85	0,28	3,90E-04
PtpAffx.111009.1.S1_at	At4g16210	ECHIA, E-COAH-2 ECHIA (ENOYL-COA HYDRATASE/ISOMERASE A); catalytic chr4:9176864-9177978 REVERSE	-1,85	0,28	3,90E-04
PtpAffx.208804.1.S1_at	At2g02860	SUT2, ATSUC3, SUC3, ATSUT2 SUT2 (SUCROSE TRANSPORTER 2); carbohydrate transmembrane transporter/sucrose transmembrane transporter	-1,50	0,35	1,27E-02
PtpAffx.13681.1.S1_s_at	At2g04350	long-chain-fatty-acid-CoA ligase family protein / long-chain acyl-CoA synthetase family protein (LACS8) chr2:1516086-1519178 FORWARD	-1,46	0,36	4,84E-02
PtpAffx.13681.1.S1_s_at	At2g04350	long-chain-fatty-acid-CoA ligase family protein / long-chain acyl-CoA synthetase family protein (LACS8) chr2:1516086-1519178 FORWARD	-1,46	0,36	4,84E-02
Ptp.6081.1.S1_at	At5g42740	glucose-6-phosphate isomerase, cytosolic (PGIC) chr5:17136080-17140622 FORWARD	-1,08	0,47	3,11E-03
Ptp.6563.2.S1_at	At2g36460	fructose-bisphosphate aldolase, putative chr2:15296929-15297732 REVERSE	-1,07	0,48	1,98E-02
PtpAffx.161.1.A1_at	At5g65110	ACX2, ATACX2 ACX2 (ACYL-COA OXIDASE 2); acyl-CoA oxidase chr5:26009821-26012482 REVERSE	-1,03	0,49	2,81E-02
PtpAffx.161.1.A1_at	At5g65110	ACX2, ATACX2 ACX2 (ACYL-COA OXIDASE 2); acyl-CoA oxidase chr5:26009821-26012482 REVERSE	-1,03	0,49	2,81E-02
PtpAffx.2469.1.A1_at	At5g10240	ASN3 ASN3 (ASPARAGINE SYNTHETASE 3); asparagine synthase (glutamine-hydrolyzing) chr5:3212934-3216418 REVERSE	1,25	2,38	7,73E-03
PtpAffx.205004.1.S1_at	At2g31955	CNX2 CNX2 (COFACTOR OF NITRATE REDUCTASE AND XANTHINE DEHYDROGENASE 2); catalytic chr2:13584635-13586484 REVERSE	1,42	2,68	4,09E-03
PtpAffx.249.322.S1_a_at	At5g35630	GS2, GLN2, ATGSL1 GS2 (GLUTAMINE SYNTHETASE 2); glutamate-ammonia ligase chr5:13831220-13833239 FORWARD	1,48	2,80	7,95E-02
PtpAffx.102478.1.A1_at	At1g37130	NIA2, B29, NIA2-1, CHL3, NR, NR2, ATNR2 NIA2 (NITRATE REDUCTASE 2); nitrate reductase (NADH)/ nitrate reductase chr1:14158617-14161652 FORWARD	2,25	4,77	1,53E-02
Ptp.5714.1.S1_at	At1g12940	ATNRT2.5 ATNRT2.5 (nitrate transporter2.5); nitrate transmembrane transporter chr1:4416405-4418337 FORWARD	4,12	17,39	1,92E-04
PtpAffx.82184.1.S1_at	At4g25720	ATQC, QC, QCT QC (GLUTAMINYL CYCLASE); catalytic/ glutaminyl-peptide cyclotransferase chr4:13099929-13102470 REVERSE	4,28	19,48	6,57E-05
PtpAffx.116307.1.S1_at	At3g24090	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)/ sugar binding / transaminase chr3:8697838-8700971 REVERSE	4,31	19,83	2,91E-04
Ptp.5930.1.S1_s_at	At1g77760	NIA1, GNR1, NR1 NIA1 (NITRATE REDUCTASE 1); nitrate reductase chr1:29236005-29239367 REVERSE	5,89	59,12	2,12E-04
PtpAffx.25006.1.S1_at	At2g15620	NIR1, NIR, ATHNIR NIR1 (NITRITE REDUCTASE 1); ferredoxin-nitrate reductase/nitrite reductase (NO-forming) chr2:6810552-6812666 FORWARD	5,94	61,22	1,46E-05

8.5 λ PstI Marker



8.6 verwendete Materialien

8.6.1 verwendete Chemikalien

- **2-Propanol p. A.**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A0900,2500PE 2,5 l
- **2-Mercaptoethanol**
 Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland M-3148 100 ml
- **Agar-Agar, Kobe I**
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland 5210.2 1 kg
- **Ammoniumacetat für die Molekularbiologie**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A2936,0250 250 g
- **Bacto™ Proteose Peptone No.3**
 BD Diagnostic Systems, Sparks, USA 211693 500 g
- **Borsäure z. A.**
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland 1001650500 500 g
- **Bromophenol Blue-Na-salt**
 SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland 15375.01 5 g
- **DEPC BioChemica**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A0881,0250 250 ml
- **Dimethylsulfoxid BioChemica**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A1584,0500 500 ml
- **DNase I, RNase-free**
 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland EN0521 1000 units
- **dNTP Set (4 x 500 µmol of 100 mM solution)**
 Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland R0186 4 x 5 ml
- **EDTA - Dinatriumsalz - Dihydrat zur Analyse**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A3553,1000 1 kg
- **Essigsäure 96 % zur Analyse**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A2618,1000 1 l
- **Ethanol vergällt (1% MEK)**
 Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland K928.3 2,5 l
- **Ethanol Techn. 100% mit 1% PETROLETH**
 BrüggemannAlcohol GmbH, Heilbronn, Deutschland 06052508 200 l
- **Ethidiumbromid**
 Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland 1116150010 10 g
- **GelGreen™ Nucleic Acid Stain, 10,000x in water**
 Biotium Inc., Hayward, USA 41005 0,5 ml
- **Glycerin 87 % zur Analyse**
 AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A3561,2500 2,5 l

- | | | |
|--|-----------------|--------------|
| • Glycogen (RNA grade, 20 mg/ml)
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland | R0551 | 2 x 0.1 ml |
| • Histo-Clear™
National Diagnostics, Atlanta, USA | HS-200 | 3,785 l |
| • HPLC-H₂O ≅ Wasser ROTISOLV® HPLC Gradient Grade
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland | A511.2 | 2,5 l |
| • di-Kaliumhydrogenphosphat wasserfrei reinst Ph. Eur., USP
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A1363,1000 | 1 kg |
| • Kanamycinsulfat BioChemica
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A1493,0025 | 25 g |
| • Lambda DNA
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland | SD0011 | 500 µg |
| • Magnesiumchlorid - Lösung (1 M)
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A3888,0500 | 500 ml |
| • Magnesiumsulfat - Heptahydrat zur Analyse
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A1037,1000 | 1 kg |
| • M-MLV Reverse Transcriptase, RNase H Minus, Point Mutant
Promega Corporation, Madison, USA | M3682 | 10.000 units |
| • PALM® Liquid CoverGlass N
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland | 415190-9020-000 | |
| • Paraplast® embedding media, Paraplast® regular
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | P3558 | 1 kg |
| • Paraplast X-TRA®
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | P3808 | 1 kg |
| • PstI
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland | ER0615 | 10.000 units |
| • RiboLock™ RNase-Inhibitor
Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland | EO0381 | 2.500 units |
| • Ribonucleic acid, transfer (tRNA) from bovine liver
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | R4752-50UN | 50 units |
| • Rifampicin
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A2220,0001 | 1 g |
| • RNase-ExitusPlus™
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland | A7153,0250 | 250 ml |
| • Roticlear®
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland | A538.1 | 1 l |
| • Sigmacote®
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | SL2-100ML | 100 ml |
| • Tetracycline hydrochloride
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | T3383-25G | 25 g |
| • Toluidine blue O
Sigma-Aldrich Chemie GmbH™, Steinheim, Deutschland | T3260 -5G | 5 g |

- **Tris ultrapure**
AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland A1086,0500 500 g
- **Universal-Agarose**
Bio&SELL e. K., Feucht bei Nürnberg, Deutschland 10.351.020 500 g
- **Wachs mit niedrigem Schmelzpunkt**
Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland L4182 1 kg
- **Xylencyanol**
Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland A513.1 10 g

8.6.2 verwendete Kits

- **ABsolute QPCR SYBR® Green Capillary Mix**
Thermo Scientific Abgene, Epsom, UK AB-1285IB
- **BD-SMART™ mRNA Amplification Kit**
BD Biosciences, Clontech, Heidelberg, Deutschland 635001
- **Experion RNA HighSens Analysis Kit for 25 Chips**
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland 700-7106
- **E.Z.N.A.® Plant RNA Kit**
Omega Bio-Tek, Inc., Norcross, USA R6827-01 (50 Reaktionen)
- **QIAquick® Gel Extraction Kit**
QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland 28706 (250 Reaktionen)
- **QIAquick® PCR Purification Kit**
QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland 28106 (250 Reaktionen)
- **RNeasy Micro Kit**
QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland 74004 (50 Reaktionen)
- **SenseAmp Plus amplification kit**
Genisphere, Hatfield, USA SENSEAMP10P

8.6.3 verwendetes Zubehör

- **BD Discardit™ II, 5 ml**
Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland 300849
- **DNA LoBind Tubes**
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland 0030 108.035 (0,5 ml)
0030 108.051 (1,5 ml)
- **Gummihammer**
BayWa AG, München, Deutschland
- **Klingen mit Griffschutz**
A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland SIH1 (100 Stück)
- **Low profile disposable microtome blades, Typ 819**
Leica Microsystems GmbH 14035838925 (50 St.)
- **MembraneSlide NF 1.0 PEN**
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland 415190-9081-000 (50 Stück)
- **MicroTube 500**
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland 415190-9221-000 (1.000 St.)
- **Precellys® Aufschluss Kits/Precellys® Keramik-Kit 1.4 mm**
PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland 91-PCS-CK14
- **Primo® female Luer Einmalspritzen, 2 ml**
CODAN Medizinische Geräte GmbH & Co. KG, Lensahn, Deutschland F81594-3
- **Probenbehälter**
A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland PR02 (2,5 ml)
PR10 (10 ml)
- **Reagiergefäß 1,5 ml**
SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland 72.690 (5.000 Stück)
- **Röhre 50 ml**
SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland 62.547.254 (300 Stück)
- **Rollrandgläser**
A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland RR05 (20 ml)
- **SafeSeal-Tips Professional**
Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland 770030 (10 µl)
770010 (10 µl MicroExtent)
770050 (20 µl)
770100 (100 µl)
770210 (200 µl)
770400 (1000 µl)
- **Spitzen**
SARSTEDT AG & Co., Nümbrecht, Deutschland 70.760.002 (gelb, 200 µl)
70.762 (blau, 1.000 µl)
- **Minisart® Syringe filter, hydrophilic**
Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland 17597 (50 Stück)

8.6.4 verwendete elektronische Geräte

- **Brutschrank UM 100**
Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- **Experion™ Automated Electrophoresis System**
Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- **Gel iX Imager**
Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
- **innova 4230 refrigerated incubator shaker (28 °C)**
New Brunswick Scientific, Edison, USA
- **Laboport Vakuumpumpe**
KNF Neuberger GmbH, Freiburg i. Br., Deutschland
- **Landgraf Thermocycler**
Landgraf Laborgeräte, Langenhagen, Deutschland
- **LightCycler® 2.0 Carousel-based Instrument**
Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
- **Mastercycler ep realplex² und Mastercycler personal**
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- **MWG-Biotech Primus 96^{plus}**
MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- **NanoDrop 2000c Spectrophotometer**
Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
- **Novaspec III Spektralphotometer**
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
- **PALM® MicroBeam (Serial No.: MB03114)**
Carl Zeiss MicroImaging GmbH, München, Deutschland
- **Mini Power Pack P20**
Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
- **QBT digital block heater**
Grant Instruments Ltd., Cambridge, UK
- **Rotationsmikrotom Leica RM2165**
Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
- **Schwingmühle MM300**
Retsch GmbH, Haan, Deutschland
- **Rotary Mixer**
A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
- **Wasserbad TW2.03 (42 °C)**
LTF Labortechnik GmbH & Co. KG, Wasserburg, Deutschland
- **Wasserbad WNB 10**
Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- **Zentrifugen – miniSpin plus, 5430, 5417R und 5810R**
Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

8.7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Das PALM® MicroBeam-System.	4
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des Laser-Strahlengangs im PALM® MicroBeam.....	5
Abbildung 1-3: Zick-Zack-Modell des pflanzlichen Immunsystems.....	9
Abbildung 1-4: Pflanzliche Hormonsignalwege als Antwort auf biotischen Stress.....	14
Abbildung 1-5: Biosyntheseweg der Jasmonsäure.....	17
Abbildung 1-6: Lichtmikroskopische Aufnahme eines <i>P.can</i> Holzquerschnitts	21
Abbildung 1-7: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>P.can</i> Strahlencellen	22
Abbildung 1-8: Lichtmikroskopische Aufnahme des <i>P.can</i> Holzes im Bereich zweier Strahlen....	23
Abbildung 1-9: Regulatorisches Modell der Blütenbildung in <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
Abbildung 1-10: Monolignolbiosynthese über den Phenylpropanoidweg	28
Abbildung 2-1: Einbettung von <i>P.can</i> Holz in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen.....	33
Abbildung 2-2: Mikroskopische Aufnahmen von <i>A.th</i> -Blütenstiel-(obere Reihe) und <i>P.can</i> -Holzquerschnitten (untere Reihe)	37
Abbildung 2-3: Sammeln von „Holzresten“.....	38
Abbildung 2-4: Infiltration einer blühenden <i>Arabidopsis</i> -Pflanze mit <i>Pseudomonas</i>	40
Abbildung 3-1: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus <i>A.th</i> Col-0-Blütenstielen.....	55
Abbildung 3-2: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus je einem entparaffinierten <i>A. th</i> -Blütenstielquerschnitt (1x 20 µm).	56
Abbildung 3-3: Elektropherogramm einer Gesamt-RNA aus entparaffinierten und gefärbten <i>A.th</i> -Blütenstielquerschnitten (2x 20 µm) nach einem Tag Laser Mikrodissektion	57
Abbildung 3-4: Elektropherogramme von Gesamt-RNAs aus entparaffinierten, gefärbten <i>P. can</i> -Holzquerschnitten mit und ohne Behandlung mit PALM® Liquid CoverGlass N (CG) ...	58
Abbildung 3-5: Ordinationsplot der <i>Arabidopsis</i> -Mikroarrays (24 hpi).....	60
Abbildung 3-6: MapMan-Gruppierung der 183 differenziell exprimierten Gene	61
Abbildung 3-7: Vergleich der verschiedenen Mikroarray-Daten.	62
Abbildung 3-8: Effizienz der SAR-Antwort in (nicht) blühenden <i>Arabidopsis</i> Col-0	63
Abbildung 3-9: Effizienz der SAR-Antwort in <i>Arabidopsis</i> Col-0-Blütenstielblättern	65
Abbildung 3-10: qPCR-Messungen in Blütenstielen infiltrierter <i>A.th</i> -Pflanzen (Zeitreihen).....	66
Abbildung 3-11: Ordinationsplot der <i>Arabidopsis</i> -Mikroarrays	67
Abbildung 3-12: Ordinationsplot der <i>Arabidopsis</i> -Mikroarrays	68
Abbildung 3-13: Ordinationsplot der Pappel-Mikroarrays.....	70
Abbildung 3-14: Die 500 am stärksten regulierten Gene, gruppiert mit MapMan.....	73

Abbildung 3-15: Übersicht über die Anzahl der Gene in der KEGG-Analyse	75
Abbildung 3-16: Übersicht über die differenziell exprimierten KEGG-Stoffwechselwege	76
Abbildung 3-17: Differenziell exprimierte GO-Stoffwechselwege.....	79
Abbildung 3-18: Ergebnisse der qPCR-Messungen im Jahresgang #1	82
Abbildung 3-19: Bestimmung der Metabolitgehalte in den saisonalen Holzproben über GC/MS-Messungen.	84
Abbildung 4-1: Zeittafel saisonaler Transkriptlevel	106

8.8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Prozentuale Zusammensetzung des Holzes einiger Baumarten	38
Tabelle 2-2: Verwendete Antibiotika	39
Tabelle 2-3: Übersicht über die durchgeführten Zeitreihen-Experimente	41
Tabelle 2-4: Reaktionsansatz für eine Reverse Transkription.....	45
Tabelle 2-5: Reaktionsansatz für die Voramplifikations-PCR.....	47
Tabelle 2-6: PCR-Programm für die Voramplifikation.....	47
Tabelle 2-7: Standard-Reaktionsansatz (20 µl) für die qPCR	49
Tabelle 2-8: Standard-Cycler-Programm für die qPCR.....	49
Tabelle 2-9: Herstellung der Standardreihen für die qPCR.....	50
Tabelle 3-1: Übersicht über in anderen Arbeiten verwendete Inokula und deren OD ₆₀₀	64
Tabelle 3-2: Liste der in den Jahresgang-Proben via qPCR gemessenen Gene.....	81
Tabelle 4-1: Liste der sieben im Phloemsaft exprimierten und in den LMPC-Proben induzierten Gene.	93
Tabelle 4-2: Gene des JA-Synthesewegs sowie deren Expression auf den Mikroarrays 24 hpi	93

Erklärung

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

Ich habe die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden weder weitere akademische Grade erworben noch zu erwerben versucht.

Würzburg, 15. Dezember 2011

Christina Larisch