

**CHARAKTERISIERUNG EINES SAFENERINDUZIERBAREN PROMOTORS UND
ANALYSE DER SAFENERABHÄNGIGEN GENEXPRESSION IN *ARABIDOPSIS
THALIANA***

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)**

FAKULTÄT FÜR NATURWISSENSCHAFTEN

UNIVERSITÄT HOHENHEIM

**Institut für Physiologie
und Biotechnologie der Pflanzen**

vorgelegt von

Carina Behringer

aus Heidelberg

2009

Dekan:	Prof. Dr. Heinz Breer
1. berichtende Person:	Prof. Dr. Andreas Schaller
2. berichtende Person:	Prof. Dr. Rüdiger Hain
Eingereicht am:	22.07.2009
Mündliche Prüfung am:	20.11.2009

Die vorliegende Arbeit wurde am 18.09.2009 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

Für meine Eltern

Günter und Iris Behringer

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 HERBIZID SAFENER	3
1.1.1 DER SAFENER WIRKMECHANISMUS	5
1.1.2 DIE SAFENER MEFENPYR-DIETHYL UND ISOXADIFEN-ETHYL	8
1.1.3 GLUTATHION-S-TRANSFERASEN	11
1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	13
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 MATERIAL	15
2.1.1 GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIALIEN	15
2.1.2 CHEMIKALIEN	16
2.1.3 ENZYME	16
2.1.4 REAKTIONS- UND AUFREINIGUNGSSYSTEME	17
2.1.5 PFLANZENMATERIAL	18
2.1.6 BAKTERIENSTÄMME	18
2.1.7 VEKTOREN	19
2.2 ANGEWANDTE METHODEN	20
2.2.1 VERWENDETE SOFTWARE UND DATENBANKEN	20
2.2.2 STERILISATION	20
2.2.3 KULTIVIERUNG UND TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i>	21
2.2.4 KULTIVIERUNG UND TRANSFORMATION VON <i>A. TUMEFACIENS</i>	22
2.2.5 KULTIVIERUNG UND TRANSFORMATION VON <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	23
2.2.6 PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	24
2.2.7 KLONIERUNG UND PLASMIDKONSTRUKTION	30
2.2.8 APPLIKATIONSVERSUCHE	33
2.2.9 REPORTERGEN TESTS	33
2.2.10 DIE CHROMATIN IMMUNO PRÄZIPITATION (CHIP)	35
2.2.11 MICROARRAY EXPERIMENTE	42
2.2.12 PROBENAUFARBEITUNG FÜR DIE MULTIPLEX GASCHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY (GC-MS/MS)	47
2.2.13 AUSWERTUNG DER MICROARRAY DATEN	47

3	ERGEBNISSE	50
3.1	INDUZIERBARKEIT DES IN2.1-PROMOTORS DURCH VERSCHIEDENE SUBSTANZEN	50
3.2	CIS AKTIVE ELEMENTE DES IN2.1-PROMOTORS	52
3.2.1	PROMOTOR DELETIONSANALYSE	52
3.2.2	DATENBANKSUCHE NACH CIS-AKTIVEN ELEMENTEN	54
3.2.3	INDUZIERBARKEIT DES <i>IN2.1ΔOCS</i> -PROMOTORS	57
3.2.4	MINIMALPROMOTER MIT OCS ELEMENT	60
3.3	REGULATION DES IN2.1-PROMOTORS DURCH TGA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	61
3.3.1	BINDUNG VON TGA2/5 AN DEN <i>IN2.1</i> -PROMOTOR	61
3.3.2	INDUZIERBARKEIT DES <i>P_{IN2.1}</i> :GUS-KONSTRUKTS IN DER <i>4TGA</i> MUTANTE	65
3.4	REGULATION DES IN2.1-PROMOTORS DURCH SALIZYLSÄURE	66
3.4.1	INDUZIERBARKEIT DES <i>P_{IN2.1}</i> :GUS-KONSTRUKTS IN DER <i>NAHG</i> UND <i>SID2-2</i> MUTANTE	66
3.4.2	INDUZIERBARKEIT DES <i>P_{IN2.1}</i> :GUS-KONSTRUKTS IN DER <i>SAIL-1</i> MUTANTE	70
3.5	EINFLUSS DER SAFENER DEN ENDOGENEN SALIZYLSÄUREGEHALT	72
3.6	INDUZIERBARKEIT VON PR1 DURCH SAFENER UND DICHLORSALIZYLSÄURE	75
3.7	SAFENER INDUZIERTER GENEXPRESSION IN ARABIDOPSIS	78
3.7.1	QUALITÄT DES GENEXPRESSIONSEXPERIMENTS	79
3.7.2	IDENTIFIZIERUNG DIFFERENZIELL EXPRIMIERTER GENE	80
3.7.3	KATEGORISIERUNG DER DIFFERENZIELL EXPRIMIERTEN GENE	81
3.7.4	REGULATION DER SAFENERINDUZIERTEN GSTS	84
3.7.5	TGA-TRANSKRIPTIONSFAKTOR ABHÄNGIGE SAFENERINDUKTION	87
3.7.6	SALIZYLSÄURE ABHÄNGIGE SAFENER INDUKTION	88
3.8	SCREENINGSYSTEM FÜR SAFENERSIGNALWEG MUTANTEN	89
4	DISKUSSION	94
4.1	SCREENINGSYSTEM FÜR SAFENERSIGNALWEG MUTANTEN	94
4.2	INDUZIERBARKEIT DES IN2.1-PROMOTORS DURCH VERSCHIEDENE SAFENER UND SALIZYLSÄURE	95
4.3	CHARAKTERISIERUNG DES IN2.1-PROMOTORS	98
4.3.1	EIN 100 BP-SEQUENZABSCHNITT MIT ZWEI <i>AS-1</i> -ELEMENTEN IST WICHTIG FÜR DIE SAFENERINDUZIERBARKEIT DES <i>IN2.1</i> -PROMOTORS	98
4.3.2	DIE DELETION DES <i>IN2.1</i> -PROMOTOR -406 <i>OCS</i> -ELEMENTS FÜHRT ZU EINER VERMINDERTEN SAFENERINDUZIERBARKEIT	101
4.3.3	FUNKTIONALITÄT DES -406 <i>OCS</i> -ELEMENTS	102
4.4	TGA-FAKTOR ABHÄNGIGE INDUKTION DES IN2.1-PROMOTORS	103

4.4.1	TGA-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	103
4.4.2	<i>IN VIVO</i> BINDUNG VON TGA2 UND/ODER TGA5 AN DEN <i>IN2.1</i> -PROMOTOR (CHIP)	105
4.4.3	SAFENERINDUZIERBARKEIT DES <i>IN2.1</i> -PROMOTORS IN DER 4TGA MUTANTE (<i>TGA2/3/5/6</i> , KAPITEL 3.3.2)	107
4.5	NPR1-UNABHÄNGIGKEIT DES SAFENERSIGNALWEGES	108
4.5.1	NPR1, SCHLÜSSELELEMENT DER SAR	108
4.5.2	NPR1 UNABHÄNGIGE INDUKTION DES <i>IN2.1</i> -PROMOTORS	109
4.6	SALIZYLSÄURE-ABHÄNGIGKEIT DER <i>IN2.1</i>-PROMOTORAKTIVITÄT	109
4.6.1	SALIZYLSÄUREBIOSYNTHESE	110
4.6.2	INDUZIERBARKEIT DES <i>IN2.1</i> -PROMOTORS IN SA-BIOSYNTHESEMUTANTEN	112
4.7	EINFLUSS DER SAFENER AUF DEN INTERNEN SALIZYLSÄURE GEHALT	113
4.8	PR1-INDUKTION DURCH SAFENER	114
4.9	SAFENER INDUZIERBARE GENEXPRESSION IN ARABIDOPSIS	115
4.9.1	DIFFERENZIELLE GENREGULATION IN <i>COL0</i> UND <i>NAHG</i>	116
4.9.2	INDUKTION VON GENEN DES DETOXIFIZIERUNGSSYSTEMS	117
4.9.3	VERGLEICH DER SAFENER UND SALIZYLSÄURE INDUZIERTEN GENEXPRESSION	122
4.9.4	MODELL DES SAFENERSIGNALWEGES	126
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND ABSTRACT</u>	138
5.1	ZUSAMMENFASSUNG	138
5.2	ABSTRACT	141
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	144
7	<u>ANHANG</u>	176
7.1	PRIMERSEQUENZEN	176
7.2	VEKTORKARTEN	178
7.2.1	DER VEKTOR pBIN19	178
7.2.2	DER VEKTOR pBCVDEAC	178
7.2.3	DER VEKTOR pHOEDEAC	179
7.2.4	DER VEKTOR pB2ACK3	179
7.2.5	DER VEKTOR pBGW	180
7.2.6	DER VEKTOR pGREEN	180
7.3	PROMOTORSEQUENZEN	181
7.3.1	DER <i>IN2.1</i> -PROMOTOR	181

7.3.2 DER 2OCS- <i>IN2.1</i> -A9-PROMOTOR	182
7.4 ANLAGEN ZUM GENEXPRESSIONSEXPERIMENT	183
7.4.1 INDUZIERTER DETOXIFIZIERUNGS-GENE (GSTs, GTs, P450s)	183
7.4.2 INDUZIERTER WRKY-TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	188
7.4.3 GENE DIE ALS ANTWORT AUF EINEN SALIZYLSÄURE STIMULUS UND MEFENPYR/ISOXADIFEN REAGIEREN (GO ANNOTATION, FISHER ´S EXACT TEST)	189
7.4.4 FRÜH SA- UND SAFENERINDUZIERBARE GENE	190
7.4.5 SAFENERINDUKTION VON GENEN MIT <i>AS-1</i> -ELEMENT	191
7.4.6 SAFENERINDUKTION VON SCL14 ZIELGENEN	192
7.4.7 GENE DIE DURCH PPA1 UND SAFENER INDUZIERT WERDEN	193
7.4.8 GENE DIE DURCH PPA1 UND SAFENER REPRIMIERT WERDEN	195
7.4.9 GENE DIE DURCH 2,4-D UND SAFENER INDUZIERT WERDEN	196
7.4.10 GENE DIE DURCH 2,4-D UND SAFENER REPRIMIERT WERDEN	198
7.4.11 GENE DIE SAFENERINDUZIERT SIND UND MIT DEM JASMONSÄURESIGNALWEG ZU TUN HABEN	199
 DANKSAGUNG	 201
 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	 202
 LEBENS LAUF	 203

Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorphenoxy-carbonsäure
4-MUG	4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid
<i>as-1</i>	<i>activating sequence 1</i>
AS	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
bp	Basenpaare
BF	Blindformulierung
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BTB/POZ zinc	broad complex, tramtrack, bric-a-brac/poxyvirus finger
BTH	Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-thiocarbonsäure S- methylester
bZIP	Protein emit basischer DNA-Bindedomäne und Interaktionsdomäne (leucin zipper)
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus (Blumenkohlmosaikvirus)
ChIP	Chromatin Immunopräzipitation
cDNA	coding DNA (kodierende DNA)
CDNB	1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen
DCS	Dichlorsalizylsäure
Deac	Deacetylase
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

DHAR	Dehydroaskorbat Reduktase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Emulsionskonzentrat
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat-Dinatriumsalz
EMS	Ethylmethanosulfonsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GEP	Genexpressionsexperiment
GO	gene ontology
GS-	Thiolatanion des Glutathions
GST	Glutathion-S-Transferase
GT	Glucosyl-Transferase
GSH	Glutathion (γ -glutamylcysteinyl glycine)
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunden
HR	hypersensitive response (Hypersensitive Antwort)
ICS	Isochorismatsynthase
IEGT	immediate early glucosyl transferase
INA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
IP	Immunopräzipitation
Isoxa	Isoxadifen
ISR	induzierte systemische Resistenz
k	Kilo-
km	Kanamycin
L	Liter
LAR	local acquired resistance (lokal erworbene Resistenz)

LB	left border (Linke Grenze)
m	Milli- (10^{-3})
m	Meter
min	Minuten
M	Molar
Mef	Mefenpyr
MEN	MOPS-EDTA-NaOAc-Puffer
MES	2(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
Mops	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MS	Murashige Skoog
<i>MtN19-like</i>	<i>MAC9.6, Medicago truncatula N19-like</i>
n	nano- (10^{-9})
N-Ac-BASTA	N-Acetyl-BASTA
nos	Nopalinsynthase
NPR1	non expressor of PR-1
npt	Neomycin-Phosphotransferase
OD	Optische Dichte
OBF	<i>ocs</i> -Element Bindungsfaktor
ocs	Octopinsynthase
P450s	Cytochrom P450 abhängige Monooxygenasen
PAT	Phosphinothricin-Acetyl-Transferase
PCA	Prinzipielle Komponenten Analyse
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PPA ₁	A ₁ -Typ Phytoprostan
PR	pathogenesis related
RB	right border (Rechte Grenze)

rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RNA	Ribonukleinsäure
Rubisco	Ribulose-bisphosphat-carboxylase
SA	Salizylsäure
sai	salicylic acid insensitive
SAR	systemic acquired resistance (systemisch erworbene Resistenz)
SDS	sodium dodecylsulfat (Natriumlaurylsulfat)
sec	Sekunden
sid	salicylic acid induction deficient
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Amminomethan
ub	unbehandelt
UV	Ultraviolett
ü.N.	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
x-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galactopyranosid
x-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylglucuronid
Ω	Ohm
μ	Mikro- (10^{-6})
\emptyset	Durchmesser

1 Einleitung

Pflanzen, die sich selbst an unerwünschten Stellen ansiedeln, werden allgemein als „Unkräuter“ bezeichnet. Wenn sie in der Landwirtschaft zwischen Kulturpflanzen wachsen und gedeihen führt dies zu erheblichen Problemen, da sie mit diesen in Konkurrenz um Nährstoffe, Wasser und Licht stehen. Zusätzlich können Unkräuter Schäden verursachen, indem sie als Nahrungsgrundlage für Ungeziefer und Krankheiten dienen, den Erntevorgang erschweren und die Kosten für Reinigung und Trocknung des Ernteguts in die Höhe treiben. Aus diesen Gründen ist eine gut abgestimmte Unkrautkontrolle für eine effiziente und rentable Landwirtschaft unerlässlich. Durch die Einführung der chemischen Unkrautbekämpfung durch Herbizide, konnte die mit erheblichem Zeit- und Arbeitsaufwand verbundene manuelle und mechanische Unkrautbeseitigung, ersetzt werden.

Für die chemische Unkrautbekämpfung gibt es die so genannten Totalherbizide, die sowohl gegen Kulturpflanzen als auch gegen Unkräuter wirken, sofern sie über grüne Pflanzenteile aufgenommen werden (Peterson *et al.* 2001, Seitz *et al.* 2003). Diese lassen sich in Kontakt- und systemische Herbizide einteilen. Erstgenannte wirken auf dem besprühten Bereich und sind normalerweise schnell wirksam und regenfest. Systemische Herbizide wandern in der Pflanze vom Ort der Aufnahme in Richtung der Vegetationspunkte, die dann zerstört werden. Daneben gibt es die so genannten selektiven Herbizide, welche direkt auf bestimmte Kulturpflanzen aufgebracht werden können, ohne diese zu schädigen, gleichzeitig aber eine wirksame Unkrautkontrolle bieten. Totalherbizide sind nur begrenzt einsetzbar. Um dies zu umgehen, kann man herbizidtolerante Kultursorten auf konventionellem Wege oder auch mit Mitteln der Gentechnik züchten. Ein Beispiel für einen traditionellen Züchtungsansatz ist das Clearfield® Produktionssystem (BASF). Ind Clearfield® Kulturpflanzen wurde, durch induzierte Mutagenese, Resistenz gegenüber Herbiziden auf der Basis von Imidazolinonen erzeugt. Das Target dieser Herbizide ist die Acetohydroxysäure-Synthase (AHAS). Die Clearfield® Kulturpflanzen tragen eine Punktmutation im entsprechenden *A/s*-Gen. Dies führt zu einer Aminosäure Substitution im exprimierten AHAS Enzym. Die Veränderung dieser einzelnen Aminosäure verändert die Bindungsstelle der AHAS für die Imidazolinone, hat jedoch keinen Effekt auf die normale Funktion des Enzyms. Da der Herbizidwirkstoff nicht mehr an die AHAS binden kann, werden die Clearfield Pflanzen durch das Herbizid nicht geschädigt. Verfügbar sind Clearfield-Saatgutlinien für Weizen, Reis, Sonnenblumen und Raps. Daneben wird auch die Gentechnik eingesetzt, um Gene, welche die Herbizidtoleranz vermitteln, künstlich in die Kulturpflanzen übertragen. Die so veränderte Kulturpflanze

wird zusammen mit dem passenden Herbizid vermarktet. Prominente Beispiele sind LibertyLink® von Bayer CropScience und Roundup Ready® von Monsanto. Der Wirkstoff von Roundup, Glyphosat, hemmt ein pflanzliches Stoffwechsellenzym, die EPSP-Synthase. Dieses Enzym ist für die Herstellung lebenswichtiger aromatischer Aminosäuren der Pflanze unentbehrlich. Mit Hilfe der Gentechnologie wurde Mais-, Soja- und Baumwollsaatgut erzeugt, welches gegen Roundup resistent ist (Roundup Ready® - Saatgut). Diese Pflanzen enthalten ein zusätzliches EPSPS-Enzym, aus dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens*, welches durch Glyphosat nicht gehemmt wird. Im Falle des LibertyLink® Systems, exprimieren die Kulturpflanzen eine Phosphinothricin-Acetyl-Ttransferase (PAT) aus *Streptomyces viridochromogenes*. Dieses Enzym kann Glufosinat, den Wirkstoff des Herbizides Liberty, acetylieren und damit unwirksam machen. Ein Beispiel hierfür ist InVigor/LibertyLink® (Raps). Die klassische Züchtung herbizidresistenter Kulturpflanzen ist extrem zeitaufwändig und die Akzeptanz gegenüber gentechnisch veränderten Kulturpflanzen ist gering.

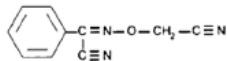
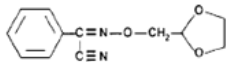
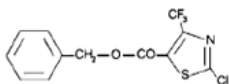
Neben Totalherbiziden gibt es selektive Herbizide, die zur Unkrautkontrolle eingesetzt werden können, ohne dass sie die Kulturpflanze schädigen. Beispiele hierfür sind die Herbizide s-Triazine (z.B. Atrazin) und 2,4-D. Triazine werden in verschiedenen Kulturen, hauptsächlich in Mais, zur Kontrolle breitblättriger Unkräuter eingesetzt. In Deutschland besteht seit 1992 jedoch ein vollständiges Anwendungsverbot von Atrazin. Als selektives Herbizid wirkt 2,4-D gegenüber den Dikotyledonen und wird beispielsweise im Mais- und Reisanbau, im Weinbau als auch in Zuckerrohrplantagen eingesetzt. Die Kulturpflanze besitzt hierbei eine natürliche Resistenz gegenüber dem Herbizid. Eine Möglichkeit für diese Resistenz ist, dass der Angriffsort des Herbizides nur in den Unkräutern vorhanden ist. Ein zweiter Resistenzmechanismus beruht auf einer veränderten Absorption/Translokation oder einer schnelleren Metabolisierung des Herbizids in der Kulturpflanze, verglichen mit dem Unkraut. Die Entwicklung selektiver Herbizide ist schwierig und mit einem hohen Kostenaufwand verbunden.

Eine weitere Möglichkeit, Selektivität in Kulturpflanzen zu erzeugen, bietet die Safener-Technologie. Safener sind chemische Substanzen, die bereits bekannten nicht selektiven Herbiziden, beigemischt werden. Safener induzieren eine Toleranz in den Anbaupflanzen, ohne dabei die Wirksamkeit der Herbizide gegen die Zielunkräuter zu verringern. Kulturpflanzen und Unkräuter gehören teilweise zur gleichen botanischen Familie und haben ähnliche physiologische Eigenschaften. Safener führen jedoch nur in der Kulturpflanze zu einer veränderten Absorption/Translokation und Metabolisierung des Herbizids. Der Einsatz der Herbizid-Safener-Kombinationen ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Diese Kombinationen werden in vielen

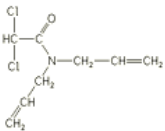

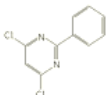
Kulturen, die normalerweise nicht ausreichend tolerant gegenüber den angewendeten Pestiziden sind, eingesetzt. Von besonderem Interesse ist dabei die Verwendung in monokotylen Kulturen wie Getreide (Weizen, Gerste, Roggen, Triticale, Sorghum), Mais und Reis. Safener für dikotyle Pflanzen konnten bislang nicht gefunden werden. Jedes Jahr werden tausende Verbindungen in einem Hochdurchsatz-Screening auf eine mögliche Anwendung als Zusatz in Herbiziden getestet.

1.1 Herbizid Safener

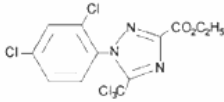
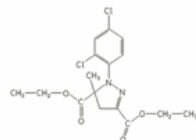
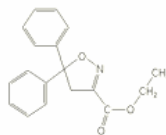
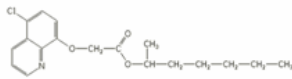
Safener sind synthetische Verbindungen die die Herbizidtoleranz in einigen monokotylen Kulturpflanzen erhöhen ohne die Empfindlichkeit der Zielunkräuter zu beeinflussen (Davies *et al.* 1999). Safener führen zu Selektivität eines Herbizides bzw. können die Selektivität erhöhen. Das Phänomen des „Safening“ wurde 1947 von Otto Hoffman entdeckt. Durch ein Versehen wurden zuvor mit dem Herbizid 2,4,5-T (2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure) behandelte Pflanzen zusätzlich Dämpfen des Herbizides 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) ausgesetzt. Diese Pflanzen zeigten jedoch keine Herbizidsymptome (Hoffman 1953). Nach der Entdeckung von Hoffman wurden durch Screeningprogramme andere Verbindungen mit Safening-Effekt gefunden. Dies führte schließlich zur Einführung von Naphtalinsäure-Anhydrid (1,8-Naphthalindicarbonsäureanhydrid) als dem ersten kommerziellen Safener 1971. Dieser wurde zusammen mit Thiocarbamatherbiziden in Getreidepflanzen (Mais, *Zea mays* L.) eingesetzt (Hoffman 1969, Hoffman 1978). Seit 2000 ist Husar® das erste Herbizid mit Safenertechnologie in Deutschland. Hierbei kommt eine Kombination des Herbizids Iodosulfuron-methyl-natrium mit dem Safener Mefenpyr-diethyl zum Einsatz. Der Safener Fenclorim wurde gegen das Herbizid Petilachlor in Reis (*Oryza sativa* L.) eingeführt (Hatzios, 1993). Benoxacor schützt Mais vor Chloroacetanilid Herbiziden (wie Metolachlor und Alachlor). Safener haben jedoch keinen schützenden Effekt auf dikotyle Unkräuter (Irzyk *et al.* 1993). Kommerziell erhältliche Safener, ihre Applikationsmethode, die entsprechenden Herbizide und der Einsatz in den verschiedenen Kulturen sind im Folgenden dargestellt.

a) Saatgut-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Cyometrinil 	Hirse	Thiocarbamate, Chloracetamide
Oxabetrinil 	Hirse	Thiocarbamate, Chloracetamide
Flurazol 	Hirse	Chloracetamide

Saatgut-Safener: Beizung des Saatguts und separate Behandlung mit dem Herbizid

b) Boden-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Dichlormid 	Mais	Thiocarbamate, Chloracetamide
Benoxacor 	Mais	Thiocarbamate, Chloracetamide
Fenclorim 	Reis	Pretilachlor

Boden-Safener: Einsatz im Voraufbau zusammen mit dem Herbizid

c) Blatt-Safener	Kulturpflanze	Herbizid
Fenclorazol-ethyl 	Getreide	Fenoxaprop-ethyl
Mefenpyr-diethyl 	Getreide	ACCCase und Sulfonylharnstoffe
Isoxadifen-ethyl 	Mais, Reis	ACCCase und Sulfonylharnstoffe
Cloquintocet-mexyl 	Weizen	Clodinafop- propagyl

Blatt-Safener: Einsatz im Nachaufbau zusammen mit dem Herbizid

Beispiele für Thiocarbamatherbizide sind EPTC und Butylat. Zu den Chloracetamidherbiziden gehören beispielsweise Metolachlor und Alachlor. Fenoxaprop-P-Ethyl ist ein ACCase-hemmendes Herbizid. Zu den Sulfonylharnstoffherbiziden werden Iodosulfuron-methyl-natrium und Mesosulfuron-methyl gezählt.

Herbizidklassen, welche in Kombination mit Safenern verwendet werden können, sind Aryloxyphenoxypropionate, Sulphonylharnstoffe, Imidazolinone, Isoxazolinone und Cyclohexadione (Davies 2001). Ein einziger Safener kann in Kombination mit Herbiziden unterschiedlicher chemischer Struktur und Wirkmechanismen verwendet werden. Zum Beispiel schützen Dichloracetamidsafener Mais gegen Chloroacetanilid- und Thiocarbamat Herbizide (Scott-Craig *et al.* 1998). Obwohl Safener in dikotylen Spezies ähnliche Effekte haben wie in Monokotylen (s. 1.1.1), wurden bisher keine kommerziell erhältlichen Safener für dikotyle Nutzpflanzen gefunden. Die Selektivität der Safener für monokotyle Pflanzen wurde mit einem noch uncharakterisierten agronomisch verwendbarem Merkmal in Verbindung gebracht, welches durch Züchtung selektiert wurde (Edwards *et al.* 2005c).

1.1.1 Der Safener Wirkmechanismus

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze zu der Wirkungsweise von Safenern. Es wäre möglich, dass Safener zu einer veränderten Herbizidaufnahmerate in Kulturpflanzen führen, und somit die Pflanzen vor einer zu hohen und schädigenden Herbiziddosis schützen. Es gibt verschiedene Studien die sich mit dieser Theorie beschäftigt haben, jedoch wurden unterschiedliche Ergebnisse für verschiedene Safener bzw. Herbizide erhalten (Ekler *et al.* 1993, Ezra *et al.* 1982). Dies spricht dafür, dass eine Variation der Aufnahmerate nicht der einzige Effekt, bzw. nicht der allgemeine Effekt von Safenern sein kann. Ein kompetitiver Antagonismus, zwischen Herbizid und den strukturell oft herbizidähnlichen Safenern, wäre ein weiterer denkbarer Wirkmechanismus (Bordás *et al.* 2002, Scott-Craig *et al.* 1998, Walton and Casida 1995). Es war möglich bekannte Herbizid-Rezeptoren zu isolieren und auf einen kompetitiven Antagonismus zwischen Safener und Herbizid zu untersuchen. In manchen Fällen wurde durch Safener die Herbizid-Rezeptor-Interaktion nicht beeinflusst (Polge *et al.* 1987, Köcher *et al.* 1989, Hatzios 1991). Walton und Casida (1995) konnten jedoch die Bindung eines Dichloracetamid-Safeners an das SafBP Mais-Protein nachweisen. Dies führte zu einer kompetitiven Hemmung der Bindung des SafBP-Proteins durch Metolachlor und EPTC. Auch eine antagonistische Wirkungsweise scheint somit nicht immer für die

Safenerwirkung ausschlaggebend zu sein. Eine weitere Möglichkeit besteht in einer durch Safener induzierten Translokation der Herbizide in Zellkompartimente, in denen sie keine schädliche Wirkung mehr entfalten können (Ezra *et al.* 1982, Ketchersid *et al.* 1982, Fuerst 1987, Varvina 1987, Fuerst *et al.* 1991). Der jedoch am häufigsten untersuchte, und weitestgehend akzeptierte Mechanismus der Safenerwirkung, beruht auf einem durch die Safener veränderten Herbizidmetabolismus (Fürst *et al.* 1991, Sagral 1978, Zama and Hatzios 1986, Gronwald 1989, Tal *et al.* 1993, Burton *et al.* 1994).

Die Detoxifizierung von Herbiziden und anderen Xenobiotika erfolgt in Pflanzen in vier Phasen (s. Abb. 1-1; Coleman *et al.* 1997, Kreuz *et al.* 1996, Davies and Caseley 1999).

Phase I

In der ersten Phase wird das Herbizid durch die Einführung oder Abspaltung von funktionellen Gruppen (meist durch Oxidation oder Hydrolyse) aktiviert. Diese Reaktionen werden von Enzymen wie Esterasen, Amidasen und häufig Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen katalysiert. Einige Herbizide können Phase I jedoch überspringen, da sie schon an sich reaktiv sind (Coleman *et al.* 1997).

Phase II

Diese reaktiven Gruppen ermöglichen die Konjugation in Phase II mit endogenen Verbindungen wie Glutathion (GSH), Glucose oder Malonat. Diese Konjugation führt zur Bildung eines wasserlöslichen Produkts, welches normalerweise weniger toxisch und mobil ist als das ursprüngliche Herbizid. Die Konjugationen werden von den entsprechenden Glutathion-, Glucosyl- oder Malonyl-transferasen katalysiert.

Phase III

Mit Hilfe von ATP-abhängigen Transportern erfolgt in Phase III die Translokation der Konjugate aus dem Zytosol in die Vakuole oder den Apoplast, was eine mögliche Feedback-Hemmung der Transferasen vermeidet. Zu den Transportern, welche die Translokation von Glutathionkonjugaten katalysieren, zählen „multidrug resistance-associated“ Proteine (MRP), die zur ABC Superfamilie der Transporter gehören. ABC Transporter sind jedoch nicht in jedem Fall beteiligt, es gibt auch Transporter die vom transmembranen H^+ Gradienten abhängig sind (Lamoureux and Rusness, 1981).

Phase IV

In der Vakuole werden die Konjugate durch verschiedene Peptidasen welche nacheinander die Aminosäure Glycin und Glutamat von dem Glutathionrest abspalten, abgebaut (Wolf *et al.* 1996, Cole & Edwards 2000, Beck *et al.* 2003).

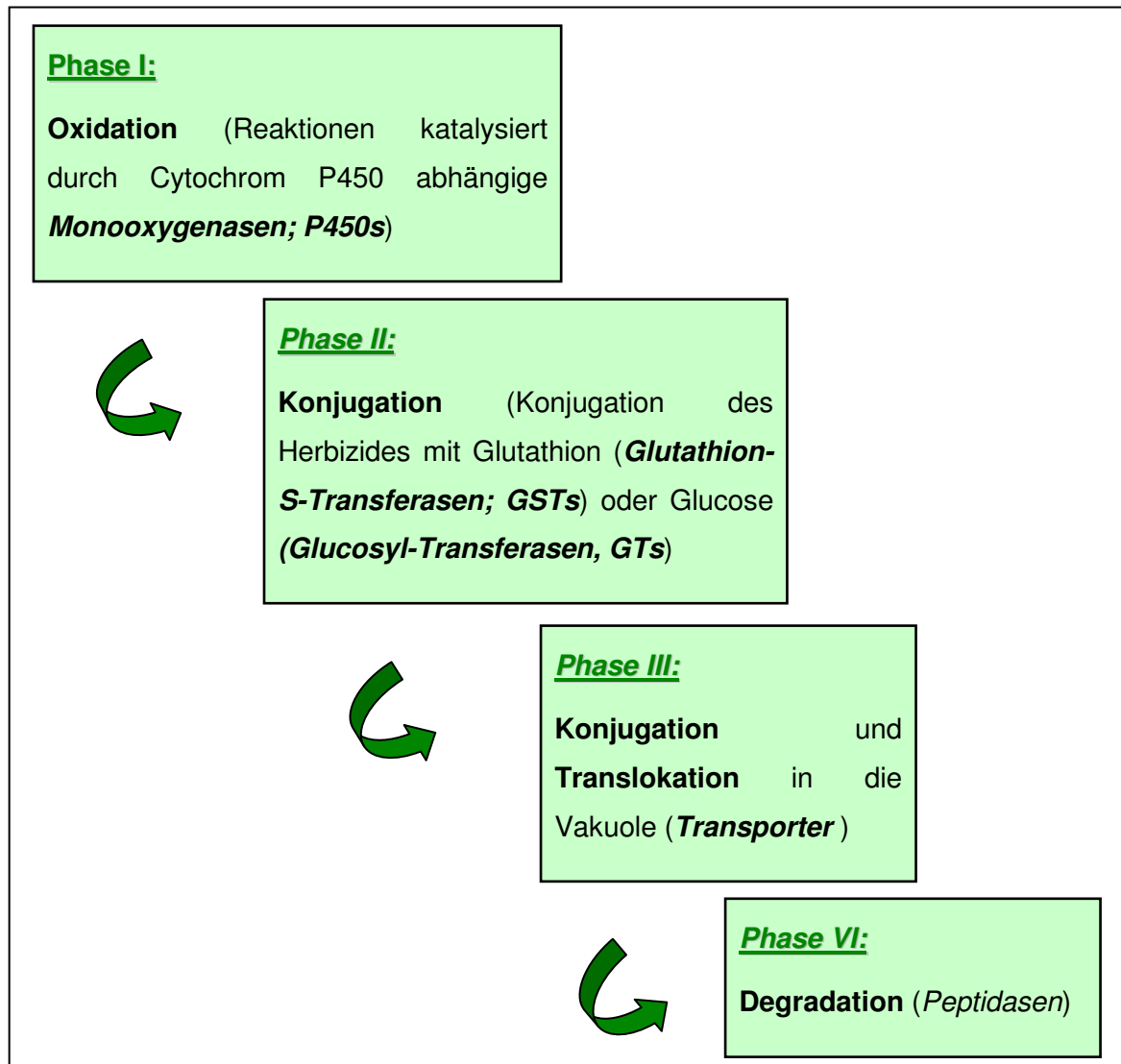


Abb. 1-1 Darstellung der Vier Phasen des Pflanzen-Detoxifizierungs-Systems

Phase I, Oxidation: Die meisten Reaktionen werden von P₄₅₀-abhängigen Monoxygenasen katalysiert. **Phase II, Konjugation:** Herbizide oder deren Metabolite aus Phase I werden entweder mit Glucose (Glucosyltransferasen) oder mit Glutathion (Glutathion-S-transferasen) konjugiert. **Phase III, weitere Konjugationen und Translokation:** Phase II-Metabolite können weiteren Konjugationen unterzogen werden um unlösliche Substanzen zu bilden, welche in die Vakuole transportiert oder an Lignin-Biopolymere gebunden werden. Phase II-Konjugate können auch direkt durch die Aktivität von glutathion- oder glucosidkonjugierten Pumpen der Vakuolen-Membran in die Vakuole transportiert werden. **Phase IV, Abbau der Glutathion-Konjugate:** In der Vakuole werden die Konjugate durch verschiedene Peptidasen welche nacheinander die Aminosäure Glycin und Glutamat von dem Glutathionrest abspalten, abgebaut

Es gibt somit mehrere Enzyme des Metabolisierungsweges, welche durch Safener aktiviert werden könnten. Im Gegensatz zu den unten diskutierten GSTs konnten nur wenige Cytochrom P450s mit einer Aktivität gegen Xenobiotika identifiziert werden (Smieszky *et al.* 1999, Robineau *et al.* 1998). Auch über die Rolle von

Glucosyltransferasen (GTs) während des Safener induzierten Herbizidmetabolismus gibt es nur wenige Untersuchungen (Edwards *et al.* 2005a).

Safener reduzieren die Giftigkeit von Herbiziden in Kulturpflanzen wahrscheinlich über die Induktion der Expression von GSTs, welche die Fähigkeit besitzen, das Herbizid mit dem Kosubstrat GSH zu konjugieren. Die Konjugation von Herbiziden mit GSH ist ein bekannter Metabolisierungsweg. Die Rate der Konjugation bestimmt die Toleranz der Pflanze gegenüber einem Herbizid (Tal *et al.* 1993, Jablonkai and Hatzios, 1994, Cummins *et al.* 1999). Vielfältige Studien haben gezeigt, dass Safener den GSH-Level (Fürst *et al.* 1991, Yenne and Hatzios 1990, Casida *et al.* 1975, Ekler *et al.* 1993, Farago *et al.* 1994) und/oder die Aktivität von Glutathion-S-Transferasen erhöhen (Hubbell and Casida 1977, Holt *et al.* 1985, Lay and Niland 1985, Komives and Dutka 1986, Fuerst *et al.* 1993, Jepson *et al.* 1994, Miller *et al.* 1994, Schroder *et al.* 1996, Richers *et al.* 1997). Die erhöhte Aktivität korrelierte sehr gut mit der Safenereffizienz (Davies and Caseley, 1999), während ein erhöhter GSH-Level allein dies nicht tat (Farago *et al.* 1994, Davies and Casely 1999, DeRidder *et al.* 2002). GST-vermittelter Herbizidmetabolismus konnte selektiv mit bestimmten Safenern in Mais (*Zea mays*; Dixon *et al.* 1997a, Dixon *et al.* 1997b), Hirse (*Sorghum bicolor*; Gronwald 1998), Weizen (*Triticum aestivum*; Cummins and Edwards, 1997, Pascal and Scalla 1999), Reis (*Oryza sativa*; Wu *et al.* 1999, Deng and Hatzios, 2002a, Deng and Hatzios, 2002b) und Gerste (*Hordeum vulgare*; Scalla and Roulet, 2002) erhöht werden. Es wird vermutet, dass Safener auf transkriptioneller Ebene wirken, indem sie die Genexpression regulieren. In Mais und Weizen führen Safener zu erhöhten Mengen an GST-mRNA (Jepson *et al.* 1994, Wiegand *et al.* 1986, Theodoulou *et al.* 2003). Eine Induktion von Phase III-Enzymen durch Safener konnte für Cloquintocet-Mexyl nachgewiesen werden. Die Behandlung mit dem Safener führte zu einer verdoppelten Aktivität von Vakuolen-Transportern, welche Glutathion- und Glucosidkonjugate transportieren (Gaillard *et al.* 1994). Auch in Weizen erhöht Cloquintocet-Mexyl den Transkriptspiegel von MRP1 (Theodoulou *et al.* 2003).

1.1.2 Die Safener Mefenpyr-diethyl und Isoxadifen-ethyl

Isoxadifen-ethyl

Der Safener Isoxadifen-ethyl (Abb. 1-2) ist ein Safener mit breitem Wirkspektrum und schützt verschiedene Pflanzenspezies gegen Herbizide verschiedener Klassen (z.B. Schützt er Mais vor Foramsulfuron (Koecher, 1999)). Isoxadifen-ethyl wird beispielsweise in Kombination mit Iodosulfuron-methyl-sodium und Foramsulfuron in

den BCS Produkten Equip® WG und MaisTer® verwendet. Auf Basis der Sulfonylharnstoff-Herbizide Foramsulfuron und Iodosulfuron-methyl-natrium wirkt es gegen die wichtigsten Schadgräser und eine Vielzahl von Unkräutern. Dieses breit gefächerte Aktivitätsspektrum spricht dafür, dass dieser Safener einen gemeinsamen Aspekt des Herbizid-Detoxifizierungsweges anspricht. Diese Eigenschaft, gemeinsam mit der nachgewiesenen starken Induzierbarkeit verschiedener Mais Detoxifizierungsgene (u.a. *In2.1*), macht diesen Safener für die vorliegende Untersuchung des Safenersignalweges so interessant. Isoxadifen wird als Ethylester appliziert, wird in der Pflanze aber sehr schnell hydrolysiert. Die freie Säure ist hoch mobil im Phloem und kann zu allen Teilen der Pflanze transportiert werden, was für die Effizienz des Safeners von Bedeutung ist. In Reis reduziert Isoxadifen-ethyl die Blattaufnahme von Fenoxaprop-ethyl, aber der Mechanismus dieses Effekts ist unbekannt und scheint auch nicht charakteristisch für diesen Safener zu sein. Eine ähnliche Aktivität konnte in Mais nicht nachgewiesen werden (Koecher 1999). Die Hydrolyse von Fenoxaprop-ethyl zur freien Säure wird durch den Safener nicht beeinflusst, aber der weitere Abbau von Fenoxaprop ist erhöht. Es wird vermutet dass Isoxadifen über die Induktion einer spezifischen GST (Koecher, 1999) wirkt. Metabolismusstudien haben gezeigt, dass Isoxadifen-ethyl in Mais über die Erhöhung des Foramsulfuron-Metabolismus wirkt, während diese Metabolisierung in den Zielunkräutern nicht verändert wird (Pallet *et al.* 2001, Hacker *et al.* 2002).

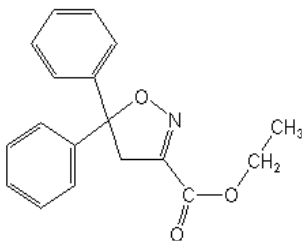


Abb. 1-2 Strukturformel Isoxadifen-ethyl

Mefenpyr-diethyl

Mefenpyr-diethyl (Abb. 1-3) wird, wie Isoxadifen-ethyl auch, als Nachauflauf Safener verwendet. Mefenpyr wird in Kombination mit einer Vielzahl von Aryloxyphenoxypropionaten und Sulfonylharnstoffherbiziden in Weizen, Roggen, Triticale und einigen Gerstesorten verwendet. Mefenpyr ist ein vielseitiger Safener, der in Kombination mit diversen einzelnen oder gemischten Herbiziden zum Einsatz kommt (Fenoxaprop-P-ethyl, z.B. Puma S®, Mesosulfuron-Methyl, z.B. Atlantis®). Produkte auf Basis von Fenoxaprop-P-ethyl sind in über 75 Ländern weltweit zugelassen. In der

Volksrepublik China ist Puma® zum Standard für die Ungras-Bekämpfung im Getreideanbau geworden. Mefenpyr-diethyl alleine hat selbst nach Applikation von hohen Dosen keine phytotoxischen Effekte. Der Safener wird schnell über die Blätter aufgenommen und wirkt systemisch. Fenoxaprop-P-ethyl alleine oder in Kombination mit Mefenpyr-diethyl wird nach Aufnahme in die Blätter von Weizen, Hartweizen oder Gerste in beiden Fällen schnell zu der freien Säure Fenoxaprop-P hydrolysiert. Die anschließende Konvertierung der herbizidwirksamen freien Säure in polare, nicht-phytotoxische Produkte, ist in Anwesenheit des Safeners deutlich schneller als ohne (Hacker *et al.* 2000). Der Schlüsselschritt der zur Detoxifizierung von Fenoxaprop-P führt, ist der GST-katalysierte Angriff von Glutathion an das Fenoxaprop-P Molekül, was zur Bildung von 4-Hydroxyphenoxypropansäure und einem Glutathion-Konjugat von 6-Chlorobenzoxazolon führt. Mit beiden Produkten erfolgen weitere Transformations Reaktionen. Der Safener Mefenpyr-diethyl führt hier ausschließlich zu einer erhöhten Metabolisierungsrate und nicht zu einem veränderten Detoxifizierungsweg in der Pflanze. Mefenpyr-diethyl erhöht die GST-Aktivität gegen das unspezifische Substrat CDNB (1-Chloro-2,4-Dinitrobenzen) etwa 2-fach während die Aktivität mit Fenoxaprop etwa 12-fach erhöht wurde (Scalla and Roulet 2002). Studien des Wirkmechanismus dieses Safeners in Weizen führten zu dem Ergebnis, dass die metabolische Abbaurate der in Kombination verwendbaren Sulfonylharnstoffherbizide Iodosulfuron-methyl-natrium und Mesosulfuron-methyl in Kulturpflanzen deutlich erhöht ist, während deren Abbaurate in den Zielunkräutern Wald-Trespe (*Bromus ramosus*) und Ackerfuchsschwanz (*Alopecurus myosuroides*) nicht beeinflusst wurde (Hacker *et al.* 1999, Hacker *et al.* 2000, Hacker *et al.* 2001). Ebenso wird durch den Safener Mefenpyr-diethyl in Weizen nur die Metabolisierungsrate von Fenoxaprop-P-ethyl, und nicht der Mechanismus der Sulfonylharnstoff-Herbizide beeinflusst. Es wurde keine Beteiligung von GSTs beim Abbau von Iodosulfuron-methyl-natrium und Mesosulfuron-methyl nachgewiesen. Metabolismus Studien zeigen eine Involvierung spezifischer Cytochrom P450 Monooxygenasen bei frühen Detoxifizierungsreaktionen. Die Bildung eines Mesosulfuron-Methyl Metaboliten, dessen Bildung durch Mefenpyr-diethyl stark induziert wird, wird wahrscheinlich durch eine P450 Monooxygenase katalysierte Reaktion gebildet (Köcher, H. 2005).

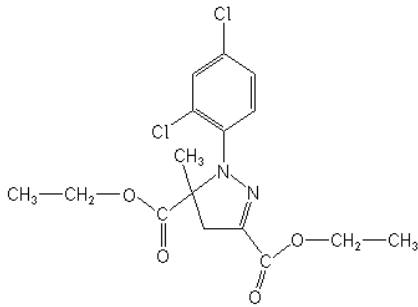


Abb. 1-3 Strukturformel Mefenpyr-diethyl

1.1.3 Glutathion-S-Transferasen

Glutathion-S-Transferasen kommen in Pflanzen, Tieren, Pilzen und einigen Bakterien vor. Die GST Genfamilie in *Arabidopsis* beinhaltet 55 Gene (Wagner *et al.* 2002). Eine Vielzahl von Faktoren induziert die RNA Expression dieser Gene: Herbizide, Schwermetalle, extreme Temperaturen, Phytohormone, Pathogenbefall etc. (Marrs, 1996, Sheehan *et al.* 2001).

Pflanzen GSTs wurden in 6 Klassen unterteilt: Phi (F), Tau (U), Theta (T), Zeta (Z), Lambda (L), und glutathionabhängige Dehydroaskorbat Reduktasen (DHARs; s. Tab. 1-1). GSTs liegen meist als Homo- oder Heterodimere vor, mit Ausnahme der DHARs und Lambda-GSTs, diese sind Monomere (Dixon *et al.* 2002a). Für diese beiden GSTs (DHARs und Lambda) konnte eine Thioltransferase Aktivität anstelle der typischen Glutathion Konjugation nachgewiesen werden (Dixon *et al.* 2002a). Die beiden größten Klassen, Phi und Tau, sind pflanzenspezifisch, während die Theta und Zeta Klassen auch in Säugern, Pilzen und Insekten vorkommen. Bis heute wurden Lambda und DHAR-Typ GSTs ebenfalls nur in Pflanzen identifiziert (Dixon *et al.* 2000)

Pflanzen GSTs können eine Vielzahl an Agrochemikalien detoxifizieren (Cole *et al.* 1997, Schröder, 1997, Cole and Edwards 2000). Die Konjugation von GSH mit elektrophilen Substraten, wie z.B Herbiziden, wird vor allem durch GSTs der Phi und Tau Klasse katalysiert (Frova 2003).

Wenn sie als Glutathion-Peroxidase agieren, können Pflanzen GSTs die Reduktion von Hydroperoxiden zu weniger schädlichen Alkoholen katalysieren (Roxas *et al.* 1997, Cummins *et al.* 1999). Die Expression einer Glutathionperoxidase in transgenem Tabak führt beispielsweise zum Schutz vor oxidativem Stress (Roxas *et al.* 2000).

Zusätzlich zu ihrer Rolle bei der Xenobiotika Entgiftung und der Toleranz gegenüber oxidativem Stress, können pflanzliche GSTs metabolische Isomerisierungs Reaktionen katalysieren. Zum Beispiel hat die AtGSTZ1 Anteil am Tyrosin Katabolismus in

Arabidopsis und katalysiert die cis-trans Konversion von Maleylacetoacetat zu Fumarylacetoacetat (Dixon *et al.* 2000). Einige pflanzliche GSTs fungieren als nichtenzymatische Bindeproteine von endogenen Substanzen wie Anthocyanen und Phytohormonen (Marrs 1996, Mueller *et al.* 2000, Gonneau *et al.* 1998).

GSTs dienen ebenfalls als Übertragungs-Protein für eine Zahl endogener Liganden (Marrs 1996, Dixon *et al.* 2000, Dixon *et al.* 2002).

Eine Zusammenstellung der charakteristischen Pflanzen – GSTs und ihrer Funktion ist in Tabelle 1-1 dargestellt (nach Edwards *et al.* 200, Dixon *et al.* 2002a).

Table 1-1 Verschiedene Subklassen der GST-Superfamilie und deren Funktion bzw. Aktivität

GST-Subklasse	Rest im Aktiven Zentrum	Funktion bzw. Aktivität
Phi (F)	S	Glutathionperoxidase Glutathion-S-Transferase; Detoxifizierung Ligandine (z.B. Auxine, Flavenoide) Isomerase
Tau (U)	S	Glutathionperoxidase Glutathion-S-Transferase; Detoxifizierung Ligandine (z.B. Auxine, Flavenoide) Hormon responsiv (z.B. Auxininduziert)
Zeta (Z)	S	Isomerase Maleylacetoacetat-Isomerase
Theta (T)	S	Glutathionperoxidase; Detoxifizierung
Lambda (L)	C	Thioltransferase Aktivität
DHARs	C	Dehydroascorbat-Reduktase Thioltransferase Aktivität

Die Glutathion-S-Transferase In2.1 aus Mais

Die Gene *In2.1* und *In2.2* werden in Mais durch substituierte Benzensulfonamid-Safener induziert (Hershey and Stoner 1991). Durch die Blattapplikation des Safeners kann in Blättern und Wurzeln eine starke und schnelle Induktion von *In2.1* nachgewiesen werden. Die Expression dieses Gens wird ebenfalls sehr stark durch die in dieser Arbeit verwendeten Safener Mefenpyr und Isoxadifen erhöht (unveröffentlichte. Ergebnisse, Dr. Klaus Bartsch). *In2.1* wird zur GST-Superfamilie gezählt, besitzt aber keine typische GST Aktivität (McGonigle *et al.* 2000).

In Weizen (*TaGSTL1*), *Arabidopsis* (*AtGSTL1* und *AtGSTL2*) und Soja (*GmIn2-1*) finden sich Enzyme mit einer hohen Sequenzähnlichkeit zu *In2.1*. *TaGSTL1* ist sehr stark safenerinduzierbar (durch Cloquintocet-mexyl und Fenchlorazol-ethyl; Theodoulou *et al.* 1999 und 2003). Über Sequenzvergleiche wurde *TaGSTL1* der Gruppe der Lambda GSTs zugeordnet. Diese Weizen-GST besitzt jedoch auch hohe Sequenzähnlichkeit zu Enzymen mit DHAR Aktivität (Theodoulou *et al.* 2003). Diese GST besitzt daher wahrscheinlich entweder DHAR- oder Thioltransferase-Aktivität. Für die beiden sequenzähnlichen *Arabidopsis* Enzyme wurde ebenfalls eine Thioltransferase-Aktivität nachgewiesen (Dixon *et al.* 2002a). Es ist daher anzunehmen, dass auch *In2.1* aus Mais eine Thioltransferase ist.

Da GSTs keine Herbizide detoxifizieren können, muss der schützende Effekt dieser GSTs über ihre Aktivität als Redoxproteine vermittelt werden. Es wird vermutet, dass diese Proteine aufgrund ihrer Thioltransferase Aktivität induziert werden, welche unter oxidierenden Bedingungen benötigt wird, um Proteinthiole in ihrer biologisch aktiven Form zu halten (Edwards *et al.* 2005c).

1.2 Zielsetzung der Arbeit

Der Signalweg, welcher zur safenerinduzierten Expression von herbiziddetoxifizierenden Genen führt, ist unbekannt. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von Elementen dieses Safenersignalweges.

Die safenerabhängige Regulation der Genexpression sollte am Beispiel des *In2.1*-Promotors aus Mais in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass dieser Promotor auch in *Arabidopsis* durch die Safener Mefenpyr und Isoxadifen induzierbar ist. Dies spricht dafür, dass der Safenersignalweg auch in dikotylen Pflanzen existiert. Dieser Ansatz verspricht daher Erkenntnisse über die Safenerwirkung und Signaltransduktion in Mono- und Dikotylen. Dies ist besonders

interessant, da bislang nur Safener für monokotyle Kulturpflanzen entwickelt worden sind.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die an der Genregulation beteiligten Transkriptionsfaktoren durch Chromatin-Immunopräzipitation, und *cis*-regulatorische Elemente durch eine Promotor-Deletionsanalyse identifiziert werden. Die an der safenerinduzierten Genexpression beteiligten Signalwege sollten in verschiedenen Arabidopsismutanten mit Hilfe des GUS-Reportergens unter der Kontrolle des *In2.1*-Promotors analysiert werden.

Weiterhin sollte ein geeignetes Reportersystem für eine spätere Selektion von Safenersignalweg-Mutanten entwickelt werden. Der Effekt der verwendeten Safener auf die Genexpression in dikotylen Pflanzen sollte durch eine Genexpressionsstudie von safenerbehandelten *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen und Signalwegmutanten untersucht werden. Die erzielten Ergebnisse sollten nach Möglichkeit in einem Modell des Safenersignalweges zusammengefasst werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte

Biorad Micropulser	Biorad; Hercules (USA)
Elektrophoresenetzgerät	Amersham Pharmacia Biotech;
„Electrophoresis power supply EPS 500/450“	Uppsala (Schweden)
Gelkammer für Agarosegele	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
„Horizon® 11 14“	
LightCycler® 480	Roche Diagnostics GmbH;
	Mannheim
PCR-Gerät (Master Cycler Gradient)	Eppendorf AG; Hamburg
Bio Photometer	"
Thermomixer compact	"
Tischzentrifuge 5415R	"
Zentrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH; Krefeld
pH-Meter	FisherScientific; Schwerte
Retsch MM 300	Retsch GmbH&Co.KG; Haan
Sonicator (Soniprep 150)	MSE (UK) Limited
	Loughboro, Leicestershire (UK)
Airbrush Pistole Grafo T1	Fisher Airbrush und
	Künstlerbedarf;Naumburg-Meyhen
Fluorometer (FLUOstar Galaxy)	BMG Labtechnologies, Offenburg
GeneChip® Fluidics Station 450/250	Affymetrix, Inc; Santa Clara (USA)
Affymetrix GeneChip® Scanner 3000	"
„Stella“, CCD Kamera	Raytest Isotopenmessgeräte
	GmbH; Straubenhardt

Verbrauchsmaterialien

GenePulser Küvetten, 0,1 cm	Biorad; Hercules (USA)
Mikrowell-Platten (24-well, steril)	Greiner bio-one GmbH;
	Frickenhausen

Lumitrac 200 96 well, weiß	“
LightCycler® 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Zellkulturschalen (Ø 140 mm, steril)	Nunc; Roskilde (Dänemark)
Zellkulturschalen (Ø 90 mm) mit Nocken	“
Glaskugeln (Ø 3 mm)	Roth; Karlsruhe
ATH1 Chips	Affymetrix, Inc; Santa Clara (USA)

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden alle von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), BD Bioscience (Heidelberg), Roth (Karlsruhe) und Difco (Detroit, USA) bezogen. Die verwendeten organischen Lösungsmittel besitzen den Reinheitsgrad p.a.; das Wasser wurde zuvor deionisiert.

Das Benetzungsmittel Silwet-L77 welches für die *Arabidopsis* Transformation (2.2.5) benötigt wird, wurde von Lehle Seeds (Round Rock, USA) und sämtliche Safener (Mefenpyr, Isoxadifen, Benoxacor) für die Promotor-Induktionsversuche (2.2.8) sowie das BASTA (200 g/L) zur Selektion transgener *A. thaliana* wurden von Bayer CropScience (Frankfurt) zur Verfügung gestellt. Die 3,5-Dichlorsalicylsäure wurde von Sigma-Aldrich bezogen. Das für die GUS-Färbung (2.2.9) verwendete x-Gluc wurde bei der Firma Carl Roth erworben.

Spezielle Chemikalien für die Microarray Genexpressionsanalyse (2.2.11)

Ultra Pure 20xSSPE	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SAPE (Streptavidin R-phycoerithrin conjugate)	MobiTec; Göttingen
Antistreptavidin biotinylated	Alexis; Lörrach
IgG from goat serum	Sigma ; München
Bovine serum Albumin	Invitrogen GmbH; Karlsruhe

2.1.3 Enzyme

Restriktionsendonukleasen

Alle Enzyme und zugehörigen Puffer wurden von der Firma New England BioLabs® Inc. (Frankfurt) bezogen, und nach Vorschrift des Herstellers eingesetzt.

Sonstige Enzyme

DNase I	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Shrimp-Alkaline-Phosphatase	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs; Ipswich (USA)
T7 RNA Polymerase	Stratagene; Waldbronn

2.1.4 Reaktions- und Aufreinigungssysteme

RNeasy Mini Kit	Qiagen; Hilden
RNeasy Midi Kit	“
Qiagen DNA Plant Kit	“
QIAPrep Spin Miniprep Kit	“
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	“
QIAfilter Cartridges	“
QIAShredder	“
QIAquick PCR Purification Kit	“
Qiagen MinElute Gel Extraction Kit	“
PWO Master Kit	Roche Diagnostics GmbH; Mannheim
Microarray cDNA Synthesis Kit	“
cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	“
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	“
Gateway® BP clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen GmbH; Karlsruhe
Gateway® LR clonase™ II Enzyme Mix	“
BioArray™ High Yield™ Transcript Labeling Kit (T7)	Enzo Life Science Inc.; Farmingdale, NY (USA)
GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents	Affymetrix Inc.; Santa Clara (USA)
Hybridisation Control Kit	
MarkerGene™ β-Glucuronidase (GUS)	Marker Gene Technologies Inc. Eugene, Oregon
Reporter Gene Activity Detection Kit	
Quick Start™ Bradford Protein Test	Biorad, Hercules (USA)

2.1.5 Pflanzenmaterial

Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*)

Wildtyp:

Col-0

Mutanten:

- *sai1-1*, salicylic acid-insensitive, Ökotyp: *Nossen*, *km^r* (NASC, the European *Arabidopsis* Stock Centre: Stock Nr. N3724;(Shah *et al.* 1997)

Alle folgenden Mutanten-Samen wurden von Frau Prof. Dr. C. Gatz zur Verfügung gestellt.

- *tga2tga3tga5tga6* (4tga) quadruple Mutante (*tga2,3,5,6* mutant; Kesarwani *et al.* 2007.) knock out der Transkriptionsfaktoren TGA2 TGA3 TGA5 und TGA6, *Col-0* (Xinnian Dong, Duke University of Durham, USA)
- *NahG* (Gaffney *et al.* 1993), trägt das *Pseudomonas putida NahG*-Gen, und exprimiert eine Salizylhydroxylase welche zur Umwandlung von Salizylsäure in Catechol führt, *Col-0*
- *Sid2-2* (*SA induction-deficient2*; Nawrath and Metraux, 1999), die Isochorismatsynthase (*sid2*), beteiligt an der Salizylsäure Biosynthese, ist mutiert, *Col-0* (Frederick M. Ausubel, Department of Genetics, Harvard Medical School, USA)

Transgene Pflanzen die im Rahmen dieser Arbeit generiert wurden

- $P_{In2.1}$:GUS, $P_{In2.1}$:DEAC, $P_{In2.1}$:PAT, $P_{In2.1}$:Luc in *Col-0*, *km^r*;
 $P_{In2.1}$:GUS in *sai1-1*; *tga2,3,5,6*; *NahG* und *sid2-2*, alle *pat^r*
- $P_{In2.1-A2}$:GUS, $P_{In2.1-A4}$:GUS, $P_{In2.1-A5}$:GUS, $P_{In2.1-A6}$:GUS:GUS, $P_{In2.1-A7}$:GUS:GUS, $P_{In2.1-A8}$:GUS, $P_{In2.1-A9}$:GUS:GUS, pBin19:GUS in *Col-0*, alle *km^r*
- $P_{In2.1\Delta ocs}$:GUS in *Col-0*, *km^r*
- $P_{2ocs-In2.1-A9}$:GUS in *Col-0*, *km^r*

2.1.6 Bakterienstämme

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana*:

Agrobacterium tumefaciens GV4000 (Bayer CropScience, Frankfurt) mit einer Rifampicin-Resistenz

Für die Vermehrung von Plasmiden:

E. coli One Shot[®] TOP10 kompetente Zellen (Invitrogen GmbH; Karlsruhe)
 F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)*7697 *galU galK rpsL* (Str^R) *endA1 nupG*

E. coli ElectroMAX[™] DH10B[™] Zellen (Invitrogen GmbH; Karlsruhe)
 F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)*7697 *galU galK λ rpsL nupG*

2.1.7 Vektoren

pBin19 (7.2.1)

Der Vektor pBin19 (Bevan *et al.* 1983) mit dem Replikationsursprung (*ori*) aus RK2 wurde für *E. coli* und *A. tumefaciens* und zur Transformation von Pflanzen eingesetzt. Der T-DNA Bereich wird von der linken und rechten Grenze (LB, RB) flankiert. Die T-Region enthält den *lac Z*-Bereich mit der Multiple Cloning Site aus M13mp19. Rekombinante *E. coli* Klone können durch Blau/Weiß-Selektion identifiziert werden. Zur Selektion transformierter Pflanzen mit Kanamycin enthält die T-Region ein dominant vererbbares Neomycin-Phosphotransferase Gen II (*npt II*). Die Expression des *npt II*-Gens wird durch den Promotor des Nopalin-Synthase Gens (*P nos*) gesteuert. Die Transkriptionstermination für das *npt II*-Gen stammt ebenfalls aus dem Nopalin-Synthase Gen (*nos A*). Außerhalb der T-Region enthält das Plasmid ein Kanamycinresistenz Gen (*npt III*) für die Selektion in Bakterien (*A. tumefaciens*, *E. coli*).

pB2ACK3-GUS (7.2.2)

Der Vektor pB2ACK3-GUS (Bayer CropScience; Frankfurt) enthält das GUS-Reporter-gen mit dem 35S-Terminator. Für die Selektion transgener Bakterien enthält er ein Ampicillin-, für die Selektion transgener Pflanzen ein *PAT*-(Phosphinotricin-Acetyltransferase)-Resistenzgen.

pBGW (7.2.5)

Der Vektor wurde von der Universität Gent, Department of Plant Systems Biology, bezogen (Karimi *et al.* 2002). Für die Selektion transgener Bakterien enthält er ein Spectinomycin-Resistenzgen und *ccdB*-Gen, für die Selektion transgener Pflanzen ein

PAT-Resistenzgen. Die gewünschten Insertionsprodukte können mit Hilfe der Gateway LR-Reaktion (2.2.7.5) über die attR1 und attR2 integriert werden.

pGreen (7.2.6)

Dieser Vektor wurde von der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt. (<http://www.pgreen.ac.uk/>). Er besitzt das Luciferase Reporter gen unter Kontrolle des 35S-CaMV Promotors und ein Ampicillin-Resistenzgen zur Selektion transgener Bakterien.

pCR2.1-Topo (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)

Dieser Vektor wurde zur Klonierung von PCR-Produkten verwendet.

2.2 Angewandte Methoden

2.2.1 Verwendete Software und Datenbanken

Datenbanken zur Sequenzbearbeitung:

NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource; <http://www.Arabidopsis.org>)

PLACE (A database of plant *cis*-acting regulatory DNA elements;
<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)

PlantCARE (A database of plant promoters and their *cis*-acting regulatory elements;
<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)

Software

Vector NTI Advance 10 (Invitrogen GmbH; Karlsruhe)

Aida Advanced Image Data analyzer (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH;
Straubenhardt)

LightCycler® 480 Software (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim)

2.2.2 Sterilisation

Medien und Geräte

Die verwendeten Medien wurden für 20 min bei 120°C (LB-Medium) bzw. 115°C (YEB-Medium, 0,5 MS-Medium) und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert. Um Salzausfällung zu verhindern, wurden temperaturempfindliche Substanzen und Salze getrennt gelöst und autoklaviert, bzw. sterilfiltriert (0,2 µm Porendurchmesser).

Oberflächensterilisation von *A.thaliana* Samen

a) Die Samen wurden flach in Glaspetrischalen ausgelegt und die offenen Petrischalen in einen Exsikkator mit 30 mL Becherglas gestellt. Hierin wurden 7 mL Natriumhypochlorid (NaOCl) und 7 mL Salzsäure (37%, rauchend) gemischt und der Exsikkatordeckel sofort geschlossen. Durch die chemische Reaktion entstand das für die Sterilisation benötigte Chlorgas. Die Samen wurden für 3 h in der Chloratmosphäre sterilisiert und anschließend noch für 1 h in der geöffneten Petrischale unter einer sterilen Werkbank belassen.

b) 20 mg Samen wurden in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß eingewogen und mit 500 µL 70 % EtOH vermischt. Nach 5 min Inkubation bei RT (mehrmals mischen) wurden die Samen durch eine 5 sec Zentrifugation bei 13 000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Samen wurden mit 500 µL einer 1:1 verdünnten Natriumhypochlorit-Lösung (12 % Chlor) inkl. 1 Tropfen Tween20 gemischt. Die Samen wurden nach 15 min bei RT (mehrmals mischen) wie oben beschrieben sedimentiert und 5-mal mit 1 mL H₂O (steril) gewaschen. Anschließend wurden die Samen in 1 mL Wasser resuspendiert und auf 0,5 MS Agarplatten verteilt.

2.2.3 Kultivierung und Transformation von *E.coli*

E.coli Bakterienstämme wurden in LB-Flüssig-Medium bzw. auf LB-Agar-Platten kultiviert (Sambrook *et al.* 1989).

LB-Medium (für *E.coli*)

10 g/L NaCl
10 g/L Tryptone
5,0 g/L Yeast-Extract
pH 7,0

Für die Herstellung von Festmedien wurden 15 g/L Bacto-Agar zugegeben.

Medienzusatz zur Selektion transformierter Bakterien:

Vektor pBin19: 50,0 µg/mL Kanamycin

Vektor pBGW: 50,0 µg/mL Spectinomycin

Transformation elektrokompentener *E.coli*

Für die Elektroporation wurden der BioRad Micropulser und BioRad Gene Pulser Küvetten (0,1 cm) verwendet. Elektroporationskonditionen: 2,0 kV, 200 Ω, 25 µF, 4-5

msec. Für die Transformation der Ligationsreaktionen (2.2.7.1) wurden One Shot® TOP10-Zellen (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) bzw. ElectroMAX™ DH10B™ –Zellen (Invitrogen GmbH; Karlsruhe, 2.1.6) nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Transformationsansätze wurden auf selektivem LB-Agar über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.4 Kultivierung und Transformation von *A.tumefaciens*

Die Bakterien (2.1.6) wurden in YEB-Medium (100 µg/mL Rifampicin) aerob bei 28°C und 100-150 rpm kultiviert. Zur Selektion transgener Stämme enthielt das Medium 50 µg/mL Kanamycin für die Selektion auf den Vektor pBin19 bzw. 50 µg/mL Spectinomycin zur Selektion von pBGW.

YEB-Medium (für *A. tumefaciens*)

5 g/L Beef-Extract
1 g/L Yeast-Extract
5 g/L Bacto-Peptide
5 g/L Saccharose
pH 7,4

Für die Herstellung von Festmedien wurden 15 g/L Bacto-Agar eingewogen. Nach dem Autoklavieren wurden 2 mL/L 1M MgSO₄ zugefügt.

Herstellung kompetenter *Agrobacterien*

Mit 10 µL einer *A. tumefaciens*-Glycerinkultur (GV4000) wurden 2 mL YEB-Medium angeimpft und über Nacht unter oben genannten Bedingungen kultiviert. 5 µL dieser Vorkultur wurden in 2 mL YEB-Medium gegeben und über Nacht inkubiert. Diese Kultur wurde mit 200 mL YEB-Medium gemischt und bis zu einer OD von 0,3 weiter kultiviert. Die Zellen wurden bei 4°C und 5000 rpm 10 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL eiskaltem TE-Puffer (3.11.4) resuspendiert und anschließend 10 min bei 3000 rpm pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 10 mL YEB-Medium aufgenommen und in 50 µL Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformation kompetenter *A.tumefaciens*

1 µg Plasmid-DNA (2.2.6.1) wurde zu einem auf Eis aufgetauten 50 µL-Aliquot kompetenter Zellen zugeben. Der Transformationsansatz wurde anschließend je 5 min auf Eis, in flüssigem Stickstoff und bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend

wurde 1 mL YEB-Medium zugeben und 2-4 h bei 28 °C und 300 rpm im Thermomixer kultiviert.

Für jede Transformation wurden zweimal 250 µL auf festem YEB ausplattiert.

2.2.5 Kultivierung und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die Pflanzen wuchsen unter Langtagbedingungen in einer Klimakammer mit folgenden Parametern:

16 h Tag 23 °C, 40 % Luftfeuchte

8 h Nacht 17 °C, 50 % Luftfeuchte

Für die sterile Anzucht wurden zuvor oberflächensterilisierte *Arabidopsis* Samen (2.2.2) auf 0,5 MS Medium ausgelegt.

0,5 MS-Medium

2,20 g/L Murashige und Skoog Basal Medium (MS)

1,95 g/L MES

pH 5,8

8,00 g/L Difco-Agar

Zur Selektion auf den Vektor pBin19 wurde dem Medium 25 µg/mL Kanamycin zugesetzt.

Transformation von *A. thaliana*

Die Transformation erfolgte nach der Floral-Dip Methode (Clough and Bent 1998): Sobald die Pflanzen die Primärfloreszenzen (nach ca. 4 Wochen) gebildet hatten wurden diese coupiert, um das Wachstum von möglichst vielen sekundären Blütentrieben zu induzieren. 3 Tage nach dem Abschneiden der Blütenstängel wurde eine 2 mL-Kultur mit dem gewünschten transgenen *A. tumefaciens* Stamm angeimpft. Mit 15 µL dieser Vorkultur wurde nach 2 Tagen eine frische 2 mL Kultur inokuliert. Nach 3 Tagen Inkubation wurde mit 0,5 mL dieser Kultur eine 50 mL Kultur angeimpft. Am 9. Tag nach dem coupieren der Pflanzen wurden 5 mL der 50 mL-Vorkultur zu 500 mL YEB-Medium gegeben und ü. N. kultiviert. Die Kulturen wuchsen bis zu einer OD₆₀₀ von 2-3 und wurden im Folgenden für das „Dippen“ der *A. thaliana* Pflanzen verwendet. Die Pflanzen wurden am Abend vor dem „Dippen“ kräftig gegossen, damit sich die Stomata öffnen und die Agrobakterien besser in das Blatt eindringen können.

Das Infiltrationsmedium beinhaltet 0,5 % Saccharose und 0,05% des Benetzungsmittel Silwet L-77. Silwet L-77 besitzt eine geringe Phytotoxizität und erleichtert das Eindringen der *Agrobakterien* in schwer zugängliche Pflanzengewebe. Die Blüten der *Arabidopsis*-Pflanzen wurden für ca. 10 sec in das Infiltrationsmedium getaucht und dabei leicht bewegt. Anschließend wurde ein Autoklavierbeutel über die Pflanzen gezogen und sie wurden zurück in die Klimakammer gestellt. Einen Tag später wurde die Haube entfernt. Nach einer Woche wurde die Infiltration wiederholt und die Pflanzen anschließend bis zur Samenreife unter Langtagbedingungen weiter kultiviert: Die Pflanzen wurden bis zum Abreifen der ersten Samen gegossen, anschließend wurde das Gießen reduziert und schließlich ganz eingestellt. Zum Trocknen wurden die Pflanzen in Papiertüten gelegt.

Infiltrationsmedium für *A. thaliana*

500 mL	einer ü.N. <i>A. tumefaciens</i> -Kultur in selektivem YEB-Medium OD ₆₀₀ 2-3)
0,5 mL	Silwet L-77
50 g	Saccharose
500 mL	H ₂ O

Die Selektion transgener Pflanzen mit Kanamycin-Resistenz (Transformiert mit pBin19) erfolgte durch sterile Anzucht auf 0,5 MS-Medium mit 25 µg/mL Kanamycin. Für die Selektion auf BASTA-Resistenz (Transformation mit dem Vektor pBGW) wurden Samen auf mit BASTA getränkter Erde ausgelegt. Hierfür wurde eine 200 g/L Glufosinate ammonium (BASTA)-Lösung (BCS GmbH; ED-Herbizide, Frankfurt) auf 35 mg/mL verdünnt. Die Erde wurde mit der verdünnten Lösung getränkt. Eine Woche später wurde erneut mit 35 mg/mL Basta-Lösung gegossen, anschließend erfolgte die Bewässerung mit Wasser.

2.2.6 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

2.2.6.1 Präparation von Pflanzen DNA

Verwendet wurden hierfür das DNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden).

Zunächst wurde das Pflanzenmaterial mechanisch zerkleinert und anschließend folgte die Lyse durch Zugabe eines Lysisbuffer (enthält eine RNase zum Abbau der RNA) bei

65 °C. Daraufhin wurden Salze, Proteine und Polysaccharide präzipitiert. Eine Filtration durch den QIAshredder™ führt zur gleichzeitigen Homogenisierung der Probe und Abtrennung des Zelldebris und des Präzipitats. Um das Binden der DNA an die DNeasy Membran zu ermöglichen wird ein entsprechender Puffer und Ethanol zugesetzt. Durch zwei Waschschriffe werden Proteine und Polysaccharide von der Membran der DNeasy Spin Column entfernt. Die Elution der DNA erfolgt mit einem Puffer niedrigen Salzgehaltes oder durch Wasser.

100 mg gemörsertes Pflanzenmaterial wurde in ein mit 8-10 Glaskügelchen (Ø 0,3 mm) befülltes 1,5 mL Eppendorf Gefäß gegeben und in fl. Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde mit Hilfe einer Retsch Mühle für 1 min bei 30 Hz gemörsert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll

2.2.6.2 Plasmid Isolation

E.coli

Zur analytischen Präparation von Plasmid-DNA wurde das QIAPrep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Verfahren basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen (Birnboim and Doly 1979) gefolgt von der Bindung der DNA an eine Silika-Membran bei hohem Salzgehalt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Hersteller Protokoll mit einer 2 mL Übernachtkultur.

Für die präparative Plasmid-DNA Isolation wurde das QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) in Verbindung mit QIAfilter Cartridges (Qiagen, Hilden) verwendet. Das Verfahren beruht ebenfalls auf einer modifizierten alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979), gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an das QIAGEN Anionen-Austauscher-Harz unter geeigneten pH-Werten und Salzkonzentrationen. Die Plasmid DNA wurde mit einem salzhaltigen Puffer eluiert und dann durch Isopropanolfällung entsalzt und konzentriert. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Hersteller Protokoll. Mit dem Eluat wurde anschließend eine Natriumacetat-Fällung durchgeführt: Zu den 300 µL Eluat wurden 750 µL EtOH (100 %) und 30 µL NaAc (pH 5, 3 M) gegeben. Anschließend wurde die Probe für 30 min bei 13 000 rpm und RT zentrifugiert. Nach zweimaligem Waschen mit 200 µL 70 % EtOH wurde das Pellet getrocknet und in 50 µL TE-Puffer resuspendiert.

A.tumefaciens

1,5 mL einer ü.N Kultur wurden bei 13 000 rpm 5 min lang abzentrifugiert und der Überstand wurde verworfen. Zum Bakterienpellet wurden 100 µL Lösung I (Zelllyse) pipettiert und anschließend 10 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µL Lösung

II erfolgte eine weitere Inkubation für 10 min bei RT. Zu dem Reaktionsansatz wurden 150 µL NaAc (3 M, pH 4,8) gegeben, gut gemischt und 5 min auf Eis gestellt. Um Proteine und restliche Zellbestandteile abzutrennen wurde die Lösung 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Zum Überstand wurde 1 mL Isopropanol gegeben und 25 min bei 13 000 rpm und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µL 0,3 M NaAc (pH 7) gelöst. Nach Zugabe von 1 mL 95% EtOH und zehninütiger Zentrifugation bei 13 000 rpm wurde wiederum der Überstand entfernt. Das DNA - Pellet wurde anschließend mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µL TE - Puffer oder Wasser gelöst.

Lösung I

50 mM	Glucose
25 mM	Tris/HCl
4,0 mg/mL	Lysozym
10 mM	EDTA
pH 8,0	

Lösung II = TE-Puffer

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

2.2.6.3 Agarose Gelelektrophorese

Die DNA-Proben wurden mit 1,5 µL BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen; Hilden) versetzt und im Agarosegel (1-2 % Agarose, 0,5 g/L Ethidium-Bromid (EtBr) in 1x TAE-Puffer) elektrophoretisch aufgetrennt (Laufpuffer: 1x TAE). Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

TAE-Lauf-Puffer

4,8 g/L	Tris
1,2 mL/L	Eisessig
20 mL/L	0,5 M EDTA (pH 8,0)

2.2.6.4 PCR

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde das PWO Master Kit (Roche Diagnostics; Mannheim) verwendet.

1xReaktionsansatz (50 µL)

25 µL PWO-Master

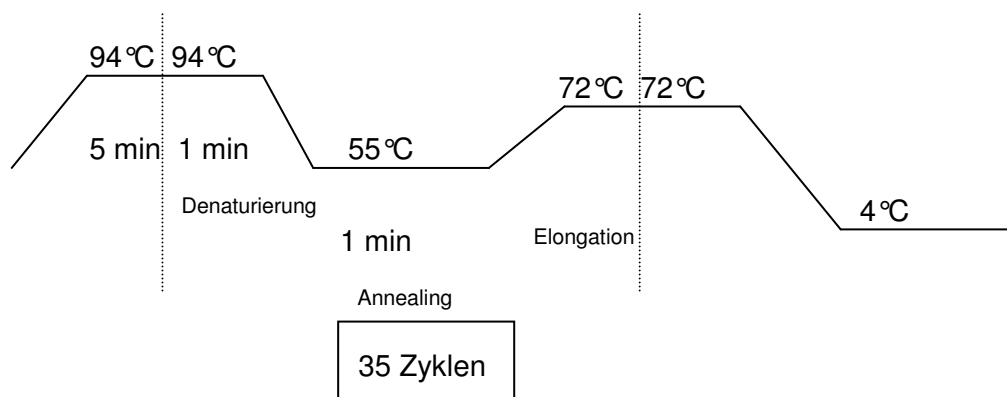
19 µL Wasser

2,5 µL Vorwärtsprimer

2,5 µL Rückwärtsprimer

1 µL DNA

Die Reaktion wurde in einem Thermocycler der Firma Eppendorf mit folgenden Parametern durchgeführt:

**2.2.6.5 Restriktionsanalysen**

Sämtliche verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England BioLabs® Inc. (Frankfurt) bezogen und nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Inkubationszeit wurde auf 2 h verlängert. Erfolgte der Doppel-/Dreifachverdau mit nichtkompatiblen Enzymen wurden die Ansätze zwischen den beiden Restriktionen mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt, sollte eine Hitzeinaktivierung des entsprechenden Enzyms nicht möglich gewesen sein.

2.2.6.6 Präparation von gesamt RNA

RNA-Isolation für Transkriptanalysen per semiquantitativer real-time-RT-PCR (Qiagen RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden) Zirka 100 mg frisches Pflanzenmaterial wurde in ein mit 8-10 Glaskügelchen (Ø 0,3 mm) befülltes 1,5 mL Eppendorf Gefäß gegeben und in fl. Stickstoff eingefroren. Die Probe wurde mit Hilfe einer Retsch Mühle für 1 min bei 30 Hz gemörsert. Vor der Verwendung wurden zum RLT-Puffer (enthalten im RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden) 10 µL/mL β-Mercaptoethanol zugegeben. Zu jeder Probe wurden 450 µL RLT/β-Mercaptoethanol-Puffer zugegeben und 3 min bei 56 °C inkubiert. Das Homogenisat wurde inklusive der Glaskügelchen auf eine QiaShredder

Säule gegeben und 2 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde weiter nach Herstellerprotokoll verfahren.

RNA-Isolation für Microarray Chips (Qiagen RNeasy Midi Kit; Qiagen, Hilden)

Es wurden 500 mg homogenisiertes Pflanzenmaterial nach Herstellerprotokoll aufgearbeitet. Anschließend erfolgte noch eine Ammoniumacetat-Fällung. Hierfür wurden 200 µL gesamt RNA Probe mit 500 µL 96 % EtOH und 100 µL Ammoniumacetat (7,5 M) vermischt und ü.N. bei -80 °C gefällt. Nach einer 25 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 5000 rpm wurde das Pellet mit 400 µL 80% EtOH gewaschen und erneut 15 min bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde für 5 min bei 37 °C getrocknet und in 100 µL DEPC Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm.

2.2.6.7 RNA-Elektrophorese

Extrahierte Gesamt-RNA (2.2.6.6) wurde unter denaturierenden Bedingungen elektrophoretisch aufgetrennt. Die RNA wurde mit 3 Teilen Probenpuffer versetzt, 10 min bei 65 °C inkubiert und für 5 min auf Eis abgekühlt. Versetzt mit 1 µL BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen; Hilden) wurden die Proben im denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

MEN-Puffer (10x)

200 mM	Mops (Na-Salz)
50 mM	NaAc wasserfrei
10 mM	EDTA
pH 7	

Probenpuffer

400 µL	Formamid
140 µL	Formaldehyd(37%)
80 µL	10xMEN
1/200 Vol	Ethidiumbromid (10 mg/mL)

Agarosegel

1,5 g	Agarose
10 mL	10xMEN
90 mL	Wasser
nach abkühlen 2 mL Formaldehyd (37%)	

2.2.6.8 cDNA Synthese und quantitative Real Time RT-PCR (qPCR)

Die isolierte Gesamt-RNA (2.2.6.6) wurde photometrisch quantifiziert und die Qualität der RNA (1-2 µg) wurde durch Agarosegel-Elektrophorese unter nativen Bedingungen überprüft (2.2.6.7). Um eventuelle DNA-Kontaminationen zu entfernen wurde die Gesamt-RNA vor der cDNA-Synthese mit DNase I (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) behandelt:

Reaktionsmix

1,0 µg	RNA
1,0 µL	10 x Reaktionspuffer
1,0 µL	Amplification grade DNase I

auf 10 µL mit DEPC-behandeltem Wasser auffüllen

Die Reaktionen wurden für 15 min bei RT inkubiert, anschließend wurde 1,0 µL EDTA (25 mM) zu jeder Reaktion geben und 15 min bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden für 1 min auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Dieser Ansatz wurde direkt für die Reverse Transkription eingesetzt.

Für die cDNA-Synthese wurde das „cDNA Synthesis Kit for RT-PCR“ (AMV) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) verwendet:

Reaktionsmix

2,0 µL	10 x Reaction Buffer
4,0 µL	25 mM MgCl ₂
2,0 µL	Desoxynucleotid-Mix
2,0 µL	Oligo-p(dT) ₁₅ Primer
1,0 µL	RNase Inhibitor
0,8 µL	AMV Reverse Transkriptase
8,2 µL	RNA-Probe

Eine Mischung aus allen verwendeten RNA Proben diente als Matritze für die Negativkontrolle. Zu diesem Reaktionsansatz wurde keine AMV Reverse Transkriptase gegeben. Wenn durch den DNase I-Verdau keine genomische DNA mehr in den RNA-Proben enthalten war, sollte diese Mischung kein PCR-Produkt liefern.

Die Proben wurden 10 min bei 25°C und anschließend 60 min 42°C inkubiert. Auf die 42°C Inkubation folgte eine Denaturierung der AMV Reversen Transkriptase bei 99°C für 5 min und anschließendes Kühlen auf 4°C für weitere 5 min. Die Überprüfung der Qualität der cDNA erfolgte über eine PCR. Als Referenz-Gen wurde die Ribulose-bisphosphat-carboxylase (Rubisco, Primer s. Anhang) verwendet.

Die qPCR wurde in einem LightCycler 480 von Roche unter Verwendung des LightCycler® SYBR Green I Master Kits (Roche Diagnostics GmbH; Mannheim) durchgeführt. Die verwendeten Primer sind im Anhang (7.1) aufgeführt. Die Auswertung erfolgte unter der Verwendung der LightCycler 480 Software mit dem Programm „Advanced Relative Quantification“.

2.2.7 Klonierung und Plasmidkonstruktion

Die erstellten Vektor-Konstrukte wurden über eine Transformation in *E.coli* (2.2.3) für eine Plasmidpräparation amplifiziert.

2.2.7.1 Fragmentisolation und Ligation

Für die Ligation vorgesehene PCR Fragmente oder Vektoren wurden entweder über ein Elektrophorese-Gel (2.2.6.3) aufgetrennt und mit dem MiniElute Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerprotokoll isoliert oder direkt mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerprotokoll aufgereinigt.

Vektoren die mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten worden sind (z.B. KpnI), wurden vor der Ligation mit alkalischer Phosphatase (alkaline phosphatase, shrimp; Roche Diagnostics, Mannheim) nach Herstellerprotokoll behandelt.

Alle Ligationen wurden mit der T4 DNA Ligase von NEB (New England BioLabs® Inc. (Beverly, USA)) durchgeführt. Die Ligations Zeiten und Bedingungen wurden zwischen einigen Stunden bei RT und über Nacht bei 4 °C variiert.

2.2.7.2 Herstellung der Promotordeletionskonstrukte im Vektor pBin19

Es wurden acht am 5´-Ende je um 100 bzw. 50 bp verkürzte Promotorfragmente in Fusion mit dem GUS-Reportergen erstellt. Hierfür wurden Primer (s. 7.1) mit integrierter KpnI-Schnittstellen verwendet.

Konstrukt-Name	Primer
-790 <i>In2.1</i>	Cla30MP3/Cla30MP2
-720 <i>In2.1-A2</i>	Cla30MPDA2/Cla30MP2
-600 <i>In2.1-A3</i>	Cla30MPDA3/Cla30MP2
-505 <i>In2.1-A4</i>	Cla30MPDA4/Cla30MP2
-416 <i>In2.1-A5</i>	Cla30MPDA5/Cla30MP2
-315 <i>In2.1-A6</i>	Cla30MPDA6/Cla30MP2

-241	<i>In2.1-A7</i>	Cla30MPDA7/Cla30MP2
-185	<i>In2.1-A8</i>	Cla30MPDA8/Cla30MP2
-130	<i>In2.1-A9</i>	Cla30MPDA6/Cla30MP2

Als Negativ-Kontrolle wurde der Vektor pBin19 ohne Promotor vor dem GUS-Gen verwendet (pBin19:GUS).

Für die Herstellung des $P_{In2.1}$:GUS -Konstruktes und der Promotordeletionskonstrukte wurden die gereinigten (2.2.7.1) PCR-Fragmente über die KpnI Schnittstellen in den Vektor pB2ACK3:GUS kloniert. Die Orientierung der Fragmente wurde über eine PCR (2.2.6.4) und einen Restriktionsverdau (2.2.6.5) kontrolliert. Die Komplette Promotor(deletions):GUS-Kassette wurde anschließend über einen Restriktionsschnitt mit BamHI/EcoRI isoliert, und über BamHI/EcoRI in den Vektor pBin19 umklont. Für die Herstellung des Konstruktes ohne Promotor wurde das GUS-Gen mit Hilfe der SacI Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor pB2ACK3:GUS geschnitten und in den Vektor pBin19 umklont. Die entsprechenden Plasmide wurden alle zusätzlich über eine Sequenzierung bei Eurofins Operon MWG (Stadt angeben) kontrolliert.

2.2.7.3 Erstellung des *In2.1*-Promotor Konstrukts mit Deletion des *ocs*-Elements

Über eine PCR (2.2.6.4) mit spezifischen Primern wurden zwei Promotorfragmente hergestellt (Cla30MP2_KpnI und Cla30MP5_BamHI 3'-Ende des Promotors und Cla30MP4_BamHI und Cla30MP3_XbaI; 5'-Ende des Promotors). Die Promorterteile wurden über eine BamHI-Restriktionsstelle wieder ligiert (2.2.7.1) sodass das *ocs*-Element im neu entstandenen Promotorkonstrukt deletiert war. Dieser *In2.1Δocs*-Promoter wurde über KpnI und XbaI gerichtet in den Vektor pBin19:GUS (2.2.7.2) kloniert.

Die entsprechenden Klone wurden über eine Sequenzierung überprüft.

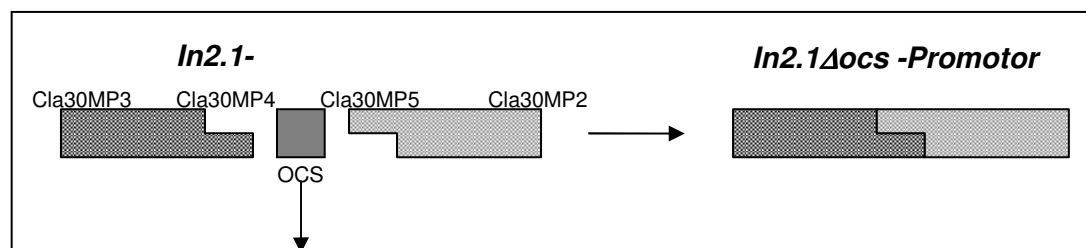


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des *In2.1*-Promotor-Konstrukts ohne das *ocs*-Element.

2.2.7.4 Herstellung eines Minimalpromotors mit Tandem ocs-Element

Das *ocs*-Element wurde als Tandem mit dem *In2.1-A9*-Promotorfragment als synthetisches Gen bei MWG synthetisiert und über XbaI/BamHI aus dem pCR2.1-Vektor (Invitrogen GmbH; Karlsruhe) in den Vektor pBin19:GUS umkloniert. Der entsprechende Klon wurde über eine Sequenzierung bei MWG überprüft.

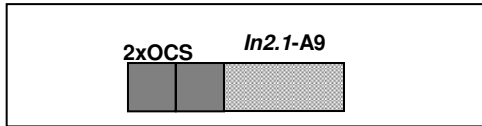


Abb. 2-2 Schematische Darstellung des 2ocs-*In2.1-A9*-Promotors

2.2.7.5 Umklonierung der $P_{In2.1}$:GUS -Kassette in den Vektor pBGW

Das $P_{In2.1}$:GUS -Konstrukt wurde zunächst in einer BP-Reaktion (Gateway® BP clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen) in den Gateway-Donr-Vektor und anschließend über die LR-Reaktion (Gateway® LR clonase™ II Enzyme Mix, Invitrogen) in den Vektor pBGW umkloniert. Beide Reaktionen wurden gemäß dem Herstellerprotokoll angesetzt. Der erhaltene Klon wurde über eine PCR (2.2.6.4) auf das Insert geprüft.

2.2.7.6 Klonierung von 35S:Luc und $P_{In2.1}$:LUC in den Vektor pBin19

Die 35S:Luc-Kassette wurde über spezifische Primer mit angehängten SacI- bzw. EcoRI-Schnittstellen mit dem Vektor pGreen als Matritze amplifiziert. Das Fragment wurde über diese Restriktionsschnittstellen in den Vektor pBin19 kloniert. Die Klone wurden über eine PCR geprüft. Das Luciferase Gen wurde mit Hilfe spezifischer Primer (Luc_3_SacI und Luc_t_EcoRI) aus dem Vektor pGreen amplifiziert und in den SacI/EcoRI geschnittenen Vektor pBin19 kloniert (pBin:LUC). Der mit Hilfe der Primer Cla30MP2/MP3 amplifizierte *In2.1*-Promotor wurde über KpnI in Vektor pBin:LUC umgesetzt. Alle verwendeten Primer sind im Anhang (7.1) zu finden.

2.2.7.7 Klonierung von 35S:DEAC und $P_{In2.1}$:DEAC in den Vektor pBin19

Die Klonierung der 35S:DEAC-Kassette erfolgte über EcoRI-Restriktionsschnittstellen aus dem Vektor pPCVKDEAC in den Vektor pBin19.

Das DEAC-Gen wurde aus dem Vektor pHOEKDEAC mittels BamHI-Restriktionsverdau isoliert und in den Vektor pBin19 umkloniert. Die Orientierung wurde über Restriktionsverdau und PCR überprüft. Der *In2.1*-Promotor wurde mit Cla30MP2/MP3 amplifiziert und über KpnI in den Vektor pBin19:DEAC kloniert.

2.2.8 Applikationsversuche

Für die Sprühapplikation der Lösungen wurde eine Airbrush-Pistole von Grafo verwendet. Die Applikationsmenge betrug für kleine Agarplatten (\varnothing 9 cm) 500 μ L und für Erdtöpfe (\varnothing 12 cm) 875 μ L pro Platte bzw. Topf. Dies entspricht für den Safenermix aus Isoxadifen und Mefenpyr einer Aufwandmenge von 1500 g a.i./ha und für Benoxacor oder Dichlorsalicylsäure einer Aufwandmenge von 150 g a.i./ha.

Stammlösung zum Spritzen

1 mL	Agrotin-Lösung (0,2 %)
25 μ L	EC-Vormischung/Diacetonalkohol (1:6)
18,75 μ L	Testsubstanz Stocklösung

für die Blindformulierung (BF) wurden statt der Testsubstanz 37,5 μ L DMSO zugegeben. Es wurde die doppelte Menge DMSO eingesetzt, da die Safener Mefenpyr und Isoxadifen immer in Mischung eingesetzt wurden (d.h. zweimal 18,75 μ L Substanz).

Emulsionskonzentrat (EC)-Vormischung

5,0 %	Phenylsulfonat CA 70
7,0 %	Emulsogen EL 360
40 %	Isophoron

<u>Verwendete Stocklösungen in DMSO</u>		<u>1 mL Spritzlösung</u>	<u>Pro Topf/Petrischale</u>
10 mg/mL	3,5-Dichlorsalicylsäure	0,90 mM	150 g a.i./ha
10 mg/mL	Benoxacor	0,72 mM	150 g a.i./ha
100 mg/mL	Mefenpyr-diethyl	5,00 mM	1500 g a.i./ha
100 mg/mL	Isoxadifen-ethyl	7,20 mM	1500 g a.i./ha

2.2.9 Reportergeren Tests

2.2.9.1 Histochemischer GUS Test ganzer Pflanzen/Blätter (Jefferson *et al.* 1987)

Das Substrat x-Gluc (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid) wird durch die von dem GUS-Gen kodierte β -Glucuronidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Hierdurch ist ein einfacher optischer Nachweis der Aktivität dieses Enzyms im Pflanzengewebe möglich. Die Pflanzen oder Blätter, von in Erde oder auf MS-Medium unter Langtagbedingungen kultivierten Pflanzen (2.2.5), wurden 2 d nach Applikation von Blindformulierung (BF) oder Testsubstanz (2.2.8) mit x-Gluc-Färbelösung

überschichtet und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die Färbelösung wurde am nächsten Tag entfernt und die Pflänzchen 2-3-mal für 30 min mit Entfärbelösung (Ethanol:Eisessig 3:1) gewaschen.

GUS-Phosphatpuffer

159,8 mL	deion. Wasser
20,0 mL	Natriumphosphatpuffer (pH 7, 500 mM)
200 µL	Triton X-100
20,0 mL	EDTA-Lösung (100 mM)

x-Gluc-Färbelösung

20,0 mL	GUS-Phosphatpuffer
20,0 mg	x-Gluc

2.2.9.2 Quantitativer GUS Test

Ein weiteres Substrat für die β -Glucuronidase ist 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid (4-MUG). Die mit Hilfe des Extraktionspuffers aus den Pflanzen gewonnene β -Glucuronidase hydrolysiert das Fluorochrom 4-Methylumbelliferon (7-hydroxy-4-methyl Cumarin, 4-MUG) zu der fluoreszierenden Verbindung 4-MU und Glucuronsäure (Gallagher and Stomp 1992). 4-MU kann bei 356 nm angeregt werden, das Emissionsmaximum liegt bei 455 nm.

Der Versuch wurde mit dem MarkerGene™ β -Glucuronidase (GUS) Reporter Gene Activity Detection Kit von MGT durchgeführt: Die Blätter von zehn bis fünfzehn 2 Wochen alten steril auf 0,5 MS Agar angezogenen Pflänzchen (2.2.5) wurden 2 Tage nach Sprühapplikation der Blindformulierung bzw. Substanz (2.2.8) in 1,5 mL Eppendorf Gefäße mit 8-10 Glaskügelchen (\varnothing 0,3 mm) gegeben und in fl. Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Blattmaterial in der Retschmühle für 1 min bei 30 Hz zerkleinert. Pro Probe wurde 200-500 µL kalter Extraktionspuffer zugegeben, gemischt und 8 min bei 8000 rcs und 4 °C zentrifugiert.

Der Proteingehalt des 1:10 verdünnten Überstandes wurde mittels Bradford-Test (Bradford, M.M.,1987) (Quick Start™ Bradford Protein Test; Biorad) bestimmt. Der quantitative GUS-Test wurde in einer 96-well Mikrotiterplatte im Fluostar durchgeführt. Es wurden je 15 µg Protein in 20 µL GUS Extraktionspuffer eingesetzt. Pro Ansatz wurde 80 µL GUS Test Puffer (0,1 mM MUG), was einer Endkonzentration von 0,08 mM MUG entspricht, zugegeben. Die Relative Fluoreszenz nach 0 und 8 h Inkubation bei 37 °C wurde erfasst. Da das Fluorometer nur einen maximalen relativen

Fluoreszenzwert von 65535 ermitteln konnte, wurden Proben die über diesem Wert lagen 1:10 oder 1:100 mit GUS Extraktionspuffer verdünnt und erneut gemessen. Die Werte wurden entsprechend verrechnet. Pro Probe wurden 3 technische Replikate gemessen. Die Standardabweichung der drei technischen Replikate wurde in Excel mit

der Formel $\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$ bestimmt. Hierbei ist x der Stichprobenmittelwert und n der Stichprobenumfang.

2.2.9.3 Nachweis der Aktivität des Luciferase-Reportergens (Biolumineszenz)

Die transgenen Pflanzen wurden 2 Wochen steril auf 0,5 MS Agar unter Langtagbedingungen angezogen. 2 Tage nach der Applikation von BF oder Mefenpyr und Isoxadifen (s. Kapitel 2.2.8) wurden die Pflanzen mit 500 µL Luciferin (1 mM in 0,01% Tween80) pro Platte besprüht. Die Biolumineszenz wurde anschließend mit der Stella Kamera (Raytest; Straubenhardt) aufgenommen und der Software Aida (Raytest; Straubenhardt) ausgewertet.

2.2.9.4 Nachweis der Aktivität der *DEAC-* und *PAT-*Reportergene

Die Pflanzen wurden 3 Wochen unter Langtagbedingungen auf Erde kultiviert. Anschließend folgte abwechselnd eine Behandlung mit Safenern (Mefenpyr und Isoxadifen) und Substrat (1,2 mg/mL N-Ac-BASTA für das *DEAC*-Reportergen; und 0,4 mg/mL BASTA für das *PAT*-Reportergen) nach folgendem Zeitplan:

Mo: Safener bzw. unbehandelt

Mi: N-Ac-BASTA oder BASTA

Do: Safener bzw. unbehandelt

Fr: N-Ac-BASTA oder BASTA

Diese Behandlungen wurden 2 Wochen lang durchgeführt, abschließend wurden die Ergebnisse photographisch dokumentiert.

2.2.10 Die Chromatin Immuno Präzipitation (ChIP)

Durch Chromatin Immunopräzipitation (ChIP; Orlando, V. 2000) kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren oder anderen DNA-assoziierten Proteinen an bestimmte DNA Sequenzen kann somit *in vivo* nachgewiesen werden. Über eine Formaldehydbehandlung intakter Zellen werden Promotor assoziierte Proteine an die

DNA gebunden, und nach der Isolation und dem Scheren des Chromatins mit spezifischen Antikörpern gegen das gesuchte Protein immunopräzipitiert. Die immunopräzipitierten DNA Fragmente werden nach der Reinigung über eine PCR analysiert, mit Primern welche die potentielle Bindungsstelle des Proteins flankierten. Die Menge an PCR Produkt ist bezeichnend für die relative Menge an Protein, die zum Zeitpunkt der Ernte an die DNA gebunden ist. Da mit dieser Methode quantitative Unterschiede der relativen Menge an Protein-DNA-Komplexen erfasst werden können, ist es möglich Stimulus-induziertes Binden zu detektieren.

Die verwendeten Pflanzen (20 pro Topf) wuchsen im Kurztag (8/16 h light/dark period, 22 °C) für 4-5 Wochen. Pro Ansatz benötigte man ca. 5 g *Arabidopsis* Blattmaterial. Verwendet wurden Col-0 Pflanzen und *P_{ln2.1}:GUS* -Pflanzen. Die Pflanzen wurden jeweils mit BF oder Mefenpyr/Isoxadifen behandelt und 6 h nach Behandlung aufgearbeitet (2.2.8).

Der gesamte Versuch wurde wie im weiteren beschrieben mit Hilfe von Benjamin Fode (Fode *et al.* 2008) (phD im Labor von Prof. C. Gatz, Göttingen) in Göttingen durchgeführt. Alle verwendeten Geräte und Chemikalien sowie das α TGA2/5 Serum (Serum (SA4364) wurden vor Ort zur Verfügung gestellt.

2.2.10.1 *In Vivo* Quervernetzung von Proteinen an die DNA

Die Blätter wurden in Nylonstrümpfen in fl. Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurden die Blätter im Nylonstrumpf in ein Becherglas mit CLB1 (Crosslink buffer 1) gegeben sodass sie komplett von Flüssigkeit umgeben waren. Das Becherglas wurde in einen Exsikkator gestellt und zweimal für 5 min Vakuum angelegt. Die Proben wurden anschließend 20 min stehen gelassen. Puffer CB1 wurde entfernt und es wurde mit CB2 gewaschen: Die Blätter wurden mit CB2 infiltriert, für 5 min Vakuum angelegt und anschließend wurde weitere 5 min inkubiert. Nach der Entfernung von Puffer CB2 wurde die Proben zweimal mit dest. Wasser gewaschen. Nachdem so viel Wasser wie möglich entfernt wurde (Schleudern der Strümpfe), konnte das Material eingefroren und in fl. Stickstoff gelagert werden.

CLB1 (Crosslink buffer 1)

50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 5,8, 1% Formaldehyd
(45,75 mL / 4,25 mL + 923 mL deion. Wasser + 27 mL 37
% Formaldehyd)

CLB2 (Crosslink buffer 2):

50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, pH 5,8, 0,3 M Glycin (25 g/L)

2.2.10.2 Isolation der Kerne

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt: Das Pflanzenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert und in 50 mL Falkons mit 20 mL NEB (Nuclei-Extraction-Buffer) überführt. Die Proben wurden mit Hilfe eines MicraRT (Art Labortechnik, Müllheim) 14 000 rev/min für 5 min homogenisiert. Die Suspension wurde durch 2 Blätter Miracloth (Calbiochem, Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK) gefiltert und das Filtrat in einem 100 mL Becherglas aufgefangen. Mit NEB wurde zu einem Endvolumen von 24 mL aufgefüllt. Für die Lyse der Organellen wurde 1 mL Triton X-100 (25 %) tropfenweise zum Filtrat gegeben (unter ständigem Rühren). Anschließend wurde für 30 min – 2 h weiter gerührt.

Zur Herstellung der Percoll-Gradienten wurden in einem 50 mL Röhrchen ein 6 mL Percoll-Kissen (75 %) vorgelegt und vorsichtig mit 6 mL Percoll (35 %) überlagert. Die resuspendierten Nuklei gab man vorsichtig auf das Percoll-Bett und es wurde bei 2100 g und 4 °C für 30 min in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Die Nuklei waren als graue Interphase zwischen den beiden Percoll-Schichten erkennbar, mit einer abgeschnittenen 1 mL Pipettenspitze wurden diese aufgenommen und in ein frisches 50 mL Röhrchen gegeben. Puffer GB wurde bis zu einem Endvolumen von 20 mL zugegeben. 6 mL Percoll (35%) wurden mit den resuspendierten Nuklei überlagert und bei 2100 g für 10 min bei 4 °C erneut zentrifugiert (swinging bucket rotor). Nach Verwerfen des Überstands wurden die Nuklei in 1 mL GB resuspendiert und in ein 10 mL Röhrchen überführt. Ein Aliquot wurde für eine DAPI-Färbung abgenommen. Die Probe wurde für 10 min bei 4 °C und 2100 g zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen (weiter bei 2.2.10.3).

DAPI-Färbung (300 nM DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in Wasser): 1,5 h bei 4 °C inkubieren. Anregungswellenlänge 358 nm, das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von 461 nm. Die Emission bei 400 nm entspricht der Bindung von DAPI an RNA und sollte durch einen geeigneten Filter subtrahiert werden.

NEB (Nuclei-Extraction-Buffer):

1 M hexylene glycol (2-Methyl-2,4-Pentandiol)

50 mM PIPES-KOH, pH 7,2

10 mM MgCl₂

Vor Gebrauch wurde β-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt

GB (Gradient buffer):

0,5 M hexylene glycol (β-methyl-2,4-pentandiol)

50 mM PIPES-KOH, pH 7,2

10 mM MgCl₂

1 % (w/v) Triton X-100

Vor Gebrauch wurde β-Mercaptoethanol zu einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt

Percoll Kissen: 75 % und 35 % (w/v) *Percoll in GB*

2.2.10.3 Chromatin-Präparation

Alle Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt: Die Kerne wurden in 1 mL SB (0,5 %) resuspendiert und Protease Inhibitor-Mix wurde zugeben (1:100; (P-9599, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)). Unter vorsichtigem Rühren bei 4 °C erfolgte eine Inkubation für 20 min. Die Probe wurde 1:1 mit 1 mL SB ohne SDS verdünnt, die Endkonzentration an SDS betrug 0,25 %. Es wurde 4mal für 20 sec mit 100 W (MSE Soniprep 150 ultrasonic disintegrator/ Sany-Gallen-Kamp, Loughboro, Leicestershire, UK) sonifiziert. Die Proben wurden während der Sonifizierung auf einem Eis/Ethanol-Bad gekühlt. Um das lösliche Chromatin von den Kerntrümmern zu trennen wurde bei 4 °C für 15 min und 11200 g zentrifugiert. Aliquots von 200 µL wurden in fl. Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Ein Aliquot von 50 µL wurde zur DNA-Quantifizierung abgenommen.

SB (Sonication buffer)

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

1 mM EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) mit 0, 0,25 oder 0,5 % (w/v) SDS (Sodium dodecyl sulfate)

2.2.10.4 Quantifizierung des DNA-Gehalts der Chromatinproben

Zu 50 μ L der Chromatinpräparation wurden 200 μ L SB, 0,25 % SDS und 5 μ L Proteinase K (aus einer 20 mg/mL Stock-Lösung) zugegeben. Um die Quervernetzungen zu lösen erfolgte eine Inkubation der Proben für 1 h bei 37 °C und für 16 h bei 42 °C in einem Heizblock. Es wurde mit 250 μ L PCI extrahiert, für 30 sec gemischt und die Phasen durch Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm getrennt. Nachdem der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt worden war, erfolgte eine Extraktion mit 250 μ L CI. Es wurde für 30 sec gemischt und die Phasen durch Zentrifugation für 5 min bei 13 000 rpm getrennt. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 1 μ L RNaseA (10 mg/mL) wurde für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1/10 Vol 3 M Na-Acetat, 1 μ L Glycogen (10 mg/mL; G-8751, Sigma-Aldrich) und 2 Vol. Ethanol (absolut) zugegeben, durch 6-8 maliges invertieren gemischt und für 2-4 h (oder ü.N) bei – 80 °C präzipitiert. Die DNA wurde durch 35 minütige Zentrifugation bei 13 000 rpm und 4 °C pelletiert. Es folgte ein Waschschrift mit 800 μ L 70 % EtOH und die Trocknung der DNA für 10 min bei RT. Das Pellet wurde in 50 μ L Wasser resuspendiert und die OD₂₆₀ bestimmt. Die Größe der DNA-Fragmente wurde auf einem 1 % Agarosegel analysiert (2.2.6.3).

Probe	Konz [μ g/ μ L]	Probe	Konz [μ g/ μ L]
WT DMSO	0,13	<i>In2.1</i> DMSO	0,111
WT Mef/Isoxa	0,218	<i>In2.1</i> Mef/Isoxa	0,162
Aus früherem Versuch zur Kontrolle:		<i>tga3/5/6</i>	0,308

PCI-Mix:

Phenol (equilibriert, pH 7,6-8,0, AppliChem/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (v/v/v))

CI-Mix:

Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v)

2.2.10.5 Immunopräzipitation des Protein-DNA Komplexes

Die Chromatinproben wurden auf Eis aufgetaut und 15 µg DNA wurde zu einem Endvolumen von 200 µL mit SB (Sonication Buffer, 0,25 % SDS) gebracht:

115,4 µL WT DMSO + 84,6 µL SB

68,8 µL WT Mef/Isoxa + 131,2 µL SB

135,1 µL *In2.1* DMSO + 64,9 µL SB

92,6 µL *In2.1* Mef/Isoxa + 107,4 µL SB

48,7 µL *tga3/5/6* + 151,3 µL SB

Es wurde jeweils 300 µL Ripa-F ohne SDS zugegeben und für 1 h bei 4 °C mit 5 µL Präimmunserum und langsamer Rotation inkubiert (z.B. auf einer Rotationsplattform wie einem Intelli-Mixer, LTF Labortechnik, Wasserburg). In der Zwischenzeit wurde 1 mL Ripa-F auf 94 mg A-Sepharose gegeben (0,125 g auf 1 mL, 0,094 g auf 750 µL -> 50 % Beads).

Pro Probe wurden 2 x 50 µL Protein A-Sepharose benötigt: Zunächst wurden die mit dem Pre-Immuneserum assoziierten Komplexe aufgebracht, und später wurden die spezifischen Komplexe mit dem Immuneserum angereichert. Um die Protein A-Sepharose zu equilibrieren wurde sie 15 min langsam bei 4 °C rotiert und anschließend für 3 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das RIPA-F wurde mit einer Insulin-Nadel entfernt. Die Protein A-Sepharose wurden erneut mit 1 mL RIPA-F gewaschen (5 min langsam bei 4°C rotieren). Der Überstand wurde wie oben beschrieben abgenommen und verworfen. Die Protein A-Sepharose wurden mit RIPA-F verdünnt bis man eine 50 % Protein A-Sepharose -Lösung erhielt. 50 µL der equilibrierten 50 % Protein A-Sepharose wurden auf die Proben geben und für 1 h bei 4 °C mit langsamer Rotation inkubiert. Diese Inkubation entfernte Komplexe vom Chromatin, welche mit dem Prä-Immuneserum interagierten. Die Proben wurden für 2 min bei 13 000 rpm zentrifugiert und 50 µL des Überstandes wurden, mit 400 µL SB, 0,25 % SDS versetzt und als Kontrolle (Inputkontrolle) zurückbehalten.

Der restliche Überstand wurde für die Immunopräzipitation verwendet: Zum Überstand wurde 1-5 µL Antiserum zugeben. Das Gemisch wurde für 2 h bei 4 °C bei langsamer Rotation inkubiert und nach Zugabe von 50 µL der 50 % Protein A-Sepharose weitere 2 h bei 4°C rotiert. Nach einer 3 min Zentrifugation bei 5 000 rpm wurde der Überstand mit einer Insulin-Nadel entfernt bis die Sepharose trocken war. Die Protein A-Sepharose wurde durch Zugabe von 1 mL RIPA-F gewaschen und 5 min bei 4°C rotiert. Der Überstand wurde nach einer weitem 3 min Zentrifugation bei 5 000 rpm mit

einer Insulin-Nadel entfernt. Dieser Wasch-Schritt wurde noch 2 mal wiederholt. Nach der Zugabe von 800 µL RIPA-F wurden die Proben in ein neues Röhrchen überführt, 5 min bei 4 °C inkubiert (langsame Rotation) und 3 min bei 5 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Auf die Protein A-Sepharose wurden 150 µL EB gegeben, 30 sec gemischt und 1 min bei 13 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen mit 150 µL 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 überführt. Der Elutionsschritt wurde ein weiteres Mal wiederholt und die Proben vereinigt. Zu den Kontrollen wurden ebenfalls 5 µL Proteinase K (20 mg/mL) zugegeben und die Proben für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die Crosslinks wurden für 4 h bei 65 °C (oder ü.N.) gelöst.

RIPA-F:

50 mM HEPES-NaOH, pH 7,4

140 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

0,1 % Natrium Deoxycholat (DOC, minimum 97 %, Sigma-Aldrich)

0,1 % SDS

RIPA-F Puffer ohne SDS

Protein A Sepharose (von *Staphylococcus aureus*, Sigma-Aldrich),

2-8 °C

EB (elution buffer)

0,1 M Glycin (pH mit HCl auf 2,5)

0,5 M NaCl

0,05 % Tween20

10 mM Tris-HCl, pH 7,4

Reinigung der DNA für die PCR

Die Proben wurden mit 450 µL PCI extrahiert, für 30 sec gemischt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt (5 min 13 000 rpm). Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführen und 450 µL CI zugegeben. Die Proben wurden für 30 sec gemischt und zentrifugiert (5 min 13 000 rpm). Zum Überstand wurde in einem neuen Röhrchen 1 µL RNaseA (10 mg/mL) gegeben und 15 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 1/10 Vol 3 M Na-Acetate, 1 µL Glycogen (10mg/mL) und 2 Vol Ethanol erfolgte eine Durchmischung durch 6-8 maliges Invertieren. Die DNA wurde für 2-4 h (oder ü.N.) bei – 80 °C präzipitiert und durch Zentrifugation pelettiert (35 min 13 000 rpm, 4 °C). Nach

einem Waschschrift mit 800 μL 70 % EtOH wurde die DNA pellettieren (20 min 13 000 rpm, RT) und bei 37 °C für 10 min getrocknet. Die IP DNA wurde in 35 μL bzw. die Input DNA in 175 μL Wasser gelöst.

Die verwendeten Primer wurden als QuantiTect Primer Assays (<http://www1.qiagen.com/Products/Pcr/QuantiTect/PrimerAssays.aspx>; Qiagen, Hilden) für die Promotoren der Cytochrom P450-Monooxygenase CYP81D11 (At3g28740; als Positiv-Kontrolle) und eine Aldo-Ketoreduktase (At2g37770, als Negativkontrolle) bestellt. Als Normalisierungsgen wurde Actin8 verwendet. Als *In2.1*-Promotospezifische Primer dienen die Primer Cla30MP8 und Cla30MP9 (s.7.1). Für jede Probe wurden je 2 Replikate (2,5 μL ; gereinigte IP-DNA bzw. Input-DNA) gemessen.

PCR-Programm

6 min 95 °C (+ 2 min wenn kein Fluoreszin gemessen wurde)

40 Zyklen: 20 s 95 °C, 20s 60 °C, 28 s 72 °C

4 min 72 °C

1 min 95 °C

1 min 95 °C

Für die Auswertung wurden die Werte der „Crossingpoints“ (C(t)), welche für die Zielpromotoren erhalten wurde, mit den C(t)-Werten für *Actin8* verrechnet. Um die Menge an DNA in allen Präparationen zu Normalisieren wurde die $2^{-\Delta C(t)}$ Methode verwendet. Das Verhältnis zwischen spezifischen Promotorfragmenten und dem Rest an *Actin8* DNA (diese „Verunreinigung“ sollte für alle Proben die mit demselben Antiserum aufgearbeitet worden sind gleich sein), stellt die Menge an präzipitierter Target-Promotor-DNA dar. Ein Wert von 1 bedeutet, dass die C(t)s von Actin8 und dem entsprechenden Promotorfragment gleich groß waren. Ein Wert unter Null beruht auf einem niedrigeren Promotor C(t)

2.2.11 Microarray Experimente

Diese Versuche wurden ab der Aufarbeitung der gesamt-RNA von Karin Stepusin, Laborantin im Labor Dr. Bartsch, durchgeführt.

Arabidopsis Pflanzen (*Col0*, *NahG*, *sid2-2* und *4tga*) wurden 4 Wochen unter Langtagbedingungen angezogen. Acht Stunden nach Sprühapplikation von BF, Dichlorsalizylsäure oder Safener (2.2.8) wurden die Blattrosetten geerntet und mit dem RNeasy Midi-Kit wurde gesamt RNA aufgearbeitet (2.2.6.6). Nach der Fällung der RNA

wurde die Qualität von je 10 µg RNA über ein denaturierendes Agarosegel überprüft (2.2.6.7).

Für die Microarray-Experimente wurde die GeneChip® Fluidics Station 450/250 von Affymetrix (Affymetrix, Inc.; Bedford) verwendet. Es wurde nach der Vorschrift des Herstellers Kapitel 2 und 3 verfahren und das Waschprotokoll für den *Arabidopsis* ATH1 Chip „EukGE-WS2v4_450“ verwendet.

Reaktionsansatz für die 1. Strang-Synthese

Microarray cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics; Mannheim)

5 µL RNA (10 µg) in siliconisierten Eppendorfgefäßen

2 µL T7-(T)-24-Primer (100 pmol/µL)

14,5 µL DEPC-Wasser

Nach 10 minütiger Inkubation bei 70 °C wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Anschließend erfolgte die Zugabe von

8 µL Reverse Transkriptase Puffer (5x)

4 µL DTT (0,1M)

2,5 µL Reverse Transkriptase Enzym (20 U/µL)

4 µL dNTPs (je 10 mM)

und die Proben wurden für 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt.

Reaktionsansatz für die 2. Strang-Synthese

Microarray cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics; Mannheim)

40 µL Produkt der 1.Strang-Synthese

72 µL DEPC-Wasser

30 µL 2.Strang-Synthese Puffer (5x)

1,5 µL dNTPx (10 mM)

6,5 µL Zweitstrang Synthese Enzym Mix (Mix aus DNA Polymerase I, *E.coli* Ligase und RNase H)

Nach 2 h Inkubation bei 16 °C wurden je 20 µL T4 DNA-Polymerase (1 U/µL) zugegeben und für 5 min bei 16 °C inkubiert. Abschließend wurden zu jeder Probe 17 µL EDTA (0,2 M, pH8) gegeben.

Reinigung der cDNA

Der 2. Strang-Synthese-Ansatz wurde mit 187 µL Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt und mit der Pipette gemischt. Die verwendeten „Phase Lock Gel® Heavy“ Eppendorfgefäße wurden für 30 sec bei höchster Geschwindigkeit

abzentrifugiert. Das Probengemisch wurde in die „Phase Lock Gel® Heavy“ Eppendorfgefäße pipettiert und für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Standard-Eppendorfgefäß überführt, nach Zugabe von 0,5 Vol NH₄Ac (7,5 M), 2,5 Vol EtOH (100 %) und 5 µL Glycogen (5 mg/mL) folgte eine 20 minütige Zentrifugation bei höchster Geschwindigkeit.

In vitro Transkription (IVT) und Markierung der RNA Sonden

BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit (T7) (Enzo Life Science, Inc.; Farmingdale) und T7 RNA Polymerase von Stratagene

Reaktionsansatz

22 µL cDNA

4 µL 10 x Puffer

4 µL Biotin markierte Ribonucleotide

4 µL 10 x DTT

4 µL RNase Inhibitor Mix

2 µL T7 RNA Polymerase (50 U/µL)

Gesamtvolumen 40 µL

Die Proben werden für 4,5-7 h bei 37 °C inkubiert und alle 30 min gemischt.

Aufreinigung der RNA

Die Reinigung der invitro Transkriptionsprodukte erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit Protokoll von Qiagen. Die RNA wurde mit DEPC-Wasser auf 100 µL aufgefüllt. Vor der Verwendung wurde zum RLT-Puffer (enthalten im RNeasy Mini Kit von Qiagen; Hilden) 10 µL/mL β-Mercaptoethanol zugegeben. Nach Zugabe von 350 µL RLT/β-Mercaptoethanol-Puffer und 250 µL 100 % EtOH wurden die Proben über eine Spin Säule durch 2 maliges Waschen mit RPE-Puffer (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Hilden) gereinigt und schließlich in 50 µL DEPC-Wasser eluiert. Nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung (OD 260 nm) wurden 20 µg cRNA mit 8 µL Fragmentierungspuffer (5x) gemischt und mit DEPC-Wasser auf 40 µL aufgefüllt. Es erfolgte eine 20 min Inkubation bei 94 °C und anschließendes Abkühlen auf Eis. 1 µg der fragmentierten cRNA und 1 µg unfragmentierte cRNA als Kontrolle werden über ein Agarosegel (2.2.6.3) aufgetrennt um den Erfolg der Fragmentierung zu überprüfen.

Hybridisierungscocktail

GeneChip® Expression 3'-Amplification Reagents Hybridization Control Kit (Affymetrix, Inc. Santa Clara)

Reaktionsansatz

38 µL cRNA

4,2 µL Control Oligo B2 3nM

12,5 µL 20x Control cRNA cocktail

2,5 µL Herings Sperm DNA 10 mg/mL

2,5 µL acetyliertes BSA 50 mg/mL

125 µL 2x MES Hybridisierungspuffer

65,3 µL DEPC-Wasser

Der Hybridisierungscocktail wurde bei – 80 °C gelagert. Die Proben wurden für 5 min bei 94 °C aufgetaut, währenddessen wurden 200 µL 1x Hybridisierungspuffer auf die ATH1-Chips geben.

Die Proben wurden auf Eis gestellt, anschließend 5 min bei höchster Geschwindigkeit abzentrifugiert und 5 min bei 45 °C inkubiert. Der Hybridisierungspuffer wurde von den ATH1-Chips entfernt und durch den Hybridisierungscocktail ersetzt. Die Hybridisierung wurde für 16-20 h bei 45 °C und 60 rpm durchgeführt.

Anschließend wurde wie nach Herstellervorschrift Kapitel 2 verfahren.

Verwendete Chemikalien:

SSPE: 1 L Ultra Pure 20xSSPE, Invitrogen

SAPC: Streptavidin R-phycoerythrin conjugate 1mg/mL, Molecular Probes über MobiTec

Antistreptavidin, biotinyliert, Vector Laboratories über Alexis

Goat IGG: 10 mg IgG Serum (Sigma) 10 mg/mL Stammlösung in 150 mM NaCl

BSA: 150 mg Rinderserum Albumin (Invitrogen)

Antifoam 0-30 (Sigma)

2xHybridisierungspuffer (50mL)

8,3 mL 12xMES
17,7 mL NaCl (5M)
4 mL 0,5 M EDTA
100 µL Tween 20 (10% in DEPC-Wasser)
19,9 mL DEPC-Wasser

12xMES

7 g MES
19,33 g MES-Natriumsalz
80 mL DEPC-Wasser
pH 6,5, sterilfiltriert

2xFärbepuffer

8,34 mL 12xMES
18,5 mL NaCl (5M)
500 µL Tween 20 (10 % in DEPC-Wasser)
22,56 µL DEPC-Wasser, filtrieren
100 µL Antifoam (5 % in DEPC-Wasser)

Puffer A

300 mL 20xSSPE
1000 µL Tween20 (10 % in DEPC-Wasser)
699 mL DEPC-Wasser

Puffer B

83,3 mL 12xMES
5,2 mL NaCl (5M)
1,0 mL Tween20 (10 % in DEPC-Wasser)
910,5 mL DEPC-Wasser

Färbelösung 1 und 3

10,8 mL 2xFärbepuffer
864 µL BSA (50 mg/mL)
216 µL Streptavidin-Phycoerythrin (1mg/mL)
9,72 mL DEPC-Wasser
5 min bei 4000 rpm zentrifugiert

Färbelösung 2

5,4 mL 2xFärbepuffer
432 µL BSA (50 mg/mL)
108 µL Goat IgG
64,8 µL Antistreptavidin
4,76 mL DEPC-Wasser
5 min bei 4000 rpm zentrifugiert

2.2.12 Probenaufarbeitung für die multiplex

Gaschromatography-tandem mass spectrometry (GC-MS/MS)

Die *Arabidopsis* Pflanzen (Col0, *NahG*, *sid2-2*) wurden steril 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert (2.2.5). Die Sprühapplikation von Blindformulierung bzw. den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen erfolgte wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben. Für jede Zeitwert (2, 4 und 6 h nach Applikation) wurden 5 x 120-140 mg Blattmaterial in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß mit 8-10 Glaskügelchen (\varnothing 0,3 mm) gegeben und in fl. Stickstoff eingefroren. Die Proben wurden mittels der Retschmühle für 1 min bei 30 s^{-1} zerkleinert. Anschließend wurde je Probe 1 mL warmes Methanol (60°C) zugegeben und 50 µL der Standard-Lösung (100 pmol D_6 SA-Standard), die Proben wurden für 30 min in einem 60°C Wasserbad inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13 000 rpm für 1 min wurde der Überstand über einen Millipore „Ultrafree-MC“ Säulenfilter (Porengröße $0,45\mu\text{m}$; PVDF Membran) gereinigt. Der Überstand durch Vakuumzentrifugation eingengt. Der Salizylsäuregehalt der Extrakte wurde durch Dr. Pollmann, an der Ruhr-Universität Bochum (Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Fakultät für Biologie) nach Müller *et al.* 2002 bestimmt.

2.2.13 Auswertung der Microarray Daten

Die Prinzipielle Komponenten Analyse (PCA)

Die PCA-Analyse transformiert mit Hilfe einer mathematischen Funktion eine Anzahl von wahrscheinlich korrelierten Variablen in eine kleinere Anzahl von unkorrelierten Variablen, so genannte prinzipielle Komponenten. Die erste prinzipielle Komponente macht die größte mögliche Varianz der Daten aus, und alle weiteren Komponenten betragen die restliche mögliche Varianz. Die Begrenzung auf die ersten zwei bis drei prinzipiellen Komponenten ist oft ausreichend um die dominanten Strukturen der

Daten und wichtige Verbindungen zwischen individuellen Experimenten oder Gruppen von Experimenten zu erkennen. Mit dieser Analyse bekommt man einen Überblick über die gewonnenen Daten und gewinnt einen Eindruck, ob die biologischen Replikate gut miteinander korrelieren, ob die Behandlung mit Safenern einen Einfluss auf die Genexpression hatte, und ob sich die Mutanten in ihrer Reaktion vom Wildtyp unterscheiden.

Der t-Test und p-Wert (Bender und Lange 2001)

Jedem Test liegt eine sogenannte Nullhypothese (H_0) und eine entsprechende Alternativhypothese zugrunde. Die Nullhypothese ist eine Annahme über die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Zufallsvariablen. Diese Nullhypothese beinhaltet die Gleichheit von Sachverhalten, etwa dass zwischen zwei Gruppen kein Unterschied besteht (bei den beiden betrachteten Gengruppen (Behandlung mit Blindformulierung oder Safenern) gibt es keinen Unterschied in den Expressionswerten). Die Alternativhypothese (H_1) ist eine durch Beobachtung oder Überlegung begründete Annahme oder Vermutung, die zur Erklärung bestimmter Phänomene dient, und die einer möglicherweise verbreiteten Annahme oder Vermutung (Nullhypothese) entgegen steht (Gene sind differenziell reguliert).

Ein sogenannter Fehler 1. Art (falsch positiv) tritt auf, wenn ein Gen als unterschiedlich exprimiert deklariert wird, obwohl kein wahrer Unterschied existiert. Bei einem Fehler 2. Art (falsch negativ) gelingt es dem Test nicht, einen wahren Expressions-Unterschied zu entdecken.

Der **p-Wert (p-Value, Überschreitungswahrscheinlichkeit)** ist das Ergebnis eines statistischen Signifikanztests. Mit Hilfe eines Signifikanztests kann man apriori formulierte Hypothesen überprüfen. Wie oben beschrieben ist die Nullhypothese die Formulierung der Gleichheit (kein Effekt), die Alternativhypothese die Formulierung eines Unterschieds (Effekts) bezüglich einer interessierenden Fragestellung (sind die Gene differenziell exprimiert?). Aus einer Zufallsstichprobe wird das für die Fragestellung relevante Effektmaß (z. B. der Mittelwert, Median, Differenz zweier Mittelwerte etc.) geschätzt. Durch eine geeignete Normierung dieses Effektmaßes erhält man eine Teststatistik. Beim **t-Test** wird das Effektmaß (Differenz zweier Mittelwerte) auf den Standardfehler dieser Differenz normiert. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass unter der Annahme, die Nullhypothese sei wahr, die Teststatistik den beobachteten oder einen extremeren Wert annimmt.

Vor der Datenerhebung wird eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit festgelegt (Signifikanzniveau α), die den Fehler 1. Art (die Nullhypothese abzulehnen, obwohl sie

richtig ist), begrenzt. Häufig gewählte Niveaus sind $\alpha = 0,05$ und $\alpha = 0,01$. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 verwendet.

Der p-Wert ist das Ergebnis eines Signifikanztests zur Prüfung einer vorab aufgestellten (Null)-Hypothese. Ist der p-Wert kleiner als das, ebenfalls vorab gewählte Irrtums-(Signifikanz-)Niveau α , dann gilt das Ergebnis als statistisch signifikant.

Der exakte Fisher-Test (Expressionist Application Note, **Fisher’s Exact Test**)

Der Exakte Fisher-Test ist ein Signifikanztest auf Unabhängigkeit in der Kontingenztafel, welcher auch bei einer geringen Anzahl von Beobachtungen zuverlässige Resultate liefert. Er geht auf den britischen Statistiker Ronal Aylmer Fisher (1890-1962) zurück. Dieser Test kann verwendet werden, wenn man eine 2 x 2 Kreuztabelle vorliegen hat, bei der die Beobachtung (Zellhäufigkeit) sehr gering ist. Fragestellungen wie: Gehören die identifizierten Gene zu einer bestimmten GO (Gene ontology) Kategorie? Wie signifikant ist die Hypothese, dass die regulierten Gene und eine bestimmte GO Kategorie korreliert sind?

So werden z.B. 2000 Gene bezüglich zweier Behandlungen untersucht und 198 Gene sind reguliert. Von diesen Genen gehören 8 Gene zur GO Kategorie „DNA Bindung“, einer Kategorie die insgesamt 42 Gene enthält. Die Frage ist, ob das auftreten dieser 8 Gene in der GO Kategorie „DNA-Bindung“ reiner Zufall oder signifikant ist. Dieses Problem wird in einer Kontingenztafel dargestellt (Abb. 2-3). Mit der Annahme, dass regulierte und unregulierte Gene nicht mit der GO Kategorie „DNA Bindung“ korreliert sind (Nullhypothese), ist der erwartete Wert für die Anzahl an regulierten Genen in der Kategorie „DNA-Bindung“: $(198/2000) \times 42 = 4,16$. Die beobachteten 8 regulierten Genen der Kategorie „DNA Bindung“, ist höher als der erwartete Wert und lässt vermuten, dass die regulierten Gene in dieser Kategorie überrepräsentiert sind. Der exakte Fisher Test gibt die Wahrscheinlichkeit wieder, dass 8 oder mehr DNA-Bindungs-Gene durch Zufall dieser Kategorie zugeordnet werden. In dem vorliegenden Fall ist diese Wahrscheinlichkeit 0,049, und wenn man einen Signifikanzwert von 0,05 annimmt, würde man die Nullhypothese verwerfen.

	Regulated	Unregulated	Total
In category <i>DNA binding</i>	8	34	42
Not in category <i>DNA binding</i>	190	1768	1958
Total	198	1802	2000

Abb. 2-3 Kontingenztafel Beispiel für einen Fishers exact Test

3 Ergebnisse

3.1 *Induzierbarkeit des In2.1-Promotors durch verschiedene Substanzen*

Das GUS-Reportergen eignet sich sowohl für einen histochemischen Nachweis als auch eine Quantifizierung der induzierten Reporterexpression. Die Gene *In2.1* und *In2.2* werden in Mais durch substituierte Benzensulfonamid-Safener, als auch Mefenpyr und Isoxadifen, induziert (Hershey and Stoner 1991, unveröffentlichte Ergebnisse, Dr. Klaus Bartsch). *In2.1* wird zur GST-Superfamilie gezählt, besitzt aber keine typische GST Aktivität (McGonigle *et al.* 2000). Der *In2.1*-Promotor wird in *Arabidopsis thaliana* ebenfalls durch die Safener Mefenpyr und Isoxadifen, als auch durch Salizylsäure induziert (Behringer 2006). Salizylsäure ist ein Schlüsselement der systemisch erworbenen Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) und führt nach Akkumulation in der Pflanze, als Antwort auf Pathogenbefall, oder exogener Applikation zur Induktion von *PR*-Genen.

Um die Induzierbarkeit des *In2.1*-Promotors durch Benoxacor, einen weiteren Mais-Safener, zu prüfen wurden Pflanzen einer homozygoten Reporterlinie mit dem Konstrukt $P_{In2.1}:GUS$ verwendet ($P_{In2.1}:GUS\#5$, s. Kapitel 2.2.7.2) und für eine histochemische GUS-Färbung eingesetzt (Abb. 3-1).

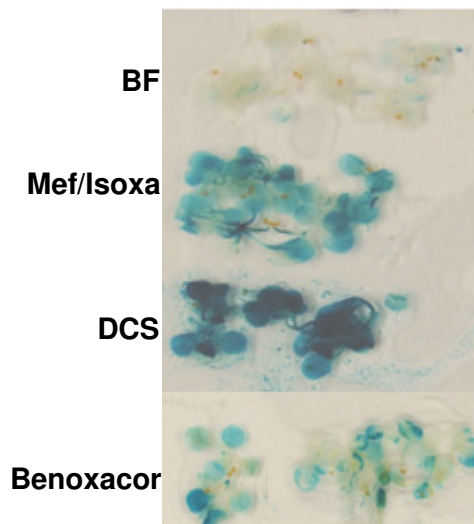


Abb. 3-1 GUS-Aktivität nach Behandlung mit verschiedenen Substanzen

Histochemischer GUS Test mit homozygoten, steril 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultivierten T2- $P_{In2.1}:GUS$ - Pflanzen#5 (Col-0), 2d nach Applikation von Blindformulierung (BF), Mefenpyr/Isoxadifen (Mef/Isoxa: 5 mM/7mM), Dichlorsalicylsäure (DCS: 0,9 mM) und Benoxacor (0,7 mM).

Wie bereits beschrieben (Behringer 2006), ist in den mit Blindformulierung (BF) behandelten Pflanzen eine leichte GUS-Aktivität in den Keimblättern zu erkennen. Pflanzen, welche mit dem Safenermix aus Mefenpyr und Isoxadifen oder mit Dichlorsalizylsäure (als Äquivalent für SA) behandelt wurden, zeigten jedoch eine deutlich induzierbare β -Glucuronidase-Aktivität in allen Gewebetypen. Dichlorsalizylsäure führte hier zu einer erkennbar stärkeren Induktion des GUS-Reportergens im Vergleich zu den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen. Die entsprechenden Induktionsstärken wurden durch einen quantitativen GUS Test bestimmt (Abb. 3-2).

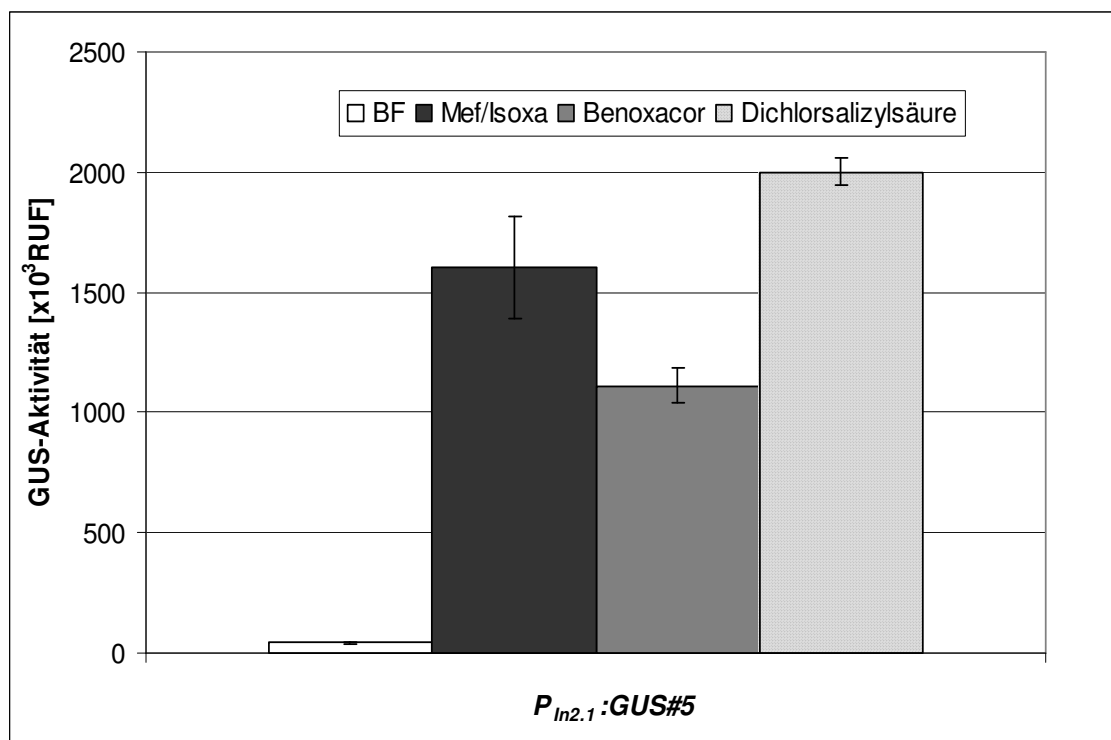


Abb. 3-2 Quantifizierung der Induzierbarkeit des *In2.1*-Promotors durch verschiedene Substanzen

14 Tage alte, steril unter Langtagbedingungen kultivierte Pflänzchen, wurden mit einem Safenermix aus Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa), dem Safener Benoxacor, Dichlorsalizylsäure (DCS) sowie Blindformulierung (BF) behandelt (2.2.8). Der quantitative GUS Test wurde wie in Kapitel 2.2.9.2 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz (RFU) nach 8 h Inkubation bei 37 °C. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung je einer Probe aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

Die höchste Reporterexpression wird, wie bereits aufgrund des histochemischen GUS-Versuches vermutet, durch exogene Applikation von DCS erreicht.

3.2 Cis aktive Elemente des *In2.1*-Promotors

3.2.1 Promotor Deletionsanalyse

Um genspezifische Regulationselemente, bzw. Sequenzmotive im *In2.1*-Promotor nachzuweisen, welche die Safenerinduzierbarkeit vermitteln, wurde eine Deletionsanalyse durchgeführt. Die vom 5'-Ende je um 50 bis 100 bp verkürzten Promotordeletionskonstrukte wurden mit dem β -Glucuronidase-Reportergen fusioniert und in transgenen Pflanzen auf die Induzierbarkeit des Reportergens analysiert. Die Herstellung der unterschiedlichen Promotor-Konstrukte ist in Kapitel 2.2.7.2 beschrieben. Als Positivkontrolle dienten homozygote Linien mit dem unverkürzten Promotor (-790; $P_{In2.1}$:GUS #3, #5), als Negativkontrolle Pflanzen mit GUS-Reportergen ohne Promotor (Linien pBin19:GUS#1, #3). Für diesen Versuch wurden acht Promotorverkürzungen hergestellt: $P_{In2.1-A2}$:GUS:GUS (-720 bp); $P_{In2.1-A3}$:GUS (-600 bp); $P_{In2.1-A4}$:GUS (-505 bp); $P_{In2.1-A5}$:GUS (-416 bp); $P_{In2.1-A6}$:GUS (-315 bp); $P_{In2.1-A7}$:GUS (-241 bp); $P_{In2.1-A8}$:GUS (-185 bp); $P_{In2.1-A9}$:GUS (-130 bp) (s. auch Abb. 3-5 b)).

Die entsprechenden Deletionskonstrukte wurden über Agrobakterium vermittelte Transformation (Kapitel 2.2.5) stabil in das *A. thaliana* Genom integriert. Die Transformation des -600 $P_{In2.1-A3}$:GUS -Konstruktes war nicht erfolgreich, für alle anderen Konstrukte konnten jeweils 2-3 homozygote Linien selektiert werden.

Die Induzierbarkeit des GUS-Reportergens durch Mefenpyr und Isoxadifen im Vergleich zur Blindformulierung wurde in den transgenen Linien quantifiziert. Die Induzierbarkeit der Reporterexpression war für den vollständigen *In2.1*-Promotor am höchsten (s. Abb. 3-3). Die Safenerinduzierbarkeit des um 100 bp verkürzten -720 $P_{In2.1-A2}$:GUS -Promotors (Linien #2, #7 und #10) war im Durchschnitt 1,8-fach reduziert. Proteinextrakte der Pflanzen mit -505 *In2.1-A4*-Promotor (Linien #6 und #10) zeigten nur noch eine geringe Aktivität. Die safenerinduzierte Reporterexpression des -416 *In2.1-A5*-Promotors (Linien #7 und #12) war ähnlich stark wie bei den Linien mit -720 $P_{In2.1-A2}$:GUS Konstrukt (Linien #2, #7 und #10). Eine Verkürzung um weitere 100 bp und mehr (Promotordeletionskonstrukte *In2.1-A6* bis -A9) führte zum Verlust der Safenerinduzierbarkeit des GUS-Reportergens und zu einer relativen Fluoreszenz vergleichbar mit der Negativkontrolle (pBin19:GUS). Wichtige *cis*-regulatorische Motive liegen somit innerhalb des Bereichs von -720 bis -315. Der Verlust der Safenerinduzierbarkeit der -505 Promotordeletion könnte durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche den Zugang von *cis*-Elementen durch bestimmte Transkriptionsfaktoren beeinträchtigen, oder die Deletion wichtiger *cis*-regulatorischer Motive im Bereich -720 bis -505, erklärt werden.

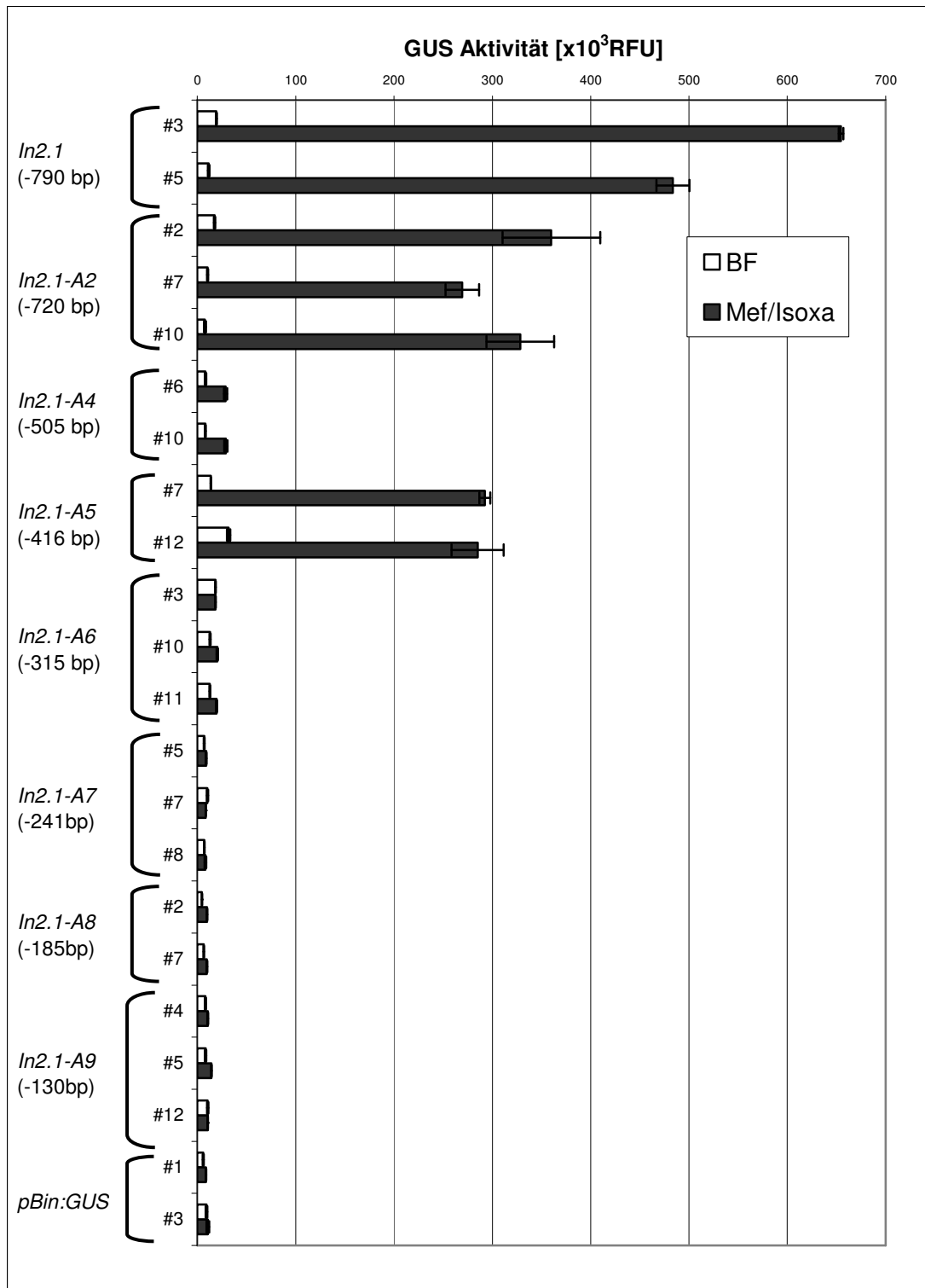


Abb. 3-3 Safenerinduzierte GUS-Aktivität verschiedener Promotor-Deletionskonstrukte

Homozygote T2-Pflanzen wurden 14 Tage steril auf 0,5 MS-Medium unter Langtag Bedingungen angezogen und mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen (Mef/Isoxa) behandelt. Zwei Tage nach dem Applikationsversuch (2.2.8) wurden Proben für einen quantitativen GUS-Test aufgearbeitet (2.2.9.2). Es sind die Namen der Promotor-Deletionskonstrukte (*In2.1-A2* bis *-A9*), die Länge des Promotors in bp (in Klammern) und die Nummern der homozygoten Linien angegeben. Als Positivkontrolle dient der WT- *In2.1*-Promotor (-790 bp), als Negativkontrolle ein Konstrukt ohne Promotor vor dem GUS-Gen (*pBin:GUS*). Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung je einer Probe aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

3.2.2 Datenbanksuche nach cis-aktiven Elementen

Neben der Deletionsanalyse zur Identifizierung wichtiger regulatorischer Promotorbereiche besteht auch die Möglichkeit, durch Abgleich mit in Datenbanken gespeicherten bekannten *cis*-Motiven, nach putativen regulatorischen Sequenzen zu suchen. Es wird vermutet, dass sich solche Elemente auf dem *In2.1-A5*-Promotor befinden könnten (s. Kapitel 3.2.1). Mit der Datenbank „PLACE“ - einer Datenbank von Pflanzen *cis*-wirkenden regulatorischen DNA Elementen (2.2.1) wurde der *In2.1*-Promotor und im Besonderen die ersten 100 bp des *In2.1-A5-Promotors* (-416 bis -315) nach homologen Sequenzabschnitten zu bekannten *cis*-aktiven Elementen durchsucht. Die höchste Sequenzähnlichkeit wurde zu einem 26 bp *ocs*-Element gefunden, welches im Promotor der *Arabidopsis* Glutathion-S-Transferase *AtGSTF8* enthalten ist. Der Sequenzabschnitt beginnt im *In2.1*-Promotor bei -406 (s. Abb. 3-4) und stimmt in 18 von 26 bp mit der Sequenz des *ocs*-Elements aus dem *AtGSTF8* Promotor („OBF5ATGST6“; Chen *et al.* 1996, Kang and Singh 2000, Zhang *et al.* 1993, Zhang *et al.* 1995) überein. Das *ocs*-Element wurde zuerst im Promotor der Octopinsynthese (*ocs*; T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*) identifiziert, wo es als 16 bp Palindrom vorkommt.

Dieser Sequenzabschnitt des *In2.1*-Promotors weist auch Sequenzähnlichkeit zur sogenannten activation-sequence 1 (*as-1*) des 35S-Promotors (-85 bis -58) aus dem Blumenkohlmosaikvirus („As1CAMV“, Cauli flower Mosaic Virus; Lam *et al.* 1989, Benfey and Chua 1990, s. Abb. 3-5) auf. Als *as-1*-Element werden die beiden TGAC Palindrome mit konserviertem Abstand bezeichnet, die sich innerhalb der 26 bp langen *ocs*-Sequenz befinden (s. Abb. 3-4 und Abb. 3-5a).

Ähnlichkeiten zu *ocs*-Elementen anderer Spezies können in einem weiteren *In2.1*-Promotorbereich (-321 bis -306) gefunden werden (s. Abb. 3-4). Diese Sequenz liegt am Ende des *In2.1-A5*-Promotorfragmentes und geht in die ersten 10 bp des *A6*-Promotorbereiches über (s. Abb. 3-5 b). Die Hälfte oder ein Teil dieses Motivs sind jedoch nicht für die Safenerinduzierbarkeit des $P_{In2.1-A6}$:GUS (-315) Konstruktes ausreichend (s. Abb. 3-3, Abb. 3-4). In diesem Sequenzabschnitt können Ähnlichkeiten zu einem *ocs*-Element, welches im Promotor der Soja (*Glycine max*) Glutathion-S-Transferase GH2/4 („OCSGMGH24“; Ulmasov *et al.* 1994, Ulmasov *et al.* 1994) enthalten ist, zu einem *ocs*-Enhancerelement des Ti-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens* („OCSENHANMOTIFAT“; Singh *et al.* 1989, Ulmasov *et al.* 1994, Fromm *et al.* 1989 Tokuhiya *et al.* 1990) und der ASF1-Bindungs Stelle der Nopalin Synthase („ASF1ATNOS“; Lam *et al.* 1990, Kim *et al.* 1994) auf dem Ti-Plasmid von *A.*

tumefaciens gefunden werden. Das als salizylsäureresponsive Element „SARECAMV“ bezeichnete Motiv, ist ein Teil der CaMV 35S-Promotor-Sequenz (Qin *et al.* 1994; s.o.).

a) -406 ocs-Element	
<i>In2.1</i>-Promotor	-406 CAGTT A GGTCATAGATG A CG A CG A CG -381
ocs-Element <i>AtGSTF8</i>	ATCTT A TGTC A TTGATG A CG A CGCTCC -400
„OBF5ATGST6“	-426 -400
b)	
<i>In2.1</i>-Promotor	-407 GC A GT A GGTCATAGATG A CG- A CG A CGT -380
<i>As1</i>CAMV 35S-Promotor	CC A CTG A CGT A AGGGATG A CG C ACA A TCC -58
„AS1CamV“	-85
<i>In2.1</i>-Promotor	-323 TG A CAC A ATCGATT A CGTCA -304
<i>As1</i>CAMV 35S-Promotor	TG A CGT A AGGGATG A CG C AC -62
„AS1CamV“	-81
c)	
<i>In2.1</i>-Promotor	-416 TG A CTTC A GC A GT A GGTC A T -395
<i>nos</i> Promotor	TG A GCT A AG C AC A T A CGT C AG -111
„ASF1 ATNOS“	-131
d) -327 ocs-Element	
<i>In2.1</i>-Promotor	-327 AAGATG A CAC A ATCGATT A CGT C A -304
ocs-Element <i>GmGH2/4</i>	CGGTT T ACGT A ATCTCTT A CAT C A
„OCSGMGH24“	
e)	
<i>In2.1</i>-Promotor	-321 A CAC A ATCGATT A CGT -306
ocs-Promotorsequenz	A CGT A AGCGCTT A CGT -177
„OCSENHANMOTIFAT“	-192

Abb. 3-4 Vergleich cis-regulatorischer Elemente des *In2.1* Promotors. Die Sequenzen der homologen *cis*-Motive wurden über die Datenbank „PLACE“ gefunden. Die größte Sequenzähnlichkeit besteht zum *ocs*-Element des *AtGSTF8* Promotors einer *Arabidopsis* GST (a). Es werden ebenfalls Ähnlichkeiten mit dem *as-1*-Element des CaMV 35S-Promotors (b), dem *ocs*-Element des Nopalinsynthase-Promotors (c), einem *ocs*-Element der Soja GST *GmGH2/4* (d) und dem *ocs*-Element des Ti-Plasmids aus *A.tumefaciens* (e) festgestellt, die Sequenzübereinstimmungen sind fett markiert.

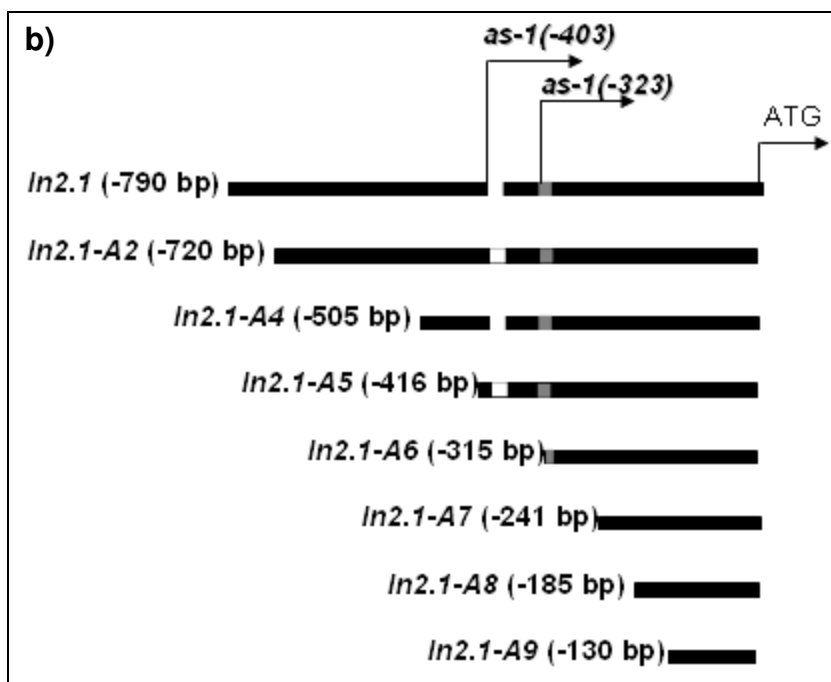
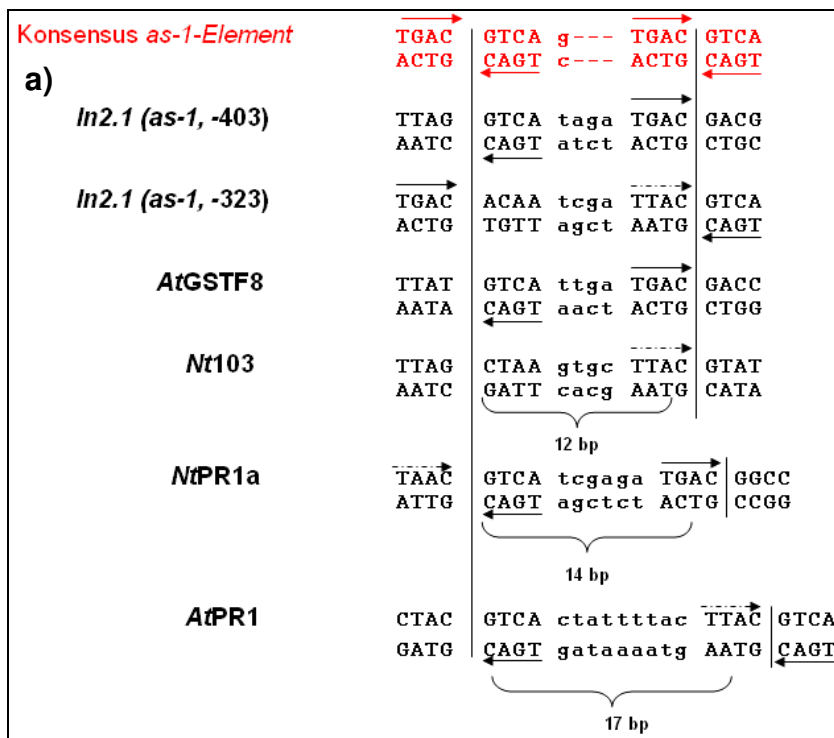


Abb. 3-5 a) Alignment der *as-1*-Element Konsensussequenz mit verschiedenen Pflanzen-Promotoren Die TGAC-Halbseiten der 8 bp Palindrome sind durch Pfeile, TGAC-Motive die eine Mutation beinhalten sind durch unterbrochene Pfeile markiert. Die Zentren der Palindrome werden durch vertikale Linien gekennzeichnet. Dargestellt sind die beiden *In2.1*-Promotor *as-1*-ähnlichen-Elemente (-403 und -323) neben den *Arabidopsis as-1*-Elementen der Promotoren des *AtGSTF8*- und *PR1*-Gens, als auch der *as-1*-Elemente aus den Tabak-Promotoren der *GST Nt103* und dem *PR1a*-Gen

Abb. 3-5 b) Lage der *as-1*-Elemente im *In2.1*-Promotor Dargestellt sind die verschiedenen Promotor-Deletionskonstrukte (A2 – A9) und die Lage der identifizierten *as-1*-Elemente des *In2.1*-Promotors

Krawczyk *et al.* 2002 konnten durch die Analyse von *as-1*-ähnlichen Elementen eine „Konsensus-*as-1*-ähnlichen-Sequenz“ von 20 bp identifizieren, die zwei imperfekte Palindrome enthält, welche durch eine konservierte Distanz von 12 bp getrennt sind (Abstand zwischen den Mitten der beiden TGAC – Palindromen: **TGACGTCAⁿnnnTGACGTCA**, s. Abb. 3-5a).

Die *ocs*-ähnlichen Elemente des *In2.1*-Promotors im Sequenzbereich -406 bis -380 bp und -327 bis -304 bp haben große Ähnlichkeit mit der *as-1*-Konsensussequenz. Die enthaltenen TGAC-Palindrome haben ebenfalls den charakteristischen 12 bp-Abstand (s. Abb. 3-5a).

Transgene Pflanzen mit dem -505 $P_{In2.1-A4}$:GUS Konstrukt (Abb. 4.5) zeigten nach Safenerapplikation keine Reporter-gen-Induktion mehr. Die Suche nach *cis*-aktiven Elementen in dieser Promotorsequenz, innerhalb der *In2.1*-A2 bis -A4 Promotorsequenz, ergab jedoch nur einen Treffer. Es wurde eine Sequenzähnlichkeit zu einer WRKY-Faktor Bindungsstelle (TTGAC) im (-)-Strang bei -683, welche im *Arabidopsis* NPR1 Promotor als Wiederholung +70 und +79 enthalten ist („WBOXATNPR1“; Yu *et al.* 2001), gefunden. Da hier nur eine Wiederholung dieser Sequenz weit entfernt vom Translationsstart gefunden wurde, ist die Relevanz für die Safenerinduzierbarkeit nicht eindeutig zu beurteilen. Die geringe Induzierbarkeit dieses Konstruktes könnte auch durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen entstehen.

3.2.3 Induzierbarkeit des *In2.1*Δ*ocs*-Promotors

Mit Hilfe der Promotor Deletionskonstrukte und der Datenbanksuche nach *cis*-regulatorischen Motiven konnten zwei *ocs*- bzw. *as-1*-ähnlichen Elementen im *In2.1*-Promotor Sequenzbereich von -406 bis -304 bp gefunden werden. Eine Deletion dieser 100 bp führte zum Verlust der Safenerinduzierbarkeit. Wegen der großen Ähnlichkeit des ersten dieser *ocs*-Elemente (-406), zu einem *ocs*-Element des *Arabidopsis AtGSTF8* Promotors, wurde die Relevanz dieses *cis*-Motives durch Deletion der entsprechenden 20 bp (-406 bis -381, s. Abb. 3-6) für die Safenerinduktion überprüft (s. Kapitel 2.2.7.3).

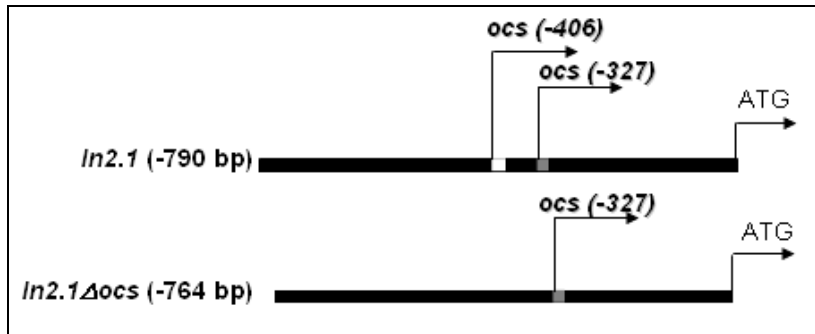


Abb. 3-6 Schematische Darstellung des WT-Promotors und *In2.1Δocs*-Promotors

Der im oberen Teil abgebildete -790 bp WT-Promotor (*In2.1*) enthält beide *ocs*-Elemente, während im *In2.1Δocs*-Promotor das zum *AtGSTF8*-Promotor homologe *ocs*-Element (-406) deletiert wurde.

Der so konstruierte *In2.1Δocs*-Promotor (s. Abb. 3-6) wurde fusioniert mit dem GUS-Reporter gen stabil in das *A. thaliana* Genom integriert (Kapitel 2.2.4, 2.2.5).

Es wurden 2 homozygote Linien (#4 und #5) mit dem $P_{In2.1Δocs}$:GUS Konstrukt selektiert. Da sich diese beiden Linien stark in ihrer Safenerinduzierbarkeit unterschieden, wurden zusätzlich 3 heterozygote Linien (#1, #2, #3) histochemisch und quantitativ (s. Abb. 3-7 und Abb. 3-8) auf die safenerinduzierte Expression der β -Glucuronidase untersucht. Alle verwendeten Pflanzenlinien wurden über die Präparation von genomischer DNA (s. Kapitel 2.2.6.1) und Sequenzierung der *In2.1*-Promotorsequenz auf die Deletion des -406 *ocs*-Elements überprüft. In Abb. 3-7 sind die histochemischen GUS-Färbungen der verschiedenen Linien im Vergleich zu einer homozygoten Linie mit WT *In2.1*-Promotor dargestellt. Die Deletion des -406 *ocs*-Elements führt zu keiner gewebespezifisch veränderten Expression des Reportergens nach Safenerapplikation. Ebenfalls ist kaum ein Unterschied zwischen Pflanzen mit WT Promotor und solchen mit *In2.1Δocs*-Promotor erkennbar.

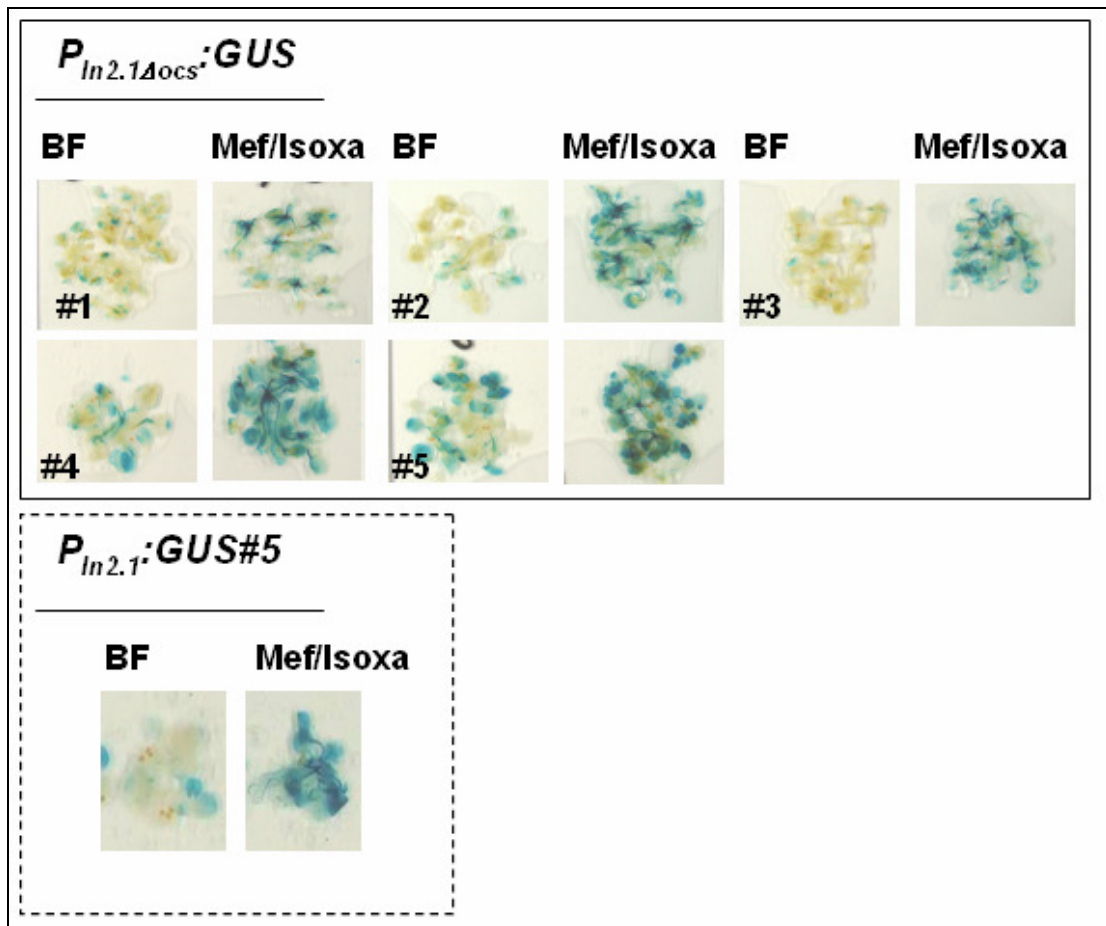


Abb. 3-7 Promotoraktivität des WT-*In2.1*-Promotors und des *In2.1Δocs* Promotors

Dargestellt ist der histochemische GUS-Test von 3 heterozygoten ($P_{In2.1\Delta ocs}:GUS\#1,2,3$) und 2 homozygoten ($P_{In2.1\Delta ocs}:GUS\#4,5$) Linien mit dem deletiertem -406 *ocs*-Element im Vergleich zu Pflanzen mit WT-Promotor ($P_{In2}:GUS\#5$). Die Pflanzen wurden steril unter Langtagbedingungen für 2 Wochen auf 0,5 MS Medium angezogen. 2 Tage nach der Behandlung mit Blindformulierung (BF) und den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) wurden pro Linie 5-8 Pflänzchen für einen histochemischen GUS-Test verwendet.

Durch die Quantifizierung der Reporterogenaktivität nach Safenerbehandlung konnte jedoch ein Unterschied zwischen den verschiedenen Promotorkonstrukten festgestellt werden (Abb. 3-8). Die safenerinduzierte GUS-Aktivität in homozygoten Pflanzen mit *In2.1Δocs*-Promotor der Linie #4, als auch der drei heterozygoten Linien #1, #2 und #3 ist deutlich geringer als in Pflanzen mit WT-Promotor. Die Aktivität ist, verglichen mit Pflanzen der WT-Promotor Linie #5, um etwa 60 % reduziert. Eine Ausnahme bilden Pflanzen der homozygoten *In2.1Δocs*:GUS-Linie #5. In den entsprechenden Extrakten konnte nach Safenerbehandlung eine ebenso hohe Reporterogenaktivität nachgewiesen werden, wie bei Pflanzen mit WT-Promotor. Es kann jedoch vermutet werden, dass dies auf einem sogenannten Positionseffekt beruht. Hierbei beeinflussen benachbarte Gene bzw. Promotoren die Expression des Reportergens.

Offensichtlich führt die Deletion des -406 *ocs*-ähnlichen Elements zu einer Reduktion aber nicht zum Verlust der Safenerinduzierbarkeit der *In2.1*-Promotoraktivität.

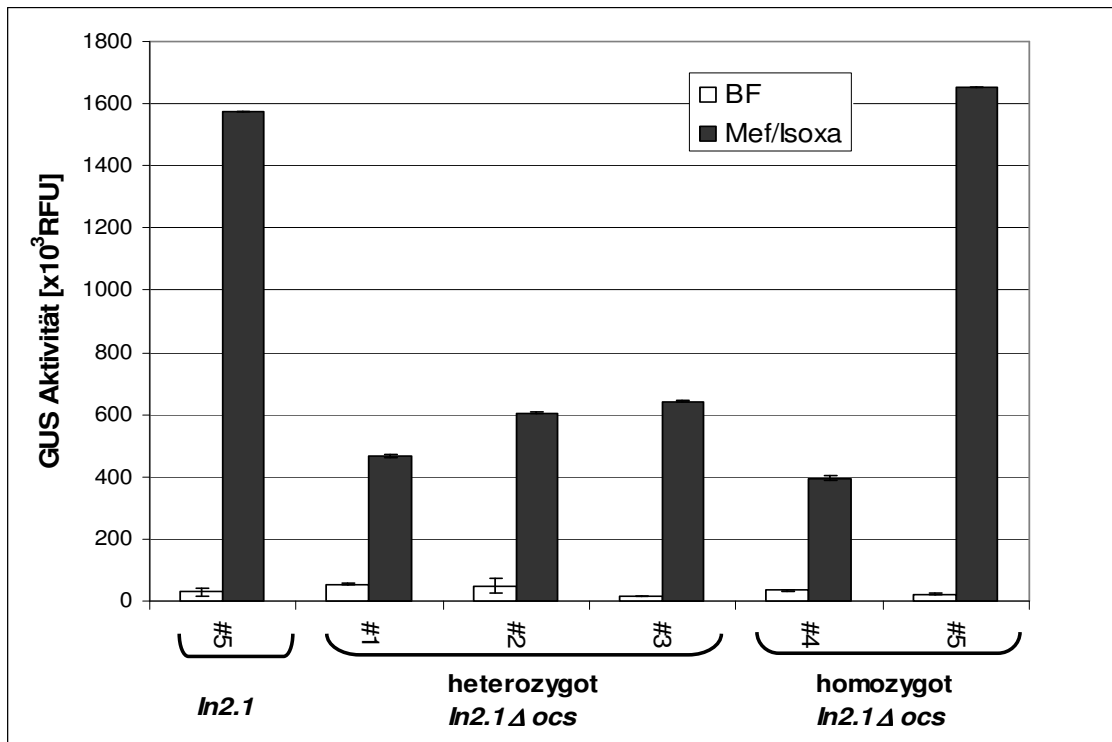


Abb. 3-8 Promotoraktivität des WT-*In2.1*-Promotors und des *In2.1Δocs* Promotors

Quantifizierung der relativen Reporterexpression nach Behandlung mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) 2 Tage nach Applikation (2.2.8). Für diesen Versuch wurden homozygote Pflanzen mit WT *In2.1*-Promotor $P_{In2.1}$:GUS #5 und deletiertem *ocs*-Element *In2.1Δocs*:GUS#4,5 als auch heterozygote Pflanzen mit *In2.1Δocs*-Konstrukt (#1-3) verwendet. Proben für einen quantitativen GUS-Test wurden nach den Angaben in Kapitel 2.2.9.2 aufgearbeitet und gemessen. Dargestellt ist die relative Fluoreszenz (RFU) der Proteinhextrakte nach 8 h Inkubation bei 37°C. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung je einer Probe aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

3.2.4 Minimalpromoter mit *ocs* Element

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben, scheinen *ocs*-ähnliche Sequenzen wichtig für die volle *In2.1*-Promotoraktivität zu sein. Um die Bedeutung des – 406 *ocs*-ähnlichen Elements für die Safenerinduzierbarkeit zu belegen, wurde ein Konstrukt mit einer Tandemwiederholung dieses Elements, fusioniert mit einem Minimalpromotor (–130 *In2.1*-A9-Promotor) hergestellt (in Anlehnung an Chen und Singh 1999).

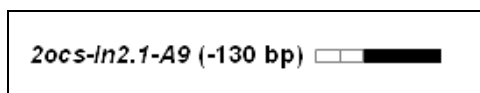


Abb. 3-9 Darstellung des $P_{2-ocs-In2.1-A9}$:GUS Konstruktes

Dieser Promotor besteht aus einer Tandem-Wiederholung des -406 *ocs*-Elements und dem -130 *In2.1*-A9-Minimalpromotor; s. auch Abb. 3-5 b) und Abb. 3-6

Der entsprechende *2ocs-In2.1*-A9-Promotor (s. Abb. 3-9) wurde als synthetisches Gen bei Eurofins MWG Operon in Auftrag gegeben und schließlich fusioniert mit dem GUS-

Reportergen über Agrobakterium vermittelte Transformation stabil in das *Arabidopsis* Genom integriert. In T1-Pflanzen konnte weder nach Safener- noch nach Salizylsäurebehandlung eine Expression des Reportergens nachgewiesen werden (Abb. 3-10). Es wäre möglich, dass das gewählte *ocs*-Element nicht für die Safener- und Salizylsäureinduzierbarkeit verantwortlich ist, oder dass der gewählte Minimalpromotor nicht funktionell ist.

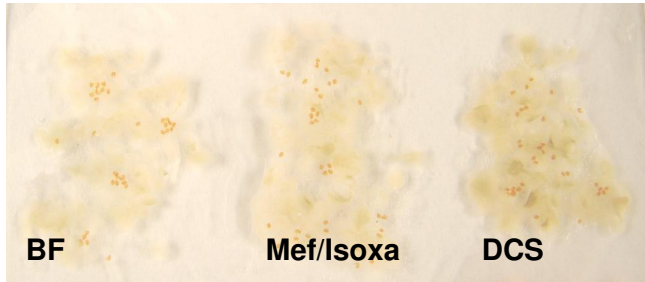


Abb. 3-10 GUS-Reportergenaktivität in Pflanzen mit *2ocs-A9:GUS*-Konstrukt

Homo und heterozygote- T1-Pflanzen wurden 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert und 2 d nach der Behandlung mit Blindformulierung (BF), Safenern (Mef/Isoxa) und Dichlorsalizylsäure (DCS) einer histochemischen GUS-Färbung unterzogen.

3.3 Regulation des *In2.1*-Promotors durch TGA-Transkriptionsfaktoren

3.3.1 Bindung von TGA2/5 an den *In2.1*-Promotor

Regulatorische Sequenzen die mit dem *as-1*-Element verwandt sind, wie zum Beispiel das *ocs*-Element, können in einer Vielzahl von stressresponsiven Pflanzenpromotoren, und dem *PR-1*-Genpromotor (*Pathogenesis related-1*) in *Arabidopsis* gefunden werden (Lebel *et al.* 1998). Die Aktivierung von *as-1*- bzw. *ocs*-Elementen benötigt die Bindung von *ocs*-Element-Bindungsfaktoren (*ocs*-element binding factors (OBF)) bzw. TGA-Transkriptionsfaktoren. Diese gehören zu einer spezifischen Klasse hochkonservierter bZIP Transkriptionsfaktoren. Für die pathogenvermittelte Induktion des *as-1*-Elements des *PR1*-Promotors wird das Signalmolekül Salizylsäure, einer der Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 oder TGA6 (redundante Klasse II *as-1* Bindeproteine; Zhang *et al.* 2003) und das TGA-Faktor interagierende Ankyrin-Repeat Protein NPR1 (NONEXPRESSOR OF *PR* genes) benötigt (Cao *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1997).

Die Induktion des *Arabidopsis AtGSTF8*-Promotors, welcher ein *ocs*-Element enthält, das zu dem im *In2.1*-Promotor gefundenen ähnlich ist, wurde als NPR1-unabhängig beschrieben (Uquillas *et al.* 2004, Blanco *et al.* 2005). Dieses *ocs*-Element besitzt Bindungsstellen für OBF4 (oder TGA4) und OBF5 (TGA5). Beide Faktoren können an

das *ocs*-Element binden, wobei OBF5/TGA5 effizienter an beide Hälften des *ocs*-Elements gleichzeitig binden kann (Zhang *et al.* 1993). OBF5 hat große Ähnlichkeit zum Mais OBF3.1 Protein (Zhang, Foley, Singh 1993). Eine Untersuchung des OBF3.1-Proteins konnte zeigen, dass dieses 8-mal effizienter, als beispielsweise TGA1a aus Tabak, an beide Hälften eines *ocs*-Elements binden kann (Foley *et al.* 1993). Es ist ebenfalls nachgewiesen, dass TGA2 *in vivo* an *as-1*-Elemente bindet (Fode *et al.* 2008).

Um zu überprüfen ob die TGA-Faktoren TGA2 und/oder TGA5 ebenfalls an das -405 *ocs*- und das innerhalb dieser 26 bp liegende *as-1*-Element des *In2.1*-Promotors binden, wurde ein Chromatin Immunpräzipitations (ChIP) Experiment durchgeführt. Mit dieser Methode lassen sich *in vivo* an eine bestimmte DNA-Sequenz gebundene Transkriptionsfaktoren nachweisen. Hierfür wurden zunächst Blätter von 5 Wochen alten *Arabidopsis* Pflänzchen mit Formaldehyd behandelt um promotorassoziierte Proteine an die DNA zu binden. Nach der Isolation und dem Scheren des Chromatins, erfolgte zunächst eine Fällung mit Präimmunserum (Inputkontrollen). Die Protein-DNA Komplexe wurden aus diesen Proben schließlich spezifisch, mit Antiserum gegen die Transkriptionsfaktoren TGA2/5, immunopräzipitiert. Die präzipitierten DNA Fragmente wurden nach der Aufreinigung mit Hilfe einer quantitativen real-time PCR mit Primern analysiert, welche die *In2.1*-Promotorsequenz des -406 *ocs*-Fragments flankierten. Das zweite im *In2.1*-Promotor enthaltene *ocs*-ähnliche Element bei -323 wurde somit von dieser Untersuchung ausgeschlossen. Die Menge an PCR Produkt ist repräsentativ für die Menge an Protein, die zum Zeitpunkt der Blatternte an die DNA gebunden war. Um eine mögliche Bindung der TGA Faktoren 2 und/oder 5 an den *In2.1*-Promotor zu untersuchen, wurde das ChIP-Experiment mit Pflanzen der homozygoten Linie *P_{In2.1}:GUS #2-4* (Behringer 2006) und Wildtyppflanzen durchgeführt.

Der Versuche wurde im Labor von Prof. C. Gatz in Göttingen, in Zusammenarbeit mit Dr. B. Fode durchgeführt (2.2.10). Als Positivkontrolle für die Bindung von TGA2/5 diente ein Sequenzabschnitt des Promotors einer Cytochrom P450 Monooxygenase (Cyp81D11; Fode 2008), als Negativkontrolle wurde eine Aldoketoreduktase Promotorsequenz verwendet, welche keine TGA-Bindungsstelle enthält (7.1). Die Ergebnisse der quantitativen real time PCR sind in Tab. 3-1 dargestellt.

Tab. 3-1 Ergebnisse der quantitativen real-time PCR mit Promotor-spezifischen Primern

Es sind die C(t) – Werte der für die Immunopräzipitation mit α tga2,5-Serum verwendeten Chromatin-Proben (oben), als auch der Inputkontrollen dargestellt. Es wird ebenfalls das in Abb. 3-11 dargestellte Verhältnis der C(t)-Werte von spezifischem Promotor C(t) zu unspezifischem Actin C(t) aufgeführt.

α tga2,5	C(t)							
	Actin	Cyp81 [$\frac{Cyp81}{Actin}$]		In2.1 [$\frac{In2.1}{Actin}$]		AldoKeto [$\frac{AldoKeto}{Actin}$]		
WT, BF	26,1	24,0	0,9	29,9	1,1	27,6	1,1	
WT, Mef/Isoxa	32,0	29,6	0,9	33,0	1,0	33,9	1,1	
$P_{In2.1}:GUS\#2-4$, BF	24,5	22,7	0,9	17,6	0,7	25,8	1,1	
$P_{In2.1}:GUS\#2-4$, Mef/Isoxa	26,0	23,8	0,9	19,0	0,7	27,1	1,0	
Inputkontrollen	C(t)							
	Actin	Cyp81 [$\frac{Cyp81}{Actin}$]		In2.1 [$\frac{In2.1}{Actin}$]		AldoKeto [$\frac{AldoKeto}{Actin}$]		
WT, BF	21,9	24,8	1,1	29,1	1,3	23,7	1,1	
WT, Mef/Isoxa	22,2	25,2	1,1	28,8	1,3	24,1	1,1	
$P_{In2.1}:GUS\#2-4$, BF	31,3	33,5	1,1	27,5	0,9	32,7	1,0	
$P_{In2.1}:GUS\#2-4$, Mef/Isoxa	23,9	27,4	1,1	19,9	0,8	26,0	1,1	

Die Abb. 3-11 stellt das Verhältnis zwischen dem präzipitierten jeweiligen Promotorfragment und unspezifisch präzipitierter *Actin8*-DNA dar. Die Normalisierung auf Actin wurde gewählt, da ein Verlust von Chromatin über die verschiedenen Aufreinigungsschritte nicht ausgeschlossen werden konnte. Die Schwankung der C(t)s für Actin8 (s. Tab. 3-1) bestätigen diese Vermutung. Je kleiner das Verhältnis von Promotor C(t) zu Actin8 C(t), umso größer ist die Menge des spezifisch präzipitierten *In2.1*-Promotors. Eine Bestätigung für die spezifische Bindung der verwendeten Primer an das -406 *ocs*-Element, liefern die ermittelten hohen C(t) Werte der mit BF bzw. Mef/Isoxa behandelten Wildtyp-Pflanzen (Tab. 3-1). Diese Pflanzen enthalten keinen *In2.1*-Promotor.

Die Werte der Inputkontrollen repräsentieren die im Überstand, vor der Zugabe des selektiven Antikörpers, enthaltene Promotor-DNA-Menge der verschiedenen getesteten Gene. Wie man in Abb. 3-11 erkennen kann, wurde das Fragment des Positiv-Kontroll-Promotors der Cytochrom P450 Monooxygenase Cyp81D11, im Vergleich zu den Inputkontrollwerten, durch die Immunopräzipitation mit dem α TGA2,5-Antiserum leicht angereichert. Das Verhältnis der C(t)s des Cyp81D11-Promotors zu Actin liegt für die Inputkontrollen über 1, für die IP-Proben unter 1. Das ChIP-Experiment war somit erfolgreich. Die Anreicherung des Cyp81D11-Promotorfragments kann in WT und $P_{In2.1}:GUS\#2-4$ -Pflanzen sowohl in den BF- als auch den safenerbehandelten Proben nachgewiesen werden. Die Safener Mefenpyr und Isoxadifen induzieren somit keine Rekrutierung der TGA Faktoren TGA2 und/oder TGA5 an den Cytochrom P450 Promotor.

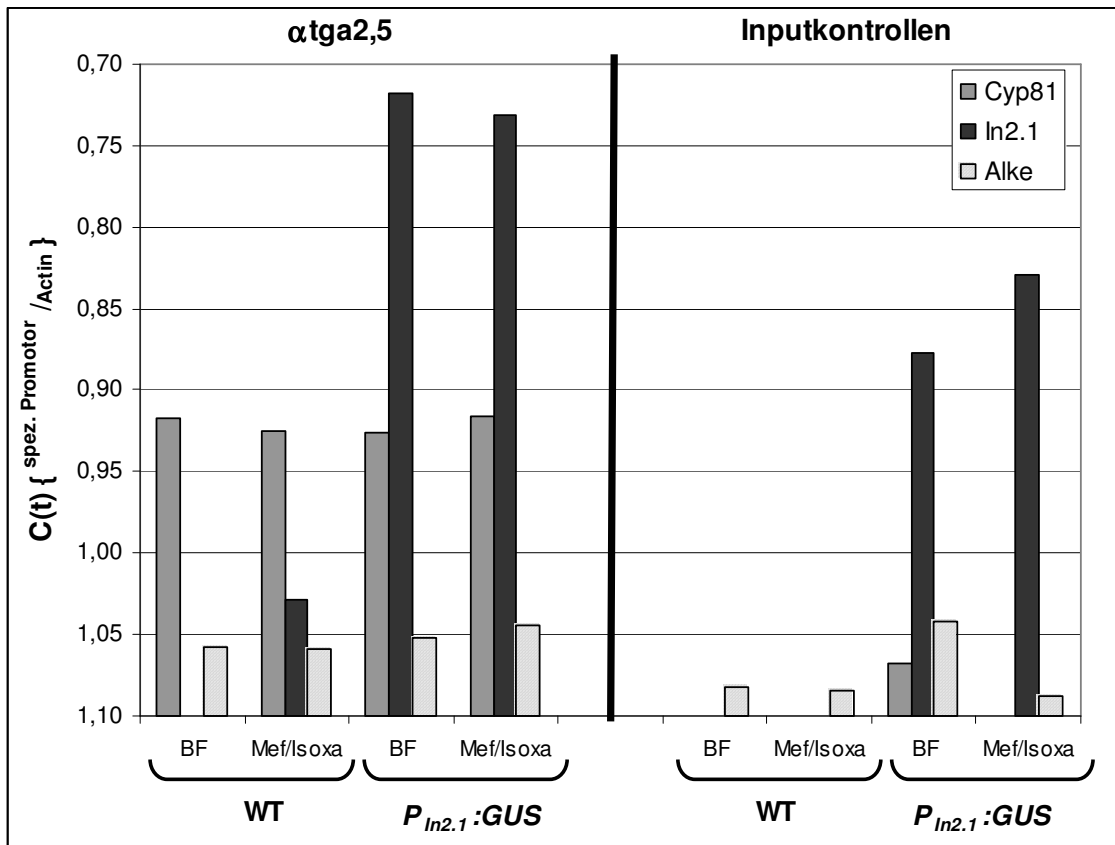


Abb. 3-11 Durch Chromatin Immunopräzipitation nachgewiesene *in vivo* Bindung von TGA Faktoren an die Promotoren von *Cyp81D11* und *In2.1* Homozygote Pflanzen der Linie *P_{In2.1}:GUS* #2-4 und Wildtyp-Pflanzen wurden 4-5 Wochen unter Kurztagbedingungen kultiviert und mit den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen als Mischung (Mef/Isoxa) bzw. Blindformulierung (BF) behandelt. 6 h nach der Behandlung wurden die Proben vor der Chromatinaufarbeitung mit Formaldehyd behandelt. Die Inputkontrollen wurden nach der Fällung mit dem unspezifischen Antiserum aus dem Überstand genommen. Aus diesem Überstand wurde anschließend das Chromatin mit dem spezifischen α TGA2,5 Antiserum immunopräzipitiert. Aus diesem gewonnenen Chromatin wurde nach der Auflösung der Crosslinks mit einer Real time-PCR die Menge an präzipitierter Promotor-DNA bestimmt. In diesem Diagramm ist das Verhältnis der C(t)s von spezifisch präzipitierter Promotor-DNA und unspezifisch präzipitierter *Actin8*-DNA dargestellt. Um die Menge an DNA in allen Präparationen zu normalisieren wurde die $2^{-\Delta C(t)}$ Methode verwendet. Das Verhältnis zwischen spezifischen Promotorfragmenten und dem Rest an *Actin8* DNA (diese "Verunreinigung" sollte für alle Proben die mit demselben Antiserum aufgearbeitet worden sind gleich sein), stellt die Menge an präzipitierter Ziel-Promotor-DNA dar. Ein Wert von 1 bedeutet, dass die C(t)s von *Actin8* und dem entsprechenden Promotorfragment gleich groß waren. Ein Wert unter Eins beruht auf einem niedrigeren Promotor C(t).

Der gewählte Promotorabschnitt der Aldoketoreduktase (*Alke*) wird durch das TGA2,5-Antiserum erwartungsgemäß nicht angereichert, da er kein *as-1*-Element enthält. Das durch die Primer Cla30MP8 und Cla30MP9 flankierte -406 *ocs*-ähnliche Element, wird durch die ChIP in den mit Blindformulierung und mit Safener behandelten Probe präzipitiert. Damit wurde eine Bindung von TGA2/5 an das *ocs*-Element von *In2.1* *in vivo* nachgewiesen. Allerdings konnte auch im Falle des *In2.1*-Promotors keine safenerinduzierte Rekrutierung der untersuchten TGA-Faktoren beobachtet werden, ähnlich wie dies auch für die Cytochrom P450 Monooxygenase (*Cyp81D11*) der Fall war.

3.3.2 Induzierbarkeit des $P_{In2.1}$:GUS-Konstrukts in der *4tga* Mutante

Eine weitere Möglichkeit die Relevanz der TGA-Transkriptionsfaktoren für die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors zu testen ist, neben der ChIP mit einem TGA2,5-Antiserum, die Transformation des $P_{In2.1}$:GUS -Konstruktes in eine TGA-knockout Mutante.

In *Arabidopsis* gibt es 10 TGA Transkriptionsfaktoren (Jakoby *et al.* 2002) von denen 7 (TGA1-TGA7) bezüglich ihrer Interaktion mit NPR1 charakterisiert wurden. Die Klasse II TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2, TGA5 und TGA6) spielen nicht nur eine Rolle für die Induktion des *PR1*-Promotors, sondern auch bei der Induktion von Genen, die zur Detoxifizierung und Stress-Antwort gehören (Mueller *et al.* 2008). Des Weiteren sind sie an der Induktion von NPR1-unabhängig induzierbaren *as-1*-ähnlichen Motiven beteiligt (Fode *et al.* 2008).

Für diesen Versuch wurde eine *Arabidopsis* quadruple Mutante (*4tga*) gewählt, die zusätzlich zum Knockout der drei Klasse II Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und TGA6 noch einen weiteren Knockout für den TGA3 Transkriptionsfaktor der Klasse III besitzt. Die TGA Faktoren TGA2, TGA5 und TGA6 spielen eine essentielle Rolle für die Etablierung der SAR (Zhang *et al.* 2003). Diese Triple Mutante (*tga2/5/6*) hat – im Gegensatz zu *NPR1* – eine erhöhte *PR1*-Hintergrundexpression, diese wurde dem TGA3 Faktor zugeschrieben, da in der *4tga* Mutante (*tga2/3/5/6*) die basale Expression vollständig ausblieb (Kesarwani *et al.* 2007).

Die Transformation der *4tga* Mutante erfolgte mit dem $P_{In2.1}$:GUS -Konstrukt im Vektor pBGW (2.2.7.5) über die Floral Dip Methode (2.2.5). Es wurden 4 homozygote Linien (2.2.5), auf die Safenerinduzierbarkeit des Reportergens untersucht. In Abb. 3-12 sind die Messergebnisse für die relative Fluoreszenz, d.h. der Reporterexpression nach Safenerinduktion, dargestellt. Die Safenerinduzierbarkeit ist durch den Knockout der vier Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA3, TGA5 und TGA6 in 3 Linien reduziert (*4tga* #5, #12 und #31) bzw. verloren gegangen ($P_{In2.1}$:GUS #10). Die GUS-Induktion ist im Wildtyp etwa 36x stärker als in den *4tga* Mutantenlinien #5, #12 und #31. Auffällig ist auch die hohe basale Reporterexpression in den drei TGA-knockout Linien #5, #10 und #31 (Fluoreszenzwerte der entsprechenden BF-Proben sind 2-4 mal höher als im WT). Die vier betroffenen TGA-Transkriptionsfaktoren spielen somit sowohl eine Rolle für die Safenerinduktion des *In2.1*-Promotors in *Arabidopsis thaliana*, als auch für die basale Expression des gekoppelten Reportergens.

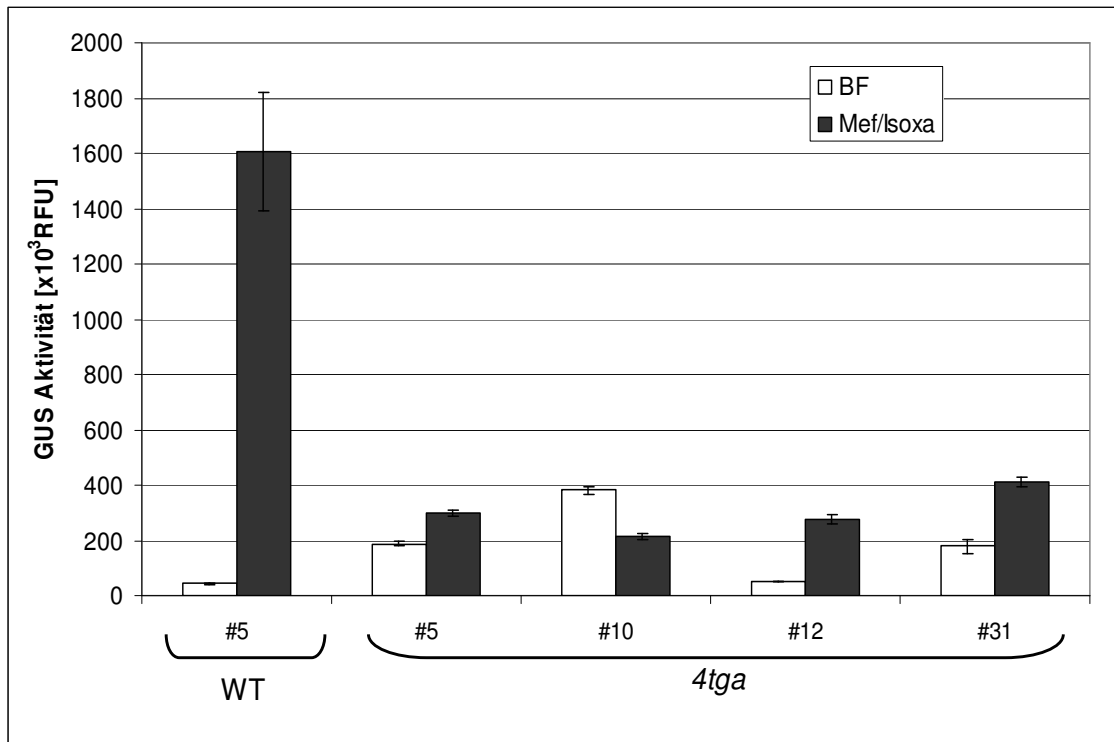


Abb. 3-12 Safenerinduzierbarkeit des In2.1-Promotors in Col0 und 4tga.

2 Wochen alte steril unter Langtag kultivierte Pflanzen, der homozygoten WT-Linie $P_{In2.1}$:GUS #5, als auch der 4 homozygoten Linien $P_{In2.1}$:GUS #5, #10, #12, #31 in der 4tga Mutante (tga2/3/5/6) wurden mit Blindformulierung (BF) oder mit dem Safenermix Mefenpyr/Isoxadifen (Mef/Isoxa) behandelt (2.2.8). Die Proteinrohextrakte für einen quantitativen GUS-Test wurden nach Kapitel 2.2.9.2 aufgearbeitet. Die relative Fluoreszenz der Proteinrohextrakten nach 8 h Inkubation bei 37°C wird dargestellt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus je einem Proteinrohextrakt aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

3.4 Regulation des In2.1-Promotors durch Salizylsäure

3.4.1 Induzierbarkeit des $P_{In2.1}$:GUS-Konstrukts in der NahG und sid2-2 Mutante

Salizylsäure spielt eine wichtige Signalrolle bei der Induktion verschiedener früher und später Gene während der SAR. Unter anderem ist die Akkumulation von Salizylsäure nach einem Pathogenbefall notwendig für die Induktion verschiedenster Abwehr Gene (Maleck *et al.* 2000, Schenk *et al.* 2000). Von diesen Genen sind am besten die *PR*-Gene (pathogenesis related) mit antimikrobieller Wirkung (Van Loon and Van Strien 1999), als auch Proteine mit detoxifizierender Wirkung wie GSTs (Glutathion-S-Transferasen) und GTs (Glucosyltransferasen) charakterisiert. Diese Gene spielen eine wichtige Rolle bei dem Schutz der Zellen vor oxidativem Stress (Edwards *et al.* 2000, Li *et al.* 2001). GSTs und GTs werden durch Multigen-Familien kodiert, und werden durch Pathogeninfektion (Alvarez *et al.* 1998, Horvath *et al.* 1998, Levine 1994, Pontier *et al.* 2001), verschiedene Xenobiotika und Verbindungen die zellulären Stress

auslösen (wie SA, Auxine und H₂O₂; Horvath and Chua 1996, Marrs 1996, Xiang *et al.* 1996), aktiviert.

In *Arabidopsis* führt die exogene Applikation von SA zur Etablierung der SAR und erhöhter Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen. Es wurde vermutet, dass SA über Phenylalanin synthetisiert wird (Mauch-Mani and Slusarenko 1996, Yalpani *et al.* 1993, Coquoz *et al.* 1998, Ribnicky *et al.* 1998, Leon *et al.* 1995), jedoch konnte SA auch nach Inhibierung dieses Syntheseweges noch gebildet werden (Mauch-Mani and Slusarenko 1996). Einige Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* synthetisieren SA mit Hilfe der Isochorismatsynthase (ICS) und Pyruvatlyase (Uknes *et al.* 1995). Über die Klonierung und Charakterisierung von SID2 (Salicylic acid induction deficient), konnte gezeigt werden, dass SA ausgehend von Chorismat mit Hilfe der ICS synthetisiert wird, und dass die so gebildete SA für die LAR und SAR Antwort benötigt wird (Wildermuth *et al.* 2001). Die *Arabidopsis* SA-Biosynthese Mutante *sid2-2* akkumuliert, nach der Inokulation mit einem Pathogen, keine SA und ist empfindlicher gegenüber virulenten und avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* und *Peronospora parasitica* (Nawrath and Métraux 1999). Die Mutante wurde über eine Fast Neutron-Mutagenese gefunden. Diese Mutagenese führt typischer Weise zu Deletionen, die zum Verlust der Transkription des betreffenden Gens führen. Somit konnte in Blättern der *sid2-2* Mutante, die durch den biotrophen Pilz *Erysiphe* infiziert wurden, auch keine Transkripte der Isochorismatsynthase (ICS1) nachgewiesen werden (Wildermuth *et al.* 2001).

Transgene Pflanzen die das *Pseudomonas putida* *NahG*-Gen exprimieren, welches für eine Salizylsäure-Hydroxylase kodiert (konvertiert SA zu Katechol; Yamamoto *et al.* 1965), haben einen sehr geringen internen SA-Level (Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993). Da Salizylsäure für die Expression von PR-Genen und die Etablierung der SAR notwendig ist, sind *NahG*-Pflanzen gegenüber einer Vielzahl von Pilzen, Bakterien, Oomyzeten und viralen Pathogenen besonders anfällig (Kachroo *et al.* 2000, Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993), und haben eine extrem reduzierte Expression von PR-Genen (Delaney *et al.* 1994). Anders als in *NahG*-Pflanzen ist in *sid2-2* Mutanten nur die Expression von *PR1* vermindert, während *PR-2* und *PR-5* nach der Pathogeninfektion immer noch exprimiert werden.

Wie in vorangegangenen Versuchen gezeigt wurde (Kapitel 3.1 und 3.2.2), konnte der safenerinduzierbare *In2.1*-Promotor ebenfalls durch Applikation von Salizylsäure induziert werden. Der Promotor enthält zudem *cis*-aktive Elemente, welche auch in salizylsäureinduzierbaren Gen-Promotoren enthalten, und für deren salizylsäureabhängige Expression relevant sind.

Um die Frage zu klären, ob Salizylsäure ein Signalmolekül des safenerinduzierten Signalweges ist, wurde das $P_{In2.1}$:GUS Konstrukt in die beiden beschriebenen Salizylsäure-defizienten Mutanten transformiert. Die Rolle der Isochorismatsynthase für die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors wurde über die Transformation des $P_{In2.1}$:GUS Konstrukts in die *sid2-2* Mutante überprüft, und die Relevanz des endogenen Salizylsäure Levels für die Safenerinduktion über die Klonierung des Konstrukts in *NahG* Pflanzen. Es konnten 2 für das $P_{In2.1}$:GUS Konstrukt homozygote *sid2-2* Linien und 8 homozygote *NahG* Linien identifiziert werden. Alle Linien wurden über die Präparation von gesamt RNA (2.2.6.6), anschließender cDNA-Synthese (2.2.6.8) und einer PCR (2.2.6.4) auf die Expression des *NahG*-Gens bzw. die Nicht-Expression des *ICS*-Gens überprüft.

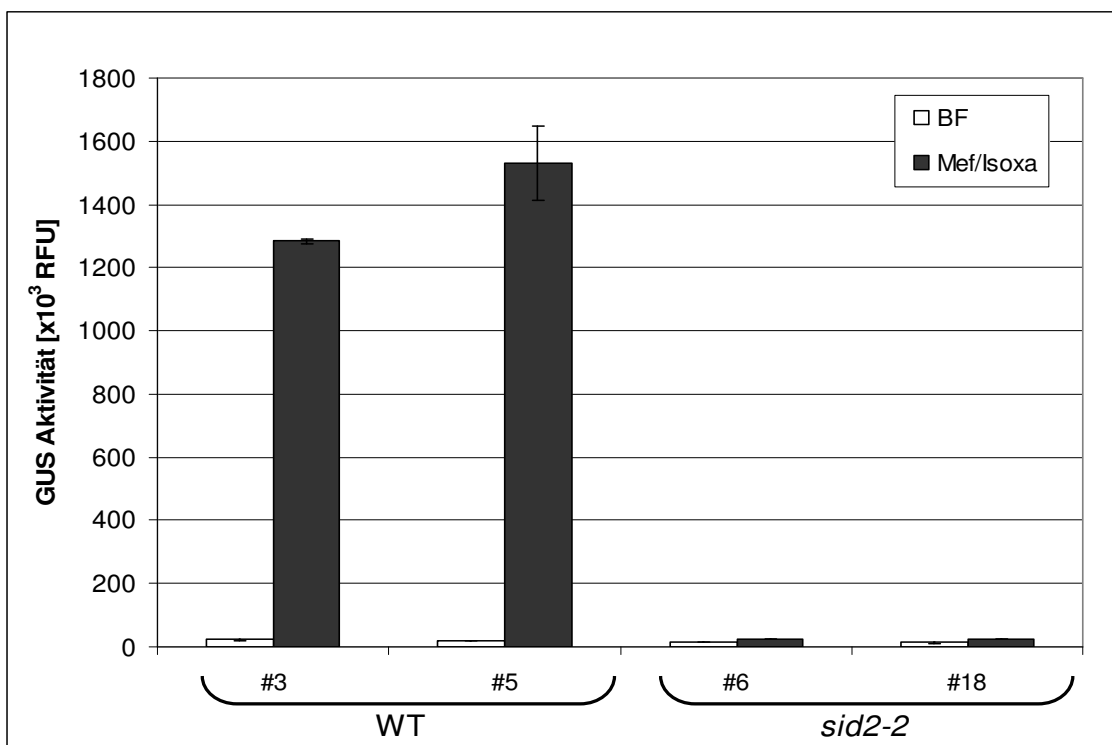


Abb. 3-13 Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in Col0 und *sid2-2*

Pflanzen der homozygoten WT-Linien ($P_{In2.1}$:GUS #3,#5) und homozygoten Reportergermlinien der Salizylsäurebiosynthese Mutante *sid2-2* ($P_{In2.1}$:GUS #6,#18) wurden 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Zwei Tage nach der Applikation von Blindformulierung (BF) oder den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa, s. Kapitel 2.2.8) wurden Proteinrohextrakte für einen quantitativen GUS-Test aufgearbeitet (s. Kapitel 2.2.9.2). Die relative Fluoreszenz nach 8 h Inkubation bei 37°C wird dargestellt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus je einem Proteinrohextrakt aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

Die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors ging in den beiden homozygoten *sid2-2 P_{In2.1}:GUS*-Linien vollständig verloren (Abb. 3-15). Die Mutation der Isochorismatsynthese, und die damit verbundene geringe endogene Salizylsäurekonzentration, haben also einen erheblichen Einfluss auf die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors.

In vier (*P_{In2.1}:GUS* #7, #12, #13, #21), der insgesamt 7 homozygoten *NahG In2.1*-Reportergerenlinien, ist ebenfalls keine Induzierbarkeit des Promotors durch Safener mehr zu beobachten. Drei der untersuchten Linien (*P_{In2.1}:GUS* #4, #15, #17) zeigen jedoch noch eine geringe Reportergereninduktion nach der Applikation von Mefenpyr und Isoxadifen (Abb. 3-14). Es wäre möglich, dass in diesen Linien eine Mutation des *NahG*-Gens vorliegt, welche die Aktivität verringert. Ebenfalls könnte die Expression der Salizylsäurehydroxylase niedriger sein, als bei den anderen Linien, und somit ein höherer endogener SA-Gehalt vorliegen. Offensichtlich hat der geringe SA-Gehalt in den *NahG* –Pflanzen einen negativen Einfluss auf die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors.

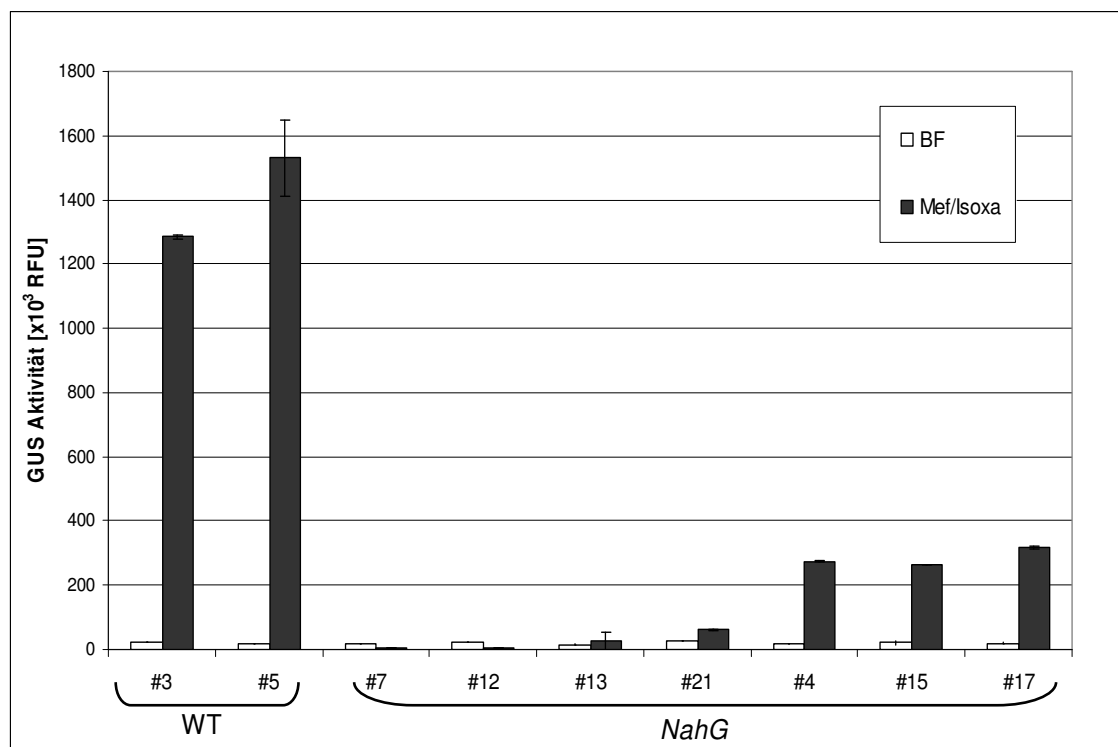


Abb. 3-14 Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in Col0 und *NahG*

Pflanzen der homozygoten WT-Linien (*P_{In2.1}:GUS* #3,#5) und homozygoten *GUS*-Reportergerenlinien in der Salizylsäure Mutante *NahG* (*P_{In2.1}:GUS* #7,#12,#13,#21,#4,#15,#17) wurden 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Zwei Tage nach der Applikation von Blindformulierung (BF) oder den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa, s. Kapitel 2.2.8) wurden Proteinrohextrakte für einen quantitativen *GUS*-Test aufgearbeitet (s. Kapitel 2.2.9.2). Die relative Fluoreszenz nach 8 h Inkubation bei 37°C wird dargestellt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus je einem Proteinrohextrakt aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

3.4.2 Induzierbarkeit des $P_{In2.1}$:GUS-Konstrukts in der *sai1-1* Mutante

Auf der Suche nach Mutanten des Salizylsäure Signaltransduktionsweges wurde von Shah *et al.* (1997) ein genetischer Screen entwickelt, der auf der Induktion des *Agrobacterium tumefaciens tms2*-Gens unter Kontrolle des Tabak *PR1a* Promotors beruht (*Pr1a:tms2*). Salizylsäure induzierbare Expression des *tms2* Genes führt zur Sensitivität der transgenen *Arabidopsis* (No-0) Pflanzen gegenüber α -Naphthalenacetamid (α -NAM; erkennbar durch eine inhibierte Wurzelentwicklung keimender Pflanzen). Nach EMS Mutagenese wurde die α -NAM insensitive *sai1* (*salicylic acid insensitive*) Mutante identifiziert. Diese Mutante exprimiert nach Behandlung mit Salizylsäure weder das *tms2*-Gen noch die endogenen *Arabidopsis* PR-Gene *PR1*, *PR2* oder *PR5*. PR-Gene werden in dieser Mutante auch nach Behandlung mit chemischen Induktoren der SAR, wie z.B. 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) oder Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-thiocarbonsäure S-methylester (BTH), nicht mehr induziert. *Sai1-1* Pflanzen akkumulieren normale SA-Mengen nach Infektion mit einem avirulenten Pathogen. *Sai1* ist allelisch zu *npr1* (Cao *et al.* 1994).

NPR1 ist ein Schlüsselement der SAR und für die Induktion später salizylsäureinduzierter Gene (wie *PR1*) essentiell. Der endogene Salizylsäuregehalt hat direkten Einfluss auf die NPR1-Expression und -Aktivierung. Durch die Akkumulation von Salizylsäure nach Pathogenbefall, wird die *NPR1*-Transkription erhöht, und der Redox-Status der NPR1 Proteine verändert. Diese Veränderung führt zur Spaltung von Disulfidbrücken, der im Zytoplasma vorliegenden inaktiven NPR1-Oligomere. Die aktive, monomere Form von NPR1, interagiert im Nukleus mit *as1*-Element gebundenen TGA-Faktoren und vermittelt die Expression von PR1 (Eulgem 2005).

In den vorangegangenen Kapiteln (Kapitel 3.4.1) konnte gezeigt werden, dass die Safenerinduktion des *In2.1*-Promotors abhängig vom internen Salizylsäuregehalt ist. Es wäre daher möglich, dass NPR1 auch eine Rolle im Safenersignalweg spielt, zumal die am Safenersignalweg beteiligten TGA-Faktoren (Kapitel 3.3) keine Transaktivierungsdomäne besitzen und einen Kofaktor für die Aktivierung der Transkription benötigen. Um die Beteiligung von NPR1 im Safenersignalweg zu testen wurde das $P_{In2.1}$:GUS -Konstrukt im Vektor pBGW (2.2.7.5) über die Floral Dip Methode (2.2.4; 2.2.5) in den No-0 WT und die *sai1-1* Mutante transformiert. 12 T1-Pflanzen wurden unter Langtagbedingungen kultiviert und nach 4 Wochen mit Dichlorsalizylsäure behandelt (2.2.8). 24 h nach der Applikation wurde pro Pflanze 1

Blatt für eine mRNA-Aufarbeitung (2.2.6.6) und GUS-Färbung abgenommen. Mit Hilfe einer RT-PCR wurde die Expression des *tms2*-Selektionsmarkers und *PR1*-Gens überprüft. 5 Pflanzen, welche kein *tms2*- und *PR1*-Gen exprimierten wurden für die weiteren Versuche verwendet. Drei dieser Pflanzen konnten im folgenden als homozygot für das Reporter-gen im *sai1-1* Hintergrund ($P_{In2.1}$:GUS #2, #3, #5, *sai1-1*) bestimmt werden. Die histochemische GUS-Färbung (2.2.9.1) der entsprechenden T1-Pflanzen nach DCS-Behandlung ist in Abb. 3-15 dargestellt.

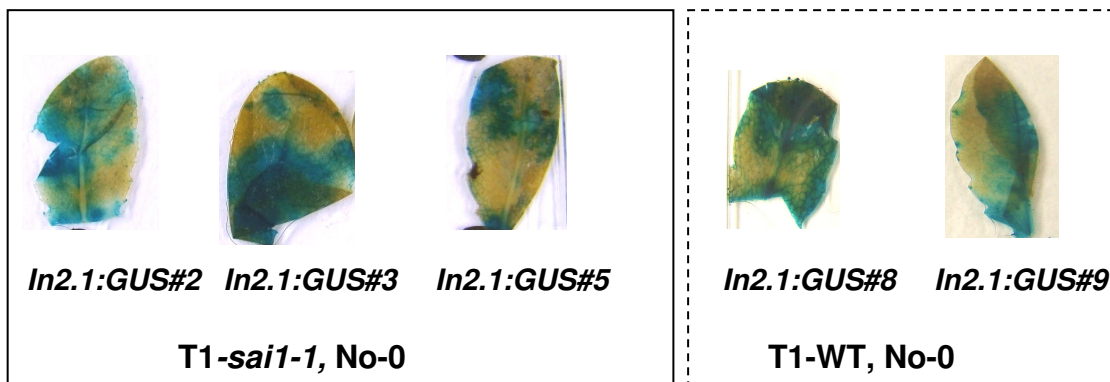


Abb. 3-15 GUS-Aktivität in mit Dichlorosalizylsäure-behandelnten No Wildtyp und *sai1-1* Mutanten Pflanzen
Die *sai1-1* T1-Pflanzen (links im Bild) und T1-No-0 Wildtyp-Pflanzen mit $P_{In2.1}$:GUS Konstrukt wurden 4 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. 1 d nach der Behandlung mit Dichlorosalizylsäure wurde ein Blatt für die histochemische GUS-Färbung abgenommen.

In WT als auch der *sai1-1* Mutante ist die Induktion des Reporter-gens durch Salizylsäure deutlich zu erkennen. Die salizylsäureinduzierte Promotoraktivität ist somit unabhängig von NPR1 (s. Abb. 3-15). Es gibt ebenfalls Salizylsäure responsive Gene, wie z.B. *IEGT* (immediate early-induced glucosyltransferase; Horvath and Chua 1996) und *AtGSTF8*, auf welche die *npr1* Mutation keine Auswirkung (Blanco *et al.* 2005, Uquillas *et al.* 2004) hat. Diese Gene werden sehr früh, d.h. teilweise schon 0,5 h nach SA-Applikation induziert.

Um die Wirkung der Safener Mefenpyr und Isoxadifen auf die Reporter-genaktivität zu untersuchen, wurde mit den homozygoten T2-Linien ein quantitativer GUS-Test nach Safener- bzw. BF-Behandlung durchgeführt (2.2.9). Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 3-16 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl in WT als auch der *sai1-1* Mutante die β -Glucuronidase durch Safener induziert wird. Die Induktion des *In2.1*-Promotors durch die verwendeten Safener ist daher ebenfalls unabhängig von NPR1. Es kann vermutet werden, dass es gemeinsame Elemente zwischen dem „frühen“ Salizylsäure- und Safenersignalweg gibt.

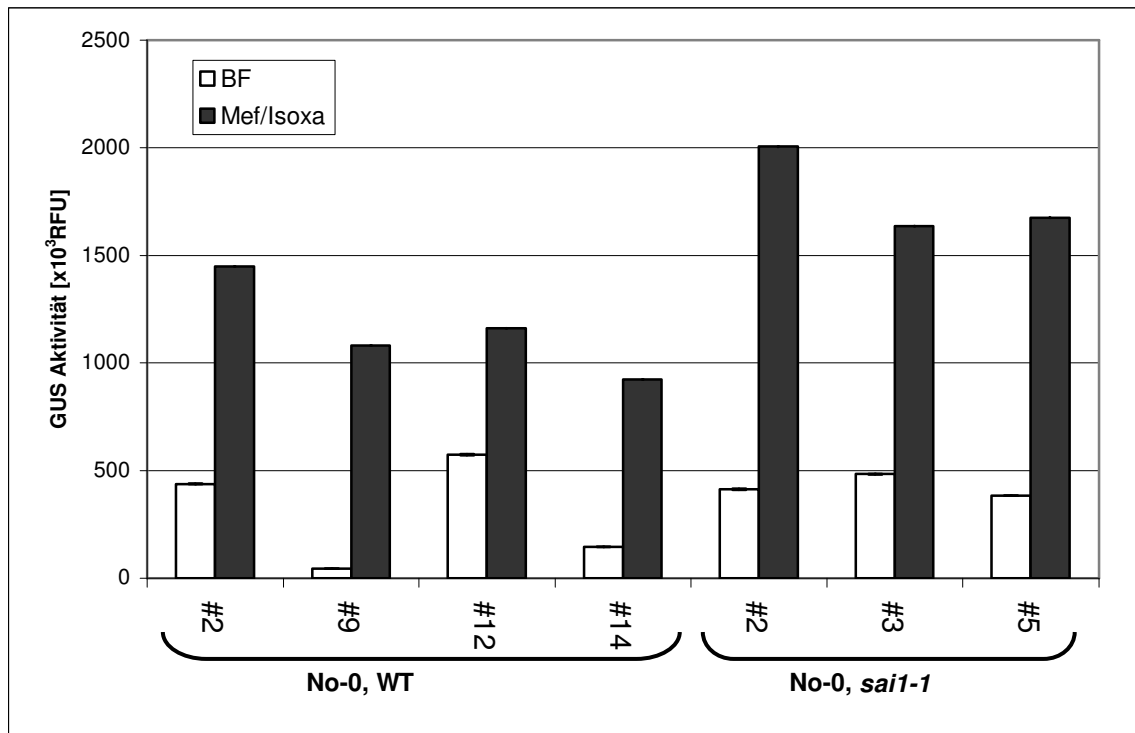


Abb. 3-16 Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in No-0 Wildtyp und *sai1-1* Mutanten Pflanzen
 Quantifizierung der relativen Reporterexpression nach Behandlung mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa, s. Kapitel 2.2.8). Für diesen Versuch wurden 2 Wochen alte, steril unter Langtag kultivierte Pflanzen verwendet. Zum einen Pflanzen der homozygoten No-0, WT-Linien $P_{In2.1}:GUS$ #2,#9 und #12, als auch der 3 homozygoten No-0, *sai1-1* Linien $P_{In2.1}:GUS$ #2,# und #5. Proteinrohextrakte für einen quantitativen GUS-Test wurden nach Kapitel 2.2.9.2 aufgearbeitet. Die relative Fluoreszenz nach 8 h Inkubation bei 37 °C wird dargestellt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert einer Dreifachbestimmung aus je einem Proteinrohextrakt aus 15-20 Pflänzchen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen der Werte an.

3.5 Einfluss der Safener auf den endogenen Salizylsäuregehalt

Für die Etablierung der SAR ist nach Pathogenbefall eine interne Akkumulation von SA notwendig. Es wäre durchaus denkbar, dass auch Safener zu einer Erhöhung der Salizylsäurebiosynthese führen, da die Safenerinduzierbarkeit des $P_{In2.1}:GUS$ Konstruktes eine Abhängigkeit von der internen Salizylsäurekonzentration zeigte (3.4.1). Die Konzentration an freier Salizylsäure wurde daher nach Applikation von BF und den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen in Col0, *sid2-2* als auch *NahG* (Negativkontrolle) untersucht. Es gibt, ausgehend von Chorismat, zwei denkbare Synthesewege für Salizylsäure: zum einen über Phenylalanin oder Isochorismat (s. Kapitel 4.6.1). Um einen möglichen Einfluss der Safenerapplikation auf den Phenylalanin-Biosyntheseweg zu untersuchen, wurde daher die *sid2-2*-Mutante in diesen Versuch miteinbezogen. Diese Messungen wurden extern mit Hilfe einer GC-MS/MS Technik (Müller *et al.* 2002) von Mitarbeitern des Labors von Dr. Pollmann (Universität Bochum, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie) durchgeführt. Die Probenvorbereitung wird in Kapitel 2.2.12 beschrieben.

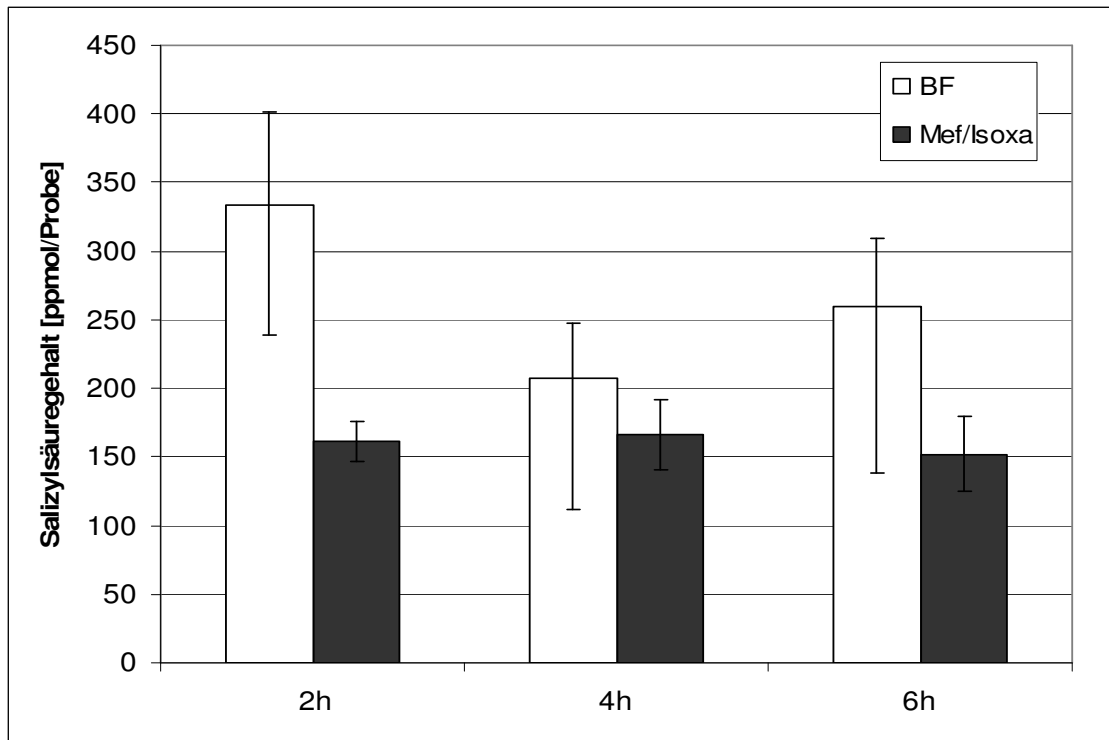


Abb. 3-17 Gehalt freier Salizylsäure in Col0 Pflanzen nach Safenerapplikation

Für diesen Versuch wurden Col0 Pflanzen 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. 2 h, 4 h und 6 h nach der Behandlung mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) wurden 100-140 mg Blattmaterial für eine Methanolextraktion verwendet. Pro Probe wurden vor der Extraktion 100 ppmol interne D6-SA-Standards zugegeben. Die Messung des Salizylsäuregehaltes wurde in Bochum, Labor Dr. Pollmann durchgeführt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus einer Fünffachbestimmung, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (StabW) der Werte an.

Die Safenerapplikation führt innerhalb von 6 h offensichtlich nicht zu einer Erhöhung der internen Salizylsäurekonzentration in Wildtyppflanzen (Abb. 3-17), wie sie beispielsweise nach einer Pathogeninfektion erwartet werden könnte. In dem vorliegenden Experiment scheint sich nach der Safenerbehandlung der Salizylsäuregehalt der Pflanzen sogar eher zu verringern.

Der Salizylsäuregehalt in der *sid2-2*-Mutante liegt erwartungsgemäß unter dem der WT-Pflanzen (Abb. 3-18). Eine Safenerinduktion der ICS-unabhängigen Salizylsäure-Biosynthese über Phenylalanin kann jedoch nicht beobachtet werden. Auch in *NahG* Pflanzen kann durch Safener keine Erhöhung des Salizylsäure-Gehaltes nachgewiesen werden (Abb. 3-19). Offensichtlich ist die Salizylsäure-Konzentration in dieser Mutante aber geringfügig höher als in *sid2-2* Pflanzen.

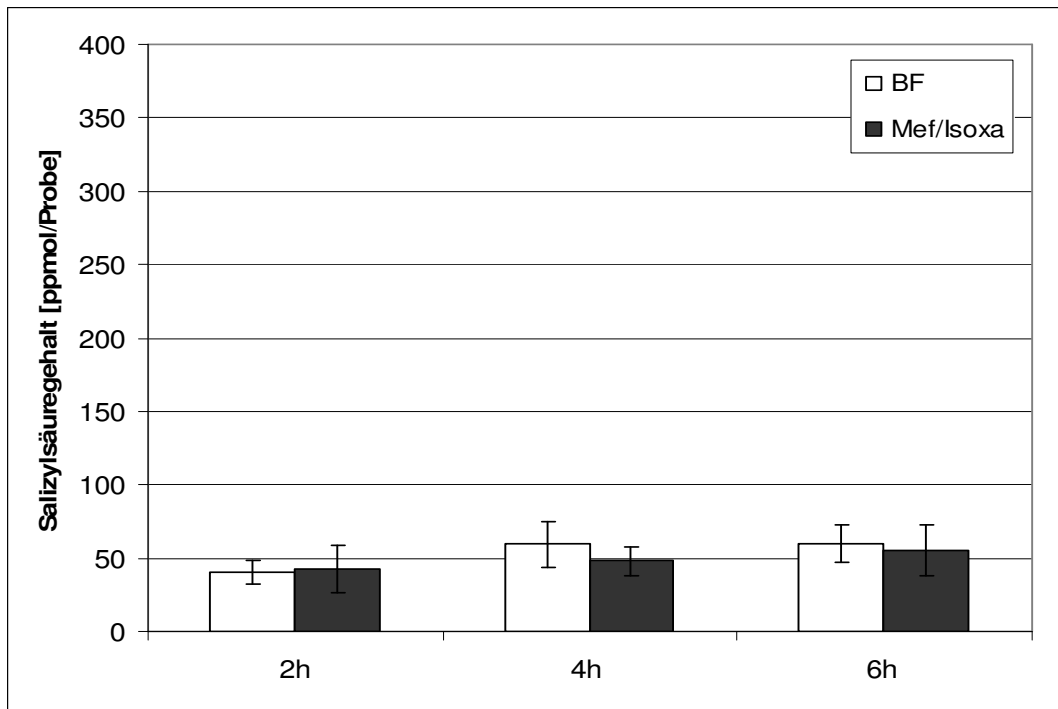


Abb. 3-18 Gehalt der freien Salizylsäure in *sid2-2* Pflanzen nach Safenerapplikation

Für diesen Versuch wurden Col0 Pflanzen 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. 2 h, 4 h und 6 h nach der Behandlung mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) wurden 100-140 mg Blattmaterial für eine Methanolextraktion verwendet. Pro Probe wurden vor der Extraktion 100 ppmol interner D₆-SA-Standard zugegeben. Die Messung des Salizylsäuregehaltes wurde in Bochum, Labor Dr. Pollmann durchgeführt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus zwei einer Fünffachbestimmungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (StabW) der Werte an.

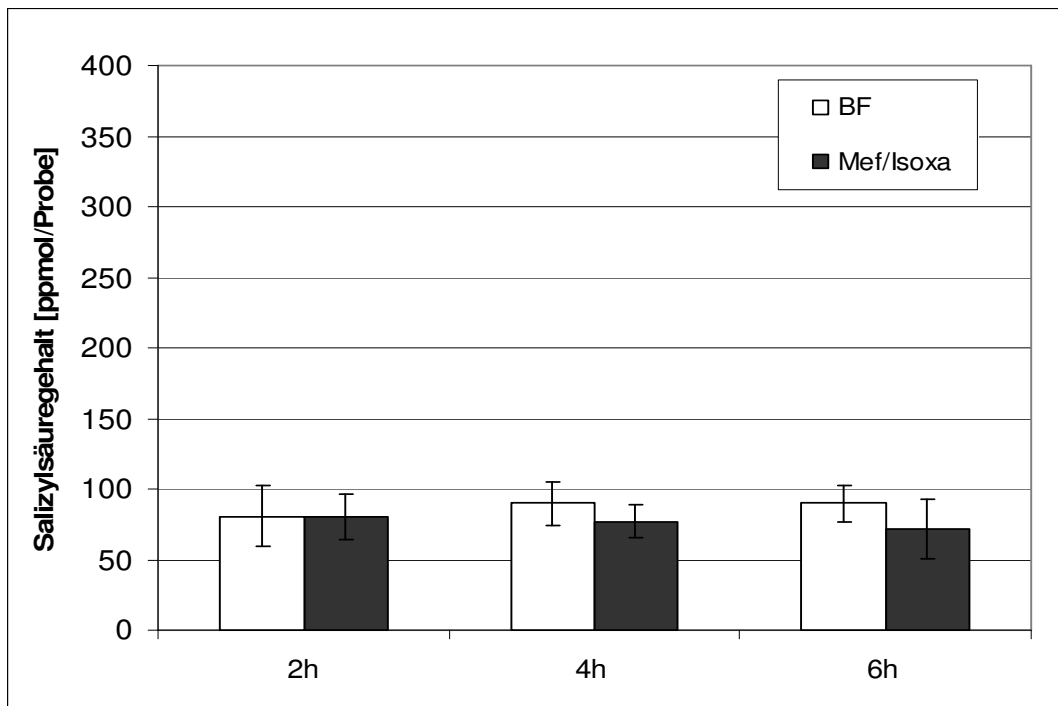


Abb. 3-19 Gehalt der freien Salizylsäure in *NahG* Pflanzen nach Safenerapplikation

Für diesen Versuch wurden Col0 Pflanzen 2 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. 2 h, 4 h und 6 h nach der Behandlung mit Blindformulierung (BF) bzw. den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) wurden 100-140 mg Blattmaterial für eine Methanolextraktion mit 100 pmol D₆-SA-Standard pro Probe eingesetzt. Die Messung des Salizylsäuregehaltes wurde in Bochum, Labor Dr. Pollmann durchgeführt. Die Daten entsprechen dem Mittelwert aus zwei einer Fünffachbestimmungen, die Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (StabW) der Werte an.

Safener führen somit weder zur Aktivierung der SA-Biosynthese über den Phenylalanin- noch über den Isochorismatsyntheseweg. Die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors scheint jedoch von der endogenen Salizylsäurekonzentration abhängig zu sein. In Col0 Pflanzen, deren SA-Gehalt am höchsten ist, ist die größte safenerinduzierbare Reporterogenaktivität nachweisbar (s. Abb. 3-16). In *NahG* Mutanten, deren SA-Gehalt weit unter dem Wert der WT Pflanzen liegt, ist nur in einigen Linien eine geringe Safenerinduzierbarkeit erkennbar (s. Abb. 3-16). In *sid2-2* Mutanten, mit dem nachweislich geringsten endogenen SA-Gehalt, kann keine safenerinduzierte Reporterogenaktivität mehr nachgewiesen werden (s. Abb. 3-13).

3.6 Induzierbarkeit von *PR1* durch Safener und Dichlorsalizylsäure

In den vorangegangenen Kapiteln konnten bereits einige Parallelen zwischen dem Safener- und Salizylsäuresignalweg aufgezeigt werden. Der *In2.1*-Promotor wird sowohl durch Salizylsäure als auch durch Safener aktiviert. Dieser Induktion konnten, den beiden Signalwegen gemeinsame Transkriptionsfaktoren (wie TGA-Faktoren, s. Kapitel 3.3.1) und *cis*-aktive Elemente (s. Kapitel 3.2), zugeordnet werden. Wie bereits mehrfach beschrieben, ist die SA ein Schlüsselement der SAR. In SA Biosynthesemutanten ist eine Entwicklung der SAR, und eine Expression des SAR Markergens *PR1*, somit nicht möglich. In Kapitel 3.5 konnte gezeigt werden, dass die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in SA-Biosynthesemutanten ebenfalls nur bedingt, bzw. gar nicht möglich ist.

Es sollte daher geprüft werden, ob Safener aufgrund der gefundenen gemeinsamen Signalweegelemente, ebenfalls zur Induktion des SAR Markergens *PR1* führen. Die Induktion von *PR1*, als auch die Induktion des *GUS*-Reportergens unter Kontrolle des *In2.1*-Promotors, wurde nach Applikation von Dichlorsalizylsäure und den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen zu verschiedenen Zeitpunkten mit einer real time PCR quantifiziert (Abb. 3-20 und 3-21).

Die Induzierbarkeit des Reportergens ist, wie im quantitativen GUS-Test bereits ersichtlich (Kapitel 3.1), durch Dichlorsalizylsäure höher als durch Safener (Abb. 3-20). Nach acht Stunden wurde bereits die maximale Reporterexpression erreicht. Während nach Safenerbehandlung eine geringe Steigerung der GUS-Transkriptmenge beobachtet werden kann, stagniert die durch SA induzierte GUS-Transkriptmenge nach ein bis zwei Tagen.

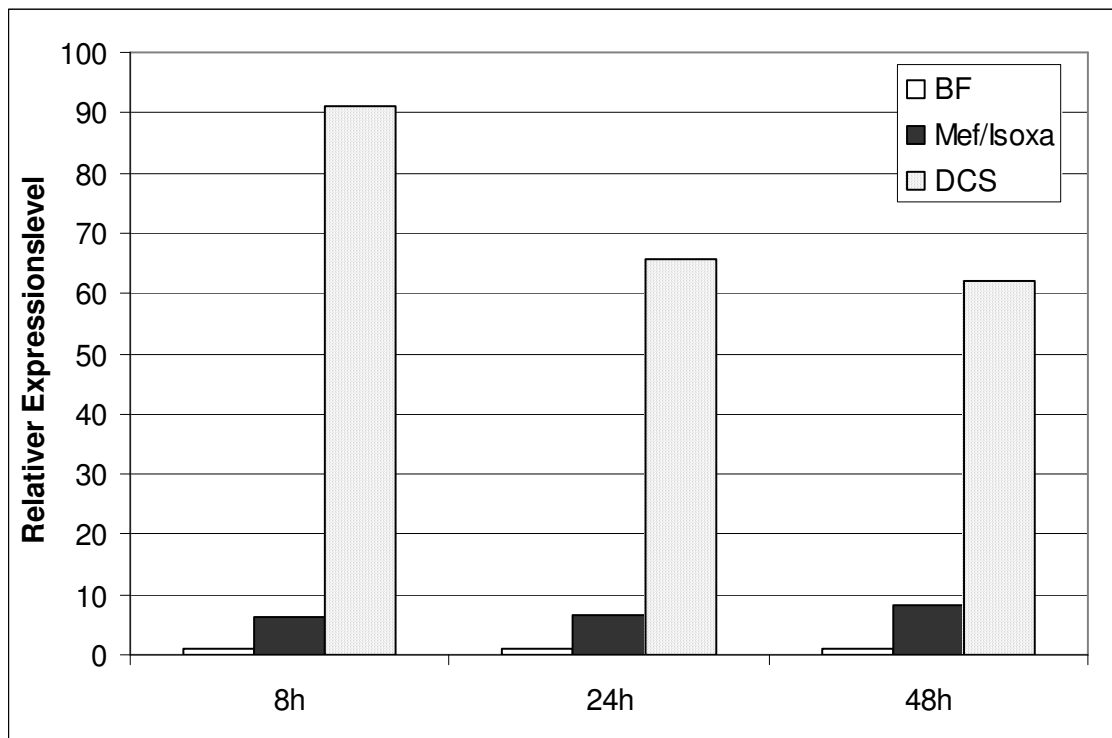


Abb. 3-20 GUS-Induktion durch Mefenpyr/Isoxadifen bzw. Dichlorsalizylsäure

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der relativen *GUS*-Transkriptlevel in WT $P_{m2.1}::GUS\#5$ Pflanzen. Zwei Wochen steril unter Langtagbedingungen angezogene Pflanzen wurden mit Blindformulierung (BF), den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) bzw. Dichlorsalizylsäure (DCS) behandelt. Die Blatt-Proben für die cDNA Synthese wurden 8, 24 und 48 h nach Behandlung genommen. Eine Normalisierung der Werte erfolgte mit Rubisco und der Wert von mit BF behandelten Pflanzen wurde gleich 1 gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung.

Die Behandlung mit DCS führt in *Arabidopsis* zu einer schnellen (8 h) und sehr starken Expression von *PR1*. Die maximale Expression wird nach 24 h beobachtet (Abb. 3-21). Im Vergleich zu den mit DCS behandelten Pflanzen, ist nach einer Behandlung mit den Safenern erst nach 48 h eine geringe Induktion des *PR1*-Gens nachweisbar (Abb. 3-21). Safener führen somit wahrscheinlich auch nicht zu einer Etablierung der SAR. Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls, dass Safener in WT-Pflanzen auch nach mehr als 6 h nicht zu einer Erhöhung des endogenen SA-Gehaltes führen. Ein erhöhter endogener SA-Gehalt würde zu erhöhter *PR1* Expression führen.

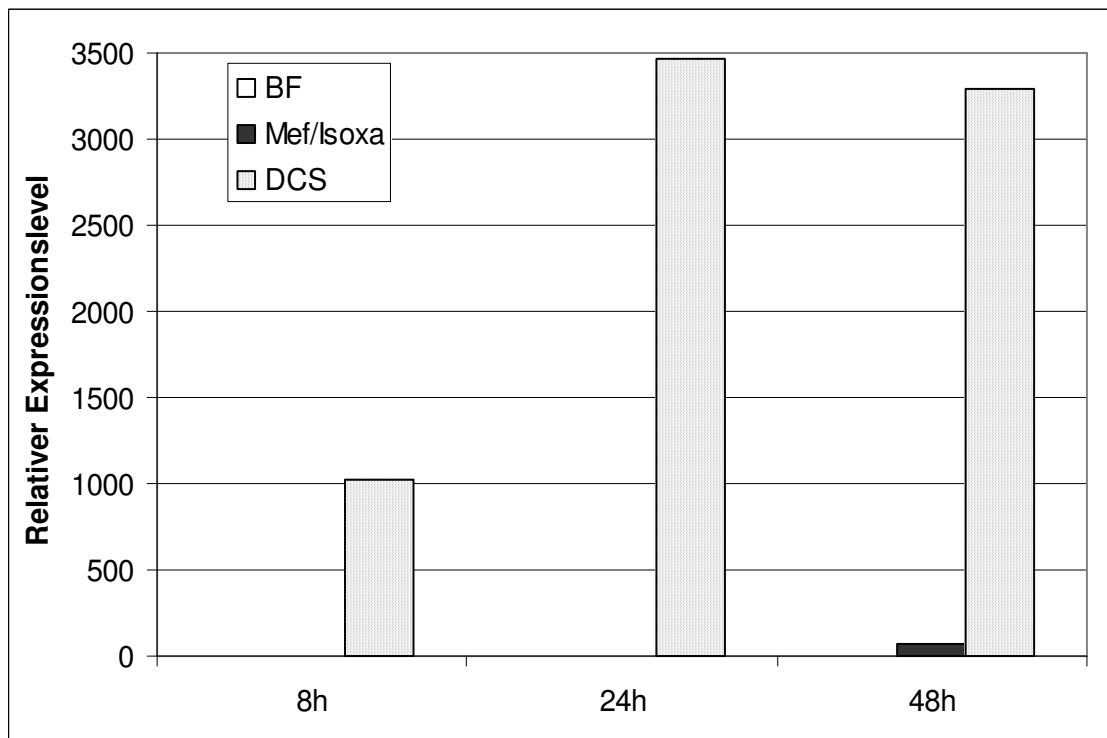


Abb. 3-21 *PR1*-Induktion durch Mefenpyr/Isoxadifen bzw. Dichlorsalicylsäure

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der relativen *PR1*-Transkriptlevel in *P_{In2.1}:GUS#5* (WT). Zwei Wochen steril angezogene Pflanzen wurden mit den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) bzw. Dichlorsalicylsäure (DCS) behandelt. Die Blatt-Proben für die cDNA Synthese wurden 8, 24 und 48 h nach Behandlung genommen. Die Werte wurden mit Rubisco normalisiert, und der Wert von mit BF behandelten Pflanzen wurde gleich 1 gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung.

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Applikation der Safener Mefenpyr/Isoxadifen in der *sid2-2* Mutante, innerhalb von 6 h, zu keiner Induktion der SA-Biosynthese über den Phenylalaninweg führt (s. 3.5). Es wäre jedoch Möglich, dass dieser Zeitpunkt zu früh gewählt war, und der Salicylsäuregehalt zu einem späteren Zeitpunkt erhöht wird. Eine safenerinduzierte SA-Biosynthese über den Phenylalaninweg nach mehr als 6 h, und die damit verbundene erhöhte Salicylsäurekonzentration, wären dann in der *sid2-2* Mutante über eine erhöhte *PR1* Expression nach Safenerbehandlung nachweisbar.

Um den Effekt der Safener auf die *PR1*-Induktion in der *sid2-2* Mutante zu untersuchen, wurden 24 h nach Applikation von Dichlorsalicylsäure bzw. Safenern (Mefenpyr und Isoxadifen) die entsprechenden Transkriptmengen, verglichen mit dem WT, quantifiziert (Abb. 3-22). In *sid2-2* Pflanzen ist nach 24 h, im Unterschied zur Applikation von DCS, keine *PR1* Induktion durch Safener nachweisbar. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass Safener auch nach mehr als 6 h zu keiner Induktion der SA-Biosynthese über den Phenylalaninweg führen.

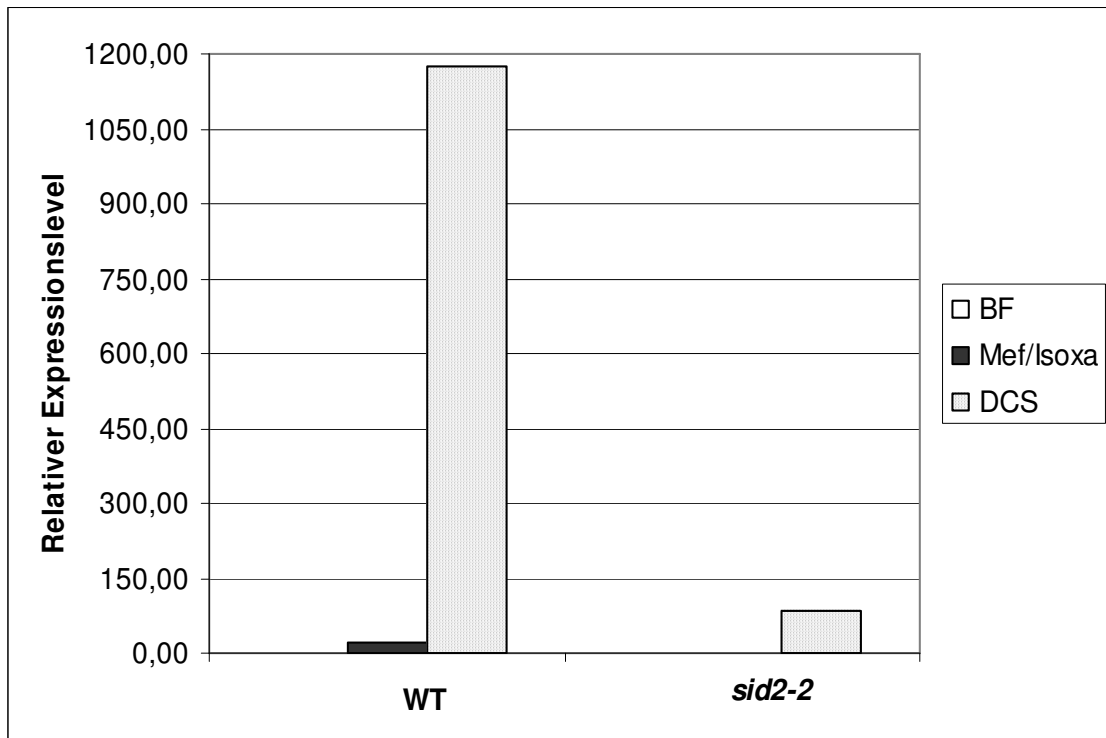


Abb. 3-22 PR1-Induktion durch Mefenpyr/Isoxadifen bzw. Dichlorsalizylsäure in *sid2-2*

Quantitative real-time RT-PCR Analyse der relativen *PR1*-Transkriptlevel in *P_{In2.1}:GUS#5* (WT) und *P_{In2.1}:GUS#6* (*sid2-2*) Pflanzen. Zwei Wochen steril angezogene Pflanzen wurden mit den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen (Mef/Isoxa) bzw. Dichlorsalizylsäure (DCS) behandelt. Die Blatt-Proben für die cDNA Synthese wurden 24 h nach Behandlung genommen. Die Werte wurden mit Rubisco normalisiert, und der Wert von mit BF behandelten WT-Pflanzen wurde gleich 1 gesetzt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten einer Dreifachbestimmung.

3.7 Safener induzierte Genexpression in *Arabidopsis*

Neben der Charakterisierung eines safenerinduzierbaren Promotors, sollte in dieser Arbeit auch die Wirkung von Mefenpyr und Isoxadifen auf die Genexpression (gene expression profiling, GEP) in einer dikotylen Pflanze untersucht werden, um sie mit der Wirkung in Monokotylen zu vergleichen. Durch dieses Experiment mit *Arabidopsis* WT Pflanzen und den zuvor bereits verwendeten Mutanten, könnte man auch die bereits gewonnenen Ergebnisse im Bezug auf den Safenersignalweg, unabhängig vom *In2.1*-Promotor, bestätigen. Es ist ebenfalls denkbar, dass über ein solches Experiment weitere Elemente des Safenersignalweges gefunden werden können.

Um den Einfluss der Safenerbehandlung 8 h nach Applikation auf die Genexpression in WT-Pflanzen, als auch verschiedener *Arabidopsis* Mutanten zu untersuchen, wurde RNA von 4 Wochen alten, unter Langtagbedingungen in Erde angezogenen Pflanzen isoliert. Gleiche Mengen von drei unabhängigen RNA-Proben wurden für jeden Genotyp aufgearbeitet. Von jeder RNA-Probe wurden Sonden hergestellt und mit dem Affymetrix *Arabidopsis* ATH1 GeneChip Array (Redman *et al.* 2004) hybridisiert. Die Versuche wurden wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben durchgeführt. Für dieses GEP

wurden *Arabidopsis* Wildtyp-Pflanzen (Col0), die TGA-Faktor knockout Mutante *4tga* (*tga2/3/5/6*) und die beiden Salizylsäure Mutanten *NahG* sowie *sid2-2* verwendet (s. Kapitel 2.1.5).

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit der Software „Expressionist® Pro 5, Analyst“ der Genedata AG (s. Kapitel 2.2.13).

3.7.1 Qualität des Genexpressionsexperiments

Die Hauptkomponenten Analyse (PCA, principle component analysis) ist ein Verfahren der multivariablen Statistik (s. auch Kapitel 2.2.13). Mit der PCA kann man umfangreiche Datensätze strukturieren, vereinfachen und veranschaulichen. Eine Mehrzahl statistischer Variablen wird hierbei durch eine geringere Zahl möglichst aussagekräftiger Linearkombinationen (die sogenannten Hauptkomponenten) genähert (Pearson 1901). Durch diese Methode ist es möglich, die Qualität eines GEP Experimentes zu beurteilen.

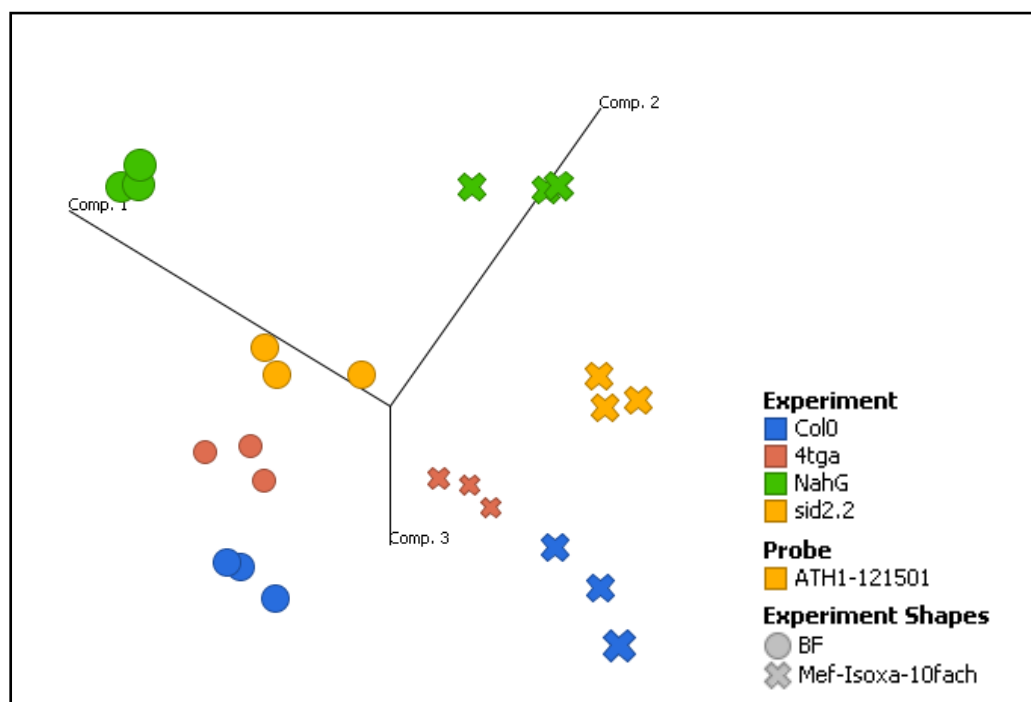


Abb. 3-23 Hauptkomponenten Analyse der WT-, *NahG*-, *sid2-2*-ATH1 Microarray Chips

Abgebildet werden die biologischen Triplikate der Behandlung mit Blindformulierung (BF, Kreis) und mit Mefenpyr/Isoxadifen (Mef/Isoxa; Kreuze) und die Ergebnisse für die Mutanten bzw. Wildtyppflanzen. WT: blau, *NahG*: grün; *sid2-2*: orange, *4tga*: rot.

Die PCA-Analyse der in drei biologischen Replikaten durchgeführten acht Genexpressionsexperimente (vier Genotypen Col0, *sid2-2*, *NahG*, *4tga*) jeweils mit BF und Mef/Isoxa behandelt) zeigt zunächst, dass die Triplikate der Behandlungen nahe

beieinander liegen, dies spricht für eine gute Qualität des GEP Experimentes. Weiterhin zeigt sich, dass die Behandlung mit den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression im Wildtyp und den Mutanten hat (die jeweiligen Hauptkomponenten werden in einer Ebene „verschoben“). Man kann ebenfalls einen deutlichen Unterschied bezüglich der Genexpression in WT und den verschiedenen Mutanten feststellen (Abb. 3-23), wobei hier für beide Behandlungen (BF, Safener) der deutlichste Unterschied zwischen *NahG* und WT-Pflanzen besteht.

3.7.2 Identifizierung differenziell exprimierter Gene

Um differenziell exprimierte Gene zwischen Pflanzen die mit Blindformulierung behandelt wurden und solchen, die mit den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen behandelt wurden zu identifizieren, wurde zunächst ein „2-Gruppen-t-Test“ für alle Genotypen durchgeführt. Es wurde nach Genen gesucht, die bei einem Schwellenwert von 0,05 mindestens 2-fach differenziell reguliert sind (Dallal, 2007).

Die Ergebnisse für den Wildtyp (Col0) und die Mutanten sind in Tab. 3-2 dargestellt.

Tab. 3-2 Zweifach differenziell regulierte Gene 8h nach Behandlung mit den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen in den verschiedenen Mutanten und Col0 WT-Pflanzen

	hochreguliert	runterreguliert	insgesamt
Col0	438	103	541
4tga	246	24	270
nahG	719	141	860
sid2-2	410	146	556

Die Behandlung mit den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen führt in Wildtyp und Mutanten hauptsächlich zu einer Geninduktion. Die meisten Gene werden durch Safenerbehandlung in der *NahG* Mutante differenziell exprimiert, den geringsten Effekt beobachtet man diesbezüglich in der *4tga* Mutante. Offensichtlich ist durch diese Mutation die Induktion/Repression vieler safenerinduzierbarer Gene betroffen.

Die in WT Pflanzen safenerregulierten 541 Gene wurden über ihre GO-(gene ontology)-Annotation verschiedenen übergeordneten Gruppen zugeteilt (s. Abb. 3-24). Man kann hier feststellen, dass ein großer Teil der in *Arabidopsis* safenerregulierten Gene in Zusammenhang mit metabolischen Prozessen, Transport, Transkriptionsregulation und Proteinmodifikationen gebracht werden kann.

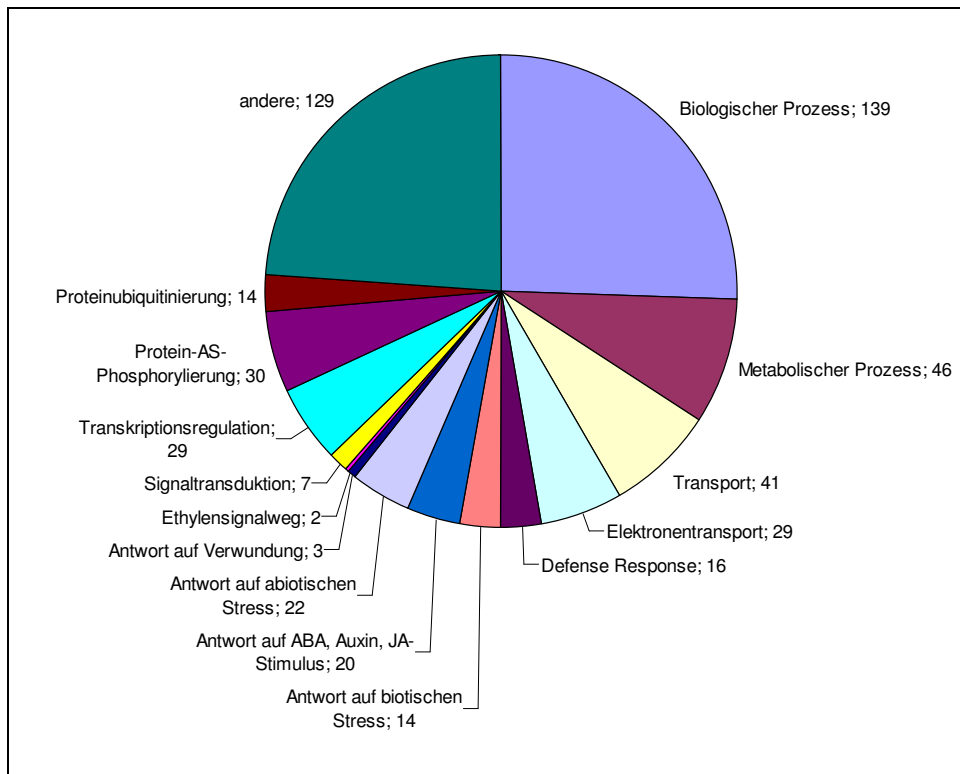


Abb. 3-24 Regulation der Genexpression durch Safener in *Arabidopsis*

GO-Annotation; 19 Transport (Aminosäuretransport: 3; Auxintransport: 2; Proteintransport: 2; Lipidtransport: 10; Multidrug-Transport: 5); **46 Metabolischer Prozess** (metabolischer Prozess: 11; Kohlenhydratmetabolismus: 16; Lipidmetabolismus: 9; Proteinmetabolismus: 10); **16 Defense Response** (Bakterien, Pilze); **20 Response to ABA, Auxin, JA** (ABA: 7; Auxin: 11; JA: 2); **22 Abiotic stress** (cold: 2; heat: 5; highlight: 2, oxidative stress: 5; others: 8)

3.7.3 Kategorisierung der differenziell exprimierten Gene

In *Arabidopsis* WT Pflanzen werden durch Safener 541 Gene, verglichen mit der BF-Behandlung, differenziell reguliert. Es sollte nun untersucht werden, welche dieser Gene mit einer statistischen Signifikanz safenerreguliert werden. Es sollte weiterhin aufgeklärt werden, zu welcher übergeordneten Gruppe diese Gene gehören. Für die Analyse eignet sich der exakte Fisher Test (Fisher's Exact Test, Fisher 1935, Fisher 1962). Dieser ist ein statistischer Zähl-Test, der Aussagen über die statistische Signifikanz der Über- bzw. Unterrepräsentation von Bestandteilen einer gewählten Gruppe, bezogen auf eine sogenannte „Universelle Gruppe“, erlaubt (s. auch Kapitel 2.2.13). Er wird für kleine Stichproben verwendet. Mit dem Programm Expressionist hat man die Möglichkeit, diesen Test nach verschiedenen Kategorien durchzuführen: z.B. nach den Überbegriffen „Biologischer Prozess“, „molekulare Funktion“ und nach „Bindungsstellen“ der entsprechenden Promotoren (1 kb aufwärts des Transkriptionsstarts). Die Ergebnisse werden nach den jeweiligen p-Werten sortiert. Ein niedriger p-Wert spricht für eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die entsprechenden

safenerinduzierten Gene, bzw. deren *cis*-regulatorische Elemente, nicht zufällig in die untersuchte Gruppe fallen.

Biologischer Prozess	p-Wert
Antwort auf einen Stimulus	6,9*10⁻²⁷
Antwort auf einen chemischen Stimulus	1,8*10⁻¹⁸
Antwort auf einen biotischen Stimulus	1,4*10⁻¹⁴
Antwort auf einen anderen Organismus	1,4*10 ⁻¹⁴
Antwort auf einen Hormonstimulus	6,4*10 ⁻¹⁰
Antwort auf einen endogenen Stimulus	5,8*10 ⁻¹⁰
Abwehrantwort	1,1*10 ⁻⁰⁹

Die im Wildtyp durch Safener induzierbaren Gene gehören offensichtlich zu einer Gruppe von Genen, die auch durch einen chemischen oder biotischen Stimulus induziert werden können. Der Safenersignalweg könnte daher mit den für diese Genantworten zusammenhängenden Signalwegen überlappen.

Führt man den Fisher's Exact Test mit der MapMan Annotation bzw. dem Kriterium „molekulare Funktion“ durch, werden Glutathion-S-Transferasen mit einem besonders niedrigen p-Wert aufgeführt. Transporter, Gene des Pflanzen-Detoxifizierungssystems, werden in *Arabidopsis* ebenfalls spezifisch durch Safener induziert. Sowohl GSTs als auch Transporter gehören auch in Monokotylen zu den safeneraktivierten Enzymen (Fuerst et al. 1993, Jepson et al. 1994, Miller et al. 1994, Riechers et al. 1997, Gaillard et al. 1994, Theodoulou et al. 2003). Die Safenerantwort in Mono- und Dikotylen weist offensichtlich, wie bereits vermutet, große Ähnlichkeit auf.

Biologischer Prozess, MapMan	p-Wert
Verschiedene Glutathion-S-Transferasen	2,4*10⁻⁷
RNA Regulation der Transkription	1,4*10 ⁻⁵
WRKY-Domän-Transkriptionsfaktor Familie	
verschiedene Transporter	3,7*10⁻⁵

Molekulare Funktion	p-Wert
Katalytische Aktivität	2,3*10 ⁻⁶
Glutathion-S-Transferase Aktivität	9,6*10⁻⁶
Transporter Aktivität	2,6*10⁻⁴
Elektrochemisches Potential gesteuerte	8,1*10 ⁻⁴
Transporter Aktivität	

Neben der Induktion von GSTs und Transportern haben Safener auch einen spezifischen Einfluss auf die Regulation der Transkription. Hierbei spielen offensichtlich Transkriptionsfaktoren, welche eine WRKY-Domäne besitzen, eine wichtige Rolle im Safener Signalweg. WRKY-Transkriptionsfaktoren haben ihren Namen aufgrund der sogenannten WRKY-Domäne, einer 60 AS-Region die zwischen allen WRKY-Familienmitgliedern hoch konserviert ist.

Führt man den Fisher's Exact Test in der Kategorie „Bindungsstelle“ durch, so findet man innerhalb der durch Safener induzierten *Arabidopsis* Gene eine signifikante Anreicherung von W-Box-Motiven. Diese Beobachtung ist ein weiteres Indiz für die Beteiligung der WRKY-Transkriptionsfaktoren im Safenersignalweg, da diese DNA-Sequenzen spezifisch von WRKY-Transkriptionsfaktoren gebunden werden. Ein erhöhtes Vorkommen von *as-1*-ähnlichen Sequenzen kann jedoch nicht als signifikant bewertet werden (schlechter, d.h. hoher p-Wert).

Bindungsstellen	p-Wert	Safener ind. Gene mit diesem Motiv
„ACGTATERD1“	$1,6 \cdot 10^{-5}$	470
“HSE binding site motif”	$1,7 \cdot 10^{-5}$	50
“POLASIG1”	$7,5 \cdot 10^{-5}$	426
“MYB1AT”	$3,4 \cdot 10^{-4}$	362
“ WBBOXPCWRKY1 ”	$1,3 \cdot 10^{-3}$	139
“AS1F1MOTIFCAMV”	0,14087	184

Definition der Abkürzungen:

“**ACGTATERD1**”: ACGT Sequenz (von -155 bis -152) welche für die durch Etiolierung induzierte Expression von *erd1* (early responsive to dehydration) in *Arabidopsis* benötigt wird (*Arabidopsis thaliana*; Simpson *et al.* 2003)

“**HSE binding site motif**”: AGAANNTTCT Sequenz (heat stress element), Vorkommen: *Arabidopsis thaliana*

“**POLASIG1**”: AATAAA Sequenz, PolyA Signal, gefunden im *legA* Gen der Erbse, Reis und Alpha-Amylase und „Near upstream elements“ (NUE) in *Arabidopsis* (Loke *et al.* 2005)

“**MYB1AT**”: WAACCA Sequenz, MYB Erkennungssequenz welche im Promotor des dehydrierungsresponsiven Gens *rd22* und vielen anderen Genpromotoren aus *Arabidopsis* enthalten ist; W=A/T (Abe *et al.* 2003)

“**WBBOXPCWRKY1**”: TTTGACY Sequenz, WB-Box; WRKY Proteine binden spezifisch an die DNA-Sequenzmotive (T)(T)TGAC(C/T), welche als W-Box bezeichnet werden. Diese Sequenz wurde im *PR1* Gen der Petersilie und einem Transkriptionsfaktor aus *Arabidopsis* gefunden als auch im Amylase Gen der Süßkartoffel, dem Alpha-Amy2 Gen aus Weizen, Gerste und der Waldtresse. Dieses Motiv wurde ursprünglich in der PLACE Datenbank als TTGACT registriert und am 22. Juni 2006 zu TTTGACY korrigiert; Y=C/T; Vorkommen: Süßkartoffel (*Pomoea batatas*), Weizen (*Triticum aestivum*), Gerste (*Hordeum vulgare*); Waldtresse (*Avena fatua*), Petersilie (*Petroselinum crispum*), *Arabidopsis thaliana*; Ishiguro and Nakamura 1994, Rushton *et al.* 1995, Rushton *et al.* 1996, de Pater *et al.* 1996, Eulgem *et al.* 2000).

Mit den 184-Genen, die ein *as-1*-Element in ihrem Promotor enthalten, wurde ein Fisher's Exact Test auf den betroffenen biologischen Signalweg durchgeführt. Diese Gene gehören hauptsächlich, d.h. mit einem niedrigen p-Wert, in die beiden safenerinduzierten Gruppen: „Antwort auf einen chemischen und biologischen Stimulus“. Führt man die gleiche Analyse mit den 139 Genen durch, deren Promotoren WRKY-Bindungsmotive (W-Boxen) enthalten, wird ersichtlich, dass diese Gene hauptsächlich zu der Gruppe der Gene gehören, die nach einem biotischen Stimulus induziert werden. Die Gruppe der chemisch induzierten Gene ist jedoch auch hier mit einem sehr geringen p-Wert zu finden. Somit haben Gene, die zu den beiden durch Safener induzierten (Haupt-) Gengruppen „Antwort auf einen chemischen bzw. biotischen Stimulus“ gehören in ihren Promotoren vor allem W-Boxen und *as-1*-ähnliche regulatorische Elemente. Von den insgesamt 75 beschriebenen WRKY-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* sind 9 durch Safener induziert (s. Anhang 7.4.2).

3.7.4 Regulation der safenerinduzierten GSTs

Safener reduzieren die Giftigkeit von Herbiziden in Kulturpflanzen wahrscheinlich über die Induktion der Expression von tau und phi Klasse GSTs. Es ist daher interessant, die safenerinduzierte Expression und die Regulation der in *Arabidopsis* induzierten GSTs näher zu betrachten.

In Wildtyp Pflanzen sind ausschließlich tau-Klasse GSTs induziert (Induktionswerte und p-Werte s. Anhang 7.4.1). Eine dieser 12 am stärksten induzierten GSTs ist das *In2.1*-ähnliche Gen aus *Arabidopsis* (*AtGSTL1*; AT5G02780). Die Induktion dieses Gens ist in *NahG*-Pflanzen, verglichen mit dem WT, erhöht (s. Abb. 3-25). Dieser Unterschied beruht auf einer stark verringerten basalen Expression des *AtGSTL1*-Gens in dieser Salizylsäurebiosynthese Mutante (der basale Expressionswert liegt in mit BF behandelten Col0-Pflanzen 3 mal höher als in *NahG* Pflanzen, s. Tab. 3-3). Der relative Expressionslevel von *AtGSTL1* ist in mit Safener behandelten Col0 Pflanzen doppelt so hoch wie in safenerbehandelten *NahG* Pflanzen. Dieses Ergebnis geht einher mit der für den Mais *In2.1*-Promotor beobachteten niedrigeren Aktivität in *NahG* Pflanzen (s. Kapitel 3.4.1). Eine verminderte basale Expression dieses Gens konnte in *sid2-2* und *4tga* Pflanzen nicht nachgewiesen werden.

Um die safenerinduzierte Expression der GSTs in der *NahG* Mutante zu bewerten, wurden die relativen Expressionswerte der GSTs betrachtet (Tab. 3-3, und Abb. 3-25). Nach einer Behandlung mit Blindformulierung sind die Expressionswerte von mehr als der Hälfte der GSTs (*AtGSTU3*, *AtGSTL1*, *AtGSTU11*, *AtGSTU10*, *AtGSTU4*,

AtGSTU8, *At4G19880*, *AtGSTF8*) bereits geringer als in Col0 (s. auch Kapitel 4.9.1). Einige dieser Gene werden nach Safenerapplikation jedoch ähnlich hoch exprimiert wie im WT, sodass die absoluten Induktionswerte in der *NahG* Mutante höher sind als im WT (*AtGSTU3*, *AtGSTU11*, *AtGSTU4*). Ausnahmen bilden hier *AtGSTL1* und *AtGSTU10*. Bei diesen GSTs ist der Expressionswert nach BF- und Safener-Behandlung deutlich geringer als im WT, die Induktionsfaktoren sind, auf Grund der dennoch starken Safenerinduktion, höher als im WT. Es gibt jedoch auch GSTs, deren Expression in der *NahG* Mutante nach BF-Behandlung höher ist als im WT (*AtGSTU1*, *AtGSTU7*, *AtGSTU25*, *AtGSTU24*). Diese GSTs zeigen nach Safenerbehandlung in *NahG*-Pflanzen einen entsprechend höheren Expressionswert, und damit ähnliche Induktionswerte wie im WT. Einzige Ausnahme ist *AtGSTU25*, dieses Gen wird nach Safenerbehandlung in *NahG* fast doppelt so hoch exprimiert wie im WT. In der *NahG* Mutante ist also die Expression vieler safenerinduzierter GSTs nach BF- und Safenerbehandlung stark verändert.

Tab. 3-3 Relative Expressionswerte der safenerinduzierbaren GSTs in Col0 und *NahG* Die Mittelwerte der relativen Expression der Gene und die daraus resultierenden Induktionsfaktoren von 3 biologischen Replikaten werden dargestellt. Das *Arabidopsis* endogene *In2.1* ähnliche Gen ist grau hinterlegt.

	Col0			NahG		
	BF	Mef/Isoxa	Induktionsfaktor	BF	Mef/Isoxa	Induktionsfaktor
<i>AtGSTU3</i>	167	1343	8,0	56	922	16,9
<i>AtGSTU1</i>	133	664	5,0	259	1126	4,4
<i>AtGSTL1</i>	148	640	4,3	53	326	6,3
<i>AtGSTU7</i>	732	2403	3,3	1404	3178	2,7
<i>AtGSTU11</i>	77	236	3,1	38	178	4,7
<i>AtGSTU10</i>	266	690	2,6	105	394	3,8
<i>AtGSTU25</i>	165	416	2,6	305	1264	4,3
<i>AtGSTU4</i>	343	812	2,4	257	945	3,7
<i>AtGSTU8</i>	533	1210	2,3	149	609	4,1
<i>AtGSTU24</i>	736	1437	2,0	1319	2932	2,2
<i>At4G19880</i>	715	1434	2,0	650	1352	2,1
<i>AtGSTF8</i>	2304	4089	1,8	1811	4288	2,4

Eine Mutation der ICS (*sid2-2*) führt bei den meisten der genannten GSTs zu einer verminderten Safenerinduzierbarkeit (*AtGSTU3*, *AtGSTU1*, *AtGSTU7*, *AtGSTU10*, *AtGSTU25*, *AtGSTU4*, *AtGSTU3*), und bei zwei GSTs (*At4G19880* und *AtGSTU24*) zum Verlust der Induzierbarkeit. Auch die Induzierbarkeit von *AtGSTL1* ist in dieser Mutante deutlich reduziert (s. Abb. 3-25).

Ein Knockout von 4 TGA-Faktoren (*4tga* Mutante) hat einen Einfluss auf die Safenerinduzierbarkeit aller aufgeführten GSTs. Die Safener Induktion der GSTs ist mehr oder weniger deutlich reduziert bzw. inhibiert (*AtGSTU1*, *AtGSTU25*, *AtGSTU24*,

AtGSTF8). Die Induzierbarkeit des *Arabidopsis In2.1*-Gens (*AtGSTL1*) ist in der *4tga*-Mutante jedoch nur leicht reduziert (s. Abb. 3-25). In der entsprechenden Promotorsequenz konnte auch kein *as-1*-ähnliches Element identifiziert werden.

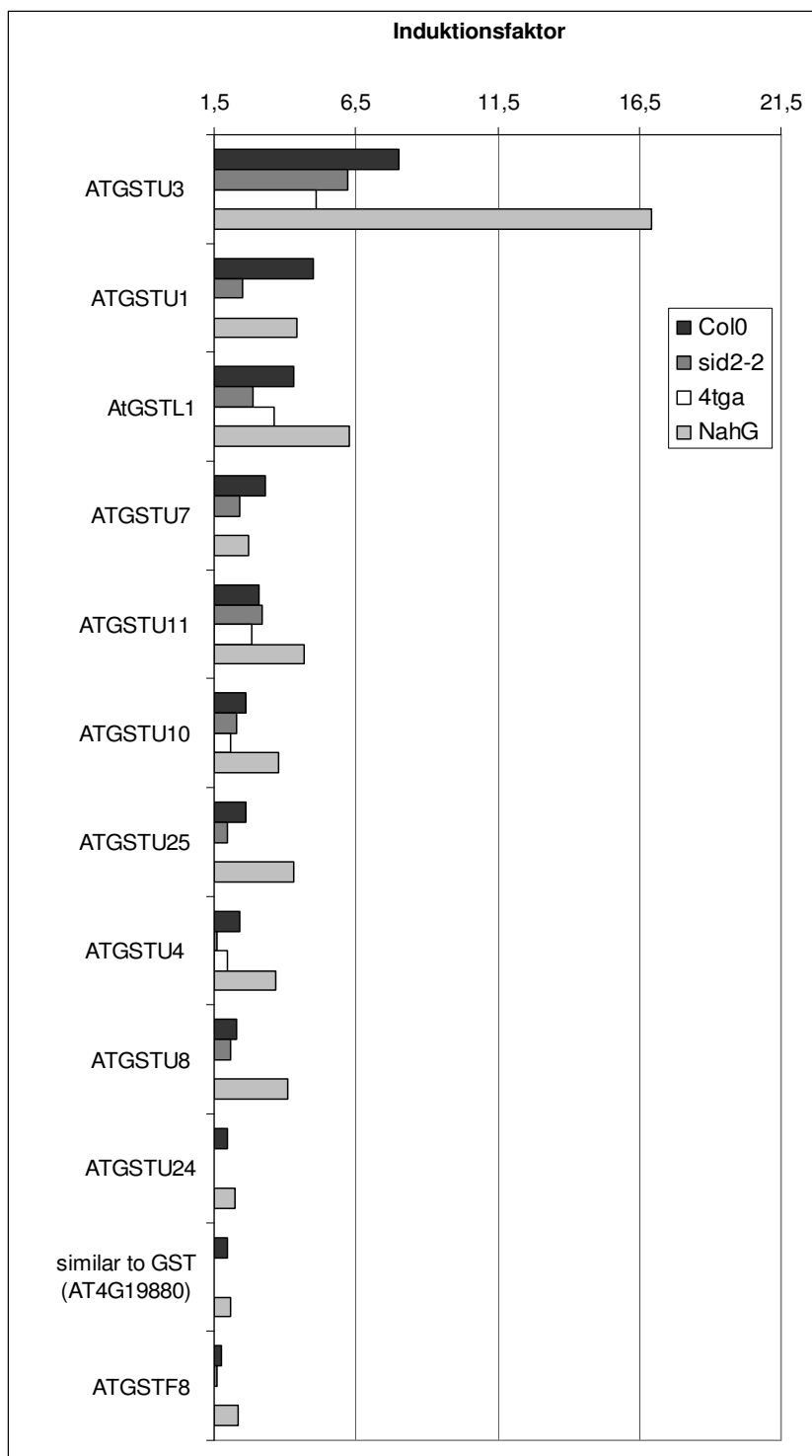


Abb. 3-25 Safenerinduktion verschiedener GSTs im Wildtyp (Col0) und Mutanten (*sid2-2*, *4tga*)

Die über das Microarray Experiment identifizierten Safenerinduzierbaren GSTs aus Col0, sowie das *AtIn2.1*-Gen, sind nach der Induzierbarkeit im WT sortiert von oben nach unten abgebildet. Die Induktionsfaktoren der GSTs in der Salizylsäure-Biosynthese Mutante (*sid2-2*) als auch der Quadrupel TGA-knockout Mutante (*4tga*) sind ebenfalls dargestellt.

3.7.5 TGA-Transkriptionsfaktor abhängige Safenerinduktion

Es wurde bereits gezeigt, dass die safenerinduzierte *In2.1*-Promotor Aktivität von TGA-Transkriptionsfaktoren abhängig ist (s. Kapitel 3.3). Durch den Vergleich der safenerregulierten Genexpression zwischen WT Pflanzen und der *4tga* Mutante kann man eine Aussage darüber treffen, inwiefern diese Transkriptionsfaktoren an der Regulation anderer safenerinduzierter Gene beteiligt sind. Mit einem Venn Diagramm werden die 541 safenerregulierten Gene des WT mit den 270 safenerregulierten Genen der *4tga* Mutante verglichen (s. Abb. 3-26 und Kapitel3.7.2).

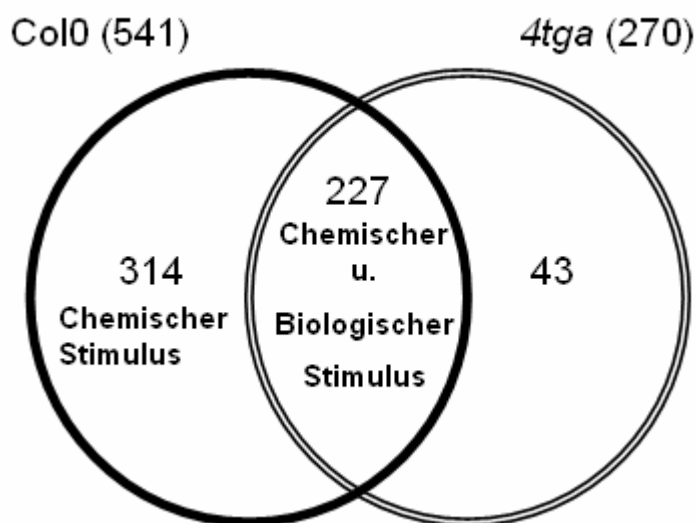


Abb. 3-26 Vergleich der Safener regulierten Gene im WT und *4tga*

Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, wurden die gemeinsamen 227 und die in Col0 314 differenziell safenerregulierten Gene, über einen exakten Fisher Test verschiedenen Kategorien im Bezug auf einen biologischen Prozess zugeordnet.

Aus diesem Diagramm ist ersichtlich, dass etwa die Hälfte der im WT safenerresponsiven Gene über einen TGA-Transkriptionsfaktor abhängigen Signalweg reguliert werden. Führt man einen exakten Fisher Test für die im WT und *4tga* koregulierten 227 Gene durch, so findet man statistisch überrepräsentiert Gene der Gruppen „Abwehr-Antwort“, „chemischer Stimulus“ und „Antwort auf Bakterium“. Die im WT abhängig von TGA-Faktoren regulierten 314 Gene gehören jedoch hauptsächlich zu einer Gruppe von Gene, die auf einen „chemischen Stimulus“ reagieren.

3.7.6 Salizylsäure abhängige Safener Induktion

Die Induzierbarkeit des *In2.1*-Promotors zeigte eine deutliche Abhängigkeit vom endogenen Salizylsäure-Gehalt (Kapitel 3.4). Der Einfluss der endogenen SA-Konzentration auf die safenerregulierte Genexpression wurde daher, verglichen mit dem WT, in den bereits verwendeten SA-Biosynthesemutanten (*sid2-2*, *NahG*) untersucht (s. Abb. 3-27 a,b).

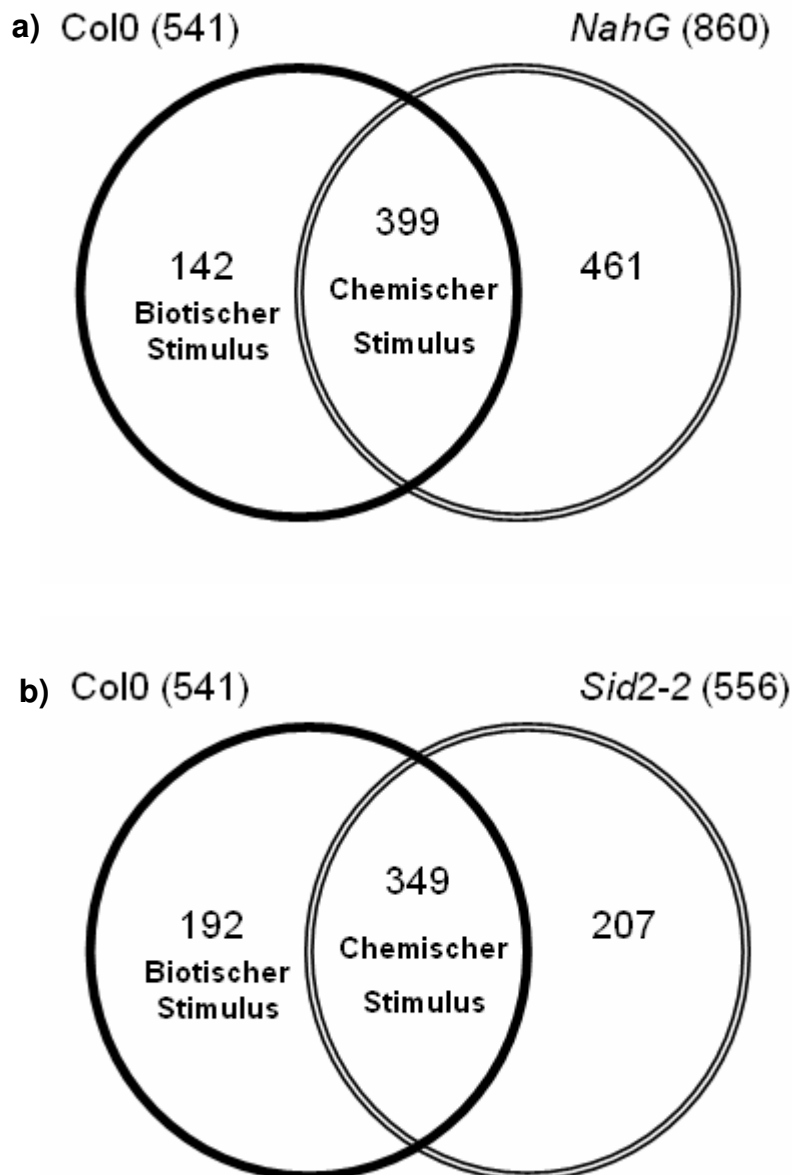


Abb. 3-27 a) Vergleich der Safener regulierten Gene in Col0 und *NahG*

b) Vergleich der Safener regulierten Gene in Col0 und *sid2-2*

Wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben, wurden die gemeinsamen und die in Col0 differenziell safenerregulierten Gene, über einen exakten Fisher Test verschiedenen Kategorien im Bezug auf einen biologischen Prozess zugeordnet.

Es ist auffallend, dass der größere Teil der safenerregulierten Gene in den Mutanten und WT Pflanzen gleich ist. Eine Mutation im Salizylsäurebiosynthese-Weg hat

offensichtlich einen geringeren Effekt auf die safenerinduzierte Genexpression als ein Knockout von 4 TGA-Faktoren (Kapitel 3.7.5). Nur etwa ein Drittel der safenerregulierten Gene kann in den beiden SA-Biosynthese Mutanten nicht mehr induziert werden (s. Abb. 3-27 a,b). Diese SA-abhängigen Gene gehören hauptsächlich zu einer Gruppe von Genen, die auf einen biotischen Stimulus reagieren. Die Gene, die zur Kategorie „Antwort auf einen chemischen Stimulus“ gehören, zeigen jedoch keine Abhängigkeit vom internen Salizylsäure Level. Es kann somit bestätigt werden, dass die safenerregulierten Gene hauptsächlich zwei Gruppen zugeordnet werden können (s. auch Kapitel 3.7.3). Zum einen ist dies eine Gruppe von Genen, die auch durch andere chemische Stimuli induziert werden können, und deren Safenerinduzierbarkeit unabhängig vom endogenen Salizylsäure Level ist. Und zweitens werden Gene der zweiten Gruppe, die abhängig vom endogenen Salizylsäure Level reguliert werden, auch durch biotischen Stress induziert. Somit scheint die Regulation des *In2.1*-Promotors der Regulation der zweiten Gruppe anzugehören.

3.8 Screeningsystem für Safenersignalweg Mutanten

In dieser Arbeit wurde der *In2.1*-Promotor in verschiedene, bereits charakterisierte *Arabidopsis* Mutanten transformiert um den Einfluss dieser Mutationen auf die Promotoraktivität zu untersuchen. Ein Mutanten-Screening bietet zusätzlich die Möglichkeit, auch bislang noch unbekannte Mutationen zu finden, die einen Einfluss auf den Safenersignalweg haben. Es sollten daher verschiedene Reportergene, unter Kontrolle des *In2.1*-Promotors, für ein späteres Screening-System nach Safenersignalweg-Mutanten getestet werden. Neben dem bereits für diese Arbeit verwendeten *GUS*-Reportergen, wurde ein Deacetylase (*DEAC*)-, Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (*PAT*)- und Luciferase (*Luc*)-Reportergen eingesetzt (s. Abb. 3-28).

Das *DEAC*-Reportergen ist für ein dominant negatives Selektionssystem geeignet. In Pflanzen wurden bisher nur wenige Suizidsysteme verwendet, ein Beispiel ist das bereits in Kapitel 3.4 beschriebene *tms2*-Gen, mit welchem die *sai1-1* Mutante selektiert wurde (Shah *et al.* 1997). Das Genprodukt setzt hier die ungiftigen Substrate Naphtylacetamid und Indolacetamid zu den in hohen Konzentrationen toxischen Produkten Naphtylelessigsäure bzw. Indolessigsäure um (Depicker *et al.* 1988, Karlin-Neumann *et al.* 1991). Der Nachteil dieses Suizidsystems ist die relativ hohe Hintergrundaktivität unspezifischer Hydrolasen die ebenfalls diese toxische Reaktion katalysieren. Das *DEAC*-Reportergen hydrolysiert das ungiftige Pro-Herbizid *N*-Acetyl-Phosphinothricin (*N*-Ac-BASTA) und setzt das Herbizid Phosphinothricin (BASTA) frei

(Bartsch *et al.* 1996, Kriete *et al.* 1996). Diese Aminosäuredeacetylase wurde aus einem Bakterienstamm isoliert (*Stenotrophomonas spce.*), welcher aus einer Bodenprobe in Frankfurt unweit des Hoechst-Geländes bei Tor Süd gewonnen wurde (Bartsch *et al.* 1996).

Reportergergen	Marker für die Safenerinduzierte Reportergergenaktivität	Beispielbilder	
		- Safener	+ Safener
a) <i>GUS</i>	Blaue Blätter	+ x-Gluc 	+ x-Gluc 
b) <i>Deac</i>	Umwandlung des Pro-Herbizids in ein Herbizid (BASTA)	+N-Ac-BASTA 	+ N-Ac-BASTA 
c) <i>Pat</i>	Resistenz gegen ein Herbizid (BASTA)	+ BASTA 	+ BASTA 
d) <i>Luc</i>	Lumineszenz	+ Luciferin 	+ Luciferin 

Abb. 3-28 Verschiedene Reportergergensysteme

(a) Die Safener induzierte β -Glucuronidase (*GUS*) Aktivität ist über eine histochemische GUS-Färbung nachweisbar (Die Umsetzung der Substrates x-Gluc führt zur Blaufärbung der Blätter). (b) Nach Aktivierung der Deacetylase (*DEAC*) wird das Pro-Herbizid N-Ac-BASTA deacetyliert und in das aktive Herbizid BASTA überführt. Diese Umwandlung hat letale Folgen für die transgenen Pflanzen. (c) Die Safenerinduzierte Expression der bakteriellen Phosphinothricin-Acetyl-Transferase (*PAT*), führt zur Inaktivierung von BASTA (Glufosinat) und somit der Resistenz der Pflanzen. (d) Die safenerinduzierte Luciferase-Aktivität dekarboxyliert das Substrat Luciferin. Die bei dieser Reaktion entwickelte Biolumineszenz kann mit einer CCD-Kamera dargestellt werden.

In Anlehnung an ein bereits beschriebenes Screening-System für das *DEAC*-Reportergergen (Brenner 2002), wurden Versuche mit 4-6 Wochen alten T1-*P_{In2.1}:DEAC* und T1-*P_{35S}:DEAC*-Pflanzen durchgeführt (s. Kapitel 2.2.9.4). Hierbei wurden zunächst 3 Wochen unter Langtagbedingungen in Erde kultivierte Pflanzen an einem Tag mit dem Safenermix Mef/Isoxa behandelt und 1-2 Tage später mit N-Ac-BASTA besprüht. Als Kontrolle diente eine Gruppe von T1-*P_{In2.1}:DEAC* Pflanzen, die nur mit N-Ac-BASTA behandelt wurde, als Positiv-Kontrolle wurden Pflanzen mit *P_{35S}:DEAC*-Konstrukt eingesetzt. Die abwechselnde Behandlung mit (oder ohne) Safener und N-Ac-BASTA wurde 2 Wochen fortgesetzt.

Der Versuch mit den T1-Pflanzen verlief erwartungsgemäß: Safener- und N-Ac-BASTA behandelte T1-*P_{In2.1}:DEAC* Pflanzen zeigten, aufgrund der safenerinduzierten Expression des *DEAC*-Gens, eine Herbizidschädigung (s. Abb. 3-29b). T1-*P_{In2.1}:DEAC*

Pflanzen, die nur mit N-Ac-BASTA behandelt wurden, zeigten keine Herbizidschädigung, da ohne eine Applikation von Safenern das Reporter-gen nicht exprimiert wurde (Abb. 3-29c). Somit wurde auch das applizierte Pro-Herbizid nicht in das wirksame Herbizid BASTA umgesetzt. Pflanzen, die das *DEAC*-Gen konstitutiv exprimierten (T1-*P*_{35S}:*DEAC* Pflanzen, Abb. 3-29a), zeigen eine deutliche Herbizidschädigung.

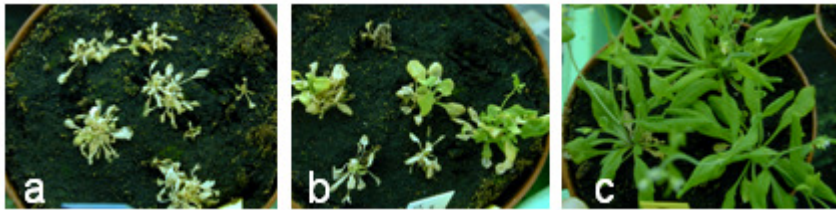


Abb. 3-29 DEAC-Aktivität in T1- *P*_{35S}:*DEAC* und *P*_{In2.1}:*DEAC* Pflanzen

Die T1-*P*_{35S}:*GUS* (a) und T1-*P*_{In2.1}:*DEAC* (b,c) Pflanzen wurden 3 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen, wie in Kapitel 2.2.9.4 beschrieben behandelt: Es erfolgte entweder eine Behandlung nur mit N-Ac-BASTA (a und c) oder abwechselnd mit den Safenern Mefenpyr/Isoxadifen und N-Ac-BASTA (b).

Obwohl die Versuche für T1-Pflanzen mit *P*_{In2.1}:*DEAC* Konstrukt erwartungsgemäß verliefen (Abb. 3-29), konnten keine für ein Mutantenscreening geeigneten homozygoten T2-Linien gefunden werden. In dieser Generation trat das eingangs erwähnte Problem der Hintergrundexpression des (*GUS*)-Reporter-gens in den Keimblättern auf (s. Kapitel 3.1). Diese geringe Reporter-genexpression in BF-behandelten Pflanzen (Abb. 3-30a) führte dazu, dass das applizierte N-Ac-BASTA in das systemisch wirkende Herbizid BASTA umgesetzt wurde und die komplette Pflanze stark schädigte. Diese Pflanzen konnten nicht mehr von Pflanzen unterschieden werden, die mit Safener und N-Ac-BASTA behandelt worden waren (Abb. 3-30 b). Beide Behandlungen führten zu gleich starken Schäden wie in Pflanzen mit konstitutiver *DEAC*-Expression (*P*_{35S}:*DEAC*-Pflanzen, Abb. 3-30d).



Abb. 3-30 DEAC-Aktivität in T2- *P*_{35S}:*DEAC* und *P*_{In2.1}:*DEAC* Pflanzen

Die T2-*P*_{In2.1}:*DEAC* (a-c) und T2-*P*_{35S}:*GUS* (d) Pflanzen wurden 3 Wochen unter Langtagbedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen, wie in Kapitel 2.2.9.4 beschrieben behandelt: Es erfolgte entweder eine Behandlung nur mit N-Ac-BASTA (d) oder abwechselnd mit Blindformulierung (a) oder Mefenpyr/Isoxadifen (b) und N-Ac-BASTA. Zur Kontrolle blieb ein Topf T2-*P*_{In2.1}:*DEAC* Pflanzen (c) völlig unbehandelt.

Die Etablierung eines geeigneten Screeningsystems für das Herbizidresistenz-Gen *PAT* (aus *Streptomyces viridochromogenes*) konnte aus den gleichen Gründen nicht verwirklicht werden. Die safenerinduzierte Expression dieser Transferase führte zur Inaktivierung des Herbizides „BASTA“ (Glufosinat, s. Kapitel 2.2.9.4), und durch die Hintergrundexpression in den Keimblättern auch zu einer Resistenz in mit BF-behandelten Pflanzen.

Als geeignetes Reporter-gen für ein Mutantenscreening konnte das *Luc*-Gen (aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis*) etabliert werden. In Gegenwart von ATP und Mg^{2+} katalysiert dieses Enzym die oxidative Decarboxylierung von Luciferin, hierbei entstehen „Lichtblitze“ die zur Biolumineszenz der Pflanzen führen.

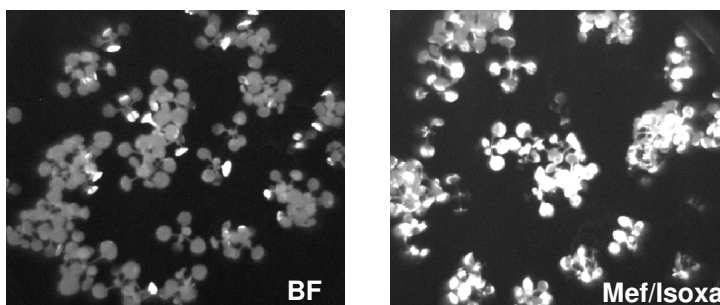


Abb. 3-31 Safener induzierbare Luciferase-Reporterexpression

Zwei Wochen steril auf Agar angezogene homozygote *P_{In2.1}:Luc#16* Pflanzen wurden 2 Tage nach Applikation von Blindformulierung (BF, links) bzw. Safenern (Mefenpyr/Isoxadifen, rechts) mit Luciferin besprüht. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (RayTest) und der sensitiv CL-Raytest-Methode aufgenommen.

Die safenerinduzierte Expression des *Luc*-Gens führt, 2 Tage nach Safenerbehandlung, zu einer deutlich erkennbaren Biolumineszenz der homozygoten *P_{In2.1}:Luc*-Pflanzen (Abb. 3-31 rechtes Bild, Behandlung s. Kapitel 2.2.9.3). *P_{In2.1}:Luc*-Pflanzen, die mit BF behandelt wurden, zeigen keine so deutliche Lumineszenz, sondern nur die bereits erwähnte Hintergrundexpression in den Kotyledonen (Abb. 3-31, links).

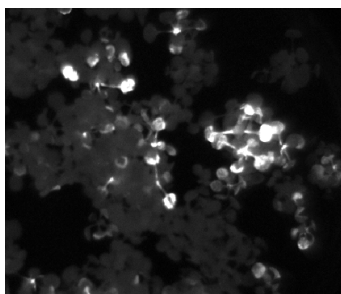


Abb. 3-32 Simuliertes Mutantenscreening für Pflanzen mit Luciferase-Reportergen

WT und *P_{In2.1}:Luc#16* Pflanzensamen wurden gemischt und 3 Wochen steril unter Langtagbedingungen kultiviert. 2 Tage nach der Applikation von Safenern wurden die Pflanzen über die Applikation des Substrates Luciferin auf Biolumineszenz untersucht. Die Aufnahmen wurden mit einer CCD-Kamera (RayTest) und der sensitiv CL-Raytest-Methode aufgenommen.

Die $P_{In2.1}$:Luc Pflanzen sind für ein „gain-“ und „loss-of-function-Screening“ nach Safenersignalweg Mutanten einsetzbar. Nach der Mutagenese würde man bei einem „loss-of-function Screening“ nach Pflanzen suchen, die nach Safenerapplikation keine Biolumineszenz mehr aufweisen. Mit einem „Gain-of-function-Screening“ könnten mögliche Repressoren des Safenersignalweges identifiziert werden. Pflanzen mit einer solchen Mutation würden auch ohne Safenerapplikation das Reporter gen konstitutiv exprimieren. Um dieses Screening-System zu simulieren wurden $P_{In2.1}$:Luc Pflanzen gemischt mit WT-Pflanzen auf einer Agarplatte auf safenerinduzierbare Biolumineszenz überprüft (Abb. 3-32). Eine eindeutige Unterscheidung von Pflanzen mit und ohne Reporter genexpression war in diesem System möglich.

4 Diskussion

4.1 Screeningsystem für Safenersignalweg Mutanten

Es gibt mehrere Möglichkeiten um nach regulatorischen Elementen des Safenersignalweges zu suchen. Zum einen kann man den Einfluss bereits bekannter Mutationen auf den Signalweg untersuchen, indem man das entsprechende Promotor-Reportergenkonstrukt in die jeweilige Mutante kloniert. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für die Charakterisierung des Safenersignalweges angewendet. Eine weitere Methode wäre das Screening nach unbekanntem Komponenten des Signalweges durch die Suche nach Mutanten, die eine Veränderung in der safenerabhängigen Expression eines Reportergens zeigen. Hierfür könnte man Samen einer geeigneten homozygoten Reportergermlinie einer Mutagenese unterziehen (z.B. einer EMS-Mutagenese). In der zweiten Mutanten-Generation würde man nach Pflanzen suchen, die verglichen mit dem Wildtyp, eine veränderte Reportergermlinienexpression nach der Behandlung mit den Safenern Mefenpyr und Isoxadifen aufweisen. Dies beinhaltet Mutanten, die ohne Safenerbehandlung eine konstitutive Reportergermlinienexpression zeigen (sog. „gain of function“ Mutation). Oder nach Mutanten, in denen nach der Safenerapplikation keine Reportergermlinienaktivität mehr nachweisbar ist (sog. „loss of function“ Mutation).

Um in künftigen Versuchen ein solches Mutantenscreening durchführen zu können, wurden verschiedene Reportergermlinien getestet. Die Eignung des *DEAC*-Reportergermlinien als Suizidsystems in einem „loss-of-function screen“ wurde untersucht. Pflanzen, die das *DEAC*-Reportergermlinien unter Kontrolle eines safenerinduzierbaren Promotors exprimieren, können nach Applikation der Safener Mefenpyr und Isoxadifen das Pro-Herbizid N-Ac-BASTA in das letale Herbizid BASTA umwandeln und sterben. Es war jedoch nicht möglich einen entsprechenden Versuchsaufbau zu etablieren, da die Hintergrundexpression des Reportergermlinien dazu führte, dass auch nichtinduzierte Pflanzen das Proherbizid deacetylierten und somit geschädigt wurden. Ein weiterer Nachteil dieses Selektionssystems ist der aufwendige Versuchsaufbau, der eine mehrfache Behandlung der Mutanten mehrmals abwechselnd mit den Safenern und dem Substrat erfordert. Anders als *DEAC* führt Pat zu einer Inaktivierung des Herbizides. Unter Kontrolle eines safenerinduzierbaren Promotors würde eine „gain of function“ Mutation im Safenersignalweg dazu führen, dass solche Mutanten auch ohne vorherige Applikation von Safenern eine Behandlung mit dem Herbizid BASTA überlebten, da in den entsprechenden Pflanzen das Resistenzgen konstitutiv exprimiert worden wäre. Auch in diesem Fall führte die Hintergrundaktivität des Reportergermlinien

bereits in unbehandelten Pflanzen zu einer Resistenz gegenüber dem Herbizid. Es konnte auch hier keine geeignete Konzentration des Herbizides gefunden werden, für welche eine klare Differenzierung zwischen safenerinduzierter Resistenz und Resistenz aufgrund der Hintergrundexpression getroffen werden konnte.

Das GUS-Reportergen ist für ein Mutantenscreening ungeeignet, da man erst Teile der Pflanze abnehmen und über Nacht färben müsste, um Mutanten zu identifizieren. Ebenfalls ist das Substrat x-Gluc recht teuer und diese Methode eignet sich nicht für Untersuchungen im großen Maßstab.

Als geeignetes Reporter gen für ein späteres Mutantenscreening wurde das Luciferasegen gefunden. Mit diesem Gen lassen sich sowohl loss- als auch gain-of-function Mutanten identifizieren: Pflanzen, die eine Mutation tragen, welche zur konstitutiven Expression des Reporter gens führt, würden auch ohne Safenerapplikation nach Behandlung mit Luciferin leuchten (s. auch Abb. 3-32). Mutanten mit einer Mutation im Safenersignalweg würden trotz vorheriger Applikation von Mefenpyr und Isoxadifen nach Behandlung mit Luciferin nicht mehr leuchten, und wären ebenfalls klar von den WT-Pflanzen zu unterscheiden. Dieses System ist einfach und schnell durchzuführen, Safener und Substrat müssen nur einmalig appliziert werden und die Aufnahme eines Bildes mit der CCD-Kamera Stella von Raytest dauert nur 1 min. Für die Mutagenese der Pflanzen bietet sich die klassische EMS-Mutagenese als auch eine Fast Neutron Mutagenese an. Die EMS-Mutagenese führt zu Einzelbasen-Mutationen, die später aufwendig durch Rückkreuzungen kartiert werden müssen. Die Fast Neutron Mutagenese führt zu Deletionen im Kilobasen Bereich, diese Mutationen lassen sich mit einem Tiling-Array einfach nachweisen (Hazen *et al.* 2005).

4.2 Induzierbarkeit des In2.1-Promotors durch verschiedene Safener und Salizylsäure

Der Einsatz von Herbiziden ist für die Kontrolle von Schad- und Unkräutern unerlässlich. Besonders wichtig sind hierbei selektive Herbizide, die nur gegen bestimmte Zielunkräuter wirken, ohne die Kulturpflanze zu schädigen. Die Entwicklung neuer selektiver Herbizide ist jedoch mit einem enormen Zeit- und Kostenaufwand verbunden. Der Einsatz der Safener-Technologie ermöglicht es, sogenannte „intelligente“ Herbizide zu entwickeln. Die Beimischung von Safenern zu bekannten, bislang nicht-selektiven Herbiziden, führte zur Entwicklung neuer Produkte (z.B. MaisTer®, Atlantis®, Puma®), die zwischen Nutz- und Schadpflanzen unterscheiden können. Ein Beispiel ist Atlantis®, diese Herbizid-Safener-Mischung ermöglicht die

Bekämpfung von Ungräsern in Getreide, welche botanisch selbst zu den Gräsern gehören. Die Wirkung der Herbizid-Safener beruht hierbei auf einem nur in der Kulturpflanze erhöhten Herbizidmetabolismus. Safener erhöhen hierbei sowohl die Aktivität von Glutathion-S-Transferasen, als auch die Konzentration des benötigten Kosubstrates GSH (Yenne and Hatzios 1990, Fuerst *et al.* 1991, Fuerst *et al.* 1993, Jepson *et al.* 1994, Miller *et al.* 1994, Schröder and Pflugmacher 1996, Richers *et al.* 1997).

Die Safener-Induktion der herbiziddetoxifizierenden GSTs erfolgt hierbei in allen Geweben. Vor allem in der Blattoberfläche der Pflanzen, welche durch Herbizide angegriffen wird (Jepson *et al.* 1994, Dixon *et al.* 1998). In Weizen (*Triticum tauschii*) ist jedoch die Koleoptile, eine Struktur die den sich entwickelnden Spross umschließt, der Ort der Safener induzierten Herbiziddetoxifizierung (Riechers *et al.* 2003). Auch in dikotylen Pflanzen wurde die Induktion von GSTs und dem Kosubstrat GSH nach Safenerbehandlung untersucht. Durch eine 24 h stündige Inkubation (u.a. mit Benoxacor) wurde beispielsweise in *Arabidopsis* Zellkulturen und Pflanzen eine Erhöhung der GSH-Konzentration festgestellt. Die Expression von herbiziddetoxifizierenden Enzymen in *Arabidopsis* Wurzeln wurde ebenfalls nachgewiesen (DeRidder *et al.* 2002). In der Erbse sind herbiziddetoxifizierende GSTs ebenfalls nur in den Wurzeln safenerinduzierbar (Edwards 1996). Durch Safener werden im Soja-Blattgewebe zwar GSTs induziert, diese haben allerdings keine Aktivität gegenüber Herbiziden (Andrews *et al.* 2005).

Sowohl die Safener Mefenpyr und Isoxadifen, als auch Benoxacor werden in Mais eingesetzt. Benoxacor erhöht die GST Aktivität gegen Metolachlor und schützt so die Pflanzen vor der Schädigung durch das Herbizid (Fuerst *et al.* 1993). Auch für die Safener Mefenpyr (Scalla and Roulet 2002) und Isoxadifen ist eine Induktion spezifischer GSTs in verschiedenen monokotylen Pflanzen nachgewiesen worden (unveröffentlichte Ergebnisse Dr. Bartsch). In dieser Arbeit und der vorangegangenen Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass die in Mais eingesetzten Herbizidsafener Mefenpyr und Isoxadifen den aus Mais stammenden *In2.1*-Promotor auch in *Arabidopsis* induzieren können. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit auch nach Benoxacorbehandlung eine ähnlich hohe Induktion des *In2.1*-Promotors in transgenen *Arabidopsis* nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.1). DeRidder und Goldsbrough (2006) beschrieben für mit Benoxacor behandelte *Arabidopsis* Pflänzchen eine vornehmlich auf die Wurzel beschränkte gesteigerte Expression einer tau-Klasse *Arabidopsis* GST (*AtGSTU19*), und begründeten mit dieser gewebespezifischen GST-Expression die mangelnde Safenerwirkung in Dikotylen. Das unter der Kontrolle des *In2.1* - Promotors

exprimierte β -Glucuronidase Reportergen konnte in der vorliegenden Arbeit durch alle getesteten Safener in Blättern und Wurzeln aktiviert werden. In allen bisherigen Studien wurden die *Arabidopsis* Pflanzen oder Zellkulturen 24 h lang mit dem Safener inkubiert, die Genexpression bzw. Proteinexpression wurde anschließend untersucht. Safener wirken jedoch sehr schnell auf der Transkriptionsebene (nach 4-6 h; unveröff. Ergebnisse Dr. Bartsch), weshalb ein früherer Zeitpunkt zur Untersuchung der GST-Induktion in *Arabidopsis* sinnvoller ist. In der vorliegenden Arbeit wurde zudem eine Applikationsmethode gewählt, die der tatsächlichen Sprühapplikation im Feld sehr Nahe kommt. Die Induktion weiterer *Arabidopsis* GSTs 8 h nach Safenerbehandlung im Blattgewebe konnte ebenfalls nachgewiesen werden (s. Kapitel 3.7).

Wie bereits durch Edwards *et al.* (2005) gezeigt werden konnte, wirken Safener in *Arabidopsis* weniger selektiv auf die Induktion von spezifischen GSTs und GTs als zum Beispiel in Weizen und Mais. Dies erklärt die in dieser Arbeit beobachtete Induktion des *In2.1*-Promotors durch Mefenpyr und Isoxadifen als auch Benoxacor.

Die Induzierbarkeit von GSTs verschiedener Klassen durch xenotiotische Substanzen wie Salizylsäure, Wasserstoffperoxid, Herbizide, Auxine und auxin Analoga ist in einer Vielzahl von Pflanzen, unter anderem *Arabidopsis*, nachgewiesen worden (Marrs, K.A. 1996, Wagner *et al.* 2002). Die Quantifizierung der β -Glucuronidase Aktivität nach Safener bzw. Salizylsäurebehandlung offenbarte eine deutlich höhere Induktion des *In2.1* GST-Promotors durch Salizylsäure verglichen mit den Safenern. Auch Hershey und Stoner (1991) konnten neben der Induktion der *In2.1* mRNA durch den Safener 2-CBSU eine Induktion des Gens durch Salizylsäure in Mais nachweisen. Diese parallele ist ein weiterer Beleg für konservierte Signaltransduktionsmechanismen zwischen mono- und dikotylen Pflanzen.

Eine exogene Applikation von Salizylsäure führt normalerweise zur Ausbildung der systemisch erworbenen Resistenz (White 1979). Diese erworbene Resistenz der Pflanze gegen ein breites Spektrum von Pilzen, Bakterien, Oomyceten und viralen Pathogenen (Durant and Dong 2004) dauert sehr lange an, teilweise sogar während der kompletten Lebenszeit der Pflanze (Sticher *et al.* 1997). Es ist durchaus denkbar, dass der Signaltransduktionsweg, welcher zur Ausbildung der SAR (systemisch erworbene Resistenz) führt, und der Safenersignalweg ähnliche Signaltransduktions-Elemente besitzen.

4.3 Charakterisierung des *In2.1*-Promotors

4.3.1 Ein 100 bp-Sequenzabschnitt mit zwei *as-1*-Elementen ist wichtig für die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors

Mit Hilfe einer Deletionsanalyse lassen sich genspezifische Sequenzmotive im Promotor eines Gens nachweisen. Diese Analyse kann sowohl in einem transienten Zell- und Gewebekultur Test als auch in transgenen Organismen, bei denen das zu untersuchende Deletionskonstrukt stabil in das Genom integriert ist, durchgeführt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Deletionsanalyse des *In2.1*-Promotors in transgenen *Arabidopsis thaliana* durchgeführt (3.2.1), da in einer Zellkultur keine gewebespezifische Expression (Wurzel/Blatt) nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden um 50 bis 100 bp verkürzte *In2.1*-Promotordeletionskonstrukte fusioniert mit dem GUS-Reportergen in *Arabidopsis* auf ihre Safenerinduzierbarkeit untersucht. Auffällig war der Verlust der Safener induzierten Reportergenexpression ab dem *P_{In2.1-A6}:GUS*-Konstrukt (-315). Wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt werden konnte, besitzt der *In2.1*-Promotor zwei *cis*-regulatorische Motive mit Sequenzähnlichkeit zu *ocs*- bzw. *as-1*-Elementen. Diese befinden sich auf einem 100 bp langen Promotorfragment, nach dessen Deletion die Safenerinduzierbarkeit komplett verloren geht. Die Ermittlung dieser *cis*-aktiven Promotor-Motive erfolgte mit Hilfe der Datenbank PLACE.

Das *ocs*-Element (der Octopinsynthese des Ti-Plasmid von *A.tumefaciens*) wird auch als *as-1*-ähnliches Element bezeichnet (Lam *et al.* 1989) und kommt in ähnlicher Form in den Promotoren der Mannopinsynthese und Nopalinsynthese (*nos*) von *A. tumefaciens* vor (Bouchez *et al.* 1989, Lam *et al.* 1990, Feltkamp *et al.* 1994). *As-1* ähnliche Elemente vermitteln die sofortige frühe Antwort auf SA, Xenobiotika und andere Stress verwandte Signale (Liu and Lam 1994, Qin *et al.* 1994, Xiang *et al.* 1996, Garreton *et al.* 2002) sowie auf oxidativen Stress (Garreton *et al.* 2002).

Das *ocs*-Element ist eine gut charakterisierte Enhancer Sequenz welche in den Promotoren einiger pflanzlicher GSTs gefunden wurde (Chen *et al.* 1996, Ulmasov *et al.* 1994, Takahashi *et al.* 1995, Van der Zaal *et al.* 1996): z. B. in den Promotoren der Glutathion-S-Transferasen *AtGSTF6* (Yang *et al.* 1998) und *AtGSTF8* (Chen *et al.* 1996, Chen and Singh 1999) aus *Arabidopsis thaliana*, den Tabak GST-Promotoren *GNT35/Nt103* (van der Zaal *et al.* 1987) und *parA/Nt114* (van der Zaal *et al.* 1987, Takahashi *et al.* 1989), sowie dem Glucosyltransferase Gen *IEGT* (Horvath and Chua 1996).

Das -406 *In2.1 ocs*-Element (bzw. -403 *as-1*-Element) besitzt große Sequenzähnlichkeit (86 % Sequenzübereinstimmung) zu einem *ocs*-Element der *Arabidopsis AtGSTF8*. Sowohl der *In2.1*-Promotor als auch der *AtGSTF8*-Promotor werden wenigen Stunden nach Behandlung mit dem Safener Benoxacor und Salizylsäure induziert (Chen and Singh 1999, DeRidder *et al.* 2002). Diese Ähnlichkeit in der Sequenz und Safenerinduzierbarkeit zwischen einem mono- und dikotylen Promotorelement ist ein Beleg für einen konservierten Safenersignalweg in Mono- und Dikotylen.

Das -327 *ocs*-Element (bzw. -323 *as-1*-Element) besitzt eine hohe Sequenzähnlichkeit zu einem Soja-GST *ocs*-Promotorelement (GH2/4).

Beide ähnlichen Soja und *Arabidopsis ocs*-Elemente wurden bereits durch verschiedene Studien auf ihre Funktionalität untersucht (Ellis *et al.* 1993, Ulmasov *et al.* 1994, Chen *et al.* 1999). Der GH2/4-Promotor zeigte nach Applikation von H₂O₂ und 2,4-D eine schnelle Induktionskinetik, denn eine Akkumulation des GH2/4-Proteins war bereits 8 h nach Behandlung mit 2,4-D nachweisbar (Ulmasov *et al.* 1995). Die zu den im *In2.1*-Promotor gefundenen ähnlichen *ocs*-Sequenzen gehören somit ebenfalls zu GST-Promotoren, die nach Applikation von Xenobiotika (2,4-D und Safener), als auch Salizylsäure eine schnelle Induktionskinetik aufweisen.

Ocs – bzw. *as-1*-ähnliche Elemente sind Bindestellen für TGA Faktoren (Niggeweg *et al.* 2000a, Johnson *et al.* 2001a, Pontier *et al.* 2001). Die als Tandem angeordneten Transkriptionsfaktor Bindungsstellen (TGACG) sind essentiell für die *ocs*-Element Aktivität (Ellis *et al.* 1993). Der 12 bp-Abstand zwischen diesen Bindungsstellen ist für die *in vivo* Aktivität essentiell. Dieser 12 bp Abstand ist in den *as-1*-Elementen des *In2.1*-Promotors ebenfalls konserviert (s. Abb. 4-1).

Es gibt auch *as-1*-ähnliche Elemente in den *PR1*-Promotoren von Tabak (*PR1a*; Strompen *et al.* 1998) und *Arabidopsis thaliana* (*PR1*). Die Distanz zwischen den TGACG-Palindromen ist im *PR1a*-Promotor aus Tabak auf 14 bp und im *PR1*-Promotor aus *Arabidopsis* auf 17 bp erweitert (Abb. 3-5). Der Abstand zwischen den TGACG Motiven ist in *PR-1* Promotoren somit länger und weniger konserviert (Krawczyk *et al.* 2002). Die funktionelle Analyse des *PR-1* Promotors erlaubte die Differenzierung zwischen den TGACG-ähnlichen Wiederholungen: Während das LS5-Element bei der basalen Repression des Gens involviert ist, hat das LS7-Element eine Bedeutung für die SA-vermittelte Aktivierung (s. Abb. 4-1; Lebel *et al.* 1998). Die beiden Elemente LS7 und LS5 können *in vitro* unabhängig voneinander TGA-Faktoren binden (Despres *et al.* 2000). Eine solche Differenzierung ist für die *as-1*-ähnlichen

Motive der GTs und GSTs mit einem 12 bp Abstand zwischen den TGACG-Palindromen nicht möglich.

Für die *in vivo* Interaktion von TGA-Faktoren mit dem *PR-1*-Promotor ist NPR1 essentiell (Johnson *et al.* 2003) und für diese Aktivität müssen beide TGACG-Motive vorhanden sein (Benfey *et al.* 1990, Neuhaus *et al.* 1994). Früh SA-induzierte Gene (wie GSTs und GTs), deren Promotoren ebenfalls *as-1*-ähnliche bzw. *ocs*-Motive enthalten sind unabhängig von NPR1 (Blanco *et al.* 2005). Durch eine vorherige Inkubation mit Cycloheximid konnte gezeigt werden, dass die sehr schnelle Induktion eines 35S CamV *as-1*:GUS Konstrukts durch SA unabhängig von einer *de novo* Proteinsynthese ist, wohingegen die *PR1* Induktion nicht mehr zu beobachten war (Qin *et al.* 1994).

IEGT38*	-407	$\overrightarrow{\text{TGACGAAT}}$	gcaa	$\overrightarrow{\text{TGACGTGA}}$	-388
IEGT35*	-104	$\overrightarrow{\text{AGACGTAT}}$	gcaa	$\overrightarrow{\text{CGACGTCA}}$	-85
GSTU7*	-48	$\overrightarrow{\text{TGACGTCA}}$	ccag	$\overrightarrow{\text{TGACGAAC}}$	-65
UGT75B1*	-130	$\overrightarrow{\text{TGACGTCT}}$	gcga	$\overrightarrow{\text{TGACGCTC}}$	-149
OPR1*	-97	$\overrightarrow{\text{TGACGTAT}}$	tcat	$\overrightarrow{\text{TGACGACA}}$	-116
OPR1*	-45	$\overrightarrow{\text{ATACGTCTG}}$	tcaa	$\overrightarrow{\text{TGACGACC}}$	-26
consensus		$\overrightarrow{\text{TGACGTCA}}$	nnnn	$\overrightarrow{\text{TGACGTCA}}$	
In2.1	-403	$\overrightarrow{\text{TTAGGTCA}}$	taga	$\overrightarrow{\text{TGACGACG}}$	-384
In2.1	-323	$\overrightarrow{\text{TGACACAA}}$	tcga	$\overrightarrow{\text{TTACGTCA}}$	-304
PR-1a Nt	-594	$\overleftarrow{\text{TAACGTCA}}$	tcgaga	$\overrightarrow{\text{TGACGGCC}}$	-574
PR-1 At	-636	$\overrightarrow{\text{TCTATGACGTAA}}$	gtaaaatag	$\overrightarrow{\text{TGACGTAGA}}$	-665
		LS7		LS5	

Abb. 4-1 Darstellung verschiedener *as-1*-ähnlicher Elemente Dargestellt sind die beiden *as-1*-Elemente des *In2.1*-Promotors (-403 und -323), die *as-1*-Elemente aus Promotoren früh Salizylsäure induzierbarer Gene aus *Arabidopsis* (mit einem Sternchen gekennzeichnete (*) Blanco *et al.* 2005) als auch die spät Salizylsäure induzierbaren *PR1*-Gene aus *Arabidopsis* (*PR1-At*) und Tabak (*PR-1a Nt*). Die beiden TGACG-Motive LS5 und LS7 des *PR1-At*-Promotors sind ebenfalls eingezeichnet.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich die *as-1*-Elemente des *In2.1*-Promotors strukturell und funktionell von den ebenfalls als *as-1*-Element bezeichneten Motiven des *PR1*-Promotors unterscheiden.

Blanco *et al.* (2005) konnten früh SA-induzierte (0,5 bis 4 h nach Applikation) Gene zwei Gruppen zuordnen: Gene der Gruppe 1, zu denen Glucosyltransferasen (GTs), GSTs, Transporter und Proteine des Lipid-Metabolismus zählten, enthielten in ihren Promotoren *as-1*-ähnliche Motive mit großer Sequenzähnlichkeit zu bekannten *ocs*-

Elementen (s. Abb. 4-1, Chen *et al.* 1996). Die Induktion dieser Gene wurde als NPR1-unabhängig und TGA-Transkriptionsfaktor abhängig beschrieben. Gene die der zweiten Gruppe angehören, hauptsächlich Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen, zeigten eine NPR1-abhängige Induktion nach Salizylsäure Behandlung und die Promotoren dieser Gene enthielten keine Motive die perfekt zu einer bekannten Pflanzenregulationssequenz passten. Im *PR1*-Regulon, einer Gruppe von 26 Genen welche mit *PR1* während der SAR ko-reguliert werden, lag das Vorkommen der TGACG-Motive in den entsprechenden Promotoren ebenfalls weit unter dem erwarteten Wert (Maleck *et al.* 2000). Einige *as-1*-Elemente, zu denen auch die im *In2.1*-Promotor enthaltenen zählen, werden durch verschiedene Substanzen aktiviert (SA, Auxine, 2,4-D, Safener), während *PR-1* Gene nur spät durch Aktivatoren der SAR aktiviert werden (Uquillas *et al.* 2004). Die im *In2.1*-Promotor gefundenen *as-1*-Elemente gehören in Bezug auf diese Charakteristika deutlich in die Gruppe der NPR1-unabhängigen, früh induzierbaren Elemente.

Die Induktionskinetik nach Applikation von Salizylsäure (und Safenern), das gemeinsame, strukturell ähnliche *cis*-regulatorische *as-1*-ähnliche Motiv als auch die zugehörigen Gene (wie GSTs und GTs) sprechen für gemeinsame regulatorische Elemente des Signaltransduktionsweges von früh Salizylsäure- und Safenerinduzierten Genen. Die Struktur des *ocs*-Elements ähnelt den tandem AP-1 Sites, für die in tierischen GST-Promotoren eine Antwort auf oxidativen Stress beschrieben ist (Daniel 1993, Ulmasov *et al.* 1994). Oxidativer Stress könnte durch die exogene Applikation elektrophiler Substanzen, wie Hormonen, inaktiven Hormonanaloga oder andere Substanzen induziert werden. Für SA wurde nachgewiesen, dass sie direkt mit einer Katalase interagiert und diese Interaktion zu erhöhten H₂O₂ Mengen und der Bildung von Reaktiven Sauerstoffspezies (Chen *et al.* 1993) führt. Es ist durchaus denkbar, dass Safener eine ähnliche Wirkung in Pflanzenzellen hervorrufen, und hierdurch die gemeinsamen SA- und Safener-Signalweg Elemente reguliert werden.

4.3.2 Die Deletion des *In2.1*-Promotor -406 *ocs*-Elements führt zu einer verminderten Safenerinduzierbarkeit

Die größte Ähnlichkeit zu einem bereits beschriebenen *cis*-regulatorischen Motiv wurde zum *ocs*-Element der *AtGSTF8* gefunden. Da diese GST ebenfalls nachweislich Safener- und Salizylsäureinduzierbar ist, wurde die Relevanz dieses *ocs*-ähnlichen (-406) Elements für die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors überprüft. Hierfür wurde ein Promotordeletionskonstrukt ohne das 26-bp Motiv erstellt und fusioniert mit

dem GUS-Reportergen in *Arabidopsis* transformiert. Homo- und heterozygote Pflanzen mit diesem mutierten Promotor zeigten in einem quantitativen GUS Test eine verringerte Safenerinduzierbarkeit im Vergleich zu Pflanzen mit dem WT-Promotor (Kapitel 3.2.3). Im histochemischen GUS Test war diese verringerte Induzierbarkeit teilweise nicht mehr deutlich nachweisbar. Dies könnte auf der längeren Inkubationszeit der histochemischen Färbung beruhen, oder aber es gibt weitere Faktoren, die für die Safenerinduzierbarkeit verantwortlich sind. Die Induzierbarkeit der *Arabidopsis* GSTF8 durch Salizylsäure wurde in transgenen Pflanzen ebenfalls nur zum Teil durch das im Promotor enthaltene *ocs*-Element vermittelt (Chen and Singh 1999). Der Nachweis erfolgte in diesem Experiment über eine 2 bp-Mutation in einer Hälfte des *ocs*-Elements von TGACG zu TtcCG. In den überirdischen Pflanzenteilen war die Induktion durch SA des mutierten und nicht-mutierten Promotors ungefähr gleich. In den Wurzeln war jedoch der WT-Promotor deutlich stärker durch SA induzierbar, als der Promotor mit der *ocs*-Mutation. Die Deletion des -406 *ocs* – Elements des *In2.1*-Promotors führte jedoch nachweislich zu keiner gewebespezifischen Beeinflussung der Reporterexpression nach Safenerapplikation.

Offensichtlich ist das -406 *ocs*-ähnliche Element des *In2.1*-Promotors, wie auch das sequenzähnliche *AtGSTF8* *ocs*-Element, nur zum Teil für die Safener- und Salizylsäureinduzierbarkeit der jeweiligen Promotoren verantwortlich. Um die Relevanz der beiden *In2.1-ocs*-Elemente (-406 und -327) für die Safenerinduktion zu testen, müsste ein zweites und drittes Deletionskonstrukt, in welchem entweder das -327 *ocs*-Element fehlt, oder beide Elemente deletiert oder mutiert wurden, erstellt und getestet werden.

4.3.3 Funktionalität des -406 *ocs*-Elements

Mit einem Minimalpromotor verlinkte *ocs*-Sequenzen aus Pathogen- oder Pflanzenpromotoren sind durch Salizylsäure, Auxin und inaktive Auxin Analoga induzierbar (Kim *et al.* 1994, Liu and Lam 1994, Qin *et al.* 1994, Ulmasov *et al.* 1994, Van der Zaal *et al.* 1996, Zhang *et al.* 1994). Auch für die beiden zum *In2.1*-Promotor sequenzähnlichen *ocs*-Sequenzen aus *Arabidopsis* und Soja konnte jeweils in Fusion mit einem Minimalpromotor die Funktionalität nachgewiesen werden (Ulmasov *et al.* 1994, Chen *et al.* 1999).

Für die weitere Charakterisierung des -406 *ocs*-ähnlichen Motives wurde ein Minimalpromotorkonstrukt, basierend auf dem *In2.1-A9*-Promotor (-130) mit einer

Tandemwiederholung des 26 bp *ocs*-Elements erstellt und stabil in das *Arabidopsis* Genom integriert (3.2.4). Eine Safener- oder Salizylsäure induzierte Reporterexpression war jedoch für T1-Pflanzen mit diesem Konstrukt nicht nachweisbar. In einem ähnlichen Experiment konnten Chen und Singh (1999) ein Konstrukt aus einem einzelnen *AtGSTF8 ocs*-Element fusioniert mit dem -58 *AtGSTF8*-Promotor eine deutliche Induzierbarkeit dieses Minimalpromotors durch Salizylsäure nachweisen. Anders als beim *In2.1*-Promotor enthält der *AtGSTF8* Promotor jedoch keine weiteren *ocs*-oder *as-1*-ähnlichen Elemente. Es besteht die Möglichkeit, dass für die Induktion des -403 *In2.1-ocs*-Elements durch Safener oder Salizylsäure weitere Bindungsstellen benötigt werden. Aufgrund der beschriebenen Funktionalität von *ocs*-Minimalpromotorkonstrukten verschiedener Spezies ist dies jedoch eher unwahrscheinlich. Im Fall des *In2.1*-Promotors besteht weiter die Möglichkeit, dass nicht (nur) das zur *Arabidopsis* GSTF8 sequenzähnliche *ocs*-Element die Safenerinduzierbarkeit steuert, sondern auch das zweite -327 *ocs*-Element, mit Sequenzähnlichkeit zum 35S CamV Promotor- bzw. der Soja-*ocs*-Promotorsequenz. Um die Funktionalität des -130 *In2.1-A9* Minimalpromotor nachzuweisen, müsste ein Fusionskonstrukt mit einem bereits als Salizylsäure induzierbar nachgewiesenen *as1*-Element erstellt werden.

Eine weitere Möglichkeit für einen gain-of-function-Versuch wäre die Integration eines der beiden *ocs*-Elemente in einen nicht Safener induzierbaren Promotor, z.B. der Ribulose-Bisphosphate-Carboxylase Untereinheit 3A (Qin *et al.* 1994).

4.4 TGA-Faktor abhängige Induktion des *In2.1*-Promotors

4.4.1 TGA-Transkriptionsfaktoren

In *Arabidopsis* gibt es etwa 75 Mitglieder der bZIP Transkriptionsfaktor Familie. Eine Klasse der bZIP Proteine die mit der Stressantwort in Verbindung stehen sind die TGA/octopin synthase (*ocs*)-Element-Bindungs Faktor (OBF) Proteine, allgemein TGA-Faktoren genannt (nach ihrer DNA-Bindestelle mit der Konsensus-Sequenz TGACG). Die TGA-Faktoren wurden zunächst als ASF-1 (activating sequence factor-1) annotiert, da sie in nukleären Zellextrakten vorkommen, die an *as-1*-ähnliche Sequenzen binden. TGA-Faktoren enthalten eine basische Domäne, welche für die Bindung an die DNA notwendig ist, und eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne mit Leucinresten an jeder siebten Position (leucin zipper, Landschulz *et al.* 1988). Die bisher in *Arabidopsis*

charakterisierten Faktoren haben teilweise Homologie zu TGA-Faktoren aus Tabak und Mais.

Klasse I TGA-Transkriptionsfaktoren

Zu Klasse I werden die TGA-Faktoren TGA1 (Schindler *et al.* 1992) und TGA4/OBF4 (Zhang *et al.* 1993) gezählt. Diese beiden Transkriptionsfaktoren binden nur in SA-induzierten Blättern an NPR1, diese Bindung beruht auf einer Reduktion von zwei Cys-Resten die nur in TGA1 und TGA4 vorkommen (Despres *et al.* 2003). Der zu TGA1 homologe Transkriptionsfaktor ist TGA1a aus Tabak (Katagiri *et al.* 1989).

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
Subklasse I	TGA1	TGA1a
	TGA4 (OBF4)	PG13
Subklasse II	TGA2 (AHBP1b)	TGA2.1
	TGA5 (OBF5)	TGA2.2
	TGA6	
Subklasse III	TGA3	

Abb. 4-2 Verschiedene TGA-Transkriptionsfaktor Subklassen in *Arabidopsis* und Tabak; Referenzen: TGA1 (Schindler *et al.* 1992), TGA1a (Katagiri *et al.* 1989), TGA4 (Zhang *et al.* 1993), PG13 (Fromm *et al.* 1991), TGA2 (Kawata *et al.* 1992), TGA2.1 (Niggeweg *et al.* 1997), TGA5 (Zhang *et al.* 1993), TGA2.2 (Niggeweg *et al.* 2000b), TGA6 (Xiang *et al.* 1995), TGA3 (Miao *et al.* 1994).

Klasse II TGA-Transkriptionsfaktoren

Die zweite Subklasse enthält die TGA-Faktoren TGA2/AHBP1b, TGA5/OBF5 und TGA6 (Kawata *et al.* 1992, Zhang *et al.* 1993, Xiang *et al.* 1995, Xiang *et al.* 1997). Die Tabak-homologen Faktoren sind TGA2.1 und TGA2.2 (Niggeweg *et al.* 1997, Niggeweg *et al.* 2000a, Niggeweg *et al.* 2000b). TGA1a, TGA2.1 und TGA2.2 können *in vitro* jede Kombination an denkbaren Hetero- und Homodimeren einnehmen. Jedes der beiden im *as-1*-Element enthaltenen TGACG-Motive kann von einem dieser Dimere besetzt werden, wobei die Besetzung mit nur einem TGA2.1-Homodimer ausgeschlossen ist (Niggeweg *et al.* 2000b). In Tabak führt die Überexpression von TGA2.2 und TGA2.1 zu verstärkter Expression früher Abwehrgene (Niggerweg *et al.* 2000b, Kegler 2001). Die Mutation der DNA-Bindedomäne des TGA2.2-Faktors reduziert die Expression früher wie später Abwehrgene (Niggerweg *et al.* 2000a). TGA-Faktoren spielen somit bei der Induktion von Xenobiotika responsiven Genen als auch *PR1* eine Rolle: Für den Klasse II Tabak TGA-Faktor TGA2.2 konnte gezeigt werden,

dass er NPR1-abhängige und – unabhängige Promotoren reguliert (Thurow *et al.* 2005, Butterbrodt *et al.* 2006).

Die Interaktion von TGA-Faktoren der Klasse II mit NPR1 konnte – durch Zwei-Hybrid-Versuche in Hefe - sowohl für die Transkriptionsfaktoren aus Tabak als auch aus *Arabidopsis* nachgewiesen werden (Niggerweg *et al.* 2000b, Zhou *et al.* 2000)

Klasse III TGA-Transkriptionsfaktoren

2,6-Dichloroisoinikotinsäure (INA) ist ein chemischer Induktor der SAR (Lawton *et al.* 1996). Die Beteiligung von TGA3 an der basalen sowie INA- induzierten *PR* Gen Expression wurde nachgewiesen (Keserwani *et al.* 2007).

4.4.2 *In vivo* Bindung von TGA2 und/oder TGA5 an den *In2.1*-Promotor (ChIP)

As-1-ähnliche *cis*-Elemente regulieren die Transkription von nukleären und *PR*-Genen als Antwort auf Stress und Pathogenbefall. TGA Faktoren, die spezifisch an *as-1*-Elemente binden sind wahrscheinliche Kandidaten für die Vermittlung der Transkription.

Durch das Chromatin-Immunopräzipitations-Experiment konnte eine Bindung der TGA-Faktoren TGA2 und/oder TGA5 an den Bereich –617 bis – 328 bp des *In2.1*-Promotors nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Sequenz liegt das -406 *ocs*-Element, welches ähnlich zum *ocs*-Element des *AtGSTF8* Promotors ist. Dieses *ocs*-Element kann in *Arabidopsis* von TGA5 bzw. OBF5 gebunden werden (Zhang *et al.* 1993). Die Bindung des TGA5 bzw. OBF5-Transkriptionsfaktors scheint auch an das Maispromotor *cis*-Element möglich zu sein. Da OBF5 große Ähnlichkeit zum Mais OBF3.1-Transkriptionsfaktor besitzt, ist eine Regulation des Safenerinduzierbaren *In2.1*-Promotors in Mais über OBF3.1 ebenfalls sehr wahrscheinlich.

Die Bindung von TGA2/5 an *as-1*-ähnliche Elemente einiger 2,4-D induzierter und NPR1-unabhängig regulierter *Arabidopsis* Gene wurde bereits nachgewiesen (Fode *et al.* 2008). Die entsprechenden *as-1*-ähnlichen Sequenzen der Promotoren sind ähnlich den im *In2.1*-Promotor gefundenen *as-1*-Motiven (Abb. 4-3).

Cyp81D11	-243	TGAC ATAT	gcaa	TGAC <u>ACA</u>	-224
GSTU7	-64	GTT CGTCA	ctgg	TGAC <u>GTCA</u>	-45
MtN19	-121	TGAC GAGA	gcgg	TGAC <u>GTCA</u>	-102
In2.1	-403	TTAG GTCA	taga	TGAC GACG	-384
In2.1	-323	TGAC ACAA	tcga	TTA CGTCA	-304

Abb. 4-3 As-1-Elemente die TGA2,5 binden

Fett gedruckt wurden die putativen TGA-Faktor Bindungsstellen im (+) und (-) Strang (mit Unterstreichung). Cyp81D11 (At3g28740), Mtn19 (At5g61820) und GSTU7 (At2g29430).

Die entsprechenden Gene können, ebenfalls wie die Gruppe der Safener induzierbaren Gene, dem Pflanzendetoxifizierungssystem (Phase I und II) zugeschrieben werden. In verschiedenen Studien konnte eine Induzierbarkeit von *as-1*-Elementen durch TGA-Faktoren nach der Applikation von xenobiotischem Stress nachgewiesen werden: Der TGA-Faktor TGA1a wird in Tabak durch xenobiotischen Stress aktiviert und vermittelt so die Genexpression in Wurzelspitzen (Klienedinst *et al.* 2000). Über ein ChIP-Experiment konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass dieser TGA-Faktor *in vivo*, nach herbizidinduziertem xenobiotischen Stress, vermehrt an die *as-1*-Elemente der GST-Promotoren *GNT1* und *GNT35* bindet. Sowohl diese Bindung als auch die Expression der entsprechenden Gene wurde durch den xenobiotischen Stress stark aktiviert. Eine *in vivo* Bindung von TGA1a an *PR1-a* konnte in diesem Experiment jedoch nicht nachgewiesen werden (Johnson *et al.* 2001a). Diese Beispiele und die hier nachgewiesene Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2/5) an den *In2.1*-Promotor sprechen für die Relevanz dieser regulatorischen Proteine für die Safenerantwort in Mono- und Dikotylen.

Eine Gemeinsamkeit der untersuchten xenobiotischen Chemikalien ist, dass sie einen halogensubstituierten aromatischen Ring haben, der mit Sulfhydryl Gruppen interagieren kann. Eine Änderung des Redoxzustandes der Zelle könnte somit allgemein die Genexpression steuern. Safener könnten also ebenfalls als elektrophile Substanz und über einen geänderten Redoxzustand der Zelle die Expression mancher Gene beeinflussen.

4.4.3 Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in der *4tga* Mutante (*tga2/3/5/6*, Kapitel 3.3.2)

TGA-Faktor Bindungsstellen finden sich sowohl im *In2.1*-Promotor als auch im Promotor von *PR1*. Die Regulation des *PR1*-Promotors durch verschiedene TGA-Faktoren ist bereits gut untersucht. Nachfolgend wird der Effekt der 4 fehlenden TGA-Faktoren auf die Regulation der beiden Promotoren verglichen.

Zwei TGA-Boxen sind wichtig für die *PR1*-Regulation (s. Abb. 4-1, Lebel *et al.* 1998). Eine dieser Boxen (LS7) dient als positives *cis*-Element, während die zweite (LS5) die *PR1* Transkription konstitutiv reprimiert. Die drei TGA Faktoren TGA2, TGA5 und TGA6 sind für die Etablierung der SAR essentiell. TGA2 und TGA3 binden *in vivo* nach SA-Behandlung an den *PR1* Promotor (Johnson *et al.* 2003). TGA3 könnte über die Bildung von Heterodimeren mit den Transkriptionsfaktoren TGA2, TGA5 und/oder TGA6 zur Entwicklung der SAR oder *PR1*-Regulation beitragen (Eulgem 2005). Die basale Expressionsstärke von *PR1* ist in unbehandelten *tga2/5/6* Pflanzen erhöht (Zhang *et al.* 2003). Offensichtlich spielen die TGA Faktoren auch eine Rolle für die negative Regulation der basalen *PR1*-Expression. In der Quadrupel Mutante (*4tga*), mit einem zusätzlichen knockout des TGA3 Transkriptionsfaktors, ist die basale *PR1* Expression (die in der triple Mutante (*tga2/5/6*) beobachtet werden kann) komplett geblockt (Kesarwani *et al.* 2007).

TGA-Faktoren sind nicht nur für die Regulation der SAR bzw. *PR1* bedeutend, sondern können auch mit *as-1*-Elementen interagieren, die in Genpromotoren des Detoxifizierungssystems enthalten sind (GSTs, z.B. *AtGSTF8* und *AtGSTU7*; Zhang *et al.* 1993, Fode *et al.* 2008). Eine *in vivo* Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2 und/oder TGA5 an das -406 *ocs*-Element des *In2.1*-Promotors wurde in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Dieses Element hat eine große Sequenzähnlichkeit mit dem *ocs*-Element aus dem *Arabidopsis GSTF8*-Promotor, für welchen bereits eine positive Regulation durch TGA5 bzw. OBF5 nachgewiesen werden konnte. Die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1* Promotors ist in der TGA knockout Mutante (*4tga*) deutlich reduziert und die basale Expression des gekoppelten GUS-Reportergens ist erhöht. TGA3 ist somit wahrscheinlich nicht, wie für *PR1* beobachtet, für die basale Regulation des *In2.1*-Promotors relevant. Um die Rolle der einzelnen Transkriptionsfaktoren für die Safenerinduzierbarkeit des Promotors zu verifizieren, müsste das *In2.1*-Promotorkonstrukt in verschiedene einfach- oder mehrfach-TGA-Knockout Linien transformiert werden.

4.5 NPR1-Unabhängigkeit des Safenersignalweges

4.5.1 NPR1, Schlüsselement der SAR

Ein wichtiges Element der Genexpressionsregulation während der SAR ist NPR1 (non expressor of *PR1*). NPR1 enthält zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen: Eine BTB/POZ-Domäne (broad complex, tram-track, bric-à-brac/poxvirus zinc finger) und eine Region mit vier Ankyrinmotiven (Cao *et al.* 1997, Ryals *et al.* 1997). Die *Arabidopsis* Mutante *non expressor of PR-1 genes (npr1)* wurde zum ersten Mal in einem Screen nach Pflanzen entdeckt, die nach SAR Induktion keine *PR*-Gene mehr exprimieren (Cao *et al.* 1994). Die Expression von vielen Genen die während der SAR hochreguliert werden, sind in der *npr1-1* Mutante betroffen (Maleck *et al.* 2000). Weitere Mutantenscreens nach SAR-Signalwegmutanten führten zur Entdeckung von *non-inducible immunity-1 (nim1)* und der zu *npr1* allelischen *salicylic acid insensitive mutant-1 (sai1)* (Glazebrook *et al.* 1996, Shah *et al.* 1997). NPR1 wird konstitutiv exprimiert und wird durch SA etwa 2-fach induziert (Cao *et al.* 1998). Durch die Bildung der Reaktiven Sauerstoffspezies zu Beginn der SAR ändert sich der Redoxzustand der Zelle. PR1 liegt im Zytoplasma als Oligomer vor (durch interne Disulfidbrücken stabilisiert), die Änderung der Redoxpotentials führt zur Reduktion von NPR1. Diese monomere Form akkumuliert im Nukleus und aktiviert durch die Interaktion mit TGA-Faktoren die Genexpression (Zhang *et al.* 1999) von *PR1* (s. Abb. 4-4).

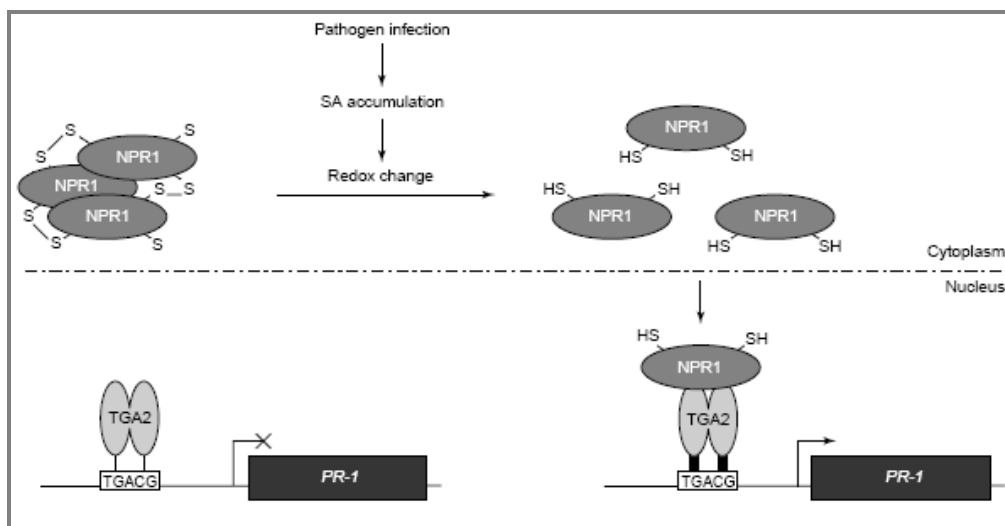


Abb. 4-4 Illustration der SA-vermittelten Redox-Regulation mit der PR-Genexpression. Das Modell zeigt in der oberen Hälfte die im uninduzierten Zustand im Zytoplasma vorliegenden inaktiven NPR1-Oligomere. Die Bindung von TGA-Transkriptionsfaktoren an das *as-1*-ähnliche Promotorelement (TGACG) ist für die PR1-Expression nicht ausreichend. Nach Pathogeninfektion wird interne Salizylsäure akkumuliert und in der Zelle entsteht eine reduzierende Umgebung. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Anhäufung von Antioxidanzien. Unter diesen Konditionen werden die intermolekularen Disulfidbrücken des NPR1-Oligomers reduziert und NPR1 geht in die monomere, aktive Form über. Die monomere NPR1-Form wird anschließend in den Nukleus transloziert und kann dort mit TGA-Transkriptionsfaktoren, wie TGA2, interagieren. Die Bindung von NPR1 an TGAs stimuliert und stabilisiert deren DNA-Bindung (dicke schwarze Balken), was zur Aktivierung der PR1-Genexpression führt (Abb. von Pieterse and Van Loon 2004).

4.5.2 NPR1 unabhängige Induktion des *In2.1*-Promotors

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, teilten Blanco *et al.* (2005) früh SA-induzierbaren Gene in zwei Gruppen ein. NPR1-unabhängig regulierte Gene die (wie GTs und GST) mit *as-1*-ähnlichen Elementen in ihren Promotoren. Und NPR1-abhängig regulierte Gene, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, ohne Anreicherung von *as-1*-Elementen in den entsprechenden Promotoren. Wie in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.1.1) wirken Safener hauptsächlich über die Induktion Herbizid-metabolisierender Gene, zu denen unter anderem auch GTs und GSTs gezählt werden. Durch die Transformation des $P_{In2.1}$:GUS Konstrukts in die *sai1-1* Mutante und den entsprechenden Wildtyp No-0 (Kapitel 3.4.2) konnte der Nachweis erbracht werden, dass sowohl die Safenerinduktion als auch die Induktion durch Salizylsäure des *In2.1*-Promotors unabhängig von NPR1 ist. Wie in Kapitel 3.2 beschrieben, sind im *In2.1*-Promotor *as-1*-ähnliche Elemente enthalten, die sich auch in den Promotoren anderer, früh Salizylsäure induzierbarer und NPR1-unabhängiger Genen finden (Droog *et al.* 1995, Chen and Singh 1999, Uquillas *et al.* 2004). Der Safenersignalweg könnte also mit dem frühen NPR1-unabhängigen SA-Signaltransduktionsweg überlappen.

TGA2 aus *Arabidopsis* (Rochon *et al.* 2006) und TGA2.2 aus Tabak (Thurow *et al.* 2005) haben keine Transaktivierungs-Domäne. Deshalb müssen andere Proteine (Koaktivatoren) die Transaktivierungsdomäne an dem TGA2/5/6-*as-1* Komplex bereitstellen. Der Koaktivator könnte über ein modifiziertes Yeast-two-Hybrid Screening gefunden werden (in Anlehnung an die von Fode *et al.* 2008 beschriebene Methode): Hierfür würde man eine 3-fach Kopie des *In2.1* (-406) -*as-1*-Elements stromaufwärts des *HIS3* Markergens (Weigel *et al.* 2005) integrieren und den TGA-Transkriptionsfaktor TGA2 trans-Expimieren. Da *as-1* gebundener TGA2-Faktor in Hefe nur sehr gering die Transkription aktiviert, würde der entsprechende Stamm ohne den Koaktivator nicht auf selektivem Medium wachsen.

4.6 Salizylsäure-Abhängigkeit der *In2.1*-Promotoraktivität

Aus vorangegangenen Versuchen ist ersichtlich, dass Salizylsäure den *In2.1*-Promotor induziert und dass es gemeinsame *cis*-Motive (*as-1*-Elemente) und Transkriptionsfaktoren (TGA-Transkriptionsfaktoren) zwischen dem Salizylsäure- und Safenersignalweg gibt (Kapitel 3.1, 3.2). Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wurde die Relevanz des endogenen Salizylsäuregehalts für die Aktivierung des Safenersignalweges in den Salizylsäure(biosynthese)-Mutanten *sid2-2* und *NahG*

untersucht. Nach der stabilen Integration des $P_{In2.1}$:GUS Konstruktes in das Genom der beiden Salizylsäure Biosynthese-Mutantenlinien *NahG* und *sid2-2* wurde die Safenerinduzierbarkeit der GUS-Reportergens mit Hilfe eines quantitativen GUS-Tests bestimmt (3.4.1).

4.6.1 Salizylsäurebiosynthese

Nach der Behandlung von Tabakpflanzen mit Salizylsäure (SA), Aspirin (Acetyl-SA) oder Benzoessäure werden *PR* Gene induziert und die Pflanzen sind resistent gegen Tabak-Mosaik-Virus (TMV)-Befall (White, 1979). Es konnte ebenfalls eine Korrelation zwischen der Akkumulation von SA und der Expression von *PR*-Genen nach Infektion von Tabakpflanzen mit TMV beobachtet werden (Malamy *et al.* 1990, Métraux *et al.* 1990). SA-Analoga wie INA und BTH können ebenfalls die gleiche Gruppe von *PR*-Genen induzieren (Friedrich *et al.* 1996, Görlach *et al.* 1996, Lawton *et al.* 1996, Ward *et al.* 1991).

Die Biosynthese von SA erfolgt über das im Shikimatweg gebildete Chorismat. Aus Chorismat wird über mehrere Zwischenstufen Phenylalanin gebildet. Die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure wird von der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) katalysiert. Nach weiteren Zwischenschritten bildet die Benzoessäure-2-Hydroxylase (BA2H) aus Benzoessäure Salizylsäure (Abb. 4-5). Früher wurde dieser Syntheseweg für die während der SAR akkumulierende Salizylsäure verantwortlich gemacht (Mauch-Mani and Slusarenka 1996, Yalpani *et al.* 1993, Coquoz *et al.* 1998, Ribnicky *et al.* 1998, Leon *et al.* 1995), obwohl SA immer noch produziert werden konnte, wenn dieser Signalweg inhibiert wurde (Mauch Mani and Slusarenka 1996, Coquoz *et al.* 1998). Manche Bakterien, wie *Pseudomonas aeruginosa* synthetisieren SA über eine Isochorismatsynthase (ICS) und Pyruvatlyase (Serino *et al.* 1995). Wildermuth *et al.* (2001) konnten in ihrer Studie der *Arabidopsis sid2-2* Mutante nachweisen, dass die für die SAR benötigte SA in *Arabidopsis* über Isochorismat synthetisiert wird (Abb. 4-5). Die Mutation der Isochorismatsynthase (kodiert durch ICS1; lokalisiert im Chloroplast) führt zu einer fehlenden SA-Akkumulation nach Pathogenbefall (Narwrath *et al.* 2002). Exogene Applikation von SA oder SA Analoga stellt die Resistenz in vielen Pflanzen mit einer Mutation oberhalb der SA Produktion wieder her (Parker *et al.*, 1996, Century *et al.* 1995).

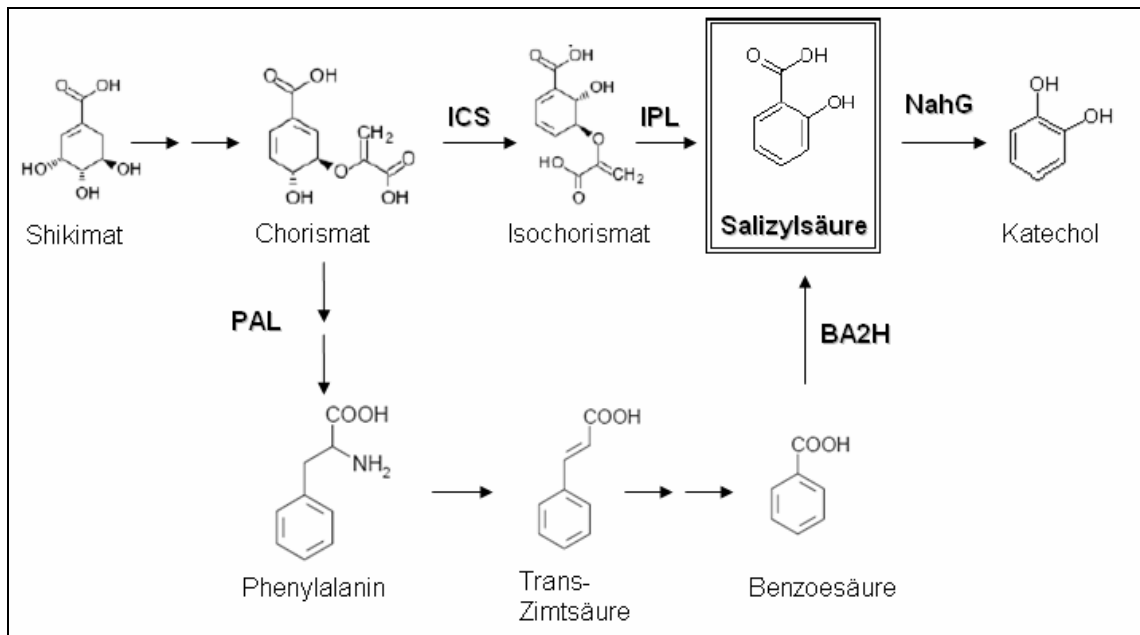


Abb. 4-5 Salizylsäure-Biosynthese Wege

Die Biosynthese ist in *Arabidopsis* über zwei Wege denkbar: im oberen Bildabschnitt ist die Synthese über die Isochorismatsynthase aufgezeigt: Chorismat wird katalysiert von der ICS (Isochorismatsynthase) zu Isochorismat umgewandelt und anschließend mit Hilfe der IPL (Isochorismat Pyruvatlyase) zu Salizylsäure umgesetzt. Die Expression des bakteriellen Gens *NahG* (Salizylsäurehydroxylase) führt zur Umwandlung von Salizylsäure zu Katechol. In der unteren Zeile ist die Synthese über Phenylalanin (Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)), Trans-Zimtsäure und Benzoessäure zu Salizylsäure (Benzoessäure-2-Hydroxylase (BA2H)) dargestellt.

Die Expression eines bakteriellen SA-Hydroxylase Genes (*NahG*) in Pflanzen führt zur Umwandlung von Salizylsäure in Katechol. Transgene *Arabidopsis* oder Tabakpflanzen, die dieses Gen exprimieren, akkumulieren nach einer Pathogeninfektion nur sehr geringe SA-Mengen und können keine SAR etablieren oder *PR*-Gene exprimieren (Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993). In *Arabidopsis* wird durch die Applikation von SA die SAR ausgelöst, ein Entfernen der SA durch das bakterielle Transgen *NahG* beseitigt die SAR (Dempsey *et al.* 1999, Ryals *et al.* 1996).

Der interne Salizylsäure-Gehalt steigt in Col0-Pflanzen 4h nach der Inokulation mit dem avirulenten *P. syringae* stark an und erreicht sein Maximum nach ca. 8 h (Lieberherr *et al.* 2003). Die *PR1*-Expression ist nach 8 h bereits nachweisbar und erreicht nach 12 h den maximalen Wert.

Nach Infektion mit dem virulenten biotrophen Pilz *Erysiphe* oder avirulenten Stämmen von *Pseudomonas syringae* liegt der Salizylsäure Gehalt in der *sid2-2* Mutante 5-10 % unter dem WT-Spiegel (Nawrath and Metraux 1999, Dewdney, J. *et al.* 2000). Die Expression des SAR-Markergens *PR1* ist in der *sid2-2* Mutante ebenfalls verringert (Nawrath and Metraux 1999, Dewdney *et al.* 2000). In *NahG*-Pflanzen führt die Inokulation mit *P. syringae* ebenfalls zu keiner Salizylsäureakkumulation (Lieberherr *et*

al. 2003). In dieser Mutante ist die Expression der ICS nachweislich nicht verändert jedoch wird keine SAR etabliert und kein *PR1* exprimiert (Wildermuth *et al.* 2001).

4.6.2 Induzierbarkeit des *In2.1*-Promotors in SA-Biosynthesemutanten

Eine veränderte interne Salizylsäurekonzentration hat einen drastischen Effekt auf die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors (3.4.1): In der *sid2-2*-Mutante ist keine Induzierbarkeit mehr nachweisbar, ebenso wie in 4 homozygoten *NahG*-Linien mit *P_{In2.1}*:GUS Konstrukt. In 3 der getesteten *NahG*-Linien war jedoch nach wie vor eine sehr geringe Induzierbarkeit des Promotors nachweisbar. Safener induzierbare Gene werden in der Regel nach 4-8 h exprimiert (unveröff. Ergebnisse Dr. Bartsch). Würden Safener zu einer Akkumulation von Salizylsäure führen hätte erhöhte Salizylsäuregehalt der Zellen einen sofortigen Effekt auf die Safener induzierten Gene. Anders als bei *PR1*, dessen Transkriptmenge erst 4-8 h nach der beginnenden Salizylsäureakkumulation beeinflusst wird.

Liebherr *et al.* (2003) untersuchten in einer Studie die SA-Abhängigkeit der Induktion von 2 SA-induzierbaren *Arabidopsis* Glutathion-S-Transferasen. Eine dieser GSTs ist *AtGSTF6*, welche häufig als allgemeiner Stressmarker verwendet wird. Die Expression dieser GST ist sowohl durch Pathogene (Alvarez *et al.* 1998, Greenberg *et al.* 1994, Maleck *et al.* 2000) als auch durch eine Reihe anderer Stress Faktoren (Kiyosue *et al.* 1993, Sharma and Davies 1994, Maleck *et al.* 2000, Wagner *et al.* 2002, Reymond *et al.* 2000) induzierbar. Diese GST ist 2h nach Inokulation mit *P. syringae* sowohl in Col0 (stark) als auch in *NahG* Pflanzen (etwas schwächer) induzierbar. Die Expression in *NahG* verringert sich jedoch nach weiteren 2-4 h und ist schließlich nicht mehr nachweisbar, während die Expression in Col0 weiter ansteigt. Die Expression von *AtGSTF6* wurde in dieser Studie ebenfalls als NPR1 unabhängig, bzw. nur teilweise NPR1-abhängig beschrieben. Auch der *In2.1*-Promotor zeigt eine NPR1-unabhängige Salizylsäure Induzierbarkeit. 2 d nach Behandlung von transgenen *NahG*-Pflanzen ist eine Reporterexpression in manchen Linien nachweisbar. Das β -Glucuronidase Reporter gen ist sehr stabil, und eine anfängliche GUS-Geninduktion 2-4 h nach Safenerbehandlung der transgenen *NahG* Pflanzen könnte zu der beobachteten geringen Reporterexpression in den Linien #4, #15, #17 geführt haben. Eine Untersuchung der Reporterexpression über eine real time PCR 2-8 h nach Safenerbehandlung im Vergleich zu Col0-Pflanzen würde hierüber Aufschluss geben. Eine weitere Möglichkeit ist eine verringerte Expression bzw. Aktivität der Salizylsäure-

Hydroxylase in diesen Linien. Allgemein haben *NahG* Pflanzen einen geringfügig höheren internen Salizylsäuregehalt als *sid2-2* Pflanzen (s. Kapitel 3.5). Eventuell hat der absolute Salizylsäuregehalt einen Einfluss auf den Redoxzustand der Zellen (Chen *et al.* 1993) und dieser wiederum ist für die Safenerinduktion des *In2.1* Promotors relevant.

4.7 Einfluss der Safener auf den internen Salizylsäure Gehalt

Da in den vorangegangenen Versuchen eine Abhängigkeit der *In2.1*-Promotoraktivität vom internen Salizylsäuregehalt festgestellt wurde, sollte nun der Einfluss der Safenerapplikation auf diesen Gehalt untersucht werden.

Die exogene Applikation von Salizylsäure (SA) führt zur Induktion der Resistenz gegen verschiedene Pathogene und der Expression eines Sets von SAR Genen (Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993). Es ist weiterhin belegt, dass synthetische Verbindungen wie INA und BTH die SAR in Pflanzen induzieren (Friedrich *et al.* 1996, Métraux *et al.* 1990). INA und BTH führen zur Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen und induzieren die Expression von SAR-Genen ohne die Akkumulation von SA im betreffenden Gewebe zu induzieren. Die biologisch aktivierte SAR wird hingegen sogar durch die Akkumulation von SA in gesundem Gewebe begleitet. Diese beiden chemischen Substanzen induzieren die SAR auch in transgenen *NahG* Pflanzen (Delaney *et al.* 1994, Gaffney *et al.* 1993). Die Untersuchungen mit *Arabidopsis* Mutanten zeigten, dass diese Verbindungen die SAR induzieren, indem sie den gleichen Wirkort „downstream“ der SA Akkumulation stimulieren, der für die Aktivierung des Signaltransduktionswegs der SAR-Entwicklung relevant ist (Lawton *et al.* 1996, Uknes *et al.* 1992, Vernooij *et al.* 1995).

In Asien wird die synthetische Verbindung Probenazole (PBZ, Fungizid) in Reis für die Kontrolle der sogenannten Brusone Krankheit, ausgelöst durch *Magnaporthe grisea*, verwendet. Da PBZ nur geringe antimikrobielle Wirkung gegenüber *M. grisea* aufweist, wurde vermutet, dass PBZ in Reis zur Induktion von Abwehrmechanismen führt (Ward *et al.* 1991, Watanabe 1997). Yoshioka *et al.* konnten 2001 nachweisen, dass PBZ als auch der aktive Metabolit 1,2-benzisothiazole-1,1,-dioxid (BIT) in *Arabidopsis* zur Entwicklung der SAR und Expression von *PR1* in Tabak führt. Dies geschieht durch eine Stimulation eines Signals „upstream“ der SA Akkumulation im SAR Signaltransduktionsweg (Yoshioka *et al.* 2001). Unter den Chemikalien die bisher als SAR Aktivatoren identifiziert wurden, stimulieren nur PBZ und BIT die Signaltransduktion der SAR-Entwicklung oberhalb der SA Akkumulation.

Obwohl die ICS zu den durch Safener induzierten Genen gehört (s. Anhang 7.4.3), wurde sogar eine Reduktion des internen Salizylsäuregehaltes nach Safenerbehandlung beobachtet. Eine durch die verwendeten Safener induzierte UDP-Glucosyltransferase (UGT; *AtUGT74F2*, s. Anhang 7.4.1) transferiert Glucose zur Carboxyl- als auch zur Hydroxylgruppe der Salizylsäure (Lim *et al.* 2002). Die spezifische Aktivität der Synthese des Glucosylesters ist jedoch 10-fach höher. Nur zwei der von Li *et al.* (2002) getesteten Enzyme konnten die 2-OH Position der Salizylsäure des Benzenringes glucosylieren: *AtUGT74F2* und *AtUGT74F1*, letztere hat eine hohe Sequenzähnlichkeit mit *UGT74F2* (> 82 % Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäuresequenz). Untersucht man den phylogenetischen Baum der *Arabidopsis* UGTs auf Homologie zur Tabak UGT der Salizylsäure (Lee and Raskin 1999) so erhält man genau den Zweig welcher diese beiden UGTs enthält. Es ist somit möglich, dass *AtUGT74F2* ortholog zur Tabak Salizylsäure UDP-Glucosyltransferase ist. Dies erklärt den reduzierten Gehalt an freier Salizylsäure nach Safenerbehandlung. Obwohl wahrscheinlich durch die safenerinduzierte ICS freie Salizylsäure gebildet wurde, kann sie durch die ebenfalls safenerinduzierte *AtUGT74F2* sofort glucosyliert werden. In weiterführenden Arbeiten wäre somit die Messung der freien und glucosylierten Salizylsäure sinnvoll, um diese Theorie zu bestätigen.

Es konnte nachgewiesen werden, dass eine geringe interne Salizylsäurekonzentration (*NahG*, *sid2-2*) zu einem erhöhten Ertrag führen kann (Abreu and Munné-Bosch 2009). Es wäre also sehr interessant den Effekt der Safener auf eine mögliche Ertragssteigerung zu untersuchen.

4.8 PR1-Induktion durch Safener

PR-Gene (pathogenesis related proteins) akkumulieren nach Pathogenbefall in Tabakblättern, welche hypersensitiv auf den Tabak Mosaic Virus (TMV; van Loon 1997) reagierten. Einige dieser *PR*-Proteine, wie Chitinasen und Glucanasen haben antimikrobielle Wirkung. Die Pathogeninduzierte Expression der meisten *PR*-Gene ist korreliert mit der SAR Entwicklung in uninfiziertem Gewebe und kann durch exogene Applikation von Salizylsäure simuliert werden (Ward *et al.* 1991). Zusätzlich zu SA führt auch die Applikation von INA oder BTH zur Induktion von dem gleichen Spektrum an SAR Genen, wie sie während der pathogen-induzierten SAR beobachtet werden kann (Ward *et al.* 1991, Uknes *et al.* 1992, Uknes *et al.* 1993, Vernooij *et al.* 1995, Friedrich *et al.* 1996, Lawton *et al.* 1996). Durch INA wird die Expression von *PR1* in Tabak nach 2 Tagen und *Arabidopsis* nach einem Tag erhöht (Ward *et al.* 1991; Uknes *et al.* 1992).

In mit Salizylsäure behandelten Blättern war ein Anstieg der *PR1* Expression bereits nach 4 h erkennbar und erreichte nach 12-48 h ein Maximum.

Die Applikation von DCS führt zu einer schnellen und hohen Induktion des *GUS*-Reportergens in transgenen *Arabidopsis* Pflanzen, die nach 24-48 h stagniert. Die Safener Mefenpyr und Isoxadifen führen bereits nach 8 h zu einer vollständigen Induktion des Reporter gens, diese Expression bleibt über den gemessenen Zeitraum konstant. Die späte Induktionskinetik des *PR1*-Gens ist nach DCS-Behandlung deutlich erkennbar, hier steigt die Transkriptmenge nach ein bis zwei Tagen im Vergleich zu dem nach 8 h gemessenen Wert sogar noch an. Im Gegensatz hierzu führt die Safenerbehandlung der Pflanzen zu keiner Induktion von *PR1*. Safener führen somit, im Gegensatz zu INA oder BTH, auch zu keiner Ausbildung der SAR.

Obwohl es offensichtlich gemeinsame frühe Zielgene von Salizylsäure und Safenern gibt, haben Safener keinen Einfluss auf spät Salizylsäure induzierbare Gene. Die gemeinsamen Safener- und Salizylsäure-Signalweegelemente sind somit ausschließlich an der Regulation früh induzierbarer Gene des Detoxifizierungssystems beteiligt.

In der SA-Biosynthese Mutante *sid2-2* wird 24 h nach Safenerapplikation ebenfalls keine *PR1*-Expression induziert. Diese Beobachtung bestätigt das Ergebnis, dass die Safener Mefenpyr und Isoxadifen in dieser Mutante innerhalb der ersten 12 h nach Applikation zu keiner Akkumulation von Salizylsäure führen.

4.9 Safener induzierbare Genexpression in *Arabidopsis*

Die durch Mefenpyr und Isoxadifen regulierten 541 Gene in Col0 Pflanzen lassen sich über ihre GO (Gen Ontologie) Annotation hauptsächlich zwei allgemeinen Gengruppen zuordnen. Gene, die ebenfalls als Antwort auf einen chemischen und Gene, die ebenfalls auf einen biotischen Stimulus reagieren. In einer Studie über die Genregulation als Antwort auf abiotische und biotische Stressoren machten Glombitza *et al.* (2004) eine ganz ähnliche Beobachtung. Mit einem spezifischen DNA Array (MetArray) wurden gezielt Gene des sekundären Metabolismus (GSTs, GTs, P450s, Transporter) auf die Regulation durch Herbizide (zwei Sulfonylharnstoffherbizide und Bromoxynil), UV-B Bestrahlung, endogene Stresshormone (Methyljasmonat und SA) als auch Pathogeninfektion (*Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*) untersucht. Mit Hilfe einer prinzipiellen Komponenten Analyse (PCA) wurde in dieser Studie nachgewiesen, dass die Genexpression durch Applikation der beiden Sulfonylharnstoffherbizide, SA als auch durch Pathogenbefall ähnlich reguliert wird. Einige Xenobiotika (wie Safener

und einige Herbizide) scheinen also einen Einfluss auf die Genexpression verschiedenster Gruppen von Genen zu haben, die sowohl auf biotische als auch abiotische Stimuli reagieren. Auch in dieser Studie wurde, ebenso wie in der vorliegenden Arbeit, eine ähnliche Genregulation von Genen des sekundären Metabolismus durch Xenobiotika und Salizylsäure beobachtet.

4.9.1 Differenzielle Genregulation in Col0 und *NahG*

Es wurde ein T-Test mit BF behandelten Proben von Col0 und *NahG* Pflanzen durchgeführt. Insgesamt sind 812 Gene mindestens 2-fach differenziell reguliert (p -Wert 0,05). Hiervon sind, verglichen mit dem WT, in *NahG* 482 Gene runterreguliert. Die Expression der bakteriellen Salizylsäurehydroxylase, und die damit verbundene Bildung von Katechol, scheint einen großen Einfluss auf die basale Expression vieler verschiedener Gene zu haben. Es wurde untersucht wie viele dieser Gene, deren basaler Expressionswert in *NahG* niedriger ist als in Col0, im WT und der Mutante safenerinduzierbar sind (Abb. 4-6). 72 dieser in *NahG* basal reprimierten Gene sind in Col0 und 163 Gene sind in *NahG* safenerinduzierbar. Vergleicht man diese beiden safenerinduzierbaren Gengruppen miteinander, so erkennt man, dass nur 5 dieser Gene in Col0 und *NahG* unterschiedlich sind (d.h. 5 der in *NahG* basal reprimierten Gene sind nur noch in Col0 safenerinduziert).

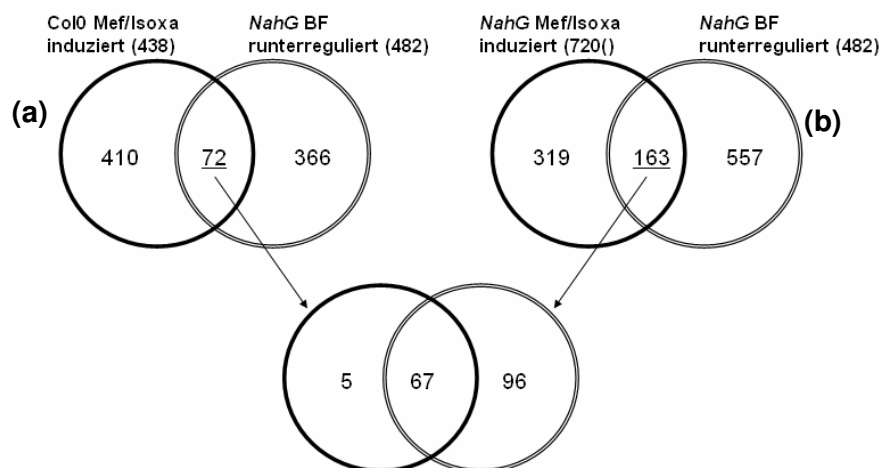


Abb. 4-6 Safenerinduzierbarkeit der Gene mit niedrigerer basaler expression *NahG* (verlichen mit Colo) Verglichen werden in der oberen Zeile die Gengruppen der safenerinduzierten Gene im WT mit den basal in *NahG* reprimierten Genen (oben links) als auch die Gengruppe der safenerinduzierten Gene in *NahG* mit den in dieser Mutante basal reprimierten Genen. Im unteren Diagramm ist der Vergleich der safenerinduzierten Gene aus Vergleich (a) und (b) dargestellt.

Da man das Kriterium mindestens 2-fach differenziell gewählt hat, und in *NahG* die basale Expression vieler Gene vermindert ist, erfüllen in dieser Mutante mehr Gene dieses Kriterium als im WT: In *NahG* sind 286 Gene mehr als 3-fach safenerinduziert, in Col0 sind dies nur 143 Gene. Dies erklärt die große Differenz zwischen den safenerinduzierbaren Genen in Col0 und *NahG*.

4.9.2 Induktion von Genen des Detoxifizierungssystems

Mit Hilfe des ATH1-Microarray Chip Experiments (Kapitel 3.7) konnte in *Arabidopsis* die Safener gesteuerte Induktion von 438 Genen nachgewiesen werden. Durch die Applikation von Mefenpyr und Isoxadifen wurde die Expression von 103 Genen herunterreguliert. Die dem Wirkmechanismus der Safener zugeschriebene Geninduktion von Pflanzendetoxifizierungsgenen, insbesondere von Glutathion-S-Transferasen konnte in der vorliegenden Arbeit auch in *Arabidopsis* nachgewiesen werden (s. Anhang 7.4.1).

4.9.2.1 Safenerinduktion von Glutathion-S-Transferasen

Die Hauptreaktion bei der Metabolisierung von Chloroacetanilidherbiziden ist die direkte Konjugation mit GSH (Jablonkai and Hatzios 1993). Diese Konjugationsreaktionen werden durch lösliche GSTs katalysiert (Coleman *et al.* 1997b, Cobbett 2000). Für die Herbiziddetoxifizierung sind hauptsächlich GSTs der phi und tau Klasse wichtig (Marrs 1996, Edwards and Dixon 2000). Im Unterschied zu diesen sind GSTs der lambda Klasse Monomere und besitzen anstelle der Glutathion-Transferase Aktivität eine Thioltransferase Aktivität. Ebenfalls ist der Serinrest des aktiven Zentrums der tau und phi Klasse GSTs durch einen Cysteinrest ersetzt. Zwei der *Arabidopsis* lambda GSTs (*AtGSTL1* und *AtGSTL2*) besitzen große Sequenzähnlichkeit mit dem Mais *In2.1*- und dem Weizen *Cla30*-Gen (Dixon *et al.* 2002). Beide Gene werden durch Safener induziert (McGonigle *et al.* 2000). *AtGSTL1* wird durch die Behandlung mit Mefenpyr und Isoxadifen stark induziert. Und ist ebenfalls durch den Safener Dichlormid, das Auxinherbizid 2,4-D als auch in geringem Maße durch das Diphenylether Herbizid Fluorodifen induzierbar (Dixon *et al.* 2002). Obwohl GSTLs durch Safener induziert werden, sind sie nicht direkt an der Detoxifizierung von Herbiziden beteiligt. Eine denkbare Funktion dieser GSH-abhängigen Thioltransferasen wäre die Dethiolierung spezifischer S-glutathionylierter Proteine, die während oxidativem Stress, ausgelöst durch Herbizide, akkumulieren (Klatt and Lamas 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Mefenpyr und Isoxadifen hauptsächlich tau-Klasse GSTs (GSTUs) induziert. Sechs dieser GSTs (*AtGSTU1*, *AtGSTU4*, *AtGSTU3*, *AtGSTU7*, *AtGSTU8*, *AtGSTU10*) sind nahe miteinander verwandt (Abb. 4-7).

Bislang gibt es keine Untersuchungen über die Genexpression von mit Mefenpyr und Isoxadifen behandelten *Arabidopsis* Pflanzen. In publizierten Untersuchungen wurde unter anderem der Safener Benoxacor verwendet. Dieser Safener erhöht die GST-Aktivität in Mais (Wiegand *et al.* 1986, Irzyk and Fuerst 1993). Durch Benoxacor konnte in *Arabidopsis* hauptsächlich die Expression einer tau-Klasse GST (*AtGSTU19*), und einiger phi-Klasse GSTs (GSTFs; *AtGSTF2*, *AtGSTF8*, *AtGSTF7*, *AtGSTF6*; DeRidder *et al.* 2002) nachgewiesen werden. Diese GSTs waren nach Behandlung mit Mefenpyr und Isoxadifen nicht, oder nur schwach (*AtGSTF8*) induzierbar. Die Probenahme erfolgte in allen oben aufgeführten Studien erst nach einer 24 stündigen Safenerinkubation. In der vorliegenden Arbeit wurden die Safener, wie in der kommerziellen Anwendung in einer Formulierung auf die Pflanzen gesprüht, und die Proben wurden bereits nach 8 h genommen. Da Safener in Mischung mit dem passenden Herbizid appliziert werden, müssen sie ihre Wirkung sehr schnell entfalten. Gene die für den Wirkmechanismus der Safener relevant sind, erwartet man somit unter den früh regulierten Genen. Da für die Safener induzierte *AtGSTU19* eine Wurzel spezifischen Induktion (DeRidder and Goldbrough 2006), und eine langsame Induktionskinetik (Wagner *et al.* 2002) beschrieben wurde, ist es nicht verwunderlich dass sie im vorliegenden Experiment nicht unter den induzierten GSTs zu finden ist. DeRidder *et al.* (2002) konnten für *AtGSTU19* eine Aktivität gegenüber Chlorazetanilidherbiziden nachweisen, das Aktivitätsmuster war hierbei ähnlich zu gereinigten tau-Klasse GSTs aus Mais (Dixon *et al.* 1999). Die durch Mefenpyr und Isoxadifen induzierten tau-Klasse GSTs *AtGSTU24* und *AtGSTU25* sind von allen induzierten GSTs über ihre Aminosäuresequenz am nächsten mit *AtGSTU19* verwandt (s. Abb. 4-6).

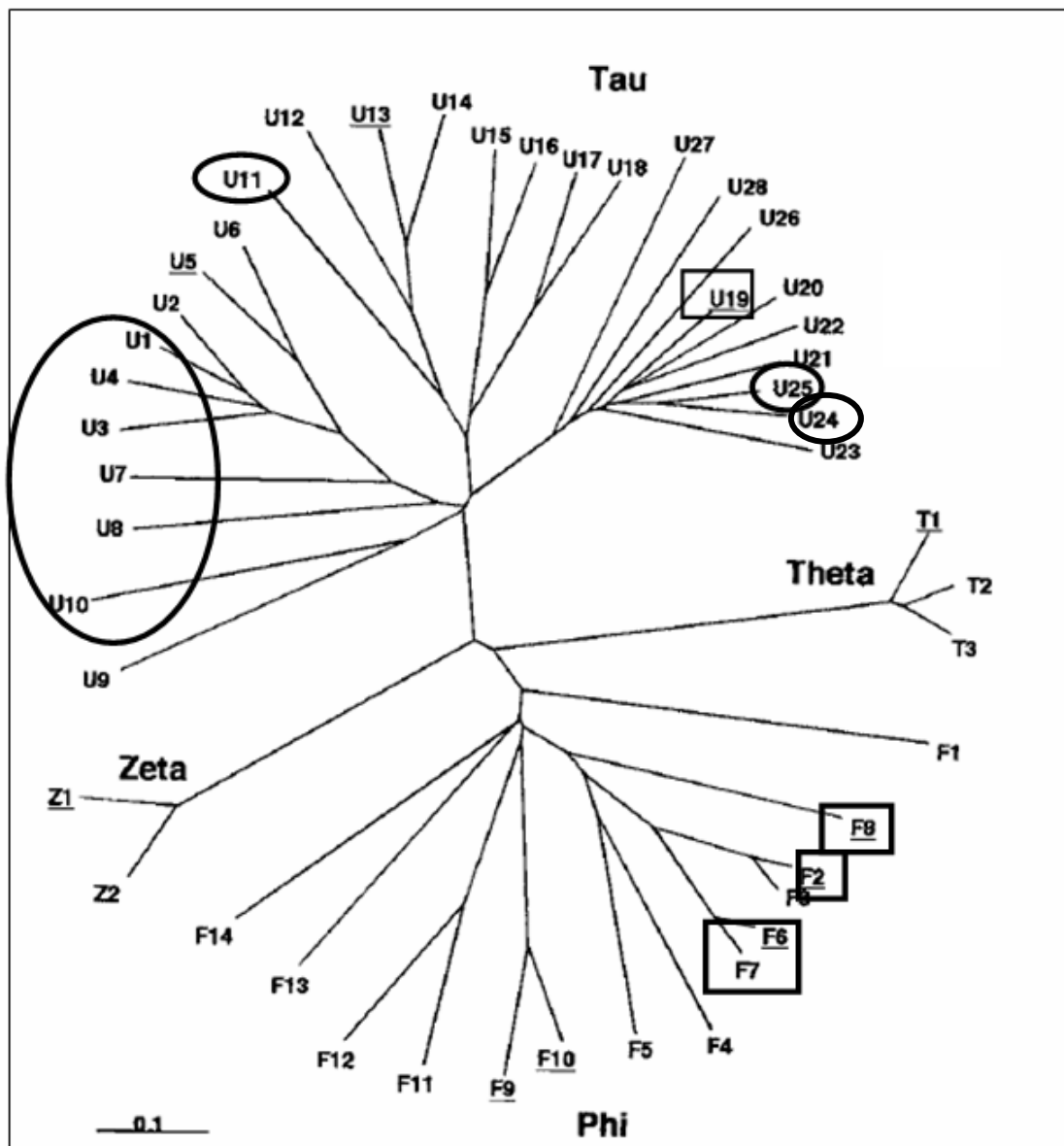


Abb. 4-7 Die GST Super-Familie aus *Arabidopsis* Kladogramm der GST Superfamilie aus *Arabidopsis* („unrooted bootstrapped tree (n=5000)“) basierend auf einem multiplen Sequenz-Alignment (ClustalX, Thompson *et al.* 1997) der kompletten Proteinsequenz aller AtGSTs. Es sind nur die Namen der GST-Klassen (Phi, Tau, Zeta) und jeweiligen Nummern genannt. Die Abbildung wurde von Wagner *et al.* (2002) übernommen. Eingekreist sind die in dieser Arbeit Safenerinduzierten tau-Klasse GSTs. Mit einem Rechteck umrandet sind die in *Arabidopsis* durch Benoxacor induzierten phi- und tau-Klasse GSTs (DeRidder *et al.* 2002).

Die Funktionen von GSTU24 und 25 wurden bereits in einigen Untersuchungen charakterisiert. Dixon *et al.* (2009) wiesen für AtGSTU25 eine hohe Glutathion-Peroxidase (GPOX) Aktivität gegenüber Cumenhydroperoxid nach. Diese GST hatte auch eine hohe Aktivität gegenüber dem Substrat CDNB. Eine Behandlung von *Arabidopsis* Pflanzen mit Chloroacetanilidherbiziden und TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) führt zu einer stark erhöhten AtGSTU24 Expression (Mezarri *et al.* 2005). GSTs konnten in Wurzeln als Enzyme der ersten Konjugationsreaktionen von TNT nachgewiesen werden (Ekman *et al.* 2003). In Phytoremediationsstudien wird die

mögliche Bodensanierung durch Pflanzen untersucht. Hierbei ist der Abbau von schädlichen Bodenchemikalien relevant. Zu diesen Verbindungen gehören TNT und Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX) oder Chloroacetanilidherbizide, wie Acetochlor (AOC) und Metolachlor (MOC). Auch wenn Safener zu keinem Schutz dikotyler Pflanzen vor Herbiziden führen, wäre eine Verwendung von Mefenpyr oder Isoxadifen eventuell für solche Phytoremediationsprojekte interessant, um den Schadstoff-/ oder Herbizidabbau in belasteten Böden zu erhöhen. Hierfür wäre auch eine auf die Wurzeln beschränkte Expression herbiziddetoxifizierender GSTs kein Problem, sondern eher von Vorteil.

Die durch Mefenpyr und Isoxadifen induzierte tau Klasse GST *AtGSTU1* konnte ebenfalls durch die Behandlung mit TNT und RDX, Auxinen und CDNB induziert werden (Mezarri *et al.* 2005, Van der Kop *et al.* 1996, Dixon *et al.* 2002). Des Weiteren werden *AtGSTU1* als auch *AtGSTU7* durch OPDA induziert und konjugieren pflanzliche Oxylipine (wie OPDA und Traumatin (Wundhormon)) mit GSH (Böttcher 2007).

Safener wirken in monokotylen Pflanzen spezifisch auf die Induktion verschiedener GSTs (Edwards *et al.* 2005). In Weizen ist beispielsweise der Safener Cloquintocet-Mexyl der optimale Induktor für *TaGSTFs*. Cloquintocet induziert in *Arabidopsis* jedoch *AtGSTFs* und hat keinen Effekt auf *AtGSTUs*. Die Mais Safener Dichloromid und R-29148 zeigen einen ähnlichen Effekt auf die Induktion von GSTUs in Weizen, jedoch hat diese Induktion einen geringen Effekt auf die Konjugation des Substrates CDNB. CDNB gilt als universelles GST-Substrat zum Nachweis nucleophiler Substitutionsreaktionen. Offensichtlich sind die in Weizen induzierbaren GSTUs nicht oder nur gering aktiv bei der Konjugation von CDNB. Die beobachteten Unterschiede zwischen den durch Mefenpyr und Isoxadifen bzw. Benoxacor induzierten *Arabidopsis* GST-Gruppen könnten auch für eine selektive Safenerinduktion bestimmter GST-Klassen in Dikotylen sprechen.

Für weiterführende Arbeiten wäre eine Expression der safenerinduzierten GSTs in *E.coli* und ein anschließender Test der Aktivität gegenüber verschiedenen Herbiziden sehr interessant. Ebenfalls wäre eine Proteomanalyse von mit Mefenpyr und Isoxadifen behandelten Pflanzen aufschlussreich, da eine mangelnde Proteinexpression von GSTs im Blattgewebe bislang als Grund für die fehlende Safenerwirkung in *Arabidopsis* aufgeführt wurde (Smith *et al.* 2004).

4.9.2.2 Safenerinduktion von Transportern

Die Induktion der GSH-Synthese als Antwort auf einen Stress-Stimulus ist ein wichtiger Teil der pflanzlichen Abwehrstrategie (May and Leaver 1992). Der Safener Benoxacor führt zu einem erhöhten GSH-Wert sowohl in Mais (Farago and Brunold 1994, Kocsy *et al.* 2001) als auch in *Arabidopsis* Keimlingen (DeRidder *et al.* 2002). In Phase III des Detoxifizierungssystems (1.1.1) werden die mit GSH-konjugierten Xenobiotika in die Vakuole transportiert. Eine wichtige Gengruppe dieser Detoxifizierungsphase bilden die Glutathion-Konjugat Transporter (GS-X Pumpen; ATP-abhängige Transporter), indem sie Glutathion-konjugierte Xenobiotika (GS-X) aus dem Zytosol entfernen. Diese Transporter gehören zur ATP-Bindungs-Kassette (ABC; ATP binding cassette) Superfamilie. Durch die Safener Mefenpyr und Isoxadifen werden 3 dieser Transporter (*AtMRP2*, *AtMRP3* und *AtMRP6*) in *Arabidopsis* induziert. Die Überprüfung, ob die verwendeten Safener ebenfalls zu einer Erhöhung des GSH-Gehaltes führen, wäre ein wichtiges weiterführendes Experiment.

4.9.2.3 Safenerinduktion von UDP-Glucosyltransferasen

Pflanzliche UDP-Glucosyltransferasen (UGTs) transferieren UDP-Glucose auf kleine Akzeptormoleküle. Sie sind ein Teil der zweiten Phase des pflanzlichen Detoxifizierungssystems. Li *et al.* (2002) untersuchten die Aktivität von 90 *Arabidopsis* UGTs gegenüber verschiedenen Substraten wie Salizylsäure, 4-Hydroxybenzoesäure (4-HBA) und anderen Benzoaten. Für die durch Mefenpyr und Isoxadifen induzierbare UGT *AtUGT75B1* (s. Anhang 7.4.1) wurde hierbei eine hohe Aktivität gegenüber 4-HBA und 3,4-Dihydroxybenzoesäure (3,4- DHBA) nachgewiesen. 4-HBA hat großes Interesse auf sich gezogen, da diese Verbindung eine potentielle Polyester-Vorstufe ist (Dong *et al.* 2001): Sie ist in Pflanzen ebenfalls eine Vorstufe für Shikonin, einem natürlichen Pigment von kommerziellem Interesse (Rev. in Papageorgiou 1999).

4.9.2.4 Safenerinduktion von Cytochrom P450 Monooxygenasen

Eine Safenerinduktion von Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen (P450s) durch Safener in *Arabidopsis* wurde bislang nicht nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Induktion von acht P450s durch Mefenpyr und Isoxadifen nachgewiesen werden. An der Reduktion aromatischer Nitrogruppen (wie sie in TNT und RDX vorkommen, s.o.) sind sogenannte Nitroreduktasen beteiligt. Sie werden in zwei Gruppen eingeteilt: Die Reduktion von Nitrogruppen durch Typ I Enzyme ist unempfindlich gegenüber molekularem Sauerstoff, während Enzyme des zweiten Typs Sauerstoff-sensitiv sind (Peterson *et al.* 1979). An der Reduktion von TNT sind Typ II Nitroreduktasen beteiligt, zu denen P450s gezählt werden (Bryant and Deluca 1991).

Die Induktion der P450s durch Safener könnte wie oben bereits erwähnt für einen Phytoremediationsansatz interessant sein.

Ein Vergleich der durch Safener- und 2,4-D induzierten Gene zeigte eine Überlappung bezüglich der Detoxifizierungsgene (s. Anhang 7.4.9 und 7.4.10). Vor allem GSTs (*AtGSTU4*, *AtGSTU7*, *AtGSTU10* und *AtGSTU25*) werden durch beide Substanzen induziert. Jedoch auch Transporter, eine Cytochrom P450 Monooxygenase und OPR1.

Durch das vorliegende Genexpressionsexperiment konnte nachgewiesen werden, dass alle für den Safener Wirkmechanismus und das Pflanzendetoxifizierungssystem als wichtig beschriebenen Gene durch Mefenpyr und Isoxadifen induziert werden. Ein Argument für die mangelnde Safenerwirkung in Dikotylen war bisher, dass die Expression der relevanten Gene nicht im richtigen Gewebe erfolgte. Dies konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch widerlegt werden, da die Expression der entsprechenden Gene im Blattgewebe nachgewiesen wurde. Ein weiteres Argument war die mangelnde Proteinexpression der entsprechenden GSTs (im Blattgewebe). Für weiterführende Arbeiten wäre somit eine Proteomanalyse von mit Mefenpyr und Isoxadifen behandelten *Arabidopsis* Pflanzen wichtig. Die Frage warum Safener in dikotylen Kulturpflanzen dennoch keine Herbizidschützende Wirkung entfalten, lässt sich bislang noch nicht beantworten.

4.9.3 Vergleich der Safener und Salizylsäure induzierten Genexpression

4.9.3.1 Ähnlichkeit zwischen früh salizylsäure- und safenerinduzierten Genen

Salizylsäure (SA) reguliert PR Proteine (Van Loon and Van Strien 1999) und detoxifizierende oder antioxidante Enzyme wie GSTs und GTs (Edwards et al 2000, Li et al 2001). Alle diese Gene werden nicht nur durch SA sondern auch durch Pathogene (Maleck *et al.* 2000) induziert. GSTs und GTs werden ebenfalls durch Auxin, Wasserstoffperoxid und verschiedene Xenobiotika als auch durch Verwundung induziert (Horvath and Chua, 1996, Xiang et al 1996, Delessert et al 2004, Uquillas et al 2004). Über die vorliegenden GO-Annotationen konnten 9 safenerinduzierbare Gene gefunden werden (s. Anhang 7.4.3), die auch nach einem Salizylsäure Stimulus induziert werden. Unter diesen Genen befinden sich GSTs und GTs. Diese Gene wurden bereits als früh SA induzierbare Gene beschrieben (Xing *et al.* 1996, Horvath and Chua 1996, Uquillas *et al.* 2004) und werden in Microarray Studien als typische induzierte Gene nach Pathogenbefall oder oxidativem Stress gefunden (Maleck *et al.*

2000, Schenk *et al.* 2000, Vandenabeele *et al.* 2004). GSTs katalysieren die Addition von Glutathion an verschiedene Substrate. Diese Modifikation spielt eine wichtige Rolle für die Detoxifizierung von Xenobiotika und endobiotischen Verbindungen als auch für die Gewinnung der Redox Balance (Marrs 1996, Edwards *et al.* 2000).

Blanco *et al.* (2005) konnten, wie mehrfach beschrieben, die in *Arabidopsis* früh Salizylsäure induzierten Gene in zwei weitere Gruppen aufteilen. Zu Genen der ersten Gruppe gehörten auch Gene des Lipid-Metabolismus (DOX1, OPR1). Diese Gene wurden NPR1-unabhängig reguliert. Einige der Gene aus Gruppe 1 sind ebenfalls Safener induzierbar (s. Anhang 7.4.4). Unter diesen waren OPR1 und DOX1, Gene des Lipidmetabolismus. Modifizierte Lipide sind wichtige Signale die während der Seneszenz, der Pathogenabwehr und dem oxidativen Stress eine Rolle spielen (Shah, 2005). OPR1 kodiert eine 1/2-Oxophytodiensäure Reduktase. Das Substrat von OPR1 ist unbekannt aber Schaller *et al.* (2000) konnten nachweisen, dass OPR1 keine Rolle bei der JA-Synthese spielt. OPR1 wird durch viele verschiedene Xenobiotika wie das Auxin-Herbizid 2,4-D, Chloracetanilid-Herbizide und Phytoprostane induziert, als auch durch Seneszenz, Verwundung, UV-C und JA (Raghavan *et al.* 2005, Mezzari *et al.* 2005, Mezzari *et al.* 2005, Müller *et al.* 2008, He and Gan 2001, He *et al.* 2002). Es wird in Zukunft also nicht verwunderlich sein, wenn man herausfindet, dass das Produkt von OPR1 ebenfalls ein Lipidmolekül ist, welches im Signalweg von Detoxifizierungsmechanismen eine Rolle spielt. Auch für den Safenersignalweg könnte dieses Enzym und seine Produkte eine wichtige Rolle spielen. In dieser Hinsicht ist es wichtig zu erwähnen, dass bereits mehrere Gene die für Proteine des Lipid-Metabolismus kodieren mit dem SA Signalweg, der Antwort auf oxidativen Stress und der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht wurden. Zum Beispiel zeigen PAD4 (Phytoalexin-deficient 4) und EDS1 (enhanced disease susceptibility 1) Homologie zu Lipid-Acyl-Hydrolasen und beide kontrollieren die SA Akkumulation nach Pathogen-Erkennung (Feys *et al.* 2001).

Durch ein Micro Array Experiment konnten Blanco *et al.* (2009) 217 Gene als früh SA induzierbar identifizieren. 31 dieser Gene wurden NPR1 unabhängig reguliert. Diese Gene wurden den Gruppen „Metabolismus“ und „Zellrettung, Abwehr und Virulenz“/„Interaktion mit der Umwelt“ (Unterkategorien die mit der Detoxifizierung und Antwort auf Chemikalien und Hormone in Verbindung stehen) zugeordnet. Die NPR1-unabhängigen Gene wurden, mehr als die NPR1-abhängigen Gene, durch eine Vielzahl von Stressbehandlungen (biotisch, chemisch, abiotisch) induziert, die die Redox Zell Homeostasis beeinflussen. Einige dieser 31 Gene sind auch safenerinduzierbar (s. Anhang 7.4.4). Diese Beobachtungen stimmen gut mit den

bisherigen Ergebnissen der safenerinduzierten Gene überein und bestätigen den Zusammenhang von früh xenobiotikainduzierten Genen (durch Safener oder Salizylsäure), welche NPR1-unabhängig reguliert werden.

Unter den von Blanco *et al.* (2009) identifizierten NPR1-unabhängigen Genen kodieren zwei für für Glutaredoxine (GRXs), zwei für GSTs und 6 für UDP-Glucosyltransferasen. Durch die Applikation von Safenern werden ebenfalls 3 Glutaredoxine, 10 GSTs und 5 UDP- Glucosyltransferasen induziert (s. Anhang 7.4.1). GRXs, zusammen mit Thioredoxinen (TRXs), sind zwei hauptsächliche Enzymsysteme, welche die reversible thiolbasierte Reduktion von Ziel-Proteinen katalysieren (Rouhier *et al.* 2008). Diese Proteine wurden mit der SA-abhängigen Reduktion von NPR1 und TGA Faktoren in Verbindung gebracht die für die Transkription von Abwehrgenen wichtig sind (Fobert an Despres 2005, Foyer and Noctor 2005, Tada *et al.* 2008). Eine ähnliche Funktion könnten diese Enzyme im Safenersignalweg haben, indem sie TGA-Transkriptionsfaktor-Kofaktoren für die Geninduktion aktivieren. Die safener- und salizylsäureinduzierten GSTs und UGTs katalysieren die S-Glutathionylierung und O-Glycosylierung von verschiedenen Akzeptormolekülen. Wie bereits von Blanco *et al.* (2005) und Holuigue *et al.* (2007) diskutiert, sind diese Enzyme an der Detoxifizierung von endogenen xenobiotischen Verbindungen beteiligt. Diese Gene sind, wie bereits mehrfach erwähnt, während Stress-Abwehr Reaktionen gute Kandidaten für die Verminderung toxischer Effekte verschiedener Metabolite (z.B. ROS; Lim and Bowles 2004, Edwards *et al.* 2005b).

SA hat neben ihrer Rolle für die SAR Etablierung auch einen Einfluss auf die Abwehr von Stress und der akklimatorischen Antworten auf Stress. Beispielsweise die Wiederherstellung der Redox Balance, intrazelluläre Stresssignalweitergabe, der Pathogenerkennung und Vermittlung von Metabolischen Veränderungen. SA reguliert die schnelle Aktivierung von Genen mit antioxidanter und detoxifizierender Wirkung, über einen NPR1-unabhängigen Pahtway (Uquillas *et al.* 2004, Blanco *et al.* 2005, Holuigue *et al.* 2007). Offensichtlich liegt in diesem Signaltransduktionsweg die Gemeinsamkeit zum Safenersignalweg. Diese Wege werden NPR1- unabhängig reguliert.

4.9.3.2 Die Relevanz der Salizylsäurebiosynthese für die Safenerinduktion

Mit Hilfe der Genexpressionsstudie zweier Salizylsäure Biosynthese Mutanten (*sid2-2*, *NahG*) wurde der Einfluss dieser Mutationen auf die Safener regulierte Genexpression in *Arabidopsis* untersucht. Über statistische Methoden konnten die Safener regulierten Gene in 2 Gruppen unterteilt werden. Zum einen gehören diese Gene zu einer

Gengruppe, die ebenfalls auf einen chemischen Stimulus hin reguliert wird, zum anderen zu Genen, die auf biotischen Stress reagieren. Pflanzen mit einer Mutation des SA-Biosynthese Weges haben einen geringeren endogenen Salizylsäure Gehalt als Wildtyp-Pflanzen (Kapitel 3.5). Die Behandlung mit Safenern führt zu keiner Akkumulation endogener Salizylsäure. Der Salizylsäure Gehalt der Pflanzen spielt jedoch offensichtlich eine Rolle für die basale Expression vieler Gene (s. Kapitel 3.7.2) und die vollständige Induktion von Safener-responsiven Genen. In den Salizylsäure Biosynthese Mutanten ist vornehmlich die Safener regulierte Expression von Genen der Gruppe „biotischer Stimulus“ betroffen. Dieses Ergebnis spricht wieder für eine Überlappung der durch Safener und Salizylsäure gesteuerten Genregulation, wie sie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben wurde. Der Teil der safenerregulierten Gene, die auch durch andere Signalmoleküle, welche auf einen biotischen Stimulus reagieren, induziert werden können, ist streng von der Salizylsäurekonzentration der Zellen abhängig.

Vergleicht man die Ergebnisse für die Safenernduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors aus Mais mit den Daten für das *Arabidopsis* endogene *In2.1*-Gen (*AtGSTL1*, s. Kapitel 3.7.4), so findet man in *NahG* Mutanten ebenfalls, bezogen auf die absoluten Expressionswerte des Gens, eine deutlich reduzierte Transkriptmenge von *AtGSTL1*. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der beobachteten niedrigeren GUS-Aktivität in transgenen *NahG* Pflanzen (s. Kapitel 3.4.1). Der Effekt der ICS-Mutation ist für das endogene *Arabidopsis In2.1*-Gen jedoch geringer als für den Mais *In2.1*-Promotor (s. Kapitel 3.4.1).

Da für die Salizylsäure eine Interaktion mit einer Katalase nachgewiesen wurde (Chen *et al.* 1993), hat sie wahrscheinlich einen direkten Einfluss auf den Redoxzustand der Zellen. Ein niedriger SA-Gehalt könnte somit über einen veränderten Redoxzustand einen Einfluss auf die Aktivität bestimmter Transkriptionsfaktoren haben (wie dies beispielsweise für TGA1 nachgewiesen wurde; Fobert and Després 2005). Eine starke Induktion von *AtGSTL1* konnte beispielsweise durch den Safener Dichlormid als auch durch Agenzien, welche direkt den Redoxzustand der Zellen stören, nachgewiesen werden. Zu diesen Agenzien zählen das Reduktionsmittel Ascorbinsäure, das Oxidationsmittel *t*-Butylhydroperoxid, als auch den GSH Syntheseinhibitor BSO, (Dixon *et al.* 2002).

4.9.4 Modell des Safenersignalweges

4.9.4.1 TGA-Transkriptionsfaktoren und *as-1*-Elemente

In der Promotorsequenz des in dieser Arbeit charakterisierten *In2.1*-Promotors wurden relevante *as-1*-ähnliche *cis* Motive für die Safenerinduzierbarkeit kartiert (3.2). Diese Elemente finden sich in 184 Promotoren der insgesamt 541 Safenerinduzierten Gene. Wie bereits in vorherigen Kapiteln besprochen, binden typischer Weise TGA-Transkriptionsfaktoren an diese TGACG Motive (*as-1*-ähnlichen Elemente; Johnson *et al.* 2001, Rochon *et al.* 2006). Es wird angenommen, dass TGA-Faktoren eine Rolle bei der Antwort auf durch Xenobiotika ausgelösten Stress spielen. Viele Gene, die nachweislich ein *as-1*-Element enthalten, sind durch Safener induziert (s. Anhang 7.4.5).

Über die Analyse der safenerregulierten Genexpression in einer TGA-Faktor knockout Mutante (*4tga*) konnte festgestellt werden, dass etwa die Hälfte der safenerresponsiven Gene durch TGA-Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Diese TGA-Faktor abhängigen Gene gehören hauptsächlich Genen der „chemischer-Stimulus-responsiven“ Gruppe an.

Betrachtet man nur die Expression des endogenen *AtIn2.1*-Gens (*AtGSTL1*) hat ein Knockout von 4 TGA-Transkriptionsfaktoren kaum einen Einfluss auf die Safenerinduktion dieses Gens. In der 2 kb aufwärts Sequenz vom Transkriptionsstartpunkt dieses Gens können jedoch auch keine *as-1*-Element ähnlichen Motive gefunden werden (Promotorsequenz über „PlantPan“, *cis*-Elemente: Datenbank „PLACE“). Offensichtlich spielen TGA-Faktoren für die safenerregulierte Induktion dieses Gens keine Rolle. Die Sequenz dieses Promotors enthält jedoch mehrere W-Box-Motive (s. Kapitel 4.9.4.5).

4.9.4.2 TGA-Transkriptionsfaktoren und oxidierte Lipide spielen eine Rolle bei Detoxifizierungsprozessen in *Arabidopsis*

Mueller *et al.* (2008) konnten in ihrer Studie nachweisen, dass generelle Detoxifizierungsprozesse und Stressantworten in *Arabidopsis* über TGA-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden. 247 der insgesamt 501 PPA₁ (A₁-Typ Phytoprostan) regulierten Gene wurden in der triple TGA-knockout Mutante (*tga2/5/6*) nicht mehr induziert. In dieser Studie wurde über ein Microarray Experiment die Expression von Genen nach der Applikation von Oxylipinen (PPA₁, s. Abb. 4-8) untersucht. Diese Oxylipine können über enzymatische und nichtenzymatische Reaktionen entstehen. Wichtige enzymatisch gebildete Oxylipine sind 12-Oxo-

Phytodiensäure (OPDA) und Jasmonsäure (JA). Diese Verbindungen wirken als Signale, welche die Pflanzenentwicklung und Pflanzenstressantworten regulieren. Nichtenzymatische Reaktionen werden durch freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reguliert, und führen zur gleichzeitigen Bildung einer Vielzahl von oxidierten Lipiden (u.a. Hydroxyfettsäuren und Phytoprostane; Imbusch and Mueller, 2000, Gobel *et al.* 2002). Nichtenzymatisch gebildete Oxylipine bilden sich während verschiedenster Stressreaktionen, dies wurde der Akkumulation von ROS zugeschrieben (Thoma *et al.* 2003, Montillet *et al.* 2005, Grun *et al.*, 2007). Phytoprostane sind strukturell sehr ähnlich zu OPDA und sind biologisch aktiv. Diese Verbindungen enthalten eine α, β -ungesättigte Carbonylgruppe, welche diese Verbindungen als reaktive Elektrophile Verbindungen (RES, reactive electrophilic species) klassifiziert. Dieser Cyclopentenonring wurde als kritisch für die biologische Aktivität beschrieben (Almeras *et al.*, 2003). Zwei Gruppen von Proteinen kommen für die Reduktion des Cyclopentenonringes in Frage: GSTs und OPRs. Beide Enzymklassen haben eine geringe Substratspezifität und spielen eine Rolle bei der Detoxifizierung von reaktiven lipophilen Xenobiotika und endogenen reaktiven Lipidoxidationsprodukten. Die membran-permeablen lipophilen Xenobiotika, die in *Arabidopsis* eine xenobiotische Abwehrreaktion steuern, sind strukturell sehr unterschiedlich. Zu ihnen zählen Barbiturate, Herbizide, Benzensulfonamid Safener, (Chloro)Phenole und weitere (Baerson *et al.*, 2005).

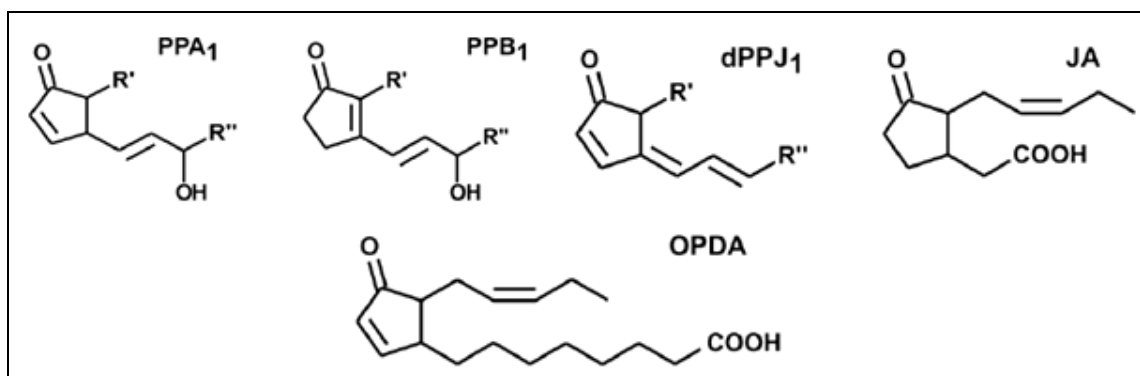


Abb. 4-8 Chemische Struktur verschiedener Oxylipine Phytoprostane sind zusammengesetzt aus Typ I ($R' = C_7H_{14}COOH$, $R'' = C_2H_5$) und Typ II ($R' = C_2H_5$, $R'' = C_7H_{14}COOH$) Stereoisomeren (Müller *et al.* 2008)

Unter den PPA1 induzierbaren Genen sind verschiedene GSTs (unter anderem *AtGSTU19*, *AtGSTF8* (PPA1 ist ebenfalls ein Substrat für diese GST, Mueller *et al.* 2008) Cytochrom P450 Monooxygenasen, ABC Transporter und auch OPR1 (OPR1 kann PPA1 metabolisieren, Mueller *et al.* 2008). 19 der 48 mindestens 3-fach PPA1 induzierten Gene, die den Funktionen „Detoxifizierung“, „sekundärer Metabolismus“

und „Stress-Antwort“ zugeschrieben wurden (Mueller *et al.* 2008) sind ebenfalls durch Safener induzierbar (s. Anhang). Zu den gemeinsam Safener und PPA1-induzierten GSTs gehören *AtGSTU4*, *AtGSTU7*, *AtGSTU10* und *AtGSTU22*. Einige dieser Gene zeigen keine oder eine verminderte Safenerinduzierbarkeit in der *4tga* Mutante (s. Anhang 7.4.7). 10 der 34 durch PPA1 runterregulierten Gene sind auch nach Safenerapplikation reprimiert (s. Anhang 7.4.8). Zwischen den durch PPA1 und Safener induzierten Detoxifizierungsgenen gibt es somit eine große Übereinstimmung. Wie bereits erwähnt wäre es möglich, dass oxidierte Lipide eine Rolle im Safenersignalweg spielen. Da auch die Safenerinduzierten tau-Klasse GSTs *AtGSTU1* und *AtGSTU7* OPDA als Substrat akzeptieren (Böttcher 2007).

Analog zu den in dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen, vermuten auch Mueller *et al.* (2008) gemeinsame Transkriptionsfaktoren (z.B. TGA-Faktoren) zwischen dem Detoxifizierungs- (PPA1) und SA-Signalweg.

4.9.4.3 Scarecrow like -14 (*scl14*), ein putativer TGA-Faktor Koaktivator des Safenersignalweges

Die *in vivo* Bindung der TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2,5 an einen Safener responsiven Promotor konnte durch eine Chromatin Immunopräzipitation im Rahmen dieser Arbeit ermittelt werden (Kapitel 3.3). Ebenfalls wurde für den *In2.1*-Promotor und viele Safenerregulierte Gene eine NPR1 unabhängige Regulation nachgewiesen (s.o. und Kapitel, 3.4.2). TGA2 aus *Arabidopsis* und TGA2.2 aus Tabak (Rochon *et al.* 2006, Thurow *et al.* 2005) haben keine Transaktivierungs-Domäne, deshalb müssen andere Proteine (Koaktivatoren) die Transaktivierungsdomäne an dem TGA2/5/6-*as-1* Komplex vermitteln. Die Beteiligung eines Inhibitors, welcher unter basalen Bedingungen entweder den Koaktivator bindet oder den TGA2-*as-1*-Komplex blockiert wurde bereits für Tabak (Johnson *et al.* 2001b, Butterbrodt *et al.* 2006) postuliert und ist konform mit der Beobachtung, dass einige NPR1-unabhängige Gene durch die Behandlung mit CHX (Cycloheximid, einem Proteinsynthese-Inhibitor) induziert wurden (Uquillas *et al.* 2004). Die Beteiligung eines solchen Inhibitors ist auch für den Safenersignalweg denkbar (Abb. 4-9), müsste über ein entsprechendes Experiment mit CHX jedoch bestätigt werden.

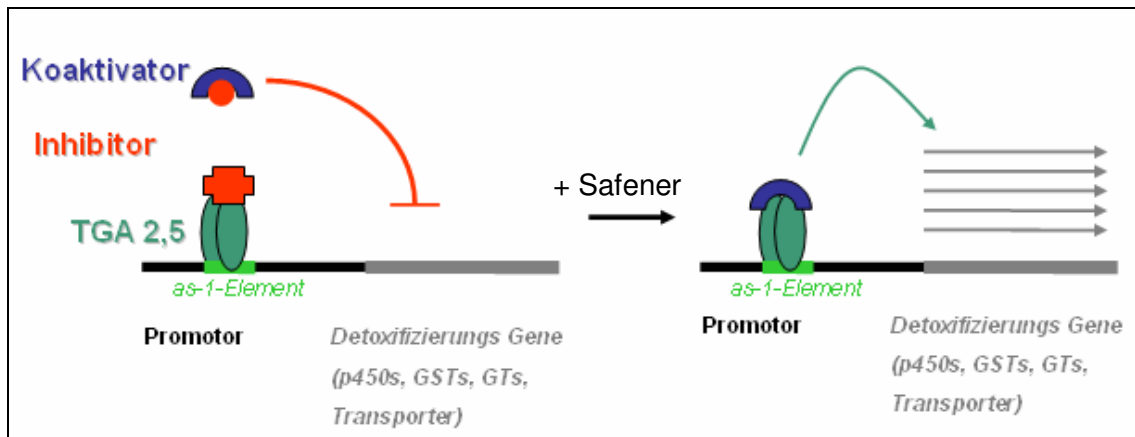


Abb. 4-9 Modell der Safenerinduzierten Genexpression mit Beteiligung eines Inhibitors Im unbehandelten Zustand blockiert ein Inhibitor entweder den Koaktivator oder den *as-1*-Element gebundenen TGA2/5/6-Komplex. Die Applikation von Safenern führt zu einer Modifikation des Inhibitors (keine Bindung mehr an den Koaktivator oder/und den *as-1*-TGA2/5/6-Komplex) und somit zur Aktivierung der Genexpression.

4.9.4.4 *scl14*, Kofaktor für die Aktivierung stressinduzierbarer Promotoren

Als möglicher TGA-Transkriptionsfaktor Koaktivator für stressinduzierbare Promotoren wurde von Fode *et al.* (2008) *scl14* (scare crow like 14), vorgeschlagen. Über ein Protein-Interaktionsscreening in Hefe mit dem Klasse II Transkriptionsfaktor TGA2 aus *Arabidopsis* als „bait“, wurde ein Protein der GRAS Familie als Interaktionsfaktor identifiziert. Die GRAS Protein Familie hat 33 Mitglieder in *Arabidopsis* (Bolle 2004). Der Name setzt sich zusammen aus GAI (Gibberellic-acid insensitive), RGA (Repressor of GA 1) und SCR (Scarecrow; Pysh *et al.* 1999). GAI und RGA spielen wichtige Rollen im Gibberellinsäure-abhängigen Signaltransduktionsprozess (Silverstone *et al.* 1998), während SCR in einem Screening für Mutationen gefunden wurde, welche die Wurzelentwicklung betrafen. In der sogenannten GRAS Domäne am C-terminus enthalten GAI, RGA, SCR und SCARE-CROW-LIKE (SCL) Proteine eine konservierte Aminosäure Signatur. Die N-terminale Domäne ist dagegen variabler (Di Laurenzio *et al.* 1996). Obwohl die direkte DNA Bindung an eine spezifische Sequenz nicht nachgewiesen ist, wurden GRAS Proteine als transkriptionelle Regulatoren klassifiziert (Riechmann *et al.* 2000, Zentella *et al.* 2007). Die Expression von *SCL14* wurde durch abiotischen Stress induziert (wie Ozonbehandlung), und über eine Micro Array Analyse konnten Gene identifiziert werden, die *SCL14* für die volle Expression benötigen (Siemens, 2005). Viele dieser identifizierten Gene (z.B. *CYP81D11* und *AtGSTU7*) sind wahrscheinlich an Detoxifizierungsprozessen beteiligt. Fode *et al.* (2008) konnten die Rekrutierung von *SCL14* an *as-1*-Element gebundene TGA Faktoren endogener Promotoren nachweisen, die durch SA, 2,4-D und andere Chemikalien induzierbar waren. Die korrespondierenden Gene vermitteln den Schutz

der Pflanze gegenüber verschiedensten Typen xenobiotischen Stresses. Viele der in dieser Arbeit identifizierten SCL14 Zielgene sind ebenfalls durch Safener induzierbar (s. Anhang 7.4.6). Obwohl die *SCL14* Expression nicht durch Safener induzierbar ist, wird ein als *SCL14*-ähnlich beschriebenes Gen (At2g29060) durch Safener 2,4-fach induziert (p-Wert 0,002). SCL14- oder SCL14-ähnliche Proteine sind somit gute Kandidaten für TGA-Transkriptionsfaktor Kofaktoren des NPR1- unabhängigen Safenersignalweges.

Alle in dieser Arbeit enthaltenen Daten werden in einem Diagramm des Safenersignalweges (Abb. 4-4) zusammengefasst.

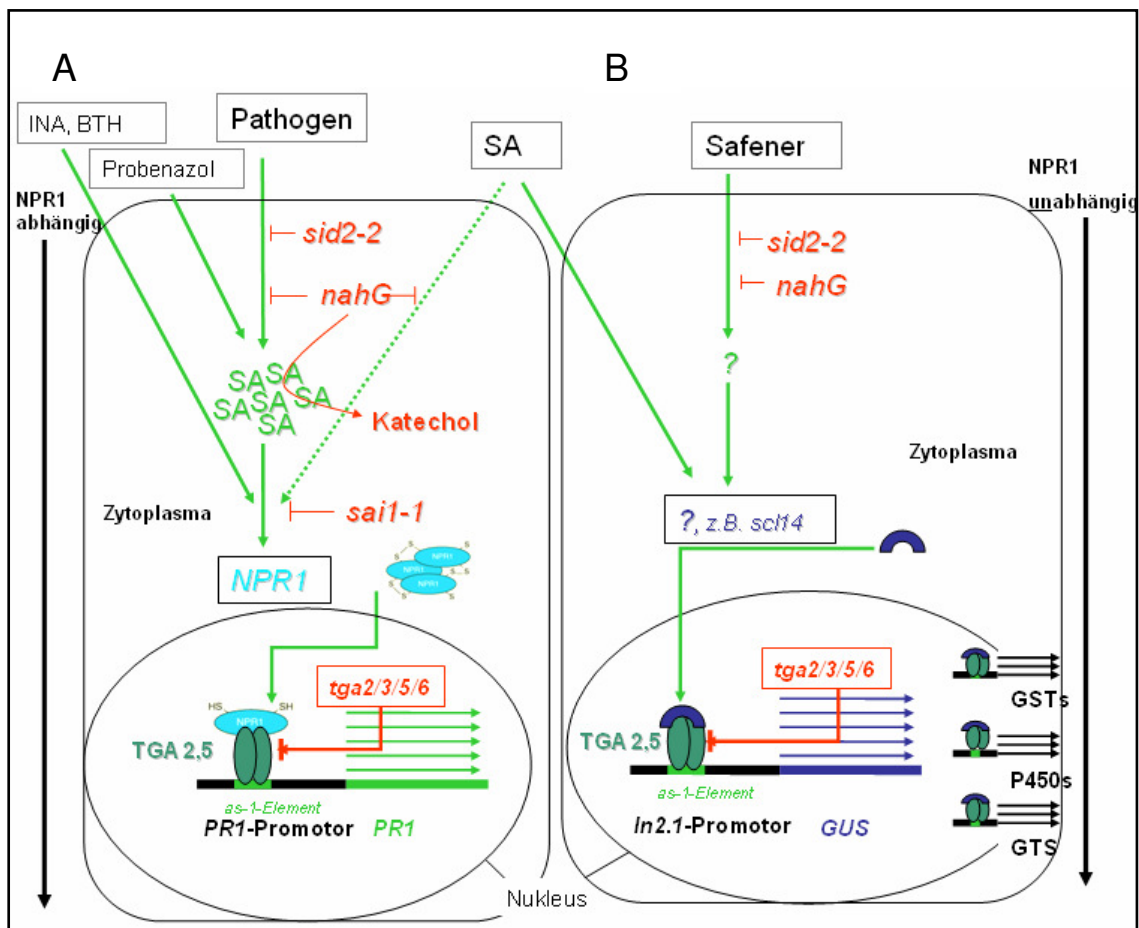


Abb. 4-10 Modell des Safener- und Salizylat-Signalweges

A: NPR1-abhängiger (non expressor of PR genes) Signalweg der systemisch erworbenen Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) dargestellt. Eine Pathogeninfektion führt zur Akkumulation von endogener Salizylsäure. In *Arabidopsis* wird Salizylsäure (SA) über Isochorismat mit Hilfe der Isochorismatsynthase (ICS) synthetisiert. Eine Mutation der ICS, wie sie in der Mutante *sid2-2* vorkommt, blockiert die Ausbildung der SAR. Eine exogene Applikation von SA kann diese jedoch wieder herstellen. Die Expression einer bakteriellen SA-Hydroxylase (*NahG*, *Pseudomonas putida*) führt zum Abbau von SA zu Katechol und blockiert ebenfalls die Ausbildung der SAR. Die Akkumulation der SA führt zu einem veränderten Redoxzustand der Zelle, dies führt zur Aufspaltung der Disulfidbrücken des inaktiven NPR1-Oligomers. Die monomere und aktive NPR1-Form wird in den Nucleus transportiert und kann hier über die Interaktion mit *as-1-Element* gebundenen TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2,5) die *PR1*-Expression (pathogenesis related protein-1) induzieren (Pieterse and Van Loon 2004). Eine Mutation des *NPR1*-Gens (*sai1-1*) oder ein knockout von TGA-Transkriptionsfaktoren (*tga2tga3tga5tga6*) verhindert die Ausbildung der SAR und die *PR1*-Genexpression. Die beiden chemischen Induktoren der SAR, 2,6-Dichlorisonicotinsäure (INA) und Benzo-(1,2,3)-thiadiazol-7-thiocarbonylsäure S-methylester (BTH), führen zu keiner endogenen SA-Akkumulation aber zur NPR1-abhängigen Expression von PR-Genen (wie *PR1*). Ein dritter chemischer SAR Induktor, das Fungizid Probenazol, bewirkt hingegen eine Erhöhung des endogenen Salizylsäuregehaltes.

B: Identifizierte Elemente des Safenersignalweges. Die exogene Applikation von Safenern und Salizylsäure führt zur Aktivierung des *In2.1*-Promotors und zur Expression verschiedener *Arabidopsis* Glutathion-S-Transferasen (GSTs), Glucosyltransferasen (GTs) und Cytochrom P450 abhängiger Monooxygenasen (P450s). Die Aktivierung dieser Gene ist NPR1-unabhängig und erfordert keine interne SA-Akkumulation. Ein geringer endogener SA-Gehalt (in den Mutanten *sid2-2*, *NahG*) hat jedoch einen negativen Einfluss auf die *In2.1*-Promotor gesteuerte safenerinduzierte β -Glucuronidase (GUS)-Expression. Die TGA-Transkriptionsfaktoren TGA2/5 interagieren *in vivo* mit dem *as-1*-ähnlichen Element des *In2.1*-Promotors und ein knockout von 4 TGA-Transkriptionsfaktoren (*tga2tga3tga5tga6*) führt zu einem Verlust der Safenerinduzierbarkeit. Für einige safener- und salizylsäureinduzierte GSTs, GTs und P450s wurde eine *scl14* (scarecrowlike-14) abhängige SA-Induzierte Genexpression beschrieben (Fode *et al.* 2008). Hierbei führte die Interaktion von *as-1*-Element gebundenen TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2/5) mit *scl14* zur Geninduktion.

4.9.4.5 Die Rolle von WRKY-Transkriptionsfaktoren und W-Boxen im Safenersignalweg

Der Fisher's Exact Test identifizierte unter den safenerinduzierbaren Genen ein statistisch signifikantes Vorkommen von Transkriptionsfaktoren mit einer WRKY Domäne (Kapitel 3.7.3).

4.9.4.6 WRKY Transkriptionsfaktoren

Diese Transkriptionsfaktoren haben alle eine DNA-Bindungsregion von 60 Aminosäuren Länge (die WRKY Domäne) gemeinsam. Diese beinhaltet das absolut konservierte WRKY Sequenzmotiv neben einem Zink-Finger Motiv. Diese Konservierung führte zu der „WRKY“ Namensgebung der Transkriptionsfaktor Familie (Eulgem *et al.* 2005, Rushton *et al.* 1996). Die WRKY Familie besteht in *Arabidopsis* aus 75 Mitgliedern (http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~somssich/wrky_webpage/wrky_family/wrky_family_inde.html). WRKY Faktoren binden mit einer hohen Affinität an eine DNA-Sequenz die W-Box genannt wird (C/T)**TGAC**(T/C) (Eulgem *et al.* 2000). Diese Transkriptionsfaktoren binden ebenfalls an W-Boxen, die in *ocs*-Element-Sequenzen enthalten sind. Die Bindungsaffinität für diese Stellen ist jedoch geringer als für andere W-Boxen (de Pater *et al.* 1996). Obwohl eine einzige W-Box innerhalb eines Promotors manchmal ausreicht um eine WRKY-abhängige Genexpression zu vermitteln, wird häufig ein Klaster von W-Boxen beobachtet (Eulgem *et al.* 1999, Maleck *et al.* 2000). Die W-Box-abhängige Bindungsaktivität benötigt sowohl die invariable WRKY Aminosäurestruktur als auch die Cystein und Histidin-Reste der WRKY Domäne, welche tetraedrisch ein Zinkatom umgeben (Maeo *et al.* 2001). Die Transkription von *WRKY* Genen ist schnell und stark als Antwort auf Verwundung, Pathogeninfektion oder abiotischen Stress in einer Vielzahl von Pflanzen hochreguliert (Eulgem *et al.* 2000). Die Infektion von Tabak mit dem Tabak Mosaik Virus (TMV) oder Bakterien, die Behandlung mit Pilz-Induktoren, Salizylsäure (SA) oder Wasserstoffperoxid induziert sehr stark verschiedene *WRKY* Gene (Chen and Chen 2000, Yoda *et al.* 2002, Takemoto *et al.* 2003, Vandenabeele *et al.* 2003). In *Arabidopsis* reagieren 49 der 72 getesteten *WRKY* Gene auf die Behandlung mit SA oder bakterielle Infektion (Dong *et al.* 2003). Durch die Auswertung von Genexpressionsstudien wurde eine Überrepräsentation von W-Box Elementen (z.B. der WRKY-Bindungsstelle) innerhalb von Promotoren einer Gruppe von Genen nachgewiesen, die während der SAR ko-exprimiert werden (Petersen *et al.* 2000, Maleck *et al.* 2000).

4.9.4.7 Safenerinduzierte WRKY-Transkriptionsfaktoren

Durch die Behandlung mit Safenern werden 9 WRKYs induziert (*AtWRKY6*, -22/29, -30, -31, -33, -40, -45, -48, -75, s.Abb. 4-11). Die Safenerinduzierbaren WRKY-Transkriptionsfaktoren scheinen jedoch nicht nur zu einer Gruppe von ähnlichen WRKY-Faktoren anzugehören (Gruppe III und Gruppe II a,b,c,e) Einige dieser Faktoren sind bereits gut charakterisiert:

AtWRKY6 ist im Nukleus lokalisiert, die höchste Expression findet während der Seneszenz statt, und dieser Faktor ist vor allem in Wurzeln stark exprimiert. Die Expression von *WRKY6* ist durch Salizylsäure und bakterielle Infektion stark induziert (Robatzek and Somssich 2001). *AtWRKY42* ist homolog zu *AtWRKY6* und wird in mit Blindformulierung behandelten Pflanzen nicht exprimiert. Nur nach Safenerapplikation ist eine Expression des entsprechenden Gens nachweisbar. *AtWRKY6* kann als positiver und negativer Regulator der Genexpression wirken. *WRKY6* reprimiert seine eigene und die Expression von *WRKY42* (Robatzek and Somssich 2002). Zielgene von *AtWRKY6* sind das Seneszenz-assoziierte Protein 1 (*SEN1*), eine Protease, das Jasmonsäure regulatorische Protein *NAC2*, eine Glutathion-S-Transferase (Nam 1997, Dong 1998), als auch Gene die für abwehrverwandte Proteine kodieren (*R22*, *R74*, *R143*, *R144*). Eine Überexpression von *AtWRKY6* führt zu erhöhten *NPR1*- und *PR1*-Transkriptmengen und zu einer schnelleren und stärkeren Antwort unter Stress induzierenden Konditionen (Robatzek and Somssich 2002). Durch die erhöhte *WRKY6*-Expression könnten Safener somit einen positiven Effekt auf die Stresstoleranz der Pflanzen haben.

Eine MAP Kinase Kaskade welche zur Hochregulation von zwei *WRKY* Genen führt (*AtWRKY22* und *AtWRKY29*) wird durch *flg22* aktiviert (Asai *et al.* 2002). Ebenfalls führt Chitin zur Induktion einiger *WRKY* Gene (unter anderem *AtWRKY22* und *AtWRKY29*, Wan *et al.* 2004). Die Überexpression von *AtWRKY29* vermittelt eine geringere Empfindlichkeit gegenüber dem virulenten Bakterium *P. syringae* (Asai *et al.* 2002). Einhergehend mit der Rolle der WRKYs während des *flg22*- und Chitin-regulierten Signalweges, waren W-Box ähnliche Motive in Promotoren von Genen, die durch jeden dieser Induktoren hoch-reguliert wurden, angereichert (Chen *et al.* 2002, Dong *et al.* 2003, Kalde *et al.* 2003). Die Expression von *AtWRKY22* ist 1 h nach Salizylsäurebehandlung induziert (Dong *et al.* 2003).

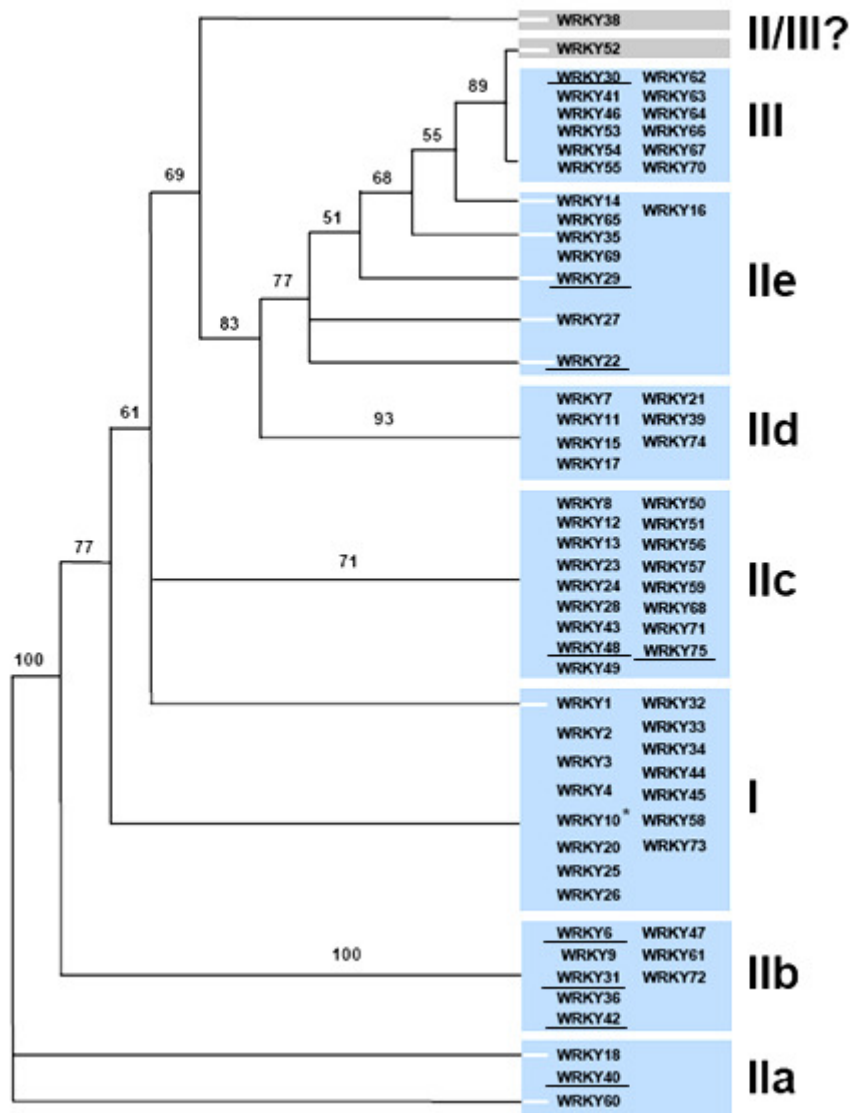


Abb. 4-11 Phylogenetischer Baum der Arabidopsis WRKY Proteine basierend auf ihrer DNA-Bindungs-WRKY Domänen (http://www.mpiz-koeln.mpg.de/~somssich/wrky_webpage/wrky_family/wrky_family_inde.html) Safenerinduzierbare WRKY Transkriptionsfaktoren sind unterstrichen.

4.9.4.8 Die Rolle der WRKY-Transkriptionsfaktoren für die *NPR1* und *PR*-Induktion

Salizylsäure, NPR1, TGA und WRKY Faktoren sind ein wichtiger Teil der molekularen Kaskade welche die *PR1* Expression aktiviert. Eine molekulare Kaskade die auf SA-abhängigen Signalen zu PR1 über NPR1, WRKY und TGA Transkriptionsfaktoren führt, ist gut etabliert. Eine erhöhte SA-Konzentration reguliert die NPR1-Aktivität über zwei parallele Mechanismen. Diese Kaskade scheint gemeinsam von der SAR, der Basalen Abwehr und einigen R Genen genutzt zu werden. Erhöhte SA Werte,

resultierend aus R-abhängiger oder R-unabhängiger Pathogenerkennung, beeinflussen die NPR1 Aktivität über zwei parallele Mechanismen (Abb. 4-11).

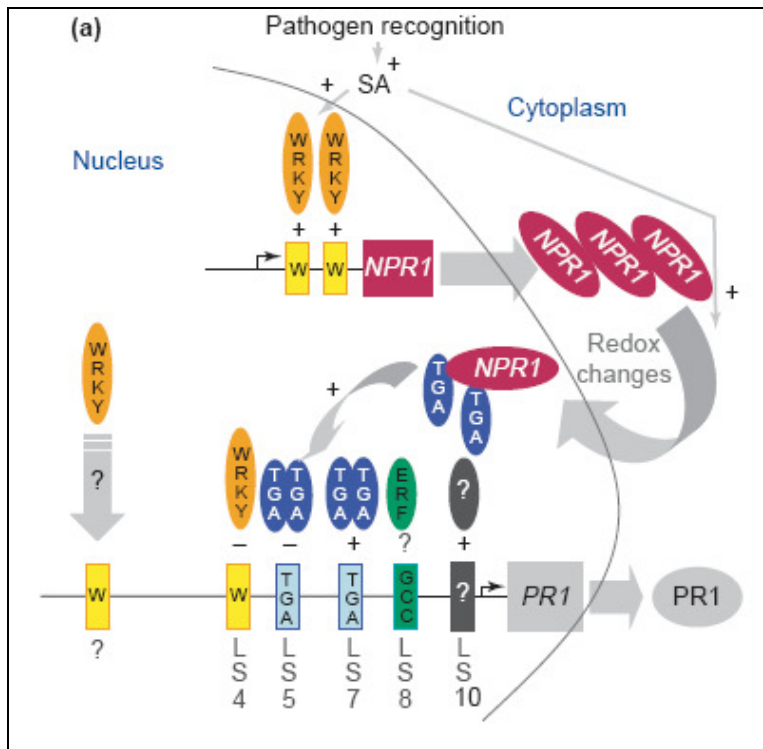


Abb. 4-12 Eine molekulare Kaskade führt zur salizylsäureabhängigen PR1-Expression.

Erhöhte SA Konzentrationen regulieren die Induktion der *NPR1* Transkription über WRKY Faktoren, welche an 2 W-Boxen im 5'UTR von *NPR1* binden. In ruhenden *Arabidopsis* Zellen liegt NPR1 in oligomerer Form in Zytoplasma vor. Die erhöhte SA Konzentration reguliert eine biphasische Veränderung der zellulären Redox-Umgebung, dies führt zur Reduktion der intramolekularen Disulfidbrücken der NPR1 Oligomere. Die monomeren NPR1 Proteine werden in den Nucleus transportiert wo sie die Bindung von TGA Faktoren an TGA-Boxen (LS5 und LS7) des *PR1* Promotors aktivieren. Die TGA-Box LS5 und LS4, eine W-Box die wahrscheinlich mit WRKY Faktoren interagiert, sind negative Elemente welche die *PR1* Expression reprimieren. Die TGA-Box LS7 und LS10, welche mit unbekanntem Transkriptionsfaktoren interagiert, sind positive Elemente. Die GCC-Box (LS8), interagiert wahrscheinlich mit ERF Transkriptionsfaktoren. Die Effekte dieses Elements auf die *PR1* expression ist unbekannt. Die SAR-Induktion stimuliert die Bindung von Proteinfaktoren an dieses Element. Zusätzlich könnten WRKY Faktoren die *PR1* Regulation indirekt oder über die Interaktion mit W-Boxen oberhalb von LS4 beeinflussen. Interaktionen werden durch graue Pfeile dargestellt. Aktivierende Mechanismen mit einem (+), reprimierende Mechanismen mit einem (-). Kodierende Regionen von Genen werden durch Quadrate dargestellt, cis-Elemente durch waagerechte Rechtecke und Transkriptionsfaktoren als auch *NPR1* durch Ovale. Die Transkriptionsstartseiten der Gene werden durch schwarze Pfeile markiert. (Eulgem 2005)

- 1.) Durch SA wird die *NPR1* Transkription 2-3 -fach induziert, diese Regulation und die basale *NPR1* Expression benötigt WRKY Faktoren die mit zwei W Boxen im 5'UTR *NPR1* interagieren (Yu *et al.* 2001). Die Regulation von NPR1 ist wichtig für seine Funktionen, da die Expressionsstärke dieses Gens positiv mit dem Grad an Resistenz und PR-Genexpression korrelieren (Cao *et al.* 1998).
- 2.) Erhöhte SA Werte steuern einen Wechsel des Redox-Status des NPR1 Proteins (Mou *et al.* 2003). In der Abwesenheit einer Pathogeninfektion bildet NPR1 über Disulfidbrücken Oligomere, diese NPR1 Aggregate befinden sich im Zytoplasma. Nach der Pathogeninfektion führt die erhöhte SA Konzentration zu einer Änderung der zellulären Redoxumgebung (Mou *et al.* 2003, Vanacker *et*

*al.*2000). Nach einer initiellen Erhöhung des Reduktionspotentials, gewinnen Pflanzenzellen eine reduzierendere Umgebung durch Akkumulation von Antioxidanzien. Unter diesen Konditionen wird NPR1 zur monomeren Form reduziert die im Nukleus akkumuliert. Die nukleäre Lokalisation von NPR1 ist essentiell für die Vermittlung der PR Genexpression (Dong 2001, Kinkema *et al.* 2000). Im Kern interagiert NPR1 direkt mit Mitgliedern der TGA Sub-Familie der bZIP Transkriptionsfaktoren (Subramaniam *et al.* 2001, Fan and Dong 2002, Pontier *et al.* 2002) und stimuliert deren Bindung an TGA-Boxen des PR1-Promotors und wahrscheinlich anderen SA-induzierbarer Gene (Singh *et al.* 2002). Mehrere Studien belegen die Interaktion von TGA Faktoren mit NPR1 (Zhang *et al.* 1999, Despres *et al.* 2000, Zhou *et al.* 2000, Niggeweg *et al.* 2000b, Kim and Delaney 2002).

Das LS4 Element, eine putative WRKY Bindungsstelle im PR1 Promotor agiert als starkes Repressorelement (Lebel *et al.* 1998). Zumindest ein WRKY Faktor *AtWRKY6* kann, wie bereits beschrieben, als starker transkriptioneller Repressor wirken (Robatzek and Somssich 2002), und von weiteren W-Boxen konnte gezeigt werden, dass sie die Transkription negativ regulieren (Chen and Chen 2002, Robatzek and Somssich 2002), was die Vorstellung, dass WRKY Faktoren eine Rolle bei die *PR1* Suppression haben, verstärkt.

4.9.4.9 Beteiligung der WRKY-Transkriptionsfaktoren im Safenersignalweg

Wie für die TGA-Faktoren gezeigt, könnten auch WRKY Faktoren sowohl eine Rolle für die SAR-Regulation als auch im Safenersignalweg spielen. Eine statistische Überrepräsentation von W-Boxen und Transkriptionsfaktoren mit WRKY-Domäne in den safenerinduzierten Genen konnte bereits über die Analyse der „Bindungsstellen“ und mit Hilfe der MapMan Annotationen (Fisher's Exact Tests, s. Kapitel 3.7.3) nachgewiesen werden. Beispielsweise finden sich in der Promotorsequenz des safenerinduzierbaren endogenen *In2.1*-Gens (*AtIn2.1*), wie bereits beschrieben, keine *as-1*-ähnlichen Elemente aber 4 W-Box-Motive. Ebenfalls enthält der Promotor der safenerinduzierbaren Isochorismatsynthase (ICS) W-Boxen (Wildermuth *et al.* 2001). Für weitergehende Untersuchungen wäre sicherlich eine Transformation des *P_{In2.1}:GUS* Konstruktes in verschiedene *WRKY*-knockout Mutanten, oder auch ein Chromatin Immunopräzipitations Experiment mit *WRKY*-Antiserum sehr interessant.

In der vorliegenden Arbeit konnten *cis*-aktive Promotorsequenzen, wie das *as-1*-Element und W-Box-Motive, als wichtige Elemente des Safenersignalweges in mono- und dikotylen Pflanzen aufgedeckt werden. Ebenfalls war es möglich, die *in vivo* Bindung spezifischer Transkriptionsfaktoren an diese Elemente nachzuweisen. Der Einfluss von Salizylsäure, eines wichtigen zellulären Signalmoleküls, auf den Safenersignalweg wurde ebenfalls verifiziert. Diese Ergebnisse konnten in einem Modell der Safener regulierten Signalkaskade zusammengefasst werden. Dieses Modell ist sicherlich nicht vollständig, bietet jedoch eine gute Basis für weiterführende Versuche. Beispielsweise ließen sich durch Yeast-one und -two-Hybrid Versuche weitere *cis*-aktive Promotorsequenzen und interagierende Transkriptionsfaktoren finden. Um weitere Faktoren des Signalweges aufzuklären, könnte das entwickelte Luciferase-Screening-System eingesetzt werden. Bezüglich der Regulationselemente des Safenersignalweges konnte eine große Ähnlichkeit zwischen mono- und dikotylen Pflanzen aufgezeigt werden. Darüber hinaus wurde der Nachweis erbracht, dass durch die Safener Mefenpyr und Isoxadifen auch in *Arabidopsis* Gene des pflanzlichen Detoxifizierungssystems induzierbar sind. In weiterführenden Versuchen könnte die Funktion der safenerinduzierten Gene, bei der Entgiftung der Herbizide, untersucht und nachgewiesen werden.

5 Zusammenfassung und Abstract

5.1 Zusammenfassung

Safener werden vielen modernen nichtselektiven Herbiziden beigemischt. Dies führt zur selektiven Aktivierung metabolischer Vorgänge in Kulturpflanzen, die zu einem schnelleren Abbau des Herbizides führen. Eine solche Wirkung kann in den Zielunkräutern jedoch nicht beobachtet werden. Durch Safener wird die Toleranz der Kulturpflanze gegenüber dem nichtselektiven Herbizid erhöht. Diese Wirkung konnte bislang nur in monokotylen Kulturpflanzen nachgewiesen werden. Ein besseres Verständnis der Regulationsmechanismen, die zu einer erhöhten Herbizidmetabolisierung in Kulturpflanzen führt, ist ein wichtiger Aspekt der Safenerforschung. Ziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung von Elementen des Safenersignalsweges, sowie eine Analyse der safenerinduzierten Genexpression in der dikotylen Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*.

Charakterisierung der Safener Signaltransduktion in *A. thaliana*

Zu diesen safenerinduzierbaren Enzymen des pflanzlichen Detoxifizierungssystem gehören unter anderem Glutathion-S-Transferasen (GSTs). Um *cis*-regulatorische Elemente des Safenersignalsweges zu charakterisieren, wurde der Promotor des Mais *In2.1* Gens verwendet. Dieses Gen kodiert für eine GST der hoch safenerinduzierbaren lambda Klasse (GSTLs) der GST-Superfamilie. Aufgrund der zuerst in Mais beschriebenen massiven Induktion von GSTLs durch Benzensulfonamid-Safener werden diese GSTs auch als „In2.1-Proteine“ bezeichnet. Der Promotor des *In2.1*-Gens wurde mit dem β -Glucuronidase (GUS) Reporter gen fusioniert und in das *Arabidopsis thaliana* Genom integriert.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass für die Safenerinduzierbarkeit des *In2.1*-Promotors durch Mefenpyr und Isoxadifen ein 100 bp langer Sequenzabschnitt relevant ist. Auf dieser Sequenz konnten zwei *as-1*- bzw. *ocs*-Elemente identifiziert werden. Die Deletion eines dieser Motive führte zu einer verringerten Safenerinduzierbarkeit des Promotors.

Die Bindung von zwei TGA-Transkriptionsfaktoren (TGA2/5) an eines dieser *as-1*-Elemente *in vivo* wurde in einem Chromatin Immunopräzipitationsexperiment nachgewiesen. Die Relevanz dieser Faktoren für die Induzierbarkeit des *In2.1*-Promotors, wurde durch eine Transformation des *P_{In2.1}:GUS* Konstruktes in eine TGA-Transkriptionsfaktor knockout Mutante (*tga2/3/5/6*) bestätigt.

TGA-Faktoren benötigen für die Induktion der Transkription einen Kofaktor. Ein solcher Interaktionspartner ist NPR1 (non expressor of PR genes). Zusammen mit TGA Faktoren führt er zur Expression von *PR1* (pathogenesis-related protein 1), einem Markergen der systemisch erworbenen Resistenz. Die Beteiligung dieses Kofaktors am Safenersignalweg wurde über die Transformation des *P_{In2.1}:GUS*-Konstruktes in eine entsprechende Mutante überprüft (*sai1-1*; salicylic insensitive 1). Der Safenersignalweg konnte hierbei als NPR1-unabhängig bewertet werden.

TGA-Transkriptionsfaktoren, *as-1*-Elemente, als auch die Akkumulation von Salizylsäure nach Pathogenbefall spielen eine wichtige Rolle für den Salizylsäuresignalweg, der zur Etablierung der systemisch erworbenen Resistenz führt. Da der *In2.1*-Promotor ebenfalls stark salizylsäureinduzierbar ist, wurde der Einfluss des internen Salizylsäuregehaltes auf die Induzierbarkeit des Promotors durch Mefenpyr und Isoxadifen überprüft. Eine niedrige endogene Salizylsäurekonzentration führte zu einem Verlust der Safenerinduzierbarkeit des Mais-Promotors in transgenen Salizylsäurebiosynthese-Mutanten (*NahG*, *sid2-2*). Der Einfluss der Applikation von Mefenpyr und Isoxadifen auf die Salizylsäurebiosynthese in Wildtyp (WT), *sid2-2*- und *NahG*-Pflanzen, wurde 2-6 h nach Safenerapplikation untersucht. Weder im WT noch in den Salizylsäurebiosynthesemutanten konnte eine durch Mefenpyr und Isoxadifen induzierte SA-Biosynthese nachgewiesen werden.

Um weitere noch unbekannte Elemente des Safenersignalweges zu identifizieren bietet sich ein Mutantenscreen an. Um hierfür die Voraussetzungen zu schaffen, wurden im Rahmen dieser Arbeit homozygote Arabidopsis Pflanzen mit dem Luciferase-Reporter gen unter Kontrolle des *In2.1*-Promotors generiert. Nach Mutagenese der Samen dieser Reporterlinie werden sich sowohl „loss-of-function“ (keine Reporter genexpression nach Safenerbehandlung) als auch „gain-of-function“ Mutationen (konstitutive Reporter genexpression ohne Safenerbehandlung) identifizieren lassen.

Die Genexpression in mit Mefenpyr und Isoxadifen behandelten *A. thaliana*

Die Wirkung von Mefenpyr und Isoxadifen auf die Genexpression von dikotylen Pflanzen, wurde durch ein Micro-Array-Experiment (ATH1 Gene Chip, Affymetrix) untersucht. Verwendung fanden hierbei die bereits für die Charakterisierung des *In2.1*-Promotors eingesetzten Wildtyp- und Mutantepflanzen (*tga2/3/5/6*, *sid2-2*, *NahG*).

In Wildtyppflanzen konnte die Induktion von Genen verschiedener Phasen des pflanzlichen Detoxifizierungssystems (P450s, GSTs, GTs, Transporter) als auch eines

endogenen *In2.1*-Gens nachgewiesen werden. Die induzierten GSTs gehören hauptsächlich zur tau Klasse (GSTUs) der GST-Superfamilie. Die Induktion von GSTs in *A. thaliana* kann, wie auch in Monokotylen, als statistisch signifikant für die Safenerantwort bewertet werden. Dieses Ergebnis unterscheidet sich von früheren Untersuchungen der safenerinduzierten GST-Expression in *Arabidopsis* in denen nach Behandlung mit dem Safener Benoxacor hauptsächlich die Induktion von phi Klasse GSTs (GSTFs) nachgewiesen wurde. Offensichtlich wirken verschiedene Safener selektiv auf die Genexpression von phi und tau-Klasse GSTs in *A. thaliana* was zuvor auch in Monokotylen beobachtet wurde.

Der Einfluss der TGA-Transkriptionsfaktoren auf den Safenersignalweg konnte durch das Genexpressionsexperiment mit der TGA-knockout Mutante bestätigt werden. Etwa die Hälfte der im Wildtyp safenerregulierten Gene sind durch diese Mutation betroffen. Unter den safenerregulierten Genen in Wildtyppflanzen wurde eine statistisch signifikante Induktion von WRKY-Transkriptionsfaktoren und eine Überrepräsentation von WRKY-Transkriptionsfaktor Bindungsstellen in den Promotorsequenzen nachgewiesen. Eine Beteiligung von WRKY-Transkriptionsfaktoren im Safenersignalweg ist aufgrund dieser Ergebnisse sehr wahrscheinlich.

Die Ergebnisse wurden in einem Modell des Safenersignalweges zusammengefasst. Dieses Modell stellt eine gute Basis für weiterführende Versuche zur Charakterisierung der Safener gesteuerten Signalkaskade dar. Aufgrund der vielen Parallelen hinsichtlich der Safenerantwort in mono- und dikotylen Pflanzen scheint es wahrscheinlich, dass künftig doch noch Safener für dikotyle Kulturpflanzen zu finden sein werden.

5.2 Abstract

Many modern non selective herbicides are supplemented with safeners. These chemical compounds rapidly activate herbicide metabolising processes in crop plants without reducing herbicide activity in target weeds. Therefore, tolerance against non-selective herbicides is increased in safener-treated crop plants but not in weeds. This protective effect could only be observed in monocotyledons so far. The mode of action of safeners was studied and reviewed in several publications, but the molecular signalling cascade leading to the expression of the corresponding genes is still unknown. The aim of the present work was to characterise important elements of the safener signalling pathway and to analyse the safener induced gene expression in the dicotyledon model plant *Arabidopsis thaliana*.

Characterisation of the *In2.1*-promoter in *Arabidopsis thaliana*

Among the safener inducible enzymes of the plant detoxification system are glutathione-S-transferases (GSTs). To characterise *cis*-acting sequence motifs of the safener signalling pathway, the promoter of the maize *In2.1* gene was used. *In2.1* encodes a GST of the highly safener-inducible lambda class (GSTLs) of the GST super family. Based on the high inducibility of these GSTLs by benzene sulphonamide safeners, which was firstly reported for maize, these GSTs are designated as “In2.1-proteins”. For further studies, the *In2.1*-promoter was fused to the β -glucuronidase (GUS) reporter gene and stably introduced into the *Arabidopsis thaliana* genome.

Using multiple promoter deletion constructs, it was possible to identify a 100 bp sequence within the *In2.1* promoter that mediates safener-induced expression of the GUS reporter gene. This sequence contains two *ocs*- or *as-1*-like elements. The deletion of one of these elements compromised safener inducibility of the mutated promoter.

TGA factors typically bind to *as-1* elements and the *in vivo* binding of two of these factors (TGA2/5) to one of the *as-1*-like elements of the *In2.1*-promoter was demonstrated in a chromatin immunoprecipitation experiment. Consistent with the involvement of TGA transcription factors in the safener signalling pathway, induction of the *P_{In2.1}:GUS* construct by safeners was strongly reduced in a mutant background lacking four TGA factors (*tga2/3/5/6*).

Since TGA factors do not possess a trans-activation domain, the *as-1*-element bound TGA factors need a co-activator to mediate transcription. TGA transcription factors and

as-1 elements are a part of the systemic acquired resistance (SAR) signalling pathway, which gets activated after pathogen infection or the application of salicylic acid (SA). A key regulator of this pathway is NPR1 (*non-expressor of PR1*), a cofactor activating the *as-1*-element bound TGA-factor transcription complex, leading to *PR1* (*pathogenesis related protein 1*) gene expression. To investigate if safeners mediate *GUS* gene expression via NPR1, the $P_{In2.1}:GUS$ construct was transformed into the NPR1-deficient *Arabidopsis* mutant *sai1-1* (*salicylic acid insensitive 1*). *In2.1* promoter activity in the *sai1-1* background was as high as in wild-type plants indicating that the safener signalling pathway is NPR1 independent.

Since *In2.1*-promoter activity is strongly induced by SA treatment, the relevance of endogenous SA levels for safener-induced promoter activity was analysed. Low endogenous SA levels in the SA-deficient *sid2-2* and *NahG* mutants impaired the induction of the $P_{In2.1}:GUS$ reporter gene by the safeners mefenpyr and isoxadifen. However, when endogenous SA levels were measured 2 and 6 h after mefenpyr and isoxadifen treatment in wild-type plants and the two SA-deficient mutants, it was found that SA biosynthesis is not increased after safener treatment.

A possible strategy for the identification of unknown elements of the safener signalling pathway is a screen for safener signalling-deficient mutants. As a prerequisite for such an experiment, homozygous transgenic *Arabidopsis* plants carrying the luciferase reporter gene under control of the *In2.1*-promoter were generated in the present work. After the mutagenesis of seeds of this reporter line, it will be possible to identify both loss-of-function (no reporter gene expression after safener treatment) as well as gain-of-function (constitutive reporter gene expression without safener treatment) mutants.

Gene expression in *Arabidopsis thaliana* after treatment with mefenpyr and isoxadifen

To investigate the effect of safeners in dicotyledons, *Arabidopsis* wt and mutant plants (*tga2/3/5/6*, *sid2-2*, *nahG*) were analysed for mefenpyr and isoxadifen-induced gene expression.

The Affymetrix ATH1 gene chip was used in this gene expression profiling experiment revealing the safener-induced expression of several genes belonging to the detoxification system of plants: glutathione-S-transferases (mainly of the tau class of the GST super family; GSTUs), glucosyl-transferases (GTs) and cytochrome P450 monooxygenases (P450s). Like it was expected from the safener mode of action in monocotyledons, the statistically significant induction of GSTs was also observed in

dicotyledons. These results are in contrast to earlier publications which showed the induction of phi class GSTs (GSTFs) in benoxacor-treated *Arabidopsis* seedlings. Different safeners appear to cause the selective expression of phi or tau class GSTs in *Arabidopsis*, as previously reported for monocotyledons.

In the quadruple TGA knockout mutant (*tga2/3/5/6*) safener inducibility was lost for half of the genes that were shown to be activated after safener treatment in wild-type plants, thus confirming a role for TGA factors in the safener signalling pathway. In addition to TGA factors, WRKY transcription factors are likely to be involved in safener signalling. Gene expression profiling revealed the statistically significant induction of nine WRKY factors, and WRKY binding sites were found to be overrepresented in the promoters of mefenpyr and isoxadifen induced genes.

From the results of the present work, a model of the safener signalling pathway was derived, which constitutes a good basis for further studies of the safener regulated signalling cascades. Considering the obvious similarities in safener-regulated gene expression in mono- and dicotyledons, the future identification of safeners for dicotyledonous crops seems possible.

6 Literaturverzeichnis

Abe H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. 2003. *Arabidopsis* AtMYC2 (BHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78

Abreu, M.E., and Munné-Bosch, S. 2009. Salicylic acid deficient in NahG transgenic lines and sid2 mutants increases seed yield in the annual plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Exp. Bot.* 60(4): 1261-1271

Almeras, E., Stolz, S., Vollenweider, S., Reymond, P., Meine-Saffrane, L., Farmer, E.E. 2003. Reactive electrophile species activate defense gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 34: 205-216

Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C. 1998. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773-784

Alvarez, M.E., 2000. Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol. Biol.* 44: 429-442

Andrews, C.J., Cummins, I., Skipsey, M., Grundy, N.M., Jepson, I., Townson, J., Edwards, R. 2005. Purification and characterization of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. *Pestic. Biochem. Physiol.* 82 (3): 205-219

Asai, T., Guillaume, T., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.-L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., Sheen, J. 2002. MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977-980

Baker, C.J. and Orlandi, E.W. 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33: 299-321

Bartsch, K., Kriete, G., Broer, I. and Pühler, A. 1996. Novel genes coding for amino acid deacetylases with specificity for N-Acetyl-L-Phosphinothricin, their isolation and their use. Patent No. WO 98/27201. Hoechst Schering Agrevo GmbH, EUR

Bearson, S.R., Sanchez-Moreiras, A., Pedrol-Bonjoch, N., Schulz, M., Kagan, I.A., Agarwal, A.K., REigosa, M.J., Duke, S.O. 2005. Detoxification and transcriptome

response in *Arabidopsis* seedlings exposed to the allelochemical benzoxzolin-2(3H)-one. J. Biol. Chem. 280: 21867-21881

Beck, A., Lenzian, K., Oven, M., Christmann, A. (2003). Phytochelatin synthase catalyzes key step in turnover of glutathione conjugates. *Phytochemistry* 62: 423-431

Behringer, C. 2006 „Klonierung von Herbizid-Safener-induzierbaren Promotoren aus Pflanzen und Charakterisierung ihrer Aktivitätsmuster mit Hilfe von Reportergen-Konstrukten in *Arabidopsis thaliana*“, Diplomarbeit. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig

Bender, R. und Lange, St. 2001. Was ist der p-Wert? Dtsch. Med.Wschr. 126: T39-T40, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York

Benfey, P.N. and Chua, N.-H. 1990. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: Combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250: 959-966

Benfey, P.N., Ren, L. and Chua, N.H. 1990. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development. *EMBO. J.* 9: 1677–1684

Bevan, M. W., Flavell, R. B., Chilton, M. D. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. *Nature* 304: 184-187

Birnboim, H.C., Doly, J. 1979. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nuc. Acid Res.* 7: 1513-1522

Blanco, F., Garretón, V., Frey, N., Dominguez, C., Pérez-Acle, T., Van der Straeten, V., Jordana, X., Holuigue, L. 2005. Identification of NPR1-dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 59: 927-944

Blanco, F., Salinas, P., Cecchini, N.M., Jordana, X., Van Hummelen, P., Alvarez, M.E., Holuigue, L. 2009. Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.*

Bolle, C. 2004. The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development. *Planta* 218: 683-692

Bordás, B., Kömíves, T., Szántó, Z., Lopata, A. 2002. Comparative three-dimensional quantitative structure-activity relationship study of safeners and herbicides. *J. of Agricultural Food Chemistry* 48: 926-931

Bouchez, D., Tokuhsa, J.G., Liewellyn, D.J., Dennis, E.S. and Ellis, J.G. 1989. The ocs element is a component of the promoters of several T-DNA and plant viral genes. *EMBO J.* 8: 4197-4204

Böttcher, C. 2007. Untersuchungen zur Biologie freier und lipidgebundener Phytodiensäuren. Dissertation. Ruhr-Universität Bochum, Bochum

Bradford, M.M., 1987. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Brenner, W. 2002. I. Etablierung eines induzierbaren Suizidsystems zur Identifizierung von Mutanten der salizylsäureabhängigen Signaltransduktion. II. Expression von tierischen Signaltransduktionskomponenten in Tabak zur Herstellung eines induzierbaren Expressionssystems. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen, Göttingen.

Bryant, C. and Deluca, M. 1991. Purification and characterization of an oxygen-insensitive NAD(P)H nitroreductase from *Enterobacter cloacae*. *J. Biol. Chem.* 266: 4119-4125

Burton, J.D., Maness, E.P., Monks, D.W., Robinson, D.K., 1994. Sulfonylurea selectivity and safener activity in a landmark and a merit sweet corn. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48: 163-172

Butterbrodt, T., Thurow, C., Gatz, C. 2006. Chromatin immunoprecipitation analysis of the tobacco PR-1a- and the truncated CaMV 35S promoter reveals differences in salicylic acid-dependent TGA factor binding and histone acetylation. *Plant Mol. Biol.* 61: 665-674

Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., Dong, X. 1994. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* 6: 1583-1592

Cao, H., Glazebrook, J., Clarek, J.D., Volko, S., Dong, X. 1997. The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* 88: 57-63

- Cao, H., Li, X., Dong, X. 1998.** Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6531-6536
- Casida, J.E., Kimmel, E.C., Ohkawa, H., Ohkawa, R., 1975.** Sulfoxidation of thiocarbamate herbicides and metabolism of thiocarbamate sulfoxides in living mice and liver enzyme systems. *Pestic. Biochem. Physiol.* 5: 1-11
- Century, K.S., Holub, E.B., Staskawicz, B.J. 1995.** NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Acad. Sci.* 92(14): 6597-6601
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886
- Chen, W., Chao, G., Singh, K.B. 1996.** The promoter of a H₂O₂-inducible, *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J.* 10: 955-966
- Chen, W. and K.B. Singh 1999.** The auxin, hydrogen peroxide and SA induced expression of GST6 Promoter is mediated in part by an ocs-Element. *The Plant J.* 19 (6): 667-677
- Chen, C. and Chen, Z. 2000.** Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 42: 387-396
- Chen, C. and Chen, Z. 2002.** Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signaling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 295-305
- Chen, W., Provart, N.J., Glasebrook, J., Katagiri, F., Chang, H.-S. et al. 2002.** Expression profile matrices of *Arabidopsis* transcription factor genes predict their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell.* 14: 559-574
- Clough, S.J., Bent, A.F. 1998.** Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16 (6): 735-743
- Cobbett, C.S. 2000.** Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 211-216

- Cole, D., Cummins, I., Hatton, P., Dixon, D., Edwards, R. 1997.** Glutathione transferases in crops and major weeds. In Hatzios, ed, Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, 139-154
- Cole, D.J., Edwards, R. 2000.** Secondary metabolism of agrochemicals in plants. In T. Roberts, ed, Metabolism of Agrochemicals in Plants. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, pp. 108-134
- Coleman, J.O.D., Blake-Kalff, M.M.A., Dvies, T.G.E. 1997a.** Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. Trends in plant science 2: 114-151
- Coleman, J.O.D., Randall, R., Blade-Kalff, M.M.A. 1997b.** Detoxification of xenobiotics in plant cells by glutathione conjugation and vacuolar compartmentalization: a fluorescent Test using monochlorobimane. Plant Cell Environ. 20: 449-460
- Coquoz, J.-L., Buchala, A. & Metraux, J.-P. 1998** The biosynthesis of salicylic acid in potato plants. Plant Physiol. 117: 1095-1101
- Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R. 1997.** Purification of multiple glutathione transferases involved in herbicide detoxification from wheat (*Triticum aestivum* L.) treated with the safener fenchlorazole-ethyl. Pestic. Biochem. Physiol. 59: 35-49
- Cummins, I., Cole, D.J., Edwards, R., 1999.** A role of glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. Plant J. 18: 285-292
- Dallal, G.E. 2007.** Historical background to the origins of p-values and the choice of 0,05 as the cut-off for significance; from "the little handbook of statistical practice" Tufts University, Boston
- Daniel, V. 1993.** Gluathione S-transferases: gene structure and regulation of expression. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28: 173-207
- Davies, J., Caseley, J.C. 1999.** Herbicide safeners: a review. Pestic Sci., 55: 1043-1058
- Davies, J. 2001.** Herbicide safeners – commercial products and tools for agrochemical research. Pesticide Outlook 10-15

Delaney, T.P., Uknes, S., Vemooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, W., Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250

Dempsey, D.M., Shah, J., Klessig, D.F. 1999. Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 18: 547-575

Deng, F., Hatzios, K.K. 2002a. Purification and characterization of two glutathione S-transferase isozymes from indica-type rice involved in herbicide detoxification. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72: 10-23

Deng, F., Hatzios, K.K. 2002b. Characterization and safener induction of multiple glutathione S-transferases in three genetic lines of rice. *Pestic. Biochem. Physiol.* 72: 24-39

De Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., Kijne, J. 1996. Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 24: 4624-4631

Depicker, A.G., Jacobs, A.M. and Van Montagu, M.C. 1988. A negative selection scheme for tobacco protoplasts-derived cells expressing the T-DNA gene 2. *Plant Cell Rep.* 7: 63-66

DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R., Goldsbrough, P.B. 2002. Induction of Glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide Safeners. *Plant Phys.* 130: 1497-1505

DeRidder, B.P. and Goldsbrough, P.B. 2006. Organ-specific expression of glutathione s-transferases and the efficacy of herbicide safeners in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 140: 167-175

Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. and Fobert, P.R. 2000. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* 12: 279–290

Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., Desveaux, D., Fobert, P.R., 2003. The *Arabidopsis* NPR2 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic/leucine zipper transcription factor TGA1. *Plant Cell* 15: 2181-2191

Dewdney, J. et al. 2000. Three unique mutants of *Arabidopsis* identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J.* 24: 205-218

- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. 1997a.** Characterisation of multiple glutathione transferases containing the GST I subunit with activities toward herbicide substrates in maize (*Zea mays*). Pestic. Sci. 50:72-82
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. 1997b.** Characterization and regulation of multiple glutathione transferases in corn (*Zea mays*). Plant Physiol. (Suppl). 114: 155-156
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. 1998.** Purification, regulation and cloning of a glutathione transferase (GST) from maize resembling the auxin-inducible type III GSTs. Plant Mol. Biol. 36: 75-87
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. 1999.** Dimerization of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. Plant Mol. Biol. 40: 997-1008
- Dixon, D.P., Cole, D.J., Edwards, R. 2000.** Characterisation of a Zeta Class Glutathione Transferase from *Arabidopsis thaliana* with a Putative Role in Tyrosine Catabolism. Arch. Biochem. Biophys. 384: 407-412
- Dixon, D.P., Davis, B.G., Edwards, R. 2002.** Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants J. Biol. Chem. 277: 30859-30869
- Dixon, P.D., Hawkins, T., Hussey, P.J., Edwards, R. 2009.** Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily. J. of Exp. Botany 60 (4): 1207-1218
- Dong, X. 1998.** SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 316-323
- Dong, X. 2001.** Genetic dissection of systemic acquired resistance. Curr. Opin. Plant Boil. 4: 309-314
- Dong, D., Jiang, S., Ni, Y., Jiang, B. 2001.** Syntheses and properties of thermotropic copolyesters of p-hydroxybenzoic acid. Eur. Polym. J. 37: 611-617
- Dong, J., Chen, C., Chen, Z. 2003.** Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Mol. Biol. 51:21-37
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M.A., Saindrenan, P., Fritig, B., Kauffmann, S. 1997.** Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of

salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10: 646-655

Droog, F., Spek, A., van der Kooy, A., de Ruyter, A., Hoge, H., Liggenga, K., Hooykaas, P., van der Zaal, B. 1995. Promoter analysis of the auxin-regulated tobacco glutathione S-transferase genes Nt103-1 and Nt103-35. *Plant Mol. Biol.* 29: 413-429

Durrant, W.E. and Dong, W. 2004. Systemic acquired resistance. An annual Review of Phytopathology 42: 182-209

Edwards, R. 1996. Characterisation of glutathione transferases and glutathione peroxidases in pea (*pisum sativum*). *Physiol. Plant.* 98: 594-604

Edwards, R. and Dixon, D.P. 2000. in "Herbicides and their mechanisms of action" (Cobb, A.H., and Kirkwood, R.C., eds) 38-71, Sheffield Academic Press, Sheffield UK

Edwards, R., Dixon, D.P., Walbot, V. 2000. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5: 193-198

Edwards, R., Dixon, D.P., Helmut, S., Lester, P. 2005a. Plant glutathione transferases. In: *Methods in enzymology.* Academic Press, New York, pp. 169-186

Edwards, R., Del Buono, D., Fordham, M., Skipsey, M., Brazier, M., Dixon, D.P., Cummins, I. 2005b. Differential induction of glutathione transferases and glucosyltransferases in wheat, maize and *Arabidopsis thaliana* by herbicide safeners. *Z. Naturforsch* 60c: 307-316

Edwards, R., Brazier-Hicks, M., Dixon, D.P., Cummins, I. 2005c. Chemical manipulation of antioxidant defenses in plants. In: *Advances in botanical research*, Vol 42: 1-32

Ekler, Z., Dutka, F., Stephenson, G.R., 1993. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione-S-transferase activity in maize. *Weed Res.* 33: 311-318

Ellis, J.G., Tokuhisa, J.G., Liewellyn, D.J., Bouchez, D., Singh, K., Dennis, E.S., Peacock, W.J. 1993. Does the ocs-element occur as a functional component of the promoters of plant genes? *The plant J.* 4(3): 433-443

Ekman, D.R., Lorenz, W.W., Przybyla, A.E., Wolfe, N.L., Dean, J.F.D. 2003. SAGE analysis of transcriptome responses in *Arabidopsis* roots exposed to 2,4,6-trinitrotoluene. *Plant Physiol.* 133: 1397-1406

Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. 1999. Early nuclear events in plant defense signaling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 18: 4689-4699

Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* 5: 199-206

Eulgem, T. 2005. Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome, *Trends Plant Sci.* 10(2): 71-78

Ezra, G., Gressel, J., 1982. Rapid effects of thiocarbamate herbicide and its chloroacetamide protectants on macromolecular synthesis and glutathione levels in maize cell culture. *Pestic. Biochem. Physiol.* 17: 48-58

Ezra, G., Krochmal, E., Gressel, J. 1982. Competition between a thiocarbamate herbicide and herbicide protectants at the level of uptake into maize cells in culture. *Pestic. Biochem. and Physiol.* 18: 107-112

Fan, W., and Dong, X. 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1377-1389

Farago, S., Brunold, C., Kreuz, K., 1994. Herbicide safeners and glutathione metabolism. *Physiol. Plantarum* 91: 537-542

Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., Parker, J.E. 2001. Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signalling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J.* 20: 5400-5411

Fisher, R.A. 1935. The logic of inductive inference, *Journal of the Royal Statistical Society Series A* 98: 39-54

Fisher, R.A. 1962. Confidence limits for a cross-product ratio, *Australian Journal of Statistics* 4: 41

- Fletkamp, D., Masterson, R., Starke, J., Rosahl, S. 1994.** Analysis of the involvement of ocs-like bZip-binding elements in the differential strength of the bidirectional mas 1'2'promoter. *Plant Physiol.* 105: 259-268
- Flor, H.H. 1995.** host-parasite interactions in flax rust – its genetic and other implications. *Phytopathology* 45: 680-685
- Fobert, P.R., Després, C. 2005.** Redox control of systemic acquired resistance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 8(4): 378-82
- Fode, B., Siemsen, T., Thurow, C., Weigel, R., Gatz, C. 2008.** The *Arabidopsis* GRAS protein SCL14 interacts with class II TGA transcription factors and is essential for the activation of stress-inducible promoters. *Plant Cell.* Nov 4 [epub ahead of print]
- Fode, B. 2008.** The GRAS Protein scl14 and TGA transcription factors interact to regulate stress-inducible promoters. Dissertation, Georg-August-Universität zu Göttingen, Göttingen
- Foley, R.C., Grossman, C., Ellis, J.G., Liewellyn, D.J., Dennis, E.S., Peacock, W.J., Singh, K.B. 1993.** Isolation of a maize bZIP protein subfamily: candidates for the ocs-element transcription factor. *Plant J.* 3: 669-679
- Foyer, C.H and Noctor, G. 2005.** Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Friedrich, L., Lawton, K., Dincher, S., Winter, A., Staub, T., Uknes, S., Kessmann, H., Ryals, J. 1996.** Benzothiadiazole induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant J.* 10: 61-70
- Fromm, H., Katagiri, F., Chua, N.H. 1989.** An octopine synthase enhancer element directs tissue-specific expression and binds ASF-1, a factor from tobacco nuclear extracts. *Plant Cell* 1: 977-984
- Fromm, H., Katagiri, F., Chua, N.-H. 1991.** The tobacco transcription activator TGA1a binds to a sequence in the 5'-upstream region of a gene encoding a TGA1a related protein. *Mol. Gen. Gene* 229: 181-188
- Fuerst, E.P., 1987.** Understanding the mode of action of chloroacetanilide and thiocarbamate herbicides. *Weed Technol.* 1: 270-277

Fuerst, E.P., Lamoureux, G.L., Ahrens, W.H., 1991. Mode of action of the dichloroacetamide antidote BAS 145-138 in corn. *Pestic. Biochem. Physiol.* 39: 138-148

Fuerst, E.P., Irzyk, G.P., Miller, K.D., 1993. Partial characterization of glutathione S-transferase isozymes induced by the herbicide safener benoxacor in maize. *Plant Physiol.* 102: 795-802

Gaffney, T., Freidrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. 1993. Requirement of Salicylic-Acid for the induction of systemic acquired-resistance, *Science* 261 (261): 754-756

Gallagher, S.R., Stomp, A.M., 1992. GUS Protocols: Using the GUS Gene as a reporter of gene expression

Garreton, V., Carpinelli, J., Jordana, X. and Holuigue, L. 2002. The as-1 promoter element is an oxidative stress-responsive element and salicylic acid activates it via oxidative species. *Plant Physiol.* 130: 1516–1526

Glazebrook, J., Rogers, E.E., Ausubel, F.M. 1996. Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143: 973-982

Glombitza, S., Dubuis, P-H., Thulke, O., Welzl, G., Bovet, L., et al. 2004. Crosstalk and differential responses to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Mol. Biol.* 54: 817-835

Gobel, C., Feussner, I., Hamberg, M., Rosahl, S. 2002. Oxylinin profiling in pathogen-infected potato leaves. *Biochim. Biophys. Acta* 1584: 55-64

Goldsbrough, A.P., Albrecht, H., Stratford, R. 1993. Salicylic acid inducible binding of a tobacco nuclear protein to a 10 bp sequence which is highly conserved amongst stress-inducible genes. *Plant J.* 3: 563-571

Gonneau, J., Mornet, R., Laloue, M. 1998. A *Nicotiana plumbaginifolia* protein labeled with an azido cytokinin agonist is a glutathione S-transferase. *Physiol. Plant* 103: 114-124

Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H., Ryals, J. 1996. Benzothiodiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8: 629-643

- Greenberg, J.T., Guo, A.L., Klessig, D.F., Ausubel, F.M. 1994.** Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77: 551-563
- Gronwald, J.W., 1989.** Influence of herbicide safeners on herbicide metabolism. In: Hatzios, K.K., Hoagland, E.R. (Eds.), *Crop Safeners for Herbicides: Development, Uses and Mechanisms of Action*. Academic Press, New York 103-128
- Gronwald, J.W., Plaisance, K.L. 1998.** Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. *Plant Physiol.* 117: 877-892
- Grun, G., Berger, S., Matthes, D., Mueller, M.J. 2007.** Early accumulation of non-enzymatically synthesized oxylipins in *Arabidopsis thaliana* after infection with *Pseudomonas syringae*. *Funct. Plant Biol.* 34: 65-71
- Hacker, E., Bieringer, H., Willms, L, Ort, O., Koecher, H., Kehne, H., Fischer, R.C. 1999.** Iodosulfuron plus mefenpyr-diethyl: An new foliar herbicide for weed control in cereals. In *Proc. Br. Crop Prot. Conf. – Weeds* 1: 15-22
- Hacker, E., Bieringer, H., Willms, L., Rösch, W., Köcher, H., Wolf, R. 2000.** Mefenpyr-diethyl – A safener for fenoxaprop-P-ethyl and iodosulfuron in cereals. *Z. Pflanz. Pflanzenschutz, Sonderheft XVII*, 493-500
- Hacker, E., Bieringer, H., Willms, L., Lorenz, K., Koecher, H., Huff, H., Borrod, G., Brusche, R., 2001.** Mesosulfuron-methyl- a new active ingredient for grass weed control in cereals. *Proc. Br. Crop Prot. Conf. – Weeds*, 43-48
- Hacker, E., Bieringer, H., Willms, L, Schnabel, G., Koecher, H., Hagemeister, H., Steinheuer, W. 2002.** *Z. Pflanz. Pflanzenschutz, Sonderheft XVIII* 747-756
- Hammond-Kosack, K.E. und Jones, J.D.G. 1996.** Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8: 1773-1791
- Hatzios, K.K. 1991.** An overview of the mechanisms of action of herbicide safeners. *Z. Naturforsch.* 46 (c): 819-827
- Hatzios. K.K., 1993.** An overview of the uses and action of herbicide safeners. *Pesticides/Environment: Molecular Biological approaches*. In: Mitsui, T. (Ed.), *Proceedings of the first International Symposium on Pesticide Science*. Tokyo, Japan 155-165

- Hayes, J.D. and McLellan, L.I. 1999.** Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a Coordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Research* 31: 273-300
- Hazen, S.P., Borevitz, J.O., Harmon, F.G., Pruneda-Paz, J.L., Schultz, T.F., Yanovxky, M.J., Liljegren, S.J., Ecker, J.R., Kay, S.A. 2005.** Rapid array mapping of circadian clock and developmental mutations in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* 138: 990-997
- He, Y., and Gan, S. 2001.** Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 47: 595-605
- He, Y., Fukushige, H., Hilderbrand, D.F., Gan, S. 2002.** Efficiency supporting a role of jasmonic acid in *Arabidopsis* leaf senescence. *Plant Physiol.* 128: 876-884
- Hershey, H.P. and Stoner, T.D. 1991.** Isolation and characterization of cDNA clones for RNA species induced by substituted benzensulfonamides in corn. *Plant Mol. Biol.* 17 (4): 679-690
- Hoffman, O.L., 1953.** Inhibition of auxin by 2,4,6-trichlorophenoxy acetic acid. *Plant Physiol.* 28: 622-628
- Hoffman, O.L., 1969.** Chemical antidotes for EPTC in corn. *Abst. Weed Sci. Soc. Am.* 9, 12-125
- Hoffman, O.L., 1978.** Herbicide antidotes: from concept to practice. In: Pallos, F.M., Casida, J.E. (Eds.), *Chemistry and Action of Herbicide Antidotes*. Academic Press, New York 1-13
- Holuigue, L., Salinas, P., Blanco, F., Garretón, V. 2007.** Salicylic acid and reactive oxygen species in the activation of stress defence genes. In: Hayat, S., Ahmad, A. (eds) *Salicylic acid-a plant hormone*. Springer, Dordrecht 197-246
- Holt, D.C., Lay, V.J., Clark, E.D., Dinsmore, A., Jepson, I., Bright, S.W., Greenland, A.J., 1985.** Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta* 196: 295-303
- Horvath, D.M. and Chua, N.H. 1996.** Identification of an immediate-early salicylic acid-inducible tobacco gene and characterization of induction by other compounds. *Plant Mol. Biol.* 31: 1061-1072

- Hovarth, D.M., Huang, D.J., Chua, N.-H. 1998.** Four classes of salicylate-induced tobacco genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 895-905
- Hubbell, J.P., Casida, J.E., 1977.** Metabolic fate of N, N-dialkylcarbomyl moiety of hiocarbamate herbicides in rats and corn. *J. Agric. Food Chem.* 25: 404-413
- Imbusch, R. and Mueller, M.J. 2000.** Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F1 (Phytprostanes F1) in plants. *Plant Physiol.* 124: 1293-1304
- Irzyk, G.P. and Fuerst, E.P. 1993.** Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*). *Plant Physiol.* 102: 803-810
- Ishiguro S and Nakamura K. 1994.** Characterization of a cDNA encoding a novel DNA-binding protein, SPF1, that recognizes SP8 sequences in the 5' upstream regions of genes coding for sporamin and beta-amylase from sweet potato. *Mol. Gen Genet.* 244: 563-571
- Jablonkai, I., Hatzios, K.K. 1993.** In vitro conjugation of chloroacetanilide herbicides and atrazine with thiols and contribution of nonenzymatic conjugation to their glutathione-mediated metabolism in corn. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1736-1742
- Jablonkai, I., Hatzios, K.K., 1994.** Microsomal oxidation of the herbicide EPTC and acetolachlor and of the safener MG-191 in maize. *Pestic. Biochem. Physiol.* 41: 221-232
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Droge-Laser, W., Vicente-Carbojosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. 2002.** bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.* 7: 106-111
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bevan, M.W. 1987.** GUS fusions: β -galactosidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6: 3901-3907
- Jepson, I., Lay, U.J., Holt, D.C., Bright, S.W., Greenland, A.J., 1994.** Cloning and characterization of maize herbicide safener induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isomers I, II and IV. *Plant Mol. Biol.* 26: 1855-1866
- Johnson, C., Boden, E., Desai, M., Pascuzzi, P. and Arias, J. 2001a.** In vivo target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J.* 28: 237-243.

- Johnson, C., Glover, G., Arias, J. 2001b.** Regulation of DNA binding and trans-activation by a xenobiotic stress-activated plant transcription factor. *J. Bio. Chem.* 276: 172-178
- Johnson, C., Boden, E. and Arias, J. 2003.** Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 1846–185
- Kachroo, P., Yoshioka, K., Shah, J., Dooner, H.K., Klessig, D.F. 2000.** Resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two-host genes and is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene, and jasmonate independent. *Plant Cell* 12: 677-690
- Kalde, M., Barth, M., Somssich, I.E., Lippok, B. 2003.** Members of the *Arabidopsis* WRKY group III transcription factors are part of different plant defense signalling pathways. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 295-305
- Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsiachlis, P.H., Makris, A.M. 2000.** A novel plant glutathione-S-transferase/peroxidase suppresses bax lethality in yeast. *J. Biol. Chem.* 275: 29207-29216
- Kang, H.G., Singh, K.B. 2000.** Characterization of a salicylic acid-responsive, *Arabidopsis* Dof domain protein: Overexpression of OBP3 leads to growth defects. *Plant J.* 21: 329-339
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A. 2002.** Gateway vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7 (5): 193-195
- Karlin-Neumann, G.A., Brusslan, J.A., Tobin, E.M. 1991.** Phytochrome control of the *tms2* gene in transgenic *Arabidopsis*: a strategy for selecting mutants in the signal transduction pathway. *Plant Cell* 3 (6): 573-582
- Katagiri, F., Seipel, K., Chua, N.-H., 1992.** Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 12: 48109-4816
- Katagiri, F., Yamazaki, K., Horikoshi, M., Roeder, R.G., Chua, N.-H. 1990.** A Plant DNA-Binding protein increases the number of active preinitiation complexes in a human *in vitro* transcription system. *Genes Dev.* 4: 1899-1909
- Katagiri, F., Seipel, K., Chua, N.-H. 1992.** Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* 12: 4809-4816

- Kawata, T., Imada, T., Shiraishi, H., Okada, K., Shimura, Y., Ivabuchi, M. 1992.** A cDNA clone encoding a HBP-1b homologue in *Arabidopsis thaliana*. Nucl. Acids Res. 20: 1141-1147
- Keen, N.T. 1992.** Gene-for-Gene complementarity in plant-pathogen interactions. Annu. Rev. Genet. 24: 447-463
- Kegler, C. 2001.** Analyse des Transkriptionsfaktors TGA2.1 aus *Nicotiana tabacum*. Dissertation, Georg-August Universität Göttingen, Göttingen
- Kesarwani, M., Yoo, J., Dong, X. 2007.** Genetic Interactions of TGA Transcription Factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. Plant Physiol. 144(1) : 336-346
- Ketchersid, M.L., Vieter, D.M., Merkle, M.G., 1982.** CGA-43089 effects on metolachlor uptake and membrane permeability in grain sorghum (*Sorghum bicolor*). J. Plant Growth Regul. 1: 285-294
- Kim, Y., Buckley, K., Costa, M.A., An, G. 1994.** A 20 nucleotide upstream element is essential for the nopaline synthase (nos) promoter activity. Plant. Mol. Biol. 24: 105-117
- Kim, H.S., Delaney, T.P. 2002.** Over-expression of TGA5, which encodes a bZIP transcription factor that interacts with NIM1/NPR1, confers SAR-independent resistance in *Arabidopsis thaliana* to *Peronospora parasitica*. The Plant J. 32(2) : 151-163
- Kiyosue, T., Ymaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 1993.** Characterization of two cDNAs (ERD11) and (ERD13) for dehydration-inducible genes that encode putative glutathione S-transferases in *Arabidopsis thaliana* L. FEBS Lett. 335: 189-192
- Klatt, P. and Lamas, S. 2000.** Regulation of protein function by Sglutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. Eur. J. Biochem. 267 (16): 4928-4944
- Klienedinst, S., Pascusszi, P., Redman, J., Desai, M., Arias, J. 2000.** A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. Plant Mol. Biol. 42: 679-688
- Köcher, H., Büttner, B., Schmidt, E., Löttsch, K., Schultz, A. 1989.** Influence of HOE 70542 on the behavior of fenoxaprop-ethyl in wheat. Proceedings 1989 Brighton Crop Protection Conference-Weeds, 495-500

Koecher, H. 1999. Mode of action of the herbicide safener AE F122996 (summary) Hoechst Schering AgrEvo GmbH, Frankfurt am Main

Köcher, H. 2005. Pflanz.-Nachrichten – Bayer 58: 179-194

Komives, T., Dutka, F., 1986. Biochemical mode of action of the safener MG-191. Proc. EWRS Symp. 381-385

Kocsy, G., Van Ballmoos, P., Ruegsegger, A., Szalai, G., Galiba, G., Brunold, C. 2001. Increasing the glutathione content in a chilling-sensitive maize genotype using safeners increased protection against chilling-induced injury. Plant Physiol. 127: 1147-1156

Krawczyk, S., Thurow, C., Niggeweg, R. and Gatz, C. 2002. Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. Nucleic Acids Res. 30: 775–781

Kreuz, K., Tommasini, R., Martinoia, E. 1996. Old enzymes for a new job. Herbicide detoxification in plants. Plant Physiology 111: 349-353

Kriete, G., Niehaus, K., Perlick, A.M., Puhler, A., Broer, I. 1996. Male sterility in transgenic tobacco plants induced by tapetum-specific deacetylation of the externally applied non-toxic compound N-acetyl-L-phosphinothricin. Plant J. 9: 809-818

Kuc, J. 1982. Induced immunity to plant disease resistance. BioScience 32: 854-860

Lam, E., Benfey, R.N., Gilmartin, P.M., Fang, R-X., Chua, N-H. 1989. Site-specific mutations alter in vitro factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 7890-7894

Lam E., Katagiri, F., Chua, N.H. 1990. Plant nuclear factor ASF-1 binds to an essential region of the nopaline synthase promoter. J. Biol. Chem. 265: 9909-9913

Lamb, C.J., Lawton, M.A., Dron, M., Dixon, R.A. 1989. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. Cell 56: 215-224

Lamb, C.J. 1994. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. Cell 76: 419-422

- Lamoureux, G.L. and Rusness, D.G. 1981.** Catabolism of glutathione conjugates of pesticides in plants. In: Sulfur in pesticide action and metabolism, PP. 133-64 Eds. J. Rosen, P. Magee and J. Casida) American Chemical Society, Washington, DC
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F., McKnight, S.L. 1988.** The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764
- Lawton, K.A., Friedrich, L, Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T., Ryals, J. 1996.** Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant J.* 10: 71-82
- Lay, M., Niland, A.M., 1985.** Biochemical response of inbred and hybrid corn (*Zea mays* L.) to R-25788 and its distribution with EPTC in corn seedlings. *Pestic. Biochem. Physiol.* 23: 131-140
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J. and Ward, E. 1998.** Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 16: 223-233
- Lee, H.-il, Raskin, I. 1999.** Purification, Cloning, and Expression of a pathogen inducible UDP-glucose: Salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* Vol. 274 (51) : 36637-36642
- Leon, J., Shulaev, V., Yalpani, N., Lawton, M.A., Raskin, I. 1995.** Benzoic acid 2-hydroxylase, a soluble oxygenase from tobacco, catalyzes salicylic acid biosynthesis. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 92: 10413-10417
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. 1994.** H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593
- Li, Y., Baldauf, S., Lim, E.K., Bowles, D.J. 2001.** Phylogenetic analysis of the UDP-glycosyltransferase multigene family of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276: 4338-4343
- Lieberherr, D., Wagner, U., Dubuis, P.-H., Métraux, J.-P., Mauch, F. 2003.** The rapid induction of glutathione S-transferase AtGSTF2 und AtGSTF6 by avirulent *Pseudomonas syringae* is the result of combined salicylic acid and ethylene signaling. *Plant Cell Physiol.* 44 (7): 750-757

- Lim, E.-K., Doucet, C.J., Li, Y., Elias, L., Worrall, D., Spencer, S.P., Ross, J., Bowles, D.J. 2002.** The activity of *Arabidopsis* glycosyltransferases toward salicylic acid, 4-hydroxybenzoic acid, and other benzoates. *The J. of Biol. Chem.* 277 (1): 586-592
- Lim, E.K., and Bowles, D.J. 2004.** A class of plant glycosyltransferases involved in cellular homeostasis. *EMBO J* 23: 2915-2922
- Liu, X. and Lam, E. 1994.** Two binding sites for the plant transcription factor ASF-1 can respond to auxin treatments in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.* 269: 668–675.
- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M., Frohnmeier, H. 2000.** Glutathione and UV Light-induced glutathione-S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell* 12: 1939-1950
- Maeo, K., Hayashi, S., Kojima-Suzuki, H., Morikami, A., Nakamura, D. 2001.** Role of conserved residues of the WRKY domain in the DNA-binding of tobacco WRKY family proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2428-2436
- Malamy, J., Carr, J.P., Klessig, D.F., Raskin, I. 1990.** Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection. *Science* 250: 1002-1004
- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K. 2002.** A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* 419: 399-403
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton, K.A., Dangl, J.L., Dietrich, R.A. 2000.** The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26: 403-410
- Marrs, K.A. 1996.** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 127-158
- Mauch-Mani, B., Slusarenko, A.J. 1996.** Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212
- May, M.J. and Leaver, C. 1992.** Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant Physiol.* 103: 621-627

- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lan, S.M.C., Koeppe, M.K., O'Keefe, D.P. 2000.** A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *Plant Physiol.* 124: 1105-1120
- Metraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyssbenz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. 1990.** Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004-1006
- Metraux, J.P. 2002.** Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. *Trends Plant Sci.* 7(8): 332-334
- Mezzari, M.P., Walters, K., Jelínková, M., Shih, M.-C., Just, C.L., Schnoor, J.L. 2005.** Gene Expression and Microscopic analysis of *Arabidopsis* exposed to chloroacetanilid herbicides and explosive compounds. A phytoremediation approach. *Plant Phys.* 138: 858-869
- Miao, Z.-H. and Lam, E. 1995.** Construction of a trans-dominant inhibitor for members of the TGA family of transcription factors conserved in higher plants. *Plant J.* 7: 887-896
- Miller, K.D., Irzyk, G.P., Fuerst, E.P., 1994.** Benoxacor treatment increases glutathione S-transferase activity in suspension cultures of *Zea mays*. L. *Pestic. Biochem. Physiol.* 48, 123-134
- Milhomme, H., Roucx, C., Bastide, J. 1991.** Safeners as corn seedling protectants against acetolactate synthase inhibitors. *Z. für Naturforsch.* 46c: 945-949
- Montillet, J.L., Cacas, J.L., Garnier, L., Montane, M.H., Douki, T., Bessoule, J.J., Polkowska-Kowalczyk, L., Maciejewska, U., Agner, J.P., Vial, A., Triantaphylides, C. 2004.** The upstream oxylipin profile of *Arabidopsis thaliana*: A tool to scan for oxidative stresses. *Plant J.* 40: 439-451
- Morelan, D.E., Corbin, F.T., Fleischmann, T.J., McFarland, J.E. 1995.** Partial characterization of microsomes isolated from mung bean cotyledons. *Pest. Biochem. and Physiol.* 52: 98-108
- Mosher, R.A., Durrant, W.E., Wang, D., Song, J., Dong, X. 2006.** A comprehensive structure-function analysis of *Arabidopsis* SN1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *The Plant Cell* 18: 1750-1765
- Mou, Z., Fan, W., Dong, X. 2003.** Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944

Mueller, L.A., Goodman, C.D., Silady, R.A., Walbot, V. 2000. AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiol.* 123: 1561-1570

Müller, A., Dückting, P., Weiler, E.W. 2002. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 44-56

Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J., Berger, S. 2008. General Detoxification and Stress responses are mediated by oxidized lipids through TGA Transcription Factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20(3): 768-785

Nam, H.G. 1997. The molecular genetic analysis of leaf senescence. *Curr. Opin. Biotech.* 8: 200-207

Nahla A El-Sherif. 2008. Regulation of an *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene (AtGSTU19) by herbicide safeners. Dissertation. Purdue University, Indiana-USA

Nawrath, C. and Metraux, J.P. 1999. Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* 11(8) : 1393-1404

Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., Metraux, J.P. 2002. EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14(1): 275-286

Neuhaus, G., Neuhaus-Uri, G., Katagiri, F., Seipel, K., Chua, N.-H. 1994. Tissue-specific expression of a as-1 in transgenic tobacco. *Plant Cell* 6: 827-834

Niggeweg, R. und Gatz, C. 1997. Isolation of TGA2.1 (Accession no. U90214), a member of a new subclass of the TGA-family of bZIP-transcription-factors in *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiol.* 113: 1464

Niggeweg, R., Thurow, C., Kegler, C. and Gatz, C. 2000a. Tobacco transcription factor TGA2.2 is the main component of as-1-binding factor ASF-1 and is involved in salicylic acid and auxin-inducible expression of as-1-containing target promoters. *J. Biol. Chem.* 275: 19897–19905.

Niggeweg, R., Thurow, C., Weiger, R., Pfitzner, U., Gatz, C. 2000b. Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA binding properties. *Plant Mol. Biol.* 42, 775-778

- Orlando, V. 2000.** Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation. *Trends Biochem. Sci.* 25: 99-104
- Pallet, K., Veerasekaran, P., Crudace, M., Koecher, H., Collins, B. 2001.** Proc. NCWSS conf. 2001 Abs. 77
- Papageorgiou, V.P., Assimopoulou, A.N., Couladouros, E., Hepwoth, D., Nicolaou, K.C. 1999.** The chemistry and biology of alkannin, shikonin and related naphthazarin natural products. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38: 270-300
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., Daniels, M.J. 1996.** Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* 8(11): 2033-2046
- Pascal, S., Scalla, R. 1999.** Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol. Plant* 106: 17-27
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E. et al. 2000.** *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 111-1120
- Peterson, D.E., Thompson, C.R., Regehr, D.L., Al-Khatib, K. 2001.** Herbicide mode of action. Kansas State University. 1-24
- Peterson, F.J., Mason, R.P., Hovsepian, J., Holtzman, J.L. 1979.** Oxygen-sensitive and -insensitive nitroreduction by *Escherichia coli* and rat hepatic microsomes. *J. Biol. Chem.* 254: 4009-4014
- Pflugmacher, S., Schröder, P., Sanermann, H. 2000.** Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. *Phytochemistry* 54: 267-273
- Pearson, K. 1901.** On lines and planes of closest fit to a system of points in space, *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, series 6(2): 559–572.
- Pieterse, C.M.J., vanWees, S.C.M., vanPelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, N., Weisbeek, P.J., vanLoon, L.C. 1998.** A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1571-1580

- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C. 1999.** Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58
- Pieterse C.M., and Van Loon, L.C. 2004.** NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7(4): 456-464
- Polge, N.D., Dodge, A.D., Caseleay, J.C. 1987.** Biochemical aspects of safener action: Effects on glutathione, glutathione-S-transferase and acetohydroxyacid synthetase in maize. *Proc Brighton Crop Prot Conf Weeds.* 1113-1120
- Pontier, D., Miao, Z.H. and Lam, E. 2001.** Trans-dominant suppression of plant TGA factors reveals their negative and positive roles in plant defense responses. *Plant J.* 27: 529–538.
- Pontier, D., Privat, I., Trifa, Y., Zhou, J.-M., Klessig, D.F., Lam, E. 2002.** Differential regulation of TGA transcription factors by post-transcriptional control. *Plant J.* 32: 641-653
- Qin, X.F., Holuigue, L., Horvath, D.M., Chua, N.-H., 1994.** Immediate early transcription activation by salicylic acid via the cauliflower mosaic virus as-1 element. *Plant Cell* 6: 863-874
- Raghavan, C., Kok Ong, E., Dalling, M.J., Stervenson, T.W. 2005.** Effect of herbicidal application of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Arabidopsis*. *Funct. Integr. Genomics* 5: 4-17
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M., Farmer, E.E. 2000.** Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-719
- Ribnicky, D. M., Shulaev, V. & Raskin, I. 1998.** Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol.* 118: 565-572
- Richers, D.E., Irzyk, G.P., Jones, S.S., Furest, E.P., 1997.** Partial characterization of glutathione S-transferases from wheat (*Triticum spp.*) and purification of a safener-induced glutathione S-transferase from *Triticum Tauschii*. *Plant Physiol.* 114: 1461-1470
- Riechers, D., Zhang, Q., Xu, F., Vaughn, K. 2003.** Tissue-specific expression and localization of safener-induced glutathione S-transferase proteins in *triticum tauschii*. *Planta* 217(5): 831-840

- Rochon, A., Boyle, P., Wigner, T., Fobert, P.R., Despres, C. 2006.** The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 18: 3670-3685
- Robatzek, S., Somssich, I.E. 2001.** A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defense-related processes. *Plant J.* 28: 123-133
- Robatzek, S. Somssich, I.E. 2002.** Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* 16: 1139-1149
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-hurtado, F., Leret, M., Sorokine, O., Didierjean, L., Werck-Reichhart, D. 1998.** The chemically inducible plant cytochrome p450 CYP76B1 actively metabolizes phenylureas and other xenobiotics. *Plant Physiology* 118: 1049-1056
- Ross, A.F. and Bozarth, R.F. 1960.** Resistance induced in one plant as a result of virus infection in another part. (Abstract). *Phytopathology* 50: 652
- Ross, A.F. 1961.** Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358
- Rouhier, N., Lemaire, S.D., Jacquot, J.P. 2008.** The role of glutathione in photosynthetic organisms.: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. *Annu Rev Plant Biol.*59: 143-166
- Roxas, V.P., Smith, R.K., Allen, E.R., Allen, R.D. 1997.** Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15: 988-991
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R., Allen, R.D. 2000.** Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Seedlings that Overexpress Glutathione S-Transferase/Glutathione Peroxidase. *Plant Cell Physiol.* 41: 1229-1234
- Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., Hooley, R. 1995.** Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved cis-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol. Biol.* 29:691-702
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. 1996.** Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15: 5690-5700

Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G. Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819

Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.Y., Johnson, J., Delaney, T.P., Jesse, T., Vos, P., Uknes, S. 1997. The *Arabidopsis* NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor I κ B. *Plant Cell* 9: 425-439

Sagral, E.G., 1978. Toxicity, selectivity, uptake, distribution and site of action of E_cpTC in corn (*Zea mays* L.) as affected by herbicide antidotes. Ph.D. Dissertation. Virginia Polytechnic Institute and State University

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a laboratory manual. 2nd N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press 1659p. ISBN 0-87969-309-6

Sandermann, H. 1994. Higher-plant metabolism of xenobiotics: the green liver concept. *Pharmacogenetics* 4: 225-241

Scalla, R., Roulet, A. 2002. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase induced by a herbicide safener in barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plant* 116: 336-344

Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., Weiler, E.W. 2000. 12-Oxophytodiene reductase 3 (OPR3) its the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta* 210: 979-984

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., Manners, J.M. 2000. Coordinated plant defence responses in revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97: 11655-11660

Schindler, U., Beckmann, H., Cashmore, A.R. 1992. TGA1 and G-box binding factors: two distinct classes of *Arabidopsis* leucine zipper proteins compete for the G-box-like element TGACGTGG. *Plant Cell* 4(10): 1309-1319

Schröder, P., Pflugmacher, S., 1996. Induction of glutathione S-transferase activity in Norway spruce by xenobiotics and herbicide safeners. *J. Appl. Bot.* 70: 97-100

Schröder, P. 1997. Fate of glutathione S-conjugates in plants: degradation of the glutathione moiety. *In* KK Hatzios, ed, Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 233-244

- Scott-Craig, J.S., Casida, J.E., Poduje, L., Walton, J.D. 1998.** Herbicide safener binding protein of maize. Purification, cloning and expression of an encoding DNA. *Plant Physiology* 116: 1083-1089
- Seitz, T., Hoffmann, M.G., Krähmer, H. 2003.** Chemische Unkrautbekämpfung: Herbizide für die Landwirtschaft. *Chemie in unserer Zeit* 37: 112-127
- Serino, L., Reimann, C., Baur, H., Beyeler, M., Visca, P., Haas, D. 1995.** Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gene Genet.* 249: 217-228
- Shah, J., Tsui, F., Klessig, D.F. 1997.** Characterization of a salicylic acid-insensitive mutant (*sai1*) of *Arabidopsis thaliana*, identified in a selective screen utilizing the SA inducible expression of the *tms2* gene). *Mol. Plant Microbe Interact.* 10(1): 69-78
- Shah, J. 2005.** Lipids, lipases, and modifying enzymes in plant diseases resistance. *Annu Rev. Phytopathol.* 43: 8.1-8.32
- Sharma, Y.K., Davies, K.R. 1994.** Ozone-induced expression of stress-related genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 105: 1089-1096
- Sheehan, D., Meade, G., Foley, V.M., Dowd, C.A. 2001.** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 360: 1-16
- Simpson, S.D., Nakashima, K., Narusaka, Y., Seki, M., Shinozaki, K., Ymaguchi-Shinozaki, K. 2003.** Two different novel cis-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *Plant J.* 33: 259-270
- Singh, K., Tokuhisa, J.G., Dennis, E.S., Peacock, W.J. 1989.** Saturation mutagenesis of the octopine synthase enhancer: correlation of mutant phenotypes with binding of a nuclear protein factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3733-3737
- Singh, K., Foley, R.C., Onate-Sanches, L. 2002.** Transcription factors in plant defence and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5: 430-436
- Sminszky, B., Corbin, F.T., Ward, E.R., Fleischmann, T.J., Dewey, R.E. 1999.** Expression of a soybean cytochrome p450 monooxygenase cDNA in yeast and tobacco enhances the metabolism of phenylurea herbicides. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America* 96: 1750-1755

- Smith, A.P., DeRidder, B.P., Guo, W.J., Seeley, E.H., Regnier, F.E., Goldsbrough, P.B. 2004.** Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor-and copper-treated seedlings. *J. Biol. Chem.* 279(25): 26098-26104
- Staskawicz, B.J., Ausubel, F.M., Baker, B.J., Ellis, J.G., Jones, J.D. 1995.** Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* 268: 661-667
- Sticher, L., Mauch-Mani, B., Métraux, J.P. 1997.** Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 35: 235-270
- Strompen, G., Grunder, R., Pfitzner, U.M. 1998.** An as-1-like motif controls the level of expression of the gene for the pathogenesis-related protein 1a from tobacco. *Plant Mol. Biol.* 37: 871-883
- Student (W.S. Gosset). 1908.** The probable error of a mean, *Biometrika* 6(1): 1-25
- Subramaniam, R., Desveaux, D., Spickler, C., Michnick, S.W., Brisson, N. 2001.** Direct visualization of protein interactions in plant cells. *Nat. Biotechnol.* 19, 769-772
- Sutherland, M.W. 1991.** The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39: 79-93
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. 2008.** Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956
- Takahashi, Y., Kuroda, H., Tanaka, T., Machida, Y., Takebe, I., Nagata, T. 1989.** Isolation of an auxin-regulated gene cDNA expressed during the transition from GO to S phase in tobacco mesophyll protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 86: 9279-9283
- Takahashi, Y., Sakai, T., Ishida, S., Nagata, T. 1995.** Identification of auxin-responsive elements of *parB* and their expression in apices of shoot and root. *Proc. Natl Acad. Sci.* 92: 6359-6363
- Takemoto, D., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. 2003.** Disease stress-inducible genes of tobacco: expression profile of elicitor-responsive genes isolated by subtractive hybridization. *Physiol Plant* 118: 545-553
- Tal, A., Romano, M.L., Stephenson, G.R., Schwan, A.L., all, J.C., 1993.** Glutathione conjugation: a detoxification pathway for fenoxaprop-Ethyl in barley, carbgrass, oat and wheat. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46, 190-199

- Theodoulou, F.L., Clark, I.M., He, X.-L., Pallet, K.E., Cole, D.J., Hallahan, D.L. 2003.** Xenobiotic co-induce glutathione-S-transferases and multidrug resistance associated protein in wheat. *Pest Management Science* 59: 11-13
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., Mueller, M.J. 2003.** Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J.* 34: 363-375
- Thurrow, C., Schiermeyer, A., Krawczyk, S., Butterbrodt, T., Nickolov, K., Gatz, C. 2005.** Tobacco bZIP transcription factor TGA2.2 and related factor TGA2.1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. *Plant J.* 44: 100-113
- Tokuhsa, J.G., Singh, K., Dennis, E.S., Peacock, W.J. 1990.** A DNA-binding protein factor recognizes two binding domains within the octopine synthase enhancer element. *Plant Cell*: 2: 215-224
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dicher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J. 1992.** Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 4: 645-656
- Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E., Ryals, J. 1993.** Regulation of pathogenesis-related protein 1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* 5: 159-169
- Uknes, S., Winter, A.M., Delaney, T., Vernooij, B., Morse, A., Friedrich, L., Nye, G., Potter, S., Ward, E., Ryals, J. 1995.** Structural genes for salicylate biosynthesis from chorismate in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.* 249: 217-228
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T. 1994.** The ocs element in the soybean GH2/4 promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1055-1064
- Ulmasov, T., Ohmiya, A., Hagen, G., Guilfoyle, T. 1995.** the Soybean GH2/4 Gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol.* 108: 919-927
- Uquillas, C., Letelier, I., Blanco, F., Jordana, X., Holuigue, L. 2004.** NPR1-independent activation of immediate early salicylic acid responsive genes in *Arabidopsis*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 34-42

- Vandenabeele, S., Van der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefases, T., Morsa, S., Rottiers, P., Sooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M. et al. 2003.** A comprehensive analysis of hydrogen peroxide-induced gene expression in tobacco. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 16113-16118
- Vandenabeele, S., Vanderauwera, S., Vuylsteke, M., Rombauts, S., Langebartels, C., Seidlitz, H.K., Zabeau, M., Van Montagu, M., Inze, D., Van Breusegem, F. 2004.** Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 39: 45-58
- Van der Zaal, E.J., Memelink, J., Mennes, A.M., Quint, A., Libbenga, K.R. 1987.** Auxin-induced mRNA species in tobacco cell cultures. Plant Mol. Biol. 10: 145-157
- Van der Zaal, B.J., Droog, F.N., Pieterse, F.J., Hooykaas, P.J. 1996.** Auxin-sensitive elements from promoters of tobacco GST genes and a consensus as-1like element differ only in relative strength. Plant Physiol. 110: 79-88
- Vanacker, H., Carver, T.L.W., Foyer, C.H. 2000.** Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. Plant Physiol. 123: 1289-1300
- Van der Kop, D.A.M., Schuyer, M., Scheres, B., Van der Zaal, B.J., Hooykaas, P.J.J. 1996.** Isolation and characterization of an auxin-inducible glutathione S-transferase gene of *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol. Biol. 30: 839-844
- Van Loon, L.C. 1997.** Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. 103: 753-765
- Van Loon, L.C. and Van Strien, E.A. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol. Mol. Plant Pathol. 55: 85-97
- Varvina, C., 1987.** Plant growth regulators as herbicide safeners for metribuzin induced injury to soybean (*Glycine Max*). Ph.D. Dissertation. University of Georgia.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Ahl-Goy, P., Staub, T., Kesmann, H. 1995.** 2,6-Dichloroisonicotinic acid induced resistance to pathogen without the accumulation of salicylic acid. Mol. Plant Microbe Interact. 8: 228-234
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P., Mauche, F. 2002.** Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. Plant Mol. Biol. 49: 515-532

- Walton, J.D. and Casida, J.E. 1995.** Specific binding of a dichloroacetamide herbicide safener in maize at a site that also binds thiocarbamate and chloroacetanilide herbicides. *Plant Physiol.* 109: 213-219
- Wan, J., Zhang, S., Stacey, G. 2004.** Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway in *Arabidopsis* by chitin. *Mol. Plant Pathol.* 5: 125-135
- Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dicher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P., Ryals, J.A. 1991.** Coordinate Gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094
- Watanabe, R. 1997.** Effect of probenazole (oryzemat) on each stage of rice blast fungus (*Pyricularia oryzae Cavara*) in its life cycle. *J.I of Pest. Sci.* 2: 395-404
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., Gatz, C. 2005.** Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 1279-1291
- White, R.F. 1979.** Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412
- Wiegand, R.C., Shah, D.M., Mozer, T.J., Harding, E.I., Diaz-Collier, J., Saunders, C., Jaworski, E.G., Tiemeier, D.C. 1986.** Messenger RNA encoding a glutathione-S-transferase responsible for herbicide tolerance in maize is induced in response to safener treatment. *Plant Mol. Biol.* 7: 235-243
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., Ausubel, F.M. 2001.** Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defense. *Nature* 414: 562-565
- Wolf, A. E., Dietz, K. J., Schröder, P. (1996).** Degradation of glutathione S-conjugates by carboxypeptidase's in the plant vacuole. *FEBS Letters* 384: 31-34
- Wu, J.R., Cramer, C.L., Hatzios, K.K. 1999.** Characterization of two cDNAs encoding glutathione S-transferases in rice and induction of their transcripts by the herbicide safener fenclorim. *Physiol. Plant* 105: 102-108
- Xiang, C., Miao, Z., Lam, E. 1995.** Isolation of TGA6 (Accession No. L42327), a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana* (PGR95-063) *Plant Physiol.* 109: 721

- Xiang, C., Miao, Z.H. and Lam, E. 1996.** Coordinated activation of as-1-type elements and a tobacco glutathione S-transferase gene by auxins, salicylic acid, methyl-jasmonate and hydrogen peroxide. *Plant Mol. Biol.* 32: 415–426.
- Xiang, C., Miao, Z., Lam, E. 1997.** DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 34: 403-415
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M. A. & Raskin, I. 1993.** Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103: 315-321
- Yamamoto, S., Katagiri, M., Maeno, H., Hayaishi, O. 1965.** Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide. *J. Biol. Chem* 240: 3408-3413
- Yang, K.Y., Kim, E.Y., Kim, C.S., Guh, J.O., Kim, K.C., Cho, B.H. 1998.** Characterization of a glutathione S-transferase gene ATGST1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* 17: 700-704
- Yenne, S.P., Hatzios, K.K., 1990.** Influence of oxime ether safeners on glutathione content and glutathione related enzyme activity in seeds and seedlings of grain sorghum. *Z. Naturforsch.* 45C: 96-106
- Yoda, H., Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., 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
- Yoshioka, K., Nakashita, H., Klessig, D.F., Yamaguchi, I. 2001.** Probenazole induces systemic acquired resistance in *Arabidopsis* with a novel type of action. *Plant J.* 25: 149-157
- Yu, D., Chen, C., Chen, Z. 2001.** Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene Expression. *Plant Cell* 13: 1527-1540
- Zama, P., Hatzios, K.K., 1986.** Effects of CGA-92194 on the chemical reactivity of metolachlor with glutathione and metabolism of metolachlor in sorghum (*Sorghum bicolor*). *Weed Sci.* 34: 834-841
- Zhang, B., Foley, R.C., Singh, K.B. 1993.** Isolation and characterization of two related *Arabidopsis* ocs-element bZIP binding proteins. *Plant J.* 4: 711-716

Zhang, B. and Singh, K.B. 1994. ocs-element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 2507-2511

Zhang, B., Chen, W., Foley, R.C., Buttner, M., Singh, K.B. 1995. Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to ocs element promoter sequences. Plant Cell. 7: 2241-2252

Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X., Dong, X. 1999. Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the PR-1 gene. Proc. Natl. Acad. Sci USA 96: 6523-6528

Zhang, Y.L., Tessaro, M.J., Lassner, M., Li, X. 2003. Knockout analysis of *Arabidopsis* transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. Plant Cell 15: 2647-2633

Zhou, J.M., Trifa, Y., Silva, H., Pontier, D., Lam, E., Shah, J., Klessig, D.F. 2000. NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. Mol. Plant-Microbe Interact. 13: 191-202

7 Anhang

7.1 Primersequenzen

Alle Primer werden als 100 pmol/ μ L Lösung angesetzt und 1:10 verdünnt für die PCR-Reaktionen eingesetzt.

Primer	Sequenz 5' 3'
--------	---------------

Primersequenzen für die Klonierung der Promotor-Verkürzungen

Cla30MP2	TCA GCG GTA CCG TCG TCG AGA TGG GAC TGG GA
Cla30MP3	TCA GCG GTA CCA GTG AAA AGT TGT AGA GGA GG
Cla30MPDA2	TCA GCG GTA CCG TGC ATG CAT AAA GGT TGG GC
Cla30MPDA3	TCA GCG GTA CCG ACG TAA CTG CAG AAG ATG TG
Cla30MPDA4	TCA GCG GTA CCG AAG CCA ACA AAT CTG TTA GC
Cla30MPDA5	TCA GCG GTA CCG ACA TGA CTT CAG CAG TTA GG
Cla30MPDA6	TCA GCG GTA CCC AAT CGA TTA CGT CAT CAG TC
Cla30MPDA7	TCA GCG GTA CCA ATT TAT TAG CAG CCA GCG AG
Cla30MPDA8	TCA GCG GTA CCG GGT CTG GCA ACC CAA ACT GG
Cla30MPDA9	TCA GCG GTA CCC CAT CAC TAA AAC ACC ACG CG

Primersequenz für das GUS Gen

GUS2	CAC ACT TTG CCG TAA TGA GTG
------	-----------------------------

Primersequenz für das *tms2* Gen

Tms2-1	CAA	CGA	TGA	ATA	TGA	ACT	GGC
Tms2-2	CCG	ATT	GCT	AAC	AGA	CGG	TGG

Primersequenzen für die Klonierung des *In2.1*-Promotors ohne *ocs* Element

Cla30MP2_KpnI	TCA GCG GTA CCG TCG TCG AGA TGG GAC TGG GA
Cla30MP5_BamHI	TCA GCG GAT CCT GTA AGC ACC TGC ATG GGG CC
Cla30MP4_BamHI	TCA GCG GAT CCC TGA AGT CAT GTC TAC AAG GA
Cla30MP3_XbaI	TCA GCT CTA GAA GTG AAA AGT TGT AGA GGA GG

Zur Klonierung des Luciferase Gens und der 35S:Luc-Kassette verwendete Primer

Primer	Sequenz 5' 3'
35S_Luc	TCA GCG AGC TCG ATA TCG TAC CCC TAC TCC AA
Luc_T	TCA GCG AAT TCG ATA TCG ATC TGG ATT TTA GT
Luc_3	TCA GCG AGC TCA TGG AAG ACG CCA AAA ACA TA

Primersequenzen für die quantitative PCR

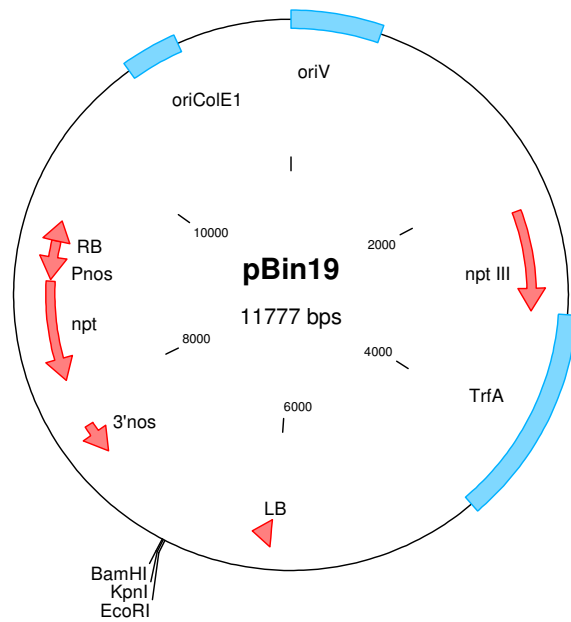
rubisco3	TGT	GGA	AGC	TTC	CAT	TGT	TCG
rubisco4	TAG	GAA	ATG	AAA	TGA	GCA	GAG
GUS5	TCA	TTG	TTT	GCC	TCC	CTG	CTG C
GUSa	CAA	GGC	ATA	TTG	CGC	GTT	GG
PR1-1	GTT	CTT	CCC	TCG	AAA	GCT	CA
PR1-2	AAG	GCC	CAC	CAG	AGT	GTA	TG

Quantitative PCR für die Auswertung der ChIP

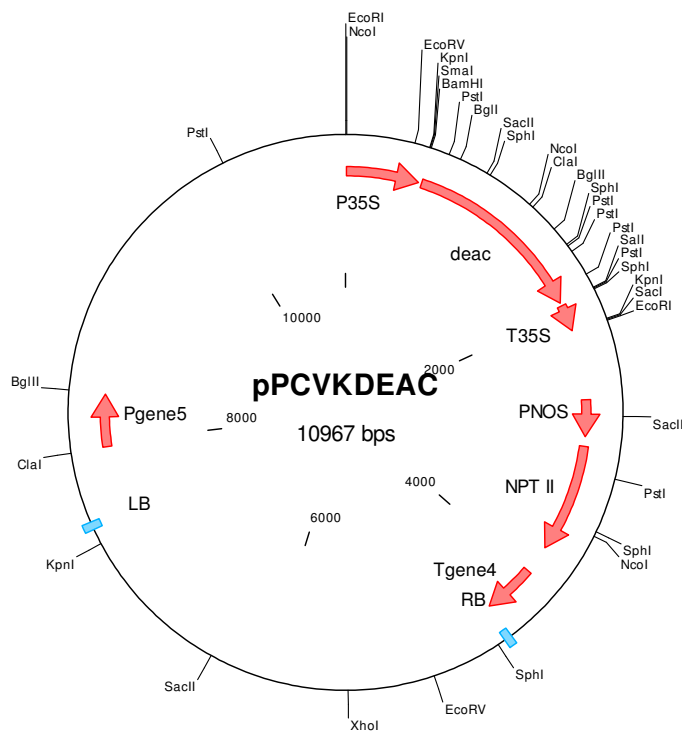
Actin8 fwd	GGT	TTT	CCC	CAG	TGT	TGT	TG
Actin8 rev	CTC	CAT	GTC	ATC	CCA	GTT	GC
AlKeprsen	AGT	TCT	GTC	TTC	TGT	GAT	ACG TG
AlKeprant	ACT	AGC	TAT	TAA	AGG	GTG	AGA AG
Cyp81sen	AAA	GTA	GGT	TTG	TTG	GTT	TCA AG
Cyp81ant	CTG	ATT	TTA	TAG	TGC	ATT	TGG AAG
Cla30MP8	CGC	CTC	TTT	GTG	ACG	CAC	GAA
Cla30MP9	TGA	TCT	AAC	TTC	ATG	AGA	CGT

7.2 Vektorkarten

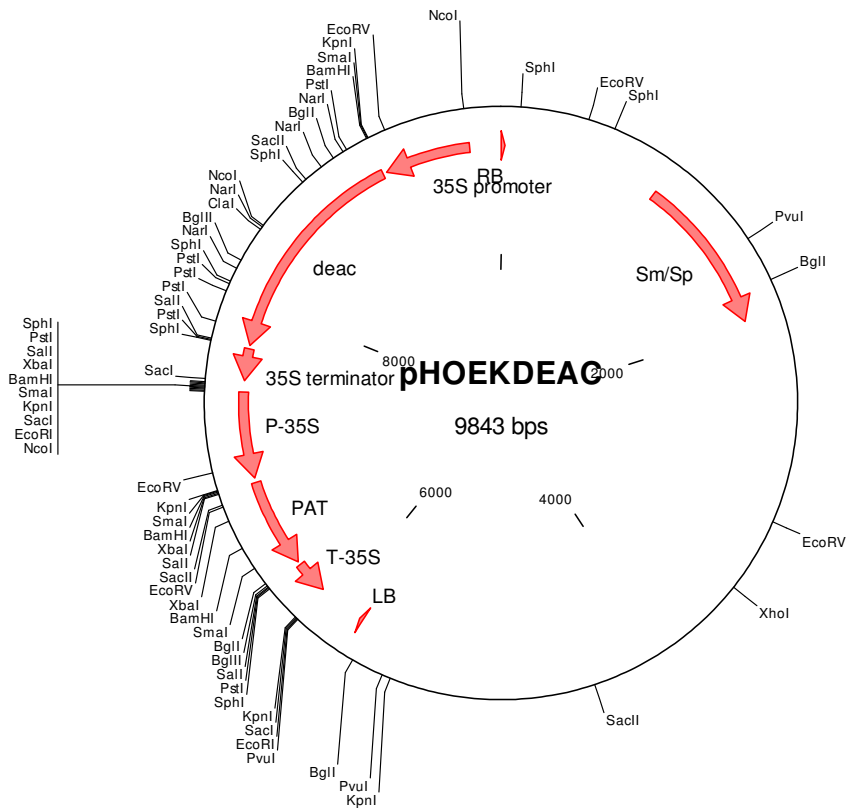
7.2.1 Der Vektor pBin19



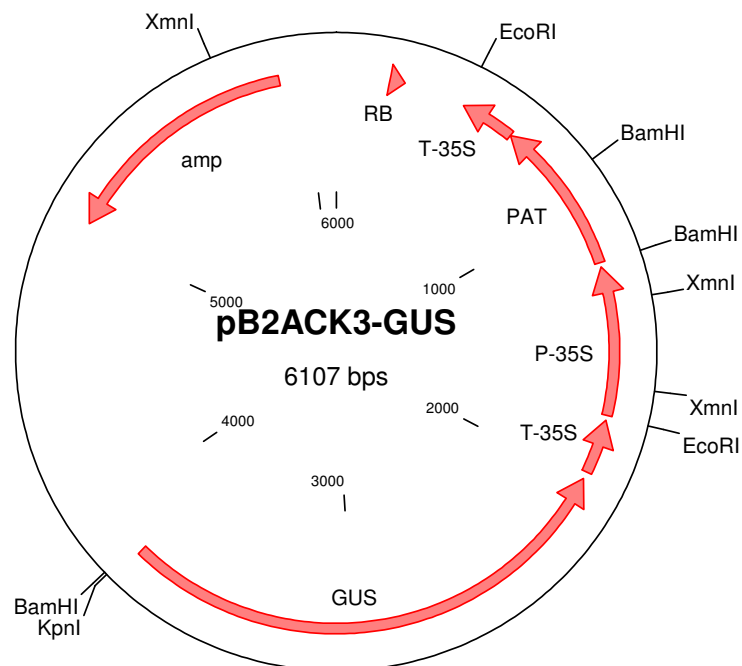
7.2.2 Der Vektor pBCVDEAC



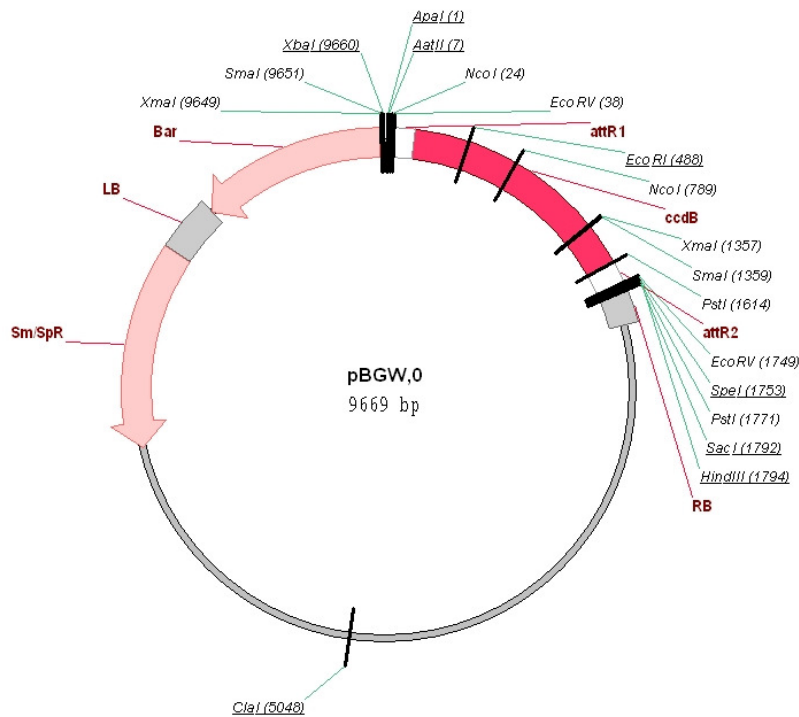
7.2.3 Der Vektor pHOEDEAC



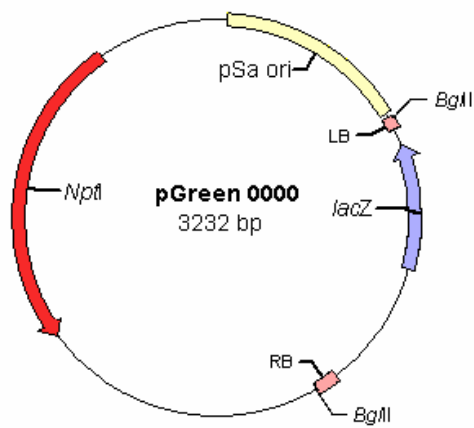
7.2.4 Der Vektor pB2ACK3



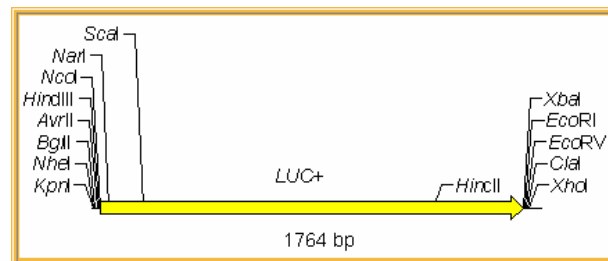
7.2.5 Der Vektor pBGW



7.2.6 Der Vektor pGreen



The *NptII* gene provides kanamycin-resistance selection for bacterial plasmid transformation in both *E. coli* and *Agrobacterium*



mit 35S:LUC Marker Kasette:

7.3 Promotorsequenzen

7.3.1 Der *In2.1*-Promotor

1	GCTTCATGCC	GAAGATATAG	ATAAGTGAAA	AGTTGTAGAG	GAGGAACGTT	AGTGGAAAGGG
	CGAAGTACGG	CTTCTATATC	TATTCACCTT	TCAACATCTC	CTCCTTGCAA	TCACCTTCCC
61	AGGAGCATTG	GTACTCGTTG	AAGCCACCAC	TAGAGTGCAT	GCATAAAGGT	TGGGCCATTG
	TCCTCGTAAC	CATGAGCAAC	TTCGGTGGTG	ATCTCACGTA	CGTATTTCCA	ACCCGGTAAC
121	TGCAAGTTTG	GTCAA CTTTG	GACGACGAAA	TCCTCTATAG	TTAATTTCCG	TGAAGTTAGG
	ACGTTCAAAC	CAGTT GAAAC	CTGCTGCTTT	AGGAGATATC	AATTAAGGC	ACTTCAATCC
181	GCACTGACCC	CACACATCAG	TGATCTAACT	TCATGAGACG	TA Pst ACTGCAGA	AGATGTGCTT
	CGTGACTGGG	GTGTGTAGTC	ACTAGATTGA	AGTACTCTGC	ATTGACGTCT	TCTACACGAA
241	TCCAACCTCG	GTTATGTTAC	CGGGAATCCC	AAGCCTTCAG	CGCTGCTGAT	GTATGCTTAA
	AGGTTGAAGC	CAATACAATG	GCCCTTAGGG	TTCGGAAGTC	GCGACGACTA	CATACGAATT
301	CTTCTTATTG	AAGCCAACAA	ATCTGTTAGC	AAATAGCATG	CAAAGATATA	CGAGAGAAAA
	GAAGAATAAC	TTCGGTTGTT	TAGACAATCG	TTTATCGTAC	GTTTCTATAT	GCTCTCTTTT
361	TAGCACGCTA	TGGGCCTTTC	TAATAAGAGA	TCCTTGTAGA	CATGACTTCA	GCAGTTAGGT
	ATCGTGCGAT	ACCCGGAAG	ATTATTCTCT	AGGAACATCT	GTACTGAAGT	CGTCAATCCA
421	CATAGATGAC	GACGACGTGT	AAGCACCTGC	ATGGGCCAA	CACGAATTGT	TCGTGCGTCA
	GTATCTACTG	CTGCTGCACA	TTCGTGGACG	TACCCCGGTT	GTGCTTAACA	AGCACGCAGT
481	CAAAGAGGCG	AAGATGACAC	AATCGATTAC	GTCAT CAGTC	GTTTAACTCA	AGTGCMACAC
	GTTTCTCCGC	TTCTACTGTG	TTAGCTAATG	CAGT AGTCAG	CAAATTGAGT	TCACGKTGTG
541	TATGAGGTCC	CTGACAGGTG	GGGCGCCACC	GCAAATTTAT	TAGCAGCCAG	CGAGCCGAGC
	ATACTCCAGG	GACTGTCCAC	CCCGCGGTGG	CGTTTAAATA	ATCGTCGGTC	GCTCGGCTCG
601	GGCGACCAGA	GACGTGGTGG	GYCTGTGGGG	GGTCTGGCAA	CCCAAAGTGG	AAAAGTCATG
	CCGCTGGTCT	CTGCACCACC	CRGACACCCC	CCAGACCGTT	GGGTTTGACC	TTTTCAGTAC
661	CATGCACTGC	AGCTAAAGTC	TAAGCCATCA	CTAAAACACC	ACGCGTATAA	ATACCCGGAC
	GTACGTGACG	TCGATTTTCA	ATTCCGTAGT	GATTTTGTGG	TGCGCATATT	TATGGGCCTG
721	CAATCAGCCA	TGCCGGCAGC	CGGCGTCGCG	TTTCCAACAG	GCCAGTCCCC	TCCCACTCCC
	GTTAGTCGGT	ACGGCCGTCT	GCCGCAGCGC	AAAGGTTGTC	CGGTCAGGGG	AGGGTGAGGG
781	AGTCCCATCT	CGACGAC				
	TCAGGGTAGA	GCTGCTG				

Abb. 7-1 Der *In2.1*-Promotor

Die beiden *ocs*- (-406 und -327 bp) bzw. *as-1*- (-403 und -323 bp) Elemente sind fett bzw. unterstrichen dargestellt; Die W-Box (-683) ist fett und kursiv gekennzeichnet

7.3.2 Der 2ocs-*In2.1-A9*-Promotor

1	CAGTTAGGTC	ATAGATGACG	ACGACGCAGT	TAGGTCATAG	ATGACGACGA
	GTCAATCCAG	TATCTACTGC	TGCTGCGTCA	ATCCAGTATC	TACTGCTGCT
51	CGCCATCACT	AAAAACACCAC	GCGTATAAAAT	ACCCGGACCA	ATCAGCCATG
	GCGGTAGTGA	TTTTGTGGTG	CGCATATTTA	TGGGCCTGGT	TAGTCGGTAC
101	CCGGCAGCCG	GCGTCGCGTT	TCCAAACAGGC	CAGTCCCCTC	CCACTCCCAG
	GGCCGTCGGC	CGCAGCGCAA	AGGTTGTCCG	GTCAGGGGAG	GGTGAGGGTC
151	TCCCATCTCG	ACGAC			
	AGGGTAGAGC	TGCTG			

Abb. 7-2 Sequenz des 2ocs-*In2.1-A9*-Promotors

Die in Tandemwiederholung angeordneten ocs-Elemente (-406) sind fett dargestellt

7.4 Anlagen zum Genexpressionsexperiment

Alle Gene sind nach ihrem Expressionslevel in Col0 absteigend sortiert.

7.4.1 Induzierte Detoxifizierungs-Gene (GSTs, GTs, P450s)

Cytochrom P450 Monooxygenasen

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
257835_at	AT3G25180	CYP82G1 (cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1); oxygen binding	5,4	4,90E-04	0,2	3,61E-04	0,4	3,53E-03	0,5	4,42E-02
246984_at	AT5G67310	CYP81G1 (cytochrome P450, family 81, subfamily G, polypeptide 1); oxygen binding	3,6	2,00E-04	3,1	2,04E-03	5,3	1,89E-06	3,3	1,24E-03
255011_at	AT4G10040	CYTC-2 (CYTOCHROME C-2); electron carrier	2,7	9,10E-05	2,0	3,80E-02	2,7	7,40E-05	1,8	5,60E-04
257636_at	AT3G26200	CYP71B22 (cytochrome P450, family 71, subfamily B, polypeptide 22); oxygen binding	2,6	1,30E-04	1,6	2,62E-03	2,9	3,59E-03	2,1	1,56E-04
258277_at	AT3G26830	CYP82G1 (cytochrome P450, family 82, subfamily G, polypeptide 1); oxygen binding	2,6	5,80E-05	1,5	5,50E-02	3,8	3,20E-04	1,9	3,15E-04
253100_at	AT4G37400	CYP81F3 (cytochrome P450, family 81, subfamily F, polypeptide 3); oxygen binding	2,3	3,00E-04	2,4	3,99E-04	2,1	6,05E-04	1,8	5,72E-03
257058_at	AT3G15352	ATCOX17 (Arabidopsis thaliana cytochrome c oxidase 17)	2,2	3,00E-03	1,6	6,00E-02	1,9	2,30E-04		
267559_at	AT2G45570	CYP76C2 (cytochrome P450, family 76, subfamily C, polypeptide 2); oxygen binding	2,1	3,00E-03	2,1	1,36E-02			1,4	1,16E-01

Glutaredoxine

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
260831_at	AT1G06830	glutaredoxin family protein	3,0	5,80E-04	1,4	1,65E-02	1,6	8,23E-02	1,9	1,40E-02
245392_at	AT4G15680	glutaredoxin family protein	2,0	3,52E-03	2,8	4,40E-04	1,8	1,78E-01	1,9	5,47E-02
266516_At	AT2G47880	glutaredoxin family protein	2,3	7,39E-03	1,2	4,51E-01	1,3	1,88E-01	1,3	4,78E-02

UDP-Glucosyltransferasen

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
245277_at	AT4G15550	IAGLU (INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYL	5,5	7,00E-04	4,1	5,90E-05	6,9	3,86E-05	1,9	2,29E-03
265499_at	AT2G15480	UGT73B5 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 73B5);	3,8	1,00E-03	2,8	9,45E-05	5,0	1,18E-05	2,5	8,19E-04
261934_at	AT1G22400	ATUGT85A1/UGT85A1 (UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 85A1);	3,3	1,10E-05	2,3	2,81E-03	3,7	3,61E-05	2,4	2,32E-04
256252_at	AT3G11340	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	2,5	1,50E-05	3,1	8,21E-03	___	___	1,2	2,23E-01
263184_at	AT1G05560	UGT1 (UDP-glucosyl transferase 75B1);	2,5	1,00E-02	2,5	1,50E-03	3,6	1,54E-03	1,5	2,80E-01
263221_at	AT1G30620	HSR8/MUR4/UJE1 (MURUS 4); UDP-arabinose 4-epimerase/ catalytic	2,5	3,10E-04	___	___	___	___	2,2	2,56E-04
260567_at	AT2G43820	GT/UGT74F2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 74F2);	2,0	2,00E-03	1,8	1,63E-02	4,2	6,56E-04	1,3	1,22E-01

Glutathion-S-Transferasen

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
266270_at	AT2G29470	ATGSTU3 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 21);	8,0	2,40E-05	6,2	1,39E-03	16,9	5,33E-05	5,1	8,43E-04
266290_at	AT2G29490	ATGSTU1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 19);	5,0	4,60E-05	2,5	1,06E-02	4,4	1,67E-04		
250983_at	AT5G02780	In2-1 protein, putative Arabidopsis thaliana (ATGSTL1)	4,3	4,40E-06	2,9	1,17E-02	6,3	5,99E-03	3,6	1,90E-03
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,70E-04	2,4	7,95E-04	2,7	8,84E-04	1,4	8,18E-04
260405_at	AT1G69930	ATGSTU11 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 11);	3,1	5,00E-04	3,2	3,04E-03	4,7	8,94E-04	2,8	7,03E-03
260225_at	AT1G74590	ATGSTU10 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 10);	2,6	8,70E-06	2,3	8,39E-03	3,8	4,67E-04	2,1	8,10E-03

262517_at	AT1G17180	ATGSTU25 (Arabidopsis thaliana Glutathione S- transferase (class tau) 25);	2,6 1,10E-02	2,0 1,00E-01	4,3 1,43E-03	
266267_at	AT2G29460	ATGSTU4 (GLUTATHIONE S- TRANSFERASE 22);	2,4 2,50E-05	1,6 2,44E-02	3,7 2,09E-05	2,0 5,02E-04
259040_at	AT3G09270	ATGSTU8 (Arabidopsis thaliana Glutathione S- transferase (class tau) 8);	2,3 2,00E-04	2,1 1,11E-02	4,1 1,45E-04	1,4 5,12E-02
262518_at	AT1G17170	ATGSTU24 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S- TRANSFERASE (CLASS TAU) 24); glutathione transferase	2,0 3,40E-03	1,5 2,69E-02	2,2 9,42E-04	1,2 2,14E-01
254549_at	AT4G19880	similar to unknown protein [Arabidopsis thaliana] (Glutathione S- transferase, predicted (InterPro:IPR016639)	2,0 5,00E-04	1,5 6,16E-03	2,1 3,72E-05	1,2 2,42E-03
266461_at	AT2G47730	ATGSTF8 (GLUTATHIONE S- TRANSFERASE 8);	1,8 3,96E-04	1,6 2,36E-02	2,4 9,82E-06	1,2 3,28E-02
260746_at	AT1G78380	ATGSTU19 (GLUTATHIONE TRANSFERASE 8);	1,4 3,00E-04	1,4 1,96E-02	1,6 1,10E-03	1,3 7,77E-03

Transporter

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
251248_at	AT3G62150	PGP21 (P-GLYCOPROTEIN 21); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	3,4	1,00E-04	2,6	3,19E-04	4,9	2,48E-05	3,5	2,12E-05
254710_at	AT4G18050	PGP9 (P-GLYCOPROTEIN 9); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	3,0	5,00E-03	3,0	1,70E-03	3,9	7,53E-05	1,5	6,86E-02
267319_at	AT2G34660	ATMRP2 (MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	2,8	1,20E-04	2,2	1,35E-04	3,0	9,58E-07	1,2	9,39E-02
258033_at	AT3G21250	ATMRP6 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 6)	2,4	8,70E-04	1,9	3,31E-04	2,1	5,05E-04	1,1	5,62E-01

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
262935_at	AT1G79410	ATOCT5 (ARABIDOPSIS THALIANA ORGANIC CATION/CARNITINE TRANSPORTER5); carbohydrate transmembrane transporter/sugar:hydrogen ion symporter	2,2	2,90E-04	1,5	7,85E-04	1,9	1,31E-04	0,9	5,93E-01
248769_at	AT5G47730	SEC14 cytosolic factor, putative / polyphosphoinositide binding protein, putative	2,1	4,00E-04	2,3	2,31E-03	3,4	2,60E-04	1,8	1,21E-03
252334_at	AT3G48850	mitochondrial phosphate transporter, putative	2,1	1,30E-04	1,9	1,01E-02	4,3	2,84E-05	2,0	3,05E-04
259937_s_at	AT3G13080; AT1G71330	[AT3G13080, ATMRP3 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 3)];[AT1G71330, ATNAP5 (Arabidopsis thaliana non-intrinsic ABC protein 5)]	2,1	1,10E-04	1,3	3,16E-01	2,8	2,04E-03	2,0	3,05E-04
246247_at	AT4G36640	SEC14 cytosolic factor family protein / phosphoglyceride transfer family protein	2,0	1,00E-03	1,5	2,17E-02	2,1	1,32E-04	1,6	1,97E-04
248134_at	AT5G54860	integral membrane transporter family protein	2,0	7,00E-04	2,3	2,21E-03	5,9	3,82E-05	1,8	1,58E-03
264652_at	AT1G08920	sugar transporter, putative	2,0	2,60E-05	2,4	2,55E-03	2,4	2,90E-06	1,7	2,96E-03
266464_at	AT2G47800	ATMRP4 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 4)	1,3	1,64E-02	1,3	1,04E-02	2,9	2,23E-05	1,2	1,39E-02
256305_at	AT1G30400	ATMRP1 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 1); xenobiotic-transporting ATPase	1,4	7,23E-03	1,5	7,72E-03	1,6	5,64E-04	1,1	6,35E-03

7.4.2 Induzierte WRKY-Transkriptionsfaktoren

Affymetrix	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
254347_at	AT4G22070	WRKY31 (WRKY DNA-binding protein 31); transcription factor	9,2	5,96E-05	8,7	8,32E-04			2,0	2,12E-04
245976_at	AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 75); transcription factor	4,1	3,29E-04	4,5	2,63E-03			4,1	9,11E-04
258975_at	AT3G01970	WRKY45 (WRKY DNA-binding protein 45); transcription factor	3,8	3,80E-04	2,3	3,46E-03	4,2	3,41E-04	2,7	8,74E-04
248611_at	AT5G49520	WRKY48 (WRKY DNA-binding protein 48); transcription factor	3,8	5,29E-04	2,6	3,24E-03	4,0	2,55E-04	2,2	7,69E-03
261892_at	AT1G80840	WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40); transcription factor	3,4	1,21E-04	2,6	3,47E-03	6,1	3,50E-04	2,4	2,98E-04
264746_at	AT1G62300	WRKY6 (WRKY DNA-binding protein 6); transcription factor	3,3	4,88E-04	2,4	9,67E-04	5,4	5,40E-05	2,9	8,05E-04
267028_at	AT2G38470	WRKY33 (WRKY DNA-binding protein 33); transcription factor	3,1	4,88E-05	3,4	1,24E-04	7,6	1,65E-05	2,6	1,06E-03
249770_at	AT5G24110	WRKY30 (WRKY DNA-binding protein 30); transcription factor	2,5	1,26E-03	2,0	6,47E-02	7,0	1,57E-05	2,7	5,02E-05
255568_at	AT4G01250	WRKY22 (WRKY DNA-binding protein 22); transcription factor	2,3	4,43E-03	4,7	2,19E-04	4,7	2,19E-04	2,1	2,34E-03

7.4.3 Gene die als Antwort auf einen Salizylsäure Stimulus und Mefenpyr/Isoxadifen reagieren (GO Annotation, Fisher's Exact Test)

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
261763_at	AT1G15520	ATPDR12/PDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	4,6	1,50E-04	4,5	3,65E-04	10,2	5,97E-08	3,4	1,09E-04
261892_at	AT1G80840	WRKY40 (WRKY DNA-binding protein 40); transcription factor	3,4	1,21E-04	2,6	3,47E-03	6,1	3,50E-04	2,4	2,98E-04
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,70E-04	2,2	7,95E-04	2,3	8,84E-04	1,4	8,18E-04
249333_at	AT5G40990	GLIP1 (GDSL LIPASE1); carboxylesterase	3,2	8,00E-04	2,2	5,10E-02	6,9	1,34E-04	2,9	1,26E-03
246401_at	AT1G57560	AtMYB50 (myb domain protein 50); DNA binding / transcription factor	2,7	1,70E-04	2,5	3,49E-04	2,9	1,47E-04	1,6	1,13E-02
265359_at	AT2G16720	MYB7 (myb domain protein 7); DNA binding / transcription factor	2,6	1,60E-04	2,5	1,16E-02	3,6	5,72E-04	2,1	1,97E-03
263184_at	AT1G05560	UGT1 (UDP-glucosyl transferase 75B1); UDP-glycosyltransferase/transferase, transferring glycosyl groups	2,5	1,00E-02	2,5	1,50E-03	3,4	1,54E-03	1,1	2,80E-01
260784_at	AT1G06180	ATMYB13 (myb domain protein 13); DNA binding / transcription factor	2,3	6,00E-03	2,0	4,60E-03	3,1	2,49E-04	1,5	2,62E-02
256376_s_at	AT1G66690; AT1G66700	[AT1G66690, S-adenosyl-L-methionine:carboxyl methyltransferase family protein];[AT1G66700, PXMT1; S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase]	2,8	1,09E-03	1,8	1,33E-01	4,3	1,64E-04	3,0	5,45E-04
262177_at	AT1G74710	ICS1 (ISOCHORISMATE SYNTHASE1); isochorismate synthase	2,2	1,30E-02	0,8	5,18E-02	1,4	8,06E-03	1,8	1,18E-04

7.4.4 Früh SA- und Safenerinduzierbare Gene

Aus Blanco *et al.* 2005 und 2009

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,76E-04	2,2	7,95E-04	2,3	8,84E-04	1,4	8,18E-04
259875_s_at	AT1G76690; AT1G76680	[AT1G76690, OPR2 (12-oxophytodienoate reductase 2); 12-oxophytodienoate reductase];[AT1G76680, OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1); 12-oxophytodienoate reductase]	2,7	9,91E-05	1,9	3,02E-03	2,1	2,66E-04	1,4	4,45E-04
263184_at	AT1G05560	UGT1 (UDP-glucosyl transferase 75B1); UDP-glycosyltransferase/transferase, transferring glycosyl groups	2,5	9,59E-03	2,5	1,50E-03	3,4	1,54E-03	1,1	2,80E-01
260567_at	AT2G43820	GT/UGT74F2 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 74F2); UDP-glycosyltransferase/UDP-glycosyltransferase/transferase, transferring glycosyl groups / transferase, transferring hexosyl groups	2,0	1,99E-03	1,9	1,63E-02	4,2	6,56E-04	1,3	1,22E-01
266461_at	AT2G47730	ATGSTF8 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 8); glutathione transferase	1,8	3,96E-04	1,6	2,36E-02	2,4	9,82E-06	1,2	3,28E-02
253281_at	AT4G34138	UGT73B1 (UDP-GLUCOSYLTRANSFERASE 73B1); UDP-glycosyltransferase/abscisic acid glucosyltransferase	1,5	1,49E-01	2,3	1,86E-02	2,5	2,07E-03		
258957_at	AT3G01420	ALPHA-DOX1 (ALPHA-DIOXYGENASE 1)	1,2	3,50E-01					1,8	1,42E-01
255220_at	AT4G05320	UBQ10 (POLYUBIQUITIN 10); protein binding	1,0	6,07E-01	1,0	9,24E-01	1,2	4,59E-03	1,0	7,69E-01
245277_at	AT4G15550	IAGLU (INDOLE-3-ACETATE BETA-D-GLUCOSYLTRANSFERASE); UDP-glycosyltransferase/transferase, transferring glycosyl groups	5,5	7,48E-04	4,0	5,90E-05	7,0	3,86E-05	2,0	2,29E-03

245976_at	AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-BINDING PROTEIN 75); transcription factor	4,1	3,29E-04	4,5	2,63E-03		4,1	9,11E-04	
248381_at	AT5G51830	pfkB-type carbohydrate kinase family protein	2,1	9,89E-04	1,7	3,15E-02	2,8	4,28E-04	1,6	1,05E-02

7.4.5 Safenerinduktion von Genen mit *as-1*-Element

Aus Fode *et al.* 2008

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,76E-04	2,3	8,84E-04	2,3	8,84E-04	1,4	8,18E-04
259705_at	AT1G77450	ANAC032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor	2,3	1,32E-03	2,1	4,82E-03	4,2	6,17E-05	1,3	1,49E-01
261564_at	AT1G01720	ATAF1 (Arabidopsis NAC domain containing protein 2); transcription factor	2,0	3,81E-03	2,1	1,13E-03	3,3	4,02E-04	1,7	1,02E-02
254759_at	AT4G13180	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	1,9	1,55E-02	1,7	6,69E-04	2,1	5,39E-03	1,5	7,60E-04
247488_at	AT5G61820	similar to MtN19-like protein [Pisum sativum] (GB:AAU14999.2); contains InterPro domain Stress up-regulated Nod 19 (InterPro:IPR011692)	1,7	1,78E-04	1,4	9,66E-03	1,9	7,63E-06	1,0	7,48E-01
257216_at	AT3G14990	4-methyl-5(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein, putative	1,5	7,83E-05	1,9	3,39E-05	1,9	3,39E-05	1,3	2,07E-02
246464_at	AT5G16980	NADP-dependent oxidoreductase, putative			1,7	2,82E-02	4,0	1,47E-04		

7.4.6 Safenerinduktion von scl14 Zielgenen

Aus Fode *et al.* 2008

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
249942_at	AT5G22300	NIT4 (NITRILASE 4)	5,7	1,03E-06	2,1	2,67E-02	4,2	2,86E-04	3,6	3,96E-04
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,76E-04	2,3	8,84E-04	2,3	8,84E-04	1,4	8,18E-04
266775_at	AT2G29060	scarecrow transcription factor family protein, similar to scarecrow-like TF14	2,4	2,50E-03	2,2	3,74E-03	2,7	3,09E-04	1,5	3,78E-02
261564_at	AT1G01720	ATAF1 (Arabidopsis NAC domain containing protein 2); transcription factor	2,0	3,81E-03	2,1	1,13E-03	3,3	4,02E-04	1,7	1,02E-02
254759_at	AT4G13180	short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) family protein	1,9	1,55E-02	1,7	6,69E-04	2,1	5,39E-03	1,5	7,60E-04
247488_at	AT5G61820	similar to MtN19-like protein [Pisum sativum] (GB:AAU14999.2); contains InterPro domain Stress up-regulated Nod 19 (InterPro:IPR011692)	1,7	1,78E-04	1,4	9,66E-03	1,9	7,63E-06	1,0	7,48E-01
259705_at	AT1G77450	ANAC032 (Arabidopsis NAC domain containing protein 32); transcription factor	1,7	1,78E-04	1,4	9,66E-03	1,9	7,63E-06	1,0	7,48E-01
257216_at	AT3G14990	4-methyl-5-(b-hydroxyethyl)-thiazole monophosphate biosynthesis protein, putative	1,5	7,83E-05	1,9	3,39E-05	1,9	3,39E-05	1,3	2,07E-02
263231_at	AT1G05680	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein	1,5	7,80E-03	1,2	4,31E-01	1,9	6,15E-04	1,5	1,22E-02
267168_at	AT2G37770	aldo/keto reductase family protein	1,5	6,80E-02	1,2	1,58E-01				
261062_at	AT1G07530	scarecrow-like transcription factor 14 (SCL14)	1,1	6,11E-01	1,0	9,50E-01	1,3	1,79E-02	1,2	3,99E-02
246464_at	AT5G16980	NADP-dependent oxidoreductase, putative			1,7	2,82E-02	4,0	1,47E-04		
256589_at	AT3G28740	cytochrome P450 family protein			5,1	3,08E-06	4,9	8,65E-04		

7.4.7 Gene die durch PPA1 und Safener induziert werden

Aus Müller *et al.* 2008

Affymetrix	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
266294_at	AT2G29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	10,2	8,22E-06	4,7	3,95E-03	13,6	1,45E-03		
256245_at	AT3G12580	HSP70 (heat shock protein 70); ATP binding	4,9	8,69E-05	5,4	2,82E-04	8,4	1,88E-04	3,1	2,53E-03
261763_at	AT1G15520	ATPDR12/PDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	4,6	1,50E-04	4,5	3,65E-04	10,2	5,97E-08	3,4	1,09E-04
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 25); glutathione transferase	3,3	5,76E-04	2,3	8,84E-04	2,3	8,84E-04	1,4	8,18E-04
254447_at	AT4G20860	FAD-binding domain-containing protein	3,3	3,94E-04	2,3	8,51E-03	4,3	6,85E-04	2,2	3,66E-03
259297_at	AT3G05360	disease resistance family protein / LRR family protein	3,0	7,12E-04	2,6	5,55E-03	5,5	2,33E-05	2,0	2,92E-03
260706_at	AT1G32350	AOX1D (ALTERNATIVE OXIDASE 1D); alternative oxidase	2,9	7,67E-05	2,3	1,47E-02	4,6	4,02E-05	2,2	2,58E-03
267319_at	AT2G34660	ATMRP2 (MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	2,8	1,20E-04	2,2	1,35E-04	3,0	9,58E-07	1,2	9,39E-02
259875_s_at	AT1G76690; AT1G76680	[AT1G76690, OPR2 (12-oxophytodienoate reductase 2); 12-oxophytodienoate reductase];[AT1G76680, OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1); 12-oxophytodienoate reductase]	2,7	9,91E-05	1,9	3,02E-03	2,1	2,66E-04	1,4	4,45E-04
260225_at	AT1G74590	ATGSTU10 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 10); glutathione transferase	2,6	8,70E-06	2,3	8,39E-03	3,8	4,67E-04	2,1	8,10E-03

Affymetrix	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
258114_at	AT3G14660	CYP72A13 (cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13); oxygen binding	2,5	2,10E-04	2,0	4,54E-05	2,9	1,46E-04	1,1	3,60E-01
258033_at	AT3G21250	ATMRP6 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 6)	2,4	8,70E-04	1,9	3,31E-04	2,1	5,05E-04	1,1	5,62E-01
266267_at	AT2G29460	ATGSTU4 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 22); glutathione transferase	2,4	2,50E-05	1,6	2,44E-02	3,7	2,09E-05	2,0	5,02E-04
246214_at	AT4G36988; AT4G36990	[AT4G36988, CPuORF49 (Conserved peptide upstream open reading frame 49)];[AT4G36990, HSF4 (HEAT SHOCK FACTOR 4); DNA binding / transcription factor]	2,3	4,99E-04	2,4	1,19E-03	3,8	1,13E-04	1,9	3,64E-04
256647_at	AT3G13610	oxidoreductase, 2OG Fe(II) oxygenase family protein	2,2	2,55E-03	1,8	1,14E-01	2,6	3,39E-03	2,2	5,29E-03
246463_at	AT5G16970	AT-AER (ALKENAL REDUCTASE); 2-alkenal reductase	2,1	3,84E-04	1,4	6,45E-02	2,0	1,26E-03		
262518_at	AT1G17170	ATGSTU24 (ARABIDOPSIS THALIANA GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (CLASS TAU) 24); glutathione transferase	2,0	3,40E-03	1,5	2,69E-02	2,2	9,42E-04	1,2	2,14E-01
252379_at	AT3G47730	ATATH1 (ABC2 homolog 1); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	2,0	7,21E-05	1,9	7,68E-04	2,2	6,25E-04	1,5	2,94E-03
252383_at	AT3G47780	ATATH6 (ABC2 homolog 6); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	1,7	2,49E-03	2,0	1,57E-03	2,7	9,20E-05	1,1	1,57E-01
266461_at	AT2G47730	ATGSTF8 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 8); glutathione transferase	1,7	4,00E-04	1,6	2,36E-02	2,4	9,82E-06	2,0	3,28E-02
258094_at	AT3G14690	CYP72A15 (cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 15); oxygen binding	1,5	1,78E-03	1,2	2,20E-02	1,9	1,51E-03	0,9	1,51E-01

7.4.8 Gene die durch PPA1 und Safener reprimiert werden

Aus Müller *et al.* 2008

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
247148_at	AT5G65670	IAA9 (indoleacetic acid-induced protein 9); transcription factor	0,7	2,81E-03	0,5	2,32E-03	0,7	4,52E-03	0,8	1,14E-01
258528_at	AT3G06770	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	0,5	2,48E-03	0,7	3,09E-02	0,6	6,17E-03	0,7	5,53E-03
255788_at	AT2G33310	IAA13 (indoleacetic acid-induced protein 13); transcription factor	0,7	7,65E-05	0,6	5,43E-04	0,6	2,69E-05	0,6	2,01E-03
249109_at	AT5G43700	ATAUX2-11 (indoleacetic acid-induced protein 4); transcription factor	0,6	6,88E-04	0,7	5,79E-03	0,7	3,42E-02	0,7	2,63E-03
263656_at	AT1G04240	SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2); transcription factor	0,4	3,28E-04	0,4	5,69E-04	0,4	1,57E-05	0,7	1,56E-02
253270_at	AT4G34160	CYCD3/CYCD3;1/D3 (CYCLIN D3;1); cyclin-dependent protein kinase regulator/ protein binding	0,6	7,34E-04	0,5	1,31E-03	0,5	4,42E-04	0,5	2,14E-03
264900_at	AT1G23080	PIN7 (PIN-FORMED 7); auxin:hydrogen symporter/ transporter	0,6	7,34E-04	0,5	1,31E-03	0,5	4,42E-04	0,5	2,14E-03
264802_at	AT1G08560	SYP111 (syntaxin 111); SNAP receptor	0,6	1,22E-03	0,6	3,62E-03	0,6	1,89E-05	0,7	7,72E-03
261660_at	AT1G18370	HIK (HINKEL); microtubule motor	0,6	1,22E-03	0,6	3,62E-03	0,6	1,89E-05	0,7	7,72E-03
260181_at	AT1G70710	AtGH9B1 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	0,6	1,58E-03	0,8	1,14E-02			0,7	8,21E-03

7.4.9 Gene die durch 2,4-D und Safener induziert werden

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
266294_at	AT2G29500	17.6 kDa class I small heat shock protein (HSP17.6B-CI)	10,2	8,22E-06	4,7	3,95E-03	13,6	1,45E-03		
256245_at	AT3G12580	HSP70 (heat shock protein 70); ATP binding	4,9	8,69E-05	5,4	2,82E-04	8,4	1,88E-04	3,1	2,53E-03
261763_at	AT1G15520	ATPDR12/PDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	4,6	1,50E-04	4,5	3,65E-04	10,2	5,97E-08	3,4	1,09E-04
266296_at	AT2G29420	ATGSTU7 (GST25);	3,3	5,70E-04	2,4	7,95E-04	2,7	8,84E-04	1,4	8,18E-04
254447_at	AT4G20860	FAD-binding domain-containing protein	3,3	3,94E-04	2,3	8,51E-03	4,3	6,85E-04	2,2	3,66E-03
259297_at	AT3G05360	disease resistance family protein / LRR family protein	3,0	7,12E-04	2,6	5,55E-03	5,5	2,33E-05	2,0	2,92E-03
260706_at	AT1G32350	AOX1D (ALTERNATIVE OXIDASE 1D); alternative oxidase	2,9	7,67E-05	2,3	1,47E-02	4,6	4,02E-05	2,2	2,58E-03
267319_at	AT2G34660	ATMRP2 (MULTIDRUG RESISTANCE-ASSOCIATED PROTEIN 2); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	2,8	1,20E-04	2,2	1,35E-04	3,0	9,58E-07	1,2	9,39E-02
259875_s_at	AT1G76690; AT1G76680	[AT1G76690, OPR2 (12-oxophytodienoate reductase 2); 12-oxophytodienoate reductase];[AT1G76680, OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1); 12-oxophytodienoate reductase]	2,7	9,91E-05	1,9	3,02E-03	2,1	2,66E-04	1,4	4,45E-04
260225_at	AT1G74590	ATGSTU10 (Arabidopsis thaliana Glutathione S-transferase (class tau) 10); glutathione transferase	2,6	8,70E-06	2,3	8,39E-03	3,8	4,67E-04	2,1	8,10E-03
262517_at	AT1G17180	ATGSTU25	2,6	1,10E-02	2,0	1,00E-01	4,3	1,43E-03		
255543_at	AT4G01870	tolB protein-related	2,6	2,58E-03	2,8	2,62E-04	4,1	1,96E-05	4,1	1,96E-05
258114_at	AT3G14660	CYP72A13 (cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 13); oxygen binding	2,5	2,10E-04	2,0	4,54E-05	2,9	1,46E-04	1,1	3,60E-01

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
258033_at	AT3G21250	ATMRP6 (Arabidopsis thaliana multidrug resistance-associated protein 6)	2,4	8,70E-04	1,9	3,31E-04	2,1	5,05E-04	1,1	5,62E-01
266267_at	AT2G29460	ATGSTU4 (GST22);	2,4	2,50E-05	1,6	2,44E-02	3,7	2,09E-05	2,0	5,02E-04
246214_at	AT4G36988; AT4G36990	[AT4G36988, CPuORF49 (Conserved peptide upstream open reading frame 49)];[AT4G36990, HSF4 (HEAT SHOCK FACTOR 4); DNA binding / transcription factor]	2,3	4,99E-04	2,4	1,19E-03	3,8	1,13E-04	1,9	3,64E-04
256647_at	AT3G13610	oxidoreductase, 2OG Fe(II) oxygenase family protein	2,2	2,55E-03	1,8	1,14E-01	2,6	3,39E-03	2,2	5,29E-03
246463_at	AT5G16970	AT-AER (ALKENAL REDUCTASE); 2-alkenal reductase	2,1	3,84E-04	1,4	6,45E-02	2,0	1,26E-03		

7.4.10 Gene die durch 2,4-D und Safener reprimiert werden

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
247148_at	AT5G65670	IAA9 (indoleacetic acid-induced protein 9); transcription factor	0,7	2,81E-03	0,5	2,32E-03	0,7	4,52E-03	0,8	1,14E-01
258528_at	AT3G06770	glycoside hydrolase family 28 protein / polygalacturonase (pectinase) family protein	0,5	2,48E-03	0,7	3,09E-02	0,6	6,17E-03	0,7	5,53E-03
255788_at	AT2G33310	IAA13 (indoleacetic acid-induced protein 13); transcription factor	0,7	7,65E-05	0,6	5,43E-04	0,6	2,69E-05	0,6	2,01E-03
249109_at	AT5G43700	ATAUX2-11 (indoleacetic acid-induced protein 4); transcription factor	0,6	6,88E-04	0,7	5,79E-03	0,7	3,42E-02	0,7	2,63E-03
263656_at	AT1G04240	SHY2 (SHORT HYPOCOTYL 2); transcription factor	0,4	3,28E-04	0,4	5,69E-04	0,4	1,57E-05	0,7	1,56E-02
253270_at	AT4G34160	CYCD3/CYCD3;1/D3 (CYCLIN D3;1); cyclin-dependent protein kinase regulator/ protein binding	0,6	7,34E-04	0,5	1,31E-03	0,5	4,42E-04	0,5	2,14E-03
264900_at	AT1G23080	PIN7 (PIN-FORMED 7); auxin:hydrogen symporter/ transporter	0,6	7,34E-04	0,5	1,31E-03	0,5	4,42E-04	0,5	2,14E-03
264802_at	AT1G08560	SYP111 (syntaxin 111); SNAP receptor	0,6	1,22E-03	0,6	3,62E-03	0,6	1,89E-05	0,7	7,72E-03
261660_at	AT1G18370	HIK (HINKEL); microtubule motor	0,6	1,22E-03	0,6	3,62E-03	0,6	1,89E-05	0,7	7,72E-03
260181_at	AT1G70710	AtGH9B1 (ARABIDOPSIS THALIANA GLYCOSYL HYDROLASE 9B1); hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	0,6	1,58E-03	0,8	1,14E-02			0,7	8,21E-03

7.4.11 Gene die safenerinduziert sind und mit dem Jasmonsäuresignalweg zu tun haben

Affymetrix Element	Locus	Annotation	Col0		sid2-2		nahG		4tga	
			fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value	fold ind.	p-Value
261763_at	AT1G15520	ATPDR12/PDR12 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 12); ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	4,6	1,50E-04	4,5	3,65E-04	10,2	5,97E-08	3,4	1,09E-04
257927_at	AT3G23240	ATERF1/ERF1 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1); DNA binding / transcription activator/ transcription factor	3,0	1,44E-03	2,2	8,44E-03	3,0	1,92E-03	3,1	5,18E-04
246401_at	AT1G57560	AtMYB50 (myb domain protein 50); DNA binding / transcription factor	2,8	1,71E-04	2,5	3,49E-04	2,9	1,47E-04	1,6	1,13E-02
254926_at	AT4G11280	ACS6 (1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLIC ACID (ACC) SYNTHASE 6)	2,7	5,65E-04	1,8	2,91E-03	3,0	2,36E-05	2,8	2,63E-04
265359_at	AT2G16720	MYB7 (myb domain protein 7); DNA binding / transcription factor	2,6	1,60E-04	2,5	1,16E-02	3,6	5,72E-04	2,1	1,97E-03
257644_at	AT3G25780	AOC3 (ALLENE OXIDE CYCLASE 3)	2,4	2,74E-04	1,7	1,74E-02	2,4	5,23E-04	2,4	5,23E-04
256453_at	AT1G75270	DHAR2; glutathione dehydrogenase (ascorbate)	2,4	1,87E-04	1,9	7,02E-03	2,7	2,29E-04	1,0	6,64E-01
260784_at	AT1G06180	ATMYB13 (myb domain protein 13); DNA binding / transcription factor	2,3	6,00E-03	2,0	4,60E-03	3,1	2,49E-04	1,5	2,62E-02
248794_at	AT5G47220	ATERF-2/ATERF2/ERF2 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR 2); DNA binding / transcription activator/ transcription factor	2,1	1,80E-02	1,4	2,06E-01	3,5	2,76E-03	1,6	3,88E-03
259875_s_at	AT1G76690; AT1G76680	[AT1G76690, OPR2 (12-oxophytodienoate reductase 2); 12-oxophytodienoate reductase];[AT1G76680, OPR1 (12-oxophytodienoate reductase 1); 12-oxophytodienoate reductase]	2,1	1,80E-02	1,4	2,06E-01	3,5	2,76E-03	1,6	3,88E-03

263174_at	AT1G54040	ESP (EPITHIOSPECIFIC R PROTEIN)	0,5 2,18E-03	0,6 2,18E-02	0,6 1,85E-02	0,7 7,65E-02
245928_s_at	AT5G24770; AT5G24780	[AT5G24770, VSP2 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 2); acid phosphatase];[AT5G 24780, VSP1 (VEGETATIVE STORAGE PROTEIN 1); acid phosphatase]	0,5 5,02E-03	0,3 3,00E-03	0,5 2,49E-02	0,7 2,31E-01
265058_s_at	AT1G52030; AT1G52040	[AT1G52030, MBP2 (MYROSINASE- BINDING PROTEIN 2)];[AT1G52040, MBP1 (MYROSINASE- BINDING PROTEIN 1)]	0,5 1,01E-02	0,3 1,12E-04	0,6 4,14E-02	0,7 3,42E-02

Danksagung

Den Herren Prof. Dr. Andreas Schaller und Dr. Klaus Bartsch gilt mein besonderer Dank. Herrn Bartsch, möchte ich dafür danken, dass er mir diese Doktorarbeit bei der Bayer CropScience AG ermöglicht hat. Ich habe mich sehr gefreut, dass ich dieses interessante Thema nach meiner Diplomarbeit weiterführend bearbeiten durfte. Vor allem bedanke ich mich für das in mich gesetzte große Vertrauen, welches mir ein sehr selbstständiges Arbeiten, und die Umsetzung eigener Ideen ermöglichte. Ebenso Herrn Prof. Dr. Andreas Schaller für die Betreuung, und ganz besonders für die Korrektur dieser extern angefertigten Doktorarbeit. Beiderseits möchte ich mich für die hilfreichen Diskussionen, Vorschläge und Ideen bedanken.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Hain spreche ich meinen verbindlichen Dank für die Übernahme des Koreferats und das Korrekturlesen meiner Arbeit aus.

Ein großes Dankeschön geht an Dr. Pascal von Koskull-Döring für das Korrekturlesen meiner Arbeit und die damit verbundenen Tipps und Kniffe zur Gestaltung. Vielen Dank für die mentale Unterstützung und Motivation in dieser stressigen letzten Phase.

Karin Stepusin danke ich für die hervorragende Durchführung der Affymetrix-Chip Experimente.

Frau Prof. Christiane Gatz danke ich für die angenehme Zusammenarbeit, die Ideen und Anregungen bezüglich verschiedener Versuche und die Bereitstellung der Mutantensamen. Ein großes Dankeschön ebenso an Dr. Benjamin Fode, für die interessante und lehrreiche Woche an der Universität Göttingen, in der ich die Methode der Chromatin Immunopräzipitation erlernen konnte.

Dank auch an Herrn Dr. Pollmann und Petra Düchting der Ruhr-Universität Bochum für die Analyse des Salizylsäuregehaltes der Pflanzenproben und die reibungslose Zusammenarbeit.

Den Mitarbeiterinnen des Labors Dr. Bartsch danke ich für das angenehme und produktive Arbeitsklima. Kerstin Schmutzler, Karin Stepusin, Gerlinde Usunow, Ulrike Hänsel und Ann-Kristin Klonus im Besonderen für die heiteren gemeinsam verbrachten Pausen, ich werde Euch sehr vermissen.

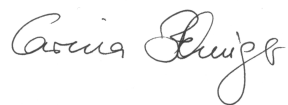
Allen Mitarbeitern des Instituts für Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen in Hohenheim möchte ich danken, dass ich trotz meiner seltenen Besuche immer das Gefühl hatte, willkommen und ein Teil der Arbeitsgruppe zu sein.

Der größte Dank geht an meine Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich immer in jeder erdenklichen Form unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Frankfurt, den 22.07.2009

A handwritten signature in cursive script, reading "Corina Stumpf".

Lebenslauf

Geburtsdatum/-ort Familienstand	29.09.1980 in Heidelberg ledig
Hochschulbildung 05/2006 – 04/2009	<p>Promotion</p> <p>Universität Hohenheim, Institut für Pflanzenphysiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Prof. Dr. A. Schaller</p> <p>„Charakterisierung eines Safener-induzierbaren Promotors und Analyse der Safener abhängigen Genexpression in <i>Arabidopsis thaliana</i>“</p> <p>Angefertigt bei der Bayer CropScience AG, Frankfurt</p>
09/2000-03/2006	<p>Studium der Biotechnologie</p> <p>an der Technischen Universität, Carolo Wilhelmina zu Braunschweig mit der Gesamtnote: „sehr gut“</p>
06/2005 – 02/2006	<p>Diplomarbeit</p> <p>Institut für Genetik, Prof. Dr. R. Hehl</p> <p>„Klonierung von Herbizid-Safener-induzierbaren Promotoren aus Pflanzen und Charakterisierung ihrer Aktivitätsmuster mit Hilfe von Reporter-gen-Konstrukten in <i>Arabidopsis thaliana</i>“</p> <p>Angefertigt bei der Bayer CropScience AG, Frankfurt</p>
10/2004 – 12/2004	<p>Studienarbeit</p> <p>Institut für Technische Chemie, Abteilung für Technologie der Kohlenhydrate, Prof. K. Buchholz</p> <p>„Identifizierung und Charakterisierung einer Fructosyltransferase aus <i>Leuconostoc mesenteroides</i>“</p>
Nebentätigkeiten 02/2003 – 03/2003 & 05/2003 – 08/2003 12/2003 – 09/2004	<p>Studentische Hilfskraft, Institut für Mikrobiologie, TU Braunschweig</p> <p>Studentische Hilfskraft, Institut für Technische Chemie, Abteilung für Technologie der Kohlenhydrate, TU – Braunschweig</p>

Schulbildung

1998 – 2000

1991 – 1998

1987 – 1991

Sprachkenntnisse

EDV-Kenntnisse

Frankfurt, 22.07.2009

Abitur

Spohngymnasium, Ravensburg mit der Note „1,4“

Zwei Buchpreise für besondere Leistungen in den Fächern Biologie und Chemie

Theodor-Heuss-Gymnasium, Esslingen

Grundschulen Trossingen, Hasslinghausen, Baltmannsweiler

Englisch, fließend in Wort und Schrift

Französisch, Grundkenntnisse

MS Office, sehr gute Kenntnisse

Expressionist 5.0, Analyst (Genedata AG), gute Kenntnisse

