

Untersuchungen zur Genexpression in Wurzeln der reblausresistenten Unterlagsrebsorte 'Börner'

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Alexandra Dietrich
geb. am 10.02.1976 in Mainz

Mainz, 2005

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2006

**In Gedenken an
meinen Vater**

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Reblausproblematik	1
1.2 Entwicklung von Blattgallen und Wurzelnodositäten bzw. -tuberositäten an anfälligen und toleranten Reben	4
1.3 Entwicklung von Nekrosen an Blättern und Wurzeln der resistenten Unterlagsrebsorte 'Börner'	6
1.4 Cecidogene Substanzen des Reblausseichels	8
1.5 Die pflanzliche Pathogenabwehr	10
1.5.1 Erkennung des Pathogens durch die Pflanze	10
1.5.2 Die Hypersensitivitätsreaktion	12
1.6 Methoden zur differenziellen Genexpressionsanalyse	15
1.6.1 Direkte Analysemethoden	15
1.6.2 Indirekte Analysemethoden	17
1.7 Zielsetzung der Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
2.2 Chemikalien und Reagenzien	24
2.3 Reagenziensätze (Kits)	26
2.4 DNA-Microarraychips	27
2.5 Software	27
2.6 Internetquellen (Stand: 2005)	27
2.7 Puffer und Lösungen	28
2.8 Pflanzenmaterial	30
2.9 Induktion der HR und Isolierung des Wurzelgewebes	31
2.9.1 Experimentell induzierte HR mit IES	31
2.9.2 Reblaus induzierte HR	32
2.9.3 Vergleichsprobe	32
2.10 Isolierung von total-RNA	33
2.10.1 RNeasy [®] Mini Kit (QIAGEN)	33
2.10.2 Isolierung nach Salzmann et al. (1999)	33
2.10.3 Isolierung nach Baiges und Mas (2003)	34
2.10.4 Quantifizierung der RNA	34
2.10.5 Die isolierten RNA-Proben und ihre weitere Verwendung in der Übersicht	34
2.11 cDNA-Subtraktion	35
2.11.1 cDNA-Synthese	35
2.11.2 cDNA-Subtraktion	37
2.11.3 Isolierung differenziell exprimierter Gene	39
2.11.4 Qualitative RT-PCR zur Verifizierung der Ergebnisse aus der cDNA-Subtraktion ..	39
2.11.5 Microarrayanalyse der subtrahierten Proben	40
2.11.6 Verifizierung der Microarrayergebnisse der 2,5-h- und 4,5-h-Probe	45
2.12 Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe	49
2.13 GeneFishing [™] der 1,5-h-Probe	52
2.13.1 Optimierung der PCR-Bedingungen	52
2.13.2 GeneFishing [™] der experimentellen Proben	53
2.14 Quantifizierung der cDNA	54
2.15 Elektrophoretische Auftrennung der cDNA-Fragmenten	55
2.16 Isolierung, Klonierung, Sequenzierung und Annotierung von cDNA-Sequenzen ...	55
2.16.1 Präparatives Gel und Isolierung der cDNA	55
2.16.2 Klonierung isolierter cDNA-Fragmente	56

2.16.3	Plasmidpräparation.....	57
2.16.4	Sequenzierung.....	58
2.16.5	Annotierung.....	58
3.	Ergebnisse.....	59
3.1	Kultivierung der 'Börner'-Wurzeln.....	59
3.2	Induktion der HR.....	59
3.2.1	Experimentell induzierte HR mit IES.....	59
3.2.2	Reblaus induzierte HR.....	60
3.3	Isolierung von total-RNA.....	60
3.4	cDNA-Synthese.....	61
3.5	cDNA-Subtraktion.....	62
3.5.1	2,5-h- und 4,5-h-Probe.....	62
3.5.2	RT-PCR des ESTs Fag-B-IES2,5h-56.....	65
3.5.3	Nullprobe.....	66
3.6	Microarrayanalyse der subtrahierten Proben.....	67
3.6.1	Hybridisierungsqualität.....	67
3.6.2	Ergebnisse der Microarrayanalysen.....	70
3.6.3	Verifizierung der Microarrayergebnisse.....	80
3.7	Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe.....	85
3.7.1	Hybridisierungsqualität.....	85
3.7.2	Ergebnisse der Microarrayanalyse.....	85
3.8	GeneFishing TM der 1,5-h-Probe.....	88
3.8.1	Optimierung der PCR-Bedingungen.....	88
3.8.2	Isolierung differenziell exprimierter Gene.....	88
4.	Diskussion.....	91
4.1	2,5-h- und 4,5-h-Probe.....	91
4.1.1	cDNA-Subtraktion.....	91
4.1.2	Microarrayanalyse.....	93
4.1.3	Differenziell regulierte Gene der 2,5-h- und 4,5-h-Probe.....	97
4.1.3.1	Signale und Signaltransduktion.....	97
4.1.3.2	DNA und RNA assoziierte Gene.....	115
4.1.3.3	Metabolismus.....	121
4.1.3.4	Transport.....	125
4.1.3.5	Proteinmetabolismus.....	127
4.1.3.6	Auxin und Wachstums assoziierte Gene.....	135
4.1.3.7	Photosynthese, Chloroplasten und Licht abhängige Prozesse.....	143
4.1.3.8	Zellwand und Cytoskelett.....	145
4.1.3.9	Abwehr assoziierte Gene.....	148
4.2	Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe.....	163
4.3	GeneFishing TM der 1,5-h-Probe.....	167
4.4	Potenzielle Signaltransduktionswege zur Aktivierung von Resistenzreaktionen durch IES.....	169
5.	Ausblick.....	173
6.	Zusammenfassung.....	175
7.	Literatur.....	176
8.	Anhang.....	193

Abkürzungen

AAA	<i>ATPases associated with different cellular activities</i>
ABA	<i>abscisic acid</i>
Abb.	Abbildung
ABP1	<i>auxin-binding protein 1</i>
abs.	absolut
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
ACP TM	<i>annealing control primerTM</i>
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AIR	<i>auxin-induced in root cultures</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
AOS	Allenoxidsynthase
AP2	Apetala 2
ARF	<i>auxin response factor</i>
ARRO1	<i>adventitious rooting related oxygenase 1</i>
AS	Aminosäure
ATP	Adeninriphosphat
AUX/IAA	<i>auxin/indole-3-acetic acid</i>
AuxRE	<i>auxin-responsive element</i>
Avr	Avirulenz
AXR1	<i>auxin resistant 1</i>
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Blast	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BR	Brassinosteroid
bZIP	<i>basic-domain leucine-zipper</i>
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmodulin
CBL	Calcineurin B
CC	<i>coiled-coil</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinases</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDPK	<i>Ca²⁺ dependent protein kinase</i>
CDS	<i>coding sequence</i>
CHI-B	Chitinase B
CIPK	CBL interagierende Proteinkinase
COI1	<i>coronatine insensitive 1</i>
COP9	<i>constitutive photomorphogenic 9</i>
CRK	Cystein reiche RLK
CTR1	<i>constitutive triple response 1</i>
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
CYP450	Cytochrom P450
DAP3	<i>death-associated protein 3</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DREB	<i>dehydration-responsive element binding</i>
DRP	<i>dynamine-related protein</i>

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECR1	<i>E1-like conjugating enzyme-related 1</i>
EDS1	<i>enhanced disease susceptibility 1</i>
eEF	Elongationsfaktor
EF-hand	<i>elongation factor-hand</i>
eIF	Initiationsfaktor
EIN	<i>ethylen insensitive</i>
ELIP	<i>early light-induced protein</i>
ENOD	<i>early nodulin genes</i>
EREBP	<i>ethylene-responsive-element-binding protein</i>
ERF	<i>ethylene response factor</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
ET	Ethylen
EtOH	Ethanol
F-ATPase	in Mitochondrien- und Thylakoidmembran lokalisierte H ⁺ -ATPase
GDH	Glutamatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
G-Protein	GTPase
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HD	Homeodomän
HIR	<i>hypersensitive-induced response</i>
HR	Hypersensitivitätsreaktion
HRGP	Hydroxyprolin reiches Glycoprotein
Hsp	Hitzeschockprotein
IAOx	Indol-3-Acetaldoxim
IES	Indol-3-Essigsäure
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
JA	<i>jasmonic acid</i>
JMT	SAM:JA-Carboxylmethyltransferase
KRP	<i>kip-related protein</i>
LB	Luria-Bertani
lecRK	Lectin reiche RLK
LiCl	Lithiumchlorid
LMM	<i>lesion mimic mutant</i>
LOB	<i>lateral organ boundarie</i>
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>
LTP	Lipidtransportproteine
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MDAR	Monodehydroascorbatreduktase
MDHA	Monodehydroascorbat
MDR	<i>multidrug-resistance</i>
MeJA	Methyl-JA
MgCl	Magnesiumchlorid
MIP	<i>major intrinsic protein</i>
MKP	MAPK-Phosphatase
MLP	<i>major latex protein</i>

mRNA	<i>messenger RNA</i>
N ₂	Stickstoff
NAC	NAM/ATAF/CUC
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamidnucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat H
NADP-Me	NADP-Malatenzym
NaOCl	Natriumhypochlorid
NBS	<i>nucleotide-binding sites</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDR1	<i>non-race specific disease resistance 1</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Nitratoxidsynthase
NPR1	<i>non-expressor of pathogenesis-related genes 1</i>
NR	Nitratreduktase
O ₂ ⁻	Superoxid
OBF	<i>ocs-element binding factors</i>
OCS	<i>octopine synthase</i>
PA	<i>phosphatidic acid</i>
PAL	Phenylalaninammoniumlyase
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PAT1	<i>phytochrome A signal transduction 1</i>
P-ATPase	in Plasmamembran lokalisierte H ⁺ -ATPase
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDCD4	<i>programmed cell death 4</i>
PhyA	Phytochrom A
PI	Proteaseinhibitor
PID	<i>proliferation, ion and death</i>
PL	Phospholipase
PR	<i>pathogen-related</i>
Pti	Pto interagierend
R	Resistenz
RCC	<i>red chlorophyll catabolite</i>
RCCR	RCC-Reduktase
RLK	<i>receptor-like kinase</i>
RNA	<i>ribo nucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	reverse Transkription
RUB1	<i>related to ubiquitin 1</i>
SA	<i>salicylic acid</i>
SAM	S-Adenosyl-L-Methionin
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SAUR	<i>small Auxin up RNA</i>
SCF	SKP1/CDC53 (Cullin)/F-Box
SCR	SCARECROW
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIPK	<i>SA-inducible protein kinase</i>

SMC	<i>structural maintenance of chromosomes</i>
SON1	<i>supressor of nim1</i>
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
SSH	suppressive subtraktive Hybridisierung
STS	Stilbensynthase
TAM	Tryptamin
TE	Tris-HCl/EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TIGR	<i>The Institute for Genomic Research</i>
TIR	<i>Toll/interleukin-1-receptor</i>
TIR1	<i>transporter resistant 1</i>
TMV	Tabakmosaikvirus
TNE	Tris-HCL/NaCl/EDTA
Ub	Ubiquitin
Usp	<i>universal stress protein</i>
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
V-ATPase	im Tonoplasten (Vakuole) lokalisierte H ⁺ -ATPase
Vol	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
WAK	<i>wall-associated kinase</i>
WAKL	<i>WAK-like</i>
WIPK	<i>wound-inducible protein kinase</i>
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactopyranosid

Aminosäuren und Nukleotide

A	(Ala)	Alanin
C	(Cys)	Cystein
D	(Asp)	Asparaginsäure
E	(Glu)	Glutaminsäure
F	(Phe)	Phenylalanin
G	(Gly)	Glycin
H	(His)	Histidin
I	(Ileu)	Isoleucin
K	(Lys)	Lysin
L	(Leu)	Leucin
M	(Met)	Methionin
N	(Asn)	Asparagin
P	(Pro)	Prolin
Q	(Gln)	Glutamin
R	(Arg)	Arginin
S	(Ser)	Serin
T	(Thr)	Threonin
V	(Val)	Valin
W	(Trp)	Tryptophan
Y	(Tyr)	Tyrosin
a		Adenin
c		Cytosin
g		Guanin
t		Thymin

1. Einleitung

1.1 Die Reblausproblematik

In der zweiten Hälfte des 19. Jahrhunderts aus Nordamerika mit amerikanischen Reben eingeschleppt, stellt die Reblaus (*Dactylosphaera vitifoliae* FITCH) seither in Europa einen bedeutenden Schädling im Weinbau dar. Innerhalb der Ordnung *Homoptera* gehört die Reblaus zur Familie der Zwergläuse (*Phylloxeridae*). Sie gilt als Parenchymsauger und ist spezialisiert auf den Befall von Weinreben [Kellow et al., 2004; Remane et al., 1976; Vogt und Schruft, 2000]. Ihr sowohl oberirdisch als auch im Boden verlaufender Entwicklungszyklus wurde bereits mehrfach in der Literatur eingehend beschrieben [Schirra, 1999; Vogt und Schruft, 2000].

Bei einer Infektion anfälliger Rebsorten kommt es zu einem typischen Schadbild an Blättern oder Wurzeln. Der Befall der Blattorgane beginnt im Frühjahr mit dem Schlüpfen der Maigallenlauslarve aus dem sog. Winterei. Die ausgewachsene Maigallenlaus induziert die Bildung von Gewebewucherungen, Blatt- oder auch Beutelgallen genannt (siehe Abb. 1.1), in die sie über einen Zeitraum von vier bis fünf Wochen parthenogenetisch bis zu 1200 Eier ablegt. Aus diesen Eiern schlüpfen ausschließlich weibliche Blattrébläuse, die ihrerseits über drei bis sechs Generationen Gallen induzieren und sich parthenogenetisch fortpflanzen. Der Befall der Blattorgane stellt in der Regel für den Rebstock keine lebensbedrohliche Situation dar.

Im Verlauf der Blattréblausgenerationen entwickeln sich einige Rébläuse zu ebenfalls weiblichen Wurzelläusen und wandern in den Boden ab. Dort pflanzen sie sich parthenogenetisch über vier bis sechs Generationen fort. Der Befall jüngerer Wurzeln führt zu gallenähnliche Strukturen, Nodositäten genannt (siehe Abb. 1.1), die der Pflanze im Allgemeinen wenig Schaden zufügen. An älteren, bereits verholzten Wurzelbereichen kommt es zur Bildung von Tuberositäten. Dabei handelt es sich ebenfalls um Gewebewucherungen in deren Folge Sekundärinfektionen, ausgelöst durch Mikroorganismen, auftreten und zum Absterben größerer Wurzelbereiche führen können (siehe Abb. 1.1). Dies bedeutet für den betroffenen Rebstock eine verminderte Nährstoff- und Wasseraufnahme, was zu einer erheblichen VitalitätseinbuÙe bis hin zum Absterben der Pflanze führen kann [Presser, 1993; Vogt und Schruft, 2000].

Im Laufe des Sommers entwickeln sich einige der Wurzelläuse zu geflügelten Formen, den Nymphen, und wandern zurück an die Oberfläche. Durch ihre erworbene Mobilität tragen diese Nymphen zur weiteren Schädlingsverbreitung bei und setzen zudem einen wichtigen

Entwicklungsprozess in Gang. Die Nymphen legen Eier an die Rebstockborke ab, aus denen sowohl weibliche als auch männliche Rebläuse schlüpfen. Diese überleben nur wenige Tage und dienen ausschließlich der geschlechtlichen Fortpflanzung. Dieser Vorgang ermöglicht die Entstehung neuer Reblausbiotypen [Forneck et al., 1999; King und Rilling, 1991]. Das Weibchen legt nur ein einziges befruchtetes Ei unterhalb der Rebstockborke ab, das Winterei, aus dem im Folgejahr wieder die Maigallenlauslarve schlüpft und sich somit der Kreislauf schließt.



Abb. 1.1: Reblausbefall anfälliger Reben

a) Reblätter mit Gallen; b) Wurzel mit Rebläusen; c) Wurzel mit Nodosität; d) abgestorbener Wurzelbereich nach Sekundärinfektion; Quelle (Abb. a und d): J. Herrmann, LWG Bayern

Die Ausprägung der beschriebenen Symptome an Blättern und Wurzeln hängt zum einen von der Aggressivität des Reblausbiotyps ab und zum anderen von der befallenen Rebsorte [Schäller, 1959]. Die aus dem Ursprungsland der Reblaus stammenden Amerikanerreben zeigen eine hohe Anfälligkeit für die oberirdisch lebenden Blatträusler und eine ausgeprägte Gallenbildung, die jedoch nur wenig Auswirkung auf die Vitalität der Pflanze hat. Dagegen vertragen sie in der Regel einen hohen Befallsdruck des Schädling an der Wurzel [Schmid et al., 1999; Vogt und Schruft, 2000]. Bei den überwiegend als reblautolerant geltenden Amerikanerreben kommt es zwar zur Bildung von Nodositäten und Tuberositäten, doch diese überstehen die Rebstöcke weitgehend unbeschadet, da auftretende Sekundärinfektionen bei

diesen Rebsorten nicht in tiefere Geweberegionen vordringen können [Niklowitz, 1955; Schmid et al., 1999]. Unter den Amerikanerreben gibt es zudem Typen, die auch eine vollständige Reblausresistenz aufweisen, wie z.B. die Wildtypen *Vitis rotundifolia* und *Vitis cinerea* [Schmid et al., 1999]. So ist in Nordamerika durch die Entstehung toleranter und resistenter Typen ein beidseitiges Miteinander von Amerikanerrebe und Reblaus im Verlauf der Koevolution beider Organismen möglich geworden.

Anders sieht es dagegen bei den Europäerreben (*Vitis vinifera* L.) aus. Zwar zeigen diese im Freiland eine sog. Feldresistenz gegenüber dem Befall mit Blattrebläusen [Presser, 1993], sie sind jedoch anfällig für eine Infektion der Wurzeln. Insbesondere die Bildung von Tuberositäten führt bei den Europäerreben zu einer erheblichen Schädigung der Wurzeln bis hin zum Stockausfall [Presser, 1993; Vogt und Schruft, 2000].

Als biologische Bekämpfungsmaßnahme greift man mittlerweile auf die Rebenveredelung zurück. Dabei werden die Europäerreben als fruchttragendes Edelreis auf tolerante oder resistente Unterlagsreben gepfropft, die den Wurzelstock stellen. Die meisten Unterlagsorten sind reblautolerant und Abkömmlinge amerikanischer Wildtypen (*Vitis riparia*, *Vitis rupestris*, *Vitis berlandieri*) [Schmid et al., 1999]. Neben den Sorten 'Rici' und 'Cina' gehört 'Börner' zu den wenigen zugelassenen, vollständig reblausresistenten Unterlagen [Porten und Hoffmann, 2004]. Sie ist eine Kreuzung zweier amerikanischer Wildreben, *Vitis riparia* 183 Geisenheim und *Vitis cinerea* Arnold [Schmid et al., 1999]. Als resistente Sorte reagiert 'Börner' auf einen Reblausbefall der Blatt- und Wurzelorgane mit einer Hypersensitivitätsreaktion (HR). Es kommt dabei zum Absterben der Zellen im lokalen Umfeld der Infektionsstelle, sichtbar durch die Entstehung dunkelbrauner bis schwarzer Nekroseflecken an Blättern und Wurzeln [El-Nady, 2001]. Dem Schädling wird damit die Lebensgrundlage entzogen. Die Reblaus kann sich an der Pflanze weder ernähren noch fortpflanzen und wandert ab oder verhungert an der Einstichstelle [Anders, 1957; Börner, 1943].

Diese ideale Kombination aus Edelreis und reblautoleranter bzw. resistenter Unterlage führte auch tatsächlich in Europa zu einer Eindämmung der Reblausverbreitung, nicht jedoch zu einer vollständigen Ausrottung des Schädlings. So konnte in den 1990igern wieder eine vermehrte Verbreitung der Reblaus in Deutschland beobachtet werden [Hermann, 1995; Schirra, 1999]. Als mögliche Ursachen werden ein zunehmend milderes Klima, das Auftreten neuer, aggressiverer Reblausbiotypen und eine unzureichende Weinbergspflege diskutiert [Schirra, 1999; Porten und Hoffmann, 2004; Presser, 1993]. Verwilderte, unbewirtschaftete Weinbauflächen, die nicht ordnungsgemäß gepflegt werden, tragen dazu bei, dass es zu

Stockausschlägen von Unterlagen kommt, die durch ihre meist ausgeprägte Blattgallenbildung erheblich zur Reblausverbreitung beitragen. Auch der Wiederaufbau wurzelechter Europäerreben unterstützt diese Entwicklung [Porten und Hoffmann, 2004]. Das führt mittlerweile dazu, dass die meist nur reblautoleranten Unterlagsreben dem steigenden Populationsdruck des Schädling nicht mehr standhalten können und Wuchsdepressionen entwickeln [Rühl, 1995]. Zusätzlich führen veränderte Bewirtschaftungsmaßnahmen, wie Begrünung, zunehmende Mechanisierung und reduzierte Stickstoffdüngung dazu, dass die gebräuchlichen Unterlagsreben an manchen Standorten nur noch bedingt leistungsfähig sind [Press, 1993]. Dies gilt auch für die vollständig resistente Unterlage 'Börner'. Zwar bietet sie einen sehr guten Schutz gegenüber der Reblaus, zeigt jedoch eine hohe Chloroseanfälligkeit und ist daher nicht für alle Standorte optimal geeignet [Hermann, 1995].

Im Hinblick auf die wieder zunehmende Reblausverbreitung und die sich ändernden Anforderungen an die Unterlagen ist daher die Erzeugung neuer reblausresistenter Unterlagssorten mit besseren weinbaulichen Eigenschaften von großer Bedeutung. Hierbei kann die grüne Gentechnik die klassische Kreuzungszüchtung unterstützen und beschleunigen.

1.2 Entwicklung von Blattgallen und Wurzelnodositäten bzw. -tuberositäten an anfälligen und toleranten Reben

Die in diesem Kapitel geschilderten Entwicklungsvorgänge von Blattgallen, Nodositäten und Tuberositäten stützen sich hauptsächlich auf die detaillierte Beschreibung der Autoren Becker und Brückbauer (1955), Niklowitz (1955) und Sterling (1951).

Der Befall der Blattoberseite betrifft in der Regel junge, noch nicht ausdifferenzierte Blätter. Dabei dringt die Reblaus mit ihrem Stechorgan, dem Stechborstenbündel, auf der Blattoberseite in die zweite bis dritte Zellschicht ein, aus denen sich regulär Palisaden- bzw. Schwammparenchym entwickeln. In unmittelbarer Nähe des Einstichs bildet sich eine Hemmzone aus, in der es zu keiner weiteren Zellteilung kommt. Dagegen zeigt sich in weiterer Entfernung ringförmig um die Einstichstelle eine erhöhte perikline Zellteilung mit nachfolgender Hypertrophie des primär meristematischen Gewebes. Infolgedessen bildet sich ein zusätzliches sekundäres Meristem aus, das Gallmeristem, das den Prozess der Zellteilung weiter aufrecht erhält und verstärkt. Im Verlauf der Wachstumshemmung im direkten Reizfeld und der Wachstumsförderung im weiter entfernten Reizfeld wölbt sich das Gewebe

ringförmig um die Reblaus auf und es kommt zur Entstehung einer Larvenhöhle, in deren Innerem sich die Reblaus befindet.

Die Gallenentwicklung ist nach ungefähr 14 Tagen abgeschlossen und das aus undifferenzierten, parenchymatischen Zellen bestehende Gewebe ist meist 35 bis 40 Zellschichten hoch. In der fertigen Galle ist zudem eine die Einstichstelle ringförmig umgebende nutritive Zone zu erkennen, die eine hohe Einlagerung von Stärke zeigt. Diese nutritive Zone dient dem Insekt als Nährstoffquelle [Kellow et al., 2004].

Je nach Rebsorte fällt die Größe und Ausprägung der Gallen unterschiedlich aus. Dabei kann es zur Ausbildung voll entwickelter Gallen bei anfälligen Reben bis hin zu unterentwickelten Zwerggallen bei toleranten Reben kommen. Weiterhin scheint auch das Blattalter zum Zeitpunkt des Einstiches eine Rolle bei der Entwicklung dieser Gewebewucherungen zu spielen [El-Nady, 2001].

Bei einem Befall junger Wurzelbereiche dringt die Reblaus mit ihrem Stechborstenbündel in die dritte bis vierte Zellschicht embryonalen, meristematischen Gewebes der Wurzelspitze ein. Meist befindet sich der Einstich im Übergangsbereich von Meristem zur Streckungszone. Die Zellen im näheren Umfeld des Reizes hypotrophieren, sodass eine Hemmzone entsteht, während die Zellen in weiterer Entfernung von der Einstichstelle zunehmend hypertrophieren. Infolge dieses Streckungswachstums der Zellen in alle Richtungen kommt es zu einer Anschwellung des Wurzelgewebes auf der gegenüberliegenden Seite des Einstiches und zu einer Krümmung der Wurzelspitze hin zur Infektionsstelle. In dieser Krümmung eingeschlossen befindet sich die Reblaus. Die Bildung eines sekundären Meristems und das Auftreten von Zellteilung scheinen im Nodositätengewebe nicht stattzufinden. Wie im Blattgallengewebe kommt es aber auch in den Nodositäten zur Ausbildung einer mit Stärke angereicherten nutritiven Zone nahe der Infektionsstelle.

Nach etwa 14 Tagen ist die Nodosität vollständig ausgebildet. Nach drei bis vier Wochen unterliegt sie jedoch durch sekundäre Infektionen einem Fäulnisprozess. Trotz dieses Absterbens der befallenen Wurzelspitzen kann die Rebe über weitere Wurzelbereiche ausreichend mit Nährstoffen versorgt werden. Insbesondere Amerikanerreben, die ein schnellwüchsiges Wurzelsystem besitzen, überstehen die Nodositätenbildung ohne nennenswerte Verluste.

Der Befall älterer, bereits verholzter Wurzelbereiche erfolgt kolonieartig durch mehrere Rebläuse. Dabei dringen die Insekten mit ihrem Stechborstenbündel in die vierte bis sechste Zellschicht des Rindenparenchyms ein. Auf den Einstich reagiert das interfaszikuläre Kambium mit der Bildung von Zellen sowohl nach innen in Richtung Markstrahlen als auch

nach außen zum Rindenparenchym. Später ist von diesem Reiz auch das faszikuläre Kambium betroffen und es kommt auch hier zur Hyperplasie. Im entstehenden Gallengewebe bildet sich ein sekundäres Gallmeristem, wodurch die Neubildung von Zellen weiter anhält und verstärkt wird. Infolge dieser vermehrten, tumorartigen Zellbildung wölbt sich das Rindenparenchym knotig auf bis hin zum Aufplatzen der oberen Korkschichten des Periderms. Ähnlich wie bei den Blattgallen und Nodositäten kommt es auch bei den Tuberositäten zur Ausbildung einer stärkehaltigen, nutritiven Zone nahe der Infektionsstelle. Nach einiger Zeit unterliegt die Tuberosität Sekundärinfektionen. Anders als bei den Nodositäten können die dann einsetzenden Fäulnisprozesse zum Absterben größerer Wurzelbereiche führen. Dies hat eine eingeschränkte Nährstoff- und Wasseraufnahme zur Folge und kann das Absterben des Rebstockes hervorrufen.

Amerikanerreben verkraften die Tuberositätenbildung sehr viel besser. Die Ursache liegt vor allem in der Bildung eines Trenngewebes, das die Tuberosität vom weiter innen liegenden Wurzelgewebe isoliert und somit den Fäulnisprozess aufhält. Dieses Trenngewebe ist in Amerikanerreben im Gegensatz zu Europäerreben besonders stark ausgebildet und verleiht diesen Sorten eine Toleranz gegenüber der Reblaus. Zusätzlich wird auch eine engere Anordnung der Marktstrahlen, die ebenfalls das Eindringen der Tuberosität in tiefere Geweberegionen verhindert, für die Reblautoleranz der Amerikanerreben verantwortlich gemacht [Schmid et al., 1999].

1.3 Entwicklung von Nekrosen an Blättern und Wurzeln der resistenten Unterlagsrebsorte 'Börner'

Im Gegensatz zu anfälligen und toleranten Rebsorten reagiert die resistente Sorte 'Börner' in der Regel auf einen Reblausbefall mit der Bildung von Nekrosen an Blättern und Wurzeln. Der bereits in Kapitel 1.2 geschilderte Befallsvorgang führt dabei zum Absterben der betroffenen Zellen und entzieht damit dem Schädling die Lebensgrundlage. Infolgedessen bleibt eine nachhaltige Beeinträchtigung der Pflanze aus [Anders, 1957; Börner, 1943].

Eingehend untersucht wurden diese Prozesse von El-Nady (2001) an Blättern und Wurzeln der Unterlagsrebe. Er konnte zeigen, dass der zeitliche Verlauf und die Ausprägung der Nekrose in engem Zusammenhang mit dem Alter des betroffenen Gewebes stehen. Je älter das Gewebe, desto länger dauert die Ausbildung der Nekrose.

El-Nady beobachtete an jungen, noch nicht entfaltetten Blättern sowie wenig differenzierten Wurzeln eine schnell verlaufende Nekrosereaktion vom Typ I (siehe Abb. 1.2). Bereits fünf

Stunden nach dem Befall konnte er eine Braunfärbung des Gewebes im Einstichbereich aufgrund der Einlagerung phenolischer Substanzen feststellen. Die betroffenen Zellen starben nach 12 bis 24 Stunden unter Ausbildung einer Nekrose ab.

Dagegen konnte El-Nady an bereits entfalteten Blättern sowie stärker differenzierten Geweberegionen im Streckungszonenbereich der Wurzeln eine Nekrosereaktion vom Typ II beobachten. 12 Stunden nach dem Befall stellte er an den Wurzeln eine um die Einstichstelle begrenzte Braunfärbung fest. Zellen im näheren Umfeld blieben dagegen zunächst lebensfähig. Die daran angrenzende Zone im weiter entfernten Bereich der Einstichstelle zeigte jedoch nach 24 Stunden die Einlagerung phenolischer Substanzen und ein zunehmendes Absterben der betroffenen Zellen (siehe Abb. 1.2). Im Kontaktbereich zum gesunden Gewebe konnten Zellwandverdickungen aufgrund von Suberineinlagerungen beobachtet werden. Diese Struktur führte zu einer Isolierung der Einstichstelle. Es kam, wahrscheinlich aufgrund einer Unterversorgung mit Wasser und Nährstoffen, innerhalb von zwei bis fünf Tagen ebenfalls zum Absterben der Zellen im näheren Umfeld der Einstichstelle und zur Ausbildung einer Nekrose. Zudem konnte El-Nady im nekrotisierenden Gewebe charakteristische Prozesse des programmierten Zelltods (PCD – *programmed cell death*) feststellen, wie z.B. die Blasenbildung an der Plasmamembran und die Kernfragmentierung (siehe Kapitel 1.5.2).

Eine ähnliche Entwicklung des Nekrosetyps II konnte El-Nady an den Blättern nachweisen. Hier kam es jedoch im Kontaktbereich zum gesunden Gewebe nicht zur Bildung von Suberin, sondern zur Lignifizierung. Zusätzlich zeigten sich an den Blättern in Ansätzen vergleichbare Reaktionen wie sie bereits in Kapitel 1.2 bei anfälligen und toleranten Reben geschildert wurden. So stellte El-Nady die Ausbildung einer Hemmzone im näheren Umfeld und ein Teilungs- und Streckungswachstum in weiter entfernten Bereichen der Einstichstelle fest, das zu einer Verdickung des betroffenen Gewebes führte. El-Nady konnte zudem zeigen, dass ältere Blätter auf einen Reblausbefall mit der Bildung rudimentärer Gallen reagieren. Jedoch stellte er keine Eiablage des Schädling in diesen Gallen fest und beobachtete das Absterben der Zellen im betroffenen Gewebe ca. fünf Wochen nach dem Zeitpunkt des Einstiches. Damit konnte auf ein höheres Abwehrpotenzial der Wurzeln im Vergleich zu den Blättern geschlossen werden.

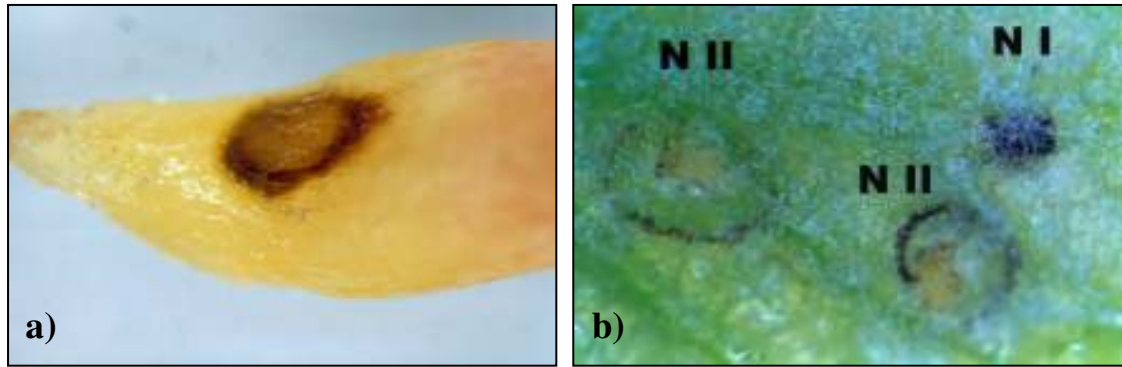


Abb. 1.2: Nekrosebildung bei 'Börner'

a) Nekrose vom Typ II an der Wurzel; b) Nekrose vom Typ I (NI) und Typ II (NII) am Blatt; Quelle: El-Nady (2001)

1.4 Cecidogene Substanzen des Reblauspeichels

Liegt keine Virusübertragung durch das Insekt vor, ist in der Regel der Speichel des Schädling für die Induktion von Wachstumsveränderungen oder Schädigungen der Pflanze verantwortlich [Miles, 1999]. So konnte Schäller (1968) im Speichel der Reblaus und anderer Aphidenarten proteolytische Enzyme und phenolische Substanzen sowie Aminosäuren (AS) und das Pflanzenwachstumshormon Indol-3-Essigsäure (IES) feststellen. Während dem Insekt proteolytische Enzyme zur Nutzung des Pflanzengewebes als Nährstoffquelle und phenolische Substanzen vermutlich zur Abwehr dienen [Miles, 1999], geht Schäller von einer Gallen bildenden (cecidogenen) Funktion der AS und der IES aus. Dabei konnte er in vergleichenden Untersuchungen mehrerer Aphidenarten feststellen, dass der IES-Gehalt im Speichel mit der Fähigkeit zur Gallenbildung korreliert. Aphidenarten, die besonders starke Wachstumsanomalien des Pflanzengewebes verursachen, weisen auch eine hohe Konzentration des Hormons im Speichel auf.

Schäller (1966) konnte zudem zeigen, dass eine experimentelle Applikation von AS-Gemischen und IES an Blättern und Wurzeln anfälliger Rebsorten zur Bildung Gallen ähnlicher Strukturen führt. Er setzte diese Substanzen in z. T. unphysiologisch hohen Lösungskonzentrationen zwischen 5 und $5 \cdot 10^{-7}$ % ein. Dabei erwies sich die Applikation hoher Konzentration als besonders wirksam bei der Bildung von Wachstumsanomalien. Schäller konnte weiterhin feststellen, dass vor allem die Kombination aus AS-Gemischen und IES ähnliche Gallenstrukturen hervorruft wie sie bei einer natürlichen Reblausinfektion auftreten. Er stellte zudem fest, dass auch die AS- oder die IES-Lösung alleine zur Bildung kleinerer Gallen ähnlicher Strukturen ausreicht.

El-Nady (2001) konnte ebenfalls zeigen, dass durch die Applikation von IES-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 0,001 % Wachstumsanomalien an Blättern und Wurzeln anfälliger Reben induziert werden können. Er konnte weiterhin feststellen, dass eine IES-Behandlung bei 'Börner' keine Wachstumsveränderungen hervorruft, sondern zur Bildung von Nekrosen an Blättern und Wurzeln führt (siehe Abb. 1.3). Keinen Unterschied in der Nekrosebildung konnte er zwischen der Applikation von IES-Lösungen und von Kombinationen aus IES und AS beobachten. Aufgrund dieser Ergebnisse geht El-Nady davon aus, dass die AS bei der Nekroseinduktion wahrscheinlich keine Rolle spielen.

Die IES gehört als pflanzliches Wachstumshormon zur Familie der Auxine und ist in eine Reihe physiologischer Prozesse involviert. Dazu gehört der Licht und Schwerkraft gesteuerte Tropismus, die Apikaldominanz, das Spross- und Wurzelwachstum sowie die Zellteilung und -streckung [Buchanan et al., 2000; Woodward und Bartel, 2005]. Dabei liegt eine starke Konzentrationsabhängigkeit der Wachstum fördernden Wirkung des Hormons vor. Der optimale Konzentrationsbereich liegt in der Wurzel bei 10^{-10} M und im Spross bei 10^{-5} M. Höhere IES-Mengen führen dagegen zu einer Wachstumshemmung [Strasburger et al., 1991]. Schäller (1959) sieht die Reblaus induzierte Gallenbildung in Verbindung mit der Konzentrationsabhängigkeit des Hormons. Ein hoher IES-Level im Einstichbereich führt zur Ausbildung der in Kapitel 1.2 beschriebenen Hemmzone. Mit zunehmender Entfernung nimmt der IES-Gehalt im Gewebe ab und führt zur Wachstumsförderung und damit zur Gallenbildung. Im Hinblick auf den Resistenzmechanismus vermutet Schäller eine erhöhte IES-Sensibilität der Rebsorte. Er nimmt an, dass die Nekrosereaktion auf eine „für die Pflanzenzelle letal hohen Konzentration des cecidogenen Reizstoffes“ zurückzuführen ist.

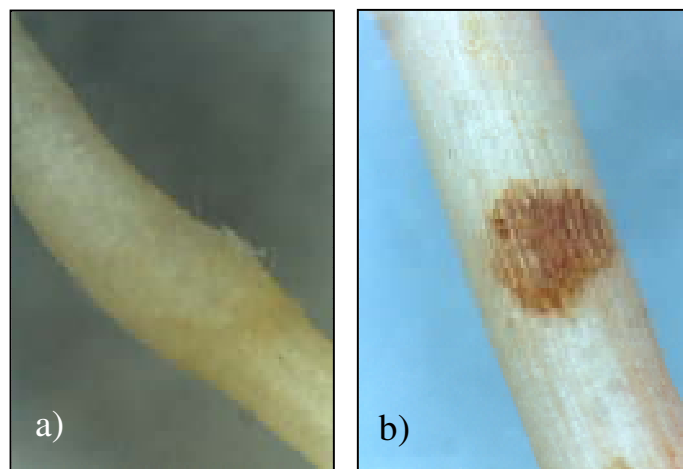


Abb. 1.3: Nach Applikation einer 0,1%igen IES-Lösung
a) Wurzel der anfälligen Ertragsrebsorte 'Riesling' mit Wachstumsanomalie, b) Wurzel der resistenten Unterlagsrebsorte 'Börner' mit Nekrose; Quelle: El-Nady (2001)

1.5 Die pflanzliche Pathogenabwehr

Durch ihre sessile Lebensweise sind Pflanzen in besonderem Maße abiotischen Umweltfaktoren, wie Temperatur, Licht, Feuchtigkeit, sowie biotischen Umweltfaktoren, wie Pathogenen (Viren, Bakterien, Pilzen, Nematoden und Insekten) ausgesetzt. Trotz einer Vielfalt an Pathogenen führen nur wenige Infektionen zu einer Erkrankung der Pflanze. Im Vergleich zu Tieren und dem Mensch besitzen Pflanzen jedoch keine spezialisierten Zellen des Immunsystems, die im Organismus zirkulieren, Krankheitserreger erkennen, inaktivieren und unschädlich machen können. Dennoch verfügen Pflanzen über ein komplexes, hoch flexibles Abwehrsystem, das die Erkennung und Bekämpfung der unterschiedlichsten Pathogene ermöglicht. Dabei nutzen Pflanzen bereits existierende physikalische und chemische Barrieren sowie induzierbare Abwehrmechanismen als Antwort auf einen Pathogenbefall.

1.5.1 Erkennung des Pathogens durch die Pflanze

In der Pathogenerkennung unterscheidet man zwischen der *nonhost* und der *host resistance*. Der am häufigsten vorkommende Abwehrmechanismus ist die *nonhost resistance*. Er schützt Pflanzen im Allgemeinen vor den meisten Pathogenen, insbesondere gegenüber Mikroorganismen, und basiert auf unspezifischen Schutz- und Erkennungsmechanismen. Dabei stellen für viele Pathogene strukturelle Pflanzenbestandteile, wie Kutikula und lignifizierte Zellwände als erste passive Abwehrfront ein unüberwindbares Hindernis dar. Neben dieser physikalischen Barriere tragen zudem antimikrobiell wirkende, meist auch konstitutive vorliegende pflanzliche Sekundärmetaboliten, wie z.B. Saponine und Glucosinolate dazu bei, dass eine Penetration des Pathogens in die Pflanzenzelle verhindert wird. [Mysore und Ryu, 2004; Buchanan et al., 2000]. Bei dieser Form der Pathogenabwehr, die auch als *nonhost resistance* vom Typ I bezeichnet wird, zeigt die Pflanze keine sichtbaren Symptome, dennoch kann es zu ersten aktiven Resistenzreaktionen kommen [Mysore und Ryu, 2004].

Im Fall der *nonhost resistance* des Typs II gelingt dem Pathogen das Überwinden dieser ersten Abwehrfront und es dringt in das Pflanzengewebe ein. Die physikalische Barriere kann durch lysierende Enzyme, natürliche Öffnungen, wie z.B. Stomata, oder Verletzungen sowie durch den Einsatz kauender, stechender oder saugender Mundwerkzeuge, wie im Falle der Reblaus, durchbrochen werden [Kombrink und Somssich, 1995]. Ist dem Pathogen die Penetration gelungen, reagiert die Pflanze im Falle einer *nonhost resistance* auf

Erkennungssubstanzen (Elicitoren) des Pathogens, die unspezifischer Natur sind. Dazu zählen z.B. das bakterielle Flagellin oder Chitine und Glucane aus der Zellwand von Pilzen, Nematoden und Insekten. Ähnlich zur angeborenen Immunität, die man aus Säugerorganismen kennt, scheinen auch Pflanzen sog. *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) zu erkennen. Es handelt sich dabei um konservierte Strukturen von Oberflächenmolekülen, die in diversen Pathogengruppen zu finden sind, in Pflanzen jedoch nicht vorkommen [Mysore und Ryu, 2004; Nürnberger et al., 2002].

Wird das Pathogen als solches erkannt, setzt die Pflanze eine Reihe von Abwehrmechanismen in Gang. Dazu gehört die Bildung reaktiver Sauerstoffformen (ROS – *reactive oxygen species*), Änderungen des zellulären Ionenflusses, strukturelle Veränderungen der Zellwand, Aktivierung von Signalkaskaden, Expression von Abwehrgenen und in der Regel die Ausbildung sichtbarer Symptome in Form einer HR [Heath, 2000b; Mysore und Ryu, 2004].

Dem unspezifischen Erkennungsmechanismus der *nonhost resistance* steht der spezifische Mechanismus der *host resistance* gegenüber. Meist ist dieser Sorten spezifisch und verleiht der Pflanze eine Resistenz gegenüber einem speziellen Pathogen. In der Regel liegt diesem Mechanismus eine Gen-für-Gen-Interaktion zugrunde. Dabei erfolgt eine spezifische Erkennung eines Avirulenz (Avr)-Genprodukts des Pathogens durch das passende Resistenz (R)-Genprodukt der Pflanze. Im einfachsten Fall verläuft diese Reaktion nach dem Rezeptor-Ligand-Modell. Allerdings wird das Mitwirken weiterer Faktoren an einigen Avr/R-Interaktionen diskutiert [Bogdanove, 2002; Bonas und Lahaye, 2002].

Eine Vielzahl von *avr*-Genen konnte bereits aus Bakterien, Viren und Pilzen isoliert werden. Sie alle zeigen eine hohe Diversität. Unter anderem gehören Proteasen dazu [Bonas und Lahaye, 2002]. *Avirulenz*-Gene aus Insekten oder Nematoden konnten bisher noch nicht endgültig identifiziert werden. Man geht aber davon aus, dass es sich bei *avr*-Genen primär um Virulenzfaktoren handelt, die in Pflanzen, denen das entsprechende *R*-Gen fehlt, Krankheitssymptome auslösen [Bonas und Lahaye, 2002; Kaloshian, 2004]. Da *R*-Gene bei der Pathogenerkennung und bei der Initiierung von Abwehrmechanismen beteiligt sind, weisen ihre Genprodukte entsprechende strukturelle Merkmale auf. So zeigen einige *R*-Proteine ein *leucine-rich repeat* (LRR)-Motiv, das Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht und wahrscheinlich für die Rezeptorfunktion verantwortlich ist. Beteiligt an der Signalweiterleitung sind möglicherweise in *R*-Proteinen gefundene sog. *nucleotide-binding sites* (NBS) assoziiert mit einer *Toll/interleukin-1-receptor* (TIR)- oder *coiled-coil* (CC)-Domäne. Es konnten außerdem *R*-Proteine mit einer Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinaseaktivität identifiziert werden sowie Membran gebunden *R*-Proteine als auch Vertreter, die

cytoplasmatisch vorliegen. Eingehend beschrieben wird die Struktur der R-Proteine von Dangl und Jones (2001).

Ist die Pathogenerkennung durch die Pflanze erfolgt, werden in der *host resistance* Abwehrmechanismen aktiviert, die vergleichbar sind mit denen der *nonhost resistance* vom Typ II.

1.5.2 Die Hypersensitivitätsreaktion

Als Reaktion auf einen Pathogenbefall kann es, wie am Beispiel 'Börner', zur Ausbildung einer HR kommen. Dabei führt der Befall sehr schnell zum Zelltod des Pflanzengewebes im lokalen Umfeld der Infektionsstelle. Das betroffene Gewebe nekrotisiert und zeigt im irreversiblen Endstadium eine dunkelbraune bis schwarze Färbung durch die Einlagerung oxidierter phenolischer Substanzen [Heath, 2000a]. Meist ist die HR verbunden mit einer Resistenz der Pflanze gegenüber einem Pathogen. Sie unterliegt einer genetischen Regulation und bedarf eines intakten Metabolismus der Pflanzenzelle. Die HR ist somit ein aktiver Prozess der Pflanze und wird daher auch als eine Form des PCD bezeichnet [Greenberg, 1997; Greenberg und Yao, 2004; Heath, 1998, 2000a]. Im tierischen Organismus ist der PCD (Apoptose) sehr viel besser untersucht als es bei den Pflanzen der Fall ist. Die HR weist jedoch einige typisch Merkmale auf, die auch bei der Apoptose im tierischen Organismus auftreten. Charakteristika der Apoptose sind z.B. DNA-Fragmentierung durch Endonukleasen, Blasenbildung an der Plasmamembran, nukläre und cytoplasmatische Kondensation, Bildung sog. *apoptotic bodies* und die Aktivierung von Caspasen, einer speziellen Familie von Cysteinproteasen. Vergleichbare Enzyme, Reaktionen und morphologische Strukturen konnten auch bei der HR einiger Pflanzen-Pathogen-Systeme nachgewiesen werden [Greenberg 1997; Greenberg und Yao, 2004; Lamb und Dixon, 1997 und in den Artikeln aufgeführte Literaturhinweise]. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, konnte El-Nady (2001) vergleichbare Prozesse auch während der Nekrosebildung bei 'Börner' beobachten.

Die HR kann Bestandteil einer Resistenzreaktion sein, sie muss aber nicht zwangsläufig vorliegen [Bonas und Lahaye, 2002; Heath, 2000a]. Eine wichtige Bedeutung hat die HR bei der Eindämmung biotropher Pathogene, wie z.B. der Reblaus, die die lebende Pflanze als Nährstoffquelle und zur Fortpflanzung benötigt. Das Absterben der Pflanzenzellen in Folge der HR entzieht dem Pathogen die Lebensgrundlage. Anders sieht es dagegen bei einer Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen aus, denen ein Absterben der Zellen keinen direkten Schaden zufügen kann. In diesen Fällen wird deutlich, dass die HR nicht alleine

Ursache für die Resistenz sein kann, sondern lediglich eine von vielen Komponenten eines komplexen Abwehrmechanismus darstellt. Die HR kann indirekt zur Resistenz beitragen, indem sie Signale zur Pathogenabwehr potenziert und weitere Resistenzmechanismen aktiviert [Heath, 1998, 2000a]. Zu diesen Mechanismen, die in einem engen Zusammenhang mit der HR sehr häufig auftreten, gehört z.B. die Bildung von ROS. Dazu zählen reduzierte Formen des atmosphärischen Sauerstoffs, wie das Superoxid (O_2^-) und das Hydrogenperoxid (H_2O_2) [Lamb und Dixon, 1997; Mittler, 2002]. Sie erhöhen die strukturelle Widerstandsfähigkeit der Zellwand und wirken als toxische Substanzen gegen Pathogene sowie als Signalsubstanzen in der pflanzlichen Abwehr [Buchanan et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Lamb und Dixon, 1997; Mittler, 2002; Wan, 2002]. Weiterhin spielen Calcium (Ca^{2+}) und die Pflanzenhormone Ethylen (ET), Jasmonsäure (JA – *jasmonic acid*), Methyl-JA (MeJA) und Salicylsäure (SA – *salicylic acid*) als Signalkomponenten eine wichtige Rolle. [Greenberg, 1997; Heath, 2000a; Hoeberichts und Woltering, 2002; Wan et al., 2002].

Für die weitere Signaltransduktion ist insbesondere die Phosphorylierung von Proteinen durch Kinasen von entscheidender Bedeutung. In der pflanzlichen Pathogenabwehr konnte in diesem Zusammenhang vor allem die Aktivierung von Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) nachgewiesen werden [Wan et al, 2002 und in dem Artikel aufgeführte Literaturhinweise; Zhang und Klessig, 2001].

Die aktivierten Signalkaskaden resultieren u. a. in einer transkriptionellen Reprogrammierung. Dabei sind insbesondere Transkriptionsfaktoren (TFs) aus den Familien WRKY, MYB, *Apetala 2 (AP2)/ethylene-responsive-element-binding protein (EREBP)*, *basic-domain leucine-zipper (bZIP)* und Whirly an der Abwehr bedingten Expressionsregulation beteiligt [Desveaux et al, 2005; Eulgem, 2005; Singh et al., 2002].

Durch diesen Prozess werden Abwehrgene reguliert, deren Genprodukte u. a. zu den sog. *pathogen related (PR)*-Proteinen, Defensinen und Phytoalexinen gehören. Diese Abwehrproteine zeigen eine hohe strukturelle Diversität und können durch ihre toxische Wirkungsweise direkt in der Pathogenezimierung fungieren [Buchanan et al., 2000; Hoffmann-Sommergruber, 2002; Kombrink und Somssich, 1995; Solomon et al., 1999; Urwin et al, 1997; Zinov'eva, 2004].

Neben der lokalen Abwehrreaktion, wie sie in Form einer HR auftreten kann, kommt es in vielen Fällen zusätzlich zur Aktivierung einer systemischen Abwehrreaktion (SAR – *systemic acquired resistance*). An dieser Reaktion sind insbesondere SA als Signalkomponente und PR-Proteine beteiligt. Die SAR sensibilisiert die Pflanze für einen weiteren Pathogenbefall

und ermöglicht somit eine effektivere Abwehrantwort [Buchanan et al., 2000; Eulgem, 2005; Pieterse und van Loon, 2004].

Die oben genannten Abwehrkomponenten und Reaktionen stehen in einem komplexen Netzwerk zueinander. Abbildung 1.4 vermittelt einen Eindruck über die Komplexität der pflanzlichen Pathogenabwehr. Wie diese Reaktionen im Detail funktionieren und untereinander interagieren wird im Diskussionsteil an Hand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eingehender beschrieben.

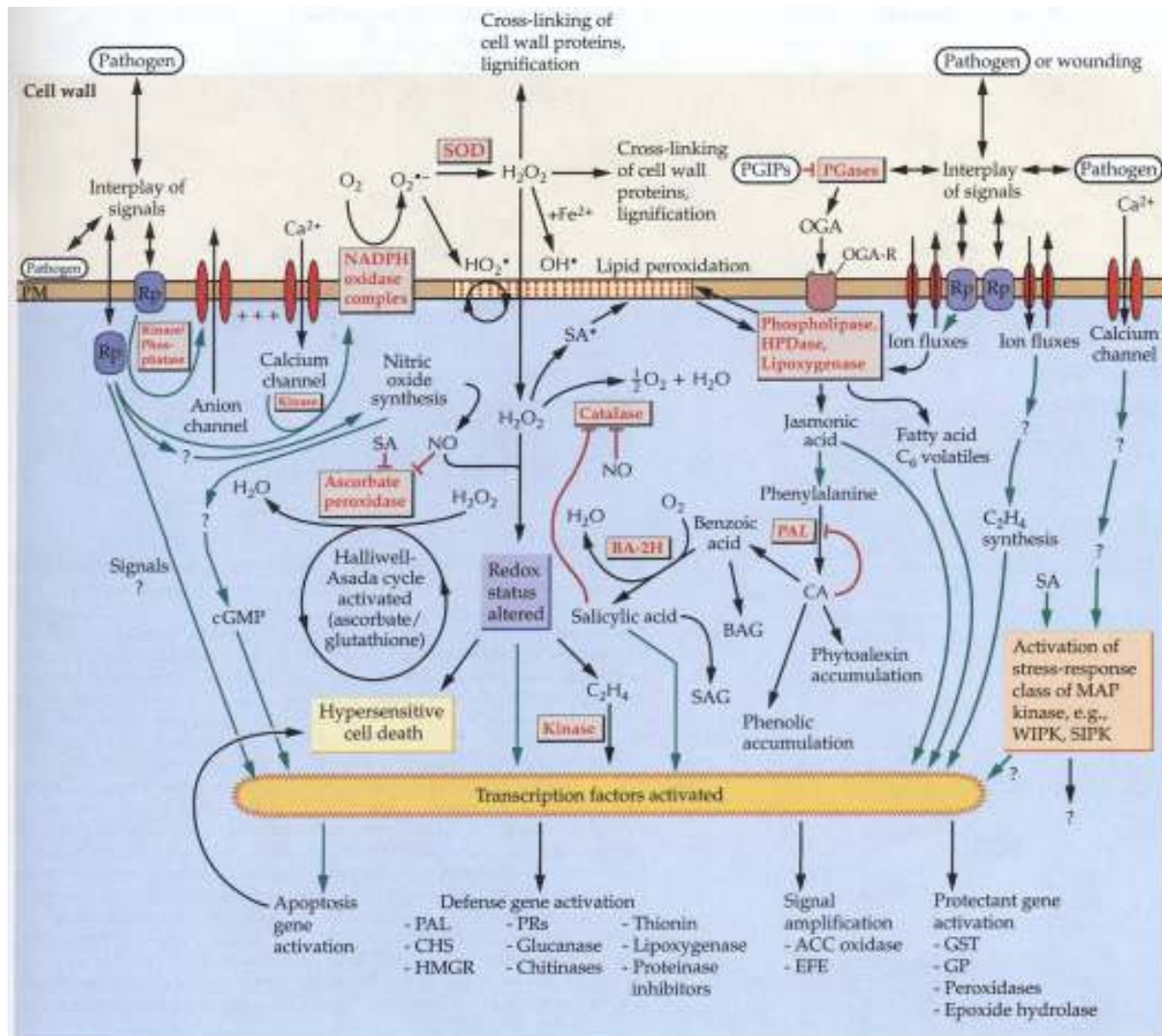


Abb. 1.4: Signaltransduktionswege der pflanzlichen Pathogenabwehr

Hydrogenperoxid (H_2O_2) Stickstoffmonoxid (NO), *salicylic acid* (SA), SA-Glucosid (SAG), Calcium (Ca^{2+}), Sauerstoff (O_2), Superoxid (O_2^-), Plasmamembran (PM), Rezeptorprotein (Rp), Superoxiddismutase (SOD), Eisen (Fe^{2+}), Hydroxyl-Radikal (OH^\bullet), Hydroperoxyl-Radikal (H_2O^\bullet), Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat H (NADPH), Phenylalaninammoniumlyase (PAL), Chalkonsynthase (CHS), Ethylen (C_2H_4), *pathogenesis-related* (PR), 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC), *ethylene-forming enzyme* (EFE), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Glutathion-S-Transferase (GST), Glutathionperoxidase (GP), 3'-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase (HMGR), Mitogen aktivierte (MAP) Kinase, SA-induzierte *protein kinase* (SIPK), *wound-induced protein kinase* (WIPK), Oligogalacturonidfragmente (OGA) und OGA-Rezeptoren (OGA-R), Polygalacturonase (PGase), PGase inhibierende Proteine (PGIPs), *cinnamic acid* (CA), *benzoic acid* (BA), BA-2-Hydroxylase (BA-2H), BA-Glucosid (BAG); Buchanan et al. (2000)

1.6 Methoden zur differentiellen Genexpressionsanalyse

Kenntnisse über die Genexpression tragen dazu bei, physiologische Vorgänge in Pflanzen und anderen Organismen zu verstehen. Von besonderem Interesse sind hierbei Änderungen der Genexpression aufgrund spezieller Einflüsse, denen die Organismen ausgesetzt sind. So kann der Vergleich des Expressionsmusters einer Pflanze unter normalen Lebensbedingungen und unter dem Einfluss eines Pathogens wichtige Informationen über den Krankheitsverlauf oder über einen vorliegenden Resistenzmechanismus liefern.

Die zunehmende Verfügbarkeit kompletter Genomsequenzen und *expressed sequence tags* (ESTs) aus zahlreichen Organismen haben zur Entwicklung einer Reihe von Methoden zur differentiellen Genexpressionsanalyse beigetragen. Diese Techniken erlauben mittlerweile den Vergleich von Expressionsmustern und die Isolierung sowie Charakterisierung differentiell exprimierter Gene mit einer enormen Durchsatzrate und hoher Sensibilität. In der Regel dient dabei die *messenger* (m)RNA als Ausgangsmaterial, da sie die Information über exprimierte und damit aktive Gene in einem bestimmten Zeitfenster enthält [Byers et al., 2000; Donson et al., 2002].

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden Methoden zur differentiellen Expressionsanalyse eingesetzt, um Unterschiede in der Genexpression zwischen hypersensitivem Gewebe (experimentell durch IES bzw. durch einen Reblausbefall induziert) und Normalgewebe der Unterlagsrebe 'Börner' zu detektieren. Dabei umfassten die angewandten Techniken sowohl direkte als auch indirekte Analysemethoden.

1.6.1 Direkte Analysemethoden

Direkte Methoden zur differentiellen Expressionsanalyse schließen Techniken, wie die DNA-Sequenzierung und die Größenfraktionierung amplifizierter cDNA-Fragmente ein. Dazu zählen beispielsweise die sog. ESTs. Es handelt sich dabei um partielle cDNA-Sequenzen, die durch willkürliches Klonieren von mRNA-Spezies erstellt werden. Ein Vergleich der ESTs und der Häufigkeit mit der sie auftreten, erlaubt die Feststellung qualitativer und quantitativer Unterschiede im Expressionsmuster zwischen den zu untersuchenden Proben [Byers et al., 2000].

Eine ähnliche Methode zur direkten Expressionsanalyse ist die sog. *serial analysis of gene expression* (SAGE). Diese Technik erlaubt eine schnelle und quantitative Analyse vieler Transkripte simultan. Sie basiert auf der Tatsache, dass die nach einer enzymatischen Restriktion vorliegenden kurzen DNA-Fragmente (10 bis 14 bp), sog. *tags*, bereits zur

Identifizierung eines Transkriptes ausreichen, wenn sie aus einer bekannten Position im Gen stammen. Die Verkettung mehrerer *tags* ermöglicht zudem eine kostengünstige und schnelle Klonierung sowie Sequenzierung [Donson et al., 2002; Velculescu et al., 1995].

Weitere direkte Methoden zur Expressionsanalyse basieren auf der Größenfraktionierung amplifizierter cDNA-Fragmente. Hierzu zählt das *differential display*. Dabei erfolgt zunächst eine reverse Transkription der mRNA in cDNA mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers. Die Zweitstrangsynthese und cDNA-Amplifikation wird mit arbiträren Primern durchgeführt und die gewonnenen Amplifikate über ein Polyacrylamid- oder Agarosegel aufgetrennt. Über einen Vergleich der Bandenmuster der zu untersuchenden Proben können differenziell exprimierte Gene auffindig gemacht, isoliert und sequenziert werden. Ganz ähnlich verläuft die sog. *random amplified polymorphism (RAP)-PCR*. Der Unterschied liegt darin, dass bereits für die Erststrangsynthese ein arbiträrer Primer verwendet wird [Donson et al., 2002].

Eine Weiterentwicklung des *differential display* ist die *cDNA-amplified fragment length polymorphism (AFLP)-Analyse*. Sie kombiniert eine enzymatische Restriktion mit einer anschließenden PCR-Amplifikation der cDNA. Dabei ermöglichen zwei kombinierte PCR-Schritte, die Präamplifikation und die selektive Amplifikation, eine höhere Reproduzierbarkeit der Ergebnisse [Vos et al., 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurde zur direkten Expressionsanalyse eine *differential-display*-Methode, das sog. GeneFishingTM, angewendet, das im Folgenden näher erläutert wird.

GeneFishingTM-Methode

Diese Methode beruht auf einem besonderen Primerdesign, welches eine spezifische und kontrollierte Bindung des Primers an das Template ermöglicht. Der sog. *annealing control primer (ACPTM)* besteht aus einer 3'-Kernsequenz und einer 5'-Universalsequenz, die durch einen regulatorischen Bereich getrennt sind (siehe Abb. 1.5). Dieser Regulator bildet unter niedrigen Schmelztemperaturen eine Blasen ähnliche Struktur aus, die eine unspezifische Bindung der 5'-Universalsequenz unter Temperaturbedingungen, bei denen die 3'-Kernsequenz optimal an die cDNA bzw. mRNA bindet, verhindert [In-Taek et al., 2003].

Zu Beginn wird die cDNA-Erststrangsynthese mit Hilfe eines Oligo-dT-ACPTM durchgeführt, der mit seiner 3'-Kernsequenz spezifisch die PolyA-Region der mRNA bindet. Im Anschluss erfolgt eine Zwei-Schritt-PCR. Dabei ermöglicht die Bindung der 3'-Kernsequenz eines arbiträren ACPTM an den Erstrang die Synthese des zweiten cDNA-Strangs in einem PCR-Zyklus. Die Bedingungen sind dabei so gewählt, dass der Oligo-dT-ACPTM in diesem Reaktionsschritt nicht mehr binden kann. Die danach folgende Amplifikation findet unter

solch hohen Stringenzbedingungen statt, dass nur die 5'-Universalsequenzen untereinander, nicht jedoch die 3'-Kernsequenzen der ACPTMs (Oligo-dT und arbiträrer Primer) an die cDNA binden können. Dies ermöglicht die Amplifikation ausschließlich authentischer PCR-Produkte. Dadurch wird mit dem GeneFishingTM im Vergleich zu anderen *differential-display*-Methoden eine geringere Anzahl an Banden erreicht. Zusammen mit dem Einsatz einer hohen dNTP-Konzentration (200 µM) ermöglicht dies die Auftrennung der Amplifikate über ein einfaches Agarosegel. Differenziell exprimierte Gene können bei einem Vergleich der Bandenmuster verschiedener Proben erkannt und cDNA-Fragmente von Interesse zur weiteren Analyse isoliert, kloniert und sequenziert werden [Yun-Lee et al., 2004].

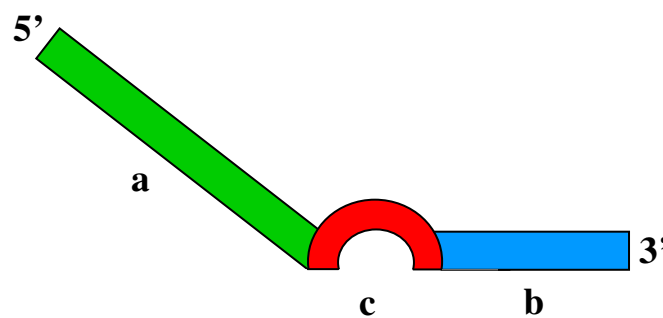


Abb. 1.5: ACPTM-Design
5'-Universalsequenz (a), 3'-Kernsequenz (b), Regulator (c)

1.6.2 Indirekte Analysemethoden

Indirekte Methoden zur differentiellen Expressionsanalyse basieren auf dem Prinzip der Hybridisierung komplementärer Nukleotidsequenzen. Hierzu zählt beispielsweise die *northern-blot*-Technik. Dabei erfolgt eine Auftrennung der RNA-Fragmente auf einem Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen. Die RNA wird anschließend auf eine Membran übertragen und kann mit radioaktiv markierten Sonden (DNA oder RNA) hybridisiert werden. Die Sonden binden an komplementäre RNA-Fractionen auf der Membran und können im Anschluss aufgrund ihrer Markierung detektiert werden. Dies ermöglicht eine qualitative sowie quantitative Analyse der Genexpression. Allerdings besteht der Nachteil darin, dass vor allem bei einer radioaktiven Markierung immer nur die Expression eines Gens untersucht werden kann [Hennig, 1998; Weaver und Hedrick, 1997].

Dagegen ermöglichen neuere Techniken zur indirekten Expressionsanalyse, wie z.B. die subtraktive Hybridisierung und die DNA-Microarraytechnik, die simultane Untersuchung vieler Gene. Beide Methoden wurden in der vorliegenden Arbeit angewandt und werden im Folgenden näher erläutert.

Suppressive subtraktive Hybridisierung

Die suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) ermöglicht den Vergleich einer Referenzprobe (*driver*) mit einer Experimentalprobe (*tester*) und basiert auf der Hybridisierung identischer Transkripte beider Proben. Die Amplifikation dieser Hybridisierungsprodukte wird in einer nachfolgenden PCR unterdrückt und damit aus der Probe subtrahiert. Dagegen ermöglicht die PCR eine verstärkte Amplifikation differenziell exprimierter Gene des *testers* [Byers et al., 2000; Diatchenko et al., 1996].

Zunächst erfolgt eine Umwandlung der mRNA-Proben in cDNA, die in einem nachfolgenden Schritt enzymatisch restringiert wird. Kurze cDNA-Fragmente garantieren in der späteren PCR die vollständige Amplifikation der cDNAs, und der Verlust langer Sequenzen kann somit verhindert werden. Die *tester*-cDNA wird in zwei Teilproben aufgetrennt, wobei die Sequenzen jeder Teilprobe an einem Ende mit einem bestimmten Adapter ligiert werden. Während der nachfolgenden ersten Hybridisierung werden beide Teilproben in getrennten Ansätzen mit einem Überschuss an *driver*-cDNA hybridisiert. Daraus resultieren vier mögliche Sequenzfraktionen (siehe Abb. 1.6). So sind in beiden Teilproben differenziell exprimierte Transkripte zu finden, die als Einzelstränge vorliegen aufgrund fehlender komplementärer Sequenzen im *driver*. Es kommen außerdem Transkripte vor, die in hoher Anzahl exprimiert im *tester* auftreten und daher schnell renaturieren. Da die Hybridisierungsreaktion einer Kinetik zweiter Ordnung folgt, dient dieser Schritt der Normalisierung der cDNA-Spezies im *tester*, die in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen können. Weiterhin kommt es zur Hybridisierung solcher Transkripte, die sowohl im *tester* als auch im *driver* exprimiert vorliegen. Da der *driver* in großen Mengen zugegeben wird, sind außerdem überschüssige *driver*-Sequenzen in beiden Teilproben zu finden.

Im zweiten Hybridisierungsschritt werden die *tester*-Teilproben kombiniert und erneut denaturierter *driver* zugegeben. Durch die Hybridisierung differenziell exprimierter Transkripte aus beiden Teilproben des *testers* tritt eine fünfte Sequenzfraktion auf. Nur die Hybridisierungsprodukte dieser Fraktion besitzen zwei verschiedene Adapter und können in der nachfolgenden PCR exponentiell amplifiziert werden. Die Sequenzen der übrigen Fraktionen werden entweder nur linear oder gar nicht amplifiziert.

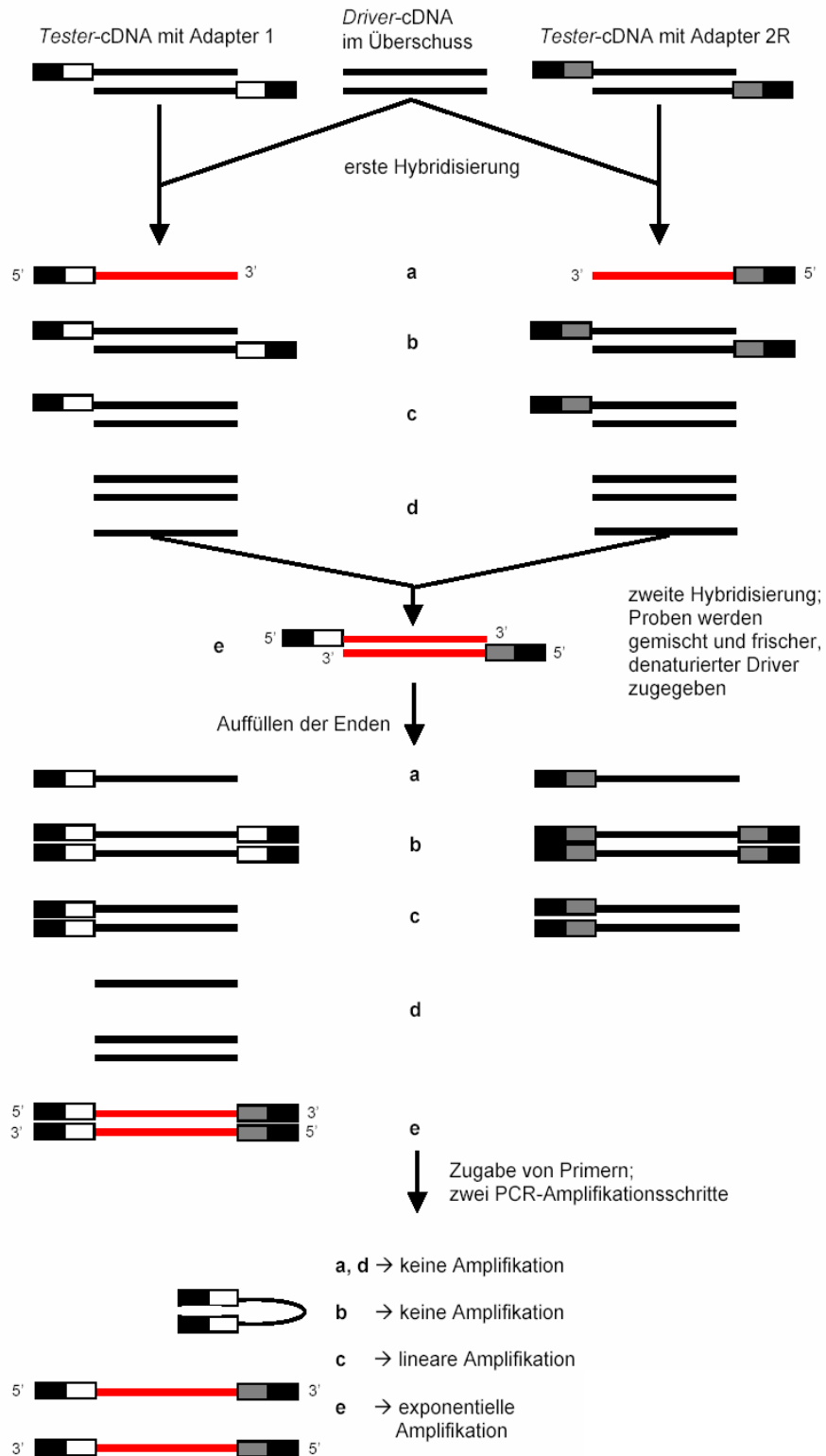


Abb. 1.6: Prinzip der SSH-Methode;

nach der enzymatischen Restriktion der cDNA und der Auftrennung des *testers* in zwei Teilproben; differenziell exprimierte Transkripte des *testers* in rot (a), renaturierte Transkripte des *testers* (b), hybridisierte identische Transkripte in *tester* und *driver* (c), überschüssige *driver*-Sequenzen (d), hybridisierte differenziell exprimierte Transkripte der *tester*-Teilproben (e); verändert nach Diatchenko et al. (1996)

Zudem wird die Amplifikation in zwei PCR-Schritte unterteilt. Dabei soll in der zweiten PCR durch den Einsatz sog. *nested*-Primer, die jeweils spezifisch an einen der beiden Adapter binden, die Amplifikation von Hintergrundprodukten weiter reduziert werden. Dies ermöglicht die Anreicherung differenziell exprimierter Transkripte, die über ein Agarosegel aufgetrennt, dann isoliert, kloniert und zur weiteren Identifizierung sequenziert werden können.

In den nachfolgenden Kapiteln wird diese SSH-Methode als cDNA-Subtraktion bezeichnet.

DNA-Microarrayanalyse

Das Grundprinzip basiert auf der Immobilisierung Gen spezifischer DNA-Fragmente auf einem Träger mit nachfolgender simultaner Hybridisierung zweier zu vergleichender Proben (Experiment und Referenz) mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung. Die DNA-Proben binden an komplementäre Sequenzen auf dem Chip. Ein qualitativer und quantitativer Vergleich der resultierenden Fluoreszenzsignale ermöglicht die Detektion differenziell exprimierter Gene [Duggan et al., 1999; Aharoni und Vorst, 2001].

Man unterscheidet zwischen zwei Formen der Microarraychips. Zum einen die cDNA- (siehe Abb. 1.7) und zum anderen die Oligonukleotid-Microarraychips. Die cDNA-Microarrays gehen auf PCR-Produkte (0,2 bis 2,5 kb lang) zurück, deren Amplifikation an genomischer DNA oder cDNA erfolgt [Aharoni und Vorst, 2001]. Diese gewonnenen Fragmente werden auf einen Glas- oder Membranträger aufgebracht (gespottet) und in der Regel durch UV-Bestrahlung immobilisiert. Die gespotteten Bereiche, die jeweils aus einer DNA-Spezies bestehen, werden als Spots bezeichnet. Während es sich bei den Membranen üblicherweise um Nitrocellulose oder geladene Nylonmembranen handelt, dienen als Glasträger in der Regel Objektträger aus der Mikroskopie. Diese sind mit einer speziellen Beschichtung aus Polylysin, Aminosilanen oder Amino reaktiven Silanen versehen, die den hydrophoben Charakter des Chips und die Haftung der gespotteten DNA verstärken sowie ihre Verteilung auf dem Träger reduzieren [Duggan et al., 1999].

Im Falle eines Oligonukleotid-Microarrays werden die DNA-Fragmente synthetisch hergestellt. Diese 50 bis 80 bp langen Oligonukleotide ermöglichen die Synthese Gen spezifischerer Fragmente als das mit PCR-Produkten der Fall ist [Aharoni und Vorst, 2001].

Mit Hilfe der Fotolithographie kann neben dem Spotten auch eine direkte Synthese der Oligonukleotide auf den Chip erfolgen [Aharoni und Vorst, 2001].

Die zu hybridisierenden Proben einer Microarrayanalyse, müssen zunächst markiert werden. In der Regel wird mRNA oder total-RNA als Ausgangsmaterial eingesetzt, das einer

Erstrangssynthese mit gekoppelter Markierungsreaktion unterzogen wird. Dabei werden üblicherweise Fluoreszenz markierte Nukleotide in den Erststrang eingebaut. Bevorzugt werden hierfür die Nukleotide Cyanin-3 (Cy3) und Cyanin-5 (Cy5) verwendet. Da sie das Licht bei distinkten und voneinander unterscheidbaren Wellenlängen absorbieren bzw. emittieren, können sie gepaart in einem Hybridisierungsansatz verwendet werden. Zudem zeigen sie eine gute Einbaurate durch die Reverse Transkriptase und eine hohe Fotostabilität. Die markierten Proben werden in gleichen Konzentrationen für mehrere Stunden bei 42° bis 70°C in einer speziellen Kammer, die vor Evaporation schützt, auf den Chip hybridisiert [Aharoni und Vorst, 2001].

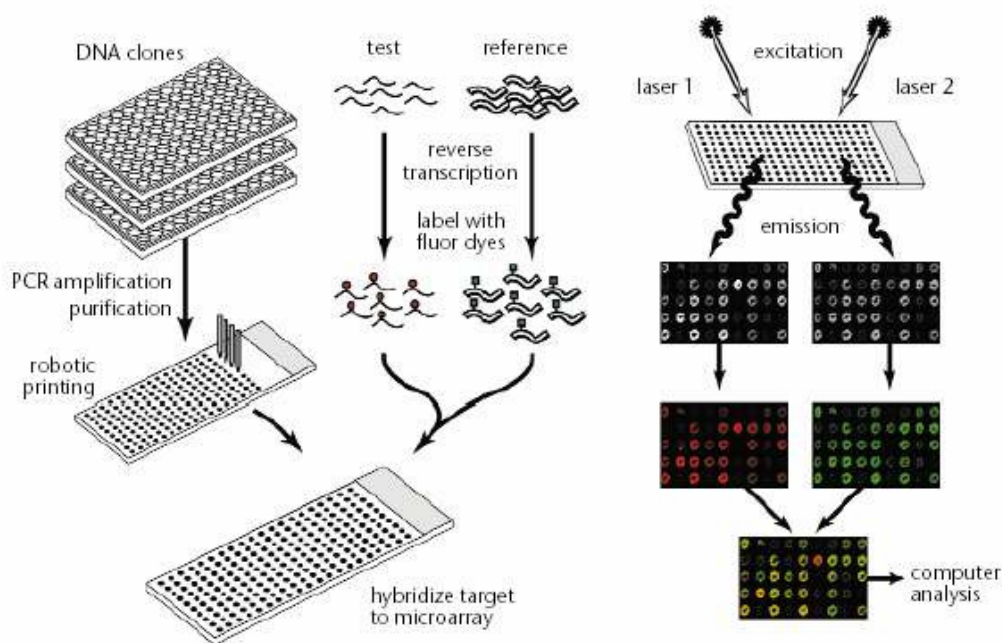


Abb. 1.7: Prinzip der Microarrayanalyse am Beispiel eines cDNA-Chips

Die schematische Darstellung zeigt die Herstellung der DNA-Fragmente mittels PCR-Amplifikation und das Spotten der Fragmente auf den Chip. Die Vorbereitung der zu hybridisierenden Proben umfasst die Erstrangssynthese mit gekoppelter Fluoreszenzmarkierung. Nach der Hybridisierung erfolgt die Detektion über einen Laserscanner bei spezifischen Anregungsenergien. Beide Farbkanäle werden getrennt aufgenommen. Es folgt die Bildverarbeitung und Messung der Signalintensitäten sowie die Verarbeitung der gewonnenen Daten zur Detektion differenziell exprimierter Gene; Duggan et al. (1999).

Die aufgrund der Hybridisierungsreaktion auf dem Chip entstehenden Fluoreszenzsignale können mit Hilfe eines Laserscanners detektiert werden. Dabei wird jeder Farbkanal (Cy3 bzw. Cy5) getrennt mit der entsprechenden Anregungsenergie gescannt und als digitales Bild aufgenommen. Im Anschluss erfolgt eine Software gestützte Bildverarbeitung, die die Lokalisierung der Spots auf dem Chip und die Intensitätsmessung der Hybridisierungssignale

sowie deren Separierung vom Hintergrund ermöglicht. Diese Rohdaten werden in einer anschließenden Datenverarbeitung transformiert, sodass ein Vergleich beider Farbkanäle und Aussagen über Expressionsunterschiede zwischen den Proben möglich werden. Diese Transformation umfasst u. a. eine Hintergrundkorrektur und eine Normalisierung der beiden Farbkanäle. Differenziell exprimierte Gene werden in der Regel durch die Berechnung der Ratio aus den Intensitätswerten der Cy3- und Cy5-Hybridisierung ermittelt [Krajewski und Bocianowski, 2002].

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Erzeugung neuer reblausresistenter Unterlagssorten mit geeigneten Anbaueigenschaften ist von essenzieller Bedeutung für den Weinbau. Neben der klassischen Züchtung könnte die Gentechnik durch die Generierung transgener, resistenter Rebsorten einen entscheidenden Beitrag dazu leisten. Grundlage zur Realisierung eines solchen Projektes sind Kenntnisse über die molekulargenetischen Mechanismen der Reblausresistenz. Die vorliegende Arbeit sollte zur Aufklärung dieser Mechanismen beitragen. Dafür sollte unter Anwendung der cDNA-Subtraktion, der Microarraytechnik und des GeneFishingTM die Genexpression von hypersensitivem Gewebe (experimentell durch IES bzw. auf natürlichem Wege durch einen Reblausbefall induziert) im Vergleich zu Normalgewebe der resistenten Unterlagsrebe 'Börner' untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollten insbesondere Einblicke in die Rolle der IES als auslösender Faktor der Resistenzreaktion gewonnen werden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (60 mm x 24 mm x 0,25 mm)	Sigma, München, Deutschland
Geldokumentationsgerät:	
- Epi Chemi™II Darkroom	UVP, Upland, USA
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Hofer, San Francisco, USA und Harnischmacher, Kassel, Deutschland
Glasgeräte	Schott, Mainz, Deutschland
Küvetten für OD-Messung (220-1660 nm)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Labormixer:	
- Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS Laboratory & Medical Supplies, Brigachtal, Deutschland
Labornetzteil:	
- PS 500XT DC Power Supply	Hofer, San Francisco, USA
Laserscanner:	
- Affymetrix 428™ Array Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Magnetrührer/Wärmeplatte:	
- Heidolph MR 3001	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Mörser, Porzellan	Haldenwanger, Berlin, Deutschland
Nylongaze (Porengröße: Ø 80 µm)	Millipor, Bedford, USA
pH-Meter:	
- Mikroprozessor HI9321	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Plastikpetrischalen (Ø 8,5 cm)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße:	
- 0,2 ml	Abgene, Epsom, England
- 0,5 und 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- 1,5 ml RNase frei, Biopur Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Rundfilter (Ø 8,5 cm)	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Spektralfotometer:

-Bio Photometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sterilfilter Minisart

(Porengröße: Ø 0,20 µm) Sartorius, Göttingen, Deutschland

Thermocycler:

- Primus 96 Plus und Primus HT MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

- PTC-100TM MJ Research, München, Deutschland

Wärmeschränke/Hybridisierungsöfen:

- Duo-Therm-Hybridisierungsöfen Biometra, Göttingen, Deutschland

- Peltier-/Präzisionsbrutschrank, IPP 200-400 Memmert, Schwabach, Deutschland

Wasserbad RM6 MGW Lauda, Lauda, Deutschland

Watte (40 cm breit) Hartmann, Heidenheim, Deutschland

Zentrifugen:

- MiniSpin Plus Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Centrifuge 5403 Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Chemikalien und Reagenzien

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-

Galactopyranosid (X-Gal) BTS Biotech Trade & Service GmbH, St-Leon, Deutschland

Agarose Roth, Karlsruhe, Deutschland

Ammoniumacetat (NH₄CH₃COO) Merck, Darmstadt, Deutschland

β-Mercaptoethanol Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland

Bacto-Agar Difco Laboratories, Detroit, USA

Bromphenolblau Serva, Heidelberg, Deutschland

Butanol (C₄H₉OH) Roth, Karlsruhe, Deutschland

Carbenicillin Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Cyanin 3 bzw. 5 (Cy3, Cy5) Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) Biomol, Hamburg, Deutschland

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	
behandeltes Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Polymerasen:	
- Advantage TM 2 Polymerase Mix	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- Titanium TM <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	Labor-Service GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma, München, Deutschland und AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Glycerol	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Guanosin	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Indol-3-Essigsäure (IES)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-D-thiogalactosid (IPTG)	Eurobio, Frankreich
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Molekulargewichtsstandard, GeneRuler TM	
DNA Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Liquid Block TM	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Luria-Bertani (LB)	Sigma, München, Deutschland
Mineralöl	Eurobio, Frankreich
N ₂ -Ethylendiamintetraessigsäure (N ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochlorid (NaOCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Laurylsarcosin	Sigma, München, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Reverse Transkriptase</i> , PowerScript™	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
<i>RsaI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Universelle Primer M13 forward und revers	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stamm: <i>XL1-Blue</i> komponente Zellen	Stratagene, La Jolla, USA

2.3 Reagenziensätze (Kits)

Chroma-Spin™-1000 Columns	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
GeneFishing™ DEG 101	Seegene, Korea, USA
Omniscript™	QIAGEN, Hilden, Deutschland
PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland
pGEM®-T Easy Vektor System	Promega, Mannheim, Deutschland
QIAprep® Spin Miniprep	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SMART™ PCR cDNA Synthese Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland

2.4 DNA-Microarraychips

Die Microarraychips, gespottet mit dem *Arabidopsis genome oligo set* 1.0 bzw. 3.0 (QIAGEN), wurden von Galbraith et al. (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6) bezogen. Die Version 1.0 umfasste 26090 Oligonukleotide (70mere), die 26029 *Arabidopsis*-Gene repräsentierten. Die Version 3.0 umfasste 29110 Oligonukleotide (70mere), darunter 28964 Protein kodierende und 87 microRNA-Gene von *Arabidopsis*.

Die Microarraychips wurden vor Gebrauch nach Angaben von Galbraith et al. (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6) rehydriert und ein UV-Crosslinking bei 130 mJ durchgeführt. Die Microarraychips wurden in 1 % SDS (w/v) für fünf Minuten, anschließend in EtOH abs. für 30 Sekunden gewaschen und für zwei Minuten bei 1000 rpm trocken zentrifugiert.

2.5 Software

Amplify 1.2	Engels, 1993
GeneSight™ 4.1 Lite Edition	Biodiscovery, El Segundo, USA
ImageGene™ 5.6 Standard Edition	Biodiscovery, El Segundo, USA
Jaguar™ 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA
Lab Works™ 4.0.0.8	UVP, Upland, USA

2.6 Internetquellen (Stand: 2005)

- Galbraith et al.:

<http://www.ag.arizona.edu/microarray/>

- *Multalin*:

<http://ribosome.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

- *National Center for Biotechnology Information* (NCBI):

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

- *Primer3*:

http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

- *The Institute for Genomic Research* (TIGR):

<http://www.tigr.org/>

- TIGER *grape gene index*:

http://www.tigr.org/tigr-scripts/tgi/T_index.cgi?species=grape

2.7 Puffer und Lösungen

Carbenicillin	10 µg/ml in Aqua dest. (autoklaviert)
	→ steril filtriert
E-Puffer	194 g Tris
(20x, Stammlösung)	15 g N ₂ EDTA
	8 g NaOH
	80 ml Eisessig
	ad 2 l Aqua dest.
E-Puffer/Guanosin	283 mg Guanosin (1 mM) auf 1 l 1x E-Puffer
EDTA	23 g NaOH
(0,5 M; pH 8,0)	186 g N ₂ EDTA
	ad 1 l Aqua dest.
	→ pH 8,0
Extraktionspuffer zur Isolierung von total-RNA:	
nach Salzman et al. (1999)	4 M Guanidinthiocyanat
	100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	25 mM Natriumcitrat (pH 8,0)
	0,5 % (w/v) N-Laurylsarcosin
	→ autoklavieren
nach Baiges und Mas (2003)	3 % (w/v) CTAB
	1,4 M NaCl
	20 mM N ₂ EDTA
	1 M Tris-HCl (pH 8,6)
	→ autoklavieren
IES-Lösung	0,1 g IES in 100 ml Aqua dest.
(0,1%)	→ unter Wärmezufuhr (ca. 50°C) gelöst
IPTG	25 mg/ml in Aqua dest.

LB/Carbenicillin-Agar
(pH 7,5)

15,5 g	LB
15,0 g	Bacto-Agar
ad 1 l	Aqua dest.

→ pH 7,5
→ autoklavieren, dann Zugabe von 5 ml
Carbenicillin (10 µg/ml)

LB-Medium
(flüssig; pH 7,5)

2,3 g	LB
ad 150 ml	Aqua dest.

→ pH 7,5
→ autoklavieren

Waschlösungen für Microarrays nach Galbraith et al. (siehe Kapitel 2.6):

MA/1

2x SSC (v/v)
0,5 % SDS (w/v)
ad 40 ml Aqua dest.

MA/2

0,5x SSC (v/v)
ad 40 ml Aqua dest.

MA/3

0,05x SSC (v/v)
ad 40 ml Aqua dest.

Stoppuffer
(10x)

25 ml	Glycerol
20 ml	0,5 M N ₂ EDTA (pH 8,0)
5 ml	1M Tris-HCl (pH 8,0)
0,1 g	Bromphenolblau

TNE-Puffer
(1x)

10 mM	NaCl
10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
0,1 mM	N ₂ EDTA (pH 8,0)

TE-Puffer

10 mM	Tris-HCl (pH 8,0)
1 mM	N ₂ EDTA (pH 8,0)

Tris-HCl (1 M ; pH 8,0 bzw. 8,6)	121 g 50 ml ad 1 l	Tris HCl Aqua dest.
	→ mit HCl auf pH 8,0 bzw. 8,6 einstellen	
SSC-Puffer (20x; pH 7,0)	3 M 0,3 M	NaCl Natriumcitrat
X-Gal	100 mg/ml in DMSO	

2.8 Pflanzenmaterial

Als Untersuchungsmaterial dienten Seitenwurzeln der Unterlagsrebe 'Börner'. Zur Gewinnung des Materials wurden im Gewächshaus kultivierte Topfreben verwendet, aus deren Wurzelballen bereits sekundär verholzte Wurzelabschnitte isoliert und für ein Kultursystem, etabliert von El-Nady (2001), eingesetzt (siehe Abb. 2.1). Die Wurzeln wurden zunächst mit Leitungswasser gesäubert und im Anschluss unter sterilen Bedingungen einer Oberflächendesinfektion unterzogen, wozu das Pflanzenmaterial eine Minute in 70%igem Ethanol (EtOH) gespült und für weitere 15 Minuten mit einer 1%igen (v/v) NaOCl-Lösung auf dem Magnetrührer behandelt wurde. Zum Abschluss erfolgte ein mehrmaliges Spülen für ein, zwei und fünf Minuten mit autoklaviertem Aqua dest.

Die nachfolgenden Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zunächst wurden an den Wurzeln vorhandene Seitentriebe entfernt, um ein Austreiben neuer Seitenwurzeln zu ermöglichen. Danach erfolgte eine Kürzung der Wurzeln auf ca. 6 cm lange Stücke, die an einem Ende mit sterilem Aqua dest. angefeuchteter Watte eingebettet wurden. Mit EtOH abs. desinfizierte Plastikpetrischalen (Ø 8,5 cm) wurden mit einem sterilen Rundfilterpapier ausgelegt und darauf vier bis acht in Watte gebettete Wurzelstücke platziert. Geschlossen wurden die Schalen mit einem Deckel, der eine mit Nylongaze (Porendurchmesser: 80 µm) abgedeckte Aussparung (ca. 5 cm²) für die Luftzufuhr enthielt. Um die Feuchtigkeit in den Schalen über mehrere Wochen zu halten, wurden diese mit handelsüblicher Frischhaltefolie am Rand verschlossen.

Die so präparierten Petrischalen wurden bei einer Temperatur von ca. 24°C im Dunklen aufbewahrt und austreibenden Seitenwurzeln für eine weitere Behandlung verwendet.



Abb. 2.1: Wurzelkultursystem nach El-Nady (2001)

2.9 Induktion der HR und Isolierung des Wurzelgewebes

Zur Untersuchung von hypersensitivem Gewebe wurde die HR experimentell durch IES oder durch eine Reblausinfektion induziert.

2.9.1 Experimentell induzierte HR mit IES

Die experimentelle Induktion der HR erfolgte, angelehnt an die Arbeiten von El-Nady (2001), durch die Applikation einer mit Aqua dest. angesetzten 0,1%igen IES-Lösung. Dies entsprach ungefähr einer Konzentration von 5,7 mM. Die Hormonlösung wurde mit einem Weichhaarpinsel auf die Wurzelspitze (Kalyptra) und die Streckungszone flächig aufgetragen (siehe Abb. 2.2). Nach festgelegten Induktionszeiten wurde der behandelte Wurzelbereich mit einem Skalpell abgetrennt, unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Aufbewahrung bei -70°C gelagert.

Auf diese Weise wurden insgesamt drei Wurzelproben nach folgenden Induktionszeiten isoliert: 1,5 h, 2,5 h und 4,5 h. Diese Zeiträume befanden sich noch vor der sichtbaren Ausprägung einer HR [Dietrich, 2002]. Im Folgenden werden diese Proben als 1,5-h-, 2,5-h- und 4,5-h-Probe bezeichnet.

Zur Kontrolle wurden regelmäßig IES behandelte Wurzeln über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden beobachtet und die Gewebereaktionen protokolliert.

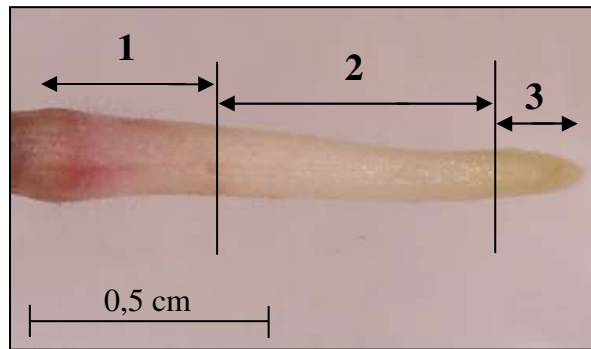


Abb. 2.2: 'Börner'-Seitenwurzel
Haarwurzelzone (1), Streckungszone (2), Kalyptra (3)

2.9.2 Reblaus induzierte HR

Zur Infektion wurden Rebläuse aus dem Freiland herangezogen. Hierzu wurden infizierte Blätter der Rebsorte 'Kober 5 BB' verwendet, die eine sehr hohe Dichte an Blattgallen zeigten. Das infizierte Material wurde in einem Zeitraum von Mai bis September desselben Jahres zur Infektion von 'Börner'-Wurzeln eingesetzt und stammte von insgesamt drei 'Kober 5 BB'-Individuen, die in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander standen.

Zwei bis drei infizierte Blätter wurden zu den kultivierten 'Börner'-Seitenwurzeln in jede der Petrischalen gegeben, die Ränder wieder mit handelsüblicher Frischhaltefolie verschlossen und erneut bei ca. 24°C im Dunkeln aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 24 Stunden wurden solche Wurzeln für eine Isolierung ausgewählt, die im Bereich der Wurzelspitze und Streckungszone mit ein bis mehreren Rebläusen besetzt waren, aber noch keine sichtbar ausgeprägten Nekrosen zeigten. Die Rebläuse wurden mit einer Pinzette vorsichtig entfernt, der infizierte Wurzelbereich mit einem Skalpell abgetrennt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Gewebematerial wurde zur weiteren Aufbewahrung bei -70°C gelagert. Im Folgenden wird diese Probe als R-Probe bezeichnet.

Zur Kontrolle wurden regelmäßig infizierte Wurzeln über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden beobachtet und die Gewebereaktionen protokolliert.

2.9.3 Vergleichsprobe

Als Vergleichsprobe wurde der Streckungszone- und Wurzelspitzenbereich unbehandelter, nicht infizierter Wurzeln isoliert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zur weiteren Aufbewahrung bei -70°C gelagert. Insgesamt wurden drei unbehandelte Vergleichsproben isoliert, die in drei verschiedenen Jahren gesammelt wurden: 2002, 2003 und 2004. Im Folgenden werden diese Proben als Probe 02, 03 und 04 bezeichnet.

2.10 Isolierung von total-RNA

Die Isolierung von total-RNA erfolgte aus 15 bis 370 mg Wurzeln. Dabei wurden verschiedene Protokolle getestet. Es erfolgten Isolierungen mit dem RNeasy[®] Mini Kit von QIAGEN sowie Isolierungen nach den Protokollen von Salzman et al. (1999) und von Baiges und Mas (2003).

2.10.1 RNeasy[®] Mini Kit (QIAGEN)

Die Isolierung von total-RNA mit dem RNeasy[®] Mini Kit wurde mit der 2,5-h- und 4,5-h-Probe aus 57 bzw. 40 mg Gewebe durchgeführt.

Unter RNase freien Bedingungen erfolgte die Isolierung nach Angaben des Herstellers. Die total-RNA wurde in 50 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser aufgenommen und bei -70°C gelagert.

2.10.2 Isolierung nach Salzmann et al. (1999)

Die Isolierung von total-RNA aus der unbehandelten Vergleichprobe 02 wurde nach Salzmann et al. (1999) mit 370 mg Gewebe durchgeführt. Dabei erfolgte unter RNase freien Arbeitsbedingungen die Isolierung weitgehend nach Protokoll des Verfassers. Das Gewebe wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert und das Pulver anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß zu 1,85 ml Extraktionspuffer und 37 µl β-Mercaptoethanol hinzugefügt. Auf eine Verwendung von Polyvinylpyrrolidon (PVP) wurde verzichtet. Nach grünlichem Schütteln des Reaktionsansatzes für eine Minute wurde eine zweimalige Extraktion mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohl (25:24:1) durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine Fällung mit 2 Vol EtOH abs. und 1/10 Vol 5 M NaCl über Nacht bei -20°C. Danach wurde die Probe bei 4°C zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen und in 1 ml DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Darauf folgte eine weitere Fällung mit 1/3 Vol 8 M LiCl über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurde die Probe bei 4°C zentrifugiert, das Pellet wiederum zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen, unter der Sterilbank für ca. 10 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die RNA-Probe wurde bei -70°C gelagert.

2.10.3 Isolierung nach Baiges und Mas (2003)

Die Isolierung von total-RNA nach dem Protokoll von Baiges und Mas (2003) wurde aus folgenden Proben mit einer Gewebemenge von 15 bis 113 mg isoliert: 1,5-h- und R-Probe sowie unbehandelte Vergleichsproben 03 und 04.

Die Isolierung erfolgte unter RNase freien Arbeitsbedingungen und wurde weitgehend nach Protokollangaben des Verfassers durchgeführt. Das Gewebe wurde unter Zugabe von flüssigem Stickstoff im Mörser homogenisiert. Auf den Einsatz von Sand für den Homogenisierungsschritt wurde dabei verzichtet. Das Pulver wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß zu 500 µl Extraktionspuffer und 1 µl β-Mercaptoethanol zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt bei 60°C im Wasserbad für 30 Minuten, wobei der Reaktionsansatz in regelmäßigen Abständen aus dem Bad entnommen und gründlich gemischt wurde. Danach erfolgte ein Extraktionsschritt mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1). Im Anschluss wurde mit 0,7 Vol Isopropanol gefällt, die Probe bei 4°C zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen, unter der Sterilbank für ca. 20 Minuten luftgetrocknet und in 100 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Danach erfolgte eine erneute Fällung mit 1/3 Vol 8 M LiCl über Nacht bei 4°C. Die Probe wurde dann bei 4°C zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen und in 50 bis 100 µl DEPC behandeltem Wasser resuspendiert. Die RNA-Proben wurden bei -70°C gelagert.

2.10.4 Quantifizierung der RNA

Die Bestimmung der RNA-Konzentration und ihrer Qualität erfolgte mit einem Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm.

2.10.5 Die isolierten RNA-Proben und ihre weitere Verwendung in der Übersicht

In Tabelle 2.1 sind die isolierten total-RNA-Proben sowie ihre weitere Verwendung zur differenziellen Expressionsanalyse im Überblick dargestellt.

Probenbezeichnung	Probenbeschreibung	Methoden zur differentiellen Expressionsanalyse
2,5-h-Probe	IES behandelt; Induktionszeit: 2,5 h	cDNA-Subtraktion
4,5-h-Probe	IES behandelt; Induktionszeit: 4,5 h	cDNA-Subtraktion
1,5-h-Probe	IES behandelt; Induktionszeit: 1,5 h	Microarrayanalyse, GeneFishing™
R-Probe	Reblaus infiziert	Microarrayanalyse
Probe 02	unbehandelte Vergleichsprobe; Isolierungsjahr: 2002	cDNA-Subtraktion (im Vergleich mit 2,5-h- und 4,5-h-Probe)
Probe 03	unbehandelte Vergleichsprobe; Isolierungsjahr: 2003	cDNA-Subtraktion (Nullprobe), GeneFishing™ (im Vergleich mit 1,5-h-Probe)
Probe 04	unbehandelte Vergleichsprobe; Isolierungsjahr: 2004	cDNA-Subtraktion (Nullprobe), Microarrayanalyse (im Vergleich mit 1,5-h- und R-Probe)

Tabelle 2.1: Isolierte RNA-Proben und ihre weitere Verwendung

2.11 cDNA-Subtraktion

Die cDNA-Subtraktion wurde mit der 2,5-h- und 4,5-h-Probe sowie mit den unbehandelten Vergleichsproben 02, 03 und 04 durchgeführt.

2.11.1 cDNA-Synthese

Da nur geringe Mengen an isolierter total-RNA zur Verfügung standen, wurde eine cDNA-Synthese nach dem SMART™ PCR cDNA Synthese Kit von BD BIOSCIENCES CLONTECH durchgeführt. Die Erststrangsynthese dieser Methode basiert auf dem *template-switching*-Prinzip [Chenchik et al., 1998]. Die Zweitstrangsynthese ist mit einer PCR-Amplifikation gekoppelt.

Erststrangsynthese

Die Erststrangsynthese erfolgte nach Angaben des Herstellers ausgehend von 0,1 bis 0,5 µg total-RNA.

cDNA-Amplifikation und Bestimmung der optimalen Zyklenzahl

Abhängig von der Ausgangsmenge an total-RNA wurden nach Angaben des Herstellers 2 bis 10 µl der Erststrangsynthese je PCR-Ansatz eingesetzt. Die Vorbereitung der PCR-Ansätze

wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Abweichungen erfolgten im Hinblick auf das gewählte Amplifikationsprogramm (siehe Tabelle 2.2). Für den Denaturierungs- und Annealingschritt wurden statt 5 Sekunden, 15 Sekunden festgelegt.

Zunächst wurde nach Herstellerempfehlung eine Bestimmung der optimalen Zyklenzahl mit einem Testansatz aus jeder Probe durchgeführt. Dabei erfolgte eine Amplifikation jedes Testansatzes für 15, 18, 21 bzw. 24 Zyklen im Thermocycler. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,2%igen Agarosegel getestet und die optimale Zyklenzahl nach Herstellerangaben bestimmt. Die experimentellen Ansätze wurden im Anschluss nach Protokoll für die zuvor bestimmte optimale Zyklenzahl amplifiziert.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	95	1 min
2	95	15 sec
3	65	15 sec
4	68	6 min
5	8	Hold

15, 18, 21, 24 x
bzw. optimale Zyklenzahl

Tabelle 2.2: PCR-Programm zur cDNA-Amplifikation

Säulenchromatographie

Die PCR-Proben aus der cDNA-Synthese wurden nach dem Herstellerprotokoll mit Chroma-SpinTM-1000 Columns (BD BIOSCIENCES CLONTECH) aufgereinigt. Abweichend vom Protokoll wurde in einigen Versuchsdurchführungen statt TNE-Puffer, TE-Puffer zum Eluieren verwendet. Neben denen vom Hersteller empfohlenen zwei Eluatfraktionen von 320 und 75 µl wurden in einigen Fällen drei weitere Eluate mit jeweils 150 µl durchgeführt, um so die cDNA-Ausbeute zu erhöhen. Die Eluate wurden nach Protokoll auf einem 1,2%igen Agarosegel getestet. Eluate, die laut elektrophoretischer Auftrennung einen deutlichen cDNA-Gehalt aufwiesen, wurden für jede Probe kombiniert.

RsaI-Restriktionsverdau

Da im Vorfeld zur cDNA-Subtraktion eine Adapterligation erfolgte, musste zunächst eine Restriktion der cDNA-Proben durch das Enzym *RsaI* vorgenommen werden. Die enzymatische Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Wurden zuvor in der Säulenchromatographie, abweichend vom Protokoll, zusätzliche Eluate gewonnen, erfolgte eine entsprechende Mengenanpassung der verwendeten *RsaI* und des Restriktionspuffers.

Eine Kontrolle des Restriktionsverdau wurde nach Herstellerangaben auf einem 1,2%igen Agarosegel durchgeführt.

Aufreinigung der restringierten cDNA

Die restringierten Proben wurden zur Inaktivierung der *RsaI* zunächst für 10 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde zu jeder cDNA-Proben ca. 1/2 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gründlich gemischt, bei 14 000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert und anschließend der wässrige Überstand abgenommen. Diese Schritte wurden mit einer erneuten Zugabe von 1/2 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) wiederholt. Eine Fällung der cDNA erfolgte unter Zugabe von 1/10 4,4 M Ammoniumacetat und 1 Vol Isopropanol. Das cDNA-Pellet wurde zweimal mit 70%igem EtOH gewaschen und unter der Sterilbank für 20 bis 30 Minuten luftgetrocknet. Die Resuspendierung der cDNA erfolgte mit 10 µl 1x TNE-Puffer.

Quantifizierung der cDNA

Siehe hierzu Kapitel 2.14.

2.11.2 cDNA-Subtraktion

Die cDNA-Subtraktion erfolgte mit dem PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit von BD BIOSCIENCES CLONTECH.

Die 2,5-h- und 4,5-h-Probe wurde jeweils als *tester* gegen die unbehandelte Probe 02 als *driver* subtrahiert. Die Subtraktion erfolgte nur in eine Richtung.

Um die Effizienz der Methode zu testen, erfolgte zusätzlich eine Subtraktion der beiden unbehandelten Proben 03 und 04. Dabei wurden die Proben in beide Subtraktionsrichtungen voneinander subtrahiert. Dieser Versuchansatz wird im Folgenden als Nullprobe bezeichnet.

Vorbereitung der Kontrollprobe und Adapterligation

Vorbereitend zur cDNA-Subtraktion wurde zunächst laut Angaben des Herstellers die cDNA-Synthese einer dem Kit beiliegenden Kontrollprobe (*human sceletal muscle polyA⁺-RNA*) durchgeführt. Danach erfolgte die Ligation der Adapter an den *tester* der experimentellen Proben (2,5-h-; 4,5-h-Probe; Probe 03 und 04) sowie der Kontrollprobe. Die cDNA-Konzentration der experimentellen Proben sollte für die Ligation bei 300 ng/µl liegen. Proben

mit einer höheren Konzentration wurden mit TE- bzw. TNE-Puffer verdünnt. Proben, deren Konzentration darunter lag, wurden für die Adapterligation in einer entsprechend höheren Menge eingesetzt. Die Kontrolle wurde laut Protokollangaben verwendet. Die weitere Durchführung der Adapterligation erfolgte ebenfalls nach Angaben des Herstellers.

Hybridisierung

Für die darauf folgenden zwei Hybridisierungsschritte sollte die cDNA-Konzentration der experimentellen *driver*-Proben ebenfalls bei 300 ng/μl liegen. Auch hier wurden höher konzentrierte Proben mit TE- bzw. TNE-Puffer verdünnt und niedriger konzentrierte Proben in einer entsprechend höheren Menge für die Hybridisierungsschritte eingesetzt. Der *driver* der Kontrollprobe wurde laut Protokoll verwendet. Die Durchführung der Hybridisierungsschritte erfolgte nach Herstellerangaben.

PCR-Amplifikation

Nach der Hybridisierung folgten zwei PCR-Amplifikationsschritte. Dabei wurden nach Herstellerprotokoll zu jedem Ansatz eine unsubtrahierte Negativkontrolle sowie eine dem Kit beiliegende kommerziell subtrahierte Kontrolle in beiden PCR-Schritten mit amplifiziert.

Die erste PCR-Amplifikation erfolgte nach Herstellerangaben im Thermocycler mit dem in Tabelle 2.3 angegebenen Programm für 27 Zyklen. Die zweite PCR-Amplifikation wurde ebenfalls nach Protokoll mit *nested*-Primern und dem gleichen PCR-Programm aus der ersten Amplifikation, jedoch nur für 12 Zyklen durchgeführt.

Nach beiden PCR-Schritten wurden die Amplifikate nach Herstellerangaben auf einem 2%igen Agarosegel getestet.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	94	30 sec
2	94	30 sec
3	66	30 sec
4	72	1,5 min
5	8	Hold

27x (1.PCR) bzw.
12x (2.PCR)

Tabelle 2.3: PCR-Programm für den ersten und zweiten Amplifikationsschritt der cDNA-Subtraktion

2.11.3 Isolierung differenziell exprimierter Gene

Zur Isolierung differenziell exprimierter Gene wurden die subtrahierten Proben erneut nach Herstellerprotokoll mit *nested*-Primern für 12 Zyklen amplifiziert (siehe Tabelle 2.3). Die PCR-Produkte wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, distinkte Banden aus dem Gel isoliert, die cDNA-Sequenzen kloniert, sequenziert und annotiert (detaillierte Durchführung siehe Kapitel 2.16).

2.11.4 Qualitative RT-PCR zur Verifizierung der Ergebnisse aus der cDNA-Subtraktion

Eine Verifizierung der Ergebnisse aus der cDNA-Subtraktion mittels qualitativer Reverse Transkription (RT)-PCR konnte aufgrund limitierter Mengen an total-RNA nur exemplarisch für die 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-56 aus der 2,5-h-Probe durchgeführt werden. Mit diesem Versuch sollte überprüft werden, ob die cDNA-Subtraktion in diesem Fall erfolgreich verlaufen war.

Dazu wurden mit Hilfe der Internetanwendung *Primer 3* [Rozen und Skaletsky, 2000] (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6) spezifische Primer an der Sequenz des Fag-B-IES2,5h-56 generiert. Neben des *sense*-Primers für die Synthese des Erststranges, wurde ein komplementärer *antisense*-Primer als Negativkontrolle eingesetzt. Für die anschließende PCR-Amplifikation wurde zusätzlich ein spezifischer Primer generiert (siehe Tabelle 2.4). Die Primersynthese erfolgte über die MWG BIOTECH AG (Deutschland). Die Primer wurden vor Gebrauch in DEPC behandeltem Wasser resuspendiert.

Die RT erfolgte ausgehend von total-RNA der 2,5-h-Probe bzw. der unbehandelten Vergleichsprobe 02 mit dem *sense*- bzw. *antisense*-Primer (experimentelle Probe bzw. Negativkontrolle) in zwei getrennten Reaktionsansätzen nach dem OmniscriptTM-Protokoll von QIAGEN. Je Ansatz wurden 100 ng total-RNA eingesetzt.

Die anschließende PCR der experimentellen Proben sowie der Negativkontrollen erfolgte nach dem in Tabelle 2.5 aufgeführten Schema und mit dem in Tabelle 2.6 dargestellten Amplifikationsprogramm. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getestet.

Primer-bezeichnung	Primersequenz	GC-Gehalt [%]	Schmelz-temp. [°C]	Verwendung
<i>sense</i> -Primer	3'-CAGTAACCCACACCTAGTAC-5'	50	59,61	Erststrangsynthese, PCR-Amplifikation
<i>antisense</i> -Primer	3'-GTCATTGGGTGTGGATCATG-5'	50	59,61	Negativkontrolle
PCR-Primer	5'-ACTGTTTCGAGTGCCTGATG-3'	50	58,88	PCR-Amplifikation

Tabelle 2.4: Primer für RT-PCR

Komponente	Eingesetzte Menge [µl]
Aqua dest.	6,25
Erststrangprobe	1,0
10x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	0,8
dNTPs (10 mM)	0,25
<i>sense</i> -Primer (10 µM)	0,3
PCR-Primer (10 µM)	0,3
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (MBI FERMENTAS)	0,1
Gesamtvolumen	10

Tabelle 2.5: PCR-Ansatz für RT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	95	5 min
2	95	30 sec
3	60	15 sec
4	72	1 min
5	8	Hold

30 x

Tabelle 2.6: PCR-Programm für RT-PCR

2.11.5 Microarrayanalyse der subtrahierten Proben

Neben der Sequenzierung wurde zusätzlich eine Microarrayanalyse der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene eingesetzt. Ebenso wurden die subtrahierten Proben aus der Nullprobe mit dieser Methode analysiert. Die Microarraytechnik diente in diesem Versuchsablauf nicht zur differenziellen Expressionsanalyse, sondern zum Screening der subtrahierten Proben.

Für die 2,5-h- und 4,5-h-Probe wurden zwei Hybridisierungsexperimente mit jeweils einem Microarraychip (Version 1.0) nach dem *flip-dye*-Prinzip (siehe Kapitel 4.1.2) durchgeführt (siehe Tabelle 2.7). In jedem Experiment wurden die 2,5-h- und 4,5-h-Probe in unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung gemeinsam auf den Chip hybridisiert.

Nach der gleichen Vorgehensweise erfolgte die Microarrayanalyse der subtrahierten Proben aus der Nullprobe (siehe Tabelle 2.8). Für die Hybridisierungsexperimente wurden Microarraychips der Version 3.0 verwendet.

Chip_Nummer (Version 1.0)	Subtrahierte Probe	Fluoreszenzmarkierung
Chip_62	2,5-h-Probe	Cy3
	4,5-h-Probe	Cy5
Chip_65	2,5-h-Probe	Cy5
	4,5-h-Probe	Cy3

Tabelle 2.7: Hybridisierungsexperimente der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe

Chip_Nummer (Version 3.0)	Subtrahierte Probe	Fluoreszenzmarkierung
Chip_281	Probe 04	Cy3
	Probe 03	Cy5
Chip_283	Probe 04	Cy5
	Probe 03	Cy3

Tabelle 2.8: Hybridisierungsexperimente der subtrahierten Proben 03 und 04

Vorbereitung der subtrahierten Proben

Die subtrahierten Proben wurden erneut nach Herstellerprotokoll (CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit) ausgehend vom Amplifikationsprodukt der ersten PCR mit *nested*-Primern amplifiziert (siehe Kapitel 2.11.2, PCR-Amplifikation). Die Zyklenzahl wurde dabei von 12 auf 15 Zyklen erhöht, um die cDNA-Ausbeute zu steigern. Für jede subtrahierte Probe wurden zwei PCR-Ansätze durchgeführt, die jeweils in eines der beiden Hybridisierungsexperimente eingingen.

Es folgte eine Aufreinigung der amplifizierten Proben mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN) nach Herstellerprotokoll. Die aufgereinigten Proben wurden jeweils in 50 µl Aqua dest. aufgenommen und die cDNA-Konzentration fotometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.14).

Markierung der subtrahierten Proben

Zur Markierung wurden die Nukleotide Cy3 bzw. Cy5 verwendet, deren Einbau in einer PCR-Amplifikation erfolgte. Für jede Markierungsreaktion wurden 0,6 µg (Nullprobe) bzw. 1,6 µg (2,5-h- und 4,5-h-Probe) subtrahierte und aufgereinigte cDNA-Probe eingesetzt. Tabelle 2.9 gibt einen Überblick über den Markierungsansatz.

Die Amplifikation erfolgte wiederum mit den *nested*-Primern und dem aus der cDNA-Subtraktion bekannten PCR-Programm (siehe Tabelle 2.3). Jedoch wurden an dieser Stelle nur zwei Amplifikationszyklen durchgeführt.

Danach erfolgte eine Aufreinigung der Proben mit dem QIAquick® Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerprotokoll. Die aufgereinigten Proben wurden jeweils in 50 µl Aqua dest. aufgenommen.

Komponente	Eingesetzte Menge
subtrahierte und aufgereinigte Probe	600 bzw. 1,6 µg
10x PCR-Puffer	6,0 µl
dATP, dGTP, dTTP (10 mM) dCTP (2 mM)	0,75 µl je dNTP
markiertes Cyanin; Cy3 bzw. Cy5 (1 mM)	1,0 µl
<i>nested</i> -Primer 1 (10 µM)	1,0 µl
<i>nested</i> -Primer 2R (10 µM)	1,0 µl
50x Advantage™ 2 Polymerase Mix (BD BIOSCIENCES CLONTECH)	1,2 µl
Aqua dest.	ad 60 µl

Tabelle 2.9: Ansatz zur Markierung der 2,5-h- und 4,5-h-Probe sowie der Nullprobe

Hybridisierung

Die Hybridisierungsreaktionen erfolgten angelehnt an das Protokoll von Galbraith et al. (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6). Die entsprechenden Cy3 und Cy5 markierten Proben wurden für jedes Hybridisierungsexperiment kombiniert. Dabei wurden jeweils 45 (Nullprobe) bzw. 50 µl (2,5-h- und 4,5-h-Probe) der aufgereinigten Proben eingesetzt. Tabelle 2.10 gibt einen Überblick über den Hybridisierungsansatz.

Komponente	Eingesetzte Menge [μ l]
20x SSC	25
Liquid Block TM	15
2 % SDS (w/v)	10
markierte Proben (Cy3 und Cy5)	90 bzw. 100 (45 bzw. 50 μ l je Probe)
Aqua dest.	ad 250

Tabelle 2.10: Hybridisierungsansatz der 2,5-h- und 4,5-h-Probe sowie der Nullprobe

Die Hybridisierungsansätze wurden gründlich gemischt und zur Denaturierung für zwei Minuten im Thermocycler bei 94°C erhitzt. Die Ansätze wurden danach sofort auf Eis platziert.

Der Microarraychip wurde auf einer Heizplatte auf ca. 65°C erwärmt und der komplette Hybridisierungsansatz (250 μ l) auf den Chip pipettiert. Darüber wurde ein Deckglas (60 mm x 24 mm x 0,25 mm) möglichst ohne Lufteinschluss platziert. Die Microarraychips wurden zusammen mit einigen Tropfen Aqua dest. in eine Hybridisierungskammer gegeben und im Wärmeschrank bei 55°C für ca. 15 Stunden inkubiert.

Waschen der Microarraychips

Das Waschen der Microarrays nach der Hybridisierungsreaktion erfolgte ebenfalls angelehnt an das Protokoll von Galbraith et al. (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6).

Die Microarraychips wurden zunächst bei 55°C in der Waschlösung MA/1 für fünf Minuten komplett eingetaucht und unter leichtem Schütteln gewaschen. Dabei wurde vorsichtig das Deckglas entfernt. Danach folgte ebenfalls unter leichtem Schütteln ein Waschschrift in Lösung MA/2 bei Raumtemperatur für fünf Minuten. Abschließend wurden die Microarraychips bei Raumtemperatur für weitere fünf Minuten in Waschlösung MA/3 unter leichtem Schütteln gewaschen.

Zum Trocknen der Microarrays wurden diese in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei 1200 rpm für zwei bis fünf Minuten zentrifugiert. Die Microarraychips wurden direkt im Anschluss gescannt.

Scannen der Microarraychips

Das Scannen der Microarraychips erfolgte mit dem konfokalen *Affymetrix 428TM Array Scanner* und der Software *JaguarTM 2.0* von AFFYMETRIX. Gemessen wurde die Emission für Cy5 bei 670 nm und für Cy3 bei 570 nm.

Spoterkennung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Die Spoterkennung und die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mit der Software *ImageGeneTM 5.6 Standard Edition* von BIODISCOVERY. Neben der Software gestützten Bildauswertung erfolgte zusätzlich eine manuelle Kontrolle der Hybridisierungssignale. Von starkem Hintergrund oder Verunreinigungen überlagerte Spots wurden für die weitere Auswertung der Daten gekennzeichnet.

Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit der Software *GeneSightTM 4.1 Lite Edition* von BIODISCOVERY.

Für die 2,5-h- und 4,5-h-Probe wurden jeweils der Cy3- und Cy5-Datensatz aus der Quantifizierung kombiniert und als Replikate ausgewertet. Hierbei wurde mit dem arithmetischen Mittel der Signalwerte aus beiden Datensätzen gearbeitet. Die Cy3- und Cy5-Datensätze der subtrahierten Probe 03 und 04 aus der Nullprobe wurden jeweils separat ausgewertet.

Alle Datensätze wurden nach folgender Transformationssequenz bearbeitet:

1. lokale Hintergrundkorrektur
2. Entfernung negativer, minderwertiger Spots (wurden zuvor in der Quantifizierung festgelegt)
3. ersetzen fehlender Werte aus Schritt 2 durch das arithmetische Mittel aller Signalwerte auf dem Chip
4. LOWESS-Normalisierung (global, linear)
5. Kombinierung von Replikaten; Berechnung des arithmetischen Mittels (bezog sich nur auf Kontrollspots)

Nach der Transformation der Daten wurde für die 2,5-h- und 4,5-h-Probe ein Schwellenwert von 1000 (Signalintensität) festgelegt. Nur Gene, deren Intensität oberhalb dieses Schwellenwertes lag, gingen in die weitere Auswertung ein. Für die Datensätze der Proben 03 und 04 wurde dieser Schwellenwert auf 200 (Signalintensität) festgelegt.

Vergleich der Microarrayergebnisse der IES behandelten mit den unbehandelten Proben

Um noch vorhandene nicht differenziell exprimierte Gene aus der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe zu eliminieren, erfolgte ein Vergleich mit den Resultaten der vier Datensätze aus der Nullprobe. Zusätzlich wurden die Hybridisierungsergebnisse der unbehandelten Probe aus der Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe (siehe Kapitel 2.12) für einen Vergleich herangezogen. Hierzu wurden aus den Hybridisierungsexperimenten Chip_41, Chip_43 und Chip_44 die Datensätze der unbehandelten Probe aus der Quantifizierung als Replikate kombiniert und ausgewertet. Im Folgenden wird diese Auswertung als Unbehandelt-1,5/R bezeichnet. Die Transformation der Daten mit der Software *GeneSightTM 4.1 Lite Edition* erfolgte wie oben beschrieben analog zu den subtrahierten Proben. Der Schwellenwert wurde bei 600 (Intensitätswert) festgelegt.

Damit standen insgesamt fünf Datensätze unbehandelter Proben für einen Vergleich zur Verfügung. Gene der 2,5-h- bzw. 4,5-h-Probe, die in mindestens zwei dieser fünf Datensätze auftraten, wurden aus der Ergebnisliste der IES behandelten, subtrahierten Proben eliminiert.

2.11.6 Verifizierung der Microarrayergebnisse der 2,5-h- und 4,5-h-Probe

Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit den Microarrayergebnissen

Mit den aus der cDNA-Subtraktion isolierten, klonierten und sequenzierten 'Börner'-ESTs (siehe Kapitel 2.11.3) wurde eine erneute Datenbanksuche über NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) durchgeführt (Details siehe Kapitel 2.16.5). Dabei wurden die besten Übereinstimmungen mit Genen bzw. Proteinen aus *Arabidopsis* recherchiert. Diese Resultate wurden mit den Microarrayergebnissen verglichen.

PCR-Amplifikation von 'Börner'-cDNAs mit spezifischen Primerpaaren angelehnt an die Microarrayergebnisse

Mit Hilfe der Microarrayergebnisse wurden spezifische Primerpaare für die Amplifikation entsprechender 'Börner'-cDNAs aus der subtrahierten 2,5-h-Probe generiert.

Hierfür wurden 19 *Arabidopsis*-Gene ausgewählt, mit denen in der Microarrayanalyse der 2,5-h-Probe ein Hybridisierungssignal gefunden werden konnte. Zu jedem Gen wurde die vollständige *coding sequence* (CDS) über *The Institute for Genomic Research* (TIGR) eingeholt (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6). Um möglichst spezifische Primersequenzen für

'Börner' erstellen zu können, wurde mit jeder *Arabidopsis*-CDS über den TIGR *grape gene index* (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6) nach Übereinstimmungen mit ESTs aus *Vitis vinifera* recherchiert. In der Regel wurden die *Vitis*-ESTs mit dem höchsten Homologiegrad für die Primergenerierung ausgewählt. In einigen Fällen wurden mehrere ESTs herangezogen. Vereinzelt wurden am gleichen *Vitis*-EST zwei verschiedene Primerpaare erstellt.

Die Primergenerierung erfolgte mit der Internetanwendung *Primer 3* [Rozen und Skaletsky, 2000] (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6). Da im Vorfeld zur cDNA-Subtraktion ein *RsaI*-Restriktionsverdau der 'Börner'-cDNA erfolgte (siehe Kapitel 2.11.1), wurde darauf geachtet, dass die erwarteten Amplifikate keine *RsaI*-Schnittstellen enthielten. Um Exon übergreifende Amplifikate zu verhindern, wurde die genomische Struktur der jeweiligen *Arabidopsis*-Gene (Bezugsquelle: NCBI) beim Primerdesign berücksichtigt.

Eine zusätzliche Optimierung der Primersequenzen erfolgte mit der Software *Amplify 1.2* [Engels, 1993], um Dimerbildungen oder unspezifische Bindungen weitestgehend zu vermeiden. Eine Übersicht der 19 ausgewählten *Arabidopsis*-Gene, der für die Primergenerierung herangezogenen *Vitis*-ESTs sowie der Primersequenzen sind in Tabelle 2.11 zu finden. Die Synthese der Primer erfolgte über die MWG BIOTECH AG (Deutschland). Die Primer wurden vor Gebrauch in DEPC behandeltem Wasser resuspendiert.

<i>Arabidopsis</i> Gene-ID	Genbezeichnung	<i>Vitis</i> - EST	Primerbezeichnung: Primersequenz (3' – 5')
At1g51720	NADP-specific glutamate dehydrogenase	CF208443	for: CTCTTCGGCTCCAAATG rev: CATGTCCGCAAGCATAA
At3g52880	monodehydroascorbate reductase	TC31565	for: CATGCCTCGGCTTTT rev: AGCAACATCTCCCACA
At5g46700	senescence-associated protein 5-like protein	TC33998	for: TCCATTCCCATCATCG rev: TTGGTGGCTTACAGCA
		TC32943	for: TAGTCGGCTTCGTGAT rev: AATCGGCTGACTCGGG
At5g61640	peptide methionine sulfoxide reductase	TC25623	for: CGGGTATGGTGCTTT rev: TTCTTGGCAGGCAGA
At3g22840	early light-induced protein	TC25080	for: ATGGCCAAAGCGAAC rev: CCAGGAACCATGGAAT
At2g16580	auxin-responsive protein, TGSAUR21	TC26661	for: AACCAGCAGCTCTGAA rev: TTGTCATCTCCCTCCA
At2g28350	auxin-responsive factor (ARF10)	TC29665	for: AGCACGCATGTGCTA rev: CCAAGCGGGGAAATA
			for2: TGTGCATGGAGAAACG rev2: CACATCCAATTCCCCT
		CA817122	for3: CTACATTGTCGCTGCTTGAA rev3: ATGGAATCTGAGGATGTGGG

Tabelle 2.11: Spezifische Primerpaare zur Amplifikation von 'Börner'-cDNAs

<i>Arabidopsis</i> Gene-ID	Genbezeichnung	<i>Vitis</i> - EST	Primerbezeichnung: Primersequenz (3' – 5')
At5g13320	auxin-responsive GH3 family protein	TC25796	for: ATTCCGCCACAGCATT rev: GCCCTGCGAAATTTGT
At3g63150	RAC-like GTP binding protein ARAC3	TC35637	for: AAGGATGCTGCAGAGA rev: TTA CT TCCCCCAGGTT
			for2: GGAATTGAGCCTCCT rev2: TAAGCTGCCAGTCCA
At4g29460	phospholipase A2 like protein	TC43911	for: GAGCCGAGAGAGAAT rev: CAAGATCATCACAGG
At5g12140	cystatin	TC38717/ TC38718	for: GCAAAAGTTTGGGTG rev: CGATGATTACCAGAT
At5g14450	GDSL-motif lipase/hydrolase family protein, similar to early nodulin ENOD8	TC47420	for: GGAGCAAATTTCCGGCATGG rev: GAGATCAACGTATGTTATGG
			for2: GGTATAAGCCCATCTCTCC rev2: GTCCTAGCTCCTTCTTGA
At1g18250	thaumatin, strong similarity to pathogenesis-related group 5 protein	TC39456	for: AAGCTCCCACCCAACAAG rev: GCATAGGAATAAGCTCTTGG
At2g19980	allergen V5/Tpx-1-related family protein, low similarity to Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1)	TC 46599	for: GAGACGAGACTGCAAGGT rev: CCTCCACACAATCTGAGTAT
		TC47119	for2: GAGAAGCCTTATTATGACTA rev2: AACCTAGCGCACCCAAG
At1g26150	Pto Kinase interactor	TC50834	for: TTGGAGTTGTCTTCTGG rev: CCATCCTCTGAAACCATC
At5g41680	Pto Kinase interactor	TC46478	for: GGCTATCATGCACCAGAGTA rev: CAGCTTAGCAACTCCTTTC
At5g51570	hypersensitive induced response protein	TC48417	for: TGGTCACCCAATACTTTGAC rev: ACTGCCTGCCTCCATCAT
			for2: CATGGTCACCCAATACTTTG rev2: CCATCATCCCATTGCGAATC
		TC39511	for: TGAGGCTGAGTCCAAGTATC rev: CATGTCCATCACATCCTTC
		TC39521	for: AAGCCTACGTCTTTGATGTA rev: TTTATCTCATTCAATTGCTC
TC39522	for: CATTGAAGGATATAGGTG rev: AGACCTTCCCTAATTTGT		
At5g62740	hypersensitive induced response protein	CN006868	for: CACATCACAACAGC rev: GAGTCCAAGTATTTATCA
At4g37000	accelerated cell death 2 (ACD2)	TC42618	for: TCAACATAACCAGCCTCTCC rev: CACCTGCCTCAGTTTCTATC
			for2: GGTATAAGCCCATCTCTCC rev2: GTCCTAGCTCCTTCTTGA

Tabelle 2.11 (Fortsetzung)

Als Template für die PCR-Amplifikationen diente die subtrahierte 2,5-h-Probe. Diese wurde zunächst nach Herstellerprotokoll (PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit, CLONTECH) erneut ausgehend vom ersten PCR-Produkt mit *nested*-Primern für 15 Zyklen nach dem in Tabelle 2.3 aufgeführten Programm amplifiziert. Es folgte eine Aufreinigung des PCR-

Produktes mit dem QIAquick® Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerprotokoll. Die gereinigte cDNA wurde in 50 µl Aqua dest. aufgenommen.

Die PCR-Ansätze wurden nach dem in Tabelle 2.12 angegebenen Schema durchgeführt. Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit dem in Tabelle 2.13 aufgeführten PCR-Programm. Je nach Primer und gewünschter Bindungsspezifität variierte die Annealingtemperatur zwischen 30 und 50°C. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getestet.

PCR-Ansätze, die gewünschte Amplifikate aufwiesen, wurden erneut nach der oben beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, die cDNA-Fragmente aus dem Gel isoliert, kloniert, sequenziert und annotiert (detaillierte Durchführung siehe Kapitel 2.16).

Komponente	Eingesetzte Menge [µl]
Aqua dest.	18,75
10x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
MgCl ₂ (25mM)	2,4
dNTPs (10 mM)	0,75
spezifischer Primer_for (10 µM)	0,9
spezifischer Primer_rev (10 µM)	0,9
subtrahierte 2,5-h-Probe	3,0
Taq-DNA-Polymerase (MBI FERMENTAS)	0,3
Gesamtvolumen	30,0

Tabelle 2.12: PCR-Ansatz zur Amplifikation von 'Börner'-cDNAs mit spezifischen Primerpaaren

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	95	5 min
2	95	30 sec
3	30 - 50	30 sec
4	72	1 min
5	8	Hold

30 x

Tabelle 2.13: PCR-Programm zur Amplifikation von 'Börner'-cDNAs mit spezifischen Primerpaaren

2.12 Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe

Die Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe wurde zur differentiellen Expressionsanalyse im Vergleich zur unbehandelten Probe 04 eingesetzt.

Da hierfür zu geringe Mengen an total-RNA zur Verfügung standen, erfolgte mit allen Proben eine cDNA-Synthese mit dem SMARTTM PCR cDNA Synthese Kit von BD BIOSCIENCES CLONTECH. Sowohl für die 1,5-h- als auch für die R-Probe wurden zunächst zwei Hybridisierungsexperimente nach dem *flip-dye*-Prinzip (siehe Kapitel 4.1.2) durchgeführt. In jedem Experiment wurden die IES behandelte bzw. Reblaus infizierte Probe und die unbehandelte Vergleichsprobe 04 in unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung gemeinsam auf den Chip hybridisiert. In einer technischen Wiederholung wurde für alle Proben erneut eine cDNA-Synthese durchgeführt und es erfolgten wiederum jeweils zwei Hybridisierungsexperimente nach dem *flip-dye*-Prinzip. Damit standen für die 1,5-h- und R-Probe jeweils vier Experimente für eine Auswertung zur Verfügung (siehe Tabelle 2.14 und 2.15). Für die Hybridisierungen wurden Microarraychips der Versionen 1.0 und 3.0 verwendet.

Chip_Nummer	Probe	Fluoreszenzmarkierung
Chip_41 (Version 1.0)	1,5-h-Probe	Cy3
	Probe 04	Cy5
Chip_42 (Version 1.0)	1,5-h-Probe	Cy5
	Probe 04	Cy3
Chip_279 (Version 3.0)	1,5-h-Probe	Cy3
	Probe 04	Cy5
Chip_280 (Version 3.0)	1,5-h-Probe	Cy5
	Probe 04	Cy3

Tabelle 2.14: Hybridisierungsexperimente der 1,5-h-Probe

Chip_Nummer	Probe	Fluoreszenzmarkierung
Chip_43 (Version 1.0)	R-Probe	Cy3
	Probe 04	Cy5
Chip_44 (Version 1.0)	R-Probe	Cy5
	Probe 04	Cy3
Chip_290 (Version 3.0)	R-Probe	Cy3
	Probe 04	Cy5
Chip_289 (Version 3.0)	R-Probe	Cy5
	Probe 04	Cy3

Tabelle 2.15: Hybridisierungsexperimente der R-Probe

Vorbereitung der Proben

Zu Beginn wurde die Erststrangsynthese der Proben nach Angaben des Herstellers (BD BIOSCIENCES CLONTECH) ausgehend von jeweils 0,5 µg total-RNA durchgeführt.

Für die anschließende PCR-Amplifikation erfolgte zunächst die Bestimmung der optimalen Zyklenzahl mit einem Testansatz aus jeder Probe (siehe Kapitel 2.11.1).

Die experimentellen Ansätze wurden dann für zwei Zyklen weniger als die zuvor bestimmte optimale Zyklenzahl im Thermocycler mit dem in Tabelle 2.2 angegebenen Programm amplifiziert. Für die Proben jedes Hybridisierungsexperimentes wurden zwei PCR-Ansätze durchgeführt und nach der Amplifikation kombiniert. Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick® Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerprotokoll. Die gereinigten cDNA-Proben wurden in jeweils 50 µl Aqua dest. aufgenommen und eine Quantifizierung der cDNA durchgeführt (siehe Kapitel 2.14)

Markierung der Proben

Zur Markierung wurden die Nukleotide Cy3 bzw. Cy5 verwendet, deren Einbau in einer PCR-Amplifikation erfolgte.

Für die Markierungsreaktion wurden die Proben jedes Hybridisierungsexperimentes in gleichen Mengen eingesetzt. Die verwendete cDNA-Menge bewegte sich dabei zwischen 0,3 und 2,1 µg. Die Proben wurden nach dem in Tabelle 2.16 aufgeführten PCR-Ansatz für zwei Zyklen nach dem in Tabelle 2.2 dargestellten Programm im Thermocycler für zwei Zyklen amplifiziert. Als PCR-Primer diente der aus dem SMART™ PCR cDNA Synthese Kit stammende SMART™-Primer.

Die PCR-Produkte wurden mit dem QIAquick[®] Purification Kit von QIAGEN nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die cDNA-Proben wurden jeweils in 50 µl Aqua dest. aufgenommen und eine Quantifizierung durchgeführt (siehe Kapitel 2.14).

Komponente	Eingesetzte Menge
aufgereinigte Probe	0,3 bis 2,1 µg
10x PCR-Puffer	10,0 µl
dATP, dGTP, dTTP (10 mM), dCTP (2 mM)	1,25 µl je dNTP
markiertes Cyanin; Cy3 bzw. Cy5 (1 mM)	1,6 µl
SMART [™] -Primer (10 µM)	2,0 µl
50x Advantage [™] 2 Polymerase Mix (BD BIOSCIENCES CLONTECH)	2,0 µl
Aqua dest.	ad 100 µl

Tabelle 2.16: Ansatz zur Markierung der 1,5-h- und R-Probe sowie der unbehandelten Vergleichsprobe 04

Hybridisierung

Die Cy3 bzw. Cy5 markierten Proben jedes Hybridisierungsexperimentes wurden in gleichen Mengen auf den Chip hybridisiert. Die verwendete cDNA-Menge bewegte sich dabei zwischen 0,3 und 3,4 µg. Die restlichen Komponenten wurden nach den in Tabelle 2.10 aufgeführten Mengen zugegeben und mit Aqua dest. auf 250 µl aufgefüllt. Die nachfolgenden Schritte erfolgten wie bereits in Kapitel 2.11.5 (Hybridisierung) erwähnt.

Waschen und Scannen der Microarraychips sowie Spoterkennung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale

Diese Schritte erfolgten nach den in Kapitel 2.11.5 (Waschen, Scannen der Microarraychips, Spoterkennung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale) aufgeführten Angaben.

Datenauswertung

Die Datenauswertung erfolgte mit der Software *GeneSight[™] 4.1 Lite Edition* von BIODISCOVERY.

Sowohl für die 1,5-h- als auch für die R-Probe wurde jedes Hybridisierungsexperiment getrennt ausgewertet. Dabei wurde die IES behandelte bzw. Reblaus infizierte Probe als Experiment und die Vergleichsprobe 04 als Kontrolle definiert.

Folgende Datentransformation wurde für jedes Hybridisierungsexperiment durchgeführt:

1. lokale Hintergrundkorrektur
2. Entfernung negativer, minderwertiger Spots (wurden zuvor in der Quantifizierung festgelegt)
3. ersetzen fehlender Werte aus Schritt 2 durch das arithmetische Mittel aller Signalwerte auf dem Chip
4. Entfernung aller Gene, die in beiden Farbkanälen (Experiment und Kontrolle) einen Signalwert unterhalb eines gesetzten Schwellenwertes (Intensitätswert) aufwiesen; dieser Schwellenwert lag je nach Hybridisierungsqualität bei 400 oder 600
5. Logarithmierung der Signalwerte zur Basis 2
6. LOWESS-Normalisierung (global, linear)
7. Bildung der Ratio für jedes Gen aus den Signalwerten des Experimentes und der Kontrolle

Zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene wurde ein sog. *fold-change cut-off* von zwei gesetzt. Das heißt, Gene, die in einem der beiden Farbkanäle eine zweifach stärkere bzw. schwächere Hybridisierungsintensität zeigten, galten als differenziell exprimiert.

Zusätzlich wurden die entsprechenden Spots dieser Gene nochmals einer visuellen Kontrolle auf dem Chip mit der Software *ImageGeneTM 5.6 Standard Edition* von BIODISCOVERY unterzogen. Konnten keine Hinweise auf Verunreinigungen durch Hintergrundsignale oder sonstige Effekte gefunden werden, wurden diese Gene in die Ergebnisse aufgenommen.

2.13 GeneFishingTM der 1,5-h-Probe

Neben der Microarrayanalyse wurde die 1,5-h-Probe im Vergleich mit der unbehandelten Probe 03 über die GeneFishingTM-Methode von SEEGENE untersucht.

2.13.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Laut Herstellerempfehlung erfolgte zunächst eine Optimierung der PCR-Bedingungen mit Hilfe der, dem Kit beiliegenden, Kontrollproben.

Es wurden 50 ng je Kontrollprobe für die Amplifikation eingesetzt. Variiert wurden dabei die verwendete Polymerase und die MgCl₂-Konzentrationen. Getestet wurden folgende

Polymerasen: 50x AdvantageTM2 Polymerase Mix (BD BIOSCIENCES CLONTECH), *Taq*-DNA-Polymerase (MBI FERMENTAS) und 50x TitaniumTM *Taq*-DNA-Polymerase (BD BIOSCIENCES CLONTECH). Dabei wurden in Kombination mit der *Taq*-DNA-Polymerase von MBI FERMENTAS MgCl₂-Mengen (25 mM) von 3 und 5µl eingesetzt. Der endgültig gewählte PCR-Ansatz ist in Tabelle 2.17 aufgeführt. Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tabelle 2.18 angegebenen Programm. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getestet und mit denen vom Hersteller empfohlenen Bandenmustern verglichen.

Komponente	Eingesetzte Menge [µl]
Kontrollprobe (Erststrang)	5,0 (50 ng)
10x PCR-Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄	5,0
MgCl ₂ (25 mM)	3,0
dNTPs (10 mM)	1,0
ACP TM -T (10 µM)	1,0
ACP TM -A1 (5 µM)	2,0
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (MBI FERMENTAS)	1,0
Aqua dest.	ad 50

Tabelle 2.17: PCR-Ansatz der GeneFishingTM-Methode

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	94	5 min
2	50	3 min
3	72	1 min
4	94	40 sec
5	65	40 sec
6	72	40 sec
7	72	5 min
8	8	Hold

40 x

Tabelle 2.18: PCR-Programm der GeneFishingTM-Methode

2.13.2 GeneFishingTM der experimentellen Proben

Nach der Optimierung der PCR-Bedingungen erfolgte zunächst die Erststrangsynthese der 1,5-h-Probe und der unbehandelten Vergleichsprobe 03 nach Herstellerprotokoll. Dabei wurden in beiden Fällen 3 µg total-RNA eingesetzt. Die RT erfolgte mit der PowerScriptTM von BD BIOSCIENCES CLONTECH. Wie vom Hersteller empfohlen, wurden den Ansätzen jeweils 2 µl Dithiothreitol (DTT) zugegeben. Ein RNase Inhibitor wurde nicht eingesetzt.

Die anschließenden PCR-Amplifikationen der 1,5-h- und R-Probe wurden ausgehend von jeweils 4 µl Erststrang mit den vom Hersteller vorgesehenen 20 ACPTM-Primerkombinationen (ACPTM-T/ACPTM-A1 bis A20) angesetzt. Die Durchführung erfolgte nach dem in Tabelle 2.17 aufgeführten Ansatz im Thermocycler mit dem unter Tabelle 2.18 angegebenen Programm. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getestet.

Ausgehend von den oben genannten PCR-Amplifikationen erfolgte angelehnt an das Herstellerprotokoll eine zusätzliche Reamplifikation. Wahlweise wurden hierzu die zuvor verwendeten ACPTM-Primerkombinationen oder die ebenfalls dem Kit beiliegenden universellen Primer nach Herstellerangaben verwendet. Aus den PCR-Produkten wurden für jeden Ansatz 0,5 µl eingesetzt. Die weiteren Komponenten wurden laut Tabelle 2.17 verwendet. Die Amplifikation verlief für 35 Zyklen mit dem in Tabelle 2.19 angegeben Programm. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel getestet.

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	94	5 min
2	94	40 sec
3	68	40 sec
4	72	40 sec
5	72	5 min
6	8	Hold

35 x

Tabelle 2.19: PCR-Programm zur Reamplifikation

Isolierung differenziell exprimierter Gene

Zur Isolierung differenziell exprimierter Gene wurden die nochmals reamplifizierten Proben auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen, distinkte Banden aus dem Gel isoliert, die cDNA-Sequenzen kloniert, sequenziert und annotiert (detaillierte Durchführung siehe Kapitel 2.16).

2.14 Quantifizierung der cDNA

Die Bestimmung der cDNA-Konzentration und ihrer Qualität erfolgte mit einem Spektralfotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm.

2.15 Elektrophoretische Auftrennung der cDNA-Fragmenten

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte auf horizontalen Agarosegelen bei einer Stromstärke von 60 bis 100 mA. Die Agarose wurde mit 1x E-Puffer in Konzentration zwischen 0,8 bis 2 % (w/v) angesetzt. Der 1x E-Puffer diente ebenfalls als Laufpuffer.

Zu den cDNA-Proben wurden vor dem Auftragen 0,7 bis 1 µl 10x Stopppuffer gegeben. Als Molekulargewichtsstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix von MBI FERMENTAS, der in einer Konzentration von 0,08 µg/µl und einer Menge zwischen 3 und 5 µl eingesetzt wurde. Im Folgenden wird dieser Molekulargewichtsstandard als Marker bezeichnet.

Die Färbung der Agarosegele wurde in einer Ethidiumbromidlösung mit einer Konzentration von 1 µg/ml in Aqua dest. durchgeführt.

Die Visualisierung der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte unter UV-Licht mit dem Geldokumentationsgerät Epi Chemi™ Darkroom und der Software Lab Works™ 4.0.0.8 von UVP.

2.16 Isolierung, Klonierung, Sequenzierung und Annotierung von cDNA-Sequenzen

2.16.1 Präparatives Gel und Isolierung der cDNA

Zur Isolierung von cDNA-Fragmenten wurden die Proben auf ein präparatives Agarosegel aufgetragen. Hierzu wurde dem 1x E-Puffer 1 mM Guanosin zugegeben. Dieser Puffer diente zum Ansetzen des 1 bis 2%igen Agarosegels sowie als Lauf-, Färb- und Waschpuffer.

Die zu isolierenden Banden wurden unter UV-Licht zügig mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Unter Zugabe von 450 µl TE-Puffer wurden die Agarosestücke mit einem Pistill gründlich zerkleinert. Im Anschluss wurden ca. 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gründlich gemischt und über Nacht bei -70°C eingefroren. Es folgte eine Zentrifugation der Proben bei 14 000 rpm für 15 Minuten und eine Abnahme der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach einer wiederholten Extraktion mit 1 Vol Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Abnahme der oberen wässrigen Phase, wurde die cDNA durch Zugabe von 0,1 Vol 4,4 M Ammoniumacetat und 2,5 Vol EtOH abs. gefällt. Nach zweimaligem Waschen des Pellets mit 70%igem EtOH wurden die cDNA-Probe

in 10 bis 20 µl Aqua dest. resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Quantifizierung der cDNA-Proben (siehe Kapitel 2.14).

2.16.2 Klonierung isolierter cDNA-Fragmente

Vektorligation

Die isolierten cDNA-Fragmente wurden in den pGEM[®]-T Easy Vektor von PROMEGA ligiert. Dabei erfolgte die Berechnung der optimalen cDNA-Konzentration für den Ligationsansatz nach Herstellerangaben in einem Insert/Vektor-Verhältnis von 3:1. Da in einigen Fällen die Konzentration der isolierten cDNA sehr niedrig lag und in größeren Mengen eingesetzt werden musste, wurde der Ligationsansatz, abweichend vom Protokoll, auf 20 µl erhöht. Hierfür wurden 1 µl Vektor, 10 µl 2x Rapid Ligationspuffer, 1 µl Ligase, die berechnete Menge an cDNA und Aqua dest. (ad 20 µl) eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Kontrollligation nach Herstellerangaben durchgeführt und alle Ansätze bei 4°C über Nacht inkubiert.

Transformation

Die Transformation der Vektorplasmide erfolgte in *E. coli* (Stamm: *XL1-Blue* von STRATAGENE). Hierzu wurden 100 µl *E. coli*-Stammkultur auf Eis langsam aufgetaut, in der Regel der gesamte Ligationsansatz zugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgten 45 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Im Anschluss wurden zu jedem Transformationsansatz 100 µl flüssiges LB-Medium pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Zu jedem Ansatz wurden 20 µl IPTG und 10 µl X-Gal gegeben. Im Folgenden wurden daraus 200 µl auf einer LB/Carbenicillin-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Die Identifizierung von Bakterien mit rekombinanten Plasmiden erfolgte durch ihre Weißfärbung basierend auf dem Prinzip der α -Komplementation [Ullmann et al. 1967].

Ob das Insert in der gewünschten Länge im Plasmid vorlag, wurde mittels PCR-Amplifikation kontrolliert. Hierzu wurden geringe Mengen der Kolonien mit einem sterilen Holzstäbchen entnommen und jeweils in einen PCR-Ansatz (siehe Tabelle 2.20) überführt. Die Amplifikation erfolgte nach dem in Tabelle 2.21 angegebenen Programm. Die PCR-Produkte wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel getestet.

Komponenten	Eingesetzte Menge [μ l]
10x PCR-Puffer mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
MgCl_2 (25 mM)	0,8
dNTPs (10 mM)	0,25
M13 forward (10 μ M)	0,3
M13 reverse (10 μ M)	0,3
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase (MBI FERMENTAS)	0,1
Aqua dest.	ad 10

Tabelle 2.20: PCR-Ansatz zur Insertkontrolle

Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
1	95	5 min
2	95	30 sec
3	65	90 sec
4	75	5 min
5	8	Hold

30 x

Tabelle 2.21: PCR-Programm zur Insertkontrolle

Anlegen von Stammkulturen

Kolonien mit einem rekombinanten Plasmid und dem gewünschten Insert wurden mit einem sterilen Holzstäbchen vollständig von der Platte entnommen und jeweils in ein Inkubationsgefäß mit 4 ml LB-Medium sowie 20 μ l Carbenicillin (10 μ g/ml) überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 $^{\circ}$ C auf einem Schüttler inkubiert.

Aus jeder Kultur wurde 1 ml entnommen, jeweils in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 0,5 ml Glycerol gegeben und gründlich gemischt. Die Stammkulturen wurden bei -70 $^{\circ}$ C gelagert.

2.16.3 Plasmidpräparation

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse [Birnboim und Doly, 1979] mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep von QIAGEN ausgehend von einer 3 ml Übernachtskultur (siehe oben; Anlegen von Stammkulturen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde in 50 μ l Aqua dest. aufgenommen.

2.16.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung der cDNA-Proben erfolgte ausgehend von der isolierten Plasmid-DNA mit den universellen Primeren M13 forward und reverse über die GENTERPRISE GmbH (Mainz, Deutschland).

2.16.5 Annotierung

Eine Annotierung der cDNA-Sequenzen erfolgte über die Gendatenbank des NCBI (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6). Hierzu wurde mit dem *basic local alignment search tool* (Blast) [Altschul et al., 1990] auf Nukleotidebene (Blastn) und AS-Ebene (Blastx) nach Homologien zu Gen- bzw. Proteinsequenzen aus der Datenbank recherchiert.

In einigen Fällen war zur weiteren Auswertung ein Vergleich zwischen den 'Börner'-Sequenzen notwendig. Hierfür wurde die Internetanwendung *Multalin* (siehe Internetquellen, Kapitel 2.6) eingesetzt.

Annotierte 'Börner'-Sequenzen wurden jeweils unter einer bestimmten ID in die EST-Datenbank des NCBI eingetragen.

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierung der 'Börner'-Wurzeln

Ein sichtbares Seitenwurzelnwachstum setzte ca. zwei Wochen nach Kultivierungsbeginn ein. Dabei unterlag die Ausbeute an Pflanzenmaterial jahreszeitlichen Schwankungen. Sehr ertragreich zeigten sich die Frühjahrsmonate.

Die Gewinnung von Seitenwurzeln war in einem Kulturansatz über ca. drei Wochen möglich. Danach ließen das Wachstum und die Qualität der Wurzeln deutlich nach. Vereinzelt konnten nach diesem Zeitraum auch Pilzinfektionen beobachtet werden.

3.2 Induktion der HR

3.2.1 Experimentell induzierte HR mit IES

Regelmäßig untersuchte Kontrollwurzeln, die mit IES behandelt und über einen längeren Zeitraum beobachtet wurden, zeigten bis auf wenige Ausnahmen deutliche Nekrosebildungen (siehe Abb. 3.1). Dabei erstreckte sich die Reaktion in der Regel über den gesamten IES behandelten Gewebebereich. Erste Anzeichen einer Braunfärbung konnten ca. fünf bis sechs Stunden nach der Applikation des Hormons festgestellt werden.

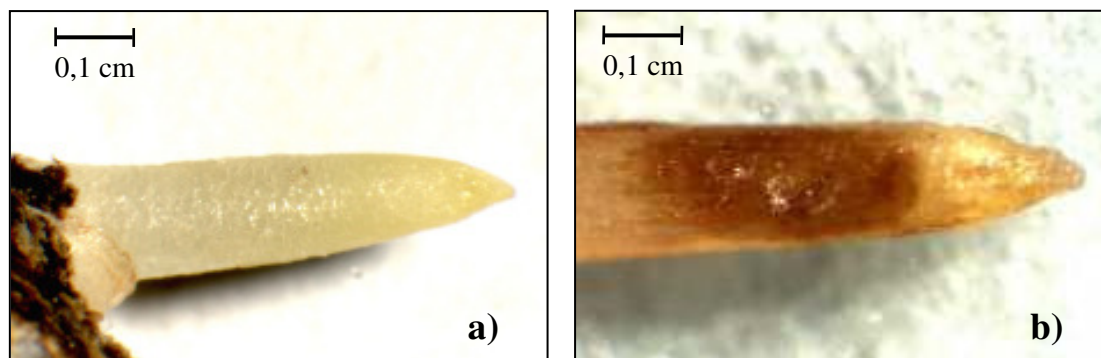


Abb. 3.1: IES induzierte HR

a) unbehandelte 'Börner'-Wurzel, b) IES (0,1%) behandelte 'Börner'-Wurzel mit Nekrose nach ca. 24h

3.2.2 Reblaus induzierte HR

Ungefähr 24 Stunden nach der Zugabe von Blattgallen konnten Reblaus besetzte Wurzelspitzen festgestellt werden (siehe Abb. 3.2). Meist waren ein bis zwei Aphiden je Wurzel im Streckungszonenbereich zu beobachten. In der Regel zeigten sich zu diesem Zeitpunkt noch keine ausgeprägten Nekrosen. Reblaus infizierte Kontrollwurzeln wiesen erst nach ca. zwei Tagen deutliche Nekrosereaktionen auf.



Abb. 3.2: Reblaus induzierte HR

Reblaus im Streckungszonenbereich einer 'Börner'-Wurzel mit einsetzender HR, sichtbar durch die Einlagerung phenolischer Substanzen im Einstichbereich; Quelle: El-Nady (2001)

3.3 Isolierung von total-RNA

Sehr gute Ergebnisse konnten mit dem RNA-Isolierungsprotokoll von Baiges und Mas (2003) erzielt werden. Die isolierten Proben zeigten bei einer eingesetzten Gewebemenge von 15 bis 113 mg total-RNA Konzentrationen zwischen 177 und 884 ng/ μ l.

Deutlich geringer fielen die Konzentrationen mit dem RNeasy Kit (QIAGEN) und nach dem Isolierungsprotokoll von Salzman et al. (1999) aus. Für die unbehandelte Probe 02 konnten 51,1 ng/ μ l, für die 2,5-h-Probe 131 μ g/ μ l und für die 4,5-h-Probe lediglich 12,4 ng/ μ l total-RNA isoliert werden.

Der Quotient aus den Absorptionswerten bei 260 nm und 280 nm lag für alle Proben zwischen 1,6 und 2,0 und deutete damit auf einen guten Reinheitswert der RNA-Proben hin.

3.4 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese nach der SMARTTM-Methode von CLONTECH konnte für alle Proben mit einer Ausgangsmenge von 0,1 bis 0,5 µg total-RNA erfolgreich durchgeführt werden. In der Regel bewegte sich die optimale Zyklenzahl zwischen 23 und 24 Zyklen (siehe Abb. 3.3). Lediglich für die 2,5-h-Probe reichte eine Anzahl von 17 Zyklen für die Amplifikation aus.

Im Falle der cDNA-Proben, die als Ausgangsmaterial für die cDNA-Subtraktion dienten, konnten mit der optimalen Zyklenzahl und nach der *RsaI*-Restriktion sowie der Aufreinigung Konzentrationen zwischen 211 und 335 ng/µl erreicht werden. Dabei lag der Quotient der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm für alle Proben in einem optimalen Bereich zwischen 1,9 und 2,0.

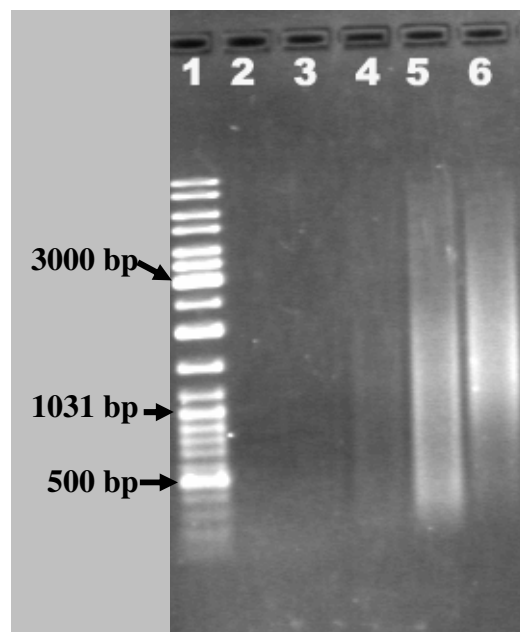


Abb. 3.3: Bestimmung der optimalen Zyklenzahl am Beispiel der 1,5-h-Probe
Marker (1), nach 15 Zyklen (2), nach 18 Zyklen (3), nach 21 Zyklen (4), nach 24 Zyklen (5), nach 27 Zyklen (6)

3.5 cDNA-Subtraktion

Die cDNA-Subtraktion wurde zur differentiellen Genexpressionsanalyse der IES behandelten 2,5-h- und 4,5-h-Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe 02 durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine cDNA-Subtraktion mit den unbehandelten Proben 03 und 04, der sog. Nullprobe.

3.5.1 2,5-h- und 4,5-h-Probe

Die cDNA-Subtraktion der 2,5-h- und 4,5-h-Probe verlief in beiden Fällen erfolgreich. Abbildung 3.4 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Proben nach der ersten bzw. zweiten PCR-Amplifikation. Die unsubtrahierten 'Börner'-Proben sowie die unsubtrahierte Kontrolle zeigten einen weitgehend undifferenzierten cDNA-, „Schmier“ und lagen in ihrer cDNA-Konzentration deutlich höher als die entsprechenden subtrahierten Proben. Diese wiesen dagegen ein Bandenmuster auf, das nach der zweiten PCR-Amplifikation deutlich hervortrat. Wie in Abbildung 3.4 b) zu erkennen ist, zeigten die Bandenmuster der subtrahierten Kontrolle (Spur 16) und der kommerziell subtrahierten Kontrolle (Spur 18) klare Übereinstimmungen. Laut Herstellerangaben spricht dieses Ergebnis für eine erfolgreich verlaufene Subtraktion.

Teilweise Übereinstimmungen waren ebenfalls zwischen den Bandenmustern der beiden subtrahierten 'Börner'-Proben (Spur 12 und 14, Abb. 3.4 b) feststellbar. Die elektrophoretische Auftrennung wies jedoch auf eine insgesamt höhere Anzahl an Amplifikaten in der 2,5-h-Probe hin.

Obwohl die subtrahierten Proben im Vergleich zu den unsubtrahierten Proben eine sichtbar geringere cDNA-Konzentration und distinkte Banden zeigten, war ein schwacher cDNA-Hintergrund erkennbar, der insbesondere in der 2,5-h-Probe auffiel.

Aus beiden subtrahierten 'Börner'-Proben wurden insgesamt 25 cDNAs mit einer Größe zwischen 1100 und 400 bp erfolgreich isoliert, kloniert und sequenziert. Eine Annotierung der Sequenzen über die NCBI-Gendatenbank war in allen Fällen auf Nukleotid- bzw. AS-Ebene möglich. Tabelle 3.1 zeigt eine Zusammenstellung der 'Börner'-ESTs, ihrer Größe, der Länge des sequenzierten Bereiches sowie der besten Datenbankübereinstimmung auf Nucleotid- bzw. AS-Ebene. Weitere Sequenzinformationen können zu jedem 'Börner'-EST unter der jeweiligen ID über die NCBI-Datenbank recherchiert werden.

Im Falle der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h-108, -133, -49, -82 sowie Fag-B-IES4,5h-144 und -27 wurde ein Sequenzalignment durchgeführt (siehe Anhang, Abb. 8.1 bis 8.3). Aufgrund

'Börner'-EST	NCBI-ID	Länge der isolierten cDNA [bp]	Länge des sequenzierten Bereiches [bp]/ Seq.-Primer	Beste NCBI-Datenbankübereinstimmung (prozentuale Übereinstimmung)
2,5-h-Probe:				
Fag-B-IES2,5h-11	CK986217	ca. 1100	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Cicer arietinum</i> , beta-galactosidase (80%)
Fag-B-IES2,5h-38	CK986222	ca. 1100	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Gossypium hirsutum</i> , translation elongation factor 1A (88%)
Fag-B-IES2,5h-45	CK986223	ca. 1100	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>blp3</i> mRNA for luminal binding protein (88%)
Fag-B-IES2,5h-05	CK986225	ca. 1100	611/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Hevea brasiliensis</i> , truncated acetyl Co-A acetyltransferase-like protein (85%)
Fag-B-IES2,5h-100	CK986215	ca. 1000	613/M13 forward 585/M13 reverse Gesamtseq.: 980	<u>Blastn:</u> <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>NtMKP1</i> mRNA for MAP kinase Phosphatase (81%)
Fag-B-IES2,5h-107	CK986216	ca. 1000	613/M13 forward	<u>Blastx:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , Reticuline oxidase-like protein (75%)
Fag-B-IES2,5h-108	DV466770	ca. 1000	611/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis vinifera</i> , synthase f3-like/Resveratrol synthase-related (93%)
Fag-B-IES2,5h-123	CK986218	ca. 900	613/M13 forward	<u>Blastx:</u> <i>Oryza sativa</i> , putative multiple stress-responsive zinc-finger protein (60%)
Fag-B-IES2,5h-133	DV466771	ca. 800	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis vinifera</i> , A1 stilbene synthase (99%)
Fag-B-IES2,5h-48	CK986224	ca. 700	591/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , proline iminopeptidase (80%)
Fag-B-IES2,5h-49	DV466769	ca. 700	610/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis vinifera</i> , synthase f3-like/Resveratrol synthase-related (96%)
Fag-B-IES2,5h-56	CK986226	ca. 700	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , putative quinone reductase (83%)
Fag-B-IES2,5h-52	CK906352 (Dietrich, 2002)	ca. 700	613/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Malus domestica</i> , mRNA for adventitious rooting related oxygenase ARRO-1 (81%)
Fag-B-IES2,5h-89	CK986228	ca. 700	611/M13 forward	<u>Blastx:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , zinc finger (AN1-like) family protein (51%)
Fag-B-IES2,5h-90	CK986229	ca. 700	611/M13 forward	<u>Blastx:</u> <i>Daucus carota</i> , Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1 precursor (72%)
Fag-B-IES2,5h-163	CK986219	ca. 650	617/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Glycine max</i> , dynamin-like protein SDL12A (83%)
Fag-B-IES2,5h-185	CK986220	ca. 650	535/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis vinifera</i> , NAD(H) glutamate dehydrogenase (99%)
Fag-B-IES2,5h-80	CK986227	ca. 550	548/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Malus domestica</i> , alpha-L-arabinofuranosidase (85%)

Tabelle 3.1: Isolierte cDNA-Sequenzen aus der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe

'Börner'-EST	NCBI-ID	Länge der isolierten cDNA [bp]	Länge des sequenzierten Bereiches [bp]/ Seq.-Primer	Beste NCBI-Datenbankübereinstimmung (prozentuale Übereinstimmung)
Fag-B-IES2,5h-82	DV466766	ca. 550	520/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis</i> , stilbene synthase (98%)
Fag-B-IES2,5h-21	CK986221	ca. 400	414/M13 forward	<u>Blastx:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , lectin-like protein kinase (47%)
4,5-h-Probe:				
Fag-B-IES4,5h-71	CK986232	ca. 1000	612/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Cucurbita maxima</i> , non-cell-autonomous heat shock cognate protein 70 (84%)
Fag-B-IES4,5h-143	CK986230	ca. 650	596/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , cyclase family protein (80%)
Fag-B-IES4,5h-144	DV466768	ca. 650	556/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis riparia</i> , <i>ripst1</i> gene for stilbene synthase (97%)
Fag-B-IES4,5h-149	CK986231	ca. 650	446/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Capsicum chinense</i> , auxin and ethylene responsive GH3-like protein (80%)
Fag-B-IES4,5h-27	DV466767	ca. 550	520/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Vitis labrusca</i> , <i>labst1</i> gene for stilbene synthase (99%)

Tabelle 3.1 (Fortsetzung)

3.5.2 RT-PCR des ESTs Fag-B-IES2,5h-56

Zur Verifizierung der cDNA-Subtraktion wurde exemplarisch eine RT-PCR des ESTs Fag-B-IES2,5h-56 (putative Quinonreduktase) aus den original RNA-Proben durchgeführt. Abbildung 3.5 zeigt die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Ansätze. Dabei wies der PCR-Ansatz der IES behandelten 'Börner'-Probe mit dem *sense*-Primer (Spur 2) ein Amplifikat der erwarteten Größe von ca. 250 bp auf. Dagegen konnten keine Amplifikate in den übrigen PCR-Ansätzen (behandelte Probe/*antisense*-Primer; unbehandelte Probe/*sense*- und *antisense*-Primer) festgestellt werden.

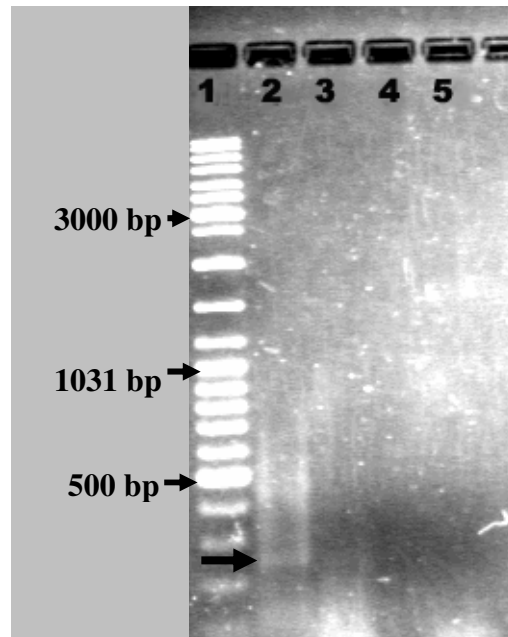


Abb. 3.5: RT-PCR des ESTs Fag-B-IES2,5h-56

Marker (1), behandelte Probe/*sense*-Primer (2, erwartetes Amplifikat durch Pfeil markiert), behandelte Probe/*antisense*-Primer (3), unbehandelte Probe/*sense*-Primer (4), behandelte Probe/*antisense*-Primer (5)

3.5.3 Nullprobe

Abbildung 3.6 zeigt die cDNA-Subtraktion der Nullprobe nach der ersten bzw. zweiten PCR-Amplifikation. Ähnlich zum cDNA-Subtraktionsansatz der 2,5-h- und 4,5-h-Probe wies auch hier das übereinstimmende Bandenmuster der subtrahierten Kontrollprobe mit der kommerziell subtrahierten Kontrolle auf einen erfolgreichen Verlauf der cDNA-Subtraktion hin. Weiterhin konnte insbesondere nach der ersten PCR ein deutlicher Unterschied in den cDNA-Konzentrationen zwischen den subtrahierten und den jeweiligen unsubtrahierten Proben festgestellt werden. Nach der zweiten PCR reduzierte sich dieser Unterschied vor allem in der Probe 03 deutlich.

Im Gegensatz zur 2,5-h- und 4,5-h-Probe wiesen die subtrahierten Proben 03 und 04 (Spuren 2 und 4) kein auffälliges Bandenmuster auf. Bis auf wenige Fragmente, die hervortraten, zeigte sich im Wesentlichen ein undifferenzierter cDNA-„Schmier“ in beiden subtrahierten Proben.

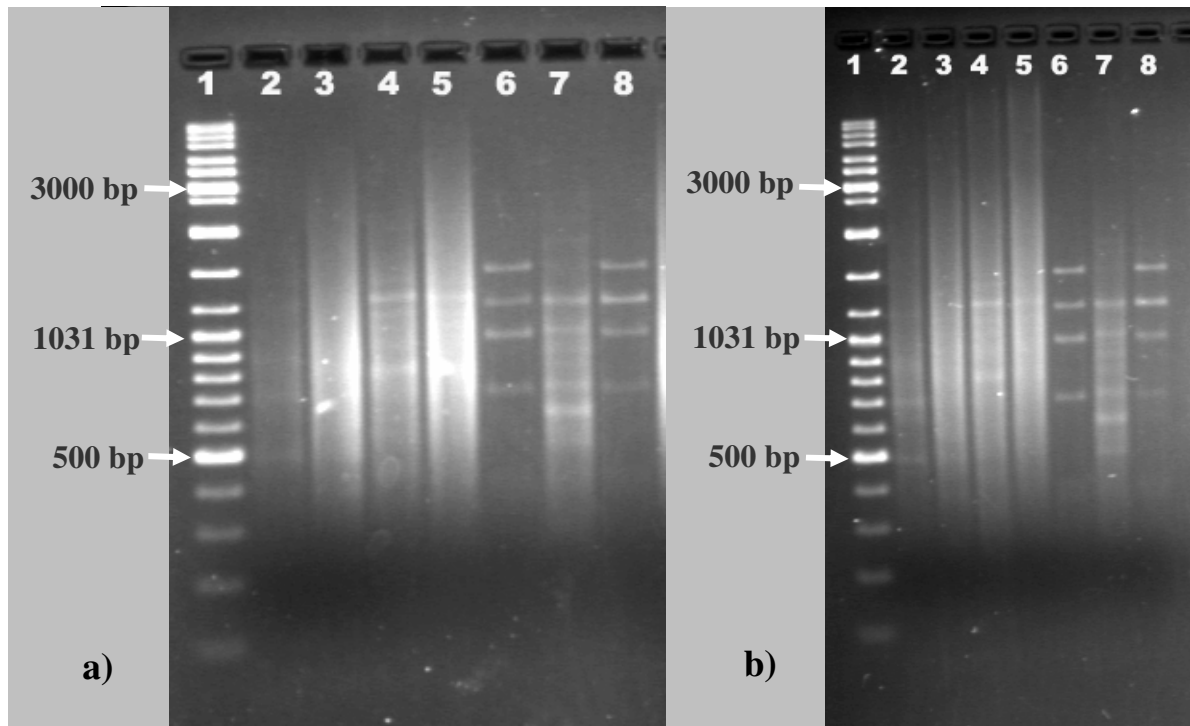


Abb. 3.6: cDNA-Subtraktion der Nullprobe 03/04 sowie der Kontrollen; nach der a) ersten und b) zweiten PCR-Amplifikation; Marker (1), subtrahierte Probe 04 (2), unsubtrahierte Probe 04 (3), subtrahierte Probe 03 (4), unsubtrahierte Probe 03 (5), subtrahierte Kontrolle (6), unsubtrahierte Kontrolle (7), kommerziell subtrahierte Kontrolle (8)

3.6 Microarrayanalyse der subtrahierten Proben

Neben der Isolierung und Sequenzierung wurde zusätzlich eine Microarrayanalyse zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene der 2,5-h- und 4,5-h- Probe durchgeführt. Ebenso erfolgte eine Microarrayanalyse der subtrahierten Nullprobe.

3.6.1 Hybridisierungsqualität

2,5-h- und 4,5-h-Probe

Für beide subtrahierten Proben wurden zwei Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde auf Chip_62 die 2,5-h-Probe mit der Cy3-Markierung und die 4,5-h-Probe mit der Cy5-Markierung hybridisiert. Mit beiden Farbkanälen zeigten sich deutliche und kräftige Signale, die auf eine erfolgreiche Hybridisierung hinwiesen. Teilweise konnte der sog. *doughnut effect* [Diehl et al., 2001] mit einem ausgeprägten Signal in den Randbereichen der

Spots und einem schwachen in der Spotmitte beobachtet werden (siehe Abb. 3.7). Weiterhin traten vereinzelt schlieren- oder fleckenförmige Hintergrundsignale auf.

Hybridisierungen mit Kontrollspots (leere Spots, *housekeeping*-Gene) konnten weder mit der Cy3 noch mit der Cy5 markierten Probe auf dem Chip gefunden werden.

Mit dem Chip_65 wurde das entsprechende *flip-dye*-Experiment durchgeführt. Auch hier konnten deutliche Hybridisierungssignale gefunden werden, die z. T. ebenfalls einen *doughnut effect* zeigten. Im Hinblick auf den Hintergrund fielen mit dem Chip_65 weniger störende Signale auf, sodass diese Hybridisierung als sehr erfolgreich gewertet wurde.

Signale mit Kontrollspots konnten auch in diesem Fall weder mit der Cy3 noch mit der Cy5 markierten Probe gefunden werden.

Abbildung 3.7 zeigt Ausschnitte (Subarrays) der hybridisierten Microarraychips mit den Proben 2,5-h/Cy5 (Chip_65) und 4,5-h/Cy5 (Chip_62). Wie zu erkennen ist, traten bis auf wenige Hintergrundflecken keine Hybridisierungssignale mit Positiv- (*housekeeping*-Gen) und Negativkontrollen (leere Spots) auf. Insgesamt zeigte das Hybridisierungsmuster beider Proben weitgehende Übereinstimmungen, wobei die 2,5-h-Probe intensivere Signale aufwies. Die in Abbildung 3.7 weiß markierten Spots veranschaulichen den gewählten Schwellenwert von 1000 (Intensitätswert). Der Spot mit dem stärkeren Signal zeigte in beiden Proben einen Intensitätswert von über 1000 und wurde damit als positives Hybridisierungssignal gewertet. Dagegen lag der schwächere Spot unterhalb des Schwellenwertes und wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Nullprobe

Für die subtrahierten Proben 03 und 04 wurden ebenfalls zwei Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde auf den Chip_281 die Probe 03 mit der Cy5-Markierung und die Probe 04 mit der Cy3-Markierung hybridisiert. Mit dem Chip_283 wurde das entsprechende *flip-dye*-Experiment durchgeführt. Beide Microarrays zeigten deutliche Signale, die auf eine erfolgreiche Hybridisierung hinwiesen. Lediglich auf Chip_281 konnte stellenweise ein zusätzliches Hintergrundsignal festgestellt werden.

Ein *doughnut effect* wie er bei der Hybridisierung der 2,5-h- und 4,5-h-Probe auftrat, konnte nicht gefunden werden. Hybridisierungssignale mit Negativkontrollen lagen ebenfalls nicht vor. Dagegen konnten mit beiden Proben sowohl auf Chip_281 als auch auf Chip_283 Hybridisierungssignale mit der Positivkontrolle *At4g00810*, einem ribosomalen Protein, regelmäßig in jedem Subarray gefunden werden.

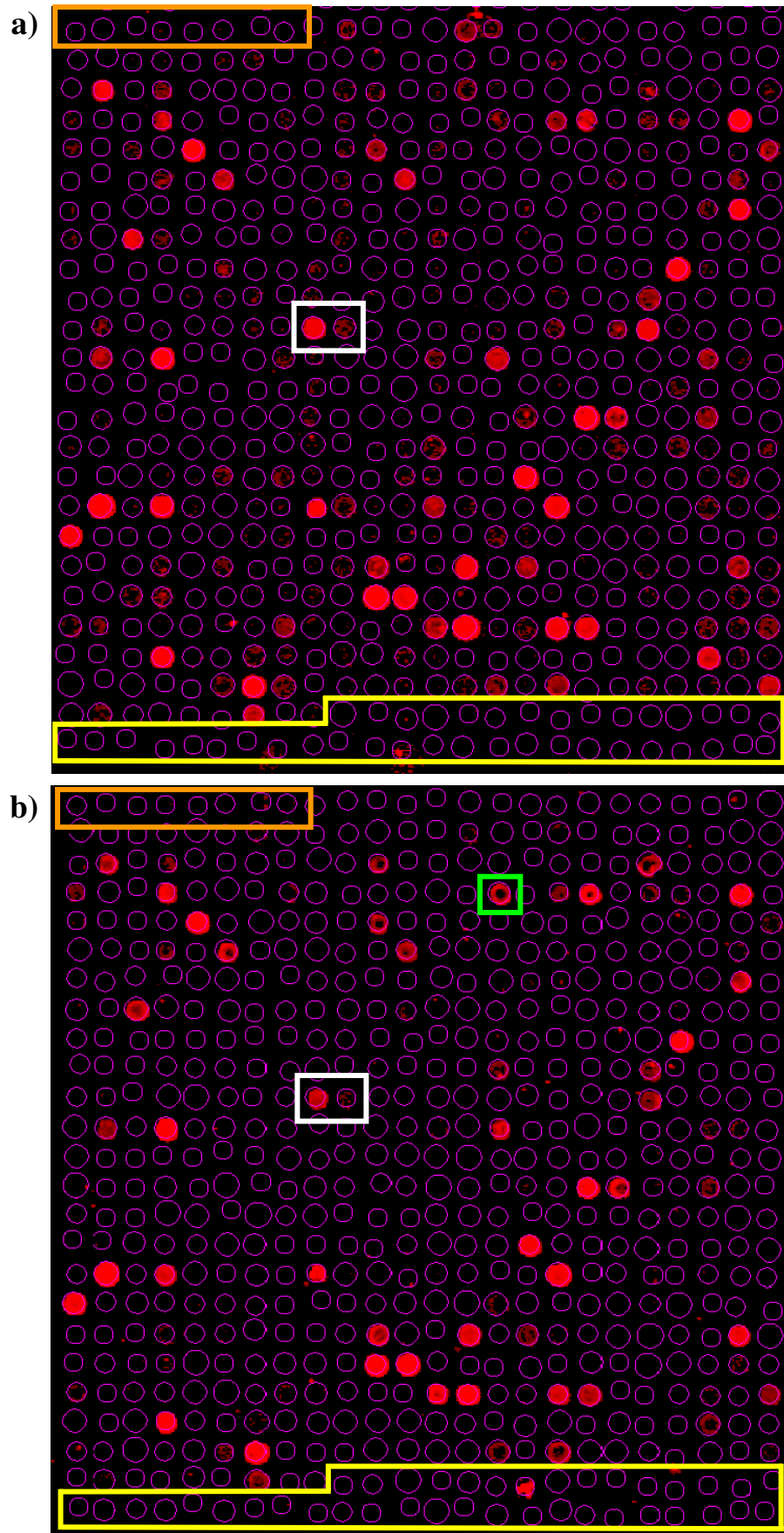


Abb. 3.7: Microarrayhybridisierung der 2,5-h- und 4,5-h-Probe; Subarrays

a) 2,5-h-Probe/Cy5 markiert (Chip_65); b) 4,5-h-Probe/Cy5 markiert (Chip_62); Positivkontrollen (orange); Negativkontrollen (gelb); Spot mit *doughnut effect* (grün); Hybridisierungssignale oberhalb und unterhalb des Schwellenwertes im Vergleich (weiß)

3.6.2 Ergebnisse der Microarrayanalysen

Nullprobe

Die vier Datensätze der Nullprobe (03/Cy3, 03/Cy5, 04/Cy3, 04/Cy5) wurden getrennt ausgewertet. In Tabelle 3.2 sind die Datensätze mit der Anzahl der Gene, deren Hybridisierungssignal über dem festgelegten Schwellenwert von 200 lag, aufgelistet. Die Cy3-Datensätze wiesen eine deutlich niedrigere Anzahl an gefundenen Genen auf. Bei einem Vergleich der Ergebnisse innerhalb jeder Probe stellte sich heraus, dass 90 % der Gene aus 03/Cy3 und 95 % der Gene aus 04/Cy3 mit den Ergebnissen des jeweiligen Cy5-Datensatzes übereinstimmten.

Für eine weitere Auswertung wurden die Resultate des Cy3- und Cy5-Datensatzes für jede Probe kombiniert. Dabei ergab sich in beiden Fällen eine vergleichbare Gesamtanzahl von rund 500 Genen. Ein Vergleich der Ergebnisse aus Probe 03 und 04 zeigte eine ca. 60%ige Übereinstimmung.

Datensatz	Anzahl der Gene	Anzahl der Gene (Kombinat)	Prozentuale Übereinstimmung
Probe 03/Cy3	100	498	60 %
Probe 03/Cy5	487		
Probe 04/Cy3	266	500	
Probe 04/Cy5	486		

Tabelle 3.2: Microarraydatensätze der Nullprobe

2,5-h- und 4,5-h-Probe

Die Datensätze Cy3 und Cy5 zeigten sowohl für die 2,5-h- als auch für die 4,5-h-Probe weitgehende Übereinstimmungen. Abbildung 3.8 verdeutlicht dies am Vergleich des Cy3- mit dem Cy5-Datensatz der 2,5-h-Probe. Dargestellt ist die Signaldifferenz gegen die Anzahl der Gene. Es ist zu erkennen, dass sich der größte Anteil der Gene um den Differenzwert Null befindet, d.h. die Ergebnisse beider Farbkanäle nahezu identisch sind.

Für die weitere Analyse wurde der Cy3- und Cy5-Datensatz für jede der beiden Proben kombiniert ausgewertet. In Tabelle 3.3 ist die Anzahl der Gene, deren Hybridisierungssignal über dem festgelegten Schwellenwert von 1000 lag, für beide Kombinate aufgelistet. Ebenfalls in der Tabelle zu finden, ist die Anzahl der Gene aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe, die

nach dem Abgleich mit den Ergebnisse aus den Datensätzen der Nullprobe sowie des Datensatzes Unbehandelt-1,5/R in die endgültige Auswertung eingingen.

Wie der Tabelle weiterhin zu entnehmen ist, lag die Anzahl der gefundenen Gene in der 4,5-h-Probe deutlich niedriger. Ein Vergleich der Ergebnisse zeigte, dass 92 % der Gene aus der 4,5-h-Probe ebenfalls in der 2,5-h-Probe zu finden waren.

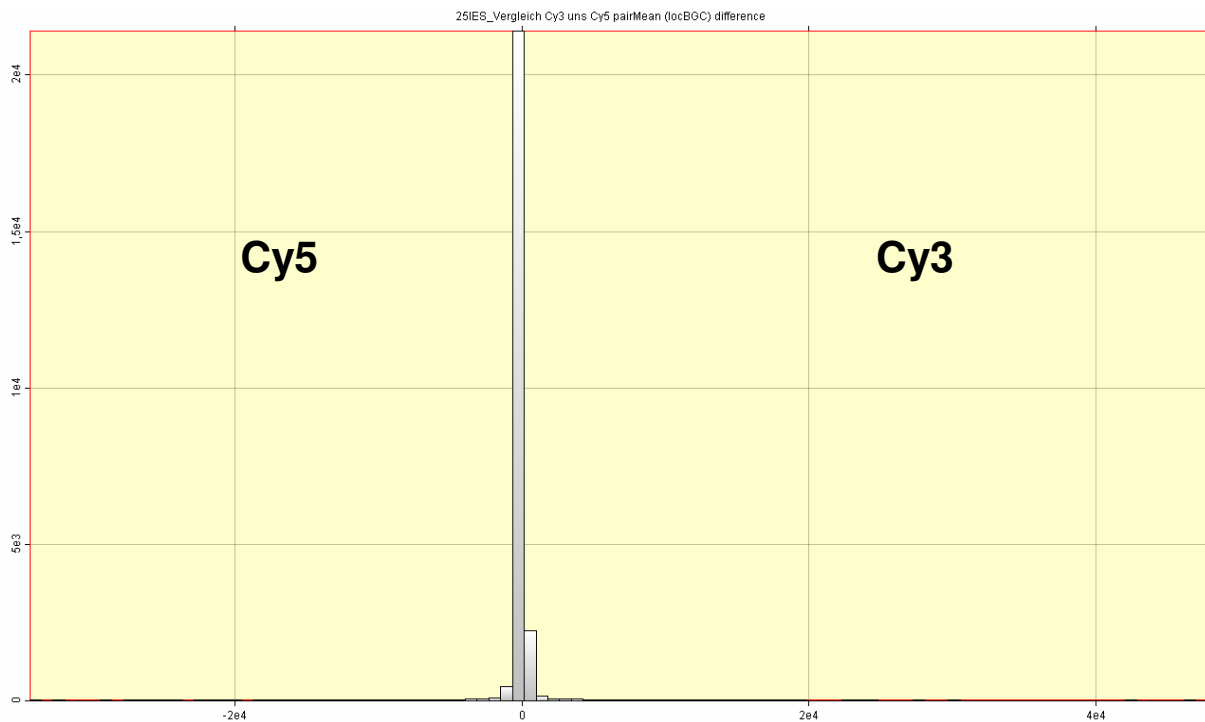


Abb. 3.8: Vergleich des Cy3- mit dem Cy5-Datensatz der 2,5-h-Probe
Differenzgrad (x-Achse), Anzahl der Gene (y-Achse)

Kombinierte Datensätze	Anzahl der Gene	Anzahl der Gene nach Abgleich mit Nullprobe und Unbehandelt-1,5/R
2,5-h-Probe: Cy3/Cy5	1300	845
4,5-h-Probe: Cy3/Cy5	940	611

Tabelle 3.3: Microarraydatensätze der 2,5-h- und 4,5-h-Probe

Die gefundenen Gene der 2,5-h- und 4,5-h-Probe wurden für die weitere Auswertung in insgesamt zehn funktionelle Kategorien unterteilt, die in Tabelle 3.4 zusammengefasst sind.

Abbildung 3.9 gibt für beide Proben die prozentuale Verteilung der Gene auf die einzelnen Kategorien an. Dabei zeigten sich vergleichbare Ergebnisse zwischen der 2,5-h- und 4,5-h-Probe.

Ein Teil der Resultate aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe ist in Tabelle 3.5 aufgelistet. Ausgenommen sind Gene der Kategorie „nicht annotiert/unbekannte Funktion“ sowie Gene, auf deren Funktion in der Diskussion nicht näher eingegangen wird. Eine Übersicht der Gesamtergebnisse ist im Anhang, Tabelle 8.1 zu finden.

Kategorie	Umfassende Gene bzw. Genprodukte
Signale/Signaltransduktion	Proteinkinasen und -phosphatasen, Signalsubstanzen, wie z.B. Hormone, weitere Signalkomponenten
DNA/RNA	Transkriptions assoziierte Proteine, wie z.B. TFs, sowie weitere DNA und RNA bindende Proteine
Metabolismus	Protein des Primär- und Sekundärmetabolismus
Transport	Proteine des Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Lipid-, Protein-, Wasser-, Ionen und Elektronentransportes
Proteinmetabolismus	Komponenten des Proteinanabolismus und -katabolismus
Auxin/Wachstum	Proteine der Auxinsynthese, -metabolismus, -transport sowie weitere Auxin regulierte Gene; Wachstums assoziierte Proteine
Photosynthese	Proteine der Photosynthese, ausgenommen Elektronentransport
Zellwand/Cytoskelett	Zellwand und Cytoskelett assoziierte Proteine
Abwehr	Abwehr assoziierte Proteine, solange sie nicht anderen Kategorien zugeordnet sind
nicht annotiert/ unbekannte Funktion	nicht annotierte Gene, Funktion unbekannt

Tabelle 3.4: Kategorisierung zur Auswertung der Microarrayergebnisse aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe

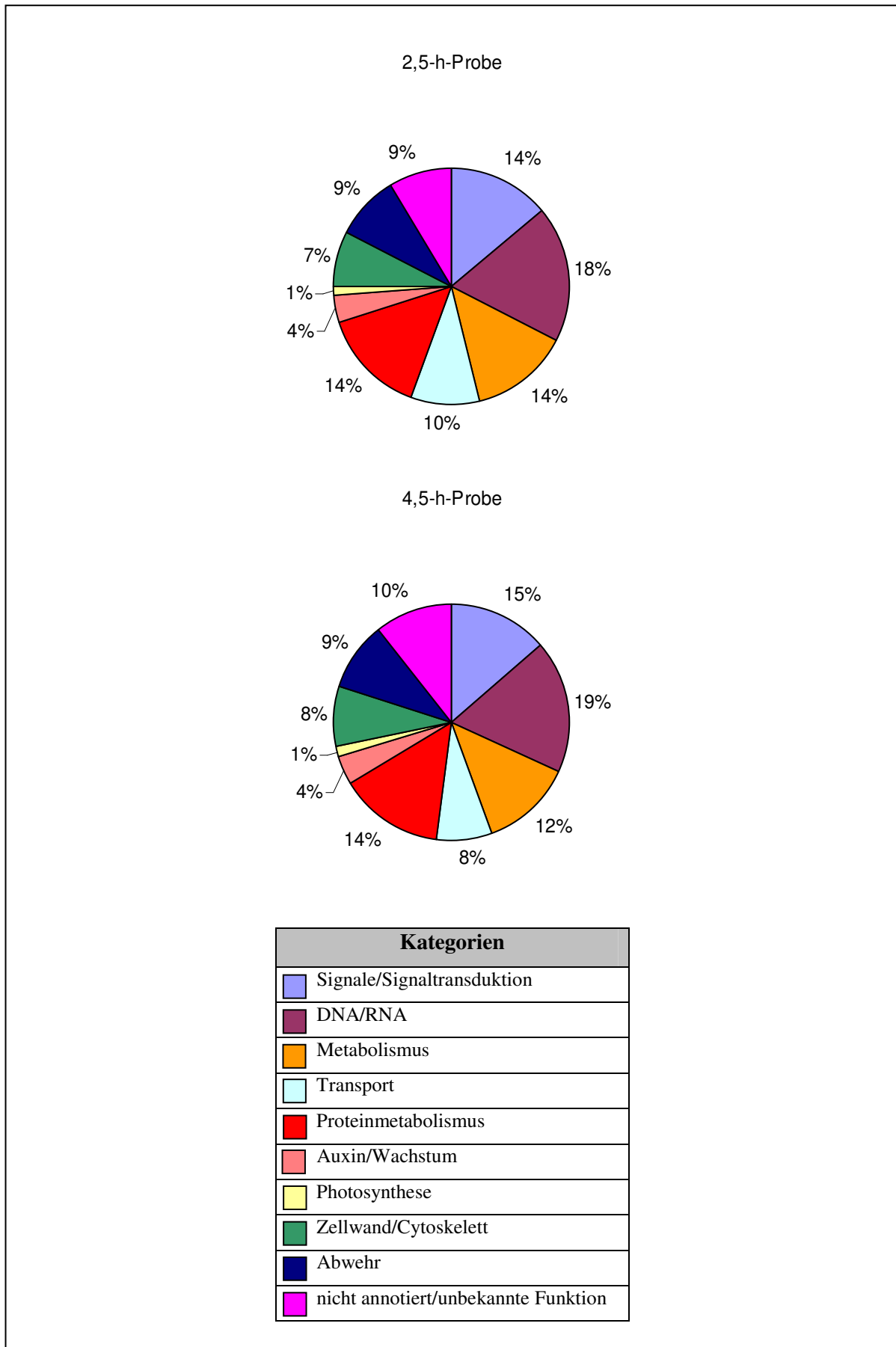


Abb. 3.9: Prozentuale Verteilung der Gene auf die funktionellen Kategorien

Signale/Signaltransduktion			
	Gen-ID	2,5	4,5
Proteinkinasen:			
mitogen-activated protein kinase, putative (MPK10)	At3g59790	+	+
mitogen-activated protein kinase, putative (MPK18)	At1g53510	+	
putative MAP kinase	At1g73670	+	
calcium-dependent protein kinase	At5g23580	+	+
calcium-dependent protein kinase-like protein	At5g12480	+	+
CBL-interacting protein kinase 2 (CIPK2)	At5g07070	+	+
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, similar to RLK5	At1g09970	+	+
protein kinase-related low similarity to receptor-like protein kinase 5 (RLK5)	At1g63600	+	+
receptor serine/threonine protein kinase (similar to PR5K)	At5g38250	+	
lectin protein kinase family protein	At3g16030	+	+
lectin protein kinase, putative, similar to receptor lectin kinase 3	At4g02420	+	+
WAK-like kinase (WAKL2)	At1g16130	+	
Pto kinase interactor 1-like protein	At5g41680	+	+
Pto kinase interactor, putative	At1g26150	+	
serine/threonine protein kinase, putative, similar to Pto kinase interactor 1	At1g06700	+	
phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	At4g36080	+	+
Calcium:			
calcineurin-like phosphoesterase family protein	At5g50400	+	+
calcineurin-like phosphoesterase family protein	At3g09970	+	+
purple acid phosphatase family protein, calcineurin-like phosphoesterase	At1g25230	+	+
calmodulin, putative	At2g41410	+	+
calcium-binding EF hand family protein similar to EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CCD1	At4g27280	+	+
lipase class 3 family protein / calmodulin-binding heat-shock protein, putative	At3g49050	+	+
calmodulin-binding protein	At4g25800	+	+
plasma membrane H ⁺ -ATPase - like; calcium ion transport	At3g60330	+	
calcium-transporting ATPase protein	At5g53010	+	+
Ethylen:			
putative ethylene receptor (EIN4)	At3g04580	+	+
putative amino-cyclopropane-carboxylic acid oxidase (ACC oxidase)	At1g12010	+	+
S-adenosylmethionine synthase 2	At4g01850	+	+
putative s-adenosylmethionine synthetase	At2g36880	+	+
putative s-adenosylmethionine synthetase	At3g17390	+	+
Jasmonate:			
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog, jacalin-like lectin domain	At1g52070	+	+
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog, jacalin-like lectin domain	At5g38540	+	+
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog, jacalin-like lectin domain	At1g52050	+	+
arginine decarboxylase 2 (SPE2)	At4g34710	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At1g19640	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At5g55250	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At5g37970		+

Tabelle 3.5: Microarrayergebnisse der 2,5-h- und 4,5-h-Probe
2,5-h-Probe (2,5); 4,5-h-Probe (4,5); Gen gefunden (+)

Signale/Signaltransduktion (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
G-Proteine:			
transducin family protein / WD-40 repeat family protein, G-beta repeat (10 copies)	At3g21540		+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein contains seven G-protein beta WD-40 repeats	At3g05090		+
GTP-binding protein-related, low similarity to RAC-like GTP binding protein ARAC3	At3g63150	+	+
rac family GTP-binding protein(ARAC9)	At2g44690	+	
rac family GTP-binding protein (ARAC4)	At1g20090	+	
prenylated rab acceptor (PRA1) family protein weak similarity to prenylated Rab acceptor 1	At5g07110	+	
RabGAP/TBC domain-containing protein, similar toGTPase-activating protein GYP7	At4g28550	+	+
Ras-related GTP-binding protein (Rab7)	At1g22740	+	+
ras-related small GTP-binding protein-like	At5g47200	+	+
Ras-related GTP-binding protein	At4g17160	+	+
DNA/RNA			
	Gen-ID	2,5	4,5
Transkriptionsfaktoren:			
WRKY family transcription factor, TMV response-related gene product	At5g15130	+	+
WRKY family transcription factor	At4g01720	+	+
WRKY family transcription factor	At2g23320	+	+
WRKY family transcription factor	At4g31800	+	
myb DNA-binding protein (AtMYB87, R2R3-MYB)	At4g37780	+	
myb DNA-binding protein (MYB77)	At3g50060	+	+
myb family transcription factor (TRIPTYCHON)	At5g53200	+	
myb family transcription factor	At2g40260	+	+
myb family transcription factor	At5g05090	+	+
myb family transcription factor	At1g71030	+	+
myb family transcription factor (MYB26)	At3g13890	+	
putative MYB family transcription factor	At2g38090	+	
AP2 domain-containing transcription factor	At2g39250	+	+
encodes a member of the DREB subfamily A-2 of ERF/AP2	At2g38340	+	+
encodes a member of the DREB subfamily A-5 of ERF/AP2	At5g67190	+	+
encodes a member of the ERF (ethylene response factor) subfamily B-5 of ERF/AP2 transcription factor family	At4g27950	+	+
putative ethylene response element binding protein (EREBP)	At2g44840	+	
ethylene-responsive protein -related contains similarity to ethylene-inducible ER33 protein	At3g20640	+	+
ethylene responsive element binding factor 9	At5g44210	+	
bZIP transcription factor, OBF5	At5g06960	+	
no apical meristem (NAM) family protein	At1g01720		+
no apical meristem (NAM) family protein, similar to NAC1	At4g01550	+	+
CUC2	At5g53950	+	+
scarecrow-like 11 - like	At5g59450	+	
scarecrow-like 13 (SCL13)	At4g17230	+	+
scarecrow-like 6 (SCL6)	At4g00150	+	
SCARECROW-like protein	At4g36710	+	+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

Metabolismus			
	Gen-ID	2,5	4,5
Primärmetabolismus:			
glutamate dehydrogenase 2	At5g07440	+	+
malate oxidoreductase, putative, similar to NADP-dependent malic enzyme	At2g19900	+	
proline iminopeptidase	At2g14260	+	+
phospholipase A2 beta	At2g19690	+	
phospholipase A2-like protein	At4g29460	+	+
Phospholipase D, putative	At3g15730	+	
phospholipase D-gamma	At4g11840	+	+
Cytochrom P450:			
cytochrome p450, putative	At1g64940	+	+
cytochrome P450 family protein, similar to Cytochrome P450 91A1	At4g37340	+	+
cytochrome p450 family	At1g13080	+	+
cytochrome p450 family	At1g13110	+	+
cytochrome p450 family	At2g14100	+	+
cytochrome P450 monooxygenase	At1g33720	+	
cytochrome p450, putative	At4g37410	+	
Phenylpropanoidbiosynthese:			
flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)	At5g07990	+	+
putative flavonol glucosyltransferase	At4g01070	+	+
leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	At5g05600	+	+
Isoprenoidbiosynthese:			
lupeol synthase (LUP1)	At1g78970	+	+
AMP-dependent synthetase and ligase family protein similar to AMP-binding protein	At1g20560	+	+
1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase - like protein	At5g11380	+	+
terpene synthase/cyclase family	At3g14540	+	+
transferase family protein similar to 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase - Taxus cuspidata	At5g07080	+	+
Alkaloidbiosynthese:			
FAD-binding domain-containing protein, similar to reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	At1g34575	+	
FAD-binding domain-containing protein, similar to reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	At1g26410	+	+
transferase family protein, similar to deacetylvinidoline 4-O-acetyltransferase	At5g47950	+	
Transport			
	Gen-ID	2,5	4,5
Protonentransport:			
ATPase E1-E2 type family protein	At4g30120	+	+
vacuolar ATP synthase subunit B	At1g76030	+	+
vacuolar ATP synthase subunit B	At4g38510	+	
vacuolar ATP synthase subunit D (VATD)	At3g58730	+	+
vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit 2	At1g19910	+	
pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	At1g15690	+	
vacuolar-type H ⁺ -translocating inorganic pyrophosphatase (AVPL1)	At1g78920	+	+
AAA-type ATPase family protein, similarity to mitochondrial ATPase (AAA family) Bcs1p	At4g05380	+	+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

Proteinmetabolismus			
	Gen-ID	2,5	4,5
Proteinkatabolismus:			
20S proteasome alpha subunit F1 (PAF1)	At5g42790	+	+
20S proteasome alpha subunit F2 (PAF2)	At1g47250	+	+
COP9 signalosome complex-related / CSN	At3g12850	+	+
E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1 (At3), putative	At2g25700	+	
E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1 (At9), putative	At3g21850	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein similar to RING-H2 zinc finger protein ATL6	At2g46160	+	+
aspartic protease, putative	At1g62290	+	
putative aspartic protease	At4g04460	+	
cathepsin B-like cysteine protease, putative	At1g02300	+	
cysteine proteinase, putative	At2g34080	+	+
cysteine proteinase RD19A	At4g39090	+	
FtsH protease, putative similar to AAA-metalloprotease FtsH	At1g07510	+	
peptidase M48 family protein, metalloendopeptidase activity	At5g51740	+	+
peptidase M50 family protein, metalloendopeptidase activity	At5g05740	+	
subtilisin-like serine protease	At5g58830		+
subtilisin-like serine protease	At4g10530	+	+
subtilisin-like serine protease	At4g10540	+	
subtilisin-like serine protease	At4g34980	+	
Auxin/Wachstum			
	Gen-ID	2,5	4,5
Auxinsynthese:			
flavin-containing monooxygenase / FMO (YUCCA3)	At1g04610	+	+
cytochrome p450 family, CYP83A1	At4g13770	+	+
Auxinkonjugate:			
IAA-amino acid hydrolase 5 / auxin conjugate hydrolase (ILL5)	At1g51780	+	
encodes a protein similar to IAA-amido synthases; GH3.1	At2g14960	+	+
IAA-alanine resistance protein 1 (IAR1)	At1g68100	+	+
Auxintransport:			
auxin efflux carrier family protein	At5g16530	+	+
ABC transporter family protein, contains similar to multidrug-resistant protein	At4g18050	+	+
Auxinrezeptor:			
auxin-binding protein 1 (ABP1)	At4g02980	+	
weiter Auxin regulierte Gene:			
auxin-responsive family protein, similar to auxin-induced SAURX10A	At4g34790	+	+
auxin-responsive family protein, similar to auxin-induced SAUR-AC1	At2g36210	+	
auxin-responsive protein, putative, similar to auxin-induced protein TGSAUR21	At2g16580	+	+
auxin-responsive GH3 family protein	At5g13320	+	+
auxin-responsive factor (ARF10)	At2g28350	+	+
Wachstum:			
speziell Auxin induziert:			
leucine-rich repeat family protein, identical to cDNA hypothetical protein (AIR9)	At2g34680	+	+
LOB domain protein 17 / lateral organ boundaries domain protein 17	At2g42440		+
LOB domain protein 29 / lateral organ boundaries domain protein 29	At3g58190	+	+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

Auxin/Wachstum (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
Zellzyklus:			
putative cyclin-dependent protein kinase	At3g05050	+	
Cyclin-dependent kinase B2;1	At1g76540	+	+
Cyclin D3;3	At3g50070	+	
exocyst subunit EXO70 family protein	At5g13990	+	
exocyst subunit EXO70 family protein	At1g54090	+	+
Nodulation:			
nodulin MtN21 family protein	At1g11460	+	+
integral membrane family protein / nodulin MtN21-related	At3g45870	+	
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein, similar to early nodulin ENOD8	At5g14450	+	+
universal stress protein (USP) family protein / early nodulin ENOD18 family	At3g03270	+	
Photosynthese			
	Gen-ID	2,5	4,5
chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP), identical to early light-induced protein;	At3g22840	+	+
phytochrome A signal transduction 1 (PAT1)	At5g48150	+	+
Zellwand/Cytoskelett			
	Gene-ID	2,5	4,5
Zellwand:			
callose synthase (1,3-beta-glucan synthase) family	At3g07160	+	+
ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	At4g36220	+	+
O-methyltransferase 1	At5g54160	+	
O-methyltransferase 1, putative	At1g21130	+	+
putative cinnamoyl-CoA reductase	At2g33600	+	+
glycosyl hydrolase family 35 (beta-galactosidase)	At4g35010	+	+
Abwehr			
	Gene-ID	2,5	4,5
Pathogenerkennung:			
leucine-rich repeat family protein, contains leucine rich-repeat (LRR), contains similarity to Cf-2.1	At3g53240	+	+
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), similar to disease resistance protein RPP1-WsC	At3g04220	+	
disease resistance protein (TIR class), similar to disease resistance protein RPS4	At1g57670	+	+
disease resistance-responsive family protein	At3g55230	+	+
disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	At5g66890	+	+
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	At2g14080	+	
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	At5g45260	+	+
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	At5g48620	+	+
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	At1g63360	+	+
non-race specific disease resistance protein (NDR1)	At3g20600	+	
glycosyl hydrolase family 81 protein, similar to beta-glucan-elicitor receptor	At5g15870	+	+
oxidative burst:			
ATP-NAD kinase family protein contains similarity to NAD kinase	At1g21640		+
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g52880	+	+
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g27820	+	
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g09940		+
monodehydroascorbate reductase, putative	At5g03630	+	+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

Abwehr (Fortsetzung)			
	Gene-ID	2,5	4,5
oxidative burst (Fortsetzung):			
peroxidase, putative, similar to peroxidase ATP3a	At5g64110	+	+
peroxidase, putative, identical to peroxidase ATP21a	At3g49960	+	
peroxidase, putative, identical to peroxidase ATP24a	At5g39580	+	+
peroxidase, putative	At5g64120	+	+
peroxidase 17 (PER17) (P17)	At2g22420	+	+
glutathione S-transferase, putative; belonging to the tau class of GSTs	At2g29420	+	+
ferredoxin-NADP+ reductase - like protein	At4g05390	+	
type 2 peroxiredoxin, putative	At1g65970	+	+
acid phosphatase type 5	At3g17790	+	
peptide methionine sulfoxide reductase - like protein	At5g61640	+	+
glutamate-cysteine ligase / gamma-glutamylcysteine synthetase (GSH1)	At4g23100	+	+
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At1g24470	+	
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At3g03980	+	+
putative tropinone reductase	At2g29320	+	+
putative tropinone reductase	At2g29370	+	+
PR-Genes:			
PR-1			
allergen V5/Tpx-1-related family protein, low similarity to Pathogenesis-related protein PR-1 precursor	At5g57625	+	+
allergen V5/Tpx-1-related family protein, low similarity to Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1)	At2g19980	+	+
allergen V5/Tpx-1-related family protein contains similarity to protein precursor	At5g66590	+	+
PR-2			
Bet v I allergen family protein low similarity to Pathogenesis-related protein2	At5g45860		+
PR-3, -4, -8, -11			
glycosyl hydrolase family 19 (chitinase)	At1g02360	+	+
glycosyl hydrolase family 19 (chitinase)	At2g43570	+	
glycosyl hydrolase family 18 protein, similar to chitinase, class V	At4g19740	+	
acidic endochitinase (CHIB1)	At5g24090	+	+
PR-5			
thaumatin, putative, strong similarity to pathogenesis-related group 5 protein	At1g18250	+	
PR-6			
cysteine protease inhibitor, putative / AtCYST1	At5g12140	+	+
trypsin inhibitor 2, putative	At1g47540	+	+
serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	At2g38900	+	+
serpin family protein / serine protease inhibitor family protein	At1g62170	+	
serpin, putative / serine protease inhibitor	At1g47710	+	+
PR-10			
major latex protein-related / MLP-related, Pathogenesis-related protein	At4g23670	+	+
PR-14			
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At4g12490	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At1g32280	+	
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At1g62790	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At3g22620	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At5g07230	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At4g12530		+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

Abwehr (Fortsetzung)			
	Gene-ID	2,5	4,5
HR und Seneszenz:			
band 7 family protein strong similarity to hypersensitive-induced response protein	At5g62740	+	+
band 7 family protein similar to hypersensitive-induced response protein	At5g51570	+	+
accelerated cell death 2 (ACD2) identical to accelerated cell death 2 (ACD2)	At4g37000	+	
MA3 domain-containing protein similar to programmed cell death 4 protein	At3g48390	+	
transferase family protein low similarity to hypersensitivity-related gene	At3g23840	+	+
senescence-associated protein 5-like protein	At5g46700	+	+
senescence-associated protein-related similar to senescence-associated protein SAG102	At5g65040	+	
diacylglycerol O-acyltransferase	At2g19450	+	
mitochondrial 28S ribosomal protein S29-related (MRP-S29, Death-associated protein 3, DAP-3)	At1g16870	+	+

Tabelle 3.5 (Fortsetzung)

3.6.3 Verifizierung der Microarrayergebnisse

Um die Zuverlässigkeit der Microarrayergebnisse einschätzen zu können, erfolgte ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den sequenzierten 'Börner'-ESTs aus der cDNA-Subtraktion. Eine Aufstellung der Resultate ist in Tabelle 3.6 dargestellt. Aufgelistet sind Datenbankübereinstimmungen der 'Börner'-ESTs mit Genen (Blastn) bzw. Proteinen (Blastx) aus *Arabidopsis* sowie dazu identische (I) oder vergleichbare (V) Ergebnisse aus der Microarrayanalyse. Von diesem Vergleich ausgenommen wurden die sechs gefundenen Stilbensynthese-cDNAs, da diese ESTs in der Datenbank keine Übereinstimmungen mit *Arabidopsis*-Sequenzen zeigten. Insgesamt konnten mit der 2,5-h- und 4,5-h-Probe in neun Fällen identische und in sieben Fällen vergleichbare Ergebnisse zwischen Sequenzierung und Microarrayanalyse gefunden werden. In nur drei Fällen zeigten die Microarrayergebnisse keine entsprechenden Resultate (-).

Weiterhin wurden angelehnt an die Microarrayanalyse 'Börner'-cDNAs mit spezifischen Primern aus der subtrahierten 2,5-h-Probe amplifiziert, isoliert und sequenziert. Von den 19 ausgewählten Genen aus der Microarrayanalyse konnten in zehn Fällen cDNAs aus der 'Börner'-Probe amplifiziert werden (Wolf, persönliche Kommunikation, 2005). Zum Teil lagen zwei Amplifikate vor, sodass insgesamt zwölf 'Börner'-Sequenzen isoliert und sequenziert wurden.

'Börner'-EST	NCBI-Datenbankübereinstimmungen mit <i>Arabidopsis</i> (prozentuale Übereinstimmung)	Identische oder vergleichbare Ergebnisse mit der Microarrayanalyse	
Fag-B-IES2,5h-100	<u>Blastn:</u> → <i>At3g55270</i> , MAP kinase Phosphatase, MKP1 (81%) <u>Blastx:</u> → <i>At3g55270</i> , <i>At3g06110</i> , phosphatase (72% bzw. 36%)	→ <i>At4g01420</i> , calcium-regulated protein phosphatase → <i>At2g32960</i> , tyrosine specific protein phosphatase	V
Fag-B-IES2,5h-107	<u>Blastx:</u> → <i>At1g34575</i> , FAD-binding domain-containing protein (60%) → <i>At1g26410</i> , FAD-binding domain-containing protein (58%)	→ <i>At1g34575</i> , <i>At1g26410</i> , FAD-binding domain-containing protein	I
Fag-B-IES2,5h-123	<u>Blastx:</u> → <i>At3g52800</i> , zinc finger-like protein (42%)	→ <i>At3g52800</i> , zinc finger-like protein → diverse zinc finger	I
Fag-B-IES2,5h-56	<u>Blastn/ Blastx:</u> → <i>At3g56460</i> , putative quinone reductase (Blastn: 83%)	—	—
Fag-B-IES2,5h-52	<u>Blastx:</u> → diverse Dioxygenasen (52-26%)	→ <i>At4g03060</i> , 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase → <i>At5g05600</i> , leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	V
Fag-B-IES2,5h-89	<u>Blastx:</u> → <i>At3g52800</i> , zinc finger-like protein (32%) → diverse zinc finger	→ <i>At3g52800</i> , zinc finger-like protein → diverse zinc finger	I
Fag-B-IES2,5h-90	<u>Blastx:</u> → <i>At1g78830</i> , <i>At1g16900</i> , curculin-like (mannose-binding) lectin family protein (62% und 56%) → <i>At1g78850</i> , <i>At1g78820</i> putative glycoprotein, EP1 (63%, 58%)	→ diverse Glycoproteine	V
Fag-B-IES2,5h-163	<u>Blastn/Blastx:</u> → diverse Dynamin ähnliche Proteine (Blastn: 90-78%)	—	—
Fag-B-IES2,5h-185	<u>Blastn:</u> → <i>At5g07440</i> , glutamate dehydrogenase 2 (80%)	→ <i>At5g07440</i> , glutamate dehydrogenase 2	I
Fag-B-IES2,5h-80	<u>Blastn:</u> → <i>At3g10740</i> , alpha-L-arabinofuranosidase (85%) → <i>At5g26120</i> , putative arabinosidase (84%) Blastx: siehe Blastn	—	—
Fag-B-IES2,5h-21	<u>Blastx:</u> → <i>At5g06740</i> , lectin-like protein kinase (47%)	→ <i>At3g16030</i> , <i>At4g02420</i> , <i>At5g42120</i> , lectin protein kinase family protein	V
Fag-B-IES2,5h-11	<u>Blastn:</u> → <i>At4g26140</i> , <i>At3g13750</i> , putative beta-galactosidasen (82%, 84%) <u>Blastx:</u> → diverse beta-Galactosidasen (69-56%)	→ <i>At4g35010</i> , beta-galactosidase	V
Fag-B-IES2,5h-38	<u>Blastn:</u> → <i>At1g07940</i> , <i>At1g07930</i> , <i>At5g60390</i> , <i>At1g07920</i> , elongation factor 1-alpha Blastx: siehe Blastn	→ <i>At5g10630</i> , elongation factor 1-alpha → <i>At1g35550</i> , Elongation factor 1-alpha	V

Tabelle 3.6: Vergleich der Sequenzierungsergebnisse mit den Microarrayergebnissen

'Börner'-EST	NCBI-Datenbankübereinstimmungen mit <i>Arabidopsis</i> (prozentuale Übereinstimmung)	Identische oder vergleichbare Ergebnisse mit der Microarrayanalyse	
Fag-B-IES2,5h-45	<u>Blastn:</u> → <i>At5g42020</i> , <i>At5g28540</i> luminal binding protein 1 und 2 (81%) <u>Blastx:</u> → <i>At1g09080</i> , luminal binding protein3 (63%)	→ <i>At1g09080</i> , luminal binding protein 3	I
Fag-B-IES2,5h-05	<u>Blastn:</u> → <i>At5g48230</i> , acetyl-CoA C-acetyltransferase (83%) → <i>At5g47720</i> , acetoacyl-CoA-thiolase (79%)	→ <i>At5g47720</i> , acetoacyl-CoA-thiolase	I
Fag-B-IES2,5h-48	<u>Blastn:</u> → <i>At2g14260</i> , proline iminopeptidase (80%)	→ <i>At2g14260</i> , proline iminopeptidase	I
Fag-B-IES4,5h-71	<u>Blastn:</u> → <i>At5g02490</i> , heat shock cognate 70kDa protein 2 (80%) → <i>At5g02500</i> , heat shock cognate 70kDa protein 1 (86%)	→ <i>At5g02490</i> , heat shock cognate 70kDa protein 2 → <i>At5g02500</i> , heat shock cognate 70kDa protein 1	I
Fag-B-IES4,5h-143	<u>Blastn:</u> → <i>At4g35220</i> , cyclase family protein (80%) <u>Blastx:</u> → diverse Cyclasen (72-63%)	→ <i>At3g14540</i> , terpene synthase/cyclase family	V
Fag-B-IES4,5h-149	<u>Blastn:</u> → <i>At2g14960</i> , similar to IAA-amido synthases, GH3.1 (86%)	→ <i>At2g14960</i> , similar to IAA-amido synthases, GH3.1	I

Tabelle 3.6 (Fortsetzung)

Laut Datenbankrecherche zeigten sechs 'Börner'-ESTs zu den Microarrayergebnissen vergleichbare Resultate. In zwei Fällen (Fag-B-IES2,5h-K26-M5 und Fag-B-IES2,5h-K4-M9) konnte mit der 'Börner'-Sequenz auf Nukleotidebene sogar eine Übereinstimmung mit dem entsprechenden *Arabidopsis*-Gen aus der Microarrayanalyse gefunden werden.

Die restlichen ESTs waren mit den *Arabidopsis*-Genen nicht vergleichbar oder konnten über die Gendatenbank nicht annotiert werden. In Tabelle 3.7 sind die beschriebenen Ergebnisse sowie die verwendeten PCR-Primer, die erwartete Amplifikatgröße und die tatsächliche Fragmentgröße aufgelistet. Weitere Sequenzinformationen können zu jedem 'Börner'-EST unter der jeweiligen ID über die NCBI-Datenbank recherchiert werden.

Im Falle der beiden als Cystatin charakterisierten ESTs Fag-B-IES2,5h-K1-M1 und Fag-B-IES2,5h-K4-M2 wurde ein Alignment beider Sequenzen durchgeführt (siehe Anhang, Abb. 8.5). Dabei zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung, die durch einen 146 bp langen Einschub im EST Fag-B-IES2,5h-K4-M2 unterbrochen ist.

Tabelle 3.7: Isolierte und sequenzierte 'Börner'-Sequenzen aus der 2,5-h-Probe zur Verifizierung der Microarrayergebnisse

<i>Arabidopsis</i> Gen-ID	Genbezeichnung	PCR-Primer/ erwartete Amplifikatgröße [bp]	erhaltene(s) Amplifikat(e) [bp]	sequenzierter Bereich [bp]/ Seq.-Primer	Beste NCBI- Datenbankübereinstimmung (Übereinstimmungen mit <i>Arabidopsis</i>)	'Börner' EST	NCBI-ID
<i>At3g52880</i>	monodehydroas- corbate reductase	TC31565 (for + rev)/ 304	304	304/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Cucumis sativus</i> , monodehydroascorbate reductase (→ <i>At3g52880</i>)	Fag-B- IES2,5h- K26-M5	DR784735
<i>At5g46700</i>	senescence- associated protein 5-like protein	TC32943 (for + rev)/ 226	291	291/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Arabidopsis</i> , <i>At5g57870</i> eukaryotic initiation factor4	Fag-B- IES2,5h- K10-M12	DV111308
<i>At5g61640</i>	peptide methionine sulfoxide reductase	TC25623 (for + rev)/ 204	214	214/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Pyrus pyrifolia</i> , elongation factor 1 alpha	Fag-B- IES2,5h- K1-M13	DV111309
<i>At3g22840</i>	early light- induced protein	TC25080 (for + rev)/ 276	276	276/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Retama raetam</i> , early light- induced protein-like (90%) (→ <i>Arabidopsis</i> , <i>At4g14690</i> early light-induced protein)	Fag-B- IES2,5h- K13-M4	DR784734
<i>At5g12140</i>	cystatin	TC38717/ TC38718 (for + rev)/ 259 bzw. 405	259	259/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Rumex obtusifolius</i> , putative cystatin (→ <i>At5g05110</i> , <i>At2g40880</i> , cystatin)	Fag-B- IES2,5h- K1-M1	DR784731
			405	405/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Rumex obtusifolius</i> , putative cystatin (→ <i>At5g05110</i> , <i>At2g40880</i> , cystatin)	Fag-B- IES2,5h- K4-M2	DR784732
<i>At5g14450</i>	lipase/hydrolase family protein, similar to early nodulin ENOD8	TC47420 (for2 + rev2)/ 278	92	92/M13 forward	keine signifikanten Übereinstimmungen	Fag-B- IES2,5h- K5-M11	DV111307

Tabelle 3.7 (Fortsetzung)

<i>Arabidopsis</i> Gen-ID	Genbezeichnung	PCR-Primer/ erwartete Amplifikatgröße [bp]	erhaltene(s) Amplifikat(e) [bp]	sequenzierter Bereich [bp]/ Seq.-Primer	Beste NCBI- Datenbankübereinstimmung (Übereinstimmungen mit <i>Arabidopsis</i>)	'Börner' EST	NCBI-ID
<i>At5g41680</i>	Pto kinase interactor	TC46478 (for + rev)/ 242	240	240/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Arabidopsis</i> , <i>At2g43230</i> , putative protein kinase	Fag-B- IES2,5h- K1-M3	DR784733
<i>At5g51570</i>	hypersensitive induced response protein	TC48417 (for + rev)/ 137 bzw. 491	137	137/M13 forward	<u>Blastx:</u> → <i>Solanum demissum</i> , putative hypersensitive-induced reaction protein → <i>Vitis vinifera</i> , hypersensitive- induced response protein (→ <i>Arabidopsis</i> , <i>At1g69840</i> , <i>At5g62740</i> , <i>At3g01290</i> , band 7 family protein, HR induced)	Fag-B- IES2,5h- K2-M6	DR831574
			491	491/M13 forward	<u>Blastn :</u> → <i>Populus tremula x Populus tremuloides</i> , phytochrome A	Fag-B- IES2,5h- K6-M7	DR831575
<i>At5g62740</i>	hypersensitive induced response protein	CN006868 (for + rev)/ 231	231	231/M13 forward	<u>Blastn:</u> <i>Capsicum annuum</i> , hypersensitive-induced reaction protein (→ <i>Arabidopsis</i> , <i>At5g62740</i> , hypersensitive-induced response protein)	Fag-B- IES2,5h- K4-M9	DR831577
<i>At4g37000</i>	accelerated cell death 2 (ACD2)	TC42618 (for + rev)/ 300	274	274/M13 forward	<u>Blastn:</u> → <i>Oryza sativa</i> , senescence- associated protein-like (→ <i>Arabidopsis</i> , <i>At4g30430</i> , senescence-associated family protein)	Fag-B- IES2,5h- K4-M10	DR831578

3.7 Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe

Der Genexpressionsvergleich der 1,5-h-Probe bzw. R-Probe mit der unbehandelten Probe 04 erfolgte mit einer Microarrayanalyse.

3.7.1 Hybridisierungsqualität

Sowohl mit der 1,5-h- also auch mit der R-Probe wurden jeweils vier Hybridisierungsexperimente durchgeführt. Dabei wurde Chip_42 aufgrund starker Hintergrundsignale von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Damit gingen drei Hybridisierungsexperimente der 1,5-h-Probe und vier der R-Probe in die weitere Auswertung ein.

Die verbleibenden sieben Microarrays zeigten gute Hybridisierungsergebnisse mit deutlichen Signalen. Dabei konnten auch Hybridisierungen mit Kontrollspots (*housekeeping*-Gene) gefunden werden, die in einem regelmäßigen Muster über den gesamten Chip gespottet waren. Abbildung 3.10 zeigt Ausschnitte (Subarrays) des Chip_279 mit der Cy3 und der Cy5 markierten Probe. Deutlich zu erkennen sind die Hybridisierungssignale mit den Kontrollspots. Es handelte sich dabei um ein *expressed protein* und das 60S ribosomale Protein P1. Mit beiden Spots konnte ein regelmäßiges Hybridisierungsmuster über den gesamten Chip gefunden werden. Wie die Abbildung 3.10 erkennen lässt, zeigten sich weitgehende Übereinstimmungen im Signalmuster, wobei mit der Cy5 markierten Probe stärkere Hybridisierungsintensitäten festgestellt wurden.

3.7.2 Ergebnisse der Microarrayanalyse

Für jeden Microarraychip wurde die Ratio aus den Cy3- und Cy5-Hybridisierungswerten gebildet. Dabei zeigte sich in allen Experimenten für den größten Anteil der Gene ein Ratiowert um eins, d.h. in diesen Fällen lag kein Unterschied zwischen der Cy3 und Cy5 markierter Probe vor. Abbildung 3.11 verdeutlicht dieses Ergebnisse am Beispiel des Chip_279. Dargestellt sind die Ratiowerte gegen die Anzahl der Gene. Klar ist zu erkennen, dass sich der wesentliche Teil der Gene im Bereich des Ratiowertes eins befindet.

Für die 1,5-h-Probe zeigten sich mit dem Chip_279 keine differenziell exprimierten Gene. Mit dem Chip_280 sowie mit dem Chip_41 konnte jeweils ein positiv reguliertes Gen in der IES behandelten Probe gefunden werden (siehe Tabelle 3.8).

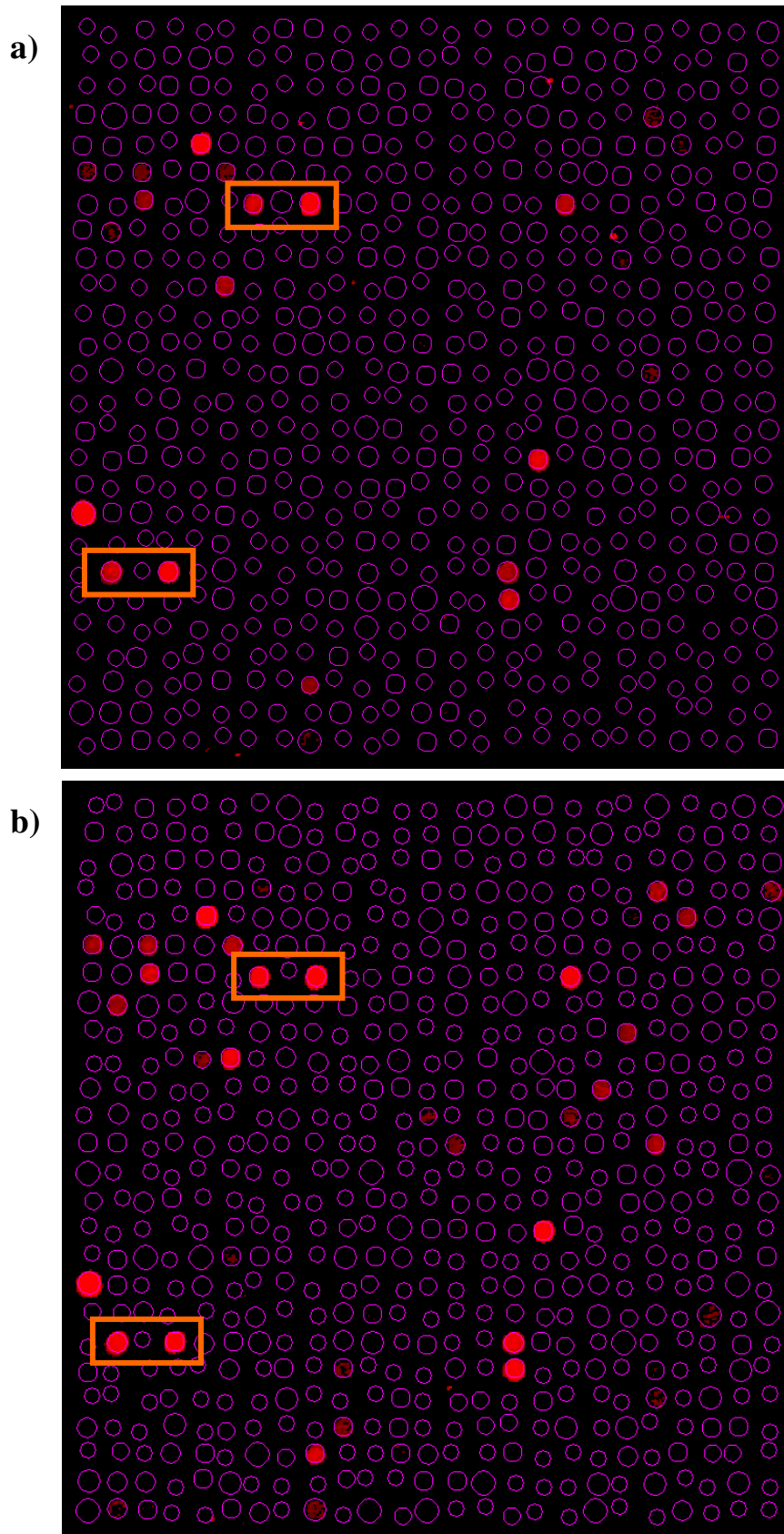


Abb. 3.10: Microarrayhybridisierung, Chip_279; Subarray
a) Cy3 markiert Probe, b) Cy5 markiert Probe, Kontrollspots (orange)

Für die R-Probe ergaben sich mit dem Chip_43 und 44 keine differenziell exprimierten Gene. Dagegen konnten mit Chip_290 ein positiv und mit Chip_289 drei negativ regulierte Gene in der R-Probe gefunden werden (siehe Tabelle 3.8).

Für jedes dieser Gene wurden zusätzlich die Ratiowerte aus den anderen Hybridisierungsexperimenten der jeweiligen Probe überprüft. Dabei stellte sich heraus, dass in allen anderen Experimenten diese Gene unterhalb des gesetzten Schwellenwertes fielen und daher nicht in die Auswertung eingingen.

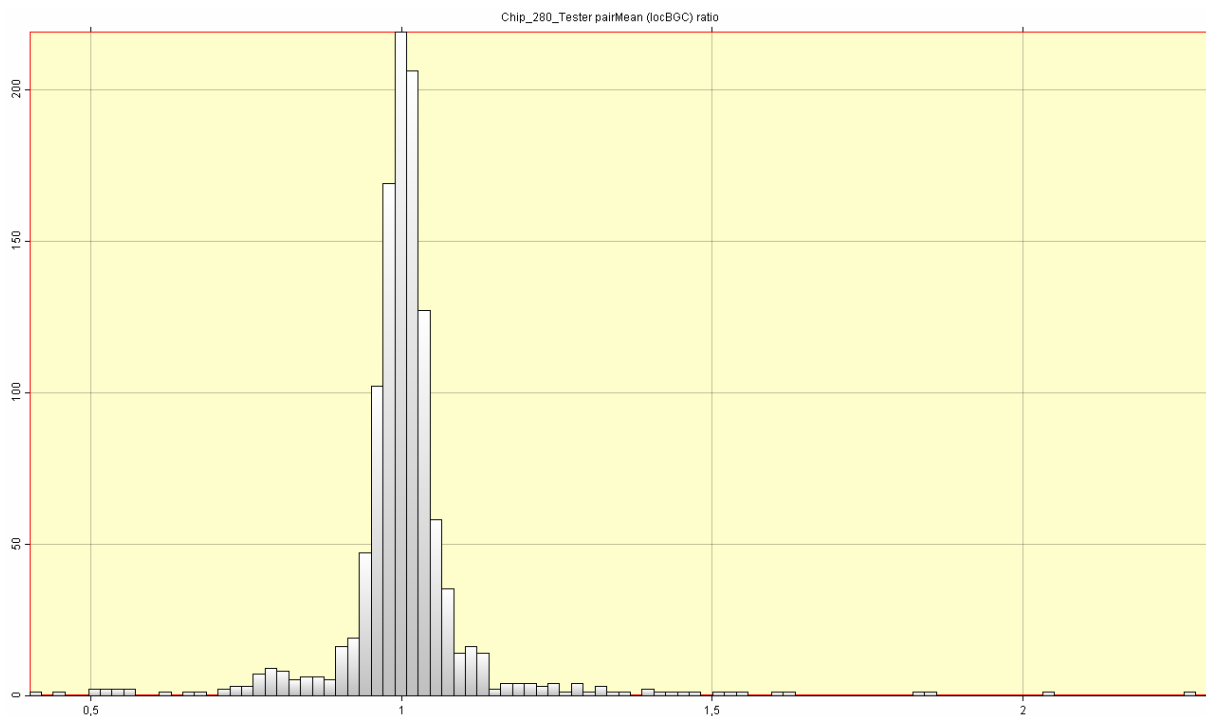


Abb. 3.11: Verteilung der Ratiowert am Beispl des Chip_279
Ratiowert (x-Achse), Anzahl der Gene (y-Achse)

1,5-h-Probe			
positiv reguliertes Gen:	Gen-ID	Ratio	Chip
structural maintenance of chromosomes (SMC) family protein, SCM1	At3g54670	2,41	41
R-Probe			
positiv reguliertes Gen:	Gen-ID	Ratio	Chip
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At1g66850	2,24	290
negativ regulierte Gene:			
expressed protein	At1g23340	-2,61	289
protein phosphatase 2C-related	At1g09160	-2,19	289
zinc finger (C2H2 type)	At5g15480	-2,47	289

Tabelle 3.8: Microarrayergebnisse der 1,5-h- und R-Probe

3.8 GeneFishing™ der 1,5-h-Probe

Neben der Microarrayanalyse wurde zusätzlich das GeneFishing™ zur differenziellen Expressionsanalyse der 1,5-h-Probe im Vergleich mit der unbehandelten Probe 03 durchgeführt.

3.8.1 Optimierung der PCR-Bedingungen

Um ein optimales Amplifikationsergebnis zu ermöglichen, erfolgte zunächst eine Optimierung der PCR-Bedingungen. Dies wurde mit den vom Hersteller empfohlenen Kontrollproben durchgeführt. Das beste PCR-Resultat konnte mit der *Taq*-DNA-Polymerase von MBI FERMENTAS und einer $MgCl_2$ -Menge von 3 μl je PCR-Ansatz erreicht werden. Eine 100%ige Übereinstimmung mit dem vom Hersteller empfohlenen Bandenmuster in Anzahl und Intensität der Banden konnte jedoch nicht festgestellt werden (siehe Abb. 3.12). Die Kontrollprobe 4.5 wies die erwarteten Fragmente mit einer Größe von 950, 475, 300 und 200 bp auf. Dagegen konnte die Bande bei 375 bp nicht eindeutig identifiziert werden. Stattdessen zeigte sich ein schwaches Amplifikat bei ca. 650 bp. Auch die Intensitätsverhältnisse entsprachen z. T. nicht den Erwartungen. So zeigte die Bande bei 200 bp eine deutlich schwächere Intensität als vom Hersteller vorgesehen.

Ähnliche Resultate ergaben sich mit der Kontrollprobe 18.5. Auch hier konnte das erwartete Amplifikat bei 375 bp nicht gefunden werden. Stattdessen zeigte sich eine Bande bei ca. 325 bp. Die übrigen PCR-Produkte stimmten in ihrer Fragmentgröße mit den Herstellerangaben überein. Jedoch zeigte auch hier die Bande bei 200 bp eine sehr schwache Intensität.

3.8.2 Isolierung differenziell exprimierter Gene

Von den insgesamt 20 Primerpaaren konnten nur mit zwei Kombinationen cDNA-Fragmente aus den 'Börner'-Proben amplifiziert und isoliert werden. Mit den restlichen Primerpaaren zeigten sich entweder keine Amplifikate oder nur sehr schwache, wenig distinkte Banden. In diesen Fällen war ein Vergleich zwischen der IES behandelten und der unbehandelten Probe bzw. eine Isolierung der Banden nicht möglich.

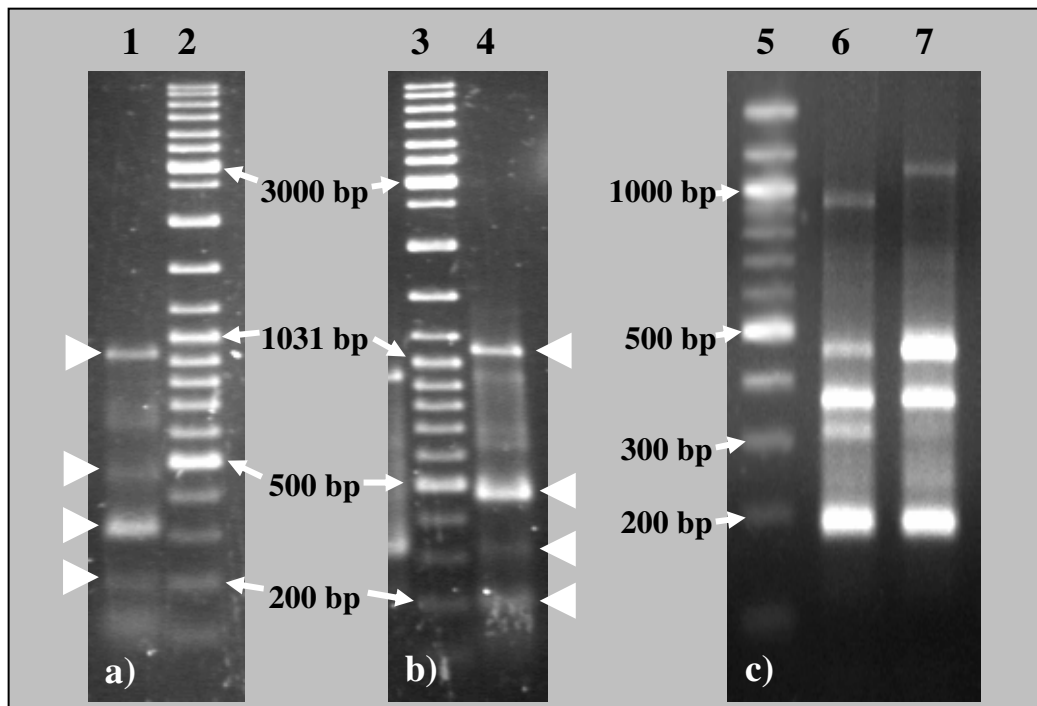


Abb. 3.12: Optimierung der PCR-Bedingungen für das GeneFishing™
 a) PCR-Optimierung mit der Kontrollprobe 4.5, Marker (2), 4.5-Probe (1); b), PCR-Optimierung mit der Kontrollprobe 18.5, Marker (3), 18.5-Probe (4); c) vom Hersteller empfohlene PCR-Resultate, Marker (5), 4.5-Probe (6), 18.5-Probe (7)

Mit dem Primerpaar ACP™-T/A18 konnte eine Doppelbande mit einer Fragmentgröße von ca. 500 bp amplifiziert werden (siehe Abb. 3.13). Diese Amplifikate zeigten eine deutlich stärkere Intensität in der unbehandelten Probe. Die cDNAs der Doppelbande konnten aus beiden Proben erfolgreich isoliert und sequenziert werden. Dabei zeigte sich eine 100%ige Übereinstimmung der Sequenzen aus der IES behandelten Probe mit denen der Vergleichsprobe, sodass von identischen Amplifikaten ausgegangen werden konnte.

Mit dem Primerpaar ACP™-T/A2 konnte ein Fragment von ca. 800 bp in der IES behandelten, nicht jedoch in der unbehandelten Probe amplifiziert werden. Die cDNA konnte erfolgreich isoliert und sequenziert werden.

Tabelle 3.9 zeigt eine Zusammenstellung der isolierten cDNA-Fragmente, ihrer Größe, der Länge des sequenzierten Bereiches sowie der besten Datenbankübereinstimmung auf Nukleotid- bzw. AS-Ebene. Weitere Sequenzinformationen können zu jedem 'Börner'-EST unter der jeweiligen ID über die NCBI-Datenbank recherchiert werden.

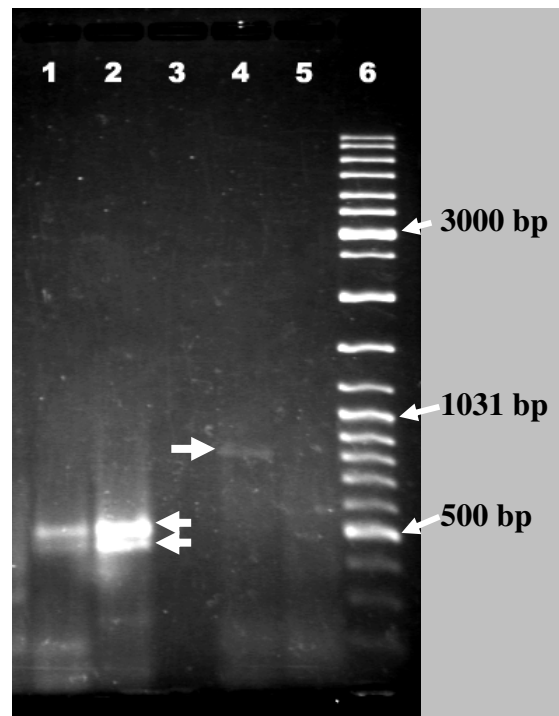


Abb. 3.13: GeneFishing™ der 1,5-h-Probe

IES behandelte Probe amplifiziert mit ACP-T/A18 (1), unbehandelte Vergleichsprobe amplifiziert mit ACP-T/A18 (2), freie Spur (3), IES behandelte Probe amplifiziert mit ACP-T/A2 (4), unbehandelte Vergleichsprobe amplifiziert mit ACP-T/A2 (5), Marker (6)

'Börner'-EST	NCBI-ID	ACP™-Primerpaar	Länge der isolierten cDNA [bp]	Länge des sequenzierten Bereiches [bp]/Seq.-Primer	Beste NCBI-Datenbankübereinstimmung (prozentuale Übereinstimmung)
negativ reguliert in der 1,5-h-Probe					
Fag-B-IES1,5h-GF-18_28	DV799594	ACP™-T/A18	500	395	<u>Blastn:</u> <i>Glycine max</i> , nodulin-26 mRNA (87%)
Fag-B-IES1,5h-GF-18_29	DV799595	ACP™-T/A18	500	356	<u>Blastx:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , universal stress protein (52%)
positiv reguliert in der 1,5-h-Probe					
Fag-B-IES1,5h-GF-02_20	DV799596	ACP™-T/A2	800	613	<u>Blastx:</u> <i>Arabidopsis thaliana</i> , homeobox-leucine zipper family protein, HB-5 (63%)

Tabelle 3.9: Ergebnisse des GeneFishing™ der 1,5-h-Probe

4. Diskussion

4.1 2,5-h- und 4,5-h-Probe

4.1.1 cDNA-Subtraktion

Die cDNA-Subtraktion nach der SSH-Methode bietet Vorteile gegenüber anderen Techniken der differentiellen Expressionsanalyse. So ermöglicht der Normalisierungsschritt zur Mengengleichung der einzelnen cDNA-Spezies die Anreicherung auch in geringen Konzentrationen vorliegender, differentiell exprimierter Gene. Dies ist vor allem im Hinblick auf die Expression von TFs oder Rezeptoren, deren mRNAs nur in geringen Mengen vorliegen, von entscheidendem Vorteil [Ji et al., 2002]. Gerade diese regulatorischen und an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten könnten bei 'Börner' in der Ausbildung der HR von entscheidender Bedeutung sein.

Die subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Proben zeigten deutliche Bandenmuster und ließen damit auf die Anreicherung differentiell exprimierter Gene schließen. Ebenso konnte eine klare Reduktion des cDNA-Gehalts in den subtrahierten Proben im Vergleich zu den jeweiligen nicht subtrahierten Proben festgestellt werden. Dies wiederum ist ein Hinweis auf die Eliminierung einzelner cDNA-Sequenzen im Verlauf der Hybridisierung. Im Idealfall handelt es sich dabei ausschließlich um nicht differentiell regulierte Gene.

Als weitere Bestätigung einer erfolgreich verlaufenen Subtraktion konnten zudem die übereinstimmenden Bandenmuster der subtrahierten Kontrolle und der kommerziell subtrahierten Kontrolle gewertet werden.

Im Falle der exemplarisch durchgeführten RT-PCR des ESTs Fag-B-IES2,5h-56 bestärkten die gewonnenen Ergebnisse zusätzlich die Annahme einer differentiellen Expression dieses Gens, da eine spezifische Amplifikation nur in der IES behandelten Probe, nicht jedoch in der unbehandelten gelang.

Diese Resultate bestätigten eine erfolgreich verlaufene cDNA-Subtraktion der 2,5-h- und 4,5-h-Probe.

Jedoch wiesen die subtrahierten Proben neben einem ausgeprägten Bandenmuster zusätzlich einen deutlichen Hintergrund an cDNA-Sequenzen auf. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Subtraktion in diesen Fällen nur unzureichend funktioniert hat und es sich bei diesen cDNAs nicht um differentiell exprimierte Gene handelt. Um diese Problematik genauer zu untersuchen, wurde eine sog. Nullprobe durchgeführt. Dabei erfolgte eine cDNA-Subtraktion mit zwei unbehandelten 'Börner'-Wurzelproben in beide Subtraktionsrichtungen. Als

Ergebnis zeigten sich vereinzelt Banden, sodass offensichtlich differenziell exprimierte Gene vorlagen. Da es sich in beiden Fällen um unbehandelte Wurzeln, jedoch nicht um identische RNA-Proben handelte, war dieses Ergebnis durchaus zu erwarten. Das Bandenmuster zeigte jedoch eine schwächere Ausprägung und deutlich weniger Banden im Vergleich zu den IES behandelten Proben, sodass hier von einem weitgehend übereinstimmenden Expressionsmuster ausgegangen werden konnte. Als Nebeneffekt dieses Versuches konnte damit zugleich gezeigt werden, dass ein Unterschied im Isolierungszeitpunkt der Wurzeln und somit auch im Alter der Rebstöcke nicht unmittelbar gravierende Unterschiede im Expressionsmuster zur Folge haben muss.

Neben den wenigen Banden war die elektrophoretische Auftrennung der subtrahierten Nullproben von einem starken cDNA-Hintergrund geprägt, wie er bereits bei den IES behandelten Proben auftrat. Die Microarrayanalyse der beiden subtrahierten Proben zeigte eine ca. 60%ige Übereinstimmung der Ergebnisse; ein Hinweis darauf, dass die Subtraktion in diesen Fällen nicht vollständig funktioniert hat.

Ji et al. (2002) konnten durch Untersuchungen der SSH-Methode zeigen, dass diese Technik in der praktischen Anwendung an Grenzen stößt. Eine sehr hohe Effizienz weist die cDNA-Subtraktion nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip bei solchen Genen auf, deren Expression differenziell aktiviert wird und deren entsprechendes Transkript nur im *tester* vorhanden ist. Wenn zusätzlich die Konzentration der entsprechenden mRNA über 0,01 % der gesamten mRNA-Probe liegt, kann eine erfolgreiche Anreicherung dieses Gens erfolgen. Problematischer ist dagegen die Isolierung solcher Gene, deren Expression zwar differenziell reguliert wird, aber das entsprechende Transkript sowohl im *tester* als auch im *driver* vorliegt. Nach Ji et al. (2002) können diese Gene nur erfolgreich bis zur Ausprägung einer deutlich sichtbaren Bande angereichert werden, wenn die ursprüngliche cDNA-Konzentration des Gens im *tester* mindestens um das 5fache höher liegt als im *driver*. Ist dies nicht der Fall, dann gehen die entsprechenden Amplifikate im Hintergrund der subtrahierten Probe unter, vorausgesetzt sie werden nicht zuvor durch die Hybridisierungsschritte vollständig subtrahiert.

Wie Ji et al. feststellen konnten, sind nicht differenziell exprimierte Gene immer in den subtrahierten Proben zu finden. Diese Präsenz äußert sich in einem cDNA-Hintergrund, der vor allem dann stark auftritt, wenn der Anteil nicht differenzieller Gene in *tester* und *driver* besonders hoch ist und nur wenige tatsächlich differenziell exprimierte Gene vorliegen. Dies konnte man u. a. im Falle der Nullprobe beobachten.

Im Hinblick auf die 2,5-h- und 4,5-h-Probe ist ebenfalls davon auszugehen, dass der Hintergrund auf nicht differenziell exprimierte Gene zurückzuführen ist. Möglicherweise sind aber auch einige differenziell regulierte Gene in den Hintergrund getreten, deren Transkripte in beiden Proben vorlagen und aufgrund eines zu geringen Konzentrationsunterschiedes zwischen *tester* und *driver* in der PCR-Amplifikation nur ungenügend angereichert werden konnten.

Dennoch wurde nach der Microarrayanalyse ein Abgleich mit den Ergebnissen der unbehandelten Proben (Nullprobe und Unbehandelt-1,5/R) durchgeführt, um so den Anteil nicht differenziell exprimierter Gene in der 2,5-h- und 4,5-h-Probe zu reduzieren.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die cDNA-Subtraktion der 2,5-h- und 4,5-h-Probe im Rahmen der praktischen Möglichkeiten dieser Methode weitestgehend erfolgreich verlaufen ist. Dennoch müssen die oben genannten Unzulänglichkeiten der Methode bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

4.1.2 Microarrayanalyse

Eine Identifizierung der über die cDNA-Subtraktion amplifizierten, differenziell exprimierten Gene erfolgte z. T. über eine DNA-Sequenzierung und anschließende Datenbankanalyse. Auf diese Weise konnten insgesamt 25 'Börner'-ESTs aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe erfolgreich charakterisiert werden. Diese Methode ist jedoch sehr zeitintensiv, sodass zur Identifizierung der Gene zusätzlich eine Microarrayanalyse durchgeführt wurde. Da zum Versuchszeitpunkt kein *Vitis*-Microarraychip zur Verfügung stand, wurde auf einen *whole-genome* Microarraychip von *Arabidopsis* zurückgegriffen. Zwei Aspekte spielten bei der Auswahl dieser Alternative eine Rolle. Zum einen sollte der Chip das gesamte Genom umfassen, um so ein breites Analysespektrum mit Genen aus allen physiologischen Bereichen der Pflanze abdecken zu können. Zum anderen zeigten sich auf Nukleotidebene teilweise 80 bis 90%ige Übereinstimmungen der sequenzierten 'Börner'-ESTs mit *Arabidopsis*-Genen (siehe Kapitel 3.6.3, Tabelle 3.6). Dies wurde als positive Voraussetzung für eine heterologe Hybridisierung gewertet.

Die Microarraytechnik ist bisher nur an einer kleinen Anzahl gut untersuchter Pflanzenmodelle, wie z.B. *Arabidopsis*, Mais und Reis, etabliert. Für weniger gut charakterisierte Pflanzen stehen entsprechende Microarraychips nicht in allen Fällen zur Verfügung. Horvath et al. (2003) konnten jedoch zeigen, dass der Einsatz von *Arabidopsis*-Chips auch in heterologen Systemen funktioniert. Sie untersuchten die Genexpression in

Blättern und Sprossspitzen bei Hafer, Pappel sowie Lorbeer, indem sie cDNA-Proben der Pflanzen mit einem *Arabidopsis*-Chip hybridisierten. Sie konnten mit dieser Methode erfolgreich in allen drei Versuchsobjekten differenziell exprimierte Gene identifizieren.

Im Falle der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe wurde der *Arabidopsis*-Chip nicht zur differenziellen Expressionsanalyse eingesetzt, sondern ausschließlich zum Screening der Proben. Da bei diesem Versuchsaufbau kein Expressionsvergleich erfolgte, zeigte sich die Auswertung der Daten wenig problematisch. Normalisierungsverfahren und statistische Tests fielen hierbei weniger ins Gewicht als das in Microarrayexperimenten zur differenziellen Expressionsanalyse der Fall ist (siehe Kapitel 4.2). Die Durchführungen eines *flip-dye*-Experimentes war allerdings auch bei diesem Versuchsansatz notwendig. Dabei werden Unterschiede, die bei der Markierungsreaktion aufgrund abweichender Einbaupräferenzen der Farbstoffe auftreten können, durch eine Wiederholung des Hybridisierungsexperimentes mit reverser Markierung der Proben eliminiert [Finkelstein et al., 2002]. Der Cy3- und Cy5-Datensatz wurde jeweils für die 2,5-h- und 4,5-h-Probe kombiniert und die beiden Proben unabhängig voneinander ausgewertet.

Bis auf vereinzelt auftretende Hintergrundsignale und einige ungleichmäßige Spots, zeigten beide Microarraychips eine gute Hybridisierungsqualität. Zudem konnten weitgehende Übereinstimmungen des Cy3- und Cy5-Datensatzes für beide subtrahierten Proben gefunden werden, sodass hier von einem erfolgreich verlaufenen Hybridisierungsexperiment ausgegangen werden konnte.

Signale mit *housekeeping*-Genen, die zur Normalisierung der Daten dienen (siehe Kapitel 4.2), konnten mit der 2,5-h- und 4,5-h-Probe nicht gefunden werden. Dass eine Bindung der 'Börner'-Proben an solche *housekeeping*-Gene prinzipiell möglich ist, da sie meist hoch konservierte Sequenzbereiche aufweisen, konnte mit den Hybridisierungsergebnissen der 1,5-h- und R-Probe gezeigt werden (siehe Kapitel 3.7.1). Es ist deshalb davon auszugehen, dass diese Gene in der 2,5-h- und 4,5-h-Probe nicht vorlagen. Dieses Resultat spricht wiederum für eine erfolgreich verlaufene Subtraktion solcher, in der Regel nicht differenziell regulierter *housekeeping*-Gene.

Ebenfalls konform mit den Ergebnissen der cDNA-Subtraktion zeigte sich die Anzahl der gefundenen Gene in der Microarrayanalyse. Deutlich mehr und intensivere Signale konnten mit der 2,5-h-Probe beobachtet werden. Vergleichbar dazu zeigte auch die elektrophoretische Auftrennung dieser subtrahierten Probe (siehe Kapitel 3.5.1, Abb. 3.4) ein stärker ausgeprägtes Bandenmuster und eine höhere cDNA-Konzentration im Vergleich zur 4,5-h-

Probe. Dennoch zeigten sich auch klare Übereinstimmungen der Bandenmuster, sodass eine ca. 92%ige Deckung der Microarrayresultate beider subtrahierter Proben nachvollziehbar ist.

Um die Zuverlässigkeit der Microarrayergebnisse besser einschätzen zu können, wurde ein Vergleich dieser Ergebnisse mit den sequenzierten 'Börner'-ESTs aus der cDNA-Subtraktion durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob *Arabidopsis*-Gene, die mit den 'Börner'-ESTs auf Nukleotid- oder AS-Ebene Übereinstimmungen zeigten, auch in den Microarrayergebnissen auftraten. Das Resultat fiel mit neun identischen und sieben vergleichbaren Ergebnissen sehr positiv aus. Nur in drei Fällen konnten keine Übereinstimmungen gefunden werden. Wie die nachfolgende Diskussion der Ergebnisse deutlich macht, stehen zudem viele der über die Microarrayanalyse gefundenen Gene im Zusammenhang mit Resistenzreaktionen oder IES induzierten Wachstumsprozessen. Dies spricht für die Zuverlässigkeit der Ergebnisse im Rahmen einer heterologen Hybridisierung.

Am Beispiel der Stilbensynthesen, deren cDNAs aus der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe isoliert werden konnten, werden allerdings auch die Grenzen des Hybridisierungsansatzes deutlich. Ein Datenbankabgleich dieser 'Börner'-ESTs zeigte weder auf Nukleotid- noch auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit *Arabidopsis*. Es ist daher anzunehmen, dass solche Wein oder 'Börner' spezifischen Gene mit der Microarrayanalyse nicht erfasst wurden.

Unter den neun identischen Resultaten zwischen Sequenzierung und Microarrayanalyse befanden sich vier 'Börner'-ESTs, die auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit dem entsprechenden *Arabidopsis*-Gen aufwiesen. Die prozentuale Identität zwischen den Sequenzen betrug in diesen Fällen ca. 80 %. Möglicherweise ist das ein Hinweis auf die mindestens notwendige Homologie, die zwischen den heterologen Systemen vorliegen muss, damit eine erfolgreiche Hybridisierung unter den gewählten Bedingungen erfolgen kann. Dem hier vorliegenden Versuchsaufbau kommt ein Effekt zugute, der in homologen Hybridisierungssystemen eher störend ist. Es muss keine 100%ige Sequenzhomologie zwischen der markierten Probe und der DNA des Microarraychips vorliegen, damit es zur Hybridisierung kommt. Verbunden ist damit eine verminderte Bindungsspezifität und eine sog. *cross-hybridization* der Spot-DNA mit verwandten Gensequenzen, wie z.B. aus Multigenfamilien. Dabei hat sich gezeigt, dass eine Sequenzhomologie von 70 % für eine *cross-hybridization* ausreicht [Donson et al., 2002]. Diese Voraussetzung ermöglicht die Bindung der 'Börner'-Proben an den *Arabidopsis*-Chip, kann aber auch zu unspezifischen Ergebnissen und Fehlinterpretationen führen.

Da nur wenige Informationen über das Hybridisierungsverhalten sowie den Homologiegrad zwischen 'Börner' und *Arabidopsis* vorliegen, wirkt sich dies auf die Zuverlässigkeit der Resultate aus und muss bei der Interpretation der Microarrayergebnisse berücksichtigt werden. In der Regel kann eine Kombination aus cDNA-Subtraktion und anschließender Microarrayanalyse eine Minimierung des störenden Hintergrundes aus der cDNA-Subtraktion und damit nicht differenziell exprimierter Gene ermöglichen [van den Berg et al., 2004]. Schwache Hybridisierungssignale deuten auf Gene des Hintergrundes aus der Subtraktion hin und werden verworfen. Dagegen sprechen starke Hybridisierungssignale für differenziell exprimierte Gene und werden ausgewertet. In einem heterologen Hybridisierungssystem ist diese Selektion nicht so einfach möglich. Ein intensives Hybridisierungssignal kann auf ein stark amplifiziertes 'Börner'-Gen der Subtraktion hindeuten. Es kann sich aber auch um eine Sequenz aus dem Hintergrund handeln, die aufgrund eines sehr hohen Homologiegrades zur Spot-DNA ein intensives Signal liefert. Umgekehrt kann ein stark amplifiziertes 'Börner'-Gen mit geringer Homologie ein schwaches Signal auf dem Chip ergeben und sogar unterhalb des Schwellenwertes fallen. Daher wurde keine Bewertung der Microarrayergebnisse in Bezug auf die Signalintensität durchgeführt. Lediglich ein Schwellenwert musste festgelegt werden, um unspezifische Hintergrundsignale des Chips von der Auswertung auszuschließen.

Aufgrund der geschilderten Unsicherheitsfaktoren der angewandten Methode, müssen die vorliegenden Microarrayergebnisse als Hinweise betrachtet werden, die einer weiteren Verifizierung bedürfen. In einigen Fällen konnte bereits eine Bestätigung der Resultate erfolgen. Angelehnt an die Microarrayergebnisse konnten mit spezifischen Primern cDNA-Sequenzen aus dem PCR-Produkt der subtrahierten 2,5-h-Probe amplifiziert werden. Insgesamt wurden 19 Gene aus den Microarrayergebnissen für diesen Versuch ausgewählt. In sechs Fällen konnten vergleichbare Gene in 'Börner' durch eine spezifische PCR-Amplifikation und anschließende Sequenzierung gefunden werden. Damit betrug die Erfolgsquote ca. 30 %. Jedoch muss bei den restlichen 13, bisher erfolglos amplifizierten Genen nicht zwangsläufig von fehlerhaften Microarrayergebnissen ausgegangen werden. Die Erfolgsquote der Amplifikation könnte mit einer weiteren Optimierung der Primer und der PCR-Bedingungen gesteigert werden. Für die Primergenerierung wurde ein Vergleich der *Arabidopsis*-Sequenzen mit dem TIGR *grape gene index* durchgeführt. Zum Teil zeigten sich Übereinstimmungen mit mehr als zehn *Vitis*-ESTs, die jedoch nicht alle für ein Primerdesign genutzt wurden. Möglicherweise führt eine Generierung der Primersequenzen an den bisher unberücksichtigten ESTs zu den gewünschten Amplifikationsergebnissen.

Die Kombination aus cDNA-Subtraktion und Microarrayanalyse hat sich trotz der oben diskutierten Unsicherheitsfaktoren im Rahmen der vorliegenden Arbeit als erfolgreiche Methode herausgestellt. Das Verfahren ermöglicht die Isolierung und Anreicherung differenziell exprimierter Gene sowie den Gewinn erster Identifizierungshinweise in kurzer Zeit. Optimierungen beider Techniken könnten zukünftig zu einer besseren Absicherung der Ergebnisse beitragen, wie z.B. eine Erhöhung der Stringenz während der Microarrayhybridisierung. Zwar würde die Anzahl identifizierbarer Gene in einem heterologen Hybridisierungssystem reduziert werden, aber gefundene Signale wären spezifischer. Im Hinblick auf die cDNA-Subtraktion könnte das Subtrahieren der Proben in beide Richtungen, wie dies für die Nullprobe durchgeführt wurde, zur Identifizierung nicht differenziell exprimierter Gene beitragen.

4.1.3 Differenziell regulierte Gene der 2,5-h- und 4,5-h-Probe

Die Ergebnisse aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe zeigten weitgehende Übereinstimmungen, was zu erwarten war. Es ist nicht notwendigerweise davon auszugehen, dass eine längere IES-Induktionszeit zu einer gravierenden Änderung des Expressionsmusters führt. Gefundene Unterschiede zwischen beiden Proben können u. U. auf technischen Unzulänglichkeiten der Analysemethoden zurückzuführen sein. Daher werden im Folgenden die Resultate aus beiden Proben nicht im Hinblick auf mögliche Unterschiede, sondern als Gesamtergebnis diskutiert. Da die IES als Wachstumshormon an einer Vielzahl physiologischer Prozesse der Pflanze beteiligt ist, muss in Betracht gezogen werden, dass einige der gefundenen differenziell exprimierten Gene in IES induzierte Wachstumsreaktionen involviert sind und wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit dem Resistenzmechanismus stehen. Daher werden die Resultate in den folgenden Kapiteln unter beiden Aspekten, Resistenz und Wachstum, diskutiert.

4.1.3.1 Signale und Signaltransduktion

Mitogen aktivierte Proteinkinasen

Eine wichtige Grundlage der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die Weiterleitung von Signalen. Da Proteine durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung in zwei Zuständen als Ein/Ausschaltelemente aktiv oder inaktiv vorliegen können, ist dieses System ideal für eine Signaltransduktion geeignet [Heldt, 2003]. Dabei übernehmen MAPKs eine Schlüsselfunktion in der Proteinphosphorylierung. Die Signaltransduktion über MAPK-Kaskaden gehört in

eukaryotischen Zellen zu einem der wichtigsten Wege, extrazelluläre Signale über einen Rezeptor intrazellulär weiterzuleiten und in der Zelle eine entsprechende Antwort zu induzieren. Diese Signalkaskaden bestehen aus drei Modulen, an deren Ende eine MAPK steht. Diese MAPK wird phosphoryliert und aktiviert durch eine MAPK-Kinase (MAPKK), die wiederum zuvor phosphoryliert und aktiviert wird durch eine MAPKK-Kinase (MAPKKK). Sehr gut untersucht ist die Signaltransduktion durch MAPKs im tierischen Organismus und an Hefezellen. In Pflanzen konnten Vertreter aller drei Module gefunden werden, jedoch sind die MAPK-Kaskaden nicht im Detail bekannt. In *Arabidopsis* sind bisher 23 MAPKs, 9 MAPKKs und 25 MAPKKKs charakterisiert [Tena et al., 2001]. Diese große Anzahl an Proteinen in allen drei Modulen erlaubt die Erkennung und Weiterleitung eines breiten Signalspektrums. Es ist daher nicht verwunderlich, dass MAPKs an einer Reihe unterschiedlicher Prozesse der Pflanze beteiligt sind, wie z.B. an der Regulation des Zellzyklus sowie an Stress und Pathogen induzierten Reaktionen. In *Arabidopsis* kommt es als Antwort auf Kälte, Hitze, UV-Strahlung, Verletzungen und weitere Stresseinflüsse zur Akkumulation der beiden MAPKs AtMPK4 und AtMPK6. Sehr eng verbunden sind diese Kinasen auch mit der Pathogenabwehr. Besonders gut untersucht sind die *wound-inducible protein kinase* (WIPK) und die *SA-inducible protein kinase* (SIPK) aus dem Tabak und die entsprechenden orthologen Proteine AtMPK6 bzw. AtMPK3 in *Arabidopsis*, die sowohl durch einen Pathogenbefall als auch durch Stressesstimuli aktiviert werden [Tena et al., 2001]. An Tabakpflanzen konnte zudem gezeigt werden, dass sowohl die WIPK als auch die SIPK eine entscheidende Funktion bei der Pathogen induzierten HR erfüllen [Suzuki et al., 2002]. Im Zusammenhang mit der Regulation von Abwehrreaktionen durch MAPKs scheinen außerdem Vernetzungen mit Ca^{2+} gesteuerten Signalwegen sowie mit dem *oxidative burst* vorzuliegen. Zu der Funktion als positive Regulatoren der pflanzlichen Pathogenabwehr, kommt die Fähigkeit einiger MAPKs Abwehrreaktionen zu inhibieren. So konnte an *Arabidopsis* gezeigt werden, dass AtMPK4 die SA induzierte SAR negativ reguliert [Suzuki, 2002].

Bisher ist in Pflanzen noch keine MAPK-Kaskade vollständig vom Rezeptor bis zum MAPK-Substrat bekannt, sodass auch keine detaillierten Kenntnisse über MAPK kontrollierte Abwehrreaktionen vorliegen [Suzuki, 2002; Tena, 2001].

Ebenso lückenhaft sind die Informationen über eine Funktion der MAPKs in Hormon gesteuerten Signalwegen. Untersuchungen an Tabakpflanzen haben gezeigt, dass eine Behandlung mit Auxinen zur Akkumulation von MAPKs führt [Tena et al., 2001]. Im Gegensatz dazu wird auch eine negative Regulation Auxin gesteuerter Signaltransduktion

durch MAPKs angenommen. Eine durch oxidativen Stress induzierte MAPK-Kaskade, in die u. a. AtMPK3 und AtMPK6 involviert sind, führt in *Arabidopsis* zu einer Repression der Auxinantwort [Tena et al., 2001].

Auch die Microarrayanalyse lieferte Hinweise auf die Aktivierung von MAPKs in beiden IES behandelten 'Börner'-Proben. So konnten Hybridisierungssignale mit insgesamt drei putativen MAPKs ermittelt werden, darunter eine mögliche MPK10 und eine MPK18. Zu beiden Kinasen liegen nur wenige Informationen über ihre Funktion im pflanzlichen Organismus vor. MPK10 fällt zusammen mit MPK6 und MPK3 in eine phylogenetische Gruppe von MAPKs, die hauptsächlich in Stress und Hormon bedingten Reaktionen aktiviert werden [Ichimura et al., 2002]. Es ist daher nicht auszuschließen, dass eine vergleichbare MAPK unmittelbar durch die IES-Behandlung oder im Verlauf der HR in den 'Börner'-Wurzeln aktiviert wurde.

Um eine effektive Signaltransduktion zu gewährleisten, ist die Inaktivierung der MAPKs und Kinasen im Allgemeinen von ebenso großer Bedeutung wie deren Aktivierung. Eine negative Regulation der Kinasen erfolgt durch deren Dephosphorylierung über entsprechende Phosphatasen, wie im Falle der MAPKs über MAPK-Phosphatasen (MKPs). Sehr häufig initiiert die Aktivierung von MAPKs zeitnah die Expression ihrer entsprechenden MKPs, sodass es zu einer negativen Feedbackkontrolle der MAPK-Aktivität kommt [Tena et al., 2001].

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit zwei Phosphatase-Genen gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Zudem zeigte die isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-100 laut Datenbankanalyse auf Nukleotidebene Übereinstimmung mit einer MKP aus dem Tabak, der NtMKP1. Eine erhöhte Akkumulation der NtMKP1 konnte während der durch den Tabakmosaikvirus (TMV) induzierten HR in Tabakpflanzen festgestellt werden. Die Phosphatase wird durch Ca^{2+} bindendes Calmodulin (CaM) aktiviert und dephosphoryliert insbesondere die SIPK, zeitweise auch die WIPK. Damit ist NtMKP1 ein Negativregulator der Pathogen induzierten HR in Tabakpflanzen [Yamakawa et al., 2004]. Abbildung 4.1 zeigt einen Vergleich der AS-Sequenz des Fag-B-IES2,5h-100 (Boe-100) mit NtMKP1. Der sequenzierte Bereich des 'Börner'-ESTs umfasst die Phosphatasedomäne und weist zudem die hoch konservierten, für die katalytische Aktivität wichtigen AS-Positionen Asp¹⁷⁰, Cys²⁰¹ und Ser²⁰⁸ auf [Yamakawa et al., 2004]. Eine dem NtMKP1 vergleichbare Funktion in der Regulation von MAPK aktivierten und Abwehr assoziierten Signalwegen ist daher auch für das isolierte 'Börner'-Gen anzunehmen.

			+			
Boe-100	260	L Q D S P S		E D I T S I L Y D V F D Y F E D V R E		
NtMKP1	168	L Q D S P T		E D I T S I L Y D V F D Y F E D V R E		
			+		+	
Boe-100	235	Q G G R V L	V H C C	Q G V S R S S	S	S L V I A Y L M
NtMKP1	194	Q G G R V F	V H C Y	Q G V S R S T	T	S L V I A Y L M
Boe-100	210	W R E G Q	S F E D A F Q Y	V K A A R G V T N P N M		
NtMKP1	218	W K E G L	S F E D A F Q H	V K A A R G V T N P N M		
Boe-100	185	G F A C Q L L Q C Q			175	
NtMKP1	243	G F A C Q L L Q C Q			252	

Abb. 4.1: Vergleich der AS-Sequenzen des 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h-100 (Boe-100, im Leseraster -2) und des NtMKP1; konservierte AS-Positionen (+)

Calcium abhängige Kinasen

Neben den MAPKs sind sog. Ca^{2+} dependent protein kinases (CDPKs) und *receptor-like kinases* (RLKs) an der Signalweiterleitung in der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligt. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit zwei CDPK-Genen auf dem Chip gefunden werden. CDPKs sind hauptsächlich aus dem Pflanzenreich bekannt und bilden dort eine große Multigenfamilie. Sie gehören den Ser/Thr-Proteinkinasen an und zeigen hoch konservierte Strukturbereiche. Neben ihrer Proteinkinaseaktivität besitzen sie außerdem eine Ca^{2+} bindende, CaM ähnliche Domäne [Romeis et al., 2001; Cheng et al., 2002]. Damit sind CDPKs in der Lage als Sensor Änderungen des cytosolischen Ca^{2+} -Gehalts in der Zelle zu erkennen und diese über ihre Proteinkinaseaktivität direkt in ein Signal umzusetzen und weiterzuleiten. CDPKs sind daher in viele Signaltransduktionswege des pflanzlichen Organismus involviert. Eine erhöhte Aktivität dieser Kinasen kann im Zusammenhang mit abiotischen Einflüssen, wie Kälte, Trockenheit, Salzgehalt und auch als Reaktion auf unspezifische Elicitoren beobachtet werden [Romeis et al., 2001]. Aber auch spezifische R/Avr-Erkennungsmechanismen lösen eine erhöhte transkriptionelle CDPK-Aktivität aus, die in Verbindung mit einer HR auftreten kann. Sehr gut untersucht ist dieser Zusammenhang am Cf9/Avr9-Modell. Das R-Gen Cf9 aus der Tomate vermittelt als Antwort auf das avr9-Gen aus *Cladosporium fulvum* in der Pflanze eine Resistenzreaktion unter Ausbildung einer HR [Cheng et al., 2002; Romeis et al., 2000, 2001]. Es ist noch unklar an welcher Stelle CDPKs an der Induktion der HR beteiligt sind. Als mögliche Phosphorylierungssubstrate werden H^+ -ATPasen, Ionenkanäle und die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat H (NADPH)-Oxidase diskutiert, sodass CDPKs vermutlich eine Rolle im *oxidative burst* und bei der Änderung des Ionenflusses spielen [Romeis et al., 2000, 2001].

CDPKs sind außerdem in Hormon gesteuerten Signalwegen von großer Bedeutung. In diesem Zusammenhang konnte z.B. in *Vigna radiata* und Zellkulturen von *Medicago sativa* eine Stimulierung der Expression spezifischer CDPKs durch IES nachgewiesen werden [Botella et al., 1996; Davletova et al., 2001].

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf eine weitere Ca^{2+} assoziierte Proteinkinase in der 2,5-h- und 4,5-h-Probe gefunden werden. Es handelt sich dabei um die Calcineurin B (CBL) interagierende Proteinkinase 2 (CIPK2). Ähnlich zu den CDPKs handelt es sich auch bei den CIPKs um Ser/Thr-Kinasen, die jedoch nicht direkt als Ca^{2+} -Sensor fungieren. Sie interagieren mit Ca^{2+} bindenden CBLs und leiten dieses Signal weiter. Involviert sind diese Kinasen in Abscisinsäure (ABA – *abscisic acid*) gesteuerten Hormonsignalwegen sowie in der Regulation Stress induzierter Gene. Die genaue Funktion vieler CIPKs ist jedoch noch weitgehend ungeklärt [Batistic und Kudla, 2004; Kolukisaoglu et al., 2004; Shi et al., 1999].

Rezeptor ähnliche Kinasen

In beiden Proben konnten außerdem Hybridisierungssignale mit einer Reihe von Kinasen aus der RLK-Familie gefunden werden. Es handelt sich dabei um Transmembranproteine mit einer extrazellulären Rezeptordomäne, einer Transmembrandomäne und einer cytoplasmatischen Ser/Thr-Kinasedomäne. RLKs dienen der Erkennung und Weiterleitung extrazellulärer Signale über die Plasmamembran in das Cytoplasma und ermöglichen somit die Kommunikation zwischen Zellen und Umgebung. Sie sind involviert in Prozesse wie Zellteilung, -differenzierung und -wachstum, Hormonhaushalt, Selbstinkompatibilität, Entwicklung und Pathogenabwehr [Chen et al., 2003, 2004; Diévar und Clark, 2004]. Klassifiziert werden die RLKs nach der Struktur ihrer extrazellulären Rezeptordomäne. Die am besten untersuchte und größte Klasse ist die der *leucin-rich repeat* (LRR)-RLKs, zu denen auch die beiden in der Microarrayanalyse gefundenen RLK5 ähnlichen Rezeptorkinasen zählen. RLK5 und ähnliche RLKs weisen neben der LRR-Region einen Cystein reichen Sequenzbereich auf und werden daher auch als CRKs bezeichnet. Chen et al. (2004, 2003) konnten an transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen zeigen, dass vier dieser CRKs, darunter auch das RLK5, durch Behandlung mit SA und als Reaktion auf eine Pathogeninfektion induziert werden. Auch eine Beteiligung von CRKs an der HR konnten von Chen et al. festgestellt werden.

Eine mögliche Funktion in der Pathogenabwehr wird auch bei den RLKs mit einer PR ähnlichen extrazellulären Domäne vermutet. Hierzu gehört die durch die Microarrayanalyse

gefundene PR-5 ähnliche Proteinkinase (PR5K). Man geht davon aus, dass diese PR-Kinasen ebenso in die Pathogenabwehr involviert sind wie die ihnen ähnlichen PR-Proteine (siehe Kapitel 4.1.3.9, *PR*-Gene). Es wird vermutet, dass sie vergleichbare Moleküle binden, die Kinasen jedoch nicht wie die PR-Proteine erst nach einem Pathogenbefall aktiviert werden, sondern konstitutiv exprimiert vorliegen und daher möglicherweise der Pathogenerkennung dienen. Die genauen Abläufe eines solchen Resistenzmechanismus sind noch nicht bekannt [Hu und Reddy, 1997; Wang et al., 1996].

Es konnten außerdem mit der Microarrayanalyse Anhaltspunkte für die Aktivierung von RLKs mit einer extrazellulären Lectin ähnlichen Domäne (lecRK) in der 2,5-h- und 4,5-h-Probe gefunden werden. Zudem zeigte die isolierte 'Börner'-cDNA Fag-B-IES2,5-21 auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit einer weiteren lecRK aus *Arabidopsis*. LecRKs können über ihre Lectindomäne Oligosaccharide, wie z.B. Elicitoren, binden und dieses Signal weiterleiten. Es wird außerdem vermutet, dass die Lectindomäne mit Hormonen, wie Auxinen oder Cytokininen, interagieren [Hervé et al., 1999].

Eine weitere große Familie innerhalb der RLKs sind die Zellwand assoziierten Kinasen (WAKs – *wall-associated kinases*) und WAK ähnlichen Proteine (WAKLs – *WAK-like*). Ein Hybridisierungssignal mit einer WAKL konnte mit der 2,5-h-Probe gefunden werden. Es handelt sich dabei um die Ca^{2+} bindende WAKL2. WAKs und WAKLs können Änderungen der Zellwandstruktur registrieren und geben dieses Signal intrazellulär weiter. Umstrukturierungen der Zellwand sind sowohl beim Zellwachstum als auch bei der Pathogenabwehr von Bedeutung (siehe Kapitel 4.1.3.8). Daher sind die WAKs und WAKLs in beide Prozesse involviert [Verica und He, 2002; Verica et al., 2003; Wagner und Kohorn, 2001]. WAKs können durch Signalsubstanzen, wie z.B. SA, MeJA und ET, transkriptionell aktiviert werden. Auch das WAKL2-Gen zeigt Sequenzstrukturen, die auf eine Aktivierung durch SA schließen lassen. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass das WAKL2-Protein eine Funktion in der Pathogenabwehr erfüllt [Verica und He, 2002; Verica et al. 2003].

Pto1 interagierende Proteine

Weiterhin deuteten die Microarrayergebnisse auf die Aktivierung eines oder mehrerer Pto1 interagierender (Pti1)-Proteine hin. Beim Pti1 handelt es sich um eine Komponente des Pto/AvrPto-Erkennungsmechanismus zwischen Tomate und dem Bakterium *Pseudomonas syringae*. Das *R*-Gen *Pto* aus der Tomate kodiert für eine intrazelluläre Ser/Thr-Kinase, die mit dem Genprodukt des *avrPto*-Gens aus *P. syringae* interagiert und dabei aktiviert wird. Diese Reaktion vermittelt eine Resistenz der Tomate gegen *P. syringae* unter Ausbildung

einer HR. An dem Erkennungsmechanismus und der nachfolgenden Resistenzreaktion sind neben dem R- und Avr-Protein weitere Komponenten beteiligt. Darunter ein Nukleotid bindendes LRR-Protein, das sog. *Prf*-Gen, und Pto interagierende Proteine. Dazu gehören die TFs Pti 4, 5 und 6, die durch die Pto-Kinase phosphoryliert und aktiviert werden und die Transkription von Abwehrgenen in Gang setzen (siehe Kapitel 4.1.3.2, Transkriptionsfaktoren). Das Pti1 ist eine im Cytoplasma vorliegende Ser/Thr-Kinase. Nach der Aktivierung von Pto durch das AvrPto-Genprodukt aktiviert diese die Pti1-Kinase durch eine spezifische Phosphorylierungsreaktion. Es handelt sich dabei um einen klassischen Signaltransduktionsweg über Proteinphosphorylierung, an dessen Ende die Ausbildung der HR steht [Bogdanove und Martin, 2000; Sessa et al., 2000; Xiao et al., 2003].

Die Notwendigkeit von Pti1 für die Aktivierung der HR konnten von Zhou et al. (1995) an *Pti1* transgenen Tabakpflanzen gezeigt werden. Bei einer Überexpression des *Pti1*-Gens zeigten die Pflanzen als Reaktion auf das AvrPto-Genprodukt aus *P. syringae tabaci* eine verstärkte HR-Bildung. Die genaue Interaktion zwischen Pto und Pti1 sowie die Substrate der Pti1-Kinase sind noch ungeklärt.

Angelehnt an die Sequenz des *Pti1* ähnlichen *Arabidopsis*-Gens, *At5g41680*, konnte mit spezifischen Primern eine cDNA-Sequenz (Fag-B-IES2,5h-K1-M3) aus der 2,5-h-Probe amplifiziert und sequenziert werden. Die EST-Sequenz zeigte auf Nukleotidebene die beste Übereinstimmung mit einer Ser/Thr-Kinase aus *Arabidopsis*.

Ein Vergleich der AS-Sequenzen des 'Börner'-ESTs (Boe-M3) mit dem *Pti1*-Protein (ToPti1) aus der Tomate zeigt eine relativ hohe Identität von 74 % (siehe Abb. 4.2). Vermutlich liegt eine vergleichbare Funktion des 'Börner'-Gens in einem Pathogen aktivierten und HR assoziierten Abwehrmechanismus vor.

Sessa et al. (2000) konnten zeigen, dass das Threonin an Position 233 des Pti1-Proteins die wichtigste Phosphorylierungsstelle für die Pto-Pti1-Interaktion darstellt. Diese AS-Position konnte jedoch mit dem 'Börner'-Amplifikat nicht erfasst werden, sodass nur eine vollständige Sequenzierung des 'Börner'-Gens weiteren Aufschluss über dessen Funktion als Ser/Thr-Kinase geben wird.

Zelle. Diese Änderungen des cytosolischen Ca^{2+} -Gehalts können durch Ca^{2+} bindende Sensorproteine erfasst und weitergeleitet werden. In der Regel binden diese Proteine Ca^{2+} über eine spezielle Domäne, die sog. *elongation factor* (EF)-*hand*. Man unterscheidet zwischen drei Hauptklassen dieser EF-*hand*-Proteine. Darunter befindet sich die Klasse der CDPKs, deren Funktion im Zusammenhang mit Abwehrprozessen bereits diskutiert wurde. Zu der zweiten Klasse zählt das in eukaryotischen Zellen hoch konserviert vorliegende CaM mit seinen Isoformen und CaM verwandten Proteinen. Die dritte Klasse bilden die CBL-Proteine. Im Gegensatz zu den CDPKs, die sowohl Ca^{2+} binden als auch durch ihre Kinaseaktivität direkt als Effektoren wirken können, fungieren CaMs und CBLs ausschließlich als Sensoren. Um das Ca^{2+} -Signal weiterzuleiten, müssen sie mit entsprechenden Zielproteinen interagieren und deren Aktivität regulieren. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die EF-*hand*-Domänen. Nach der Bindung an Ca^{2+} erfahren diese Domänen eine Konformationsänderung. Dadurch kommt es zur Exposition einer hydrophoben Oberfläche, die eine Bindung von CaM bzw. CBL an das Zielprotein ermöglicht [Luan et al., 2002]. CBLs interagieren mit nur einer Proteinfamilie, den CIPKs, deren Funktion bereits diskutiert wurde. Dagegen binden CaMs ein breites Spektrum an Proteinen, die in Prozessen wie Ionentransport, Genregulation, Stresstoleranz, Cytoskelettorganisation und Metabolismus involviert sind. Auch in der Pathogenabwehr sind CaMs von großer Bedeutung, insbesondere bei der HR-Aktivierung. So steht die Bildung von ROS im *oxidative burst* in Abhängigkeit zu einem erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel. Verantwortlich sind hierfür die Nicotinamidnucleotid (NAD)-Kinase und die Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase, die beide an der ROS-Bildung beteiligt sind (siehe Kapitel 4.1.3.9, *oxidative burst*) und durch CaMs aktiviert werden [Yamakawa et al., 2001]. Aber auch die Regulation antioxidativer Enzyme (siehe Kapitel 4.1.3.9, *oxidative burst*) erfolgt durch diese Ca^{2+} bindenden Sensoren [Reddy et al., 2003]. Wie Untersuchungen an Sojapflanzen gezeigt haben, scheinen CaMs auch einen Einfluss auf die Expression von *PR*-Genen zu nehmen [Park et al., 2004]. Ein weiteres CaM bindendes Protein ist das Mlo. Dieses Transmembranprotein reguliert Abwehrprozesse und wirkt als Negativregulator des Resistenz bedingten Zelltods. Der genaue Ablauf dieser Schutzfunktion ist nicht bekannt, jedoch ist die Expression des *Mlo*-Gens Ca^{2+} und CaM abhängig [Kim et al., 2002].

In den IES behandelten 'Börner'-Proben scheint Ca^{2+} als Signal ebenfalls eine Rolle zu spielen. Neben Ca^{2+} abhängigen Proteinkinasen konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse u. a. Anhaltspunkte für die Expression dreier CBL ähnlicher Gene sowie eines putativen CaM und eines EF-*hand*-Proteins gefunden werden. Neben einer NAD-Kinase konnten außerdem

Hybridisierungssignale mit zwei weiteren CaM bindenden Proteinen gefunden werden, darunter ein putatives Hitzeschockprotein (Hsp). Zudem scheint es zur transkriptionellen Aktivierung zweier Ca²⁺ bindender ATPasen gekommen zu sein. Möglicherweise werden diese Ionenpumpen als Reaktion auf den erhöhten cytosolischen Ca²⁺ Spiegel aktiviert, um so den Ca²⁺-Efflux aus der Zelle zu regulieren und den Ionenhaushalt wieder ins Gleichgewicht zu bringen. Einige dieser Ca²⁺-Pumpen können direkt durch CaMs reguliert werden [Yang und Poovaiah, 2003].

Calcium spielt nicht nur eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion von Abwehrmechanismen, sondern auch in der Weiterleitung von Hormonsignalen, wie z.B. Auxin. So konnten Shishova und Lindberg (2004) durch Untersuchungen an Auxin behandelten Maiszellen einen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration innerhalb weniger Minuten nach der Behandlung beobachten. Dabei scheint Auxin zunächst Ca²⁺-Kanäle in der Plasmamembran zu aktivieren und so den Influx von extrazellulärem Ca²⁺ zu ermöglichen. Im weiteren Verlauf erfolgt zusätzlich eine Freigabe von interzellulär gespeichertem Ca²⁺, z. B. aus der Vakuole. Die so ausgelöste Änderung des Ca²⁺-Gehalts in der Zelle wird durch Ca²⁺-Sensorproteine erfasst und führt zur Regulation entsprechender Zielproteine. Als Resultat dieses Signaltransduktionsweges werden Auxin gesteuerte Wachstums- und Entwicklungsprozesse in Gang gesetzt. Als Beweis für den Zusammenhang zwischen Auxin und Ca²⁺ bedingter Signaltransduktion gelten die sog. *small auxin up RNAs* (SAURs). Die Expression dieser Gene erfolgt sehr schnell als Antwort auf einen Auxinstimulus und wird durch CaMs reguliert [Yang und Poovaiah, 2000]. Hinweise auf die Expression solcher SAUR-Gene konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.3.6, Auxin gesteuerte Genexpression).

Es ist sehr wahrscheinlich, dass die IES-Behandlung in den 'Börner'-Wurzeln einen Anstieg der cytosolischen Ca²⁺-Konzentration ausgelöst hat und dadurch bedingt Ca²⁺ bindende Proteine, wie CDPKs, CaMs und CBLs, aktiviert und deren Zielproteine reguliert wurden. Jedoch muss auch hier die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass einige der durch diese Ca²⁺ abhängigen Signalwege induzierten Prozesse im Zusammenhang mit Auxin bedingten Wachstumsreaktionen stehen und nicht in den Resistenzmechanismus involviert sind. Auf der anderen Seite liefert diese Vernetzung von Auxin und Ca²⁺ abhängiger Signaltransduktion eine mögliche Erklärung, wie der Resistenzmechanismus in 'Börner' ausgelöst werden könnte. Eine Auxin induzierte Erhöhung des Ca²⁺-Levels in der Pflanze könnte über Ca²⁺-Sensoren nicht nur Wachstumsprozesse, sondern ebenso Resistenz und HR assoziierte Mechanismen auslösen wie sie im Kapitel 4.1.3.9 geschildert werden. Die

Aktivierung des *oxidative burst* durch Ca^{2+} wäre eine Erklärung für die Induktion der HR und weiterer Abwehrreaktionen.

Ethylen, Jasmonsäure, Methyljasmonat und Salicylsäure

Neben Ca^{2+} fungieren die Phytohormone ET, JA, MeJA und SA als endogene Signalsubstanzen in der pflanzlichen Pathogenabwehr.

ET ist als gasförmig vorliegendes Pflanzenhormon in eine Vielzahl von physiologischen Prozessen involviert, wie z. B. Seneszenz, Fruchtreifung, Wurzel- und Sprosswachstum. Zudem konnte die Beteiligung von ET an Stressantworten von Pflanzen auf abiotische und biotische Faktoren, wie z.B. der Befall durch Pathogene nachgewiesen werden [Buchanan et al., 2000; Tsuchisaka und Theologis, 2004].

Die ET-Erkennung erfolgt über eine Rezeptorfamilie mit Ähnlichkeiten zu den bakteriellen Zwei-Komponenten-Histidinkinase-Rezeptoren. Insgesamt sind fünf ET-Rezeptoren bekannt ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 sowie EIN4. Hinweise auf die Aktivierung eines *EIN4*-Gens konnten in beiden 'Börner'-Proben mit der Microarrayanalyse gefunden werden. Sehr ausführlich ist die Funktion des ETR1 untersucht. Mit der Bindung von ET an den Rezeptor wird dieser und die Rezeptor interagierende Raf ähnliche Kinase CTR1 (*constitutive triple response 1*) inaktiviert. Dies wiederum ermöglicht die Aktivierung des Membranproteins EIN2 (*ethylen insensitive 2*). Über einen bisher noch unbekanntem Mechanismus wird durch das aktivierte EIN2 der TF EIN3 stabilisiert. Dieser induziert daraufhin eine Transkriptionskaskade. Im Verlauf dieser ET-Antwort werden u. a. TFs aus der Familie der AP2/EREBPs aktiviert [Chang und Shockey, 1999; Stepanova et al., 2005]. Wie in Kapitel 4.1.3.2 (Transkriptionsfaktoren) eingehend beschrieben, sind diese TFs an der Regulation von Abwehrgenen beteiligt. Man geht zudem von einer entscheidenden Rolle des ET in der PCD-Aktivierung aus. Eine solche Funktion ist nachvollziehbar, da das Hormon an Seneszenzprozessen beteiligt ist. Untersuchungen von de Jong et al. (2002) an Tomatenzellen, die mit dem PCD induzierenden Topoisomerase-1-Inhibitor, Camptothecin, behandelt wurden, zeigten bei einer Blockierung der ET-Synthese und -Rezeptorerkennung reduzierte PCD-Symptome. Dagegen scheint exogen zugeführtes ET den PCD zu stimulieren. Ähnliche Beobachtungen konnten von de Jong et al. (2002) bei Pathogen induziertem Zelltod gemacht werden. Das Pflanzenhormon alleine ist nicht in der Lage PCD auszulösen, aber es scheint die Induktion des Zelltodprozesses durch H_2O_2 zu potenzieren. Es ist davon auszugehen, dass ET in der Signaltransduktionskette fungiert, die zur Aktivierung der H_2O_2 generierenden

NADPH-Oxidase führt. Weiterhin vermutet man eine Funktion des ET in der Blockierung ROS inaktivierender Enzyme, wie z.B. der Catalase.

Bei einer Abwehrreaktion kommt es zur *de novo* Synthese von ET. Der Syntheseweg des Pflanzenhormons erfolgt aus dem Methioninzyklus heraus. Dabei katalysiert die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Synthase SAM aus Methionin. Das SAM wiederum wird durch die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC)-Synthase in 5-Methylthioadenosin und ACC gespalten. Der letzte Schritt von ACC zu ET wird durch die ACC-Oxidase katalysiert. In der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit drei SAM-Synthasen und einer ACC-Oxidase gefunden werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine *de novo* Synthese von ET in den IES behandelten 'Börner'-Proben. ACC-Oxidasen werden durch Multigenfamilien kodiert. Eine differenzielle Expressionsregulation der einzelnen ACC-Oxidasen in Entwicklungs-, Seneszenz- und Abwehrprozessen konnte in Melonenpflanzen nachgewiesen werden [Lasserre et al., 1997]. Eine differenziell exprimiert vorliegende ACC-Oxidase in den behandelten 'Börner'-Proben könnte auf eine Funktion des Enzyms in Stressreaktionen und PCD-Prozessen der Pflanze hinweisen.

In der ET-Biosynthese spielt zudem Auxin eine entscheidende Rolle. Es ist bekannt, dass hohe Auxinkonzentrationen die ET-Synthese auslösen. Zurückzuführen ist dies auf eine positive Regulation von ACC-Synthasen durch Auxin. So wird die Expression einiger ACC-Synthasen durch IES induzierte *auxin response factors* (ARFs) aktiviert [Stepanova, 2005].

Ein Zusammenhang zwischen Auxin gesteuerter ET-Synthese und PCD konnte an Tabakhybriden durch Yamada et al. (2001) nachgewiesen werden. Diese Hybriden zeigten eine Temperatur abhängige Lethalität bedingt durch einen auftretenden apoptotischen Zelltod. Begleitet wurde dieser Prozess von einem hohen Auxingehalt in den Tabakhybriden. Die Inhibierung des Auxintransportes und der ET-Synthese zeigte dagegen einen deutlichen Rückgang der Lethalität, sodass Yamada et al. auf eine Regulation des PCD durch Auxin und ET schlossen.

Nach einem ganz ähnlichen Prinzip könnte die Induktion des Resistenzmechanismus in 'Börner' ablaufen. Die zugeführte IES induziert die *de novo* Synthese von ET, das dann in der Aktivierung von Abwehrgenen und in der HR-Regulation fungiert.

Als weitere regulatorische Komponenten des pflanzlichen Organismus gelten die Jasmonate. Sie sind an Prozessen, wie z.B. Fruchtreifung, Pollenentwicklung, Wurzelwachstum, Rankenbildung und Seneszenz beteiligt. Sie fungieren außerdem in Reaktionen als Antwort auf Verletzungen, abiotischen Stress und Pathogenbefall. Jasmonate werden ausgehend von

der Linolensäure aus dem Fettsäuremetabolismus heraus gebildet. Insbesondere JA, MeJA und der JA-Synthesevorläufer 12-Oxo-Phytodienonsäure (OPDA) steuern Reaktionen auf Verletzungen und Befall durch Insekten sowie andere Pathogene. Dabei wird die Biosynthese dieser Signalsubstanzen durch Faktoren wie osmotischen Stress, Trockenheit, Elicitoren und Verletzungen ausgelöst. An der Weiterleitung dieser Stimuli und an der Aktivierung der JA-Biosynthese scheinen u. a. MAPKs beteiligt zu sein. So konnten Turner et al. (2002) nach Verletzungen von Tabakpflanzen in den betroffenen Geweberegionen eine erhöhte Expression von WIPKs feststellen. Weiterhin scheinen Änderungen der Zellwand und die Signalsubstanz Systemin die JA-Biosynthese zu induzieren. An der erforderlichen Freisetzung des Ausgangssubstrates Linolensäure aus Membranphospholipiden scheinen zudem Phospholipasen aus der Gruppe A und D (PLA und PLD) beteiligt zu sein [Turner et al., 2002]. Anhaltspunkte für die Aktivierung solcher PLs konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden.

Eines der Schlüsselenzyme der JA-Synthese ist die Allenoxidsynthase (AOS). Sie katalysiert die Bildung von 12,13(S)-Epoxylinolensäure aus 13(S)-Hydroperoxylinolensäure und gehört zur Familie der Cytochrom P450 (CYP450) Enzyme [Turner et al., 2002]. Hybridisierungssignale mit einer Reihe solcher CYP450-Gene konnten in beiden Proben gefunden werden. Ob sich darunter ein AOS vergleichbares Gen befindet, kann mit den vorliegenden Ergebnissen nicht geklärt werden.

Die Bildung von MeJA aus JA erfolgt durch das Enzym SAM:JA-Carboxylmethyltransferase (JMT) [Zubieta et al., 2003]. Die Microarrayanalyse lieferte Hinweise auf die Expression dreier JMT-Enzyme. Dies lässt auf eine Funktion der Signalkomponente MeJA in der Resistenzreaktion bei 'Börner' schließen. Repka et al. (2004) konnten bei einer Behandlung von Rebblättern und -zellkulturen (*Vitis vinifera* L. cv. Limberger) mit exogenem MeJA HR ähnliche Symptome auslösen. Sie konnten außerdem die Expression von *PR*-Genen und die Auflagerung von Callose auf die Zellwände feststellen. Der Mechanismus mit dem MeJA die HR induziert ist jedoch noch nicht geklärt. Er tritt allerdings nur in verholzten Pflanzen auf.

Die Signalweiterleitung der gebildeten Jasmonate erfolgt über den Ubiquitin (Ub)/26S-Komplex SCF^{COI1}. Wie in Kapitel 4.1.3.5 (Ubiquitin abhängige Proteolyse) beschrieben, degradiert der SCF^{COI1}-Komplex Transkriptionsrepressoren und ermöglicht damit die Expression Jasmonat induzierter Gene [Farmer et al., 2003; van der Fits und Memelink, 2001]. Dazu gehören u. a. Gene, die für das Defensin PDF1.2, die Chitinase B (CHI-B), beta-1,3-Glucanasen (BGLs) sowie für diverse Proteaseinhibitoren (PIs) kodieren [Turner et al., 2002; Kombrink und Somssich, 1995]. Hinweise auf die Expression von Chitinasen und PIs

konnten in beiden Proben gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.3.9). Weiterhin scheint es zur Expression einer Arginindecarboxylase 2 (ADC2) in beiden 'Börner'-Proben gekommen zu sein. Das Enzym ist an der Biosynthese von Polyaminen beteiligt und wird als Reaktion auf Verletzungen und osmotischen Stress durch JA und MeJA induziert [Perez-Amador et al., 2002].

Hybridisierungssignale konnten auch mit drei sog. *jacalin-related lectin* (JRL)-Genen gefunden werden. Die JRL-Proteine gehören zur Familie der Kohlenhydrat bindenden Lectine. Insbesondere die Klasse der Mannose bindenden JRLs stehen im Verdacht spezifisch durch Jasmonate aktiviert zu werden und eine Rolle in pflanzlichen Stress- und Abwehrreaktionen zu spielen. Die genaue Funktion ist nicht bekannt [Wang und Ma, 2005].

Auf Ebene der Transkriptionsregulation erfolgt zudem eine Vernetzung des JA- und ET-Signalweges. Einige ET regulierte *ethylene response factors* (ERFs) werden ebenfalls durch JA aktiviert. Ein Beispiel hierfür ist das ERF1. Nach der Degradierung von Transkriptionsrepressoren durch den SCF^{COI1}-Komplex ist es dem ERF1 möglich, die Expression von *PDF1.2*, *CHI-B* und *BGL* zu induzieren. Die Aktivierung des ERF1 erfordert dabei sowohl den JA- als auch den ET-Signaltransduktionsweg [Lorenzo et al., 2003].

Einen ebenfalls positiv regulierenden Einfluss auf die JA induzierte Genexpression haben der Auxinsignalweg über das *auxin resistant 1* (AXR1) sowie der Lichtsignaltransduktionsweg über das *constitutive photomorphogenic 9* (COP9). Dabei erfolgt eine Regulation des SCF^{COI1} durch AXR1 und COP9 wie es in Kapitel 4.1.3.5 (Ubiquitin abhängige Proteolyse) am Beispiel des SCF^{TIR1}-Komplexes eingehend erläutert wird [Farmer et al., 2003].

Abbildung 4.3 veranschaulicht die oben geschilderte komplexe Vernetzung des ET-, JA-, Auxin- und Lichtsignalweges. Weiterhin geht aus der Abbildung hervor, dass auch die Signalkomponente SA in dieses Netzwerk involviert ist. SA gilt als Negativregulator der JA induzierten Genexpression. Als Übermittler des SA-Signals dient dabei das NPR1 (*non-expressor of pathogenesis-related genes 1*). In nicht infiziertem Gewebe liegt NPR1 als inaktives Oligomer im Cytoplasma vor. Bei einer Pathogen bedingten Akkumulation von SA kommt es zu einer Änderung des Redoxstatus in der Zelle, ein Mechanismus der bisher noch nicht im Detail bekannt ist. Dies führt zur Bildung von aktivierten NPR1-Monomeren, die in den Zellkern migrieren. Dort interagieren sie mit TFs aus der Klasse der TGAs, die dadurch bedingt eine höhere Bindungsaffinität an die Promotorstrukturen SA induzierter Gene erreichen und deren Expression aktivieren [Kunkel und Brooks, 2002; Pieterse und van Loon, 2004]. Gleichzeitig wirkt das NPR1 als Repressor der JA induzierten Genexpression. Umgekehrt scheint ebenso eine Inhibierung der SA-Antwort durch JA über NPR1 zu erfolgen.

Wie der Mechanismus dieser gegenseitigen Negativregulation von SA und JA im Detail funktioniert ist nicht bekannt [Farmer et al., 2003; Spoel et al., 2003].

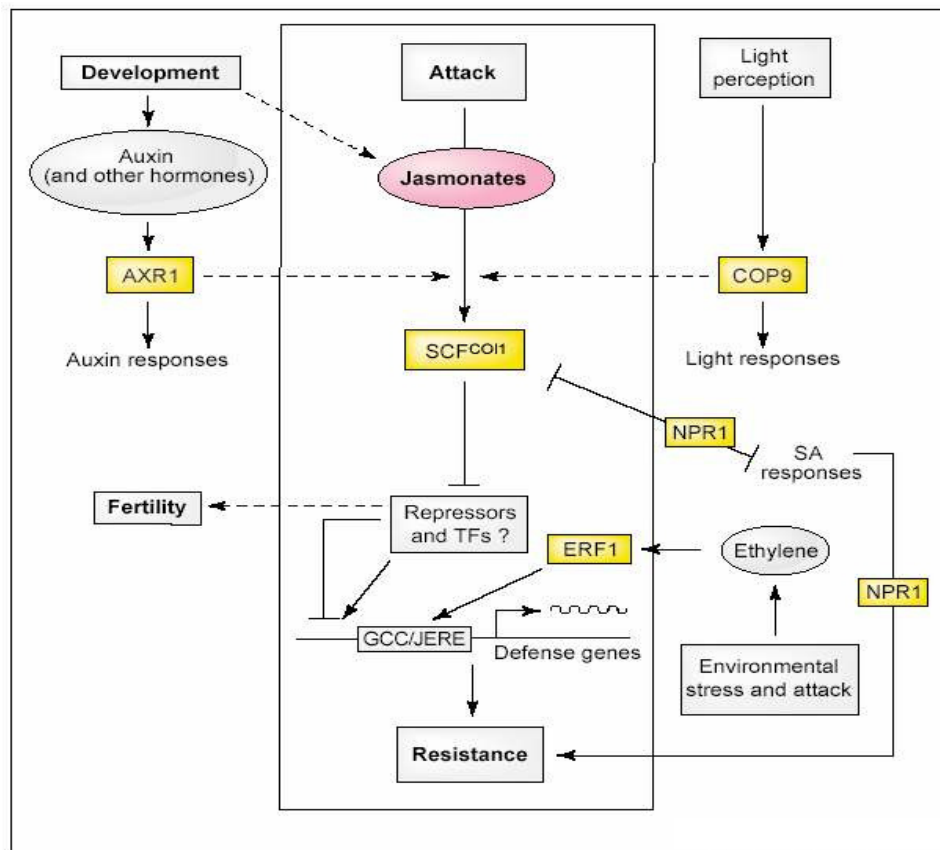


Abb. 4.3: Vernetzung des ET-, JA-, Auxin-, Licht- und SA-Signalweges

auxin resistant 1 (AXR1), SKP1/Cullin/F-Box/coronatine insensitive 1 (SCF^{COI1}), *ethylene response factor1* (ERF1), Transkriptionsfaktoren (TFs), *constitutive photomorphogenic 9* (COP9), *non-expressor of pathogenesis-related genes 1* (NPR1), *salicylic acid* (SA); Farmer et al. (2003)

SA gilt als wichtiges Schlüsselsignal der pflanzlichen Abwehr. Durch einen Pathogenbefall kommt es zu einer deutlichen Akkumulation dieser Signalsubstanz, die sowohl für die lokale Abwehr als auch für die Ausbildung der SAR von Bedeutung ist. SA reguliert die Expression von *PR*-Genen wie dies insbesondere für die *PR-1*-Gene gezeigt werden konnte. Diese Gene und die entsprechenden PR-1-Proteine gelten daher als Marker für eine SA abhängige Abwehrantwort sowie für die Induktion der SAR [Kunkel und Brooks, 2002]. Wie in Kapitel 4.1.3.9 (*PR*-Gene) beschrieben, konnten Hinweise auf die Expression *PR-1* ähnlicher Gene in den 'Börner'-Proben gefunden werden.

In einem engen Zusammenhang scheint die SA bedingte Signaltransduktion mit der ROS-Akkumulation zu stehen. SA zählt zu den Aktivatoren des *oxidative burst*. Gleichzeitig stimulieren ROS die SA-Synthese, sodass eine positive Feedbackregulation erfolgt. Damit ist

SA auch ein wichtiger Regulator des PCD. In TMV infizierten Tabakpflanzen konnte in unmittelbarer Nähe der ausgebildeten nekrotischen Läsionen die höchste SA-Konzentration festgestellt werden. Man geht davon aus, dass SA in hohen Konzentrationen PCD induziert [Hoeberichts und Woltering, 2002].

Der Ablauf der SA-Biosynthese ist nicht im Detail bekannt. Man geht u. a. davon aus, dass das Signalmolekül aus einem Seitenarm des Phenylpropanoidweges hervorgeht. Eines der Schlüsselenzyme ist dabei die Phenylalaninammoniumlyase (PAL) und als eines der wichtigsten Intermediate gilt die Benzoesäure [Buchanan et al., 2000]. Jedoch konnten mit den vorliegenden Ergebnissen keine Anhaltspunkte für die Aktivierung bzw. Synthese dieser Komponenten in den 'Börner'-Proben gefunden werden.

Die geschilderten Regulationsvorgänge zeigen eine enge und komplexe Vernetzung der ET, JA und SA gesteuerten Signaltransduktion. Während JA und ET häufig synergistisch bei der Aktivierung von Abwehrgenen wirken, ist die Interaktion von SA und JA meist antagonistischer Natur [Kunkel und Brooks, 2002].

Inwieweit diese Vorgänge auch in den IES behandelten 'Börner'-Proben zum Tragen kommen, kann mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden. Aufgrund der Hinweise aus der Microarrayanalyse ist die Involvierung ET und JA bzw. MeJA gesteuerter Regulationswege wahrscheinlich. Da zudem Hinweise auf die Aktivierung *PR-1* ähnlicher Gene gefunden wurden, ist auch eine Funktion der SA im Resistenzmechanismus bei 'Börner' denkbar.

In das komplexe Signalnetzwerk aus ET, JA und SA können weitere Hormone, wie z.B. Cytokinine und Brassinosteroide (BRs), involviert sein. Beide Hormone können die ET-Biosynthese positiv beeinflussen. Möglicherweise kann so eine zusätzliche Regulation PCD und Abwehr assoziierter Prozesse durch Cytokinine und BRs erfolgen. In niedrigen Konzentrationen wirken Cytokinine als Induktoren der Zellteilung, während hohe Konzentrationen dieses Hormons das Wachstum blockieren und stattdessen PCD induzieren. Untersuchungen an Reis- und Tabakpflanzen haben gezeigt, dass das Brassinolid aus der Familie der BRs gegen ein breites Spektrum an Pathogenen wirkt, indem es Abwehrreaktionen, darunter auch die SAR, aktiviert. Dabei sind diese Abwehrprozesse SA unabhängig und haben nicht die Expression von *PR*-Genen zur Folge [Carimi et al., 2003; Nakashita et al., 2003]. Unter den Microarrayergebnissen konnten Anhaltspunkte für eine mögliche Aktivierung von Cytokininen und BRs gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

GTP bindende Proteine

Hinweise konnten ebenfalls auf die Expression von Guanosintriphosphat (GTP) bindenden Proteinen, auch G-Proteine oder GTPasen genannt, gefunden werden. GTPasen können durch die Bindung von GTP bzw. Guanosindiphosphat (GDP) als molekulare Schalter fungieren und so extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiterleiten. Sie können als Membran gebundenes Heterotrimer vorliegen, bestehend aus $G\alpha$, $G\beta$ und $G\gamma$. Bei einer Interaktion mit einem Rezeptor kommt es am $G\alpha$ zu einem Austausch von GDP zu GTP. Damit liegt $G\alpha$ in einer aktivierten Form vor und löst sich vom Trimerkomplex ab, während $G\beta$ und $G\gamma$ an der Membran verbleiben. Das $G\alpha$ GTP ist so in der Lage Proteine zu aktivieren. Eine Umwandlung von $G\alpha$ GTP zu $G\alpha$ GDP erfolgt innerhalb kürzester Zeit durch seine intrinsische GTPase-Aktivität und es bindet als $G\alpha$ GDP erneut am Trimerkomplex [Heldt, 2003]. Zu diesem Heterotrimerkomplex gehören auch die G-Proteine aus der Familie der Transducine. Unter den Microarrayergebnissen konnten in beiden 'Börner'-Proben Vertreter dieser Familie gefunden werden, darunter auch zwei aus der Gruppe der $G\beta$ -Proteine. Es ist bekannt, dass Heterotrimerkomplexe u. a. für die Regulation von Ionenkanälen verantwortlich sind. Auf diese Weise können G-Proteine Einfluss nehmen auf die Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle und zur Aktivierung von Abwehrreaktionen beitragen [Suharsono et al., 2002].

G-Proteine können auch als Monomere, sog. kleine G-Proteine, vorliegen. Sie fungieren ebenso wie das $G\alpha$ des Trimerkomplexes als molekularer Schalter [Heldt, 2003]. Diese kleinen G-Proteine werden allgemein zur Superfamilie der RasGTPasen zusammengefasst. Aufgrund struktureller und funktioneller Ähnlichkeiten werden sie in fünf Familien unterteilt: Ras, Rab, Rho, Arf und Ran [Vernoud et al., 2003]. Diese GTPasen stellen in Eukaryoten wichtige Signalmoleküle dar und sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt. Dazu gehören Hormon gesteuerte Signalwege, Ionenregulation, Zellproliferation, Cytoskelettorganisation sowie Stress- und Abwehrantworten [Sano und Ohashi et al., 1995; Suharsono et al., 2002; Vernoud et al., 2003].

Zu den kleinen G-Proteinen gehören u. a. die RacGTPasen. Mit drei RacGTPase-Genen konnten auf dem Chip Hybridisierungssignale gefunden werden. Sie gehören zur Subfamilie der Rac/Rop-Proteine aus der Familie der RohGTPasen. Sie sind beteiligt an der Cytoskelettorganisation und an Signaltransduktionswegen. Untersuchungen des OsRac1 aus Reispflanzen [Kawasaki et al., 1999] und eines Rac/Rop-Proteins aus mit Elicitoren behandelten Sojazellen [Park et al., 2000] haben gezeigt, dass diese G-Proteine an der Bildung von ROS beteiligt sind. Man geht davon aus, dass sie ähnlich zu Rac-Proteinen im

tierischen Organismus bei der Regulation der ROS bildenden NADPH-Oxidase eine Rolle spielen und dadurch bedingt auch an der Induktion von PCD beteiligt sind [Kawasaki et al., 1999].

Ein Zusammenhang zwischen Rac/Rop-GTPasen und Hormonsignalwegen ist ebenfalls bekannt. So konnte an dem Rac/Rop-Protein NtRac1 aus Tabak gezeigt werden, dass diese GTPase durch Auxin aktiviert wird und im weiteren Auxinsignalweg von Bedeutung ist. So zeigten Mutationen des *NtRac1*-Gens, die in den Tabakpflanzen entweder zu einer Überexpression oder einer Unterexpression der GTPase führten, deutliche Auswirkungen auf Auxin regulierte Wachstumsprozesse [Tao et al., 2002]. Offensichtlich scheint NtRac1 auf die proteolytische Degradierung von *auxin/indole-3-acetic acid* (AUX/IAA)-Proteinen und der dadurch bedingten Expression Auxin aktivierter Gene Einfluss zu nehmen. Möglicherweise aktivieren IES induzierte GTPasen MAPKs, die wiederum die proteolytische Degradierung über den Ub/26S-Komplex regulieren wie dies in Kapitel 4.1.3.5 (Ubiquitin abhängige Proteolyse) ausführlich geschildert wird.

Im Hinblick auf 'Börner' ist es daher möglich, dass durch die IES-Behandlung Rac/Rop-GTPasen aktiviert und damit Auxin gesteuerte Wachstumsprozesse initiiert wurden. Dies würde bedeuten, dass die G-Proteine und die damit verbundene Signaltransduktion wahrscheinlich nicht im Zusammenhang mit der Resistenzreaktion stehen. Denkbar ist aber auch eine IES abhängige Induktion von Rac/Rop-GTPasen, die durch eine Regulation der NADPH-Oxidase an der ROS-Bildung und damit auch an der HR beteiligt sind.

Mit der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit weiteren GTPasen und mit ihnen assoziierten Proteinen gefunden werden. Darunter befindet sich ein Rab interagierendes Protein, das PRA1, sowie ein Rab7 ähnliches Protein und ein RabGAP-Protein, das die Inaktivierung der RabGTPase und die damit verbundene Bildung von RabGDP beschleunigt. Die Hauptfunktion der Rab-GTPasen liegt in der Regulation des vesikulären Transports, wie z.B. bei der Exo- und Endocytose [Yoda und Sano, 2003]. Eine Beteiligung von RabGTPasen an Abwehr- und Stressreaktionen konnte an TMV infizierten, transgenen Tabakpflanzen gezeigt werden. Pflanzen, die das RabGTPase-Gen *rgp1* aus dem Reis exprimierten, zeigten eine erhöhte SA-Synthese und die Bildung von PR-Proteinen als Antwort auf Verletzungen sowie eine erhöhte Resistenz gegen TMV-Infektionen. Vermutet wird eine Funktion des *rgp1* in der HR-Signaltransduktion [Yoda und Sano, 2003].

Weiterhin liegen Hinweise auf die Expression dreier Ras-Gene vor. Die innerhalb der Superfamilie vorkommenden GTPasen aus der Ras-Familie fungieren im menschlichen und tierischen Organismus in einer Reihe von Signaltransduktionswegen u. a. auch in Verbindung

mit Apoptose. Der Apoptoseregulation über RasGTPasen liegt dabei ein komplexes Signalnetzwerk zu Grunde, das sowohl aktivierend als auch inhibierend auf apoptotische Mechanismen in der Zelle wirken kann. Als antiapoptotisches Signal aktiviert Ras die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-K), die wiederum die Ser/Thr-Kinase Akt, auch PKB genannt, aktiviert. Dieser PI3-K/Akt-Signalweg unterbindet den apoptotischen Prozess in der Zelle durch die Inhibierung proapoptotischer Faktoren. Durch ihre Funktion als Überlebenssignal spielen RasGTPasen als Onkogene in der Tumorbildung eine entscheidende Rolle. Ebenso wie sie die Apoptose verhindern können, wirken RasGTPasen auch als proapoptotische Signale. Hierbei ist die Aktivierung der Ser/Thr-Kinase Raf durch Ras entscheidend. Raf wiederum aktiviert eine MAPK-Signalkaskade, die den Zelltod induziert. Abhängig vom Zelltyp und den vorliegenden Umständen kann dieser Signalweg auch antiapoptotisch wirken ähnlich dem PI3-K/Akt-Signalweg [Cox und Der, 2003; Downward, 1998]. Hinweise auf eine Phosphatidylinositolkinase sowie auf eine Reihe von Ser/Thr-Kinasen konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Zwar sind in Pflanzen bisher noch keine GTPasen aus der Ras-Familie gefunden worden [Vernoud et al., 2003], dennoch kann eine Funktion möglicherweise exprimiert vorliegender GTPasen in der HR-Induktion und -Regulation nicht ausgeschlossen werden.

4.1.3.2 DNA und RNA assoziierte Gene

Transkriptionsfaktoren

Abwehrreaktionen der Pflanze sind mit einer transkriptionellen Reprogrammierung verbunden, die über TFs reguliert wird. Zu den typischen Abwehr assoziierten TF-Familien zählen WRKY, MYB, AP2/EREBP, bZIP und Whirly.

Insbesondere WRKY-Faktoren scheinen ihre Hauptfunktion in der Pathogen und Stress bedingten Expressionsregulation zu haben. Ungefähr 70 % der WRKY-Proteine in *Arabidopsis* werden als Reaktion auf einen Pathogenbefall oder nach einer Behandlung mit SA transkriptionell oder posttranskriptionell induziert. Auch die Aktivierung von WRKY-Faktoren in Seneszenzprozessen konnte beobachtet werden [Dong et al., 2003; Singh et al., 2002]. Sie können als Aktivatoren sowie als Repressoren die Transkription von Genen beeinflussen. Die Expressionsregulation der WRKY-Proteine erfolgt durch eine spezifische Bindung an sog. W-Box-Strukturen, die sich in den Promotorbereichen vieler Abwehrgene befinden. Unter anderem weisen die Promotoren einiger RLK-Gene, wie der *RLK5*, und die Promotoren der *PR*-Gene (siehe Kapitel 4.1.3.1, Rezeptor ähnliche Kinasen und 4.1.3.9, *PR*-

Gene) solche W-Box-Strukturen auf [Chen et al, 2003; Dong et al., 2003]. Yoda et al. (2002) konnten bei Untersuchungen der HR in TMV infizierten Tabakpflanzen die Expression eines WRKY-Faktors feststellen. Seine Aktivierung steht möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Induktion und Regulation der HR. Es zeigte sich mit beiden 'Börner'-Proben ein Hybridisierungssignal mit einem WRKY-Gen, das Ähnlichkeiten zu einem solchen TMV induzierten Gen aufweist. Zusätzlich konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Hinweise auf die Aktivierung drei weiterer WRKY-Gene gefunden werden.

Da viele Abwehr assoziierte WRKY-Gene ebenfalls W-Box-Strukturen in ihren Promotorregionen besitzen, geht man von einem selbst regulierenden Mechanismus dieser TFs aus. WRKY-Faktoren können als Transkriptionsaktivatoren eine positive Feedbackregulation in der frühen Abwehrantwort ermöglichen. Zu einem späteren Zeitpunkt verhindern Repressoren aus der gleichen Familie durch eine negative Feedbackregulation eine anhaltende WRKY-Aktivität [Eulgem, 2005].

Eine Regulation der WRKY-Gene erfolgt auch durch Faktoren aus der MYB-Familie. Sie stellt eine der größten TF-Familien im Pflanzenreich dar und zeichnet sich durch ihre konservierte MYB-DNA-Bindungsdomäne aus. Diese Domäne besteht aus bis zu drei *repeats* (R1, R2, R3), die jeweils eine *helix-turn-helix*-Struktur aus ungefähr 53 AS aufweisen. Die größte Subfamilie der MYB-Faktoren ist die der R2R3-MYBs, deren Bindungsdomäne aus zwei *repeats* besteht [Stracke et al., 2001]. Vier der MYB-Gene (*At4g37780*, *At3g50060*, *At5g53200* und *At3g13890*), mit denen ein Hybridisierungssignal auf dem Chip gefunden werden konnte, gehören dieser R2R3-Subfamilie an. Eine Zuordnung der anderen vier MYB-Gene ist nicht möglich. R2R3-MYB-Faktoren sind an verschiedenen pflanzlichen Prozessen beteiligt. Dazu gehört die Regulation des Phenylpropanoidmetabolismus, aus dem u. a. die Phytoalexine hervorgehen (siehe Kapitel 4.1.3.3, Sekundärmetabolismus). MYBs kontrollieren zudem Hormon gesteuerte Reaktionen und Entwicklungsprozesse in der Pflanze [Stracke et al., 2001]. So nimmt z.B. der MYB-Faktor TRIPTYCHON Einfluss auf die Entwicklung von Wurzelhaaren [Kirik et al., 2004].

Eine regulierende Aufgabe in der Expression von Abwehrgenen wird ebenfalls für einige R2R3-MYB-Faktoren angenommen. Als Beispiel hierfür ist das AtMYB30 zu nennen, dessen Aktivierung im Zusammenhang mit der HR steht. In *Arabidopsis* wird die Expression dieses MYB-Faktors sehr spezifisch und schnell in einer frühen HR-Phase aktiviert als Reaktion auf *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* und andere Bakterien. Das Zielgen, dessen Expression durch AtMYB30 reguliert wird, ist noch nicht bekannt, aber man geht davon aus, dass der MYB-Faktor an einer entscheidenden Stelle des HR-Signalweges fungiert [Daniel et

al., 1999; Vaillau et al., 2002]. Wurden in beiden 'Börner'-Proben MYB-Faktoren aktiviert, wie es die Microarrayanalyse vermuten lässt, ist eine Funktion dieser TFs ähnlich zum AtMYB30 denkbar.

Weiterhin konnten in beiden Proben Anhaltspunkte für die transkriptionelle Aktivierung von TFs aus der AP2/EREBP-Familie gefunden werden, die sich in zwei Subfamilien unterteilen lässt. Die erste Gruppe umfasst Faktoren, die eine *dehydration-responsive element binding* (DREB)-Domäne aufweisen und hauptsächlich regulierend auf abiotische Stressantworten reagieren. Hinweise auf zwei solcher DREB-TFs konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse in beiden Proben gefunden werden, während die restlichen detektierten AP2/EREBP-Faktoren der zweiten Gruppe zuzuordnen sind. Sie umfasst die ERF (*ethylene response factor*)-Proteine, die eine entsprechende ERF-Domäne aufweisen. In dieser Subfamilie befinden sich einige TFs, die in Abwehrreaktionen durch ET, JA und SA aktiviert werden. Dazu zählen u. a. die zum Pto/AvrPto-Erkennungsmechanismus gehörenden Komponenten Pti4, 5 und 6 (siehe Kapitel 4.1.3.1, Pto interagierende Proteine). ERFs binden an ihre zu regulierenden Zielgene über die sog. GCC-Box. Dieses Strukturelement befindet sich in den Promotoren einiger Abwehr assoziierter, durch ET und JA induzierter Gene. Dazu gehören u. a. *PR*-Gene (siehe Kapitel 4.1.3.9, *PR*-Gene) [Gutterson und Reuber, 2004; Ohme-Takagi et al., 2000].

Innerhalb der Familie der bZIP-Faktoren sind die sog. TGA/*octopine synthase (ocs)-element binding factors* (OBF) an Stress bedingten Reaktionen beteiligt. Sie binden an das ocs-Element, das sich u. a. im Promotor von Glutathion-S-Transferase (GST)-Genen befindet, die typischerweise in vielen Stress- und Abwehrreaktionen eine Rolle spielen [Cheng und Singh, 1999; Singh et al., 2002; Zhang et al., 1995]. Hybridisierungssignale konnten mit einem solchen OBF-Gen sowie mit einem putativen GST-Gen (siehe Kapitel 4.1.3.9, *oxidative burst*) gefunden werden.

Der genaue Vorgang der Expressionsregulation über das ocs-Element ist noch nicht vollständig geklärt. Cheng und Singh (1999) konnten zeigen, dass neben den OBFs auch Auxine, SA und H₂O₂ an der Regulation des *GST6*-Gens in *Arabidopsis* beteiligt sind. Weiterhin scheinen WRKY-TFs und das OBF bindende Protein OBP1 in diesen Prozess involviert zu sein.

Neben den bereits diskutierten TFs ist es laut Microarrayanalyse zur Expression weitere Faktoren in den 'Börner'-Proben gekommen, wie z.B. Zinkfingerproteine, *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Proteine, MADS-Box-Proteine und einige andere TFs (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Zudem konnten zwei 'Börner'-cDNAs isoliert werden (Fag-B-IES2,5h-123 und Fag-B-IES2,5h-89), die beide auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit Zinkfingerproteinen zeigten.

Dabei fand sich die beste Übereinstimmung des Fag-B-IES2,5h-123 mit einem Stress induzierten Zinkfinger aus *Oryza sativa*.

Sollte es zu einer Aktivierung der genannten Faktoren in den 'Börner'-Proben gekommen sein, ist nicht davon auszugehen, dass jeder TF an der Resistenzreaktion beteiligt ist. Einige der gefundenen TFs fungieren in Entwicklungs- und Wachstumsprozessen der Pflanze und werden daher durch Hormone, wie z.B. Auxin, induziert. Dazu gehört beispielsweise die Gruppe der SCARECROW (SCR)-Faktoren, die zur Familie der GRAS-TFs zählt. Hybridisierungssignale mit vier solcher SCR-Faktoren konnten in den 'Börner'-Proben gefunden werden. Sie regulieren die asymmetrische Zellteilung bei der Bildung radialer Wurzelstrukturen und induzieren damit die Differenzierung zu Cortex- und Endodermiszellen [Gao et al., 2004; Kamiya et al., 2003]. Hinweise konnten auch auf die Aktivierung dreier Faktoren aus der NAM/ATAF/CUC (NAC)-Familie gefunden werden. Darunter befindet sich ein *NAC1* ähnliches Gen und ein *CUC2*-Gen. NAC-Faktoren sind in der Regel an der Entwicklung des Apikalmeristems von Spross und Blüte beteiligt. Abweichend davon reguliert der *NAC1*-Faktor die Bildung von Lateralwurzeln und ist daher besonders im Wurzelgewebe aktiv. Die Induktion des *NAC1*-Gens erfolgt durch Auxin [Xie et al., 2000]. Dennoch können solche mit der Entwicklung assoziierten TFs auch an PCD-Prozessen beteiligt sein. So konnten Lin und Wu (2004) u. a. die Aktivierung von GRAS- und NAC-Faktoren in der Blattseneszenz bei *Arabidopsis* nachweisen. Vor diesem Hintergrund und der Tatsache, dass offensichtlich auch typische Abwehr assoziierte TFs in den 'Börner'-Proben aktiviert wurden, kann bei einigen dieser Faktoren durchaus von einer Funktion in der Resistenzreaktion bei 'Börner' ausgegangen werden.

Transkription

An der transkriptionellen Regulation von Genen sind neben TFs eine Reihe weiterer Komponenten des Transkriptionsapparates beteiligt. Dementsprechend konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Anhaltspunkte für die Aktivierung von Faktoren des RNA-Polymerase-II und des RNA-Polymerase-III-Komplexes gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Der Komplex-II ist in Eukaryoten für die Transkription Protein kodierender Gene verantwortlich [Svejstrup, 2004] während der Komplex-III an der Synthese von tRNAs beteiligt ist [Geiduschek und Kassavetis, 2001].

Chromatinorganisation

Weiterhin spielt auch die Remodulation des Chromatins im Transkriptionsmechanismus eine entscheidende Rolle. So konnten Hybridisierungssignale mit Genen gefunden werden, die im Zusammenhang mit der Chromatinorganisation stehen, wie z.B. Histone (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Eine Aktivierung dieser Gene ist außerdem im Zellteilungsprozess zum Aufbau der Chromosomenstruktur in den Tochterzellen notwendig [Geiduschek und Kassavetis, 2001]. Es ist daher anzunehmen, dass gerade in IES induzierten Wachstumsprozessen die Chromatinorganisation und die damit verbundene Genexpression von großer Bedeutung sind.

DNA-Methylierung

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten zudem Hinweise auf die Expression von Genen gefunden werden, die im Zusammenhang mit der DNA-Methylierung stehen (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Bei diesem Prozess werden in Teilabschnitten der DNA Cytosine durch Methyltransferasen zu 5-Methylcytosin methyliert. Diese DNA-Modifikation führt zur Inaktivierung der Gene in den betroffenen DNA-Regionen. Die DNA-Methylierung ist ein Mechanismus zur epigenetischen Kontrolle der Genexpression und hat ähnlich wie die Bildung des Chromatins beim Zellteilungsprozess eine entscheidende Bedeutung [Bird, 2002; Hennig, 1998]. Dementsprechend ist die Aktivierung solcher an der DNA-Methylierung beteiligter Gene in den IES behandelten Proben nachvollziehbar.

Untersuchungen von Wada et al. (2004) an TMV infizierten Tabakpflanzen haben zudem gezeigt, dass Änderungen der DNA-Methylierung auch als Reaktion auf Stress und Pathogenbefall auftreten und somit die Regulation der Expression vieler Gene simultan ermöglichen.

Transposable Elemente

Unter Kontrolle der DNA-Methylierung steht auch die Aktivierung sog. transposabler Elemente. Sie umfassen DNA-Transposons und Retrotransposons, die in allen eukaryotischen Genomen zu finden sind und insbesondere bei Retrotransposons in sehr hoher Kopienzahl vorliegen können. Hinweise auf die Aktivierung solcher transposablen Elemente konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Pflanzliche Genome bestehen z. T. zu über 50 % aus Retrotransposonsequenzen [Wessler, 1996]. Diese mobilen genetischen Elemente besitzen im Falle der DNA-Transposons die Fähigkeit ihre Position im Genom zu ändern bzw. im Falle der Retrotransposons DNA-Kopien neu in das Genom zu

integrieren. In der Regel stehen transposable Elemente unter strikter Kontrolle und sind meist inaktiv. Jedoch wird die Expression aller bisher charakterisierten Retrotransposons in Pflanzen durch Stress, Pathogenbefall, Verletzungen, Behandlung mit Elicitoren, SA, MeJA und ähnliche Stimuli ausgelöst. Sehr gut untersucht ist in diesem Zusammenhang das Tnt1-Element aus dem Tabak. Tnt1 gehört zur Gruppe der *copia-like*-Elemente. Seine Aktivierung konnte nach einer TMV-Infektion in Tabakpflanzen sowie in Pathogen infizierten Tomaten- und *Arabidopsis*-Pflanzen nachgewiesen werden. Dabei scheint die Induktion des Retrotransposons in einer sehr frühen Phase der Abwehr zu erfolgen, die dann später zur HR führt [Beguiristain, 2001; Grandbastien et al., 1997; Sugimoto, 2000]. Ein Hybridisierungssignal mit einem *copia-like*-Element konnte sowohl mit der 2,5-h- als auch mit der 4,5-h-Probe gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

Posttranskriptionelle Regulation

Neben der transkriptionellen Regulation konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse außerdem Hinweise auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Dazu gehören Gene, die an der RNA-Prozessierung beteiligt sind, wie z.B. Splicingfaktoren. Die Bildung alternativer Splicevarianten durch Änderungen der Vorläufer-mRNAs ist ein wichtiger Prozess in vielen Organismen und ermöglicht eine große Proteindiversität. Das alternative Splicing tritt insbesondere bei Resistenz und Abwehr assoziierten Genen auf, die z.B. für MAPKs, diverse Resistenzproteine, GSTs und Hsps kodieren [Kazan, 2003].

DNA-Reparatur

Zusätzlich scheint es in den IES behandelten 'Börner'-Wurzeln zu einer Aktivierung von DNA-Reparaturmechanismen gekommen zu sein (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Möglicherweise wurde die Expression entsprechender Gene durch die Bildung von ROS induziert. Sauerstoffradikale verursachen DNA-Schäden und führen damit zu einer Reihe von Modifikationen. Als Schutzmechanismus aktiviert die Pflanze Reparatursysteme, um den Schaden zu beheben. Die Aktivierung eines solchen Reparaturgens konnte z.B. bei *Arabidopsis* als Reaktion auf H₂O₂ beobachtet werden [Desikan et al., 2000].

4.1.3.3 Metabolismus

Primärmetabolismus

In beiden 'Börner'-Proben konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Hinweise auf die Expression von Genen des Primärmetabolismus gefunden werden. Darunter befinden sich Enzyme aus Prozessen des Energiestoffwechsels, wie Glycolyse und Citratzyklus sowie Enzyme des Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Nukleotid- und Lipidstoffwechsels.

Ebenso scheint es sich bei einigen der isolierten 'Börner'-cDNAs um Gene des Primärmetabolismus zu handeln. So zeigte die EST-Sequenz Fag-B-IES2,5h-185 auf Nukleotidebene Homologien zu einer NAD(H)-Glutamatdehydrogenase (GDH) aus *Vitis vinifera* sowie mit der GDH2 aus *Arabidopsis* (*At5g07440*). Mit dem gleichen Gen konnte auch ein Hybridisierungssignal auf dem Chip gefunden werden. Die NAD(H)-GDH ist im Mitochondrium lokalisiert und katalysiert die reversible Aminierung von 2-Oxoglutarat zu Glutamat [Purnell et al., 2005].

Diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob die Expression dieser Gene in den IES behandelten 'Börner'-Proben tatsächlich differenziell verlaufen ist oder ob in diesen Fällen die cDNA-Subtraktion unzureichend funktioniert hat (siehe Kapitel 4.1.1). Jedoch setzen aktive Abwehrmechanismen, wie die HR, einen intakten Metabolismus voraus, in dessen Verlauf Änderungen des Primärmetabolismus sogar von essenzieller Bedeutung sind [Heath, 2000a; Schaaf et al., 1995]. Ein Beispiel hierfür ist der Malatmetabolismus. Ein wichtiges Enzym dieses Metabolismus ist das NADP-Malatenzym (NADP-Me). Es katalysiert die oxidative Decarboxylierung von L-Malat unter gleichzeitiger Oxidation zu Pyruvat. Dabei kommt es zur Bildung von NADPH und CO₂. Eine spezielle Aufgabe erfüllt NADP-Me in der Photosynthese von C₄-Pflanzen, indem es CO₂ aus Malat freisetzt, das zur Kohlenstofffixierung benötigt wird. Untersuchungen an transgenen Tabakpflanzen haben gezeigt, dass NADP-Me auch als Reaktion auf Verletzungen und als Antwort auf Elicitoren verstärkt exprimiert wird. In diesem Zusammenhang vermutet man eine Funktion des Enzyms in der pflanzlichen Abwehr als NADPH-Lieferant für die Lignin- und Flavonoidbiosynthese sowie für den *oxidative burst* [Casati et al., 1999; Schaaf et al., 1995]. Mit der 2,5-h-Probe konnte ein Hybridisierungssignal mit einem putativen NADP-Me-Gen gefunden werden.

Weiterhin zeigte die isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-48 auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einer Proliniminopeptidase aus *Arabidopsis*. Mit dem gleichen Gen (*At2g14260*) konnte auch in der Microarrayanalyse ein Hybridisierungssignal mit beiden Proben gefunden werden. Das Enzym garantiert den Nachschub an Prolin durch die

Hydrolyse Prolin reicher Peptide. Pflanzen reagieren auf Stresssituationen, insbesondere ausgelöst durch abiotische Faktoren, mit der Akkumulation löslicher, in hohen Konzentrationen nicht toxischer, niedermolekularer Komponenten. Dazu zählt neben Betain und diversen Kohlenhydraten auch das Prolin. Man nimmt an, dass Prolin vor oxidativen Schäden durch ROS schützt [Chen und Murata, 2002]. Es ist daher möglich, dass es in den IES behandelten Wurzeln im Verlauf eines *oxidative burst* zu einem erhöhten Bedarf an Prolin gekommen ist und dies zu einer differenziellen Regulation der Proliniminopeptidase geführt hat.

Hinweise konnten weiterhin auf die transkriptionelle Regulation von Enzymen des Lipidmetabolismus gefunden werden. Darunter befinden sich Gene aus der Familie der Phospholipasen A2 und D (PLA und PLD), deren Aufgabe in der Degradierung von Membranphospholipiden besteht. Die daraus entstehenden Produkte sind Bestandteile von Phospholipidsignalwegen und spielen insbesondere in Stresssituationen der Pflanzen eine Rolle. Eines dieser Signale ist die Phosphatidsäure (PA – *phosphatidic acid*). Untersuchungen an Reis- und Tomatenzellen sowie *Arabidopsis*-Pflanzen haben gezeigt, dass eine Behandlung mit diversen Elicitoren und Pathogenen einen ansteigenden PA-Level aufgrund erhöhter Aktivität verschiedener PLD-Isoformen zur Folge hat [de Torres Zabela et al., 2002]. Diese Ergebnisse lassen auf eine Funktion der PLD und seiner katabolen Produkte in der pflanzlichen Pathogenabwehr schließen. Wie die Regulation der Abwehr über PLD im Detail funktioniert ist noch nicht bekannt. Vermutet wird eine Funktion der PA bei der Aktivierung des *oxidative burst* [Lee, 2001; Munnik, 2000; Yamaguchi et al., 2005].

Ebenso wird für PLA eine Rolle in der Regulation von Resistenzreaktionen angenommen. So sind ihre katabolen Produkte an der Einlagerung von Callose in die Zellwand sowie an der Bildung von Phytoalexinen und JA beteiligt [Chandra et al., 1996]. Von dem laut Microarrayanalyse exprimiert vorliegenden PLA2-Enzym ist zudem bekannt, dass es innerhalb kürzester Zeit durch IES aktiviert wird und eine mögliche Rolle in der Auxinsignaltransduktion spielt [Scherer, 2002].

Die diskutierten Ergebnisse zeigen, dass Komponenten des Primärmetabolismus einen entscheidenden Beitrag in Resistenzreaktionen leisten können und dadurch bedingt eine differenzielle Regulation dieser Gene nachvollziehbar ist. Der Primärmetabolismus kann in diesem Zusammenhang die für eine Abwehrreaktion notwendige Energie sowie Substrate zur Bildung von Abwehrkomponenten liefern [Schaaf et al., 1995]. Darüber hinaus sind im speziellen Fall der Reblausresistenz bei 'Börner' möglicherweise die entscheidenden

Resistenz initiiierenden Reaktionen gerade im Primärmetabolismus zu suchen, wenn man davon ausgeht, dass die IES der auslösende Faktor ist. Die durch das Hormon gesteuerten Wachstumsprozesse sowie der Auxinmetabolismus sind eng mit dem Primärmetabolismus verbunden [Gaspar et al., 2003]. So ist es möglich, dass eine IES-Behandlung bei 'Börner' Komponenten des Primärmetabolismus aktiviert, die zur Initiierung von Abwehrreaktionen, wie der HR, beitragen. Ein Kandidat hierfür wäre beispielsweise die PLA2 oder ein für diese Reaktion spezifisches Isoenzym, das durch die IES induziert wird und Resistenzreaktionen in Gang setzt.

In diesem Zusammenhang muss allerdings auch davon ausgegangen werden, dass einige der differenziell regulierten Gene des Primärmetabolismus ausschließlich auf die Funktion der IES als Wachstumshormon zurückzuführen sind und wahrscheinlich keine Funktion im Resistenzmechanismus erfüllen.

Sekundärmetabolismus

Die Sequenzierungs- und Microarrayergebnisse lieferten weiterhin Anhaltspunkte für die Expression von Genen des Sekundärmetabolismus. So konnten Hybridisierungssignale mit diversen Enzymen des Phenylpropanoid-, Isoprenoid- und Alkaloidsyntheseweges auf dem Chip gefunden werden. Darunter waren auch Signale mit mehreren CYP450-Genen zu finden. Als Monooxygenasen spalten CYP450-Proteine in Gegenwart von NADPH bzw. NADH O₂ und übertragen dabei unter Bildung von H₂O ein Sauerstoffatom auf ein entsprechendes Substrat. Mit dieser Funktion sind sie u. a. an der Bildung von Zellwandkomponenten und Abwehrsubstanzen beteiligt [Mizutani et al., 1998; Whitbred und Schuler, 2000].

Weiterhin zeigte die 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-05 Übereinstimmungen mit einem Acetyl-CoA-Acetyltransferase ähnlichen Gen aus *Hevea brasiliensis*. Das Enzym ist an der Synthese des Grundbausteines der Terpene, dem Isopentenylidiphosphat oder auch aktives Isopren genannt, beteiligt [Richter, 1997].

Bei der Bildung zyklischer Terpene sind Cyclasen von Bedeutung [Greenhagen und Chappell, 2001]. Möglicherweise handelt es sich bei der isolierten 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES-4,5h-143 um ein solches Enzym. Die cDNA-Sequenz zeigte auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einem *Arabidopsis*-Gen aus der Cyclasefamilie, jedoch liegen laut TAIR-Datenbank keine näheren Informationen über die Funktion des Genprodukts vor. Dementsprechend könnte eine mögliche Cyclase auch an anderen Reaktionen in der Pflanze beteiligt sein. So katalysieren Cyclasen zudem die Bildung zyklischer Nukleotide, wie dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cyclic AMP – cAMP) oder dem Guanosinmonophosphat

(cyclic GMP – cGMP), die als sekundäre Botenstoffe u. a. in Abwehr bedingten Signaltransduktionswegen fungieren [Newton und Smith, 2004].

Ein Enzym aus der Alkaloidbiosynthese ist die Reticulinoxidase oder auch Berberin-„Brücken“-Enzym genannt. Es katalysiert die Bildung des Benzylochinolinalkaloids Berberin aus (*S*)-Reticulin [Richter, 1997]. Die 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES-2,5h-107 zeigte auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit einer Reticulinoxidase aus *Arabidopsis*. Zusätzlich konnten Hybridisierungssignale mit zwei weiteren Reticulinoxidasen auf dem Chip gefunden werden. Alkaloide stellen eine komplexe und vielseitige Gruppe an Sekundärmetaboliten dar. Unter anderem dienen sie auf Grund ihrer Toxizität der Abwehr von Fraßfeinden [Liscombe et al., 2005; Richter, 1997].

Einige Alkaloide sowie Phenylpropanoide und Isoprenoide sind den sog. Phytoalexinen zuzuordnen. Es handelt sich dabei um niedermolekulare Abwehrsubstanzen, die sehr schnell nach einem Pathogenangriff *de novo* synthetisiert werden und durch ihren antimikrobiellen Charakter gegen ein breites Spektrum an Pathogenen wirken [Richter, 1997]. Sie spielen insbesondere eine Rolle als Fungizide, indem sie die Keimung von Sporen verhindern sowie Veränderungen der Pilzmorphogenese hervorrufen. Sie gelten außerdem als Indikatoren pflanzlicher Resistenz [Jeandet et al., 2002].

Obwohl Phytoalexine im Allgemeinen eine hohe chemische Diversität zeigen, scheinen sich die im Wein zu findenden Phytoalexine auf die Familie der Stilbene zu beschränken. Sie gehören den Flavonoidphytoalexinen an und setzen sich aus dem Grundelement Resveratrol zusammen. Im Wein sind Oligomere des Resveratrols zu finden, die sog. Viniferine, und einfache Stilbene, wie z.B. das *trans*-Pterostilben, ein dimethyliertes Resveratrolderivat [Jeandet et al., 2002]. Eine zentrale Rolle bei der Bildung von Stilbenen spielt das Enzym Stilbensynthase (STS), das ein Molekül *p*-Coumaroyl mit drei Molekülen Malonyl-CoA zu Resveratrol kondensiert [Ferrer et al., 1999]. Aus den subtrahierten 'Börner'-Proben konnten insgesamt sechs cDNA-Fragmente isoliert und sequenziert werden (Fag-B-IES2,5h-49, -82, -108, -133 und Fag-B-IES4,5h-144, -27), die laut Datenbankanalyse auf Nukleotidebene sehr gute Übereinstimmungen mit diversen Stilben- bzw. Resveratrolsynthasen zeigten. Aufgrund von Sequenzhomologien lassen sich die sechs ESTs in drei Gruppen unterteilen. Innerhalb dieser beiden Gruppen besteht jedoch keine 100%ige Sequenzübereinstimmung. Aus diesem Grunde muss davon ausgegangen werden, dass es sich möglicherweise um insgesamt sechs verschiedene STS handelt, die in den 'Börner'-Wurzeln aktiviert wurden. Es ist bekannt, dass STS-Gene als Multigenfamilie vorliegen. Nach dem Stand von Jeandet et al. (2002) sind

mindestens neun Gene im Wein charakterisiert, davon acht aus *Vitis vinifera* und ein weiteres aus *Vitis riparia* cv Gloire de Montpellier.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass es im IES behandelten Gewebe zur Bildung von Phytoalexinen gekommen ist und dies wiederum ist als ein Indiz für die Aktivierung von Resistenzmechanismen zu werten.

4.1.3.4 Transport

Wie bereits in Kapitel 4.1.3.3 (Primärmetabolismus) erwähnt, spielt der pflanzliche Grundstoffwechsel in Resistenzreaktionen eine entscheidende Rolle bei der Energieversorgung und bei der Synthese von Abwehrkomponenten. In diesem Zusammenhang ist außerdem der Transport von Abwehrmetaboliten und diversen Zwischenprodukten von Bedeutung [Lee et al., 2004]. So konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse in beiden Proben Hinweise auf die Expression Transport assoziierter Gene gefunden werden. Darunter befinden sich Gene des Kohlenhydrat-, Aminosäure-, Lipid-, Protein- und Wassertransportes (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

Anhaltspunkte konnten ebenfalls für die Expression von Genen des Energiemetabolismus gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Darunter auch solche, die im Mitochondrium lokalisiert sind und im Elektronentransport fungieren. Wie in Kapitel 4.1.3.9 (HR und Seneszenz assoziierte Gene) beschrieben wird, können Mitochondrien assoziierte Proteine bei der Induktion von PCD-Prozessen eine entscheidende Rolle spielen.

Mit beiden 'Börner'-Proben konnten weiterhin Hybridisierungssignale mit Genen des Ionentransportes gefunden werden. Darunter auch Signale mit Protonenpumpen, deren Funktion im Hinblick auf Abwehr- und Wachstumsprozesse im Folgenden näher diskutiert wird.

Protonentransport

Als eine der wichtigsten Ionenpumpen des pflanzlichen Organismus gilt die in der Plasmamembran lokalisierte H^+ -ATPase (P-ATPase). Sie transportiert entgegen einem elektrochemischen Gradienten unter ATP-Hydrolyse Protonen über die Plasmamembran. Dies ermöglicht einen sekundären Transport und Austausch anderer Ionen, wie z.B. Kalium (K^+), sowie eine Kontrolle des cytosolischen pHs. Zudem ermöglicht der H^+ -Transport den Symport von Auxin in die Zelle. Mit diesen Funktionen spielen P-ATPasen insbesondere eine

Rolle in der Zellteilung und Zellelongation [Blakeslee et al., 2005; Portillo, 2000; Sondergaard et al., 2004]. P-ATPasen werden durch eine Multigenfamilie kodiert. Man vermutet, dass sich die Isoformen in ihrer katalytischen Wirkungsweise unterscheiden und differenziell reguliert werden [Portillo, 2000]. Änderungen der Expression werden durch Faktoren wie z.B. Licht, Alterungsprozesse, Toxine sowie durch Stress und Pathogenbefall hervorgerufen [Maleck et al. 2000, Supplemental Table A; Portillo, 2000]. Aber auch Auxin induziert die Expression bestimmter P-ATPase-Isoformen. Die durch die Protonenpumpe bedingte Absenkung des intrazellulären pHs führt dabei zur Auflockerung der Zellwandstruktur, einer Grundvoraussetzung für den Prozess der Zellelongation [Frias et al., 1996; Hager, 2003].

Da P-ATPasen während ihrer enzymatischen Tätigkeit in zwei Konformationen vorliegen, E1 und E2, werden sie auch als E1-E2-ATPasen bezeichnet [Chow und Forte, 1995]. Ein Hybridisierungssignal mit einer ATPase vom E1-E2-Typ konnte mit beiden 'Börner'-Proben gefunden werden.

H⁺-ATPasen können auch im Tonoplasten der Vakuole lokalisiert sein. Es handelt sich dabei um die sog. V-ATPasen. Sie sind verantwortlich für die Funktion der Vakuole in Prozessen wie Zellwachstum, Aufbau des Zellturgors, Kontrolle des protoplasmatischen Gleichgewichtes, Signaltransduktion und Regulation des Metabolismus [Marty, 1999].

V-ATPasen sind multimere Enzyme, die aus über zehn verschiedenen Untereinheiten bestehen. Von einigen dieser Enzyme ist bekannt, dass sie als Multigenfamilie vorliegen. So konnten Isoformen der Untereinheiten A, B, D und E sowie der Proteolipiduntereinheit gefunden werden [Magnotta und Gogarten, 2002; Sondergaard et al., 2004]. Man vermutet, dass diese Isoformen unterschiedliche Funktionen besitzen und möglicherweise als Antwort auf bestimmte Stressstimuli differenziell reguliert werden. [Magnotta und Gogarten, 2002].

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf eine differenzielle Expression der V-ATPase-Untereinheiten B und D sowie des Proteolipids gefunden werden.

Ebenfalls im Tonoplasten lokalisiert sind die Pyrophosphatasen. Auch hierbei handelt sich um H⁺-Ionenpumpen, die jedoch die erforderliche Antriebsenergie nicht aus der Spaltung von ATP sondern von Pyrophosphat beziehen [Richter, 1997]. Auch bei diesen Ionenpumpen geht man von einer Funktion in Stressantworten der Pflanzen aus [Magnotta und Gogarten, 2002]. Mit der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit insgesamt zwei Pyrophosphatasen gefunden werden.

Eine dritte Gruppe von H⁺-ATPasen sitzt in der Mitochondrien- und Thylakoidmembran. Es sind die sog. F-ATPasen [Chow und Forte, 1995]. Die Microarrayanalyse lieferte Hinweise

auf die Expression einer in der Mitochondrienmembran lokalisierten ATPase in beiden 'Börner'-Proben. Das entsprechende *Arabidopsis*-Gen zeigt Ähnlichkeiten zu dem mitochondrialen *Bcs1p*-Gen aus der Hefe. *Bcs1p* gehört zu den AAA (*ATPases associated with different cellular activities*)-Proteinen und es wird vermutet, dass es als ATP abhängiges Chaperon am Aufbau des Cytochrom b/c1-Komplexes der Atmungskette beteiligt ist [Cruciat et al., 1999]. Sollte es zur Expression eines vergleichbaren Gens in den 'Börner'-Proben gekommen sein, ist bei dem entsprechenden Genprodukt eine Funktion in der Energiegewinnung anzunehmen.

ATPasen aus der AAA-Proteinfamilie scheinen allerdings auch eine Rolle bei der HR-Regulation zu spielen. So konnten Sugimoto et al. (2004) bei TMV infizierten Tabakpflanzen die Expression eines AAA-Gens feststellen. Sie vermuten, dass es sich bei dem Genprodukt um einen Negativregulator der SA bedingten Signaltransduktion handelt, der in diesem Zusammenhang die Ausbreitung der HR eindämmt.

Die diskutierten Ergebnisse machen deutlich, dass eine Funktion differenziell exprimierter H⁺-Ionenpumpen im Resistenzmechanismus bei 'Börner' durchaus vorstellbar ist. Dennoch muss auch hier berücksichtigt werden, dass diese Ionenpumpen insbesondere bei Zellwachstumsprozessen von Bedeutung sind und wie die P-ATPasen sogar durch die IES in ihrer Funktion als Wachstumshormon aktiviert werden können. In diesen Fällen kann man davon ausgehen, dass die H⁺-Ionenpumpen nicht im direkten Zusammenhang mit der induzierten Abwehrreaktion stehen.

4.1.3.5 Proteinmetabolismus

Proteinanabolismus

Wie bereits in Kapitel 4.1.3.2 erläutert wurde, sind Resistenzreaktionen sowie Auxin induzierte Wachstumsprozesse mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität in der Pflanze verbunden. Daraus resultiert ebenfalls eine gesteigerte Proteinsynthese.

Hinweise auf die Expression Translations assoziierter Gene konnten sowohl mit den Micorarray- als auch mit den Sequenzierungsergebnissen gefunden werden. So zeigte die aus der 2,5-h-Probe isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-K10-M12 auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einem eukaryotischen Initiationsfaktor (eIF) 4 aus *Arabidopsis*. Zudem scheint es sich bei den beiden ebenfalls aus der 2,5-h-Probe isolierten Sequenzen Fag-

B-IES2,5h-K1-M13 und Fag-B-IES2,5h-38 um zwei eukaryotische Elongationsfaktoren (eEF) zu handeln.

Sowohl eIFs als auch eEFs gehören neben weiteren Komponenten, wie Terminationsfaktoren und ribosomale Proteine, zum Translationskomplex [Thornton et al., 2003]. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hybridisierungssignale mit einer Vielzahl Translations assoziierter Gene gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1), darunter auch eIFs und eEFs vergleichbar mit den isolierten 'Börner'-Sequenzen.

Komponenten des Translationskomplexes gelten im Allgemeinen als *housekeeping*-Proteine [Thornton et al., 2003]. Es stellt sich daher die Frage, inwieweit eine differenzielle Expressionsregulation dieser Gene tatsächlich in den IES behandelten Proben vorliegt oder ob in diesen Fällen die cDNA-Subtraktion unzureichend funktioniert hat.

In diesen Fällen liegt wahrscheinlich weniger eine differenzielle Aktivierung, sondern vielmehr eine gesteigerte Expressionsrate dieser Translations assoziierten Gene vor. Dies würde mit einem Resistenz bzw. Wachstums bedingten Anstieg der transkriptionellen Aktivität in der Pflanze korrelieren.

Zudem konnte im menschlichen Organismus nachgewiesen werden, dass eine erhöhte Expression der Elongationsfaktoren eEF1A1 und eEF1A2 apoptotischen Prozessen entgegenwirkt und insbesondere in Tumorgewebe auftritt. Erklärt wird dieser Zusammenhang mit einer spezifischen Steigerung der Synthese Zellwachstums assoziierter Proteine durch die beiden eEFs [Thornton et al., 2003].

In 'Börner' könnten solche eEFs die Ausbreitung der HR kontrollieren oder im Zusammenhang mit IES induzierten Wachstumsprozessen stehen.

Proteinkatabolismus

Proteasen sind in einer Vielzahl biologischer Prozesse der Pflanze von Bedeutung. Sie dienen der Degradierung missgefalteter und schädlicher Proteine. Sie bauen gezielt regulierende Proteine ab und kontrollieren damit Entwicklungs- und Wachstumsprozesse sowie Reaktionen auf Stress und Pathogenbefall. Weiterhin dienen Proteasen der posttranskriptionellen Modifikation von Enzymen und beeinflussen damit deren Aktivität. Sie sind zudem involviert in Signaltransduktionswege durch die Freisetzung von Signalpeptiden und in die Aktivierung von Rezeptoren.

Ubiquitin abhängige Proteolyse

Einer der wichtigsten proteolytischen Prozesse ist die Ubiquitin (Ub) abhängige Proteolyse über das 26S-Proteasom (Ub/26S). Einige dieser Komponenten konnten laut Microarrayanalyse in beiden Proben gefunden werden. Die Ub/26S-Proteolyse spielt eine Rolle in Signaltransduktionswegen als Antwort auf Hormone, Licht, Kohlenhydrate, Entwicklung und auch als Reaktion auf Pathogeninfektionen. Sie ist ein multienzymatischer Prozess, der mit der ATP abhängigen Aktivierung von Ub durch das Enzym E1 beginnt. Danach erfolgt ein Transfer des Ubs auf das Ub konjugierende Enzym E2. Dieses wird von einer Ub-Ligase E3 gebunden, die das Ub an ein spezifisches Zielprotein ligiert. In der Regel kommt es zur Bindung mehrere Ub-Moleküle an das Zielprotein. Die so markierten Proteine werden dann durch das 26S-Proteasom erkannt und degradiert [Devoto et al., 2003; Zeng et al., 2004]. Die Ubiquitinierung eines breiten Proteinspektrums und die hohe Spezifität mit der Proteine über diesen Mechanismus abgebaut werden, gehen insbesondere auf die E3-Enzyme zurück. Sie liegen im Vergleich zu den anderen Komponenten in der größten Vielfalt vor. Die E3-Ligasen, die Proteine für die Ubiquitinierung rekrutieren, bilden eine große und divergente Proteinfamilie [Vierstra, 2003]. Dazu zählen u. a. die SCF-Komplexe, die der Familie der RING E3-Ligasen angehören. Anhaltspunkte für die Aktivierung zwei putativer E3-Ligasen des SCF-Typs konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse in der 2,5-h-Probe gefunden werden. Der Name SCF bezieht sich auf drei der insgesamt vier Untereinheiten des Komplexes; auf SKP1, CDC53 (Cullin) und ein F-Box-Protein. Die vierte Untereinheit ist ein RING-Fingerprotein, das RBX1. Für die Bindung eines Zielproteins an einen SCF-Komplex ist das F-Box-Protein verantwortlich. Es handelt sich dabei um eine Proteinfamilie mit einer hohen strukturellen Diversität. Das *Arabidopsis*-Genom kodiert an die 700 potenziellen F-Box-Proteine und ermöglicht so das breit gefächerte Proteinspektrum mit der die SCF-Komplexe das Substrat für die Ubiquitinierung binden können [Devoto et al., 2003; Kipreos und Pagano, 2000; Vierstra, 2003]. Auch unter den Microarrayergebnissen konnten Hinweise auf die Aktivierung einer Vielzahl an F-Box-Proteinen in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Bisher sind zwei F-Box-Proteine bekannt, die in Verbindung mit einem SCF-Komplex an der pflanzlichen Abwehr beteiligt sind; das *coronatine insensitive 1* (COI1) und das *supressor of nim1-1* (SON1). COI1 kontrolliert JA abhängige Abwehrmechanismen, indem es u. a. die Expression des pflanzlichen Defensingens *PDF1.2* ermöglicht. Dabei ist die Histonacetylase RPD3b, die als Transkriptionsrepressor fungiert, ein mögliches Substrat für den SCF^{COI1}-Komplex. Neben der positiven Regulation der pflanzlichen Abwehr, deutet vieles darauf hin, dass SCF-Komplexe auch als

Negativregulatoren wirken können. Ein Beispiel hierfür ist das SON1, das im SCF-Komplex SAR unabhängige Abwehrantworten negativ reguliert.

Da in beiden Proben Hinweise auf die Aktivierung weiterer RING-Fingerproteine mit einer möglichen E3-Ligaseaktivität gefunden wurden, könnten neben SCF noch andere RING-E3-Komplexe involviert sein. Unter anderem konnte mit beiden Proben ein Hybridisierungssignal mit einem RING-Fingerprotein ähnlich zum ATL6 gefunden werden. *ATL6* kodiert für eine E3-Ligase, die in *Arabidopsis* sehr schnell nach einer Behandlung mit Elicitoren induziert wird [Salinas-Mondragón et al., 1999].

Die Aktivierung Ub abhängiger Proteolyse erfolgt u. a. durch Hormone. Insbesondere in der Auxinantwort spielt der Ub/26S-Weg eine zentrale Rolle. Bei einem niedrigen Auxinlevel in der Pflanze wird die Expression von Auxin abhängigen Genen unterdrückt. Dies ist zurückzuführen auf die AUX/IAA (*auxin/indole-3-acetic acid*)-Proteine, die als Transkriptionsrepressoren über Dimerisierungsdomänen die Transkriptionsregulatoren *auxin response factors* (ARFs) binden und deren Aktivität blockieren. Steigt der Auxinlevel z.B. durch eine externe Zufuhr des Hormons an, werden die AUX/IAA-Proteine degradiert und die Aktivierung von ARFs ermöglicht. Die so aktivierten ARFs können dann die Expression Auxin abhängiger Gene sowohl positiv als auch negativ beeinflussen [Kepinski und Leyser, 2002]. Wie in Kapitel 4.1.3.6 (Auxin gesteuerte Genexpression) eingehender beschrieben wird, lieferten die Microarrayergebnisse Hinweise auf die Aktivierung solcher Auxin/ARF regulierten Gene.

Für den Abbau der AUX/IAA-Proteine ist ein SCF-Komplex verantwortlich, der neben den üblichen Enzymen, E1, E2 und E3, weitere Schlüsselkomponenten der Ubiquitinierung aufweist. Damit die AUX/IAA-Degradierung erfolgreich verläuft, ist eine Modifikation der Untereinheit Cullin im SCF-Komplex notwendig. Dazu wird ein Ub ähnliches Molekül, das *related to ubiquitin 1* (RUB1), an das Cullin gebunden. Das RUB1 wird zunächst über einen E1 ähnlichen Komplex aktiviert, der ein Dimerisierungsprodukt der beiden Proteine AXR1 und *E1-like conjugating enzyme-related 1* (ECR1) darstellt. Über ein E2 ähnliches Protein erfolgt dann die Bindung des RUB1 an Cullin. Damit eine effektive Auxinantwort möglich ist, muss das gebundene RUB1 im Verlauf der Reaktion wieder abgespalten werden unter Mithilfe des ursprünglich aus der Lichtsignaltransduktion bekannten COP9 (*constitutive photomorphogenic 9*)-Signalosoms [Kepinski und Leyser, 2002]. Ein Hybridisierungssignal mit einem *COP9* ähnlichen Gen konnte in beiden Proben gefunden werden.

Die spezifische Bindung des AUX/IAA an den SCF-Komplex wird durch das F-Box-Protein *transporter resistant 1* (TIR1) vermittelt. Es wird vermutet, dass noch weitere F-Box-Proteine

AUX/IAAs spezifisch binden und deren Degradierung einleiten können [Schwechheimer und Schwager, 2004].

Inwieweit ein erhöhter Auxinspiegel diesen proteolytischen Mechanismus induziert ist noch nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird die Möglichkeit, dass TIR1 als Auxinrezeptor fungiert und erst die Bindung des Hormons an das F-Box-Protein die Interaktion zwischen SCF^{TIR1}-Komplex und AUX/IAA-Proteinen erlaubt. Eine zweite Möglichkeit wäre die kooperative Bindung des Auxins sowohl an TIR1 als auch an das AUX/IAA-Protein um so den SCF^{TIR1}/Substrat-Komplex zu stabilisieren. Die dritte Theorie basiert auf der Feststellung, dass die Zielproteine in der Regel phosphoryliert werden müssen, bevor eine Bindung an den SCF-Komplex und eine anschließende Degradierung durch das 26S-Proteasom erfolgen kann. Es wird daher angenommen, dass dabei Auxin induzierte Kinasen, wie z.B. MAPKs oder auch das Phytochrom A, eine Rolle spielen [Dharmasiri et al., 2005; Kepinski und Leyser, 2002]. Sowohl Anhaltspunkte für die Aktivierung von MAPKs als auch von Phytochrom A konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.3.1, Mitogen aktivierte Proteinkinasen und 4.1.3.7).

Abbildung 4.4 veranschaulicht den oben beschriebenen Mechanismus der Auxin regulierten Ubiquitinierung von Proteinen über den SCF^{TIR1}-Komplex.

Der geschilderten AUX/IAA-Proteolyseweg und die Tatsache, dass Hinweise auf Komponenten dieses Mechanismus durch die Microarrayanalyse gefunden wurden, lässt eine mögliche Erklärung für den Induktionsverlauf der Resistenzreaktion durch IES in 'Börner' zu. Es wäre möglich, dass das extern zugeführte IES den AUX/IAA-Proteolyseweg aktiviert und somit Auxin abhängige Gene induziert. In der Regel sind solche Gene an Entwicklungs- und Wachstumsprozessen der Pflanze beteiligt (siehe Kapitel 4.1.3.6, Auxin gesteuerte Genexpression). Denkbar ist aber auch die Induktion Resistenz und/oder PCD assoziierter Gene und Mechanismen. So sind ARFs an der Aktivierung der ET-Biosynthese beteiligt [Stepanova et al., 2005]. Das Pflanzenhormon ist u. a. in Prozesse der pflanzlichen Pathogenabwehr und des PCD involviert (siehe Kapitel 4.1.3.1; Ethylen, Jasmonsäure, Methyljasmonat und Salicylsäure).

Eine zweite Möglichkeit wäre die Aktivierung eines Ub/26S-Mechanismus ähnlich dem der AUX/IAA-Proteolyse. Es wäre weiterhin möglich, dass der SCF-Komplex mit einem speziellen F-Box-Protein ähnlich dem COI1 interagiert, das die spezifische Bindung und Degradierung bestimmter Proteine ermöglicht und damit regulierend auf die Resistenzreaktion einwirkt oder sogar die HR induziert.

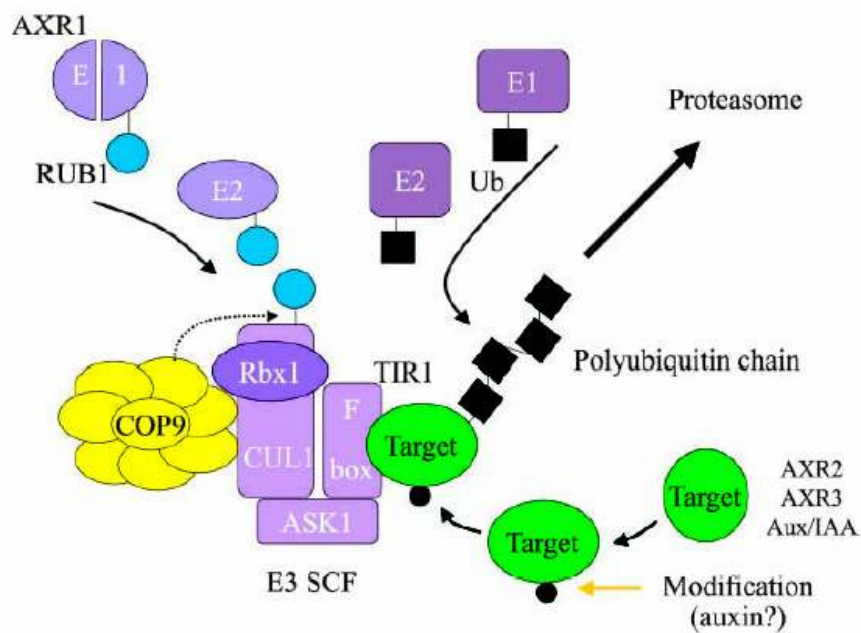


Abb. 4.4: Auxin regulierte Ubiquitinierung von Proteinen über den SCF^{TIR1}-Komplex
auxin resistant (AXR), SKP1 (ASK1)/Cullin/F-Box (SCF), RING-Fingerprotein (RBX1), *related to ubiquitin 1* (RUB1), *constitutive photomorphogenic 9* (COP9), Ubiquitin (Ub), *auxin/indole-3-acetic acid* (AUX/IAA); Kepinski und Leyser (2002)

Eine weitere Komponente der Ub/26S-Proteolyse ist das 26S-Proteasom. Es besteht aus einem 20S Kernpartikel, der die Proteolyse katalysiert, und einem 19S regulatorischen Partikel. Anhaltspunkte für die transkriptionelle Aktivierung von 20S-Untereinheiten konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden. Untersuchungen von Suty et al. (2003) an Tabakpflanzen zeigten die differenzielle Expression von 20S-Untereinheiten als Reaktion auf eine Behandlung mit Elicitoren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Verlauf der Abwehrreaktion diese 20S-Untereinheiten konstitutiv vorliegende Untereinheiten im 26S-Proteasom ersetzen, die Proteolyseeigenschaft des Komplexes verändern und somit in den Abwehrmechanismus eingreifen können. Suty et al. vermuten eine Involvierung dieser veränderten Proteasomen in der SAR. Eine ähnliche Funktion könnte auch für differenziell exprimierte 20S-Untereinheiten in 'Börner' gelten. In vorangegangenen cDNA-Subtraktionsversuchen mit IES behandelten 'Börner'-Wurzeln konnte bereits eine ähnliche 20S-Untereinheit isoliert und teilweise sequenziert werden [Dietrich, 2002].

Eine mögliche Funktion eines oder mehrerer Ub/26S-Proteolysewege in der Resistenzreaktion bei 'Börner' ist also durchaus vorstellbar. Auch eine direkte Beteiligung an der Induktion der HR ist nicht auszuschließen. Nachdem bereits aus Untersuchungen an tierischen Organismen

bekannt ist, dass Ub abhängige Proteolysewege u. a. an der Regulation der PCD beteiligt sind, wird dies auch zunehmend für den pflanzlichen Organismus angenommen [Zeng et al, 2004].

Weitere Proteasen

Neben dieser Vielzahl an Ub/26S-Komponenten konnten Hinweise auf die Aktivierung weiterer Proteasen in beiden Proben gefunden werden. Darunter befinden sich u. a. Serin-, Aspartat-, Cystein- und Metalloproteasen. Die Funktion dieser Enzyme ist in tierischen Organismen weitgehend gut untersucht. Dort fällt diesen Proteasefamilien u. a. eine Rolle in der PCD-Regulation und -Aktivierung zu. In Pflanzen sind die Untersuchungen dieser Proteasen noch nicht so weit fortgeschritten. Es gibt allerdings erste Hinweise darauf, dass sie ähnliche Aufgaben wie im tierischen Organismus übernehmen und beteiligt sind an diversen PCD-Mechanismen; darunter auch in der pflanzlichen Pathogenabwehr. So konnten z. B. Jordá et al. (1999) zwei Subtilisin ähnliche Serinproteasen, P69B und P69C, in Tomatenpflanzen und transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen nachweisen, deren Expression nach einer bakteriellen Infektion und nach einer Behandlung mit SA induziert wurde. In beiden 'Börner'-Proben konnten Hybridisierungssignale mit vier Subtilisin ähnliche Proteasen gefunden werden.

Weiterhin lieferten die Microarrayergebnisse Anhaltspunkte für die Aktivierung von Aspartat- und Metalloproteasen in den IES behandelten Wurzeln.

Bei der Aspartatprotease Phytapsin vermutet man z.B. eine Funktion in pflanzlichen PCD-Prozessen. So zeigt diese Protease eine erhöhte Expressionsrate in Tomatenpflanzen als Reaktion auf Verletzungen und Behandlungen mit MeJA und Systemin. Phytapsin ähnelt der Aspartatprotease Cathepsin D aus Säugern, die dort regulierend an PCD-Mechanismen beteiligt ist. In Pflanzen konnten zudem erhöhte mRNA-Level von Aspartatproteasen während der PCD bei der Seneszenz von Blättern und Blüten sowie bei der Bildung von Leitbündelelementen festgestellt werden [Beers et al., 2000].

Ähnliches gilt für die Metalloproteasen. Auch diese Enzyme und ihre Beteiligung am PCD sind im tierischen Organismus sehr viel besser untersucht. Sie scheinen dort während des apoptotischen Vorgangs an der Umstrukturierung der Membran beteiligt zu sein. In Pflanzen geht man bei diesen Proteasen von einem regulierenden Einfluss auf Wachstums- und Entwicklungsprozesse sowie auf PCD- und Pathogenabwehrmechanismen aus [Beers et al, 2000; Schaller, 2004].

Eine Schlüsselfunktion im PCD bei Tieren fällt den Cysteinproteasen zu. Eine der wichtigsten Gruppen dieser Enzymfamilie ist die der Caspasen. In Tieren induzieren PCD-Signale die

Selbstprozessierung eines inaktiven Caspasezymogens. Diese irreversible Aktivierung setzt eine proteolytische Kaskade in Gang. Die zahlreichen Enzyme, die daraufhin aktiviert werden, führen zur Degradierung zellulärer Komponenten und schließlich zum Zelltod. In Pflanzen gibt es bisher noch keine eindeutigen Beweise für das Vorhandensein entsprechender, den tierischen Caspasen homologen Cysteinproteasen [Lam und del Pozo, 2000; Sanmartín et al., 2005; Schaller, 2004]. Die Tatsache, dass es jedoch möglich ist, PCD in Pflanzen mit Caspaseinhibitoren zu blockieren, deutet auf die Aktivierung Caspase ähnlicher Enzyme hin. Mögliche Kandidaten hierfür sind die in Pflanzen gefundenen *vacuolar processing enzymes* und Metacaspasen. Aus beiden Gruppen konnten Enzyme in Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen gefunden werden, die eine erhöhte Aktivität in PCD-Prozessen der Pflanzenentwicklung und auch der Pathogenabwehr zeigen. Zudem konnte in Pilz infizierten Haferpflanzen eine Subtilisin ähnliche Serinprotease gefunden werden, die ebenfalls eine den Caspasen vergleichbare Aktivität aufweist [Sanmartín et al., 2005].

Neben den Caspase ähnlichen Enzymen stehen in Pflanzen noch weitere Cysteinproteasen im Verdacht PCD zu regulieren. So konnten Krüger et al. (2002) in Tomatenpflanzen eine Cysteinprotease, die Rcr3, mit Ähnlichkeiten zur Klasse der Papaine nachweisen. Nur unter Mithilfe der Rcr3-Protease ist es dem R-Genprodukt Cf2 aus der Tomate möglich, das Avr2-Genprodukt aus dem Pilz *Cladosporium fulvum* zu erkennen und eine Resistenzreaktion unter Ausbildung einer HR in der Pflanze zu induzieren. Offensichtlich ermöglicht erst die Cysteinprotease die erfolgreiche Bindung von Avr2 durch Cf2 und somit die Resistenzreaktion.

Untersuchungen an Zellen von Mäusen haben zudem gezeigt, dass die lysosomale Cysteinprotease Cathepsin B in der Lage ist, PCD zu induzieren ohne die Mithilfe von Caspasen. Diese Caspase unabhängige PCD-Aktivierung wird als Backupmechanismus zur Caspase abhängigen PCD-Aktivierung verstanden und zeigt die gleichen morphologischen und biochemischen Charakteristika. Der genaue Ablauf dieses Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt [Liu et al., 2004]. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf die Expression einer dem Cathepsin B ähnlichen Cysteinprotease in der 2,5-h-Probe gefunden werden. Möglicherweise setzt eine solche Cysteinprotease in 'Börner' eine Caspase unabhängige PCD-Aktivierung in Gang.

Es ist noch nicht bekannt, welche Reaktionen bei der Aktivierung des PCD durch Cysteinproteasen ablaufen. Solomon et al. (1999) vermuten nach Untersuchungen an Zellen der Sojabohne einen Zusammenhang mit ROS, wie sie beim *oxidative burst* entstehen (siehe Kapitel 4.1.3.9, *oxidative burst*).

4.1.3.6 Auxin und Wachstums assoziierte Gene

Im Hinblick auf eine mögliche zentrale Rolle der IES in der HR-Induktion bei 'Börner' sind die mit dem Hormon assoziierten bzw. durch das Hormon regulierten Gene von besonderem Interesse. In den vorangegangenen Kapiteln konnte bereits gezeigt werden, dass in den IES behandelten 'Börner'-Wurzeln offensichtlich Reaktionen induziert wurden, die direkt oder indirekt unter der Kontrolle des Hormons stehen. Mit Hilfe der Microarray- und Sequenzierungsergebnisse konnten jedoch Hinweise auf weitere Gene gefunden werden, die in einem direkten Zusammenhang mit dem Auxinmetabolismus und -transport sowie der Auxin regulierten Genexpression stehen.

Auxinsynthese

Die IES-Synthese kann über eine Reihe verschiedener Wege erfolgen, deren Komponenten nicht alle im Detail bekannt sind. Man unterscheidet generell zwischen zwei Formen der IES-Synthese. Zum einen Tryptophan (Trp) abhängige Synthesewege, die über unterschiedliche Intermediate IES aus Trp synthetisieren und zum anderen Trp unabhängige Wege, die IES ausgehend von Indol-3-Glycerol bzw. Indol synthetisieren. Als Beispiel für eine Trp abhängige IES-Synthese ist der Tryptamin (TAM)-Weg zu nennen. Dabei konvertiert die Trp-Decarboxylase Trp zu TAM. Mit Hilfe einer Flavonmonooxygenase aus der YUCCA-Familie wird dann aus TAM N-Hydroxyl-TAM synthetisiert. Bisher unbekannte Enzyme katalysieren die weiteren Schritte über die Intermediate Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) und Indol-3-Acetaldehyd bis hin zur IES.

Ausgehend von IAOx kann ein zweiter Syntheseweg erfolgen, der sog. IAOx-Weg. Dabei wird zuvor Trp durch die P450 Monooxygenasen CYP79B2 und CYP79B3 zu IAOx oxidiert. Dieses wiederum wird über eine zweite P450 Monooxygenase, die CYP83B1, zu IAOx-N-Oxid umgewandelt. Dieser Schritt führt weiter zur Bildung von Indole-3-Methylglucosinolat, das über Indol-3-Acetonitril von Nitrilasen zu IES hydrolysiert wird [Woodward und Bartel, 2005].

Mit der Microarrayanalyse konnten Anhaltspunkte für eine mögliche Aktivierung dieser beiden Trp abhängigen IES-Synthesewege gefunden werden. So zeigten sich Hybridisierungssignale mit einem *yucca*-Gen und der P450 Monooxygenase CYP83A1, die eine enge Verwandtschaft mit CYP83B1 aufweist. CYP83A1 besitzt zu IAOx unter normalen Umständen eine sehr niedrige Affinität. Liegt das IAOx allerdings in besonders hoher

Konzentration vor, kann ausgehend von diesem Substrat eine IES-Bildung auch durch das CYP83A1 erfolgen [Bak und Feyereisen, 2001].

Die Trp unabhängige IES-Synthese ist notwendig für die Aufrechterhaltung des basalen IES-Levels in der Pflanze und wird durch eine Zufuhr von exogenem Auxin negativ reguliert. Werden dagegen sehr hohe IES-Konzentrationen notwendig, z. B. bei Verletzungen oder anderen Stresssituationen, dann erfolgt eine Aktivierung Trp abhängiger Synthesewege [Woodward und Bartel, 2005]. Ebenso könnte es auch in den behandelten 'Börner'-Proben zu einem Wechsel von einem Trp unabhängigen zu einem Trp abhängigen Syntheseweg gekommen sein; möglicherweise in Verbindung mit einer erhöhten IES-Akkumulation.

Auxinkonjugate

Für eine normale Entwicklung der Pflanze ist die Regulation der IES-Konzentration im Gewebe von großer Bedeutung. Diese Regulation kann über die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Biosynthese des Hormons erfolgen oder oxidative IES-Degradierungsprozesse umfassen. Eine weitere Möglichkeit ist die Inaktivierung der IES durch die Bildung von Konjugaten mit Glucose, AS und Peptiden. In *Arabidopsis* liegen etwa 90 % der IES als Konjugate mit AS, ca. 9 % als Konjugate mit Glucose und nur etwa 1 % als freie, aktive IES vor. Die Funktion dieser Konjugate liegt u. a. in der Speicherung, dem Transport und der Kompartimentierung der IES. Sie tragen so zum Gleichgewicht des Hormons im Gewebe bei und werden besonders durch eine Zufuhr exogener IES gebildet [Staswick et al., 2005; Woodward und Bartel, 2005]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass mit beiden IES behandelten Proben ein Hybridisierungssignal mit einer IES/AS-Synthase gefunden wurde. Es handelt sich dabei um ein Gen aus der GH3-Familie mit Ähnlichkeiten zum *GH3.1*. Die Expression der GH3-Gene wird sehr schnell nach exogener Zufuhr von Auxin induziert. Untersuchungen an *Arabidopsis*-Keimlingen haben gezeigt, dass eine Auxinbehandlung die Expressionsrate des *GH3.1* und weiterer GH3-Gene innerhalb weniger Stunden auf mehr als das 10fache ansteigen lässt. Das Enzym katalysiert die Bildung von IES/AS-Konjugaten und trägt damit entscheidend zum IES-Gleichgewicht im Gewebe bei [Staswick et al., 2005; Woodward und Bartel, 2005].

Benötigt die Pflanze größere Mengen aktive IES, kann sie das Hormon durch Hydrolasen aus den Konjugatverbindungen wieder freisetzen. Insbesondere die Verbindungen IES/Alanin und IES/Leucin tragen durch Hydrolyse zum Pool an freier IES bei. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf die Expression einer IES/Konjugat-Hydrolase in der 2,5-h-Probe gefunden werden. Es handelt sich dabei um die ILL5, die IES aus der Verbindung

mit Alanin freisetzt [Davies et al., 1999]. Weiterhin konnte mit beiden Proben ein Hybridisierungssignal mit dem *IAR1*-Gen gefunden werden. Man geht davon aus, dass das IAR1-Protein an der Regulation des IES-Gleichgewichts beteiligt ist, indem es Hydrolasen inhibierende Metallionen, wie Zink und Kupfer, bindet und exportiert [Lasswell et al., 2000].

Eine Behandlung der 'Börner'-Wurzeln mit IES scheint somit den Metabolismus des Hormons zu beeinflussen. Eine mögliche Aktivierung Trp abhängiger Synthesewege und einer IES/Konjugat-Hydrolase deutet auf eine Verstärkung des IES-Signals im Gewebe hin. Möglicherweise ist eine besonders hohe Konzentration an freier und aktiver IES notwendig, um in 'Börner' die HR auszulösen. Auf der anderen Seite deutet die mögliche Aktivierung einer IES/AS-Synthase auf eine gleichzeitige Negativregulation des IES-Levels im behandelten Gewebe hin. Die vorliegenden Ergebnisse lassen daher keinen eindeutigen Rückschluss darüber zu, ob sich die exogene Zufuhr des Hormons in erster Linie positiv oder negativ auf die IES-Synthese und -Konzentration in der Wurzel auswirkt.

Auxintransport

Die zugeführte IES scheint außerdem den Auxintransport zu stimulieren. Neben dem Transport von IES durch das Phloem, wird das Hormon über das Parenchym von Zelle zu Zelle transportiert. In der Regel ist die höchste IES-Konzentration in den Sprossspitzen zu finden. Von dort aus erfolgt ein polarer, basipetal orientierter und energieabhängiger Transport. Daran beteiligt sind Transmembranproteine, die den Influx und Efflux des Hormons durch die Plasmamembran bei gleichzeitigem ATP abhängigem H^+ -Symport ermöglichen. Hinweise auf die differenzielle Expression von H^+ -ATPasen konnten in beiden Proben gefunden werden (siehe Kapitel 4.1.3.4). Der IES-Efflux erfolgt über PIN-Proteine, einer Multigenfamilie von sog. *auxin efflux carriers*, die zusammen mit *multidrug-resistance* (MDR)-Proteinen einen Efflux-Komplex bilden [Blakeslee et al., 2005; Woodward und Bartel, 2005]. Hybridisierungssignale mit einem *auxin efflux carrier* sowie mit einem MDR-Gen konnten mit beiden 'Börner'-Proben gefunden werden.

Auxinrezeptoren

IES-Synthese, -Metabolismus und -Transport garantieren die optimale IES-Konzentration, um Auxin regulierte Prozesse in Gang zu setzen und zu kontrollieren. Damit allerdings solche Prozesse aktiviert werden können, muss das Hormon zunächst über ein Rezeptormolekül

durch die Zelle erkannt werden. Bisher ist nur sehr wenig über mögliche Auxinrezeptoren bekannt, die das Hormon spezifisch binden und Auxin gesteuerte Reaktionen vermitteln. Wie bereits in Kapitel 4.1.3.5 (Ubiquitin abhängige Proteolyse) beschrieben, geht man bei dem F-Box-Protein TIR1 von einem möglichen Auxinrezeptor aus, der mit dem Hormon direkt interagiert und damit den SCF^{TIR1}-Komplex aktiviert. Ein weiteres Protein bei dem man eine Funktion als Auxinrezeptor vermutet, ist das in der Plasmamembran lokalisierte *auxin-binding protein 1* (ABP1). Ein Hybridisierungssignal mit dem *ABP1*-Gen auf dem Chip konnte mit der 2,5-h-Probe gefunden werden. Das ABP1-Protein ist insbesondere in embryonalem Gewebe aktiv und ist dort in die Auxin regulierte Zellelongation und Zellteilung sowie in die Festlegung von Zell- und Embryopolarität involviert. Da das ABP1 kaum Ähnlichkeiten mit bisher untersuchten Rezeptoren aufweist, ist nicht bekannt wie das Protein nach einer Bindung von Auxinen das Signal weiterleitet. Sehr wahrscheinlich ist das ABP1 nicht nur in Embryonen aktiv, sondern auch in meristematischen Geweben adulter Pflanzen [Chen et al., 2001], wie z.B. im Streckungszonenbereich der Wurzeln. Es ist denkbar, dass die IES-Behandlung der 'Börner'-Wurzeln zu einer erhöhten Expression eines ABP1 vergleichbaren Rezeptors führte. Es ist unter diesen Umständen davon auszugehen, dass dieser ABP1-Rezeptor in den Wurzeln Auxin regulierte Prozesse initiiert, die vielmehr mit dem Zellwachstum als mit einer Resistenzreaktion verbunden sind. Da jedoch in Pflanzen eine Reihe Auxin bedingter Signalwege existieren, geht man von weiteren Auxinrezeptoren aus [Jones et al., 1998]. Es ist daher ebenso möglich, dass in dem IES behandelten 'Börner'-Gewebe ein ABP1 ähnlicher Rezeptor aktiviert wurde, der direkt oder indirekt an der Induktion der HR und weiterer Abwehrreaktionen beteiligt ist.

Auxin gesteuerte Genexpression

Zu den sog. *early auxin response genes*, die sehr schnell nach einer Auxinzufuhr induziert werden, gehören drei Genfamilien. Dazu zählen die *small Auxin up RNAs* (SAURs), die GH3- und die AUX/IAA-Gene.

SAURs gelten als Marker für eine frühe Auxinantwort. Da es nach einer Auxinbehandlung innerhalb weniger Minuten zu einer Akkumulation von SAUR-mRNAs kommt, scheinen diese Gene in einer sehr frühen Phase der IES-Signaltransduktion zu wirken [Nakamura et al., 2003; Woodward und Bartel, 2005]. Weiterhin geht man von einer Vernetzung des Ca²⁺- und Auxinsignalweges über SAURs und CaMs (siehe Kapitel 4.1.3.1, Calcium) aus [Yang und Poovaiah, 2000]. Insgesamt konnten Hybridisierungssignale mit drei SAUR ähnlichen Genen auf dem Chip gefunden werden.

Wie bereits erwähnt, kodieren einige der GH3-Gene für Auxin induzierte IES/AS-Synthasen, wie die GH3.1 [Staswick et al., 2005; Woodward und Bartel, 2005]. Anhaltspunkte für die Aktivierung eines weiteren GH3-Gens, *At5g13320*, mit unbekannter Funktion konnten in beiden Proben gefunden werden. Ebenso scheint es sich bei der aus der 4,5-h-Probe isolierten 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES4,5h-149 um ein Auxin induziertes GH3-Gen zu handeln. Auf Nukleotidebene zeigte die Sequenz laut Datenbankanalyse Übereinstimmungen mit einem GH3-Gen, *CcGH3*, aus *Capsicum chinense*. Das Gen wird durch Auxin und Ethylen reguliert und spielt eine Rolle in der Fruchtreifung [Liu et al., 2005].

Die Funktion der kurzlebigen und labilen AUX/IAA-Proteine als Repressoren Auxin induzierter Genexpression wurde bereits in Kapitel 4.1.3.5 (Ubiquitin abhängige Proteolyse) geschildert. AUX/IAA-Proteine binden und inhibieren ARF-Proteine, die als TFs die Auxin induzierte Genexpression regulieren. Nach einer Auxinzufuhr erfolgt eine Ubiquitin abhängige Proteolyse der AUX/IAA-Proteine, die zu einer Aktivierung der ARFs und somit zur Auxin induzierten Genexpression führt. Da AUX/IAA-Gene ebenfalls über ARFs durch Auxin induziert werden, liegt eine komplexe Selbstregulation dieser Proteine vor, die damit eine vorübergehende, zeitlich begrenzte Auxinantwort garantiert [Woodward und Bartel, 2005].

Die Expressionsregulation durch ARFs erfolgt über die Bindung an sog. *auxin-responsive elements* (AuxRE), die in den Promotoren Auxin regulierter Gene zu finden sind. Neben einer positiven Regulation dieser Gene, können ARFs auch als Repressoren fungieren. Mit beiden IES behandelten 'Börner'-Proben konnte ein Hybridisierungssignal mit einem ARF-Gen auf dem Chip gefunden werden. Es handelt sich dabei um das *ARF10*. Aus *Arabidopsis* sind bisher 23 verschiedene ARF-Gene bekannt. Die wenigen davon charakterisierten Gene sind in embryonale Entwicklungsprozesse und in differenzielles Zellwachstum involviert. So haben Untersuchungen an *Arabidopsis* gezeigt, dass das ARF10-Protein eine Schlüsselfunktion in der Wurzelentwicklung bei der Ausbildung der Kalyptra besitzt [Wang et al, 2005].

Auxin induzierte Wachstumsgene

Da die IES in erster Linie Wachstums- und Entwicklungsprozesse reguliert, ist nachvollziehbar, dass mit Hilfe der Microarrayanalyse Hinweise auf weitere Wachstumsgene gefunden wurden. So zeigten sich Hybridisierungssignale mit Wachstums regulierenden TFs, wie z.B. dem Auxin induzierten NAC1 (siehe Kapitel 4.1.3.2, Transkriptionsfaktoren).

Weiterhin konnten mit der Microarrayanalyse Anhaltspunkte für die Aktivierung eines Gens aus der AIR (*auxin-induced in root cultures*)-Familie gefunden werden. Es handelt sich dabei

um das *AIR9*. Untersuchungen an *Arabidopsis*-Wurzeln haben gezeigt, dass die Expression des *AIR9* und weiterer AIR-Gene durch eine exogene Auxinzufuhr aktiviert wird. Die genaue Funktion des AIR9-Proteins ist nicht bekannt. Man geht davon aus, dass AIRs an der Bildung von Lateralwurzeln beteiligt sind [Neuteboom et al., 1999].

Hybridisierungssignale konnten außerdem mit zwei Genen aus der sog. *lateral organ boundarie (LOB) domain*-Familie gefunden werden. Es wird vermutet, dass einige Proteine aus dieser Familie eine Rolle in der Organentwicklung spielen. So konnten Liu et al. (2005) aus Reispflanzen das Auxin induzierte *adventitious rootless 1 (ARL1)*-Gen isolieren, das zur LOB-Familie gehört und als möglicher TF an der Bildung von Adventivwurzeln beteiligt ist.

Bei der isolierten 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-52 scheint es sich ebenfalls um ein Auxin induziertes Gen mit einer ähnlichen Funktion zu handeln. Die 'Börner'-Sequenz zeigte auf Nukleotidebene die beste Übereinstimmung mit dem *adventitious rooting related oxygenase 1 (ARRO1)*-Gen aus *Malus domestica*. Es handelt sich dabei um eine 2-Oxosäure abhängige Dioxygenase (2-ODD), die nur eine geringe Sequenzidentität mit andern Dioxygenasen aufweist und daher als neue Klasse in dieser Enzymfamilie definiert wird. Untersuchungen an Apfelkeimlingen haben gezeigt, dass eine Auxinbehandlung der Wurzeln zu einer Aktivierung der *ARRO1*-Genexpression führt [Butler und Gallagher, 2000].

Regulation des Zellzyklus durch Auxin

Die Regulation von Wachstumsprozessen durch Hormone kann auch über eine direkte transkriptionelle Kontrolle des Zellzyklus erfolgen. So aktivieren Auxine Cyclin abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases* – CDKs) und hemmen CDK inhibierende Proteine, die sog. *kip-related proteins* (KRPs). CDKs gelten zusammen mit ihren interagierenden Cyclinen als Hauptregulatoren des eukaryotischen Zellzyklus. Sie kontrollieren den Phasenübergang G₁/S sowie G₂/M, indem sie über ihre Kinaseaktivität eine Reihe Zellzyklus assoziierter Proteine regulieren. Eine stringente Kontrolle dieser regulatorischen Proteine erfolgt auf transkriptioneller Ebene sowie durch Proteolyse und inhibierende Faktoren, wie z.B. durch die KRPs, die den CDK/Cyclin-Komplex deaktivieren. Durch die transkriptionelle Regulation von CDK- und KRP-Genen tragen Auxine dazu bei, dass sich nicht mehr teilende Zellen über den Restriktionspunkt hinaus in die S-Phase und somit in einen erneuten Zellzyklus eintreten können. Dieser Prozess ist notwendig für die Auxin induzierte Bildung von Lateralwurzeln [Himanen et al., 2002; Tréhin et al., 1998]. Sowohl mit zwei CDK-Genen als auch mit einem Cyclingen konnten Hybridisierungssignale auf dem Chip gefunden werden.

Zusätzlich konnten auch mit den Sequenzierungsergebnissen Hinweise auf die Aktivierung von Zellteilungsprozessen im IES behandelten Gewebe gefunden werden. So zeigte die isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-163 auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einem Gen aus der Sojapflanze, das für ein Dynamamin ähnliches Protein (DRP – *dynamine-related protein*) kodiert. DRPs umfassen eine große Gruppe an GTP bindenden Proteinen. Sie sind während der Zellteilung von zentraler Bedeutung bei der Ausbildung der Plasmamembran an der Zellplatte. Hinzu kommt eine Funktion der DRPs bei der Teilung von Zellorganellen, wie Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen [Verma und Hong, 2005].

Ebenfalls an der Ausbildung der Zellplatte beteiligt sind Prozesse der Exo- und Endocytose [Verma und Hong, 2005]. In diesem Zusammenhang konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Hybridisierungssignale mit zwei Genen des Exocyst70-Komplexes gefunden werden.

Auxin und die Aktivierung von Nodulingenen

Eine Regulation durch Auxine vermutet man auch zunehmend für die Expression von Nodulingenen. Diese Gene werden in Wurzelknöllchen exprimiert, die bei einer symbiotischen Wechselwirkung zwischen Leguminosen und den Stickstoff (N_2) fixierenden Knöllchenbakterien (Rhizobien) gebildet werden [Crespi und Gálvez, 2000; Gualtieri und Bisseling, 2000]. Man unterscheidet dabei zwischen den sog. *early nodulin genes* (ENOD), deren Expression noch vor der eigentlichen N_2 -Fixierung erfolgt und den *late nodulin genes*, die erst während oder nach dem Fixierungsprozess aktiv sind [Crespi und Gálvez, 2000]. Man ist zunächst von einer spezifischen Aktivierung der Noduline ausschließlich im Knöllchengewebe ausgegangen. Untersuchungen des Expressionsmusters der Noduline haben jedoch gezeigt, dass diese Gene auch in anderen Gewebebereichen aktiv sind und zudem vergleichbare Gene in Nicht-Leguminosen zu finden sind. Man geht daher bei den Nodulinen von einer ursprünglichen Funktion in anderen pflanzlichen Prozessen aus. Unter den Genprodukten befinden sich u. a. Zellwand assoziierte Prolin und Glycin reiche Proteine sowie Extensine und Peroxidasen. Dazu gehören außerdem Lektine, Enzyme des Phenylpropanoidweges, Abwehrproteine, wie Chalkonsynthasen und Chitinasen sowie Proteine zur N_2 -Fixierung und Assimilation [Crespi und Gálvez, 2000]. Mit den 'Börner'-Proben konnten Hybridisierungssignale mit insgesamt sechs Nodulin ähnlichen Genen auf dem Chip gefunden werden.

Insbesondere bei den Genen der frühen Knöllchenorganogenese wird eine Regulation durch Auxine angenommen. So kann z.B. bei der Knöllchenbildung in den betroffenen Regionen

eine erhöhte Auxinkonzentration festgestellt werden, die möglicherweise den auslösenden Faktor zur Bildung dieser Organstrukturen darstellt. Untersuchungen an der Leguminose *Medicago sativa* haben gezeigt, dass die Expression einiger Nodulingene durch eine Auxinbehandlung positiv reguliert wird [Jiménez-Zurdo et al., 2000]. Ebenso zeigt eine Subtilisinprotease, aktiviert während der Knöllchenbildung in *Casuarina* und *Alnus*, Ähnlichkeiten zu dem AIR3-Protein, das in *Arabidopsis* an der Lateralwurzelbildung beteiligt ist und durch Auxin induziert wird. Busov et al. (2004) konnten zudem aus *Pinus taeda* L. das Gen *5NG4* isolieren, welches Übereinstimmungen mit dem Nodulingen *MtN21* aus *Medicago truncatula* zeigt. Die Expression des *5NG4* kann durch Auxin stark stimuliert werden und es wird vermutet, dass das Genprodukt bei der Bildung von Adventivwurzeln eine Rolle spielt. Es ist daher anzunehmen, dass die in Leguminosen vorkommenden Noduline, insbesondere die ENOD-Gene, ursprünglich eine Funktion in Wachstums- und Entwicklungsprozessen der Pflanzen erfüllen.

Auch mit den 'Börner'-Proben konnten Hybridisierungssignale mit zwei *MtN21* ähnlichen Genen sowie mit einem *ENOD8* und einem *ENOD18* gefunden werden. Eine cDNA-Sequenz mit Homologien zum *ENOD18* konnte bereits in vorangegangenen cDNA-Subtraktionsversuchen mit IES behandelten 'Börner'-Wurzeln isoliert werden [Dietrich, 2002]. Die genaue Aufgabe des ENOD18-Proteins in der Knöllchenbildung ist nicht bekannt. Es wird vermutet, dass das Protein als ATPase fungiert [Hohnjec et al., 2000].

Nodulin ähnliche Gene scheinen auch bei der Bildung Pathogen induzierter Gallen von Bedeutung zu sein. So konnten Favery et al. (2002) die Expression der beiden Nodulingene *ENOD40* und *CCS52* in *M. truncatula* sowohl in der Knöllchenorganogenese, ausgelöst durch das Bakterium *Sinorhizobium meliloti*, als auch bei der Bildung von Wurzelgallen, verursacht durch die Nematodenart *Meloidogyne incognita* feststellen. Es hat sich zudem gezeigt, dass eine Überexpression des *ENOD40* in *M. incognita* infizierten Pflanzen zu einer verstärkten Gallenbildung führt. Diese Ergebnisse deuten auf übereinstimmende Entwicklungsprozesse Nematoden induzierter Gallen und der N₂ fixierenden Wurzelknöllchen hin. Es ist daher vorstellbar, dass auch in Reblaus induzierten Gallen und Nodositäten Nodulin ähnliche Gene eine Rolle spielen. Differenziell exprimiert vorliegende Noduline könnten auf die Aktivierung erster Prozesse zur Nodositätenbildung im IES behandelten Gewebe hindeuten. Zwar sind diese Gewebeveränderungen charakteristisch für anfällige und tolerante Reben, jedoch konnte El-Nady (2001) bei 'Börner' nach einer Reblausinfektion älterer, bereits entfalteter Blätter eine unvollständige Gallenbildung feststellen (siehe Kapitel 1.3). Demnach besitzt 'Börner' das Potenzial zur Bildung IES induzierter Wachstumsanomalien. Jedoch scheint sich in der

Regel je nach Alter und Art des befallenen Gewebes früher oder später die Resistenzreaktion durchzusetzen. Ebenso ist es möglich, dass die IES-Behandlung der 'Börner'-Wurzeln neben Abwehrmechanismen auch Reaktionen der Nodositätenbildung in Gang gesetzt haben.

Die diskutierten Ergebnisse machen deutlich, dass offensichtlich in den IES behandelten Wurzeln eine Auxin induzierte Antwort ausgelöst wurde. Dafür sprechen insbesondere die SAUR-Gene, die als Marker für eine frühe Auxinantwort gelten. Inwieweit die gefundenen Gene ausschließlich an Wachstumsprozessen beteiligt sind und/oder in den Resistenzmechanismus involviert sind, kann mit den vorliegenden Ergebnissen noch nicht vollständig geklärt werden.

4.1.3.7 Photosynthese, Chloroplasten und Licht abhängige Prozesse

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf die Aktivierung Chloroplasten, Photosynthese und Licht abhängiger Gene gefunden werden. Diese Ergebnisse stehen zunächst im Widerspruch mit dem im Dunkeln kultivierten Wurzelgewebe, das in der Regel keine Chloroplasten enthalten sollte, sondern lediglich photosynthetisch inaktive Leukoplasten. Diese Plastidenform ist Ort der Lipidsynthese, Nitrataassimilation und kann in Form von Amyloplasten der Speicherung von Stärke dienen [Heldt, 2003]. Sollte es dennoch zu einer Aktivierung Chloroplasten und Licht assoziierte Gene im IES behandelten Gewebe gekommen sein, so ist dies möglicherweise auf die Versuchsbedingungen zurückzuführen. Die IES-Behandlung und Isolierung der im Dunkeln kultivierten 'Börner'-Wurzeln erfolgte unter Lichteinfluss. Auch das unbehandelte Wurzelgewebe wurde Licht ausgesetzt, jedoch nur für die kurze Zeitspanne der Isolierung, da bei diesem Gewebe keine IES-Behandlung vorgenommen wurde.

Im meristematischen Gewebe der Wurzeln liegen Vorläufer der Plastiden vor, sog. Proplastiden, die sich je nach Gewebe und Lichteinfluss in die unterschiedlichen Plastidenformen differenzieren [Heldt, 2003]. Es ist in Betracht zu ziehen, dass die Belichtung im IES behandelten Gewebe erste Differenzierungsschritte der Proplastiden zu Chloroplasten und der damit verbundenen Expression charakteristischer Gene bewirkt hat.

Nicht alle gefundenen Chloroplastengene sollen an dieser Stelle im Einzelnen diskutiert werden. Lediglich drei Gene dieser Kategorie zeigen interessante Eigenschaften, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Resistenzreaktion stehen.

Bei dem Versuch ein zum *hypersensitive-induced response* (HIR)-Protein (*At5g51570*) homologes Gen in der 2,5-h-Probe mit spezifischen Primern zu amplifizieren, konnte ein

cDNA-Fragment isoliert und sequenziert werden (Fag-B-IES2,5h-K6-M7), das laut Datenbankanalyse Ähnlichkeiten zum Phytochrom A (PhyA) aus *Populus* zeigte. PhyA gehört zu den Photorezeptoren, die Änderungen des Lichts verschiedener Wellenlänge in Intensität, Richtung und Dauer erkennen und diese Information in Form eines Signals weitergeben. Man geht davon aus, dass diese Signalweiterleitung auf der Ser/Thr-Kinaseaktivität des PhyA basiert. Mit der Funktion als Photorezeptor und Signalübermittler ist PhyA entscheidend beteiligt an der Photomorphogenese von Pflanzen [Heldt, 2003; Wang und Deng, 2003]. Hinweise auf eine weitere Komponente des PhyA-Signalweges konnte durch die Microarrayanalyse in beiden Proben gefunden werden. Es handelt sich dabei um das Gen *phytochrome A signal transduction 1 (PAT1)*. Dieser PhyA interagierende Partner gehört zur GRAS-Proteinfamilie. Mit einer Leucin reichen Domäne verfügt PAT1 über die Möglichkeit zur Protein-Protein-Interaktion und weist zudem eine Phosphorylierungsregion auf. Mit diesen Funktionen wirkt PAT1 als positiver Regulator des PhyA-Signalweges [Bolle et al., 2000]. Als ein Ziel dieses Signaltransduktionsweges gelten u. a. die AUX/IAA-Proteine. Colón-Carmona et al. (2000) konnten an *Arabidopsis* und *Pisum sativum* zeigen, dass PhyA AUX/IAA-Proteine phosphoryliert. Möglicherweise leitet dieser Schritt die Degradierung der AUX/IAA-Proteine über einen Ub/26S-Komplex und somit die Aktivierung Auxin induzierter Gene ein [Kepinski und Leyser, 2002].

Weiterhin konnten Versuche an *Arabidopsis*, Mais- und Tomatenpflanzen zeigen, dass Licht die Expression von *PR*-Genen und die Ausbildung SA abhängiger HR beeinflusst. Offensichtlich erhöht Phy die Empfindlichkeit der Pflanze gegenüber SA. Eine mögliche Rolle spielen dabei der Photosyntheseapparat der Chloroplasten und eine damit verbundene Bildung von ROS [Genoud et al., 2002]. Diese Untersuchungen lassen auf eine enge Verbindung des Licht, Hormon und Abwehr assoziierten Signalnetzwerkes schließen, sodass eine Beteiligung des PhyA-Signalweges an der Resistenzreaktion in 'Börner' möglich erscheint.

Mit der Microarrayanalyse konnten in beiden Proben Anhaltspunkte für ein weiteres Licht abhängiges Gen, ein *early light-induced protein (ELIP)*, gefunden werden. Mit spezifischen Primern konnte aus der 2,5-h-Probe ein entsprechendes ELIP-Gen amplifiziert und sequenziert werden (Fag-B-IES2,5h-K13-M4). ELIPs sind Chlorophyll und Carotenoide bindende Proteine, die bei hoher Lichteinstrahlung aktiviert werden. Man geht davon aus, dass die Lichtstress induzierten ELIPs Chlorophyll und Carotenoide vor photooxidativen Schäden schützen, die z.B. durch ROS entstehen können [Hutin et al., 2003]. Eine erhöhte ELIP-Aktivität konnte zudem als Antwort auf weitere Stresssituationen, wie UV-A,

Temperatur und Trockenheit, beobachtet werden. Eine gesteigerte Expression eines ELIP-Gens konnte außerdem im Zusammenhang mit der Blattseneszenz in Tabakpflanzen nachgewiesen werden [Binyamin et al., 2001]. In der HR könnte ein solches ELIP möglicherweise das umliegende gesunde Gewebe vor oxidativen Schäden durch ROS schützen.

Inwieweit jedoch Licht und Chloroplasten abhängige Prozesse in der Resistenzreaktion der IES behandelten 'Börner'-Wurzeln tatsächlich eine Rolle spielen, müssen weiterführende Versuche klären.

4.1.3.8 Zellwand und Cytoskelett

Umstrukturierungen der Zellwand

Die Zellwand stellt im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr eine wichtige physikalische Barriere dar. Ihr Hauptbestandteil ist das Polymer Cellulose, das aus β -1,4-glycosidisch gebundenen D-Glucosemolekülen besteht. Die Celluloseketten liegen in der Zellwand als Mikrofibrillen vor und bilden dort eine Kristall ähnliche Textur aus. Eingebettet ist dieses Grundgerüst in eine Matrix bestehend aus Hemicellulosen, Pectin und Glycoproteinen [Heldt, 2003; Vorwerk et al., 2004]. Abiotische und biotische Einflüsse, wie z.B. ein Pathogenbefall, können sehr schnell zu Änderungen dieser Grundstruktur führen, die in einer erhöhten Festigkeit und Widerstandsfähigkeit der Zellwand resultieren. So verhindern diese strukturellen Veränderungen die weitere Penetration des Pathogens in das pflanzliche Gewebe und dämmen die Ausbreitung schädlicher Substanzen ein. Zudem kann durch eine verstärkte Impermeabilität der Zellwände der Zufluss von Nährstoffen und Wasser aus gesunden in infizierte Geweberegionen unterbunden und dem Pathogen damit die Lebensgrundlage entzogen werden. Zellwandmodifikationen ermöglichen somit eine Abgrenzung und Isolierung infizierter Geweberegionen um so die Ausbreitung des Pathogens und die damit verbundenen Schäden, wie z.B. Sekundärinfektionen, in Grenzen zu halten [Buchanan, 2000; Agrios, 1988].

Eine solche Modifikation ist die Einlagerung von Callose in die Zellwand. Es handelt sich dabei um ein β -1,3-Glucan, das u. a. als Reaktion auf Verletzungen und einen erhöhten cytosolischen Ca^{2+} -Spiegel aktiviert wird. Es dient als Abdichtungsmaterial zur Versiegelung des beschädigten Gewebes. Katalysiert wird die Bildung von Callose durch das Enzym Callosesynthase [Heldt, 2003]. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten in beiden 'Börner'-Proben Hinweise auf die transkriptionelle Aktivierung einer Callosesynthase gefunden

werden. Ebenso wird die Beteiligung von Cellulosesynthasen an der Callosebildung vermutet [Dhugga, 2001]. Auch diesbezüglich konnten Hybridisierungssignale mit entsprechenden Genen auf dem Chip gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

Zu den Zellwandmodifikationen gehört außerdem das oxidative *cross-linking* Hydroxyprolin reicher Glycoproteine (HRGPs). Zu den HRGPs zählen u. a. Extensine und Arabinogalactane, die in der Regel gelöst vorliegen und in einer frühen Phase der Abwehr über ein *cross-linking* in eine unlösliche Form überführt werden. Katalysiert wird dieser Vorgang durch Peroxidasen in Gegenwart von H₂O₂, das auf Grund des *oxidative burst* in großen Mengen vorliegt (siehe Kapitel 4.1.3.9, *oxidative burst*). Das *cross-linking* der HRGPs erhöht die Festigkeit und Widerstandsfähigkeit der Zellwand und kann zunächst auch ohne eine *de novo* Synthese von HRGPs oder Peroxidasen erfolgen. In einer späteren Phase der Abwehr kann auch eine ansteigende Expressionsrate der HRGPs und der beteiligten Peroxidasen festgestellt werden [Brisson et al., 1994; Gaspar et al., 2001; Jackson et al., 2001] So konnten mit der Microarrayanalyse in beiden Proben Anhaltspunkte für die Expression von HRGPs und Peroxidasen gefunden werden.

Zudem zeigte die isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-90 auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit dem Glycoprotein EP1 aus der Karotte. Das segregierende EP1-Protein ist in ausgedehnten, nicht embryonalen Zellen zu finden und wird dort an der Zelloberfläche gebildet. Man geht davon aus, dass das Protein u. a. die Zellwandadhäsion verstärkt und damit die dicht gepackte Epidermisstruktur in ihrer Funktion als physikalische Barriere unterstützt [van Engelen et al., 1993].

Peroxidasen sind zusammen mit H₂O₂ zusätzlich an der Bildung von Lignin beteiligt. Dieses phenolische Polymer besteht aus den Monolignolen Cumaryl-, Sinapyl- und Coniferylalkohol, die aus dem Phenylpropanoidmetabolismus hervorgehen. Ein Schlüsselenzym bei der Bildung von Phenylpropanoiden ist die Cinnamoyl-CoA-Reduktase [Heldt, 2003; Ibrahim et al., 1998; Richter, 1996]. Ein Hybridisierungssignal konnte mit einem entsprechenden Gen gefunden werden.

Des Weiteren scheinen eine Ferrulat-5-Hydroxylase und zwei O-Methyltransferasen, die ebenfalls in der Ligninbiosynthese involviert sind, in den 'Börner'-Proben aktiviert worden zu sein. Diese Ergebnisse lassen auf einen Lignifizierungsprozess in den IES behandelten Gewebeproben schließen. Die Einlagerung von Lignin in die Zellwand ist ein charakteristischer Vorgang bei der Pathogenabwehr und verleiht der Pflanzenzelle eine besondere Stabilität und Widerstandsfähigkeit, führt allerdings auch zum Absterben der Zellen. Zusätzlich resultiert die Dimerisierung von Monolignolen in der Bildung sog.

Lignane, die als Abwehrsubstanzen hemmend auf das Wachstum von Pilzen und Bakterien wirken [Heldt, 2003; Ibrahim et al., 1998; Richter, 1996].

Ebenfalls aus dem Phenylpropanoidmetabolismus geht das Suberin hervor. Es handelt sich dabei um ein Polymer aus langkettigen Fettsäuren, Fettalkoholen, Hydroxyfettsäuren und Dicarbonsäuren. Einen hohen Gehalt an Suberin zeigen Korkzellen. Durch Auflagerungen von Suberin- und Wachsschichten werden die abgestorbenen Zellen des Korkgewebes undurchlässig für Gase und Wasser. El Nady (2002) konnte die Bildung von Korkzellen bei Reblaus infizierten 'Börner'-Wurzeln feststellen. Insbesondere im Kontaktbereich von nekrotisiertem und gesundem Gewebe wiesen die Wurzelzellen Suberineinlagerungen auf.

Direkte Hinweise auf die Bildung von Suberin konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse nicht gefunden werden, jedoch liegen Anhaltspunkte für die Aktivierung von Genen des Phenylpropanoidmetabolismus vor (siehe Kapitel 4.1.3.3, Sekundärmetabolismus).

Zu den weiteren Zellwandmodifikationen gehört die Hydrolyse von Zellwandbestandteilen. So scheint es sich laut Datenbankanalyse bei den isolierten 'Börner'-Sequenzen Fag-B-IES2,5h-11 und Fag-B-IES2,5h-80 um hydrolytische Enzyme mit einer solchen Funktion zu handeln. Fag-B-IES2,5h-80 zeigte auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einer α -L-Arabinofuranosidase aus dem Apfel. Dieses Enzym katalysiert die hydrolytische Freisetzung von L-Arabinose, welches Bestandteil diverser Zellwandkomponenten ist [Fulton und Cobbett, 2003]. Fag-B-IES2,5h-11 zeigte auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einer β -Galactosidase aus *Cicer aritenum*. Dieses Enzym ist an der Mobilisierung von Reservestoffen sowie am Metabolismus von Galactolipiden, Glycoproteinen und anderen Zellwandbestandteilen beteiligt. Es ist ebenfalls bekannt, dass β -Galactosidasen Zellwandkomponenten während der Seneszenz degradieren [Smith und Gross, 2000].

Die Microarray- und Sequenzierungsergebnisse lassen auf Veränderungen der Zellwandstruktur in den IES behandelten Geweben schließen. Möglicherweise sind diese Vorgänge Teil des Zelltodprozesses oder sie dienen der Isolierung des nekrotisierenden Gewebes, um so gesunde Bereiche vor weiteren Schäden zu bewahren.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass aktivierte Zellwandmodifikationen möglicherweise auch im Zusammenhang mit IES induzierten Zellwachstumsprozessen und nicht mit der Abwehrreaktion stehen.

Cytoskelett assoziierte Gene

Ebenfalls durch Wachstumsprozesse beeinflusst wird das Cytoskelett. Es handelt sich dabei um ein intrazelluläres Gerüst, das aus Faserproteinen besteht. Dazu zählen zum einen röhrenförmige Mikrotubuli, die mit Motorproteinen, wie Dynein und Kinesin, assoziiert vorliegen, und zum anderen handelt es sich um Actinmikrofilamente [Heldt, 2003; Volkmann und Baluska, 1999]. Hinweise auf die Expression von Genen, die im Zusammenhang mit dem Cytoskelett stehen konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse in beiden Proben gefunden werden (siehe Anhang, Tabelle 8.1).

Das Cytoskelett ist ein dynamischer Strukturbildner, der sehr schnell auf- und wieder abgebaut werden kann. Es spielt eine entscheidende Rolle in der räumlichen Organisation der Organellen sowie in intrazellulären Transportvorgängen und in Zellwachstumsprozessen, wie Zellteilung und -streckung. Zudem geht man von einer Funktion des Cytoskeletts im Auxintransport aus [Strasburger et al., 1991; Volkmann und Baluska, 1999]. Es ist daher anzunehmen, dass eine differenzielle Regulation Cytoskelett assoziierter Gene im 'Börner'-Gewebe auf die IES in ihrer Funktion als Wachstumshormon zurückzuführen ist.

Zunehmend wird allerdings auch die Rolle des Cytoskeletts in der Signaltransduktion diskutiert [Volkmann und Baluska, 1999]. Man nimmt an, dass es an der Transformation extrazellulärer Stimuli in intrazelluläre Signale beteiligt ist. Dementsprechend wird eine Funktion des Cytoskeletts in der Pflanze-Pathogen-Erkennung angenommen. Eine dynamische Reorganisation der Actinfilamente kann bei Pathogeninfektionen in direkt betroffenen und umliegenden Zellen beobachtet werden. Volkmann und Baluska (1999) konnten an Kartoffeln bzw. Gerste zeigen, dass der Actininhibitor Cytochalasin die normalerweise nach einer Infektion mit *Phytophthora* bzw. *Erysiphe* auftretende HR unterbindet. Es ist daher denkbar, dass eine Reorganisation des Cytoskeletts im IES behandelten 'Börner'-Gewebe ebenfalls im Zusammenhang mit der HR steht.

4.1.3.9 Abwehr assoziierte Gene

Pathogenerkennung

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, dienen *R*-Gene der spezifischen Erkennung eines Pathogens durch die Pflanze. Die Interaktion des *R*-Proteins mit dem passenden *Avr*-Protein des Pathogens ermöglicht eine schnelle Induktion von Abwehrreaktionen, die in vielen Fällen zur Ausbildung einer HR führen. Bei einer inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion kommt es sehr schnell zur Aktivierung des entsprechenden *R*-Gens und seines Genprodukts

[Dangl und Jones, 2001]. Die getesteten 'Börner'-Proben zeigten Hybridisierungssignale mit insgesamt 9 *R*-Genen (in Tabelle 3.5 als *disease resistance protein* bezeichnet) auf dem Chip. Zu sechs der entsprechenden *Arabidopsis*-Gene liegen keine weiteren Informationen über den Erkennungsmechanismus vor. Die anderen drei Gene zeigen Ähnlichkeiten mit bereits bekannten *R*-Genen. So weist das *At3g53240* Ähnlichkeiten zum *Cf-2.1* aus der Tomate auf. Das Gen kodiert für ein Transmembranrezeptor ähnliches Protein, das mit dem Avr2 aus *Cladosporium fulvum* interagiert und zu einer Resistenzreaktion unter Ausbildung einer HR führt [Rooney et al., 2005]. *At1g57670* ähnelt dem R-Protein RPS4, das zur TIR-NB-LRR-Klasse gehört. RPS4 vermittelt in *Arabidopsis* eine Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, das das entsprechende *avrRps4* exprimiert [Gassmann et al., 1999]. Dagegen zeigt *At3g04220*, mit dem in der 2,5-h-Probe ein Hybridisierungssignal gefunden werden konnte, Ähnlichkeiten zum RPP1, das zur CC-NB-LRR-Klasse der R-Proteine gehört und in *Arabidopsis* für die Resistenz gegen *Peronospora parasitica* verantwortlich ist [Eulgem et al., 2004].

Wie bereits in Kapitel 4.1.3.1 (Pto interagierende Proteine) am Beispiel des Pto/AvrPto-Erkennungsmechanismus beschrieben, sind für die Interaktion zwischen R- und Avr-Proteinen und die Aktivierung nachfolgender Signalkaskaden weitere Komponenten von Bedeutung (siehe Abb. 4.5). Man geht davon aus, dass R-Proteine komplexiert mit einer Reihe stabilisierender sowie die Signaltransduktion unterstützender Proteine vorliegen. Dazu zählen z.B. das Hsp90 und Komponenten des Ub/26S-Proteaseweges, das SGT1 und das Rar1. In einige R/Avr-Erkennungsmechanismen involviert sind außerdem das *enhanced disease susceptibility 1* (EDS1) und das *non-race specific disease resistance 1* (NDR1). Während EDS1 in der Regel die Funktion der R-Proteine aus der TIR-NB-LRR-Klasse unterstützt, ist NDR1 maßgeblich an der Aktivität der R-Proteine aus der CC-NB-LRR-Klasse beteiligt. Das NDR1-Protein ist in der Plasmamembran lokalisiert und unterstützt die Signalweiterleitung nach einer Erkennung des Avr-Proteins durch das R-Protein. Möglicherweise interagiert das NDR1 direkt mit dem R-Protein innerhalb eines Membran gebundenen Komplexes oder dient als Transporter bzw. Rezeptor für das Avr-Genprodukt [Century et. al, 1997; Coppinger et. al, 2004; Kaloshian, 2004]. Anhaltspunkte für die Expression eines *NDR1*-Gens konnten in der 2,5-h-Probe gefunden werden.

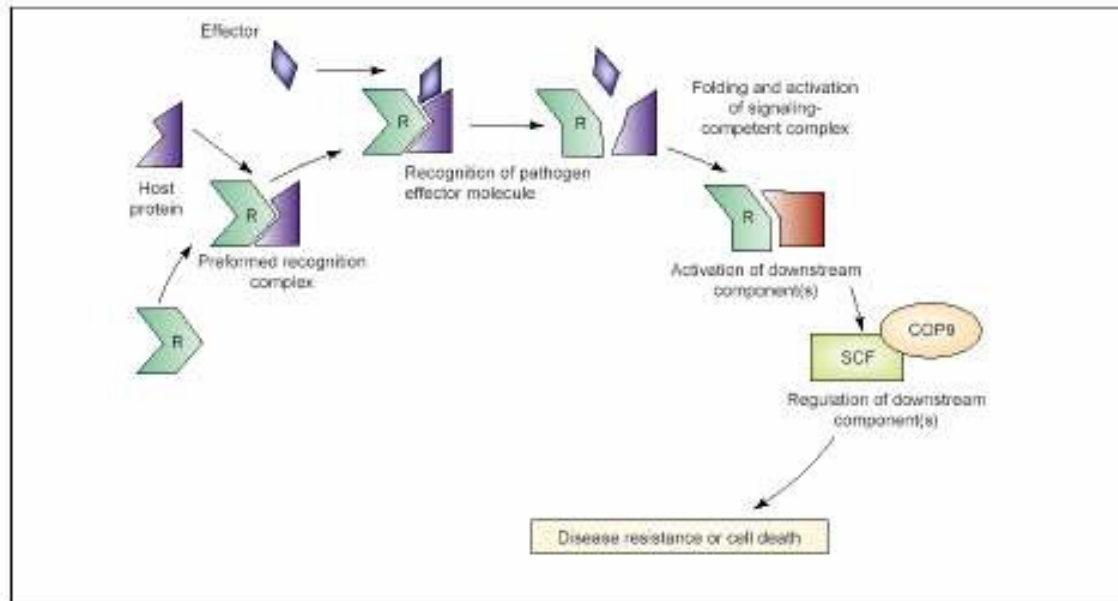


Abb. 4.5: Prinzip des R/Avr-Erkennungsmechanismus

Resistenzprotein (R), SKP1/Cullin/F-Box (SCF), *constitutive photomorphogenic 9* (COP9); verändert nach Shirasu und Schulze-Lefert (2003)

Der R/Avr-Erkennungsmechanismus ist eine wichtige Voraussetzung für die Aktivierung von Abwehrreaktionen in der *host resistance* und ist nicht nur bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen von Bedeutung, sondern auch zwischen Pflanzen und Nematoden bzw. Insekten. So vermittelt das R-Protein Mi-1 aus der Tomate eine Resistenz gegen die Nematodenarten *Meloidogyne arenaria*, *M. incognita* und *M. javanica* sowie gegen die Aphidenart *Macrosiphum euphorbiae*. Im Falle der Nematodenresistenz kommt es dabei auch zur Ausbildung einer HR. Bisher konnte in Nematoden und Insekten noch kein entsprechendes *avr*-Gen identifiziert werden. Man vermutet allerdings, dass die auslösenden Avr-Proteine entweder direkte Bestandteile des Nematoden- bzw. des Insektenspeichels sind, oder aber lysierende Enzyme des Speichels dazu beitragen, dass aus der pflanzlichen Zellwand Substanzen freigesetzt werden, die als Elicitoren mit dem R-Protein interagieren [Kaloshian, 2004].

Die untersuchten 'Börner'-Proben wurden jedoch nicht mit Rebläusen infiziert, sondern mit IES behandelt. Dadurch bedingt ist eine Bewertung der Funktion solcher R-Proteine im Auxin induzierten Resistenzmechanismus bei 'Börner' problematisch. Die Literatur liefert keine Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung von R-Proteinen mit Auxinen. Es stellt sich daher die Frage, wodurch die Expression eventuell vorliegender R-Gene in den 'Börner'-Proben aktiviert wurde und mit welchen Substanzen die entsprechenden R-Proteine interagieren. Es ist denkbar, dass eine Aktivierung solcher R-Gene auf die halbsterilen

Kultivierungsbedingungen der Wurzeln zurückzuführen ist. Neben der Behandlung mit IES können auch Infektionen mit Bakterien, Pilzen oder Viren Reaktionen, wie z.B. die Expression von *R*-Genen und die Aktivierung von R-Proteinen, in den 'Börner'-Wurzeln ausgelöst haben. Dies würde jedoch auch auf die unbehandelte Vergleichsprobe zutreffen, sodass in diesem Zusammenhang keine Unterschiede in der Genexpression zu erkennen sein sollten.

Untersuchungen an Tabakpflanzen haben gezeigt, dass eine Überexpression von *R*-Genen eine Abwehrreaktion bis hin zur HR induzieren kann, ohne dass es zuvor zu einer Interaktion mit dem passenden Avr-Protein gekommen ist. Wie bereits geschildert, liegen R-Proteine in der Regel komplexiert mit weiteren Proteinen vor. In Abwesenheit des entsprechenden Avr-Proteins verhindert diese Komplexbildung eine Aktivierung von Abwehrreaktionen durch das R-Protein. Eine Erkennung und Interaktion zwischen Avr- und R-Protein führt zu Änderungen des Komplexes und zur Aktivierung Abwehr initiiender Signalkaskaden (siehe Abb. 4.5). Bei einer Überexpression des *R*-Gens können nicht alle R-Proteine in einem Proteinkomplex gebunden und in inaktiver Form vorliegen, sodass es in diesem Fall auch in Abwesenheit des Avr-Proteins zu einer Aktivierung von Resistenzreaktionen kommen kann [Zhang et al., 2004].

Sollte es in den 'Börner'-Proben auf Grund der IES-Behandlung zu einer Aktivierung von *R*-Genen gekommen sein und sollten außerdem die entsprechenden R-Proteine einen Einfluss auf die Induktion der HR haben, gibt es dafür zwei mögliche Erklärungen. Es wäre zum einen vorstellbar, dass die in 'Börner' aktivierten R-Proteine nicht mit bisher bekannten Avr-Proteinen interagieren, sondern direkt oder unter Mitwirkung anderer Komponenten durch die IES aktiviert werden und Abwehrreaktionen in Gang setzen. Zum anderen ist in Betracht zu ziehen, dass die IES-Behandlung eine Überexpression von *R*-Genen bewirkt und der damit verbundene Überschuss an aktiven, nicht im Komplex gebundenen R-Proteinen zur Induktion von Abwehrreaktionen in Abwesenheit entsprechender Avr-Proteine führt.

Wie bereits in Kapitel 1.5.1 geschildert, verfügen Pflanzen neben dem R/Avr-Mechanismus zur spezifischen Pathogenerkennung außerdem über einen allgemeinen, eher unspezifischen Erkennungsmechanismus. Dabei werden Pathogen typische PAMP-Strukturen durch entsprechende Rezeptoren der Pflanze gebunden und Abwehrreaktionen in Gang gesetzt. Zu diesen PAMPs gehören auch β -Glucane, die in Zellwänden von Mikroorganismen vorkommen und als Elicitoren an sog. β -Glucan-Elicitorrezeptoren der Pflanze binden [Fliegmann et al., 2004]. Mit beiden 'Börner'-Proben konnte ein Hybridisierungssignal mit

einem solchen Rezeptorgen gefunden werden. Vergleichbar zu den *R*-Genen stellt sich auch hier die Frage, ob die Aktivierung eines solchen Rezeptorgens vielmehr auf eine Infektion mit Mikroorganismen als auf die IES-Behandlung zurückzuführen ist.

Man muss jedoch auch in Betracht ziehen, dass die IES nicht nur spezifische Reaktionen zur Abwehr der Reblaus induziert, sondern auch allgemeine Abwehrmechanismen direkt oder indirekt aktiviert. Eine verstärkte Expression von Elicitorrezeptoren oder der ebenfalls in diesem Kapitel diskutierten *PR*-Gene sowie die Synthese der in Kapitel 4.1.3.3 (Sekundärmetabolismus) erwähnten Phytoalexine könnte dazu beitragen, zusätzliche Sekundärinfektionen durch Bakterien, Viren und Pilze zu unterbinden.

Oxidative burst

Eine zentrale Rolle bei der Induktion und Regulation von Abwehrreaktionen spielt die sehr früh nach einem Pathogenbefall auftretende Bildung von ROS [Lamb und Dixon, 1997; Mittler, 2002]. Eine Schlüsselfunktion bei der ROS-Produktion erfüllt dabei der NADPH-Oxidase-Komplex, bestehend aus Membran gebundenen sowie cytosolisch vorliegenden Komponenten. Isoliert werden konnte dieser Komplex aus Pflanzenzellen bisher noch nicht. Man geht jedoch von einer starken Analogie zu der aus Säugerzellen bekannten NADPH-Oxidase aus. Angelehnt an das Säugermodell vermutet man daher eine Aktivierung der pflanzlichen NADPH-Oxidase durch GTP-Proteine, Ca^{2+} , Kinasen und Phosphatasen sowie Phospholipasen und zyklisches AMP [Buchanan et al., 2000; Lamb und Dixon, 1997; Mittler, 2002; Wan 2002; Wojtaszek, 1997]. Damit eine ausreichende Menge an dem erforderlichen Reduktionsäquivalent NADPH für diese Reaktion zur Verfügung steht, sind außerdem Enzyme wie das NADP-Me und die NAD-Kinase erforderlich. Die Funktionsweise des NADP-Me wurde bereits in Kapitel 4.1.3.3 (Primärmetabolismus) eingehend beschrieben. Die NAD-Kinase katalysiert die Bildung von NADP aus NAD und ATP und sichert damit den Bedarf an NADPH für die ROS-Produktion. Insbesondere die Ca^{2+} abhängigen NAD-Kinasen, die über CaMs aktiviert werden, sind an der Pathogen induzierten Ca^{2+} -Signalweiterleitung und ROS-Bildung beteiligt. Nachgewiesen wurde dieser Zusammenhang u. a. an transgenen Tabakpflanzen. Eine Hyperaktivierung der NAD-Kinase durch ein modifiziertes CaM führte als Reaktion auf verschiedene Stimuli in den Pflanzen zu einer Erhöhung der NADPH-Konzentration und zu einem schnellen und intensiven *oxidative burst* [Turner et al., 2004]. Neben putativen CaMs (siehe Kapitel 4.1.3.1, Calcium) konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Hinweise auf die Aktivierung einer Ca^{2+} /CaM abhängigen NAD-Kinase in der 4,5-h-Probe gefunden werden.

Die Funktion der ROS in der Pathogenabwehr ist sehr vielseitig. Ihre stark oxidierende Wirkung ruft Schäden an Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren hervor und führt somit zur Zellzerstörung. Mit dieser Eigenschaft können die ROS direkt toxisch und dezimierend auf Pathogene wirken [Wan, 2002; Buchanan et al., 2000]. Neben dieser antimikrobiellen Funktion trägt H₂O₂ zur Zellwandumstrukturierung bei. Es ermöglicht die Verkettung von HRGPs und es kann die Lignifizierung der Zellwand unterstützen. Wie dies bereits in Kapitel 4.1.3.8 näher ausgeführt wurde, erhöhen diese Prozesse die Widerstandsfähigkeit der Zellwand [Buchanan et al., 2000]. Zudem fungieren ROS als Signalsubstanzen und potenzieren die Signalweiterleitung, die letztendlich zur Aktivierung weiterer Abwehrreaktionen führt. So ist der *oxidative burst* u. a. beteiligt an der Aktivierung von Hsps und MAPKs, an der Erhöhung des Ca²⁺-Gehalts in der Zelle, an der Bildung von PR-Proteinen und Phytoalexinen sowie an der Regulation von Transkriptionsfaktoren. Außerdem deutet vieles darauf hin, dass der *oxidative burst* zusammen mit dem Signalmolekül SA für das Initiieren der SAR verantwortlich ist [Buchanan et al., 2000; Delledonne et al., 2001; Lamb und Dixon, 1997]. Anhaltspunkte für die Aktivierung dieser Abwehrkomponenten und -prozesse konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse gefunden werden. Dies wurde bereits in vorangegangenen Kapiteln ausführlich beschrieben.

Die ROS spielen somit eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Abwehr, stellen aber zugleich durch ihren reaktiven Charakter eine Bedrohung für die Pflanze dar. Aus diesem Grunde kommt es beim *oxidative burst* zur Aktivierung antioxidativer Enzyme, wie z.B. GSTs, Peroxidasen, Superoxiddismutase, Catalasen und Monodehydroascorbatreduktasen (MDHAR), die die schädigende Wirkung der ROS kontrollieren und eindämmen [Kovtun, 2000]. Hinweise auf die Aktivierung solcher Radikalfänger konnten in beiden IES behandelten Proben gefunden werden. So wurden Hybridisierungssignale mit vier MDHAR-Genen sowie mit fünf Peroxidasegenen entdeckt. Zusätzlich konnte angelehnt an die Sequenz des MDHAR-Gens *At3g52880* mit spezifischen Primern aus der 2,5-h-Probe die cDNA-Sequenz Fag-B-IES2,5h-K26-M5 amplifiziert und sequenziert werden. Sie zeigte auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einem MDHAR-Gen aus *Cucumis sativus*.

Peroxidasen, speziell Ascorbatperoxidasen, reduzieren H₂O₂ zu H₂O und oxidieren dabei Ascorbat unter Bildung des radikalen Monodehydroascorbat (MDHA). Die MDHAR wiederum reduziert in Gegenwart von NAD(P)H MDHA zu Ascorbat. Die Bedeutung antioxidativer Enzyme während des *oxidative burst* zeigt sich auch in ihrer Expressionsrate. Ein Anstieg der mRNA von MDHAR-Genen konnte in diversen Pflanzen als Reaktion auf

Verletzungen und andere Stresssituation, die einen *oxidative burst* auslösen, festgestellt werden [Yoon et al., 2004].

Neben ihrer Schutzfunktion im *oxidative burst*, besitzen Peroxidasen unter bestimmten Umständen auch die Fähigkeit zur Bildung von ROS. Änderungen des Ionenflusses als Antwort auf Stress oder Pathogenbefall führen zu einer Alkalisierung der extrazellulären Matrix. Dadurch bedingt kommt es zur Aktivierung pH-abhängiger Peroxidasen in der Zellwand, die die Bildung von H₂O₂ hervorrufen. Dieser Prozess scheint insbesondere während der Lignifizierung der Zellwand von Bedeutung zu sein [Kawano, 2003; Wojtaszek, 1997].

Hinweise auf die Expression weiterer antioxidativer Enzyme konnten in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden. Darunter befinden sich eine putative GST, eine Ferredoxin-NADP-Reduktase, ein putatives Peroxiredoxin, eine Typ-5-saure-Phosphatase, eine Glutamat/Cystein-Ligase und eine Peptidmethioninsulfoxidreduktase. Diese Enzyme werden u. a. als Antwort auf oxidativen Stress aktiviert und dienen dem pflanzlichen Organismus zum Schutz vor oxidativen Schäden [Bechtold et al., 2004; Pozo et al., 1998; Jez et al., 2004; Killili et al., 2004; Palatnik et al., 1997; Rouhier und Jacquot, 2005].

Zudem zeigte die isolierte 'Börner'-Sequenz Fag-B-IES2,5h-56 auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einer putativen NAD(P)H abhängigen Quinonreduktase aus Arabidopsis. Das zu der Familie der Oxidoreduktasen gehörende Enzym ist aus Säugerzellen durch seine antioxidative Funktion bekannt. Quinon, auch Chinon genannt, geht aus dem Phenolmetabolismus hervor und wird bei einem einfachen Elektronentransfer zu dem reaktiven Semichinon reduziert. Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff zu Superoxid. Die Quinonreduktase führt dagegen einen zweifachen Elektronentransport aus und reduziert Chinon zu dem ungefährlichen Chinol [Wang und Maier, 2004].

Im Hinblick auf die Aktivierung der HR spielen ROS eine bedeutende Rolle, können jedoch nicht alleine eine HR induzieren. Hier ist das Zusammenspiel mit dem Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) notwendig, dessen Bildung ebenfalls sehr schnell nach einer Pathogeninfektion in der Pflanze beobachtet werden kann. Liegen H₂O₂ und NO in einem bestimmten ausbalancierten Verhältnis vor, führt dies zur Initiierung der HR. Über die genauen Vorgänge dieser Interaktion und der nachfolgenden Signalwege, die letztendlich zum Zelltod führen, ist bisher nur wenig bekannt [Delledonne et al., 2001; Hoeberichts und Woltering, 2002; Romero-Puertas et al., 2004]. NO ist darüber hinaus an der Regulation Abwehr assoziierter Proteine, wie z.B. der PAL und dem PR-1, beteiligt. Ebenso wie die ROS

aktiviert NO die Phytoalexinbildung, MAPK-Signalkaskaden und die SAR in Verbindung mit einer SA-Akkumulation [Romero-Puertas et al., 2004].

Die NO-Synthese wird von den Enzymen Nitratreduktase (NR) und Nitratoxidsynthase (NOS) katalysiert. In der Gegenwart von O₂ und NADPH ermöglicht die NOS die Bildung von NO aus L-Arginin. Für diese Reaktion benötigt sie Tetrahydrolioptin als Redoxcofaktor [Li und Poulos, 2005]. Mit den 'Börner'-Proben konnten Hybridisierungssignale mit zwei Tropinonreduktasegenen sowie mit zwei kurzkettigen Dehydrogenase-/Reduktasegenen gefunden werden. Beide Enzymgruppen sind an der Biosynthese von Tetrahydrolioptin beteiligt.

Die vorliegenden Sequenzierungs- und Microarrayergebnisse weisen sehr deutlich auf induzierende und kontrollierende Prozesse des *oxidative burst* hin. Dementsprechend kann von einer zentralen Rolle des *oxidative burst* im IES induzierten Abwehrmechanismus bei 'Börner' ausgegangen werden.

PR-Gene

Ein Charakteristikum der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die Induktion von Abwehrsubstanzen. Dazu zählt die in Kapitel 4.1.3.3 (Sekundärmetabolismus) bereits beschriebene Gruppe der Phytoalexine. Eine weitere Gruppe von Substanzen mit Abwehreigenschaften bilden die PR-Proteine. Sie gelten als eher unspezifische Abwehrkomponenten, die in der Regel nicht erforderlich sind für die Induktion einer Resistenzantwort, sondern vielmehr zum allgemeinen Schutz der Pflanze beitragen. Ihre Aktivierung durch einen Pathogenbefall oder durch Stresssituationen der Pflanze wird, wie bereits aus vorangegangenen Kapiteln deutlich geworden ist, in einem komplexen Zusammenspiel der Signalkomponenten SA, JA, MeJA und ET reguliert. PR-Proteine werden dabei nicht nur lokal an der Infektionsstelle, sondern auch systemisch induziert und spielen daher eine wichtige Rolle in der SAR. Sie liegen meist extrazellulär vor und inhibieren das Wachstum, die Vermehrung und somit auch die Ausbreitung von Pathogenen [van Loon und van Strien, 1999].

Die PR-Proteine werden nach Aminosäuresequenz, serologischen Eigenschaften und enzymatischen sowie biologischen Funktionen in insgesamt 14 Familien unterteilt [van Loon und van Strien, 1999]. Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Anhaltspunkte für die Aktivierung einiger PR-Gene in beiden IES behandelten 'Börner'-Proben gefunden werden. So zeigten sich Hybridisierungssignale mit drei *PR-1* ähnlichen Genen auf dem Chip. Die PR-

1-Proteine gelten als Haupt-PR-Familie und gehören einer Gruppe von Proteinen an, die hoch konserviert auch in anderen Organismen, wie z.B. Pilzen, Tieren und dem Menschen, zu finden ist. In Pflanzen erfolgt ihre Expression als Antwort auf einen Pathogenbefall und wird, wie in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben, durch SA und NPR1 reguliert. Obwohl ihre genaue biochemische Funktion nicht bekannt ist, konnte bei einigen PR-1-Proteinen eine fungizide Wirkung nachgewiesen werden. So zeigen transgene Pflanzen, die das *PR-1a* konstitutiv exprimieren eine erhöhte Resistenz gegen die Pilzstämme *Phytophthora parasitica* und *Peronospora tabacina*. Da die Aktivierung von PR-1-Proteinen insbesondere im Zusammenhang mit einer SA abhängigen SAR erfolgt, gelten diese Proteine auch als SAR-Marker [Tornerio et al., 1997; van Loon und van Strien, 1999].

In der Genbezeichnung der gefundenen *PR-1* ähnlichen Gene ist außerdem die Benennung *allergen* zu finden, da viele PR-Proteine zur Familie der Allergie auslösenden pflanzlichen Allergene gehören [Hoffmann-Sommergruber, 2002].

Die PR-2-Familie besteht aus β -1,3-Glucanasen, die die hydrolytische Spaltung von β -1,3-Glucanen bewirken. Neben ihrer Funktion in Entwicklungsprozessen der Pflanzen, spielen sie außerdem eine Rolle in der Abwehr von Mikroorganismen und in Reaktionen auf Stress, wie Verletzungen, Kälte, Ozon und UV-B-Strahlung. Da beta-1,3-Glucane wichtige Bestandteile der Zellwände von Mikroorganismen darstellen, geht man bei den PR-2-Proteinen von einer direkten antimikrobiell wirkenden Funktion aus. Durch die hydrolytische Wirkung können außerdem als Elicitoren fungierende Moleküle aus der Mikroorganismenzellwand freigesetzt werden [Kauffmann et al., 1987]. Mit der 4,5-h-Probe konnte ein Hybridisierungssignal mit einem *PR-2* ähnlichen Gen auf dem Chip gefunden werden.

Eine zu den PR-2-Proteinen vergleichbare Funktion erfüllen die Chitinasen in der pflanzlichen Abwehr. Fünf Chitinaseklassen (I, II, III, V, VI) teilen sich auf insgesamt vier PR-Familien (PR-3,-4,-8 und -11) auf. Chitinasen hydrolysieren Chitin, ein Polymer aus N-Acetyl-D-Glucosaminen, das als Hauptbestandteil in Zellwänden von Pilzen aber auch in Insekten und einigen Bakterien zu finden ist. Ähnlich zu den PR-2-Proteinen führt auch die Aktivierung von Chitinasen zu einer Eindämmung des Pathogens und ermöglicht die Freisetzung wichtiger Elicitoren. Insgesamt konnten mit den IES behandelten 'Börner'-Proben Hybridisierungssignale mit vier verschiedenen Chitinasegenen auf dem Chip gefunden werden. Darunter befinden sich zwei aus der Glycosylhydrolasefamilie 19, die den PR-3-Proteinen zuzuordnen sind. Die beiden anderen Chitinasegene, darunter das *CHIB1*, gehören zu den PR-8-Proteinen [Brunner et al., 1998; Watanabe et al., 1999].

Durch ihre hohe Sequenzübereinstimmung mit dem Protein Thaumatin aus *Thaumatococcus daniellii* werden die Mitglieder der PR-5-Familie auch als Thaumatin ähnliche Proteine bezeichnet. Hinweise auf die Expression eines solchen Gens konnten in der 2,5-h-Probe mit der Microarrayanalyse gefunden werden. Einige dieser Thaumatin ähnlichen Proteine zeigen eine fungizide Wirkung gegen ein breites Spektrum an Pilzen. Wie sie in der Abwehr funktionieren ist noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass PR-5-Proteine direkt in die Membran der Pilze integrieren, dort eine Transmembranpore bilden, den Influx von Wasser und somit das Absterben der Zelle verursachen [Hoffmann-Sommergruber, 2002; Hu and Reddy, 1997].

Zur Gruppe der PR-6-Proteine zählen PIs, von denen laut Microarrayanalyse drei Serinproteaseinhibitoren sowie ein Trypsin- und ein Cysteinproteaseinhibitor (Cystatin) in den 'Börner'-Proben exprimiert wurden. Diese PIs inhibieren die Aktivität entsprechender Proteasen und zeigen eine differenzielle Expression in pflanzlichen Entwicklungsprozessen sowie als Antwort auf Stress, Verletzungen und Pathogenbefall. Insbesondere stehen sie im Zusammenhang mit der Resistenz gegenüber Insekten. Viele herbivore Insekten setzen Verdauungsenzyme, wie Serin- und Cysteinproteasen frei, um das Pflanzengewebe als Nährstoffquelle nutzbar zu machen. Dem wirkt der pflanzliche Organismus mit der Bildung entsprechender PIs entgegen und kann somit Wachstum und Entwicklung des Schädling und seiner Nachkommen einschränken. In diesem Zusammenhang kann eine Aktivierung von PIs besonders bei Verletzungen, wie sie durch Insekten entstehen, und bei einer Behandlung mit dem Wundhormon JA beobachtet werden. Zudem sind Cysteinproteasen wichtig für die Replikation von Viren, sodass durch die Pflanze gebildetes Cystatin eine entsprechende Virusresistenz bewirken kann [Belenghi et al., 2003; Margossian et al., 1988; Wijaya et al., 2000].

Neben der Funktion als Toxine, können PIs zudem die Aktivität pflanzeigener Proteasen kontrollieren und damit regulierend in PCD-Prozesse eingreifen. In Kapitel 4.1.3.5 (weitere Proteasen) wurde bereits die Fähigkeit einiger Proteasen zur Aktivierung des PCD diskutiert. Der pflanzliche Organismus wirkt diesem PCD aktivierenden Mechanismus entgegen, indem er entsprechende PIs induziert, um so die Ausbreitung des Zelltods einzugrenzen. Das *Arabidopsis* Cystatin AtCYS1, mit dem in beiden Proben ein Hybridisierungssignal gefunden werden konnte, zeigt eine hohe Expression nach Gewebeverletzungen und nach Behandlung mit exogenem JA in Verbindung mit einer erhöhten Insektenresistenz der Pflanze. Außerdem blockiert eine Überexpression des Cystatins in transgenen *Arabidopsis*-Zellen die Ausbildung einer durch Pathogene bzw. durch oxidativen Stress gesteuerten HR [Belenghi et al., 2003].

Angelehnt an die Sequenz des *AtCYS1*-Gens konnten mit spezifischen Primern aus der 2,5-h-Probe zwei cDNA-Sequenzen amplifiziert werden, Fag-B-IES2,5h-K1-M1 und Fag-B-IES2,5h-K4-M2. Beide cDNAs stimmen bis auf einen 146 bp großen Einschub in der Fag-B-IES2,5h-K4-M2-Sequenz zu 100 % überein. Die cDNAs zeigten auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit einem Cystatingen aus *Rumex obtusifolius*. Beide Gensequenzen, sowohl in der kurzen als auch in der 146 bp längeren Variante, sind im TIGR *grape gene index* zu finden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um zwei verschiedene Splicevarianten des gleichen Gens.

Die Gruppe der PR-7-Proteine ist bisher nur aus der Tomate bekannt. Es handelt sich dabei um Endoproteasen, die sehr wahrscheinlich neben Glucanasen und Chitinasen an der Lysierung der Zellwände von Pilzen und Bakterien beteiligt sind [van Loon und van Strien, 1999]. Wie in Kapitel 4.1.3.5 ausführlich diskutiert wurde, konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse Hinweise auf die Aktivierung von Proteasen in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden. Ob einige dieser möglicherweise differenziell exprimierten Proteasen zur PR-7-Gruppe zugeordnet werden müssen, kann mit Hilfe der vorliegenden Ergebnisse nicht geklärt werden.

Bei den PR-9-Proteinen handelt es sich um Peroxidasen. Insgesamt konnten Hybridisierungssignale mit fünf Peroxidasegenen auf dem Chip gefunden werden. Peroxidasen sind in vielerlei Hinsicht in Abwehr- und Stressreaktionen von Bedeutung. Sie werden durch JA induziert und tragen durch ihre Funktion in der Lignin- und Suberinsynthese zur Widerstandsfähigkeit der Zellwand bei (siehe Kapitel 4.1.3.8). Sie sind involviert in Prozesse wie Salztoleranz, Seneszenz und in den *oxidative burst*.

Die Familie der intrazellulär vorliegenden PR-10-Proteine zeigt Ähnlichkeiten zu Ribonukleasen. Sie werden im Pflanzengewebe nach einer Infektion mit Bakterien und Pilzen aktiviert und besitzen möglicherweise auch die Fähigkeit zur Degradierung viraler RNA [Park et al., 2004]. Laut Microarrayanalyse konnten Hinweise auf die Expression eines sog. *major latex protein* (MLP) gefunden werden. MLPs sind Blüten und Frucht spezifische Proteine, deren genaue Funktion nicht bekannt ist. Da diese Familie jedoch Ähnlichkeiten zu PR-10-Proteinen zeigt, wird eine Funktion der MLPs in der pflanzlichen Abwehr vermutet [Strömvik et al., 1999].

Zu den drei letzten Gruppen PR-12, -13 und -14 gehören kleine, basische und Cystein reiche Peptide mit einer antimikrobiellen Wirkung gegen ein breites Spektrum an Bakterien und Pilzen. Während die Gruppe PR-12 die sog. Defensine umfasst, zählen zur PR-13-Gruppe die Thionine [van Loon und van Strien, 1999]. Jedoch konnten mit Hilfe der Microarrayanalyse

keine Hinweise auf die Expression von Genen aus diesen beiden PR-Familien gefunden werden.

Dagegen wiesen die Microarrayergebnisse Anhaltspunkte für die Aktivierung von Genen aus der PR-14-Familie auf. Sie umfasst die sog. Lipidtransportproteine (LTPs). Es konnten Hybridisierungssignale mit insgesamt sechs LTP-Genen auf dem Chip gefunden werden. LTPs transportieren ein breites Spektrum an Lipiden und werden daher auch als *nonspecific* (ns)LTPs bezeichnet. Man geht davon aus, dass sie im pflanzlichen Organismus an der Biosynthese von Cutin beteiligt sind sowie eine Rolle in Entwicklungsprozessen und Stressreaktionen spielen. Zunehmend wird auch eine Funktion der LTPs in der pflanzlichen Pathogenabwehr diskutiert. Sie zeigen eine erhöhte Expression als Reaktion auf Pilze, Bakterien und Viren in diversen Pflanzen, darunter auch im Wein [Buhot et al., 2004; Park et al., 2002]. Buhot et al. (2004) konnten an Tabakpflanzen zeigen, dass LTPs in der pflanzlichen Abwehr möglicherweise eine Rolle in der Signaltransduktion spielen. Das LTP1-Protein aus dem Tabak ist in der Lage mit JA einen LTP1-JA-Komplex zu bilden. Offensichtlich führt diese Interaktion zu einer Konformationsänderung des LTP1 und ermöglicht dessen Bindung an einen Rezeptor und die Induktion von Abwehrmechanismen.

Die Expression von PR-Genen ist ein Indiz dafür, dass in den IES behandelten 'Börner'-Wurzeln Abwehrreaktionen aktiviert wurden. Dabei ist es nicht ungewöhnlich, dass offensichtlich nicht alle PR-Familien vertreten sind. Man geht davon aus, dass die Zusammensetzung der exprimierten PR-Gene je nach Pflanzenspezies und Infektionsart variiert [van Loon und van Strien, 1999].

HR und Seneszenz assoziierte Gene

Die Microarrayanalyse lieferte zudem Anhaltspunkte für die Expression zweier Gene aus der *hypersensitive-induced response* (HIR)-Proteinfamilie. HIRs zeigen strukturelle Ähnlichkeiten mit Prohibitinen und Stomatinen und bilden zusammen die Superfamilie der PIDs (*proliferation, ion and death*), die u. a. als positive Regulatoren der HR gelten. Prohibitine sind hoch konserviert vorliegende Proteine, die in Seneszenzreaktionen und in die Repression von Tumoren involviert sind. Zurückzuführen ist dies auf ihre Funktion als Negativregulatoren des Zellzyklus. Sie inhibieren die DNA-Synthese in der frühen G₁-Phase und wirken damit hemmend auf die Zellproliferation. Prohibitine sind hauptsächlich in der Membran von Mitochondrien zu finden. Es wird vermutet, dass sie dort als Membranproteine den Ionentransport, insbesondere den Ca²⁺-Transport regulieren. Von einigen

Tumorrepressoren, wie es die Prohibitine sind, ist bekannt, dass sie bei einer Überexpression zum Zelltod führen. Ähnliches konnte bei einer Überexpression von HIR-Genen beobachtet werden, sodass man auch bei diesen Genen von einer Funktion als Tumorrepressoren ausgeht [Nadimpalli et al., 2000].

Als Membranproteine gelten ebenfalls die Stomatine, die regulierend auf K^+ -Kanäle wirken. Eine ähnliche Funktion wird auch bei Prohibitinen und HIRs angenommen. Ein erhöhter K^+ -Efflux ist in Pflanzen häufig in Verbindung mit einem Pathogenbefall zu beobachten, sodass eine Funktion der PIDs in der Abwehr bedingten HR angenommen wird [Nadimpalli et al., 2000; Rostocks et al., 2003].

Die Sequenzierungsergebnisse bestätigten die Expression von einem oder mehreren HIR-Genen in der 2,5-h-Probe. Angelehnt an die Sequenzen der beiden HIR-Gene, *At5g62740* und *At5g51570*, konnten mit spezifischen Primern cDNA-Sequenzen aus der 2,5-h-Probe amplifiziert und sequenziert werden. Zwei cDNA-Sequenzen, Fag-B-IES2,5h-K2-M6 und Fag-B-IES2,5h-K4-M9, zeigten laut Datenbankanalyse Übereinstimmungen mit HIR-Genen aus *Solanum demissum* und *Capsicum annuum*. Mit Fag-B-IES2,5h-K2-M6 konnten zudem auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit einem HIR-Protein aus *Vitis vinifera* gefunden werden.

Eine Identifizierung von HR induzierenden und kontrollierenden Genen erfolgt zunehmend durch Untersuchungen an sog. *lesion mimic mutants* (LMMs). Durch Mutationen in HR assoziierten Genen zeigen diese LMMs eine fehlregulierte HR. Sie bilden meist spontan HR-Läsionen aus, die aber phänotypisch den Pathogen induzierten Reaktionen sehr ähnlich sind. Solche Mutanten konnten in Pflanzen, wie z.B. Mais, Gerste, Reis und *Arabidopsis*, gefunden werden und haben bereits zur Identifizierung einiger HR assoziierter Gene beigetragen [Lorrain et al., 2003]. Ein Beispiel hierfür ist die *acd2-Arabidopsis*-Mutante. Sie zeigt sich spontan ausbreitende HR-Läsionen in Verbindung mit einer konstitutiven Aktivierung von Abwehrmechanismen, wie der Expression von *PR*-Genen. Zurückzuführen ist diese Reaktion auf eine Akkumulation phototoxischer Abbauprodukte des Chlorophylls. Seneszenz und Abwehr bedingter Zelltod sind, zumindest in grünen Pflanzengewebe, mit dem Katabolismus von Chlorophyll verbunden. Dabei sind sog. Porphyrinkomponenten Vorläufer der Chlorophyllabbauprodukte und wirken sehr stark phototoxisch. Sie können unter Lichteinfluss Zelltodprozesse auslösen und potenzieren. Verhindert wird diese Reaktion durch den vollständigen Abbau der Porphyrinkomponenten. An diesem Abbau ist das *ACD2*-Gen beteiligt, das für die sog. *red chlorophyll catabolite* (RCC)-Reduktase (RCCR) kodiert. Wird

das *ACD2*-Gen durch eine Mutation inaktiviert, kann der Abbau der Porphyrinkomponenten nicht erfolgen und es werden stattdessen HR-Prozesse in Gang gesetzt. Man geht deshalb davon aus, dass *ACD2* in der Pathogenabwehr die Ausbreitung der HR eindämmt, dabei aber die Resistenzfähigkeit der Pflanze nicht negativ beeinflusst [Mach et al., 2001].

Mit Hilfe der Microarrayanalyse konnten Hinweise auf die Expression eines solchen *ACD2*-Gens in der 2,5-h-Probe gefunden werden. Es stellt sich dabei die Frage, welche Funktion ein aktiviertes *ACD2*-Gen in den 'Börner'-Wurzeln, die kein Chlorophyll enthalten, erfüllt. Wütherich et al. (2000) konnten die Expression des *ACD2*-Gens auch in Chlorophyll freiem Wurzelgewebe von *Arabidopsis*-Pflanzen feststellen und sie vermuten weitere, bisher noch unbekannte Funktionen der RCCR im pflanzlichen Organismus.

Angelehnt an die Sequenz des *ACD2*-Gens (*At4g37000*) wurde mit spezifischen Primern die cDNA-Sequenz Fag-B-IES2,5h-K4-M10 aus der 2,5-h-Probe amplifiziert und sequenziert. Laut Datenbankanalyse scheint es sich bei Fag-B-IES2,5h-K4-M10 um ein Seneszenz assoziiertes Gen zu handeln. Übereinstimmungen der 'Börner'-cDNA mit *ACD2* oder vergleichbaren Genen konnten nicht gefunden werden, sodass es weiterhin unsicher ist, ob ein solches Gen in der 2,5-h-Probe exprimiert wurde.

Neben Fag-B-IES2,5h-K4-M10 konnten unter den Microarrayergebnissen Hinweise auf die Aktivierung weiterer Seneszenz assoziierter Gene in beiden 'Börner'-Proben gefunden werden. So zeigte sich ein Hybridisierungssignal mit einer Diacylglycerolacetyltransferase. Das Enzym katalysiert die Synthese von Triacylglycerol, dessen Akkumulation in seneszenten Blättern beobachtet werden kann [Kaup et al., 2002]. Weiterhin fanden sich Hybridisierungssignale mit zwei Seneszenz assoziierten Genen, deren genaue Funktion nicht bekannt ist.

Sowohl bei der HR als auch bei der Seneszenz handelt es sich um PCD-Prozesse. Es ist daher nicht verwunderlich, dass es teilweise zu Vernetzungen dieser beiden Mechanismen kommt. So konnten Pontier et al. (1999) an Tabakpflanzen zeigen, dass das HR-Markergen *HINI* sowohl in der HR als auch in der Seneszenz exprimiert wird. Weiterhin stellten sie fest, dass es in Randbereichen von HR-Läsionen, ausgelöst durch Pathogene und HR induzierende Substanzen, zu einer erhöhten Expression von Seneszenz assoziierten Genen kommt. Möglicherweise bietet der induzierte Seneszenzmechanismus einen zusätzlichen Schutz vor eindringenden Pathogenen. Für diese Funktion spricht die Tatsache, dass einige dieser Genprodukte Ähnlichkeiten zu PR-Proteinen aufweisen. Man geht außerdem davon aus, dass

ET eine zentrale Rolle bei der Regulation HR und Seneszenz überschneidender Reaktionen spielt [Buchanan-Wollaston und Ainsworth, 1997; Pontier et al., 1999].

In Bezug auf PCD regulierende Gene konnten weitere Hinweise gefunden werden. So zeigte sich in beiden Proben ein Hybridisierungssignal mit einem HR assoziierten Gen aus der Familie der Transferasen mit unbekannter Funktion. Zusätzlich scheint es in der 2,5-h-Probe zur Expression eines Gens mit Ähnlichkeiten zum *programmed cell death 4 (Pcd4)* gekommen zu sein. Identifiziert wurde das *Pcd4* in Mäusezellen. Es bindet an den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor E4, hemmt dessen RNA-Helicaseaktivität und inhibiert damit die Translation. Ähnlich wie es für Prohibitine und HIRs der Fall ist, gilt das *Pcd4* als Tumorrepressor [Jansen et al., 2005].

Mit beiden 'Börner'-Proben konnte zudem ein Hybridisierungssignal gefunden werden, das auf die transkriptionelle Aktivierung eines mitochondrialen Proteins mit Ähnlichkeiten zum *death-associated protein 3 (DAP3)* hinweist. DAP3 ist aus Säugerorganismen und Hefezellen als proapoptotisches Protein bekannt [Berger et al., 2000].

Im tierischen Organismus besitzt das Mitochondrium eine zentrale Rolle bei der Induktion von PCD-Prozessen. Zelltodsignale ändern dabei die Permeabilität der Mitochondrienmembran. Dies wiederum resultiert in PCD aktivierende Prozesse, wie z.B. Änderungen des Ca^{2+} -Levels, des pH-Wertes sowie dem Gehalt an Metaboliten in der Zelle. Weiterhin können aus Mitochondrien proapoptotische Proteine, wie z.B. das Cytochrom C oder der *apoptosis inducing factor (AIF)*, freigesetzt werden [Lam et al., 2001]. Das Cytochrom C fungiert normalerweise in der Atmungskette als Elektronenüberträger. Bei der PCD-Induktion wirkt es jedoch als Aktivator von Caspasen, deren Funktion als degradierende Enzyme bereits in Kapitel 4.1.3.5 (weitere Proteasen) erläutert wurde [Berger et al., 2000].

Im Gegensatz zu den genannten proapoptotischen Faktoren, verbleibt das DAP3 während des Zelltodprozesses in der Mitochondrienmembran. Es wird angenommen, dass es dort an der Freisetzung des Cytochrom C beteiligt ist [Berger et al., 2000].

Zunehmend geht man auch bei Pflanzen von einer Funktion des Mitochondriums in PCD-Prozessen, wie der HR, aus [Lam et al, 2001]. So ist es z.B. möglich mit proapoptotischen Proteinen aus der sog. Bax-Familie, die im tierischen Organismus für den Mitochondrien vermittelten Zelltod verantwortlich ist, PCD auch in Pflanzen zu induzieren. Inwiefern die Freisetzung von Cytochrom C in Pflanzen eine Rolle spielt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Die mögliche Expression eines *DAP3* ähnlichen Gens in den IES behandelten 'Börner'-Wurzeln könnte ebenfalls auf eine Funktion der Mitochondrien in der HR-Induktion hindeuten.

4.2 Microarrayanalyse der 1,5-h- und R-Probe

Im Falle der 1,5-h- und R-Probe wurde die Microarrayanalyse zur differentiellen Expressionsanalyse eingesetzt. Das Prinzip dieser Methodik wurde bereits in Kapitel 1.6.2 (DNA-Microarrayanalyse) beschrieben.

Für ein solches Microarrayexperiment werden in der Regel 10 bis 50 µg Gesamt-RNA oder 0,5 bis 2,5 µg mRNA als Ausgangsmaterial der zu hybridisierenden Proben eingesetzt [Aharoni und Vorst, 2001]. Diese Mengen standen jedoch für die 'Börner'-Proben nicht zur Verfügung, so dass eine cDNA-Synthese mit gekoppelter Amplifikation nach dem SMARTTM-System von CLONTECH durchgeführt wurde. Meist sind PCR basierende Amplifikationsmethoden nicht in der Lage *full-length* cDNAs zu generieren, wodurch das Problem der Überamplifikation von cDNA-Sequenzen auftritt. Es kann dann nicht mehr von einer repräsentativen Amplifikation der Original-RNA ausgegangen werden, sodass es im Verlauf differentieller Expressionsanalysen sehr schnell zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse kommen kann [Endege et al., 1999]. Dagegen ermöglicht die SMARTTM-Technik die Amplifikation von *full-length* cDNAs und damit die Beibehaltung von Expressionsverhältnissen über eine sog. *template-switching* PCR [Endege et al., 1999; Petalidis et al., 2003]. Mehrere Arbeitsgruppen konnten bereits die erfolgreiche Anwendung der cDNA-Amplifikation nach dem SMARTTM-System für differentielle Expressionsanalysen, wie z.B. Microarrayhybridisierungen, dokumentieren [Endege et al., 1999; Petalidis et al., 2003; Vernon et al., 2000]. In diesen Versuchen konnte eine sehr gute Reproduzierbarkeit und Effizienz der Methode nachgewiesen werden.

Die so amplifizierte und im Anschluss markierte IES behandelte bzw. Reblaus infizierte Probe wurden jeweils zusammen mit einer unbehandelten, ebenfalls amplifizierte und markierte Vergleichsprobe in gleichen Konzentrationen auf die Microarraychips hybridisiert und ausgewertet. Wie in Kapitel 3.7.1 am Beispiel des Chip_279 gezeigt werden konnte, ist jedoch oft ein genereller Unterschied in der Hybridisierungsintensität zwischen der Cy3 und Cy5 markierten Probe zu beobachten. Es handelt sich dabei um systematische Differenzen wie z.B. Unterschiede in der Markierungs- und Detektionseffizienz beider Fluoreszenzfarbstoffe sowie Abweichungen in der Beschaffenheit des Microarraychips

[Quackenbush, 2002]. Diese Differenzen müssen normalisiert werden, damit ein Vergleich beider Farbkanäle möglich wird. Hierfür können beispielsweise *housekeeping*-Gene eingesetzt werden, die per Definition in beiden untersuchten Proben in gleichen Maßen exprimiert werden. Jedoch ist diese Methode problematisch, sobald wider Erwarten doch Expressionsunterschiede auftreten [Leung und Cavalieri, 2003]. Hybridisierungssignale mit *housekeeping*-Genen konnten sowohl mit der IES behandelten bzw. Reblaus infizierten als auch mit der unbehandelten Probe deutlich und regelmäßig über den Chip verteilt gefunden werden. Aufgrund des heterologen Hybridisierungssystems wurde jedoch von einer Normalisierung mit *housekeeping*-Genen abgesehen.

Eine weitere Möglichkeit ist der Einsatz fremder RNA, eine sog. *spiking control*, die vor der Markierungsreaktion in definierten Mengen beiden Proben zugegeben wird. Die *spiking control* bindet spezifisch an entsprechende Kontrollspots und ermöglichen so eine Normalisierung [Finkelstein et al., 2002].

Geht man bei den zu vergleichenden Proben von einer weitgehenden Übereinstimmung der Genexpression aus, wie dies häufig beim Einsatz von *whole-genome* Microarrays der Fall ist, werden globale Normalisierungsmethoden bevorzugt. Es handelt sich dabei um Algorithmen, die über die Intensität aller Gene auf dem Microarraychip normalisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die sog. LOWESS-Regression, eine lokal gewichtete Regressionsglättung [Quackenbush, 2002], zur globalen Normalisierung eingesetzt.

Sind beide Farbkanäle angeglichen, kann die eigentliche Expressionsanalyse durch die Bildung der Ratiowerte aus beiden normalisierten Hybridisierungsintensitäten für jedes Gen berechnet werden [Quackenbush, 2002]. Im Falle der 1,5-h- und R-Probe zeigten nahezu alle Gene einen Ratiowert um eins. Dies weist auf vergleichbare Expressionslevel der Gene in der IES behandelten bzw. Reblaus infizierten Probe und der unbehandelten Vergleichsprobe hin.

Dagegen fanden sich nur wenige Gene mit einem Ratiowert über dem festgesetzten *fold-change cut-off* von zwei. Diese Gene zeigten eine zweifach höhere bzw. niedrigere Signalstärke in einem der beiden Farbkanäle und wurden damit als differenziell exprimiert eingestuft. Insgesamt konnte ein positiv reguliertes Gen in der 1,5-h-Probe sowie ein positiv und drei negativ regulierte Gene in der R-Probe gefunden werden. Dabei zeigten sich diese Gene immer nur in jeweils einem Microarrayexperiment als differenziell exprimiert, während sie in den restlichen Experimenten aufgrund einer zu niedrigen Intensität erst gar nicht in die Auswertung eingingen. Zudem konnten mit vier der insgesamt sieben ausgewerteten Microarraychips keine differenziell exprimierten Gene gefunden werden. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf den gesetzten Schwellenwert zurückzuführen. Dieser Wert ist notwendig

um schwache Signale, die in starker Annäherung zum Hintergrund stehen, aus dem Datensatz zu filtern [Quackenbush, 2002]. Damit ist allerdings auch ein gewisser Datenverlust verbunden, der sich eventuell auf die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Microarrayanalysen der 'Börner'-Proben ausgewirkt hat.

Es könnte sich weiterhin bei den als differenziell detektierten Genen um Ausreißer handeln, die insbesondere bei niedrigen Intensitäten auftreten, wenn der relative Fehler der Ratioberechnungen steigt [Quackenbush, 2002]. Weiterhin kann es sich um unspezifische Signale handeln, die trotz einer zusätzlichen visuellen Kontrolle, die in allen Fällen durchgeführt wurde, nicht als solche erkannt wurden.

Die Problematik der Microarraytechnik liegt in der hohen Variabilität und in der z. T. schweren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die Durchführungen von Wiederholungen ist daher für die Zuverlässigkeit der Resultate unerlässlich. Möglicherweise würden im Falle der 1,5-h- und R-Probe weitere Microarrayexperimente zur Verifizierung der Ergebnisse beitragen. Neben den durchgeführten technischen Wiederholungen in Form von *flip-dye*-Experimenten sowie einer erneuten Probenpräparation aus derselben RNA, können auch biologische Wiederholungen Ergebnisse absichern. Dazu werden als Ausgangsmaterial verschiedene RNA-Proben identisch behandelter Gewebe verwendet. Eine weitere Möglichkeit der Wiederholung ist die Duplikation von Spots innerhalb eines Microarrays, was jedoch im Falle der verwendeten *Arabidopsis*-Chips nicht gegeben war [Kim et al., 2004; Leung und Cavalieri, 2003].

Statistische Methoden zur Varianzbestimmung der durchgeführten Experimente können die Auswertung zusätzlich unterstützen. Als Beispiel hierfür ist der *t*-Test zu nennen. Dabei können nach einem Vergleich der Ratiowerte jedes Gens aus den replizierten Experimenten Aussagen über die Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Werte getroffen werden. Dies ermöglicht eine bessere Identifizierung differenziell exprimierter Gene [Cui und Churchill, 2003]. Eine Kombination der Replikate und eine statistische Analyse konnte im Falle der 1,5-h- und R-Probe nicht vorgenommen werden, da mit zwei unterschiedlichen Printversionen des *Arabidopsis*-Chips gearbeitet wurde.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Unsicherheitsfaktoren entsprechen die Ergebnisse dennoch den Erwartungen. Alle durchgeführten Microarrayexperimente deuten auf ein weitgehend übereinstimmendes Expressionsmuster der Proben hin. Das ist insbesondere für die R-Probe nicht überraschend. Bei der Isolierung der Reblaus infizierten Wurzeln konnte nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass die Insekten bereits

Reaktionen im Pflanzengewebe hervorgerufen hatten. Sollte dies dennoch der Fall gewesen sein, war der Anteil des betroffenen Gewebes im Verhältnis zum isolierten Gesamtbereich relativ niedrig. Daraus ergab sich die Wahrscheinlichkeit, dass Transkripte differenziell exprimierter Gene im Gesamt-RNA-Pool untergingen und durch die RNA-Isolierung oder die cDNA-Synthese nicht erfasst wurden.

Weiterhin ist es wahrscheinlich, dass einige differenziell exprimierte Gene aufgrund fehlender Homologie im heterologen Hybridisierungssystem keine Signale zeigten.

Die Funktionen der laut Microarrayanalyse differenziell exprimierten Gene könnten auf eine Rolle im Resistenzmechanismus hinweisen. So gehört das positiv regulierte Gen der R-Probe zur LTP-Familie, deren Funktion als PR-Proteine bereits in Kapitel 4.1.3.9 (PR-Gene) diskutiert wurde. Als negativ reguliertes Gen konnte, neben einem *expressed protein* und einem Zinkfingerprotein, eine PP2C ähnliche Phosphatase gefunden werden. Die PP2C ist eine Ser/Thr-Phosphatase, die als Negativregulator Stress induzierter MAPK-Kaskaden fungiert [Rodriguez, 1998]. Die Bedeutung MAPK bedingter Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr wurde bereits in Kapitel 4.1.3.1 (Mitogen aktivierte Proteinkinasen) geschildert. Möglicherweise muss in 'Börner' für eine erfolgreiche Aktivierung der Abwehrreaktion durch MAPKs die Expression einer PP2C vergleichbaren Phosphatase inhibiert werden.

Das einzige positiv regulierte Gen der 1,5-h-Probe gehört zur *structural maintenance of chromosomes* (SMC)-Familie. Es handelt sich dabei um chromosomale ATPasen, die in der Zellteilung von Bedeutung sind. Während der Mitose sind sie an der Paarung der Tochterchromatiden sowie an der Chromosomenkondensation beteiligt. Darüber hinaus sind einige SMC-Proteine in DNA-Reparaturprozesse und Chromosomen umfassende Genrepression involviert [Hirano, 1999]. Dementsprechend könnte das Gen in IES induzierten Wachstumsreaktionen oder in eine Resistenz bedingte Transkriptionsregulation involviert sein.

Neben den bereits erwähnten Wiederholungen und statistischen Auswertungen der Microarrayexperimente könnten weiterführende Untersuchungen, wie z.B. RT-PCR oder *northern blot*, die im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt werden konnten, zur Verifizierung der gefundenen Gene beitragen.

4.3 GeneFishing™ der 1,5-h-Probe

Die 1,5-h-Probe wurde neben der Microarrayanalyse zusätzlich mit einer *differential-display*-Methode, dem sog. GeneFishing™ von SEEGENE, untersucht. Das Prinzip dieser Technik wurde bereits in Kapitel 1.6.1 beschrieben.

Das GeneFishing™ kombiniert entscheidende Vorteile der cDNA-Subtraktion und der Microarrayanalyse. Es ermöglicht, vergleichbar zur cDNA-Subtraktion, die Identifizierung bereits bekannter Gene sowie neuer Transkripte aus geringen RNA-Mengen. Weiterhin können mit dem GeneFishing™, ähnlich zur Microarrayanalyse, positiv sowie negativ regulierte Gene simultan detektiert werden. Darüber hinaus erlaubt die Methode den Vergleich von mehr als nur zwei RNA-Proben gleichzeitig [Byers et al., 2000].

Nachteile wie eine hohe Falsch-Positiv-Rate und schlechte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aufgrund unspezifischer Amplifikationsprodukte, die bei vielen *differential-display*-Methoden auftreten, wurden durch die spezifische Primerstruktur des ACP™ (siehe Kapitel 1.6.1) reduziert [Yun-Lee et al., 2004]. Jedoch ist die Methode im Vergleich zur cDNA-Subtraktion und der Microarrayanalyse in der Anwendung zeitintensiver. Für ein erfolgreiches Screening nach differenziell exprimierten Genen müssen eine Reihe von Primerkombinationen getestet und zahlreiche PCR-Amplifikationen durchgeführt werden [Byers et al., 2000]. Wie sich im Falle der 1,5-h-Probe zeigte, konnten mit einigen Primerpaaren keine cDNA-Sequenzen amplifiziert werden, sodass die vom Hersteller vorgesehenen 20 Primerpaare möglicherweise nicht für eine erfolgreiche Detektion aller differenziell exprimierter Gene ausreichend sind.

Fehlende oder schwache Amplifikate sind u. U. auch auf die vorliegenden PCR-Bedingungen zurückzuführen. Die Optimierung der PCR-Reaktion mit Hilfe von Kontrollproben zeigte sich problematisch. Die elektrophoretische Auftrennung der Kontrollproben ergab keine 100%ige Übereinstimmung mit dem vom Hersteller empfohlenen Bandenmuster. Diese Voraussetzung muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. So kann die höhere Amplifikationsstärke der 'Börner'-Sequenzen Fag-B-IES1,5h-GF-18_28 und Fag-B-IES1,5h-GF-18_29 im unbehandelten Vergleichsgewebe auf eine negative Regulation der entsprechenden Gene im IES behandelten Gewebe hindeuten oder auf nicht optimale PCR-Bedingungen zurückgeführt werden.

Fag-B-IES1,5h-GF-18_28 zeigte auf Nukleotidebene Übereinstimmungen mit dem Nodulin 26 aus der Sojapflanze. Das Nodulin gehört zur Familie der sog. *major intrinsic proteins* (MIPs) [Guenther und Roberts, 2000]. Diese Proteine ermöglichen den bidirektionalen Transport von Wasser und einigen gelösten, niedermolekularen Substanzen durch die Membran. Im Falle des Wassertransportes werden sie auch als Aquaporine bezeichnet. Der

Transport von Wasser sowie löslicher Substanzen ist während der Entwicklung und in Stresssituationen für die Pflanzen von Bedeutung. MIPs werden dabei unterschiedlich transkriptionell reguliert. So kann eine negative Expressionsregulation unter Salzstress einem weiteren Wasserverlust vorbeugen. Pflanzen haben somit die Möglichkeit bei veränderten Umweltbedingungen den Wasserhaushalt anzupassen [Jang et al., 2004; Wallace und Roberts, 2004]. Möglicherweise trägt die negative Expressionsregulation eines MIPs auch zum Gleichgewicht des Wasserhaushaltes während der Pathogenabwehr bei.

Um ein ebenfalls Stress assoziiertes Gen scheint es sich bei Fag-B-IES1,5h-GF-18_29 zu handeln. Die cDNA-Sequenz zeigte auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit einem *universal stress protein* (Usp) aus *Arabidopsis*. Diese Familie konnte bisher konserviert in Bakterien, Pilzen, Insekten und Pflanzen gefunden werden. Untersuchungen an Prokaryoten haben gezeigt, dass eine Induktion der Usps durch Wachstumsstillstand, Unterversorgung mit Kohlenhydraten, Stickstoff, Phosphat, Sulphat und AS sowie durch Hitze, Oxidationsmittel, Metalle, Antibiotika und andere Stressstimuli erfolgt [Kvint et al., 2003].

Im Reis konnte zudem die transkriptionelle Aktivierung eines ET regulierten Usp-Gens, dem *OsUsp1*, unter Stressbedingungen nachgewiesen werden [Sauter et al., 2002].

Aufgrund dieser Aktivierungsbedingungen wäre die erhöhte Expression eines Usp-Gens vielmehr im IES behandelten Gewebe als im unbehandelten Vergleichsgewebe zu erwarten.

Wie allerdings Untersuchungen des *UspA* in *Escherichia coli* gezeigt haben, ist unter einigen Stresssituationen, wie z.B. extremer Temperatur oder Belastung mit Tetracyclin, eine Repression statt einer Induktion des Gens zu beobachten [Kvint et al., 2003]. Möglicherweise führt auch die IES-Behandlung in 'Börner' zu einer negativen Regulation eines Usp vergleichbaren Genes.

Aus der 1,5-h-Probe konnte weiterhin die cDNA-Sequenz Fag-B-IES1,5h-GF-02_20 isoliert werden. Eine Amplifikation dieser cDNA erfolgte nur im IES behandelten Gewebe und deutete damit auf eine differenzielle Expression des entsprechenden Gens hin. Die Sequenz zeigte auf AS-Ebene Übereinstimmungen mit dem HB5 aus *Arabidopsis*, das zur Familie der Homeodomän (HD)-Proteine und im Speziellen zur Familie der HD-Leucinzipper (HD-Zip) gehört. HD-Proteine sind weit verbreitet und neben Pflanzen auch in Pilzen, Tieren sowie beim Menschen zu finden. Sie fungieren als TFs und sind in Entwicklungsprozesse involviert [Chan et al., 1998]. Bei der HD-Zip-Familie handelt es sich um Proteine, die spezifisch in Pflanzen vorkommen und deren Funktion in der Zelldifferenzierung und Zellelongation liegt [Johannesson et al., 2001]. Die Expression der HD-Zip-Gene wird dabei von Wachstum

assoziierten Faktoren wie Licht, Verletzungen, Stress und Hormone reguliert [Chan et al., 1998; Son et al., 2005]. So ist im Falle des *HB5*-Gens bekannt, dass seine Transkription in *Arabidopsis* durch Auxin induziert wird [Son et al., 2005]. Daher ist eine IES bedingte differenzielle Expression eines vergleichbaren Gens in 'Börner' denkbar. Zudem liegen Hinweise auf die transkriptionelle Aktivierung weiterer HD-Proteine in der 2,5-h- und 4,5-h-Probe vor (siehe Anhang, Tabelle 8.1). Da diese Proteine jedoch an Entwicklungsprozessen der Pflanze beteiligt sind, ist eine Funktion in der Resistenzreaktion nicht wahrscheinlich.

4.4 Potenzielle Signaltransduktionswege zur Aktivierung von Resistenzreaktionen durch IES

Insbesondere die Ergebnisse aus der 2,5-h- und 4,5-h-Probe bestätigen die Annahme, dass die IES das Potenzial zur Aktivierung der HR und weiterer Resistenzreaktionen in 'Börner' besitzt. So konnten Hinweise auf die Expression von PR-Proteinen, Phytoalexinen sowie HR assoziierter Proteine gefunden werden. Von großem Interesse sind dabei die Signalwege, die diesem Abwehrmechanismus zu Grunde liegen. Die vorangegangenen Kapitel haben bereits gezeigt, dass in diesem Zusammenhang Hinweise gefunden werden konnten. Wie aus Abbildung 4.6 hervorgeht, können aufgrund dieser Ergebnisse einige Signaltransduktionswege in Betracht gezogen werden, die bei der Weiterleitung des IES-Signals und bei der Aktivierung von Resistenzreaktionen beteiligt sein könnten.

Dabei muss zunächst die Erkennung des Hormons durch die Zelle erfolgen. Dies kann extrazellulär über spezifische IES-Rezeptoren geschehen, wie z.B. über *lecRKs* oder ein *ABP1* ähnliches Protein. Obwohl in der Literatur keine Anhaltspunkte diesbezüglich gefunden wurden, ist auch eine Interaktion der IES mit R-Proteinen in Betracht zu ziehen. Eine Erkennung der IES durch Rezeptoren trägt möglicherweise direkt zur Aktivierung von Resistenzreaktionen bei.

Neben einer extrazellulären Signalinitiierung kann auch die Aufnahme des Hormons in die Zelle und die Induktion des Ub/26S-Proteolyseweges erfolgen. Dies wiederum resultiert in der transkriptionellen Aktivierung u. a. von Ionenkanälen, GTPasen, TFs und Kinasen. Diese Komponenten setzen ihrerseits Prozesse in Gang, die zur Induktion von Abwehrmechanismen führen können. Eventuell spielen auch hier R-Proteine eine wesentliche Rolle. Denkbar wäre eine IES induzierte Überexpression dieser Proteine, die auch ohne eine Interaktion mit einem entsprechenden Avr-Genprodukt zur Pathogenabwehr beitragen.

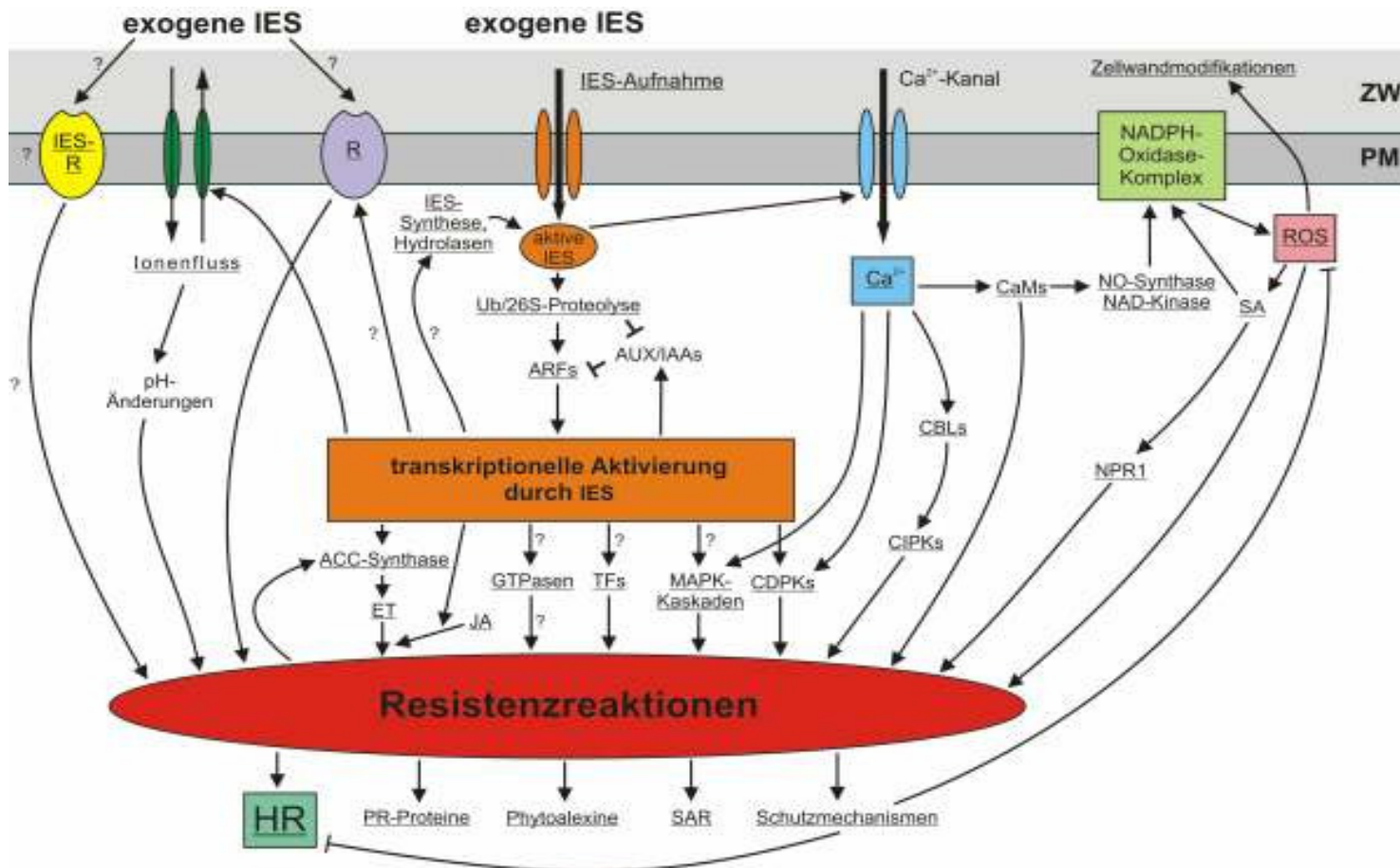


Abb. 4.6: Potenzielle Signaltransduktionswege zur Aktivierung von Resistenzreaktionen durch IES

Gene bzw. Signalvorgänge, für deren Expression bzw. Aktivierung Hinweise in den Ergebnissen gefunden wurden, sind unterstrichen; Indol-3-Essigsäure (IES), IES-Rezeptor (IES-R), Resistenzprotein (R), Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat H (NADPH)-Oxidasekomplex, *reactive oxygen species* (ROS), Zellwand (ZW), Plasmamembran (PM), Ubiquitin/26S (Ub/26S)-Proteolyse, *auxin response factors* (ARFs), *auxin/indole-3-acetic acid* (AUX/IAAs), Calcium (Ca²⁺), Ca²⁺ dependent protein kinases (CDPKs), *calineurin B like* (CBLs), *CBL interacting protein kinases* (CIPKs), Calmoduline (CaMs), Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase, Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)-Kinase, *salicylic acid* (SA), *non-expressor of pathogenesis-related genes 1* (NPR1), Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden, Transkriptionsfaktoren (TFs), Guanosinriphosphat (GTP)asen, *jasmonic acid* (JA), Ethylen (ET), 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC)-Synthase, Hypersensitivitätsreaktion (HR), *pathogenesis-related* (PR)-Proteine, *systemic acquired resistance* (SAR)

Es ist weiterhin von einer Beteiligung des ET- und JA-Signalweges auszugehen. Dabei trägt die IES über die Aktivierung der ACC-Synthase zur Bildung von ET bei. In einem komplexen Zusammenspiel dieser drei Hormone erfolgt dann eine transkriptionelle Aktivierung von Resistenz assoziierten Genen. Da der induzierte Abwehrprozess wiederum die ET-Synthese fördert, liegt an dieser Stelle eine Signalamplifikation vor.

Eine positive Feedbackregulation besteht möglicherweise auch im Hinblick auf das eigentliche IES-Signal, indem das Hormon die eigene Synthese induziert oder Hydrolasen zur Freisetzung der IES aus Konjugatverbindungen aktiviert.

Mit großer Wahrscheinlichkeit sind für die Signaltransduktion auch Ca^{2+} und ROS von zentraler Bedeutung. So kann die IES ein kurzzeitiges Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen und somit einen Anstieg der cytosolischen Konzentration des Ions bewirken. Über Ca^{2+} -Sensorproteine, wie CDPKs, CBLs und CaMs, kann die Induktion weiterer Prozesse erfolgen. Dazu gehört u. a. auch die Aktivierung des *oxidative burst* über die NO-Synthase und NAD-Kinase. ROS als zentrale Komponenten der pflanzlichen Pathogenabwehr induzieren wiederum Zellwandmodifikationen, die SA und NPR1 bedingte Signaltransduktion sowie weitere Reaktionen, die zur Resistenz führen.

Damit wird deutlich, dass die IES über viele Signalwege eine Resistenzreaktion in Gang setzen kann. Da das Hormon jedoch an weiteren physiologischen Prozessen der Pflanze beteiligt ist, muss von einer komplexen Regulation der IES-Antwort ausgegangen werden. Es stellt sich die Frage, welche Bedingungen vorliegen müssen, damit die IES in 'Börner' nicht nur als Wachstumshormon, sondern als Resistenz induzierendes Signal fungiert. Die wahrscheinlichste Erklärung liegt in der Hormonkonzentration. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Behandlung der 'Börner'-Wurzeln, angelehnt an die Arbeiten von El-Nady (2001), eine IES-Lösung mit einer unphysiologisch hohen Konzentration von ca. 5,7 mM eingesetzt. Möglicherweise muss die IES-Konzentration einen bestimmten Schwellenwert überschreiten, damit es in der Pflanze zur Resistenzreaktion kommt. So konnten Tena und Renaudin (1998) auch an Tabakzellen zeigen, dass erst eine unphysiologisch hohe Menge des Hormons zur Aktivierung einer MAPK führt. Auch die Auxin bedingte Transkription von ACC-Synthasen zur Bildung von ET erfolgt erst bei hohen IES-Konzentrationen [Stepanova, 2005]. Als initiiertes Signal wäre z.B. die Interaktion der IES mit Rezeptoren in Betracht zu ziehen, deren Aktivierung nur durch extreme Hormonkonzentrationen ausgelöst wird.

Im Hinblick auf die Signalwege, die bei einem Reblausbefall von 'Börner' in Gang gesetzt werden, können aufgrund mangelnder Ergebnisse aus der R-Probe nur limitiert Aussagen

getroffen werden. Wie bereits in Kapitel 1.4 geschildert, ist auch bei der natürlichen Induktion von Gallen bzw. Nekrosen von einer zentralen Rolle der IES auszugehen. Es stellt sich jedoch hierbei die Frage, wie und in welcher Form das initiiierende Signal hervorgerufen wird. Es ist in Betracht zu ziehen, dass eine lokale Steigerung der IES-Konzentration im betroffenen Pflanzengewebe auf eine direkte Zufuhr des Hormons über den ReblausSpeichel erfolgt. Wie bereits erwähnt, konnte Schäller (1968) den Gehalt von IES im Speichel des Schädling nachweisen. Dabei ergab sich eine Konzentration, die im optimalen Wachstum fördernden Bereich des Hormons von 10^{-5} M lag. Inwieweit jedoch diese Menge ausreicht, um Gallen bei anfälligen Reben bzw. eine Resistenzantwort bei 'Börner' zu induzieren, ist nicht bekannt. Untersuchungen an Zysten und Gallen bildenden Nematoden haben gezeigt, dass eine lokale Steigerung der IES-Konzentration auch sekundär durch den Schädling erfolgen kann [Karczmarek et al., 2004]. Denkbar ist z.B. die Freisetzung aktiver IES aus Konjugatverbindung mit Hilfe proteolytischer Enzyme des Speichels. Diese Erklärung wurde auch von Schäller (1959) für einen erhöhten IES-Gehalt im Reblaus infizierten Pflanzengewebe angenommen. Weiterhin ist eine Aktivierung der IES-Synthese in der Pflanze durch Substanzen des Insektspeichels in Betracht zu ziehen. Möglicherweise spielt hierbei im Speichelsekret vorhandenes Tryptophan als Ausgangssubstanz für die Hormonsynthese eine entscheidende Rolle. Als dritte Möglichkeit kommt ein veränderter Auxintransport in Frage. So können Effluxtransporter des Hormons durch Flavonoide blockiert werden und damit zur IES-Akkumulation im Gewebe beitragen [Goverse et al., 2000]. Eventuell fällt den von Schäller (1968) im ReblausSpeichel gefundenen phenolischen Substanzen eine solche Funktion zu.

Ungeachtet der Tatsache, ob die Steigerung des IES-Gehaltes primär und/oder sekundär durch die Reblaus erfolgt, können die nachfolgenden Prozesse, die bei 'Börner' zur Aktivierung der HR und weiterer Resistenzreaktionen führen, identisch zu denen der experimentellen Induktion verlaufen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass die oben geschilderten potenziellen Signaltransduktionswege ebenfalls für eine Reblaus induzierte Resistenzreaktion in Frage kommen.

5. Ausblick

Zur Erzeugung transgener, reblausresistenter Unterlagsreben sind fundierte Kenntnisse über den Resistenzmechanismus von essenzieller Bedeutung. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern eine entscheidende Grundlage zum Verständnis dieses Mechanismus. Insbesondere das Screening der subtrahierten 2,5-h- und 4,5-h-Probe mit Hilfe der Microarraytechnik ergab eine Vielzahl aufschlussreicher Resultate. Um darauf aufbauend weitere Untersuchungen anschließen zu können, müsste angelehnt an die Microarrayergebnisse eine Isolierung der entsprechenden 'Börner'-Gene aus den subtrahierten Proben erfolgen, wie dies bereits im Rahmen dieser Arbeit für einige Gene durch eine spezifische Amplifikation erfolgreich durchgeführt wurde. In diesem Zusammenhang sollte zukünftig auch eine weitere Verifizierung der Resultate erfolgen, wie z.B. durch die *northern-blot*-Technik oder eine quantitative *real-time* RT-PCR. Diese Untersuchungen können klären, inwieweit eine differenzielle Expression der Gene im hypersensitiven Gewebe im Vergleich zum unbehandelten Gewebe vorliegt.

Zum Verständnis der biochemischen und zellulären Funktion der Gene im Resistenzmechanismus könnten außerdem funktionelle Analysen einen entscheidenden Beitrag leisten, wie z.B. *knock-out*-, Antisense- oder *RNA-interference* (RNAi)-Techniken [Arenz und Schepers, 2003]. Jedoch ist hierbei in vielen Fällen ein Transformationssystem notwendig, das insbesondere für 'Börner' gegenwärtig noch an der erfolgreichen Regeneration somatischer Embryonen scheitert (Geier, Schröder, persönliche Kommunikation, 2005) und zukünftig optimiert werden muss.

Kenntnisse über die Funktion der Gene könnten ebenfalls durch die Einbeziehung anfälliger und toleranter Rebsorten als Vergleichssysteme gewonnen werden. Hierbei könnte analog zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit die HR experimentell durch IES oder durch eine Reblausinfektion induziert und mit Hilfe entsprechender Analysemethoden die Expression ausgewählter Gene untersucht werden.

Im Hinblick auf die Erforschung der Reblaus induzierten HR sind jedoch in zukünftigen Versuchen weitere Optimierungen notwendig. Mit Hilfe der Microarraytechnik konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur wenige Resultate aus der R-Probe gewonnen werden. Eventuell wäre hier die Anwendung der cDNA-Subtraktion von größerem Vorteil, da sie die Anreicherung differenziell exprimierter Gene, die in geringen mRNA-Konzentrationen vorliegen, ermöglicht. Insbesondere die Kombination aus cDNA-Subtraktion und anschließender Microarrayanalyse zum Screening der subtrahierten Proben hat sich als erfolgreiche Methode herausgestellt. Zukünftige Optimierungen der Techniken können zu

einer weiteren Absicherung der Ergebnisse beitragen. In der Zwischenzeit ist auch der kommerzielle Erwerb eines *whole-genome Vitis*-Microarraychip mit ca. 18000 Transkripten von *Vitis vinifera* und anderen *Vitis*-Arten über die AFFYMETRIX Inc. (USA) möglich. Der Einsatz eines solchen Microarrays könnte ebenfalls zu einer höheren Spezifität der Ergebnisse beisteuern.

6. Zusammenfassung

Die Unterlagsrebsorte 'Börner' reagiert auf einen Reblausbefall mit einer Hypersensitivitätsreaktion (HR), die sich in Form von Nekrosen an Blättern und Wurzeln zeigt. 'Börner' gilt damit als vollständig reblausresistent. Um zur Unterstützung der klassischen Züchtung zukünftig auch die Erzeugung transgener, reblausresistenter Rebsorten zu ermöglichen, sind molekulargenetische Kenntnisse über den Mechanismus der Reblausresistenz von großer Bedeutung.

In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Dissertation der Resistenzmechanismus mittels differenzieller Genexpressionsanalysen untersucht. Unter Anwendung der suppressiven subtraktiven Hybridisierung, der Microarraytechnik sowie der GeneFishingTM-Methode erfolgte ein Vergleich zwischen der Genexpression in hypersensitivem Wurzelgewebe und Normalgewebe der Unterlagsrebe 'Börner'. Neben der Reblaus induzierten HR wurde insbesondere auf die experimentelle Induktion durch das Pflanzenhormon Indol-3-Essigsäure (IES) zurückgegriffen. Damit sollten Kenntnisse über die Rolle der IES als auslösender Faktor der Resistenzreaktion gewonnen werden.

Die Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die IES Pathogenabwehrreaktionen, wie die HR, in 'Börner' induziert. So konnten Hinweise auf die transkriptionelle Aktivierung Resistenz und HR assoziierter Proteine gefunden werden, wie z.B. Phytoalexine, Resistenz (R)- und *pathogen-related* (PR)-Proteine sowie Vertreter aus der *hypersensitive-induced response* (HIR)-Familie.

Es konnten weiterhin wertvolle Informationen im Hinblick auf die Transduktion des IES-Signals im Zusammenhang mit der Aktivierung von Resistenzreaktionen gewonnen werden. So wurden Hinweise auf die Beteiligung der Signalsubstanzen Ethylen, Salicylsäure, Jasmonsäure, Calcium sowie reaktiver Sauerstoffspezies gefunden. Es konnten zudem Anhaltspunkte für die Aktivierung des Auxin induzierten Ubiquitin/26S-Proteolyseweges und weiterer Signalkomponenten, wie z.B. Kinasen und Transkriptionsfaktoren, ermittelt werden. Auch auf die Beteiligung von Auxinrezeptoren konnte aufgrund der Resultate geschlossen werden. Damit war es im Rahmen der Dissertation möglich, potenzielle Signaltransduktionswege zu erarbeiten, die für weiterführende Untersuchungen des Reblausresistenzmechanismus von entscheidender Bedeutung sind.

7. Literatur

- Agrios, G. N. (1988): Plant Pathology. Academic Press Inc. (London).
- Aharoni, A. und Vorst, O. (2001): DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Mol Biol* **48**: 99-118.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, F. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Anders, F. (1957): Neuere Auffassungen über die Reblaus-Resistenz. *Vitis* **1**: 142-152.
- Arenz, C. und Schepers, U. (2003): RNA interference: from an ancient mechanism to a state of the art therapeutic application? *Naturwissenschaften* **90**: 345-359.
- Baiges, I. und Mas, A. (2003): Good quality Vitis RNA obtained from an adapted DNA isolation protocol. *J Int Sci Vigne Vin* **37**: 59-61.
- Bak, S. und Feyereisen, R. (2001): The Involvement of Two P450 Enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in Auxin Homeostasis and Glucosinolate Biosynthesis. *Plant Physiol* **127**: 108-118.
- Batistic, O. und Kudla, J. (2004): Integration and channeling of calcium signaling through the CBL calcium sensor/CIPK protein kinase network. *Planta* **219**: 915-924.
- Bechtold, U., Murphy, D. J. und Mullineaux, P. M. (2004): Arabidopsis Peptide Methionine Sulfoxide Reductase2 Prevents Cellular Oxidative Damage in Long Nights. *Plant Cell* **16**: 908-919.
- Becker, H. und Brückbauer, H. (1955): Untersuchungen zur Histogenese der Reblausgallen. *Gartenbauwiss* **19**: 450-456
- Beers, E. P., Woffenden, B. J. und Zhao, C. (2000): Plant proteolytic enzymes: possible roles during programmed cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 399-415.
- Beguiristain, T., Grandbastien, M.-A., Puigdomènech, P. und Casacuberta, J. M. (2001): Three Tnt1 Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. Consequences for Retrotransposon Control and Evolution in Plants. *Plant Physiol* **127**: 212-221.
- Belenghi, B., Accondia, F., Trovato, M., Perazzolli, M., Bocedi, A., Polticelli, F., Ascenci, P. und Delledonne, M. (2003): AtCYS1, a cystatin from *Arabidopsis thaliana*, suppresses hypersensitive cell death. *Eur J Biochem* **270**: 2593-2604.
- Berger, T., Brigl, M., Herrmann, J. M., Vielhauer, V., Luckow, B., Schlöndorff, D. und Kretzler, M. (2000): The apoptosis mediator mDAP-3 is a novel member of a conserved family of mitochondrial proteins. *J Cell Sci* **113**: 3603-3612.
- Binyamin, L., Falah, M., Portnoy, V., Soudry, E. und Gepstein, S. (2001): The early light-induced protein is also produced during leaf senescence of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **212**: 591-597.
- Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* **16**: 6-21.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979): A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* **7**: 1513-1522.
- Blakeslee, J. J., Peer, W. A. und Murphy, A. S. (2005): Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 494-500.
- Bogdanove, A. J. (2002): Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Mol Biol* **50**: 981-989.
- Bogdanove, A. J. und Martin, G. B. (2000): AvrPto-dependent Pto-interacting proteins and AvrPto-interacting proteins in tomato. *PNAS* **97**: 8836-8840.

- Bolle, C., Koncz, C. und Chua, N-H. (2000): PAT1, a new member of the GRAS family, is involved in phytochrome A signal transduction. *Genes Dev* **14**: 1269-1278.
- Bonas, U. and Lahaye, T. (2002): Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* **5**: 44-50.
- Börner, C. (1943): Die ersten reblausimmunen Rebenkreuzungen. *Sonderabdruck aus „Angewandte Botanik“* **XXV, 1 u. 2**: 126-143.
- Botella, J. R., Arteca, J. M., Somodevilla, M. und Arteca, R. N. (1996): Calcium-dependent protein kinase gene expression in response to physical and chemical stimuli in mungbean (*Vigna radiata*). *Plant Mol Biol* **30**: 1129-1137.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. und Lamb, C. (1994): Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1713.
- Brunner, F., Stintzi, A., Fritig, B. und Legrand, M. (1998): Substrate specificities of tobacco chitinases. *Plant J* **14**: 225-234.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds. (2000): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- Buchanan-Wollaston, V. und Ainsworth, C. (1997): Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridisation. *Plant Mol Biol* **33**: 821-834.
- Buhot, N., Gomès, E., Milat, M.-L., Ponchet, M., Marion, D., Lequeu, J., Delrot, S., Coutos-Thévenot, P. und Blein J.-P. (2004): Modulation of the Biological Activity of a Tobacco LTP1 by Lipid Complexation. *Mol Biol Cell* **15**: 5047-5052.
- Busov, V. B., Johannes, E., Whetten, R. W., Sederoff, R. R., Spiker, S. L., Lanz-Gracia, C. und Goldfarb, B. (2004): An auxin-inducible gene from loblolly pine (*Pinus taeda* L.) is differentially expressed in mature and juvenile-phase shoots and encodes a putative transmembrane protein. *Planta* **218**: 916-927.
- Butler, E. und Gallagher, T. F. (2000): Characterization of auxin-induced *ARRO-1* expression in the primary root of *Malus domestica*. *J Exp Bot* **51**: 1765-1766.
- Byers, R. J., Hoyland, J. A., Dixon, J. und Freemont, A. J. (2000): Subtractive hybridization – genetic takeaways and the search for meaning. *Int J Exp Path* **81**: 391-404.
- Carimi, F., Zottini, M., Formentin, E., Terzi, M. und Lo Schiavo, F. (2003): Cytokinins: new apoptotic inducers in plants. *Planta* **216**: 413-421.
- Casati, P., Drincovich, M. F., Edward, G. E. und Andreo, C. S. (1999): Malate metabolism by NADP-malic enzyme in plant defense. *Photosynth Res* **61**: 99-105.
- Century, K. S., Shapiro, A. D., Repetti, P. P., Dahlbeck, D., Holub, E. und Staskawicz, B. J. (1997): *NDRI*, a Pathogen-Induced Component Required for *Arabidopsis* Disease Resistance. *Science* **278**: 1963-1965.
- Chan, R. L., Gago, G. M., Palena, C. M. und Gonzalez, D. H. (1998): Homeoboxes in plant development. *Biochim Biophys Acta* **1442**: 1-19.
- Chandler, J. W. und Werr, W. (2003): When negative is positive in functional genomics. *Trends Plant Sci* **8**: 279-285.
- Chandra, S., Heinsteins, P. F. und Low, P. S. (1996): Activation of Phospholipase A by Plant Defense Elicitors. *Plant Physiol* **110**: 979-986.
- Chang, C. und Shockey, J. A. (1999): The ethylen-response pathway signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 352-358.
- Chen, J.-G., Ullah, H., Young, J. C., Sussman, M. R. und Jones, A. M. (2001): ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* **15**: 902-911.

- Chen, K., Du, L. und Chen, Z. (2003): Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **53**: 61-74.
- Chen, K., Fan, B., Du, L. und Chen, Z. (2004): Activation of hypersensitive cell death by pathogen-induced receptor-like protein kinases from *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **56**: 271-283.
- Chen, T. H. und Murata, N. (2002): Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Biol* **5**: 250-257.
- Chenchik, A., Zhu, Y. Y., Diatchenko, L., Li, R., Hill, J. und Siebert, P. D. (1998): Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR. In Siebert, P. and Larrick, J. (eds). *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. Biotechniques Books, Natick, MA, 305-319.
- Cheng, S.-H., Willmann, M. R., Chen, H.-C. und Sheen, J. (2002): Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiol* **129**: 469-485.
- Cheng, W. und Singh, K. (1999): The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of Arabidopsis *GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. *Plant J* **19**: 667-677.
- Chow, D. C. und Forte, J. C. (1995): Functional Significance of the β -Subunit for Heterodimeric P-Type ATPases. *J Exp Biol* **198**: 1-17.
- Colón-Carmona, A., Chen, D. L., Yeh, K.-C. und Abel, S. (2000): Aux/IAA Proteins are Phosphorylated by Phytochrome in Vitro. *Plant Physiol* **124**: 1728-1738.
- Coppinger, P., Repetti, P. P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A. und Staskawicz, B. J. (2004): Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **40**: 225-237.
- Cox, A. D. und Der, C. J. (2003): The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**: 8999-9006.
- Crespi, M. und Gálvez, S. (2000): Molecular Mechanisms in Root Nodule Development. *J Plant Growth Regul* **19**: 155-166.
- Cruciat, C.-M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W. und Stuart R. A. (1999): Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc₁* complex. *EMBO J* **18**: 5226-5233.
- Cui, X. und Churchill, G. A. (2003): Statistical tests for differential expression in cDNA microarray experiments. *Genom Biol* **4**: Art. 210.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.-B. und Roby, D. (1999): A novel *myb* oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J* **20**: 57-66.
- Davies, R. T., Goetz, D. H., Lasswell, J., Anderson, M. N. und Bartel, B. (1999): *IAR3* Encodes an Auxin Conjugate Hydrolase from Arabidopsis. *Plant Cell* **11**: 365-376.
- Davletova, S., Mészáros, T., Miskolczi, P., Oberschall, A., Török, K., Magyar, Z., Dudits, D. und Deák, M. (2001): Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J Exp Bot* **52**: 215-221.
- De Jong, A. J., Yakimova, E. T., Kapchina, V. M. und Woltering, E. J. (2002): A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* **214**: 537-545.
- De Torres Zabela, M., Fernandez-Delmond, I., Niittyta, T., Sanchez, P. und Grant, M. (2002): Differential Expression of Genes Encoding *Arabidopsis* Phospholipases after Challenge with Virulent or Avirulent *Pseudomonas* Isolates. *MPMI* **15**: 808-816.

- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. und Lamb, C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *PNAS* **98**: 13454-13459.
- Desikan, R., Neill, S. J. und Hancock, J. T. (2000): Hydrogen Peroxide-induced Gene Expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radic Biol Med* **28**: 773-778.
- Desveaux, D. Marechal, A. und Brisson, N. (2005): Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *Trends Plant Sci* **10**: 95-102.
- Devoto, A., Muskett, P. R. und Shirasu, K. (2003): Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 307-311.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. und Estelle, M. (2005): The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- Dhugga, K. (2001): Building the wall: genes and enzyme complexes for polysaccharide synthases. *Curr Plant Biol* **4**: 488-493.
- Diatchenko, L., Lau, Y.-F. C., Campell, A. P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E. D. und Siebert, P. D. (1996): Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:6025-6030.
- Diehl, F., Grahlmann, S., Beier, M. and Hoheisel, J. D. (2001): Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal. *Nucleic Acids Res* **29**: 2-5.
- Dietrich, A. (2002): Charakterisierung von RNA aus hypersensitivem Wurzelgewebe der reblausresistenten Unterlagsrebe 'Börner'. Diplomarbeit am Institut für Molekulargenetik, Johannes Gutenberg Universität Mainz.
- Diévert, A. und Clark, S. E. (2004): LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Dev* **131**: 251-261.
- Dong, J., Chen, C. und Chen, Z. (2003): Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol Biol* **51**: 21-37.
- Donson, J., Fang, Y., Espiritu-Santo, G., Xing, W., Salazar, A., Miyamoto, S., Armendarez, V. und Volkmath, W. (2002): Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol* **48**: 75-97.
- Downward, J. (1998): Ras signaling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 49-54.
- Duggan, D. J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J. M. (1999): Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet* **21**: supplement.
- El-Nady, M. F. (2001): Untersuchungen zum Mechanismus der Reblausresistenz der Unterlagsrebe 'Börner', Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg- Universität in Mainz.
- Endege, W. O., Steinmann, K. E., Boardman, L. A., Thibodeau, S. A. and Schlegel, R. (1999): Representative cDNA Libraries and their Utility in Gene Expression Profiling. *BioTechniques* **26**:542-550.
- Engels, W. R. (1993): Contributing software to the Internet: the Amplify program. *Trends Biochem Sci* **18**: 448-450.
- Eulgem, T. (2005): Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* **10**: 72-78.
- Eulgem, T., Weigman, V. J., Chang, H.-S., McDowell, J. M., Holub, E. B., Glazebrook, J., Zhu, T. und Dangl, J. L. (2004): Gene Expression Signatures from Three Genetically Separable Resistance Gene Signaling Pathways for Downy Mildew Resistance. *Plant Physiol* **135**: 1129-1144.
- Farmer, E. E., Alméras, E. und Krishnamurthy, V. (2003): Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 372-378.

- Favery, B., Complainville, A., Vinardell, J. M., Lecomte, P., Vaubert, D., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Crespi, M. und Abad, P. (2002): The Endosymbiosis-Induced Genes *ENOD40* and *CCS52a* are Involved in Endoparasitic-Nematode Interactions in *Medicago truncatula*. *MPMI* **15**: 1008-1013.
- Ferrer, J.-L., Jez, J. M. Bowman, M. E., Dixon, R. A. und Noel J. P. (1999): Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat Struct Biol* **6**: 775-784.
- Finkelstein, D., Ewing, R., Gollub, J., Sterky, F., Cherry, J. M. and Somerville, S. (2002): Microarray data quality analysis: lessons from the AFGC project. *Plant Mol Biol* **48**: 119-131.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G. und Ebel, J. (2004): An ancient domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soyabean may play an active part in the perception of the pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem* **279**: 1132-1140.
- Forneck, A., Jin, Y., Walker, A. und Blaich, R. (1999): Karyotypes studies on grape phylloxera (*Daktulosphæra vitifoliae* Fitch). *Vitis* **38**: 123-125
- Frias, I., Caldeira, M. T., Pérez-Castineira, J. R., Navarro-Avinó, J. P., Cilianez-Maciá, F. A., Kuppinger, O., Stransky, H., Pagés, M. P., Hager, A. und Serrano, R. (1996): A Major Isoform of the Maize Plasma Membrane H⁺-ATPase: Characterization and Induction by Auxin in Coleoptiles. *Plant Cell* **8**: 1533-1544.
- Fulton, L. M. und Cobbett, C. S. (2003): Two α -L-arabinofuranosidase genes in *Arabidopsis thaliana* are differentially expressed during vegetative growth and flower development. *J Exp Bot* **54**: 2467-2477.
- Gao, M.-J., Parkin, I. A. P., Lydiate, D. J. und Hannoufa, A. (2004): An auxin-responsive SCARECROW-like transcriptional activator interacts with histone deacetylase. *Plant Mol Biol* **55**: 417-431.
- Gaspar, Th., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crèvecoeur, M., Penel, Cl. Greppin, H. und Dommes, J. (2003): Changing concepts in plant hormone action. *In Vitro Cell Dev Biol* **39**: 85-106.
- Gaspar, Y., Johnson, K. L., McKenna, J. A., Bacic, A. und Schultz, C. J. (2001): The complex structure of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Mol Biol* **47**: 161-176.
- Gassmann, W., Hinsch, M. und Staskawicz, B. J. (1999): The *Arabidopsis* *RPS4* bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J* **20**: 265-277.
- Geiduschek, E. P. und Kassavetis, G. A. (2001): The RNA Polymerase III Transcription Apparatus. *J Mol Biol* **310**: 1-26.
- Genoud, T., Buchala, A. J., Chua, N. H. und Metraux, J. P. (2002): Phytochrome signaling modulates the SA-perceptive pathway in *Arabidopsis*. *Plant J* **31**: 87-95.
- Goverse, A., Overmars, H., Engelbertink, J., Schots, A., Bakker, J. und Helder, J. (2000): Both Induction and Morphogenesis of Cyst Nematode Feeding Cells Are Mediated by Auxin. *MPMI* **13**: 1121-1129.
- Grandbastien, M.-A., Lucas, H., Morel, J.-B., Mhiri, C. Vernhettes, S. und Casacuberta, J. M. (1997): The expression of the tobacco Tnt1 retrotransposon is linked to plant defense responses. *Genetica* **100**: 241-252.
- Greenberg, J. T. (1997): Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 525-545.
- Greenberg, J. T. und Yao, N. (2004): The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 201-211.
- Greenhagen, B. und Chappell, J. (2001): Molecular scaffolds for chemical wizardry: Learning nature's rules for terpene cyclases. *PNAS* **98**: 13479-13481.
- Gualtieri, G. und Bisseling, T. (2000): The evolution of nodulation. *Plant Mol Biol* **42**: 181-194.

- Guenther J. F. und Roberts, D. M. (2000): Water-selective and multifunctional aquaporins from *Lotus japonicus* nodules. *Planta* **210**: 741-748.
- Gutterson, N. und Reuber, T. L. (2004): Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 465-471.
- Hager, A. (2003): Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in Auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *J Plant Res* **116**: 483-505.
- Heath, M. C. (1998): Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**: 117-124.
- Heath, M. C. (2000a): Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-334.
- Heath, M. C. (2000b): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**:315-319.
- Heldt, W. (2003): Pflanzenbiochemie. 3. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Hennig, W. (1998): Genetik. 2. Auflage. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Hermann, J. V. (1995): Die Reblaus in Franken – eine alte Bekannte meldet sich zurück. *Rebe & Wein* **2**: 58–60.
- Hervé, C., Serres, J., Dabos, P., Canut, H., Barre, A., Rougé, P. und Lescure, B. (1999): Characterization of the *Arabidopsis lecRK-a* genes: members of a superfamily encoding putative receptors with an extracellular domain homologous to legume lectins. *Plant Mol Biol* **39**: 671-682.
- Heß, D. (1999): Pflanzenphysiologie. 10. Auflage. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Hidden in the Putative β -Glucan Elicitor of Soybean may Play an Active Part in the Perception of Pathogen-associated Molecular Patterns during Broad Host Resistance. *J Biol Chem* **2**: 1132-1140.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inzé, D. und Beeckmann T. (2002): Auxin-Mediated Cell Cycle Activation during Early Lateral Root Initiation. *Plant Cell* **14**:2339-2351.
- Hirano, T. (1999): SMC-mediated chromosome mechanics: a conserved scheme from bacteria to vertebrates? *Genes Dev* **13**:11–19
- Hoeberichts, F. A. und Woltering, E. J. (2002): Multiple mediators of plant programmed cell death: interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. *BioEssays* **25**: 47-57.
- Hoffmann-Sommergruber K. (2002): Pathogenesis-related (PR)-proteins identified as allergens. *Biochem Soc Trans* **30**: 930-935
- Hohnjec, N., Küster, H., Albus, U., Frosch, S. C., Becker, J. D., Pühler, A., Perlick, A. M. und Frühling, M. (2000): The broad bean nodulin VfENOD18 is a member of a novel family of plant proteins with homologies to the bacterial MJ0577 superfamily. *Mol Gen Genet* **264**: 241-250.
- Horvath, D. P., Schaffer, R., West, M. und Wisman, E. (2003): *Arabidopsis* microarrays identify conserved and differentially expressed genes involved in shoot growth and development from distantly related plant species. *Plant J* **34**: 125-134.
- Hu, X. und Reddy, A. S. N. (1997): Cloning and expression of a PR5-like protein from *Arabidopsis*: inhibition of fungal growth by bacterially expressed protein. *Plant Mol Biol* **34**: 949-959.
- Hutin, C., Nussaume, L., Moise, N., Moya, I., Kloppstech, K. und Havaux, M. (2003): Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. *PNAS* **100**: 4921-4926.
- Ibrahim, R. K., Bruneau, A. und Bantignies, B. (1998): Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Mol Biol* **36**: 1-10.

- Ichimura, K. et al. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301-307.
- In-Taek, H. Yun-Lee, K., Seung-Hyun, K. Chae-II, K., Young-Yiun, G. und Jong-Yoon, C. (2003): Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *BioTechniques* **35**: 1180-1184.
- Jackson, P. A. P., Galinha, C. I. R., Pereira, C. S., Fortunato, A., Soares, N. C., Amâncio, S. B. Q. und Pinto Ricardo, C. P. (2001): Rapid Deposition of Extensin during the Elicitation of Grapevine Callus Cultures is Specifically Catalyzed by a 40-Kilodalton Peroxidase. *Plant Physiol* **127**: 1065-1076.
- Jang, J. Y., Kim, D. G, Kim, Y. O., Kim, J. S. und Kang, H. (2004): An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **54**: 713-725.
- Jansen, A. P., Camalier, C. E. und Colburn, N. H. (2005): Epidermal Expression of the Translation Inhibitor Programmed Cell Death 4 Suppresses Tumorigenesis. *Cancer Res* **65**: 6034-6041.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M. und Adrian, M. (2002): Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *J Agric Food Chem* **50**: 2731-2741.
- Jez, J. M., Cahoon, R. E. und Chen, S. (2004): *Arabidopsis thaliana* Glutamate-Cysteine Ligase. *J Biol Chem* **279**: 33463-33470.
- Ji, W., Wright, M. B., Cai, L., Flament, A. und Lindpaintner, K. (2002): Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* **3**: 1-7.
- Jiménez-Zurdo, J., Frugier, F., Crespi, M. D. and Kondorosi, A. (2000): Expression Profiles of 22 Novel Molecular Markers for Organogenetic Pathways Acting in Alfalfa Nodule Development. *MPMI* **13**: 96-106.
- Johannesson, H., Wang, Y. und Engstrom, P. (2001): DNA-binding and dimerization preferences of *Arabidopsis* homeodomain-leucine zipper transcription factor in vitro. *Plant Mol Biol* **45**: 63-73.
- Jones, A. M., Im, K.-H., Savka, M. A., Wu, M.-J., DeWitt, N. G., Shillito, R. und Binns, A. N. (1998): Auxin-Dependent Cell Expansion Mediated by Overexpressed Auxin-Binding Protein 1. *Science* **282**: 1114-1117.
- Jordá, L., Coego, A., Conejero, V. und Vera, P. (1999): A Genomic Cluster Containing Four Differentially Regulated Subtilisin-like Processing Protease Genes is in Tomato Plants. *J Biol Chem* **274**: 2360-2365.
- Kaloshian, I. (2004): Gene-for-Gene disease resistance: bridging insect pest and pathogen defense. *J Chem Ecol* **30**: 2419-2438.
- Kamiya, N., Itoh, J.-I., Morikami, A., Nagato, Y. und Matsuoka, M. (2003): The *SCARECROW* gene's role in asymmetric cell division in rice plants. *Plant J* **36**: 45-54.
- Karczmarek, A., Overmars, H., Helder, J. und Govere, A. (2004): Feeding cell development by cyst and root-knot nematodes involves a similar early, local and transient activation of a specific auxin-inducible promoter element. *Mol Plant Pathol* **5**: 343-346.
- Kauffmann, S., Legrand, M., Goeffroy, P. und Fritig, B. (1987): Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J* **6**:3209-3212.
- Kaup, M., Froese, C. D. und Thompson, J. E. (2002): A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol* **129**: 1616-1626.
- Kawano, T. (2003): Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep* **21**: 829-837.

- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. und Shimamoto, K. (1999): The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 10922-10926.
- Kazan, K. (2003): Alternative splicing and proteome diversity in plants: the tip of the iceberg has just emerged. *Trends Plant Sci* **8**: 468-471.
- Kellow, A. V., Sedgley M. und van Heeswijck, R. (2004): Interaction between *Vitis vinifera* and grape *phylloxera*: Changes in root tissue during nodosity formation, *Ann Bot* **93**: 581-590
- Kepinski, S. und Leyser, O. (2002): Ubiquitination and Auxin Signaling: A Degrading Story. *Plant Cell Supplement*: 81-95.
- Killili, K. G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P. N., Makris, M. und Kampranis, S. C. (2004): Differential Roles of Tau Class Glutathione *S*-Transferases in Oxidative Stress. *J Biol Chem* **279**: 24540-24551.
- Kim, B. S., Rha, S. Y., Cho, G. B. und Chung, H. C. (2004): Spearman's footrule as a measure of cDNA microarray reproducibility. *Genomics* **84**: 441-448.
- Kim, M. C., Lee, S. H., Kim, J. K., Chun, H. J., Choi, M. S., Chung, W. S., Moon, B. C., Kang, C. H., Park, C. Y., Yoo, J. H., Kang, Y. H., Koo, S. C., Koo, Y. D., Jung, J. C., Kim, S. T., Schulze-Lefert, P., Lee, S. Y. und Cho, M. J. (2002): Mlo, a Modulator of Plant Defense and Cell Death, Is a Novel Calmodulin-binding Protein. *J Biol Chem* **277**: 19304-19314.
- King, P. D. und Rilling, G. (1991): Further evidence of *phylloxera* biotypes: Variations in the tolerance of mature grapevine roots related to the geographical origin of the insect. *Vitis* **30**: 233-244.
- Kipreos, E. T. und Pagano, M. (2000): The F-box protein family. *Genome Biol* **1**: 3002.1-3002.7.
- Kirik, V., Simon, M., Huelskamp und Schiefelbein, J. (2004): The *ENHANCER OF THE TRY AND CPC1* gene acts redundantly with *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* in trichome and root hair cell patterning in *Arabidopsis*. *Dev Biol* **268**: 506-513.
- Kolukisaoglu, Ü., Weinl, S., Blazevic, D., Batistic, O. und Kudla, J. (2004): Calcium Sensors and Their Interacting Protein Kinases: Genomics of the *Arabidopsis* and Rice CBL-CIPK Signaling Networks. *Plant Physiol* **134**: 43-58.
- Kombrink, E. und Somssich, I. E. (1995): Defense Responses of Plants to Pathogens. *Advances in Botanical Research* **21**: 1-34
- Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena G. und Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *PNAS* **97**: 2940-2945.
- Krajewski, P. und Bocianowski, J. (2002): Statistical methods for microarray assays. *J Appl Genet* **43**: 269-278.
- Krüger, J., Thomas, C. M., Golstein, C., Dixon, M. S., Smoker, M., Tang, S., Mulder, L. und Jones, J. D. G. (2002): A Tomato Cysteine Protease Required for *Cf-2*-Dependent Disease Resistance and Suppression of Autonecrosis. *Science* **296**: 744-747.
- Kunkel, B. N. und Brooks, D. M. (2002): Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 325-331.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. und Nyström, T. (2003): The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin* **6**:140-145.
- Lam, E. und del Pozo, O. (2000): Caspase-like protease involvement in the control of plant cell death. *Plant Mol Biol* **44**: 417-428.
- Lam, E., Kato, N. und Lawton, M. (2001): Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853.

- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997): The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275.
- Lasserre, E., Godard, F., Bouquin, T., Hernandez, J. A., Pech, J.-C., Roby, D. und Balagué, C. (1997): Differential activation of two ACC oxidase gene promoters from melon during plant development and in response to pathogen attack. *Mol Gen Genet* **256**: 211-222.
- Lasswell, J., Rogg, L. E., Nelson, D. C., Rongey, C. und Bartel, B. (2000): Cloning and Characterization of *IAR1*, a Gene Required for Auxin Conjugate Sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**: 2395-2408.
- Lee, S., Hirt, H. und Lee, Y. (2001): Phosphatidic acid activates a wound-activated MAPK in *Glycine max*. *Plant J* **26**: 479-486.
- Lee, S., Kim, S.-Y., Chung, E., Joung, Y.-H., Pai, H.-S., Hur, C.-G. und Choi, D. (2004): EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annum* L.) non-host resistance against soyabean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct Integr Genomics* **4**: 196-205.
- Leung, Y. F. und Cavalieri, D. (2003): Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* **19**: 649-659.
- Li, H. und Poulos, T. L. (2005): Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem* **99**: 293-305.
- Lin, J.-F. und Wu, S.-H. (2004): Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. *Plant J* **39**: 612-628.
- Liscombe, D. K., Macleod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. L. und Facchini, P. J. (2005): Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochem* **66**: 1374-1393.
- Liu, H., Wang, S., Yu, X., Yu, J., He, X., Zhang, S., Shou, H. und Wu, P. (2005): ARL1, a LOB-domain protein required for adventitious root formation in rice. *Plant J* **43**: 47-56.
- Liu, N., Wang, Y. und Ashton-Rickardt, P. G. (2004): Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. *FEBS Letters* **569**: 49-53.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J. J. und Solano, R. (2003): Ethylene Response Factor 1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *Plant Cell* **15**: 165-178.
- Lorrain, S., Vailleau, F., Balagué, C. und Roby, D. (2003): Lesion mimic mutants: keys for deciphering cell death and defense pathways in plants? *Trends Plant Sci* **8**: 263-271.
- Luan, S., Kudla, J., Rodriguez-Concepcion, M., Yalovsky, S. und Grisse, W. (2002): Calmodulins and Calcineurin B-like Proteins: Calcium Sensors for Specific Signal Response Coupling in Plants. *Plant Cell Supplement*: 389-400.
- Mach, J. M., Castillo, A. R., Hoogstraten, R. und Greenberg J. T. (2001): The *Arabidopsis*-accelerated cell death gene *ACD2* encodes red chlorophyll catabolite reductase and suppresses the spread of disease symptoms. *PNAS* **98**: 771-776.
- Magnotta, S. M. und Gogarten, J. P. (2002): Multi site polyadenylation and transcriptional response to stress of a vacuolar type H⁺-ATPase subunit A gene in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **2**:3
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schid, J., Lawton, K. A., Dangl, J. L. und Dietrich, R. A. (2000): The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature* **26**: 403-410.
- Margossian, L. J., Federman, A. D., Giovannoni, J. J. und Fischer, R. L. (1988): Ethylene-regulated expression of a tomato fruit ripening gene encoding a proteinase inhibitor I with a glutamic residue at the reactive site. *Proc Natl Acad Sci* **85**: 8012-8016.
- Marty, F. (1999): Plant Vacuoles. *Plant Cell* **11**: 587-599.

- Miles, P. W. (1999): Aphid saliva. *Biol Rev* **74**: 41-85.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trend Plant Sci* **7**: 405-410.
- Mizutani, M., Ward, E. und Ohta, D. (1998): Cytochrome p450 superfamily in *Arabidopsis thaliana*: isolation of cDNAs, Differential Expression, and RFLP mapping of multiple cytochromes P450. *Plant Mol Biol* **37**: 39-52.
- Munnik, T., Meijer, H. J., Ter Riet, B., Hirt, H. Frank, W., Bartels., D. und Musgarave, A. (2000): Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant J* **22**: 147-154.
- Mysore, K. S. und Ryu, C.-M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* **9**: 97-104.
- Nadimpalli, R., Yalpani, N., Johal, G. S. und Simmons, C. R. (2000): Prohibitins, Stomatins, and Plant Disease Response Genes Compose a Protein Superfamily that Controls Cell Proliferation, Ion Channels Regulation, and Death. *J Biol Chem* **257**: 2957-29586.
- Nakamura, A., Shimada, Y., Goda, H., Fujiwara, M. T., Asami, T. und Yoshida S. (2003): AXR1 is involved in BR-mediated elongation and *SAUR-AC1* gene expression in *Arabidopsis*. *FEBS* **553**: 28-32.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I. und Yoshida, S. (2003): Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* **22**: 887-898.
- Neuteboom, L. W., Ng, J. M. Y., Kuyper, M., Clijedsdale, O. R., Hooykaas, P. J. J. und van der Zaal, B. J. (1999): Isolation and characterization of cDNA clones corresponding with mRNAs that accumulate during auxin-induced lateral root formation. *Plant Mol Biol* **39**: 273-287.
- Newton, R. P. und Smith, C. J. (2004): Molecules of Interest Cyclic nucleotides. *Phytochem* **65**: 2423-2437.
- Niklowitz, W. (1955): Histologische Studien an den Reblausgallen und Reblauswehnekrosen. *Phytopathol Z* **24**: 299-340
- Nürnberg, T. und Brunner, F. (2002): Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 318-324.
- Ohme-Takagi, M., Suzuki, K. und Shinshi, H. (2000): Regulation of Ethylene-Induced Transcription of Defense Genes. *Plant Cell Physiol* **41**: 1187-1192.
- Palatnik, J. F., Valle, E. M. und Carrillo, N. (1997): Oxidative Stress Causes Ferredoxin-NADP⁺ Reductase Solubilization from the Thylakoid Membranes in Methyl Viologen-Treated Plants. *Plant Physiol* **115**: 1721-1727.
- Park, C. Y., Heo, W. D., Yoo, J. H., Lee, J. H., Kim, M. C., Chun, H. J., Moon, B. C., Kim, I. H., Park, H. C., Cho, M. S., Ok, H. M., Cheong, M. S., Lee, S. M., Kim, H. S., Lee, K. H., Lim, C. O., Chung, W. S. und Cho, M. J. (2004): Pathogenesis-related Gene Expression by Specific Calmodulin Isoforms is Dependent on NIM1, a Key Regulator of Systemic Acquired Resistance. *Mol Cells* **18**: 207-213.
- Park, J., Choi, H.-J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z. und Lee, Y. (2000): Rac-Related GTP-Binding Protein in Elicitor-Induced Reactive Oxygen Generation by Suspension-Cultured Soybean Cells. *Plant Physiol* **124**: 725-732.
- Perez-Amador, M. A., Leon, J., Green, P. J. und Carbonell, J. (2002): Induction of the Arginine Decarboxylase *ADC2* Gene Provides Evidence for the Involvement of Polyamines in the Wound Response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **130**: 1454-1463.
- Petalidis, L., Bhattacharyya, S., Morris, G.A., Collins, V. P., Freeman T. C. und Lyons P. A. (2003): Global amplification of mRNA by template-switching PCR: linearity and application to microarray analysis. *Nucleic Acids Res* **31**: e142

- Pieterse, C. M. J. und Loon, L. C. van (2004): NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-464.
- Pontier D., Balague C. und Roby, D. (1998): The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *CR Acad Sci III* **321**: 721-734.
- Pontier, D., Gan, S., Amasino, R. M., Roby, D. und Lam, E. (1999): Markers for hypersensitive response and senescence show distinct patterns of expression. *Plant Mol Biol* **39**: 1243-1255.
- Porten, M. und Hoffmann, C. (2004): Reblaus gestern und heute. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **24**: 16-18.
- Portillo, F. (2000): Regulation of plasma membrane H⁺-ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* **1469**: 31-42.
- Pozo, O. del und Lam, E. (1998): Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr Biol* **8**: 1129-1132.
- Presser, C. (1993): Die Reblaus – kein Problem mehr. *Das Deutsche Weinmagazin* **23**: 22-25.
- Purnell, M. P., Skopeltits, D. S., Roubelakis-Angelakis, K. A. und Botella, J. R. (2005): Modulation of higher-plant NADP(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. *Planta* **222**: 167-180-
- Quackenbush, J. (2002): Microarray data normalization and transformation. *Nat Genet* **32**: 496-501.
- Reddy, V. S., Ali, G. S. und Reddy, A. S. N. (2003): Characterization of a pathogen-induced calmodulin-binding protein: mapping of four Ca²⁺-dependent calmodulin-binding domains. *Plant Mol Biol* **52**: 143-159.
- Remane, A., Storch, V., Welsch, U. (1976): Systematische Zoologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Repka, V., Fischerová, I. und Silhárová, K. (2004): Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biol Plant* **48**: 273-283.
- Richter, G. (1996): Biochemie der Pflanzen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Richter, G. (1997): Stoffwechselphysiologie der Pflanzen. 6. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Rodriguez, P. L. (1998): Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Mol Biol* **38**: 919-27.
- Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R. und Jones J. D. G. (2001): Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *EMBO J* **20**: 5556-5567.
- Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J. D. G. (2000): Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell* **12**: 803-815.
- Romero-Puertas, M. C., Perazzolli, M., Zago, E. D. und Delledonne, M. (2004): Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **55**: 579-583.
- Rooney, H. C. E., Klooster, J. W. van't, Hoorn, R. A. L. van der, Joosten, M. H. A. J., Jones, J. D. G. und Wit, P. J. G. M. de (2005): Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* **308**: 1873-1786.
- Rostocks, N., Schmierer, D., Kudra, D. und Kleinhofs, A. (2003): Barley putative hypersensitive induced reaction genes: genetic mapping, sequence analyses and differential expression in disease lesion mimic mutants. *Theor Appl Genet* **107**: 1094-1101.
- Rouhier, N. und Jacquot, J. P. (2005): The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radic Biol Med* **38**: 1413-1421.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* **132**: 365-386.

- Rühl, K. (1995): Reblausprobleme auch in Württemberg? *Rebe & Wein* **2**: 56–57.
- Salinas-Mondragón, R. E., Garcidueñas-Piña, C. und Guzmán, P. (1999): Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **40**: 579-590.
- Salzman, R. A., Fujita, T., Zhu-Salzman, K., Hasegawa, P. M. und Bressan, R. A. (1999): An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates. *Plant Mol Biol Rep* **17**: 11-17
- Sanmartín, M., Jaroszewski, L., Raikhel, N. V. und Rojo, E. (2005): Caspases. Regulating Death since the Origin of Life. *Plant Physiol* **137**: 841-847.
- Sano, H. und Ohashi, Y. (1995): Involvement of small GTP-binding proteins in defense signal-transduction pathways of higher plants. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4138-4144.
- Sauter, M., Rzewuski, G., Marwedel, T. und Lorbiecke, R. (2002): The novel ethylene-regulated gene *OsUsp1* from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. *J Exp Bot* **53**: 2325-2331.
- Schaaf, J., Walter, M. H. und Hess, D. (1995): Primary Metabolism in Plant Defense. *Plant Physiol* **108**: 949-960.
- Schaller, A. (2004): A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta* **220**: 183-197.
- Schäller, G. (1959): Untersuchungen über die Gallbildung und Nekrosereaktion der Rebsorten unter Berücksichtigung der Rassendifferenzierung der Reblaus. *Phytopathol Z* **36**: 67-83.
- Schäller, G. (1966): Untersuchungen zur Erzeugung künstlicher Pflanzengallen. Teil einer Habilitationsschrift, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität, Jena.
- Schäller, G. (1968): Biochemische Analyse des Aphidenspeichels und seine Bedeutung für die Gallenbildung. *Zool Jb Physiol* **74**: 54-87.
- Scherer, G. F. (2002): Secondary messengers and phospholipase A2 in Auxin signal transduction. *Plant Mol Biol* **49**: 357-372.
- Schirra, K.-J., Kopf, A. und Louis, F. (1999): Lebensweise mit Tücken. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **8**: 24-27.
- Schmid, J., Bleser, E. und Rühl, E. H. (1999): Gib der Reblaus keine Chance. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **9**: 37-41.
- Schwechheimer, C. und Schwager, K. (2004): Regulated proteolysis and plant development. *Plant Cell Rep* **23**: 353-364.
- Sessa, G., D'Ascenzo, M. und Martin, G. B. (2000): The major site of the Pti1 kinase phosphorylated by the Pto kinase is located in the activation domain and is required for Pto-Pti1 physical interaction. *Eur J Biochem* **267**: 171-178.
- Shi, J., Kim, K.-N., Ritz, O., Albrecht, V., Gupta, R., Harter, K., Luan, S. und Kudla, J. (1999): Novel Protein Kinases Associated with Calcineurin B-like Calcium Sensors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2393-2405.
- Shirasu, K. und Schulze-Lefert, P. (2003): Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci* **8**: 252-258.
- Shishova, M. und Lindberg, S. (2004): Auxin induces an increase of Ca²⁺ concentration in the cytosol of wheat leaf protoplasts. *J Plant Physiol* **161**: 937-945.
- Singh, K. B., Foley, R. C. und Oñate-Sánchez, L. (2002): Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 430-436.

- Smith, D. L. und Gross, K. C. (2000): A family of at least seven beta-galactosidase genes is expressed during tomato fruit development. *Plant Physiol* **123**: 1173-1183.
- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. und Levine, A. (1999): The Involvement of Cysteine Proteases and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* **11**: 431-443.
- Son, O., Cho, H.-Y., Kim, M.-R., Lee, H., Lee, M.-S., Song, E., Park, J. H., Nam, K. H., Chun, J.-Y., Kim, H.-J., Hong, S.-K., Chung, Y.-Y., Hur, C.-G., Cho, H.-T. und Cheon, C.-I. (2005): Induction of a homeodomain-leucine zipper gene by auxin is inhibited by cytokinin in *Arabidopsis* roots. *Biochem Biophys Res Communications* **326**: 203-209.
- Sondergaard, T. E., Schulz, A. und Palmgren, M. G. (2004): Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiol* **136**: 2475-2482.
- Spoel, S. H., Koornneef, A., Claessens, S. M. C., Korzelius, J. P., Pelt, J. A. Van, Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J.-P., Brown, R., Kazan, K., Loon, L. C. Van, Dong, X. und Pieterse, C. M. J. (2003): NPR1 Modulates Cross-Talk between Salicylate- and Jasmonate-Dependent Defense Pathways through a Novel Function in the Cytosol. *Plant Cell* **15**: 760-770.
- Stracke, R., Werber, M. und Weisshaar, B. (2001): The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 447-456.
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C. und Suza, W. (2005): Characterization of an *Arabidopsis* Enzyme Family That Conjugates Amino Acids to Indol-3-Acetic Acid. *Plant Cell* **17**: 616-627.
- Stepanova, A. N., Hoyt, J. M., Hamilton, A. A. und Alonso, J. M. (2005): A Link between Ethylene and Auxin Uncovered by the Characterization of Two Root-Specific Ethylene-Insensitive Mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2230-2242.
- Sterling, C. (1952): Ontogeny of the *Phylloxera* Gall of Grape Leafs. *Am J Bot* **39**: 6-15.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H., Schimper, A. F. W., Sitte, P., Ziegler, H., Ehrendorfer, F. und Bresinsky, A. (1991): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 33. Auflage. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Strömvik, M. V., Sundaraman, V. P. und Vodkin, L. O. (1999): A novel promotor from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs. *Plant Mol Biol* **41**: 217-231.
- Sugimoto, K., Takeda, S. und Hirochika, H. (2000): MYB-Related Transcription Factor NtMYB2 Induced by Wounding and Elicitors is a Regulator of the Tobacco Retrotransposon *Tto1* and Defense-Related Genes. *Plant Cell* **12**: 2511-2527.
- Sugimoto, M., Yamaguchi, Y., Nakamura, K., Tatsumi, Y. und Sano, H. (2004): A hypersensitive response-induced ATPase associated with various cellular activities (AAA) protein from tobacco plants. *Plant Mol Biol* **56**: 973-985.
- Suharsono, U., Fujisawa, Y., Kawasaki, T., Iwasaki, Y., Satoh, H. und Shimamoto, K. (2002): The heterotrimeric G protein α subunit acts upstream of the small GTPase Rac in disease resistance of rice. *PNAS* **99**: 13307-13312.
- Suty, L., Lequeu, J., Lançon, A., Etienne, P., Petitot, A.-S. und Blein, J.-P. (2003): Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes". *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 637-650.
- Suzuki, K. (2002): MAP kinase cascades in elicitor signal transduction. *J Plant Res* **115**: 237-244.
- Svejstrup, J. Q. (2004): The RNA polymerase II transcription cycle: cycling through chromatin. *Biochim Biophys Acta* **1677**: 64-73.

- Tao, L. Z., Cheung, A. Y. und Wu, H. M. (2002): Plant Rac-Like GTPases Are Activated by Auxin and Mediate Auxin-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* **14**: 2745-2760.
- Tena, G. und Renaudin, J.-P. (1998): Cytosolic acidification but not auxin at physiological concentration is an activator of MAP kinases in tobacco. *Plant J* **16**: 173-182.
- Tena, G., Asai, T., Chiu, W.-L. und Sheen, J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 392-400.
- Thornton, S., Anand, N., Purcell, D. und Lee, J. (2003): Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *J Mol Med* **81**: 536-548.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V. und Vera, P. (1997): Two *PR-1* Genes from Tomato are Differentially Regulated and Reveal a Novel Mode of Expression for a Pathogenesis-Related Gene During the Hypersensitive Response and Development. *MPMI* **5**: 624-634.
- Tréhin, C., Planchais, S., Glab, N., Perennes, C., Tregear, J. und Bergounioux C. (1998): Cell cycle regulation by plant growth regulators: involvement of Auxin and cytokinin in the re-entry of Petunia protoplasts into the cell cycle. *Planta* **206**: 215-224.
- Tsuchisaka, A. und Theologis, A. (2004): Unique and Overlapping Expression Patterns among the Arabidopsis 1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase Gene Family Members. *Plant Physiol* **136**: 2982-3000.
- Turner, J. G., Ellis, C. und Devoto, A. (2002): The Jasmonate Signal Pathway. *Plant Cell Supplement*: 153-164.
- Turner, W. L., Waller, J. C., Vanderbeld, B. und Snedden, W. A. (2004): Cloning and Characterization of Two NAD Kinases from *Arabidopsis*. Identification of a Calmodulin Binding Isoform. *Plant Physiol* **135**: 1243-1255.
- Ullmann, A., Jacob, F. und Monod, J. (1967): Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **24**: 339-343.
- Urwin, P. E., Lilley, C. J., McPherson, M. J. und Atkinson, H. J. (1997): Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant J* **12**: 455-461.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.-L., Triantaphylidès, C. und Roby, D. (2002): A R2R3-MYB gene, *AtMYB30*, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *PNAS* **99**: 10179-10184.
- Van den Berg, N., Crampton, B. G., Hein, I., Birch, P. R und Berger, D. K. (2004): High-throughput screening of suppression subtractive hybridization cDNA libraries using DNA microarray analysis. *Biotechniques* **37**:818-24.
- Van der Fits, L. und Memelink, J. (2001): The jasmonate-inducible AP2/ERF-domain transcription factor ORCA 3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J* **25**: 43-53.
- Van Engelen, F. A., Hartog, M. V., Thomas, T. L., Taylor, B., Sturm, A., van Kammen, A. und de Vries, S. (1993): The carrot secreted glycoprotein gene *EPI* is expressed in the epidermis and has sequence homology to *Brassica* S-locus glycoproteins. *Plant J* **4**: 855-862.
- Van Loon, L. C. und van Strein, E. A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97.
- Velculescu, V. E., Zhang, L., Vogelstein, B und Kinzler, K. W. (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* **20**:484-487.
- Verica, J. A., Chae, L., Tong, H., Ingmire, P. und He, Z.-H. (2003): Tissue-Specific and Developmentally Regulated Expression of a Cluster of Tandemly Arrayed Cell Wall-Associated Kinase-Like Kinase Genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **13**: 1732-1746.

- Verica, J. A. und He, Z.-H. (2002): The Cell Wall-Associated Kinase (WAK) and WAK-like Kinase Gene Family. *Plant Physiol* **129**: 455-459.
- Verma, D. P. S. und Hong, Z. (2005): The ins and outs in membrane dynamics: tubulation and vesiculation. *Trends in Plant Sci* **10**:159-164.
- Vernon, S. D., Unger, E. R., Rajeevan, M., Dimulescu, I. M., Nisenbaum, R. and Campbell, C. E. (2000): Reproducibility of Alternative Probe Synthesis Approaches for Gene Expression Profiling with Arrays. *J Mol Diagn* **2**: 124-127.
- Vernoud, V., Horton, A. C., Yang, Z. und Nielsen, E. (2003): Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **131**: 1191-1208.
- Vierstra, R. D. (2003): The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci* **8**: 135-142.
- Vogt, E. und Schruft, G. (2000): Weinbau. 8. Auflage. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Volkman, D. und Baluska, F. (1999): Actin Cytoskeleton in Plants: From Transport Networks to Signaling Networks. *Microsc Res Tech* **47**: 135-154.
- Vorwerk, S., Somerville, S. und Somerville, C. (2004): The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* **9**: 203-209.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. und Zabeau, M. (1995): AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**:4407-4414
- Wada, Y., Miyamoto, K., Kusano, T. und Sano, H. (2004): Association between up-regulation of stress-responsive genes and hypomethylation of genomic DNA in tobacco plants. *Mol Gen Genomics* **271**: 658-666.
- Wagner, T. A. und Kohorn, B. D. (2001): Wall-Associated Kinases Are Expressed throughout Plant Development and Are Required for Cell Expansion. *Plant Cell* **13**: 303-318.
- Wallace, I. S und Roberts, D. M. (2004): Homology Modeling of Representative Subfamilies of Arabidopsis Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic/Arginine Selectivity Filter. *Plant Physiol* **135**: 1059-1068.
- Wan, J., Dunning, F. M. und Bent, A. F. (2002): Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Funct Integr Genomics* **2**: 259-273.
- Wang, G. und Maier, R. J. (2004): An NADPH Quinone Reductase of *Helicobacter pylori* Plays an Important Role in Oxidative Stress Resistance and Host Colonization. *Infect Immun* **72**: 1391-1396.
- Wang, H. und Deng, X. W. (2003): Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends Plant Sci* **8**: 172-178.
- Wang, J.-W., Wang, L.-J., Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Xue, H.-W. und Chen, X.-Y. (2005): Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**: 2204-2216.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M. und Lawton, M. (1996): The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proc Natl Acad Sci* **93**: 2598-2602.
- Wang, X.-M. und Ma, Q.-H. (2005): Characterization of a jasmonate-regulated wheat protein related to a beta-glucosidase-aggregating factor. *Plant Physiol Biochem* **43**: 185-192.
- Watanabe, A., Hai Ning, V., Zhang, D., Arahira, M., Asare Yeboah, N., Udaka, K. und Fukazawa, M. (1999): Molecular Cloning and Ethylene-Inducible Expression of *Chib1* Chitinase from Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Biosci Biotechnol Biochem* **63**: 251-256.

- Weaver, R. F., Hedrick, P. W. (1997): Genetics. 3. Auflage. Wm. C. Brown Publishers, USA.
- Wessler, S. R. (1996): Plant retrotransposons: Turned on by stress. *Curr Biol* **6**: 959-961.
- Whitbred, J. M. und Schuler, M. A. (2000): Molecular Characterization of *CYP73A9* and *CYP82A1* P450 Genes Involved in Plant Defense in Pea. *Plant Physiol* **124**: 47-58.
- Wijaya, R., Neumann, G. M., Condrón, R., Hughes, A. B. und Poyla, G. M. (2000): Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. *Plant Sci* **159**: 243-255.
- Wojtaszek, P. (1997): Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* **322**: 681-692.
- Woodward, A. W. und Bartel, B. (2005): Auxin: Regulation, Action and Interaction. *Ann Bot* **95**: 707-735.
- Wütherich, K. L., Bovet, L., Hunziker, P. E., Donnison, I. S. und Hortensteiner, S. (2000): Molecular cloning, functional expression and characterisation of RCC reductase involved in chlorophyll catabolism. *Plant J* **21**: 189-198.
- Xiao, F., Lu, M., Li, J., Zhao, T., Yi, S. Y., Thara, V. K., Tang, X. und Zhou, J.-M. (2003): *Pto* Mutants Differentially Activate *Prf*-Dependent, *avrPto*-Independent Resistance and Gene-for-Gene Resistance. *Plant Physiol* **131**: 1239-1249.
- Xie, Q., Frugis, G., Colgan, D. und Chua, N.-H. (2000): *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. *Genes Dev* **14**: 3024-3036.
- Yamada, T., Marubashi, W., Nakamura, T. und Niwa, M. (2001): Possible Involvement of Auxin-Induced Ethylene in an Apoptotic Cell Death during Temperature-Sensitive Lethality Expressed by Hybrid between *Nicotiana glutinosa* and *N. repanda*. *Plant Cell Physiol* **42**: 923-930.
- Yamaguchi, T., Minami, E., Ueki, J. und Shibuya, N. (2005): Elicitor-induced Activation of Phospholipases Plays an Important Role for the Induction of Defense Responses in Suspension-cultured Rice Cells. *Plant Cell Physiol* **46**: 576-587.
- Yamakawa, H., Katou, S., Seo, S., Mitsuhara, I., Kamada, H. und Ohashi, Y. (2004): Plant MAPK Phosphatase Interacts with Calmodulins. *J Biol Chem* **279**: 928-936.
- Yamakawa, H., Mitsuhara, I., Ito, N., Deao, S., Kamady, H. und Ohashi, Y. (2001): Transcriptionally and post-transcriptionally regulated response of 13 calmodulin genes to tobacco mosaic virus-induced cell death and wounding in tobacco plant. *Eur J Biochem* **268**: 3916-3929.
- Yang, T. und Poovaiah, B. W. (2000): Molecular and Biochemical Evidence for the Involvement of Calcium/Calmodulin in Auxin Action. *J Biol Chem* **275**: 3137-3143.
- Yang, T. und Poovaiah, B. W. (2003): Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends Plant Sci* **8**: 505-512.
- Yoda, H. und Sano, H. (2003): Activation of hypersensitive response genes in the absence of pathogens in transgenic tobacco plants expressing a rice small GTPase. *Planta* **217**: 993-997.
- Yoda, H., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T. und Sano, H. (2002): Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* **267**: 154-161.
- Yoon, H. S., Lee, H. Lee, I. A., Kim, K. Y. und Jo, J. (2004): Molecular cloning of the monodehydroascorbate reductase gene from *Brassica campestris* and analysis of its mRNA level in response to oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **1658**: 181-186.
- Yuk, Y. F. und Cavalieri, D. (2003): Fundamentals of cDNA microarray data analysis. *Trends Genet* **19**: 649-658.

- Yun-Lee, K., Chae-II, K., Young-Yun, G., In-Taek, H. und Jong-Yoon, C. (2004): Annealing control primer system for identification of differentially expressed genes on agarose gels. *BioTechniques* **36**: 424-434.
- Zeng, L.-R., Qu, S., Bordeos, A., Yang, C., Baraoidan, M., Yan, H., Xie, Q. Nahm, B. H., Leung, H. und Wang, G.-L. (2004): *Spotted leaf11*, a Negative Regulator of Plant Cell Death and Defense, Encodes a U-Box/Armadillo Repeat Protein Endowed with E3 Ubiquitin Ligase Activity. *Plant Cell* **16**: 2795-2808.
- Zhang, B., Chen, W., Foley, R. C., Büttner, M. und Singh, K. B. (1995): Interactions between Distinct types of DNA Binding Proteins Enhance Binding to *ocs* Element Promotor Sequences. *Plant Cell* **7**: 2241-2252.
- Zhang, S. und Klessing, D. F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**: 520-527.
- Zhang, Y., Dorey S., Swiderski, M. und Jones, J. D. G. (2004): Expression of *RPS4* in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 und HSP90. *Plant J* **40**: 213-224.
- Zhou, J., Loh, Y.-T., Bressan, R. A. und Martin, G. B. (1995): The Tomato Gene *Pti1* Encodes a Serine/Threonine Kinase That Is Phosphorylated by PTO and Is Involved in the Hypersensitive Response. *Cell* **83**: 925-935.
- Zinov'eva, S. V., Vasyukova, N. I. und Ozeretskovskaya, O. L. (2004): Biochemical Aspects of Plant Interactions with Phytoparasitic Nematodes: A Review. *Appl Biochem Microbiol* **40**: 111-119.
- Zubieta, C., Ross, J. R., Koscheski, P., Yang, Y. Pichersky, E. und Noel J. P. (2003): Structural Basis for Substrate Recognition in the Salicylic Acid Carboxyl Methyltransferase Family. *Plant Cell* **15**: 1704-1716.

8. Anhang

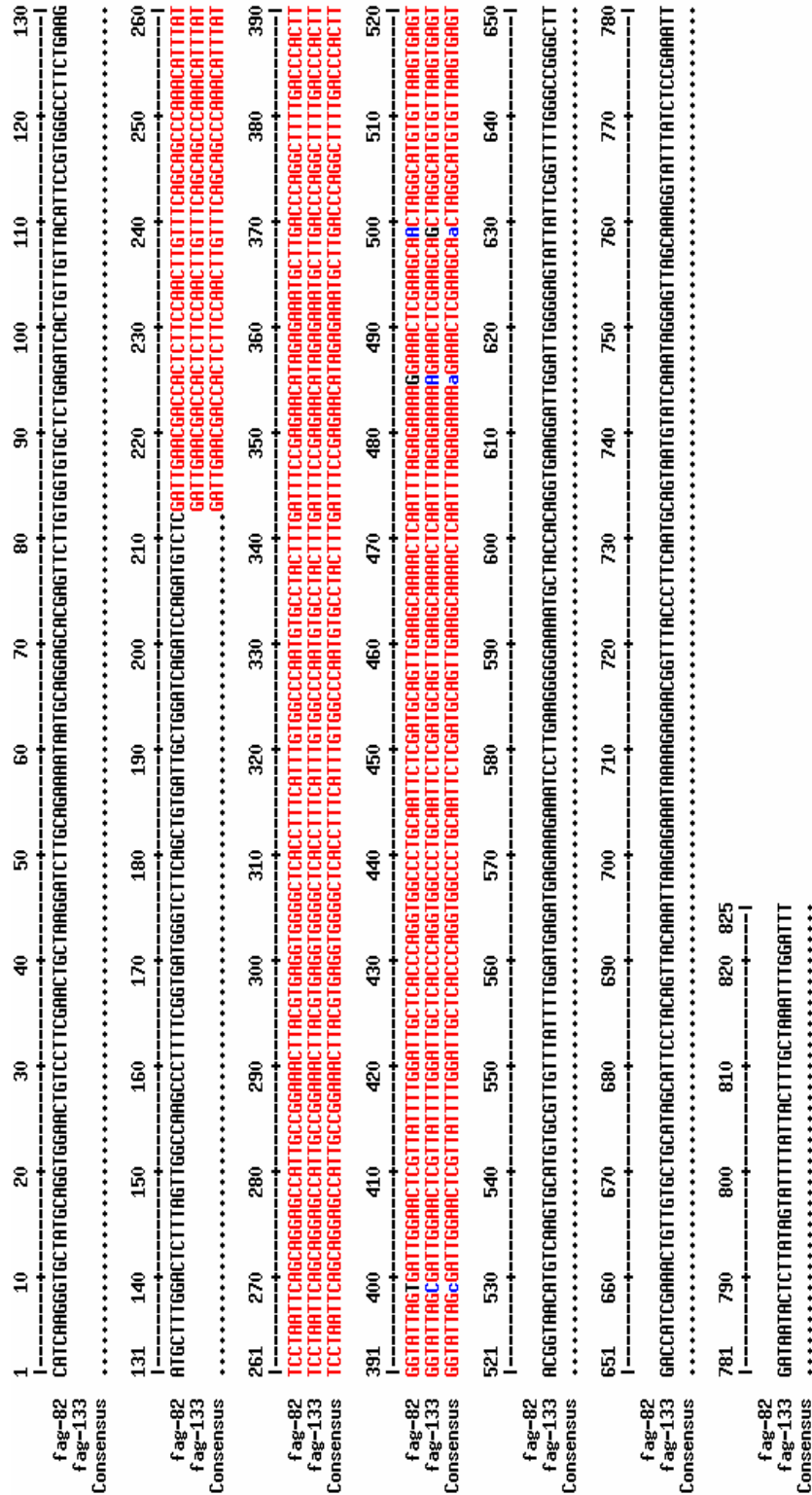


Abb. 8.1: Sequenzvergleich der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h-82 und Fag-B-IES2,5h-133

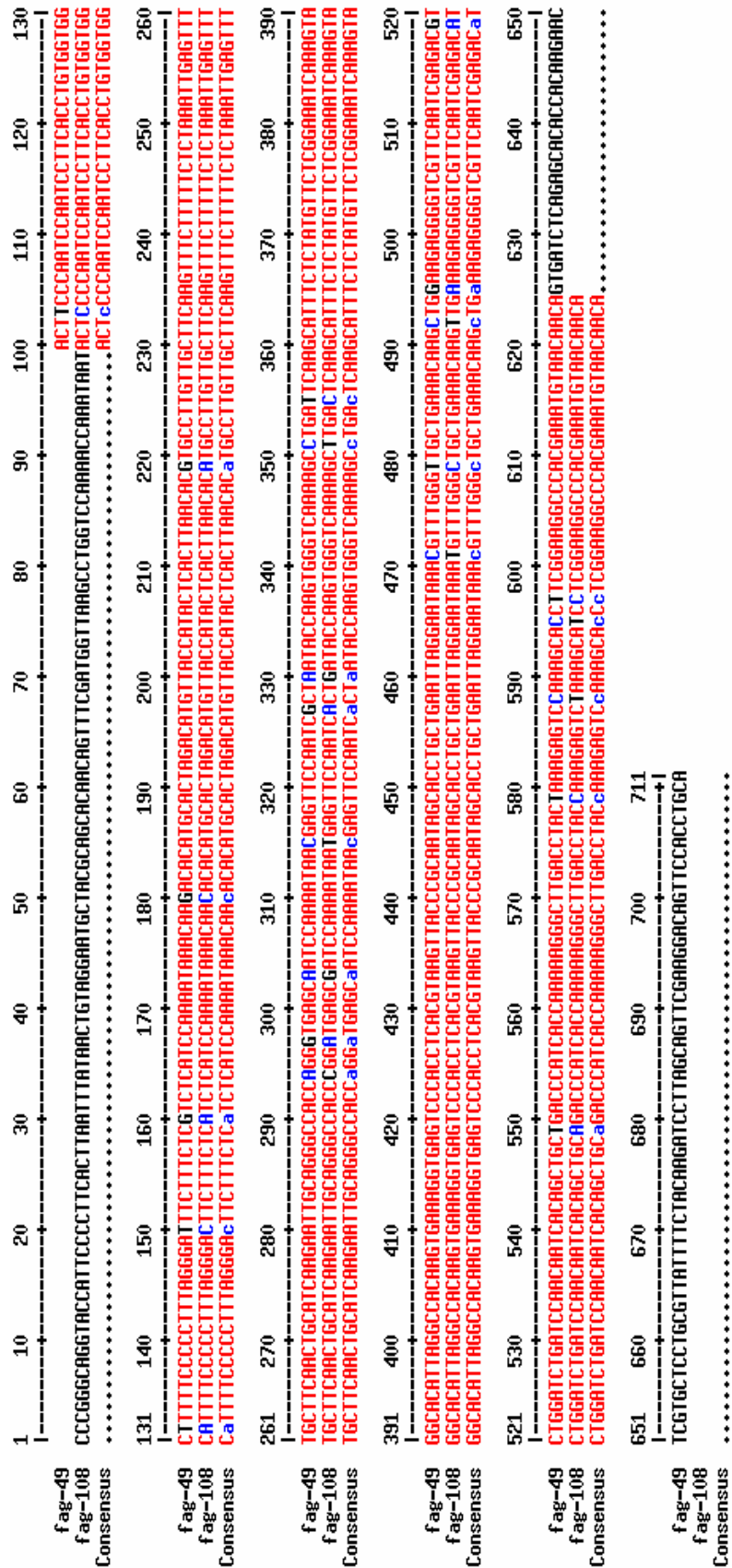


Abb. 8.2: Sequenzvergleich der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h-49 und Fag-B-IES2,5h-108

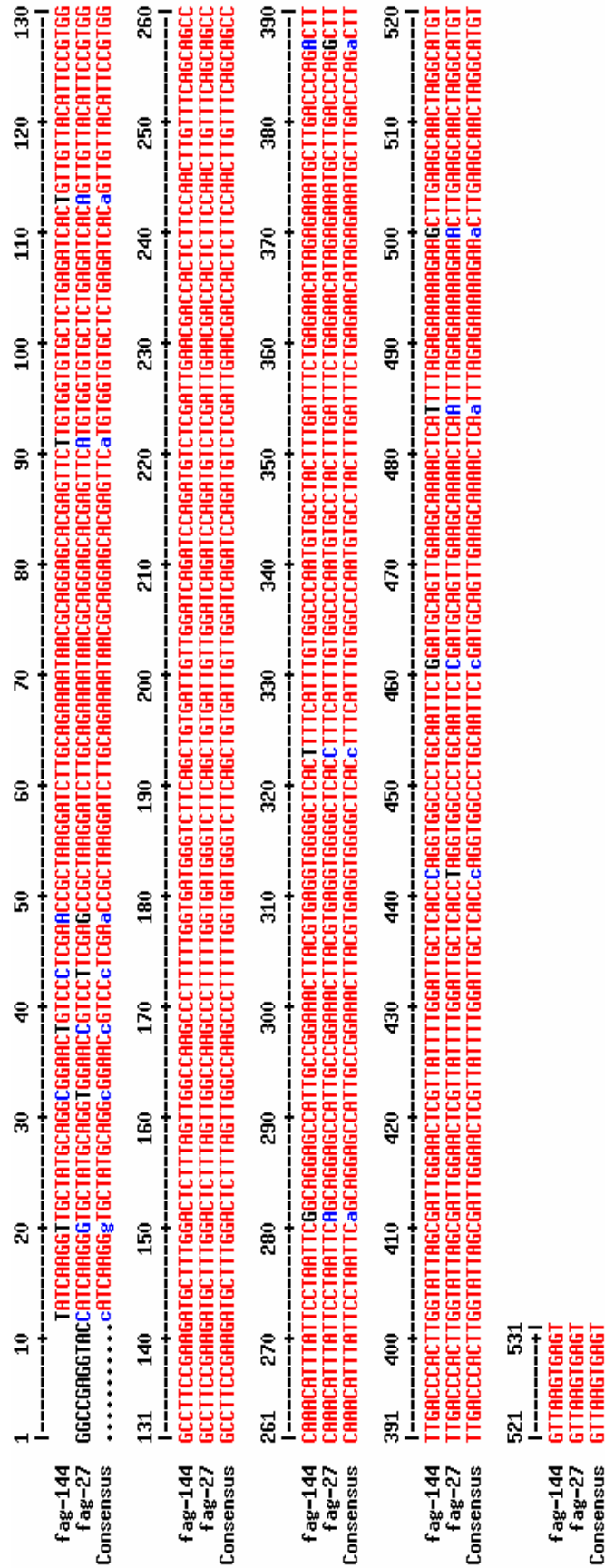


Abb. 8.3: Sequenzvergleich der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES4,5h-144 und Fag- B-IES4,5h-27

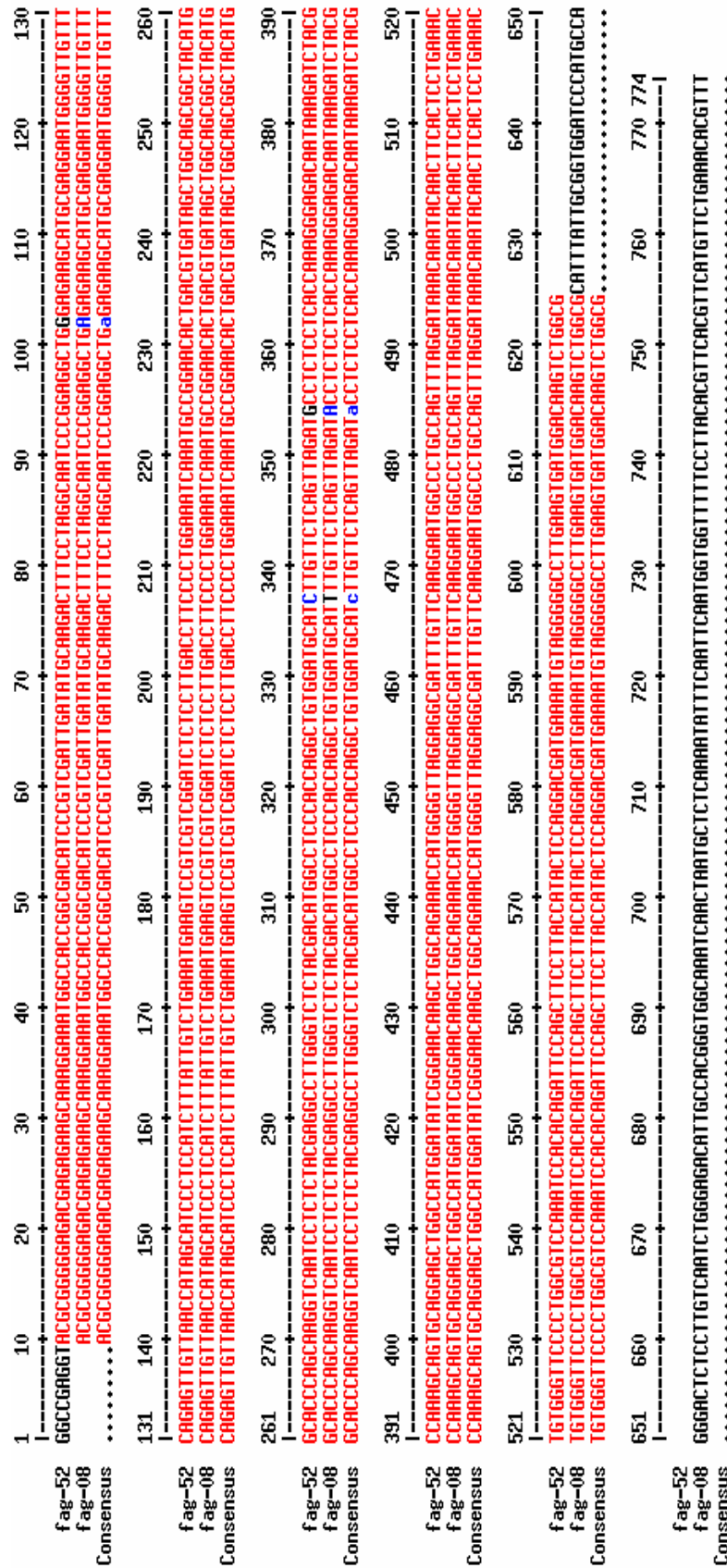


Abb. 8.4: Sequenzvergleich der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h-52 und Fag-B-IES4h-08 [Dietrich, 2002]

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100     110     120     130
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
fag_K1_M1  GCAAAAGTTTGGTGAAGCCATGGATGAATTCAGGGAGTTGCAAGGATTTAAGCATGCTCAGAGACCCAAAGTCATTTACCTTTCAGACCTTGGTGTAAACCAAG
fag_K4_M2  GCAAAAGTTTGGTGAAGCCATGGATGAATTCAGGGAGTTGCAAGGATTTAAGCATGCTCAGAGACCCAAAGTCATTTACCTTTCAGACCTTGGTGTAAACCAAG
Consensus  GCAAAAGTTTGGTGAAGCCATGGATGAATTCAGGGAGTTGCAAGGATTTAAGCATGCTCAGAGACCCAAAGTCATTTACCTTTCAGACCTTGGTGTAAACCAAG.....
131     140     150     160     170     180     190     200     210     220     230     240     250     260
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
fag_K1_M1  TAGTGCCCAACTAATGATCCTGAGGTCACGATGCTGCAATCATGTTGTTAAAGCATCCAGATGAGGTCACACTCGATTTCCGATATGACCTTTTAGAGATTCTTCTAGCTAAGGCCCAAGGTCATTGA
fag_K4_M2  TAGTGCCCAACTAATGATCCTGAGGTCACGATGCTGCAATCATGTTGTTAAAGCATCCAGATGAGGTCACACTCGATTTCCGATATGACCTTTTAGAGATTCTTCTAGCTAAGGCCCAAGGTCATTGA
Consensus  TAGTGCCCAACTAATGATCCTGAGGTCACGATGCTGCAATCATGTTGTTAAAGCATCCAGATGAGGTCACACTCGATTTCCGATATGACCTTTTAGAGATTCTTCTAGCTAAGGCCCAAGGTCATTGA.....
261     270     280     290     300     310     320     330     340     350     360     370     380     390
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
fag_K1_M1  AGGTTACGCCAARATTTGATTTGCTTGAAGTTGAATGGGGAAGTAAAGGATGTGAAGTTCAGGGCTGAAGTAAATTAAGGATATTTGAAGGAAGTTCTGTTCAACCCAGTGGAAAGGAGATCATCTCTGA
fag_K4_M2  AGGTTACGCCAARATTTGATTTGCTTGAAGTTGAATGGGGAAGTAAAGGATGTGAAGTTCAGGGCTGAAGTAAATTAAGGATATTTGAAGGAAGTTCTGTTCAACCCAGTGGAAAGGAGATCATCTCTGA
Consensus  AGGTTACGCCAARATTTGATTTGCTTGAAGTTGAATGGGGAAGTAAAGGATGTGAAGTTCAGGGCTGAAGTAAATTAAGGATATTTGAAGGAAGTTCTGTTCAACCCAGTGGAAAGGAGATCATCTCTGA.....
391     400     405
|-----|-----|
fag_K1_M1  ATCTGGTAAATCATCG
fag_K4_M2  ATCTGGTAAATCATCG
Consensus  ATCTGGTAAATCATCG

```

Abb. 8.5: Sequenzvergleich der 'Börner'-ESTs Fag-B-IES2,5h_K1_M1 und Fag-B-IES2,5h_K4_M2

Signale und Signaltransduktion			
	Gen-ID	2,5	4,5
Proteinkinasen:			
mitogen-activated protein kinase, putative (MPK10)	At3g59790	+	+
mitogen-activated protein kinase, putative (MPK18)	At1g53510	+	
putative MAP kinase	At1g73670	+	
calcium-dependent protein kinase	At5g23580	+	+
calcium-dependent protein kinase-like protein	At5g12480	+	+
CBL-interacting protein kinase 2 (CIPK2)	At5g07070	+	+
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase, similar to RLK5	At1g09970	+	+
protein kinase-related low similarity to receptor-like protein kinase 5 (RLK5)	At1g63600	+	+
receptor serine/threonine protein kinase (similar to PR5K)	At5g38250	+	
lectin protein kinase family protein	At3g16030	+	+
lectin protein kinase, putative, similar to receptor lectin kinase 3	At4g02420	+	+
WAK-like kinase (WAKL2)	At1g16130	+	
Pto kinase interactor 1-like protein	At5g41680	+	+
Pto kinase interactor, putative	At1g26150	+	
serine/threonine protein kinase, putative, similar to Pto kinase interactor1	At1g06700	+	
putative diacylglycerol kinase	At2g20900	+	
FAT domain-containing protein / phosphatidylinositol 3- and 4-kinase family protein	At4g36080	+	+
kinase like protein	At4g14780	+	+
leucine-rich repeat family protein / protein kinase family	At5g16000	+	+
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At5g37450	+	+
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At1g75640	+	+
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At2g15300	+	
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At3g56370	+	
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At5g05160	+	
leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	At5g16590	+	+
protein kinase family protein	At4g29380	+	+
protein kinase family protein	At1g65250	+	+
protein kinase family protein	At5g56890	+	
protein kinase family protein	At3g20830	+	+
protein kinase family protein	At4g13190	+	
protein kinase family protein	At1g05100	+	+
protein kinase -like protein	At5g03640	+	
protein kinase, putative	At3g06620	+	
protein kinase, putative	At3g15890	+	+
protein serine/threonine kinase	At1g01540	+	
putative histidine kinase	At2g01830	+	+
putative protein kinase	At2g23200	+	+
putative protein kinase	At2g05940	+	
putative protein kinase	At2g41910	+	
putative protein kinase	At2g47060	+	+
putative protein kinase	At3g08760	+	+
putative receptor-like protein kinase	At4g04510	+	
putative ser/thr protein kinase	At1g09440	+	+
receptor kinase, putative	At1g61400	+	
receptor lectin kinase-like protein	At5g42120	+	
receptor-like protein kinase, putative	At3g19700	+	

Tabelle: 8.1 Gesamtergebnisse der Microarrayanalyse der 2,5- und 4,5-h-Probe
2,5-h-Probe (2,5); 4,5-h-Probe (4,5); Gen gefunden (+)

Signale und Signaltransduktion (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
receptor-like protein kinase-related	At1g63570	+	+
receptor-like protein kinase-related	At3g22050	+	+
receptor-like protein kinase-related	At5g41300	+	+
serine/threonine kinase - like protein	At4g23300	+	+
serine/threonine protein kinase-like protein	At5g23170	+	
serine/threonine-specific kinase like protein	At3g53810	+	
serine/threonine-specific protein kinase -like protein	At3g58690	+	+
shaggy-related protein kinase kappa, putative	At1g57870	+	+
similar to extragenic suppressor of bimD6 mutation	At2g24990	+	+
Similar to receptor kinase	At4g00970	+	+
serine/threonine protein kinase	At1g19090	+	+
Proteinphosphatasen:			
putative calcium-regulated protein phosphatase	At4g01420		+
tyrosine specific protein phosphatase family protein	At2g32960	+	+
Calcium:			
calcineurin-like phosphoesterase family protein	At5g50400	+	+
calcineurin-like phosphoesterase family protein	At3g09970	+	+
purple acid phosphatase family protein, calcineurin-like phosphoesterase	At1g25230	+	+
calmodulin, putative	At2g41410	+	+
calcium-binding EF hand family protein similar to EF-hand Ca ²⁺ -binding protein CCD1	At4g27280	+	+
lipase class 3 family protein / calmodulin-binding heat-shock protein, putative	At3g49050	+	+
calmodulin-binding protein	At4g25800	+	+
plasma membrane H ⁺ -ATPase - like; calcium ion transport	At3g60330	+	
calcium-transporting ATPase protein	At5g53010	+	+
putative annexin	At2g38760	+	
vacuolar sorting receptor, calcium-binding EGF-like domain signature	At2g14720	+	+
Ethylen:			
putative ethylene receptor (EIN4)	At3g04580	+	+
putative amino-cyclopropane-carboxylic acid oxidase (ACC oxidase)	At1g12010	+	+
S-adenosylmethionine synthase 2	At4g01850	+	+
putative s-adenosylmethionine synthetase	At2g36880	+	+
putative s-adenosylmethionine synthetase	At3g17390	+	+
Jasmonsäure:			
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog	At1g52070	+	+
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog	At5g38540	+	+
jacalin lectin family protein, similar to myrosinase-binding protein homolog	At1g52050	+	+
arginine decarboxylase 2 (SPE2)	At4g34710	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At1g19640	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At5g55250	+	+
S-adenosyl-L-methionine:jasmonic acid carboxyl methyltransferase (JMT)	At5g37970		+
myrosinase-associated protein, putative; protein id:	At1g54000	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Signale und Signaltransduktion (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
G-Protein:			
transducin family protein / WD-40 repeat family protein, G-beta repeat	At3g21540		+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein contains seven G-protein beta WD-40 repeats	At3g05090		+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At1g24530	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At5g14050	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At2g18900	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At3g45620	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At2g37160	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein contains similarity to regulatory protein Nedd1	At5g05970	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At3g51930	+	+
transducin family protein / WD-40 repeat family protein similar to Sec31p	At1g18830	+	
transducin family protein / WD-40 repeat family protein	At2g19540	+	
amino acid transporter family protein	At5g02170	+	+
proline-rich family protein contains proline rich extensin domains	At1g31750	+	+
GTP-binding protein, putative	At1g07620	+	+
prenylated rab acceptor (PRA1) family protein weak similarity to prenylated Rab acceptor 1	At5g07110	+	
RabGAP/TBC domain-containing protein, similar toGTPase-activating protein GYP7	At4g28550	+	+
Rab GDP dissociation inhibitor	At3g59920	+	+
Ras-related GTP-binding protein (Rab7)	At1g22740	+	+
ras-related small GTP-binding protein-like	At5g47200	+	+
Ras-related GTP-binding protein	At4g17160	+	+
ADP-ribosylation factor - like protein	At5g14670	+	+
ADP-ribosylation factor 3	At2g24765	+	+
GTP-binding protein-related, low similarity to RAC-like GTP binding protein ARAC3	At3g63150	+	+
rac family GTP-binding protein(ARAC9)	At2g44690	+	
rac family GTP-binding protein (ARAC4)	At1g20090	+	
weitere Signale:			
14-3-3 protein GF14 pi (grf13)	At1g78220	+	
CLE9, putative, CLAVATA3/ESR-Related 9 (CLE9)	At1g26600	+	+
permease-related low similarity to purine permease	At3g23870	+	
integral membrane family protein	At1g03700	+	
importin alpha - like protein	At5g03070	+	+
forkhead-associated domain-containing protein	At1g75530	+	+
putative gibberellin 20-oxidase	At1g60980	+	
phytochelatin synthetase-related	At4g27110	+	
sterol delta7 reductase; brassinosteroid biosynthesis	At1g50430	+	
acetoacyl-CoA-thiolase	At5g47720	+	+
oxysterol-binding family protein	At4g22540	+	+
two-component responsive regulator family protein / response regulator family protein similar to ARR2 protein	At4g16110	+	
response regulator 3; cytokinin mediated signaling	At1g59940	+	

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

DNA und RNA assoziierte Gene			
	Gen-ID	2,5	4,5
Transkriptionsfaktoren:			
WRKY family transcription factor, TMV response-related gene product	At5g15130	+	+
WRKY family transcription factor	At4g01720	+	+
WRKY family transcription factor	At2g23320	+	+
WRKY family transcription factor	At4g31800	+	
myb DNA-binding protein (AtMYB87), R2R3-MYB	At4g37780	+	
myb DNA-binding protein (MYB77)	At3g50060	+	+
myb family transcription factor (TRIPTYCHON)	At5g53200	+	
myb family transcription factor	At2g40260	+	+
myb family transcription factor	At5g05090	+	+
myb family transcription factor	At1g71030	+	+
myb family transcription factor (MYB26)	At3g13890	+	
putative MYB family transcription factor	At2g38090	+	
AP2 domain-containing transcription factor	At2g39250	+	+
DREB subfamily A-2 of ERF/AP2 transcription factor family	At2g38340	+	+
DREB subfamily A-5 of ERF/AP2 transcription factor family	At5g67190	+	+
ERF (ethylene response factor) subfamily B-5 of ERF/AP2 transcription factor family	At4g27950	+	+
putative ethylene response element binding protein (EREBP)	At2g44840	+	
ethylene-responsive protein-related, similarity to ethylene-inducible ER33 protein	At3g20640	+	+
ethylene responsive element binding factor 9	At5g44210	+	
bZIP transcription factor, OBF5	At5g06960	+	
no apical meristem (NAM) family protein	At1g01720		+
no apical meristem (NAM) family protein, similar to NAC1	At4g01550	+	+
CUC2	At5g53950	+	+
scarecrow-like 11 - like	At5g59450	+	
scarecrow-like 13 (SCL13)	At4g17230	+	+
scarecrow-like 6 (SCL6)	At4g00150	+	
SCARECROW-like protein	At4g36710	+	+
ARF GAP-like zinc finger-containing protein ZIGA2	At3g53710	+	
b/t putative transcription factor	At3g14030	+	
bHLH family protein	At5g57150		+
bHLH protein	At3g56770	+	+
bHLH protein	At4g30980	+	+
bHLH protein	At2g43140	+	
bHLH protein	At3g23690	+	+
bHLH protein	At3g47710	+	+
bHLH protein	At4g02590	+	
CCAAT-box binding transcription factor family protein	At5g47670	+	+
CHP-rich zinc finger protein, putative	At3g28650	+	+
CHP-rich zinc finger protein, putative	At5g02330	+	+
CHP-rich zinc finger protein, putative	At5g54050	+	+
CONSTANS B-box zinc finger family protein	At2g47890	+	+
DC1 domain-containing protein	At1g60420	+	
Dof zinc finger protein	At4g24060	+	+
floral homeotic gene APETALA1	At1g69120	+	
floral homeotic protein APETALA3 (AP3)	At3g54340	+	+
GATA transcription factor 1 (AtGATA-1)	At3g24050	+	
GATA zinc finger protein	At3g51080	+	

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

DNA und RNA assoziierte Gene (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
G-box binding factor(bZIP protein), putative	At4g01120	+	
homeodomain protein	At5g17810	+	+
homeodomain protein, Protodermal factor2 (PDF2)	At4g04890	+	+
KNAT1 homeobox-like protein	At4g08150	+	+
KNAT3 homeodomain protein	At5g25220	+	+
MADS-box family protein	At2g40210		+
MADS-box protein	At4g22950	+	
MADS-box protein (AGL38)	At1g65300	+	+
mitochondrial glycoprotein family protein / MAM33 family protein	At2g39795		+
nucleic acid binding protein - like	At5g26210	+	+
putative heat shock transcription factor	At2g26150	+	+
putative DNA binding protein	At4g22810	+	
putative PCF2-like DNA binding protein	At2g45680	+	+
putative YABBY3 axial regulator	At4g00180	+	+
putative zinc finger protein	At3g14320	+	+
putative zinc-finger protein	At2g28200	+	+
putative zinc-finger protein	At4g35280	+	+
squamosa promoter-binding protein-like 2 (SPL2)	At5g43270	+	+
sterile apetala	At5g35770	+	+
TCP family transcription factor, putative similar to PCF2	At5g23280	+	+
transcription factor-related similar to enhancer of polycomb	At1g16690	+	+
transcriptional activator, putative similar to transcriptional activator FHA1	At3g07220	+	
transcriptional co-regulator family protein	At4g25515	+	
zinc finger - like protein	At3g52800	+	
zinc finger (B-box type) family protein	At5g57660	+	
zinc finger (C2H2 type) family protein	At4g35610	+	+
zinc finger (C2H2 type) family protein	At5g14010	+	+
zinc finger (C2H2 type) protein (WIP5)	At1g51220	+	
zinc finger (C2H2 type) protein-related	At5g54340	+	
zinc finger (DHHC type) family protein	At4g15080	+	
zinc finger and C2 domain protein, putative	At4g05330	+	+
zinc finger homeobox family protein	At1g75240	+	+
zinc finger homeobox family protein	At5g60480	+	
zinc finger homeobox family protein	At5g15210	+	+
zinc finger protein ZAT7	At3g46090	+	+
zinc finger protein-related	At2g16090	+	+
zinc finger protein-related	At1g65430	+	+
zinc finger protein-related	At2g25370	+	+
zinc finger protein-related weak similarity to mudrA [Zea mays]	At1g49920	+	+
zinc-finger protein, putative	At1g32540	+	
heat shock transcription factor-like protein	At3g63350	+	+
transcription factor jumonji (jmiC) domain-containing protein	At5g06550	+	
inner no outer protein (INO)	At1g23420	+	
Transkription:			
RNA polymerase subunit	At1g60620	+	+
DNA-directed RNA polymerase III family protein	At1g01210		+
RNA polymerase III subunit - like protein	At3g49000	+	+
RNA polymerase II fifth largest subunit like protein	At4g14660	+	+
transcription factor IIA large subunit	At1g07480	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

DNA und RNA assoziierte Gene (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
mepirin and TRAF homology domain-containing protein	At2g04170	+	+
putative poly(A) polymerase	At4g32850	+	
Chromatinorganisation:			
putative histone H2A	At1g52740		+
glycine-rich protein	At1g65440	+	+
high mobility group protein beta2 (HMGbeta2)	At1g20696	+	+
histone H1	At2g30620	+	+
histone H3, putative	At3g27360	+	
linker histone protein	At1g14900	+	
RNA-Prozessierung:			
DEAD/DEAH box helicase carpel factory (CAF)	At1g01040	+	+
RNA binding protein 45 (RBP45), putative	At4g27000	+	
arginine/serine-rich splicing factor SC35	At5g64200	+	
polynucleotide phosphorylase	At5g14580	+	
polypyrimidine tract-binding protein (PTB)	At3g01150	+	
putative pre-mRNA splicing factor	At4g03430	+	+
splicing factor-related similar to step II splicing factor SLU7	At3g45950	+	+
putative GAR1 protein	At3g03920	+	+
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP), putative	At3g07810	+	+
WD-40 repeat family protein, contains 5 WD-40 repeats, similar to pre-mRNA splicing factor PRP17	At5g54520	+	+
DEAD/DEAH box RNA helicase, putative	At5g08610	+	+
DEAD/DEAH box RNA helicase protein, putative	At3g06980	+	+
putative RNA helicase	At3g06480	+	+
Methylierung:			
SAP domain-containing protein contains	At3g04260	+	+
adenosylhomocysteinase	At4g13940	+	+
C2 domain-containing protein, similar to cold-regulated gene SRC2	At4g15740	+	+
membrane translocase - like protein	At5g11690	+	
DNA-Reparatur:			
reverse transcriptase like protein	At4g15590	+	+
HhH-GPD base excision DNA repair family protein	At1g75230	+	+
double strand break repair protein, putative	At3g23100	+	+
AT hook motif-containing protein-related, very low similarity to DNA repair and recombination protein pif1	At3g42100	+	+
putative DNA repair protein and transcription factor (XPB2)	At5g41360	+	+
Retroelemente/ Retrotransposons:			
putative retroelement pol polyprotein	At2g14640	+	+
putative retroelement pol polyprotein	At2g15100	+	+
putative non-LTR retroelement reverse transcriptase	At2g22350	+	+
Athila retroelement ORF2, putative	At5g32475	+	+
pseudogene, Athila retroelement orf1	At3g29641	+	+
Ta11 non-LTR retroelement protein, putative	At3g31430	+	+
similar to copia-like retroelement pol polyprotein	At5g49665	+	+
gypsy-like retrotransposon family	At2g13330		+
b/t pseudogene, non-LTR retroelement reverse transcriptase	At3g28920	+	+
En/Spm-like transposon protein	At2g07770	+	+
contains similarity to En/Spm transposon protein	At3g29787	+	
pseudogene, putative transposon protein	At4g04050		

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

DNA und RNA assoziierte Gene (Fortsetzung)			
Mutator-like transposase family	At4g08610	+	
hAT dimerisation domain-containing protein	At3g22220	+	
similar to putative transposase protein (CACTA-element) transposon	At5g28526		+
weitere Nukleinsäure assoziierte Gene:			
RRM-containing protein	At1g20880	+	
RRM-containing protein	At3g08000	+	+
RRM-containing protein	At5g03480	+	+
RRM-containing protein	At5g53700	+	
RRM-containing RNA-binding protein, putative	At1g07360	+	
RNA and export factor binding protein, putative	At5g02530	+	+
RRM-containing protein	At2g46780	+	+
RNA recognition motif (RRM)-containing protein	At1g76940	+	
pumilio/Puf RNA-binding domain-containing protein	At4g08560	+	
self-incompatibility protein-related	At3g26860	+	+
exoribonuclease-related, similar to exoribonuclease CSL4	At5g38890	+	+
polyadenylate-binding protein II (PAB2), putative	At5g10350	+	
polyadenylate-binding protein II (PAB2), putative	At5g51120	+	+
KH domain protein	At1g14170	+	
KH domain protein	At3g04610	+	
KH domain protein	At1g51580	+	+
replication protein-related weak similarity to Replication Protein A 70 kDa DNA-binding subunit	At5g37100	+	+
putative AT-hook DNA-binding protein	At2g45850	+	
DNA-binding family protein contains a AT hook motif	At3g04590	+	+
DNA-binding protein-related	At4g17800	+	+
DNA-binding protein-related	At1g14490		+
DNA-binding storekeeper protein-related	At4g00270	+	+
DNA-binding protein, putative	At5g35970	+	
WD-40 repeat family protein / zfw4 protein (ZFWD4)	At5g49200	+	+
WD-40 repeat family protein / zfw1 protein (ZFWD1)	At4g25440	+	+
tatD-related deoxyribonuclease family protein	At5g17570	+	+
Metabolismus			
	Gen-ID	2,5	4,5
Energie- und Kohlenhydratstoffwechsel:			
glycosyl hydrolase family 17	At3g07320	+	+
fructose-bisphosphate aldolase	At4g26520	+	+
fructose-bisphosphate aldolase - like protein	At4g26530	+	+
fructose-bisphosphate aldolase -like protein	At5g03690	+	+
putative UDP-galactose-4-epimerase	At2g34850	+	+
rhomboid family protein	At3g53780	+	+
6-phosphogluconolactonase-like protein	At5g24400	+	
alpha-amylase - like protein	At4g25000	+	+
alpha-mannosidase -like protein	At5g14950	+	
citrate synthase-like protein	At3g60100	+	
glycosyl hydrolase family 14 (beta-amylase)	At5g18670		+
haloacid dehalogenase-like	At4g39970		+
sucrose synthase, putative	At1g73370		+
dTDP-glucose 4-6-dehydratase - like protein	At5g59290	+	+
2,3-biphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase family protein	At4g09520	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Metabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
glycosyl hydrolase family 17	At4g34480	+	
glycosyl hydrolase family 38 (alpha-mannosidase)	At5g13980	+	+
ATP citrate-lyase, putative	At1g60810	+	
galactinol synthase, putative	At1g60450	+	
galactose-1-phosphate uridyl transferase-like protein	At5g18200	+	+
glycosyl hydrolase family 17	At1g64760	+	
Sucrose synthase, putative	At5g64790	+	
glycosyl hydrolase family 3	At5g20950	+	
glycosyl hydrolase family 31	At5g11720	+	+
glycosyl hydrolase family 77 (4-alpha-glucanotransferase)	At2g40840	+	
L-ascorbate oxidase family	At4g39830	+	
malate oxidoreductase, putative, similar to NADP-dependent malic enzyme	At2g19900	+	
putative 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	At1g09780	+	
putative enolase	At1g74030	+	
pantothenate kinase-related	At2g17340	+	+
alcohol dehydrogenase (ATA1)	At3g42960	+	
aconitate hydratase-related / citrate hydro-lyase-related	At5g54950	+	+
putative transketolase precursor	At2g45290	+	
transketolase - like protein	At3g60750	+	
galactosyltransferase family protein	At5g53340	+	
invertase inhibitor homolog	At5g64620	+	+
invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	At4g12390	+	+
invertase/pectin methylesterase inhibitor family protein	At3g47670	+	
Nukleotid-, Aminosäure- und Sekundärmetabolismus:			
adenosine kinase 2 (ADK2)	At5g03300	+	+
uridine diphosphate glucose epimerase	At1g12780	+	+
nucleoside diphosphate kinase family protein	At1g17410	+	+
nucleosidase-related	At4g28940	+	+
quinolinate phosphoribosyl transferase family protein	At2g01350	+	
cytidine deaminase 7	At4g29600	+	+
succinic semialdehyde dehydrogenase (gabD), putative	At1g79440	+	
spermidine synthase	At5g53120	+	+
caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative	At1g24735	+	+
alanine--glyoxylate aminotransferase, putative / beta-alanine-pyruvate aminotransferase	At4g39660	+	+
ornithine cyclodeaminase/mu-crystallin family protein	At5g52810	+	
dihydroneopterin aldolase family	At3g21730	+	
PRLI-interacting factor-related	At5g60050	+	
putative phospholipase	At2g39410	+	
Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase, putative	At3g29590	+	+
carboxyphosphoenolpyruvate mutase, putative	At1g77060	+	+
betaine aldehyde dehydrogenase, putative	At3g66658	+	
CTP synthase - like protein	At4g02120	+	+
3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate, putative	At1g22410	+	+
ketol-acid reductoisomerase	At3g58610	+	+
NADP-specific glutatamate dehydrogenase, putative	At1g51720	+	+
aconitase C-terminal domain-containing protein	At2g43100	+	+
glutamate dehydrogenase 2	At5g07440	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Metabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
acetylglutamate kinase-like protein	At3g57560	+	+
homocysteine S-methyltransferase 1 (HMT-1)	At3g25900	+	+
membrane protein, putative	At1g63120	+	+
putative alanine acetyl transferase	At2g32030	+	
ATP phosphoribosyl transferase 2 (ATP-PRT2)	At1g09795	+	+
argininosuccinate lyase (AtArgH)	At5g10920	+	+
imidazoleglycerol-phosphate synthase subunit H - like	At5g60540	+	+
CBS domain-containing protein	At5g10860	+	+
2-oxoglutarate-dependent dioxygenase, putative (AOP2)	At4g03060	+	+
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	At4g15500	+	+
UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	At5g38040	+	
glycosyltransferase family protein	At4g27560	+	
UDP-glucose:indole-3-acetate beta-D-glucosyltransferase (iaglu)	At4g15550	+	+
Cytochrom P450:			
cytochrome p450, putative	At1g64940	+	+
cytochrome P450 family protein, Similar to Cytochrome P450 91A1	At4g37340	+	+
cytochrome p450 family	At1g13080	+	+
cytochrome p450 family	At1g13110	+	+
cytochrome p450 family	At2g14100	+	+
cytochrome P450 monooxygenase	At1g33720	+	
cytochrome p450, putative	At4g37410	+	
Phenylpropanoidbiosynthese:			
flavonoid 3'-hydroxylase (F3'H)	At5g07990	+	+
putative flavonol glucosyltransferase	At4g01070	+	+
leucoanthocyanidin dioxygenase-like protein	At5g05600	+	+
pseudogene, putative amp-binding protein	At1g65875	+	
Isoprenoidbiosynthese:			
lupeol synthase (LUP1)	At1g78970	+	+
AMP-dependent synthetase and ligase family protein	At1g20560	+	+
1-D-deoxyxylulose 5-phosphate synthase - like protein	At5g11380	+	+
terpene synthase/cyclase family	At3g14540	+	+
transferase family protein similar to 10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyl transferase	At5g07080	+	+
Alkaloidbiosynthese:			
FAD-binding domain-containing protein, similar to reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	At1g34575	+	
FAD-binding domain-containing protein, similar to reticuline oxidase precursor (Berberine-bridge-forming enzyme)	At1g26410	+	+
transferase family protein, similar to deacetylindoline 4-O-acetyltransferase	At5g47950	+	
Lipidmetabolismus:			
digalactosyldiacylglycerol synthase	At3g11670	+	+
phospholipase A2 beta	At2g19690	+	
phospholipase A2-like protein	At4g29460	+	+
Phospholipase D, putative	At3g15730	+	
phospholipase D-gamma, putative	At4g11840	+	+
fatty acid hydroxylase (FAH1)	At2g34770	+	+
cytochrome b5 isoform 1	At5g53560	+	
cytochrome b5	At2g32720	+	
Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5/6 kinase	At5g16760	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Metabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
inositol polyphosphate 5-phosphatase II (IP5PII)	At4g18010	+	+
oleosin	At5g40420	+	+
tetraacyldisaccharide 4'-kinase family protein	At3g20480	+	+
putative phosphatidylglycerotransferase	At4g04870	+	
6-phosphogluconate dehydrogenase	At5g41670	+	+
pyruvate decarboxylase-1 (Pdc1)	At4g33070	+	
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein	At5g45920	+	+
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein similar to family II lipase EXL3	At5g37690	+	+
esterase/lipase/thioesterase family protein low similarity to 3-oxoadipate enol-lactone hydrolase	At3g03990	+	
proline iminopeptidase	At2g14260	+	+
hydrolase, alpha/beta fold family protein	At5g17780	+	+
adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase-like protein	At5g57590	+	
hydrolase, alpha/beta fold family protein	At5g39220	+	+
hydrolase, alpha/beta fold family protein	At5g41900	+	+
peroxisomal membrane protein-related	At4g14310	+	+
thioesterase family protein	At2g29590	+	+
Transport			
	Gen-ID	2,5	4,5
Kohlenhydrattransport:			
D-xylose-H ⁺ symporter - like protein	At5g59250	+	+
glucose transporter	At1g11260	+	+
putative sucrose/H ⁺ symporter	At2g02860	+	+
sugar transporter-like protein	At5g27350	+	+
sugar transporter family protein similar to xylose permease	At3g03090	+	
sugar transporter, putative	At3g05400	+	
putative Na ⁺ -dependent inorganic phosphate cotransporter	At2g29650	+	+
glucose transporter	At4g21480	+	
monosaccharide transport protein, STP4	At3g19930	+	+
phosphate transport protein	At3g54700	+	+
Aminosäure-, Lipid-, Protein- und Wassertransport:			
ABC transporter family protein	At5g39040	+	+
ABC transporter family protein ABC transporter-like proteins	At3g60970	+	+
ABC transporter family protein	At2g36380	+	
ABC transporter family protein	At3g60160	+	
ABC1 family protein contains Pfam domain	At3g24190		+
lysine and histidine specific transporter, putative	At1g25530	+	+
amino acid permease	At5g40780	+	
amino acid transport protein AAT1	At4g21120	+	+
alpha-soluble NSF attachment protein-like	At3g56450	+	+
ammonium transport protein (AMT1)	At4g13510	+	+
transporter, putative similar to glycerol-3-phosphate transporter	At1g30560	+	
RNase L inhibitor protein, putative	At4g19210	+	
lysine and histidine specific transporter, putative	At1g48640	+	
plasma membrane intrinsic protein 1B (PIP1B)	At2g45960	+	+
major intrinsic family protein / MIP	At3g47440	+	+
major intrinsic family protein / MIP	At3g04090	+	+
gamma tonoplast intrinsic protein; gamma tonoplast intrinsic protein 2 (TIP2).	At3g26520	+	

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Transport (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
mitochondrial carrier protein family	At4g32400	+	+
mitochondrial carrier protein family	At5g64970	+	
proton-dependent oligopeptide transport (POT)	At3g25280	+	
high-affinity nitrate transporter ACH1 - like protein	At5g60770	+	
amino acid permease, putative	At3g19553	+	
C4-dicarboxylate transporter/malic acid transport family protein	At4g27970	+	+
outer membrane lipoprotein - like	At5g58070	+	+
peptide transporter	At5g46040	+	+
adenylate translocator	At3g08580	+	
36kDa-peroxisomal membrane protein (PMP36)	At2g39970	+	
putative transmembrane protein G5p	At3g51830	+	+
esterase/lipase/thioesterase family protein	At3g03230	+	+
lanthionine synthetase C-like family protein	At2g20770	+	+
mitochondrial carrier protein family	At5g46800	+	+
syntaxin SYP121	At3g11820	+	+
syntaxin SYP111 (KNOLLE)	At1g08560	+	
putative coatmer protein complex, subunit beta 2 (beta prime)	At1g79990	+	
synaptobrevin 7B, putative	At1g04750	+	
putative synaptobrevin	At2g32670	+	
TMS membrane family protein / tumour differentially expressed (TDE)	At1g16180	+	+
vesicle-associated membrane family protein / VAMP	At4g21450	+	
translocon-associated protein alpha (TRAP alpha) family protein	At2g21160	+	+
acyl-CoA binding protein, putative / ACBP	At5g53470	+	+
integral membrane HRF1 family protein	At3g59500	+	+
choline transporter-related contains weak similarity to CD92 protein	At4g38640	+	+
phosphate translocator-related	At5g11230	+	
Energiegewinnung/ Redoxgleichgewicht:			
nitrogen fixation NifU-like family protein similar to HIRA-interacting protein 5	At3g20970	+	
cytochrome b561, putative	At1g26100	+	+
succinate dehydrogenase flavoprotein alpha subunit	At5g66760	+	
tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein	At2g42580	+	+
putative inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase	At1g05630		+
thioredoxin, putative	At3g06730	+	
ferredoxin-related	At3g17670	+	
rubredoxin family protein	At5g17170	+	
glutaredoxin family protein	At5g03870	+	+
Ionen-transport:			
P-ATPase			
ATPase E1-E2 type family protein	At4g30120	+	+
V-ATPasen			
vacuolar ATP synthase subunit B	At1g76030	+	+
vacuolar ATP synthase subunit B	At4g38510	+	
vacuolar ATP synthase subunit D (VATD)	At3g58730	+	+
vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit 2	At1g19910	+	
Pyrophosphatasen			
pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	At1g15690	+	
vacuolar-type H ⁺ -translocating inorganic pyrophosphatase (AVPL1)	At1g78920	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Transport (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
F-ATPase			
AAA-type ATPase family protein, similarity to mitochondrial ATPase (AAA family) Bcs1p	At4g05380	+	+
H ⁺ -Antiport			
putative potassium transporter/channel	At2g25600	+	+
aldo/keto reductase family protein	At1g60680	+	
MATE efflux protein-related	At5g52050	+	
MATE efflux family protein similar to ripening regulated protein DDTFR18	At4g25640	+	
weitere Ionentransporter:			
copper-binding family protein similar to copper homeostasis factor	At5g24580	+	+
copper transport protein - like	At5g59040	+	+
heavy-metal-associated domain-containing protein	At1g49420	+	
heavy-metal-associated domain-containing protein	At5g52740	+	+
heavy-metal-associated domain-containing protein	At2g37390	+	
similar to axi 1 protein from Nicotiana tabacum	At2g01480	+	+
sodium hydrogen antiporter, putative similar to NhaD	At3g19490	+	
putative zinc transporter	At2g46800	+	
copper chaperone (CCH)-related	At1g56210	+	+
Proteinmetabolismus			
	Gen-ID	2,5	4,5
Proteinanabolismus:			
40S ribosomal protein S10	At5g41520	+	
40S ribosomal protein S8 (RPS8A)	At5g20290	+	+
50S ribosomal protein L21 chloroplast precursor (CL21)	At1g35680		+
50S ribosomal protein-related	At4g23620	+	+
60S acidic ribosomal protein P1-like protein	At5g47700	+	+
60S RIBOSOMAL PROTEIN - like	At3g49910	+	
60S ribosomal protein - like	At5g02870	+	+
60S ribosomal protein (fragment), putative	At1g35200		+
60S RIBOSOMAL PROTEIN L12 -like	At3g53430	+	
60S ribosomal protein L21, putative	At1g57860	+	
60S ribosomal protein L27A	At1g70600	+	+
60S ribosome subunit biogenesis protein	At4g15770	+	+
acidic ribosomal protein p1	At4g00810	+	+
agenet domain-containing protein	At5g23800	+	+
elongation factor 1-alpha, putative / EF-1-alpha	At5g10630	+	+
elongation factor Tu C-terminal domain-containing protein	At1g35550	+	
eukaryotic release factor 1 homolog	At5g47880	+	
eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit-like protein	At5g05470	+	
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit g (eIF3g)	At3g11400	+	+
eukaryotic translation initiation factor 4A (eIF4A), putative	At1g72730	+	+
eukaryotic translation initiation factor-related	At4g23330	+	+
translation initiation factor eIF-2 gamma subunit	At2g18720	+	
isoleucyl-tRNA synthetase	At5g49030	+	+
phenylalanyl-tRNA synthetase, putative	At4g39280	+	
protein phosphatase 2C (PP2C)	At3g15260	+	+
putative asparaginyl-tRNA synthetase	At3g07420	+	+
putative eukaryotic translation initiation factor 2 alpha subunit, eIF2	At2g40290	+	+
putative ribosomal protein L19	At4g02230	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Proteinmetabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
putative ribosomal protein S13	At4g00100	+	+
putative subunit of TOC complex	At5g09420	+	+
putative vacuolar processing enzyme	At2g25940	+	+
ribosomal protein L17 -like protein	At3g54210	+	+
ribosomal protein L35 -like	At3g55170	+	
ribosomal protein L9, putative	At1g33140	+	+
ribosomal protein precursor - like	At5g14320	+	+
ribosomal protein, putative	At3g25520		+
S1 RNA-binding domain-containing protein	At3g23700	+	+
selenium binding protein, putative	At3g23800	+	+
SWIM zinc finger family protein	At2g07320	+	
putative gamma-glutamyltransferase	At1g69820	+	
Proteinkatabolismus:			
Ub/26S			
20S proteasome alpha subunit F1 (PAF1)	At5g42790	+	+
20S proteasome alpha subunit F2 (PAF2)	At1g47250	+	+
armadillo/beta-catenin repeat family protein	At5g01830	+	+
armadillo/beta-catenin repeat family protein	At5g62560	+	+
COP9 signalosome complex-related / CSN	At3g12850	+	+
E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative	At1g78870	+	+
E2, ubiquitin-conjugating enzyme, putative	At1g64230	+	
E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1 (At3), putative	At2g25700	+	
E3 ubiquitin ligase SCF complex subunit SKP1/ASK1 (At9), putative	At3g21850	+	
F-box protein ZEITLUPE/FKF/LKP/ADAGIO family	At1g51550	+	+
mepirin and TRAF homology domain-containing protein	At5g26300	+	+
mepirin and TRAF homology domain-containing protein	At5g26320	+	+
mepirin and TRAF homology domain-containing protein	At3g58200	+	+
mepirin and TRAF homology domain-containing protein	At3g58220	+	+
n-calpain-1 large subunit, putative	At1g55350	+	
PHD finger family protein	At2g37520	+	+
PHD finger family protein	At3g24010	+	
polyubiquitin (UBQ3)	At5g03240	+	+
polyubiquitin (UBQ4)	At5g20620	+	+
putative ARI-like RING zinc finger protein	At2g31770	+	+
TRAF-type zinc finger-related	At1g09920	+	
ubiquitin-associated (UBA)	At5g12120	+	+
ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kd	At5g62540	+	+
ubiquitin-like protein (UBQ8)	At3g09790		+
ubiquitin-specific protease 12 (UBP12)	At5g06600	+	
ubiquitin-specific protease 23 (UBP23), putative	At5g57990	+	
F-box family protein	At3g49450	+	+
F-box family protein	At2g17310	+	+
F-box family protein	At2g26160	+	+
F-box family protein	At5g46170	+	
F-box family protein	At5g49610	+	
F-box family protein	At3g17530	+	
F-box family protein	At5g52620	+	+
F-box family protein	At1g20790	+	+
F-box family protein	At5g03970	+	+
F-box family protein	At2g43260		+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Proteinmetabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
F-box protein family	At1g55590	+	+
F-box protein	At4g26340	+	+
F-box protein	At1g13780	+	
F-box protein	At4g00160	+	+
F-box protein	At5g44490	+	
F-box family protein	At1g67160	+	+
F-box family protein low similarity to SKP1 interacting partner 6	At4g39060	+	+
Kelch repeat containing F-box protein family	At2g29860	+	+
kelch repeat-containing F-box family protein	At3g46050	+	
kelch repeat-containing F-box family protein	At4g39756	+	
kelch repeat-containing F-box family protein	At1g74510	+	+
kelch repeat-containing F-box family protein	At1g22040		+
kelch repeat-containing F-box family protein low similarity to SKP1 interacting partner 6	At1g19470	+	
kelch repeat-containing F-box family protein similar to SKP1 interacting partner 6	At3g10510	+	+
kelch repeat-containing F-box family protein similar to SKP1 interacting partner 6	At5g03020	+	+
putative RING-H2 zinc finger protein	At2g15580	+	+
putative RING zinc finger protein; very low similarity to RING-H2 finger protein RHG1a	At1g68070	+	+
BR domain-containing protein / ARIADNE-like protein ARI7 (ARI7)	At2g31510	+	+
RING-H2 finger protein RHA2b	At2g01150	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At2g15260	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At3g46620	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At3g63530	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At4g09100	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At4g38140	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At2g45530	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At5g41450	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At5g05830	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At4g25230	+	
zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein similar to RING-H2 zinc finger protein ATL6	At2g46160	+	+
zinc finger (C3HC4-type RING finger)	At5g41350	+	
OTU-like cysteine protease family protein	At5g04250	+	+
weitere Enzyme des Proteinkatabolismus:			
AAA-type ATPase family protein	At5g16930	+	+
AAA-type ATPase family protein	At1g62130	+	+
putative AAA-type ATPase	At2g18190	+	
CAAX amino terminal protease family protein	At5g60750	+	+
fatty acid desaturase family protein	At4g04930	+	
leucyl aminopeptidase - like protein	At4g30920	+	+
prohibitin - like protein	At5g14300	+	+
prolyl aminopeptidase-like protein	At3g61540	+	+
aspartyl protease family protein contains Eukaryotic and viral aspartyl proteases active site	At3g51360		+
putative prolylcarboxypeptidase	At2g24280		+
putative serine carboxypeptidase II	At2g24000		+
putative serine carboxypeptidase II	At2g33530	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Proteinmetabolismus (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
aspartic protease, putative	At1g62290	+	
putative aspartic protease	At4g04460	+	
cathepsin B-like cysteine protease, putative	At1g02300	+	
cysteine proteinase, putative	At2g34080	+	+
cysteine proteinase RD19A	At4g39090	+	
FtsH protease, putative similar to AAA-metalloprotease FtsH	At1g07510	+	
peptidase M48 family protein, metalloendopeptidase activity	At5g51740	+	+
peptidase M50 family protein, metalloendopeptidase activity	At5g05740	+	
subtilisin-like serine protease	At5g58830		+
subtilisin-like serine protease	At4g10530	+	+
subtilisin-like serine protease	At4g10540	+	
subtilisin-like serine protease	At4g34980	+	
Auxin und Wachstum			
	Gen-ID	2,5	4,5
Auxinsynthese:			
Trp-abhängig:			
flavin-containing monooxygenase / FMO (YUCCA3)	At1g04610	+	+
cytochrome p450 family, CYP83A1	At4g13770	+	+
Auxinkonjugate:			
IAA-amino acid hydrolase 5 / auxin conjugate hydrolase (ILL5)	At1g51780	+	
encodes a protein similar to IAA-amido synthases; GH3.1	At2g14960	+	+
IAA-alanine resistance protein 1 (IAR1)	At1g68100	+	+
Auxintransport:			
auxin efflux carrier family protein	At5g16530	+	+
ABC transporter family protein, contains similar to multidrug-resistant protein	At4g18050	+	+
Auxinrezeptoren:			
auxin-binding protein 1 (ABP1)	At4g02980	+	
Auxin induzierte Gene:			
auxin-responsive family protein, similar to auxin-induced protein SAURX10A	At4g34790	+	+
auxin-responsive family protein, similar to auxin-induced protein SAUR-AC1	At2g36210	+	
auxin-responsive protein, putative, similar to auxin-induced protein TGSAUR21	At2g16580	+	+
auxin-responsive GH3 family protein	At5g13320	+	+
auxin-responsive factor (ARF10)	At2g28350	+	+
Auxin induzierte Wachstumsgene:			
leucine-rich repeat family protein, identical to cDNA hypothetical protein (AIR9)	At2g34680	+	+
LOB domain protein 17 / lateral organ boundaries domain protein 17 (LBD17)	At2g42440		+
LOB domain protein 29 / lateral organ boundaries domain protein 29 (LBD29)	At3g58190	+	+
weitere Wachstums assoziierte Gene:			
putative glutaredoxin	At3g02000	+	+
Sas10/U3 ribonucleoprotein (Utp)	At2g43650	+	+
SSXT protein-related / glycine-rich protein	At5g28640	+	
TGF beta receptor associated protein-related	At1g22860	+	+
GCN5-related N-acetyltransferase	At5g13780	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Auxin und Wachstum (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
Zellzyklus:			
putative cyclin-dependent protein kinase	At3g05050	+	
Cyclin-dependent kinase B2;1	At1g76540	+	+
Cyclin D3;3	At3g50070	+	
excyst subunit EXO70 family protein	At5g13990	+	
excyst subunit EXO70 family protein	At1g54090	+	+
temperature sensing protein-related	At4g05440	+	+
yellow-leaf-specific protein 8 (YLS8) / mitosis protein DIM1	At5g08290	+	+
Nodulation:			
nodulin MtN21 family protein	At1g11460	+	+
integral membrane family protein / nodulin MtN21-related	At3g45870	+	
nodulin MtN3 family protein	At4g15920	+	
GDSL-motif lipase/hydrolase family protein, similar to early nodulin ENOD8	At5g14450	+	+
universal stress protein (USP) family protein / early nodulin ENOD18 family protein	At3g03270	+	
RWP-RK domain-containing protein similar to nodule inception protein	At4g38340	+	+
Photosynthese, Chloroplasten und Licht abhängige Prozesse			
	Gene-ID:	2,5	4,5
chloroplast lumen common protein family	At3g09490	+	+
phototropic-responsive NPH3 family protein	At3g03510	+	+
protochlorophyllide reductase C	At1g03630	+	
putative rubisco subunit binding-protein alpha subunit	At2g28000	+	+
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At2g37540	+	+
thylakoid luminal 17.9 kDa protein, chloroplast precursor	At4g24930	+	+
phytochrome E	At4g18130		+
putative dimethyladenosine transferase	At2g47420	+	+
chlorophyll A-B binding family protein / early light-induced protein (ELIP)	At3g22840	+	+
phytochrome A signal transduction 1 (PAT1)	At5g48150	+	+
Zellwand und Cytoskelett			
	Gen-ID	2,5	4,5
Cellulosesynthese:			
amylogenin; reversibly glycosylatable polypeptide	At5g16510	+	+
cellulose synthase - like protein	At4g18780	+	
cellulose synthase catalytic subunit (IRX3)	At5g17420	+	+
cellulose synthase catalytic subunit	At5g64740	+	+
putative cellulose synthase	At2g32530	+	
putative cellulose synthase	At2g33100	+	
glycosyl transferase family 2 protein similar to cellulose synthase	At5g16190	+	+
Glycoproteine:			
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At2g18910	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At1g21090	+	
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g55390	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g02850	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g57070	+	
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g48920	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At4g23470	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At1g21695	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	At5g14380	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein family	At4g28160	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Zellwand und Cytoskelett (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
hydroxyproline-rich glycoprotein homolog	At4g14900	+	+
hydroxyproline-rich glycoprotein-related	At5g51680	+	+
extensin - like protein	At4g38770	+	+
extensin-like protein	At4g13390	+	
predicted proline-rich protein	At4g28300	+	+
proline-rich family protein	At2g41420	+	+
proline-rich family protein	At2g16630	+	+
proline-rich family protein	At5g43770	+	+
leucine-rich repeat family protein	At1g49490	+	
arabinogalactan-protein (AGP7)	At5g65390	+	+
arabinogalactan-protein (AGP10)	At4g09030	+	+
arabinogalactan-protein (AGP11)	At3g01700	+	+
arabinogalactan-protein (AGP12)	At3g13520	+	+
putative glycine-rich cell wall protein	At4g36230	+	+
glycine-rich protein	At4g21620	+	+
glycine-rich protein	At2g26120	+	+
glycine-rich protein	At4g33610	+	
putative glycine-rich protein	At4g22480	+	+
sonstige Zellwand assoziierte Gene:			
xyloglucan endotransglycosylase (TCH4)	At5g57560	+	+
xyloglucan endotransglycosylase, putative	At4g18990	+	+
YGGT family protein	At5g21920	+	+
yrnC family protein	At3g01920	+	+
pectate lyase, putative	At3g54920	+	+
pectinesterase	At5g04970	+	+
pectinesterase family	At3g05620	+	
pectinesterase family	At3g29090	+	+
pectinesterase family	At5g07410	+	
pectinacylesterase, putative	At3g05910	+	+
DC1 domain-containing protein	At3g11390		+
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	At1g62970	+	
formin homology 2 domain-containing protein	At5g54650	+	+
formin homology 2 domain-containing protein	At5g48360	+	+
nuclear protein ZAP-related similar to nuclear protein ZAP	At5g62760		+
dolichyl-di-phosphooligosaccharide-protein glycotransferase	At5g66680	+	+
callose synthase (1,3-beta-glucan synthase) family	At3g07160	+	+
ferulate-5-hydroxylase (FAH1)	At4g36220	+	+
O-methyltransferase 1	At5g54160	+	
O-methyltransferase 1, putative	At1g21130	+	+
putative cinnamoyl-CoA reductase	At2g33600	+	+
glycosyl hydrolase family 35 (beta-galactosidase)	At4g35010	+	+
Cytoskelett:			
tubulin folding cofactor B	At3g10220	+	+
tubulin folding cofactor A (KIESEL)	At2g30410	+	
actin depolymerizing factor 5	At2g16700	+	+
actin depolymerizing factor-like protein	At4g25590	+	
armadillo/beta-catenin repeat family protein / kinesin motor family	At1g12430	+	+
kinesin light chain-related low similarity to kinesin light chain	At4g10840	+	+
autophagy 8e (APG8e), Microtubule associated protein 1A/1B	At2g45170	+	

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Zellwand und Cytoskelett (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
microtubule associated protein (MAP65/ASE1) family protein low similarity to protein regulating cytokinesis 1 (PRC1)	At4g26760		+
microtubule organization 1 protein (MOR1)	At2g35630	+	+
Abwehr assoziierte Gene			
	Gen-ID	2,5	4,5
Pathogenerkennung:			
leucine-rich repeat family protein, contains leucine rich-repeat (LRR), contains similarity to Cf-2.1	At3g53240	+	+
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), similar to disease resistance protein RPP1-WsC	At3g04220	+	
disease resistance protein (TIR class), similar to disease resistance protein RPS4	At1g57670	+	+
disease resistance-responsive family protein	At3g55230	+	+
disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	At5g66890	+	+
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	At2g14080	+	
disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class), putative	At5g45260	+	+
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	At5g48620	+	+
disease resistance protein (CC-NBS-LRR class), putative	At1g63360	+	+
non-race specific disease resistance protein (NDR1)	At3g20600	+	
glycosyl hydrolase family 81 protein, similar to beta-glucan-elicitor receptor	At5g15870	+	+
oxidative burst:			
ATP-NAD kinase family protein contains similarity to NAD kinase	At1g21640		+
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g52880	+	+
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g27820	+	
monodehydroascorbate reductase, putative	At3g09940		+
monodehydroascorbate reductase, putative	At5g03630	+	+
peroxidase, putative, similar to peroxidase ATP3a	At5g64110	+	+
peroxidase, putative, identical to peroxidase ATP21a	At3g49960	+	
peroxidase, putative, identical to peroxidase ATP24a	At5g39580	+	+
peroxidase, putative	At5g64120	+	+
peroxidase 17 (PER17) (P17)	At2g22420	+	+
glutathione S-transferase, putative; belonging to the tau class of GSTs	At2g29420	+	+
ferredoxin--NADP+ reductase - like protein	At4g05390	+	
type 2 peroxiredoxin, putative	At1g65970	+	+
acid phosphatase type 5	At3g17790	+	
peptide methionine sulfoxide reductase - like protein	At5g61640	+	+
glutamate-cysteine ligase / gamma-glutamylcysteine synthetase (GSH1)	At4g23100	+	+
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At1g24470	+	
short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	At3g03980	+	+
putative tropinone reductase	At2g29320	+	+
putative tropinone reductase	At2g29370	+	+
PR-Gene:			
PR-1			
allergen V5/Tpx-1-related family protein, low similarity to Pathogenesis-related protein PR-1 precursor	At5g57625	+	+
allergen V5/Tpx-1-related family protein, low similarity to Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1)	At2g19980	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Abwehr assoziierte Gene (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
allergen V5/Tpx-1-related family protein contains similarity to protein precursor (PR-1)	At5g66590	+	+
PR-2			
Bet vi allergen family protein low similarity to Pathogenesis-related 2	At5g45860		+
PR-3, -4, -8, -11			
glycosyl hydrolase family 19 (chitinase)	At1g02360	+	+
glycosyl hydrolase family 19 (chitinase)	At2g43570	+	
glycosyl hydrolase family 18 protein, similar to chitinase, class V	At4g19740	+	
acidic endochitinase (CHIB1)	At5g24090	+	+
PR-5			
thaumatin, putative, strong similarity to pathogenesis-related group 5	At1g18250	+	
PR-6			
cysteine protease inhibitor, putative / AtCYST1	At5g12140	+	+
trypsin inhibitor 2, putative	At1g47540	+	+
serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	At2g38900	+	+
serpin family protein / serine protease inhibitor family protein	At1g62170	+	
serpin, putative / serine protease inhibitor	At1g47710	+	+
PR-10			
major latex protein-related / MLP-related, Pathogenesis-related protein Bet v I family	At4g23670	+	+
PR-14			
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At4g12490	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At1g32280	+	
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At1g62790	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At3g22620	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At5g07230	+	+
protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP)	At4g12530		+
HR und Seneszenz:			
band 7 family protein strong similarity to hypersensitive-induced response protein	At5g62740	+	+
band 7 family similar to hypersensitive-induced response protein	At5g51570	+	+
accelerated cell death 2 (ACD2)	At4g37000	+	
MA3 domain-containing similar to programmed cell death 4 protein	At3g48390	+	
transferase family protein low similarity to hypersensitivity-related gene	At3g23840	+	+
senescence-associated protein 5-like protein	At5g46700	+	+
senescence-associated protein-related similar to senescence-associated protein SAG102	At5g65040	+	
diacylglycerol O-acyltransferase	At2g19450	+	
mitochondrial 28S ribosomal protein S29-related contains weak similarity to mitochondrial 28S ribosomal protein S29 (MRP-S29, Death-associated protein 3, DAP-3) [Homo sapiens]	At1g16870	+	+
weitere Abwehr und Stress assoziierte Gene:			
heat shock protein 17.6-II	At5g12020	+	
heat shock protein 70, putative / HSP70	At3g12580	+	+
heat shock cognate 70 kDa protein 2 (HSC70-2)	At5g02490	+	+
heat shock cognate 70 kDa protein 1 (HSC70-1)	At5g02500	+	+
HEAT SHOCK PROTEIN 81-2 (HSP81-2)	At5g56030	+	+
putative DnaJ protein	At2g21510	+	+
DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	At2g42750	+	+
DNAJ heat shock protein, mitochondrially targeted (GFA2)	At5g48030	+	

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)

Abwehr assoziierte Gene (Fortsetzung)			
	Gen-ID	2,5	4,5
luminal binding protein 3 (BiP-3)	At1g09080	+	+
15.7 kDa class I-related small heat shock protein-like (HSP15.7-CI)	At5g37670	+	+
auxilin-related	At4g12780	+	
bundle-sheath defective protein 2 family / bsd2	At3g47650	+	+
heat shock protein-related	At5g54660		+
26.5 kDa class I small heat shock protein-like (HSP26.5-P)	At1g52560	+	
FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, putative	At5g64350	+	+
enolase (2-phospho-D-glycerate hydroylase)	At2g36530	+	
ERD15 protein	At2g41430	+	
histidinol dehydrogenase, putative / HDH, putative	At5g63890	+	+
glycosyl transferase family 8 protein	At3g58790	+	
transmembrane protein-related (TOM1)	At4g21790	+	+
tobamovirus multiplication protein 3, putative / TOM3	At1g14530	+	+

Tabelle 8.1 (Fortsetzung)