

**Analyse pathogen-responsiver Mitglieder
der CMPG-Genfamilie in
*Arabidopsis thaliana***

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch–Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Andreas Heise
aus Oldenburg

Köln 2001

Berichtersteller:	Prof. Dr. Klaus Hahlbrock Prof. Dr. Martin Hülskamp
Prüfungsvorsitzender:	Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge
Tag der mündlichen Prüfung:	6. Juli 2001

für Kathrin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Krankheit und Resistenz	1
1.2	Molekulare Analysen der pflanzlichen Pathogenabwehr	3
1.3	Regulationsmechanismen.....	6
1.4	Zellkulturen und Elizitoren	8
1.5	Wege der Funktionsaufklärung.....	9
1.6	Identifizierung des Petersiliegens <i>PcEli17</i>	10
1.7	Ziele der Arbeit.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Chemikalien, Enzyme und Radioisotope	13
2.2	Kulturmedien, Puffer und Lösungen	13
2.3	Desoxyoligonukleotide	14
2.4	Bakterienstämme und Plasmide.....	16
2.5	Zellkulturen	17
2.6	Pflanzen und Pflanzenanzucht	17
2.7	Elizitoren und Pathogene	18
2.8	Elizitorbehandlung einer Arabidopsis-Zellsuspensionskultur	18
2.9	Infiltration von Arabidopsis thaliana mit Elizitor und Pseudomonaden	19
2.10	Verwundung von Blättern	19
2.11	Molekularbiologische Standardmethoden.....	20
2.12	Isolierung genomischer <i>AtCMPG1</i> -Klone aus einer genomischen <i>Arabidopsis</i> -Bibliothek	23
2.13	Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE).....	25
2.14	Transiente Expression in Protoplasten	25
2.15	Herstellung und Analyse transgener Pflanzen.....	27
2.16	Histochemischer Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität.....	29
2.17	Isolierung von Nullmutanten.....	29

2.18	Expression von AtCMPG1 und AtCMPG2 in <i>E.coli</i>	29
2.19	Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen.....	32
3	ERGEBNISSE	33
3.1	Isolierung von genomischen und cDNA-Klonen einiger Mitglieder der CMPG-Genfamilie und Bestimmung der Kopienzahl im Genom von <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.1.1	Herstellung genspezifischer Sonden und Überprüfung ihrer Spezifität	40
3.2	Expressionsstudien	43
3.2.1	Organspezifische Expression	43
3.2.2	Transkriptakkumulation von AtCMPG1 und AtCMPG2 in einer <i>Arabidopsis</i> -Zellsuspensionskultur nach Zugabe von Elizitor	45
3.2.3	Transkriptakkumulation von AtCMPG1 und AtCMPG2 in der Pflanze nach Infiltration von Pseudomonaden	47
3.3	Identifizierung und Charakterisierung eines elizitorresponsiven Promotorelements im AtCMPG1-Promotor	53
3.3.1	Transfektionen von Protoplasten mit Promotor::GUS-Konstrukten	53
3.3.2	Analyse transgener Promotor::GUS-Fusionslinien	62
3.4	Untersuchungen zur Funktion von AtCMPG1 und AtCMPG2	65
3.4.1	Expression von AtCMPG1 und AtCMPG2 in <i>Escherichia coli</i> und Herstellung spezifischer Antiseren	65
3.4.2	Analyse zur intrazellulären Lokalisation von AtCMPG1 und AtCMPG2	70
3.4.3	Analyse transgener AtCMPG1- und AtCMPG2-Überexpressionslinien.....	72
3.4.4	Isolierung einer AtCMPG1-Nullmutante.....	74
3.4.5	Phänotypanalyse der AtCMPG1- und AtCMPG2-Überexpressionslinien und der AtCMPG1-Nullmutante.....	79
4	DISKUSSION	83
4.1	AtCMPG1 und AtCMPG2 werden nach Pathogenbefall schnell und transient induziert	84
4.2	Identifizierung eines elizitorresponsiven Promotorelements	94
4.3	Stellen Überexpressionspflanzen und Nullmutanten geeignete Werkzeuge für eine Funktionsaufklärung dar?	98
4.4	Suche nach Genen mit Sequenzähnlichkeit zu PcEli17 und Charakterisierung der CMPG-Genfamilie	102
4.5	CMPGs als transkriptionelle Regulatoren?.....	115
4.6	Ausblick	116
5	ZUSAMMENFASSUNG	118
6	LITERATURVERZEICHNIS	120
7	ANHANG	132

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ackerschmalwand)
BABA	β-Aminobuttersäure
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid
Da	Dalton (= 1,6605655 x 10 ⁻²⁷ kg)
DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> Stamm DC3000
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxygenin
DMS	Dimethylsulfat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G	Guanin
GABA	γ-Aminobuttersäure
GFP	"green fluorescent protein"
GUS	β-Glucoronidase
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
kB	Kilobasen
kBp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
M	mol/l
min	Minute(n)

MOPS	3-(M-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	"messenger"-RNA (Boten RNA)
N	Nukleotid (A, C, G oder T)
nt	Nukleotid(e)
OD	optische Dichte
ori	"origin of replication"
p. A.	zur Analyse
<i>Pc</i>	<i>Petroselinum crispum</i> (Petersilie)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PR-Gene	<i>pathogenesis-related-genes</i>
Pst	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i>
PVP	Polyvenylpropylen
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm 1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>tomato</i> Stamm DC3000 (<i>avrRpm1</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (funktionelle Enzymeinheit)
U	Uracil
<i>uidA</i>	GUS-Enzym kodierendes Gen
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
Wt	Wildtyp

Für Aminosäuren wurden die konventionellen Einbuchstaben- bzw. Dreibuchstaben-abkürzungen verwendet.

Englische und lateinische Begriffe und Bezeichnungen wurden kursiv geschrieben.

1 Einleitung

1.1 Krankheit und Resistenz

Pflanzen leben ebenso wie Tiere und Menschen in einem ständigen Kontakt mit Mikroorganismen. Viele solcher Gemeinschaften sind für beide Seiten von Nutzen, es liegt also eine symbiontische Beziehung vor. Beispiele hierfür sind zahlreich. Beim Menschen ist es z. B. die Besiedlung des Darms mit Bakterien, Pilzen und Protozoen (Darmflora), die wesentlich zu einer Stärkung des Immunsystems beiträgt und einen Schutz vor einer Besiedlung und Invasion durch unerwünschte, meist pathogene Mikroorganismen darstellt. Die Gesamtzahl der den Menschen besiedelnden Organismen beträgt mehr als 10^{14} , dies übertrifft die Anzahl an körpereigenen Zellen um das zehnfache (Brandis *et al.*, 1994). Bei Pflanzen ist das bekannteste Beispiel die als Mykorrhiza bezeichnete Wurzelsymbiose zwischen höheren Pflanzen und Pilzen (zur Übersicht: Parniske, 2000). Ohne Pilzpartner gedeihen z. B. Waldbäume nur kümmerlich und auch der Pilz profitiert von dieser Lebensgemeinschaft.

Wird ein Organismus durch die Besiedlung mit Mikroorganismen so stark geschwächt, dass er seine normalen physiologischen Funktionen nicht mehr in gewohnter Weise erfüllen kann, führt dies bei Pflanzen meistens zu einem reduzierten Wachstum, einer gestörten Entwicklung oder sogar zum völligen Absterben der Pflanze.

Viele Pflanzen, die vom Menschen in vielfältigster Weise genutzt werden, sind über einen oft Jahrtausende währenden Prozess der Kultivierung und gezielten Züchtung gegenüber dem ursprünglichen, oft gar nicht mehr bekannten Wildtyp, derart modifiziert, dass viele Eigenschaften, die nicht unmittelbar zu den gewünschten Eigenschaften gehören, im Laufe der Zeit verloren gegangen sind. Diese Nutzpflanzen weisen oft eine reduzierte Resistenz gegenüber Mikroorganismen auf. Die wirtschaftliche Bedeutung von Pflanze-Pathogen-Interaktionen kann enorme Ausmaße annehmen.

Von der geschätzten Anzahl von mehr als einer Million Bakterienarten sind lediglich 200 Arten charakterisiert, die Pflanzenkrankheiten auslösen (Kempken and Kempken, 2000). Bei Pilzen ist der Anteil phytopathogener Organismen deutlich größer. Von den ca. 100.000 bekannten Pilzarten sind ca. 8000 phytopathogene Arten charakterisiert. Dies korreliert mit der Tatsache, dass von den 162 wichtigsten Infektionskrankheiten 135 (83 %) durch Pilze, die übrigen vor allem durch Bakterien und Viren verursacht werden (Müller and Loeffler, 1992).

Ein Beispiel für einen pflanzenpathogenen Pilz, der auch heute noch große Schäden im Kartoffelanbau anrichtet, ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule *Phytophthora infestans*. Ursprünglich aus Südamerika, der Heimat der Kartoffel, eingeschleppt, breitete dieser Pilz sich über ganz Europa aus und verursachte in Irland in den Jahren 1845 und 1846 den kompletten Ausfall beider Jahresernten. Die entstandenen Hungersnöte hatten große Auswanderungswellen zur Folge. Bis heute konnte keine *Phytophthora*-resistente Kartoffelsorte gezüchtet werden und nur mit starken fungiziden Mitteln kann dem Pilz Einhalt geboten werden.

Trotz dieser großen Anzahl pflanzenpathogener Organismen ist jedoch der Befall einer Pflanze mit Mikroorganismen und eine starke Vermehrung des potenziellen Pathogens, also das Erkranken der Pflanze, eher die Ausnahme. Der phytopathologische Begriff Resistenz bezeichnet die Fähigkeit einer Pflanze, den Befall durch Schaderreger zu verhindern oder zu begrenzen (Hoffmann *et al.*, 1994). Gründe hierfür liegen in einer fehlenden Kompatibilität zwischen Pflanze und Pathogen und in den präformierten Schutzeinrichtungen zu sehen. Die Fälle, in denen keine Besiedlung der Pflanze stattfindet und die Pflanze nicht auf die Mikroorganismen reagiert, überwiegen bei weitem. Selbst in denjenigen Fällen, in denen Mikroorganismen in der Lage sind, in die Pflanze einzudringen, findet keine oder nur eine geringe Vermehrung der Mikroorganismen statt. Die Pflanze ist also resistent und die Mikroorganismen avirulent. Sind sämtliche Genotypen / Rassen dieses Mikroorganismus gegenüber allen pflanzlichen Genotypen avirulent, so wird dies als Nichtwirt / Nichtpathogen-Interaktion bezeichnet (Heath, 2000).

Existieren von einem Mikroorganismus zwei genetische Varietäten, die sich in der Pathogenität gegenüber einem pflanzlichen Genotyp unterscheiden, spricht man von einer rassenspezifischen Interaktion. Die meisten rassenspezifischen Interaktionen sind inkompatibel, das heißt, das Pathogen ist avirulent und die Pflanze resistent. Die inkompatible Interaktion zeichnet sich durch das ausbleibende Wachstum des avirulenten Pathogens in oder auf der resistenten Pflanze aus, oft verursacht durch hypersensitiven Zelltod des befallenen Pflanzengewebes (Kap. 1.2).

Ist das Pathogen virulent und die Pflanze anfällig (suszeptibel), liegt eine kompatible Interaktion vor. Es findet eine starke Vermehrung des Pathogens in oder auf der Pflanze statt und die Pflanze erkrankt.

1.2 Molekulare Analysen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Pflanzen haben verschiedene Möglichkeiten der Pathogenabwehr entwickelt. Zum einen existieren präformierte Schutzbarrieren, zum anderen werden bei Pathogenbefall eine Vielzahl von Abwehrmechanismen aktiviert. Häufig führt eine lokale Infektion zu einer systemisch erworbenen Resistenz der Pflanze (systemic acquired resistance, SAR: Durner *et al.*, 1997).

Die erste und wichtigste Schutzbarriere der Pflanze, auf die ein Mikroorganismus stößt, ist die meist einzellschichtige Epidermis, die im Vergleich zu Zellen eines Gewebeverbandes deutlich verstärkte Zellwände besitzt. Außen auf die Epidermiszellen aufgelagert ist die Kutikula, die einen stark hydrophoben Charakter hat und allein durch die fehlende Benetzbarkeit vielen Mikroorganismen die Möglichkeit zur Kolonisation entzieht. Die Kutikula besteht aus Kutin und Wachsen. Kutin ist ein Polyester vor allem aus C₁₆- und C₁₈-Hydroxyfettsäuren und außerordentlich widerstandsfähig gegenüber mikrobiellem Abbau. Wachse sind Ester langkettiger aliphatischer Fettsäuren mit ebenfalls langkettigen aliphatischen und zyklischen Alkoholen. Im Zuge der Co-Evolution entwickelten sich jedoch immer wieder Pathogene, die beispielsweise durch die Sekretion von Kutinasen solche Barrieren überwinden können.

Bei Pflanzenorganen, die ein sekundäres Dickenwachstum aufweisen, folgt der Epidermis ein weiteres als Kork bezeichnetes Abschlussgewebe. Blättern und unverholzten Sprossachsen fehlt dieses Gewebe in der Regel (Jurzitza, 1987). Die Wurzel besitzt mit einer komplex aufgebauten Wurzelrinde ebenfalls eine mechanische Barriere, die ein einfaches Eindringen von Mikroorganismen erschwert.

Neben diesen mechanischen Barrieren werden von der Pflanze niedermolekulare Substanzen mit fungizider oder bakterizider Wirkung gebildet. Ein Beispiel hierfür sind die Saponine, die in der Tomate präformiert vorliegen (Osbourn, 1996). Niedermolekulare antimikrobielle Substanzen, die nach Pathogenbefall in den Pflanzenzellen akkumulieren, werden als Phytoalexine bezeichnet (Paxton, 1981). Als Produkte des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels gehören sie sehr unterschiedlichen Naturstoffklassen an. Entdeckt wurden sie in *Phytophthora infestans*-infizierten Kartoffelknollen. Inzwischen wurden in mehr als 20 Pflanzenarten über 300 Phytoalexine charakterisiert (zur Übersicht: Smith, 1996). Gut untersucht sind die Furanocoumarine, die in Petersilie die Hauptgruppe der Phytoalexine darstellen (Scheel *et al.*, 1986).

Voraussetzung für eine erfolgreiche Pathogenabwehr ist die frühzeitige Erkennung (Perzeption) des Pathogens und eine entsprechend schnelle Aktivierung von

Abwehrmechanismen. Hierbei ist die Schnelligkeit der pflanzlichen Reaktion von entscheidender Bedeutung. Die Moleküle, die die Abwehrreaktionen auslösen, bezeichnet man als Elizitoren. Ursprünglich wurden als Elizitoren nur Faktoren bezeichnet, die die Phytoalexin-Synthese im Pflanzengewebe aktivieren. Heutzutage versteht man unter Elizitoren Moleküle, die jegliche Abwehrreaktionen der Pflanze aktivieren (zur Übersicht: Nürnberger, 1999). Elizitoren können Bestandteile des Pathogens (exogene Elizitoren) oder der Pflanze (endogene Elizitoren) sein. Bei den endogenen Elizitoren handelt es sich zumeist um pflanzliche Zellwandbestandteile, deren Freisetzung vom Pathogen, z. B. durch hydrolytische Enzyme, erfolgt. Die meisten Abwehrreaktionen werden jedoch durch exogene Elizitoren aktiviert, die verschiedenen Substanzklassen angehören. Es wurden bisher Proteine, Oligopeptide, Glykoproteine, Oligosaccharide und Fettsäuren als Elizitor-aktive Moleküle charakterisiert (Benhamou, 1996; Ebel and Cosio, 1994).

Resistenzgene kodieren für membranständige oder cytosolische Rezeptorproteine, die Elizitoren erkennen und binden. Die Bindung eines Elizitors ist reversibel, spezifisch und sättigbar (Nürnberger *et al.*, 1994). Eine andere Definition beschreibt Resistenzgene nach ihrer Wirkung. Das Resistenzgenprodukt ermöglicht die Resistenz der Pflanze gegen ein spezifisches Pathogen und der Ausfall der von dem Resistenzgenprodukt vermittelten Funktion hat die Anfälligkeit der Pflanze zur Folge. Bisher wurden fünf verschiedene Resistenzgenklassen molekular beschrieben (Hammond-Kosack and Jones, 1997). Die Einteilung der Resistenzgene erfolgt sowohl über die zelluläre Lokalisation als auch über strukturelle Merkmale der Proteine. Ein Großteil der klonierten Resistenzgene wurde aus *Arabidopsis thaliana* (im folgenden als *Arabidopsis* bezeichnet) und einigen Kulturarten, wie Tomate (Cf-9, Jones *et al.*, 1994; Pto, Martin *et al.*, 1993), , Tabak (N, Whitham *et al.*, 1994), Reis (Xa21, Song *et al.*, 1995) und Zuckerrübe (Hs1pro-1, Cai *et al.*, 1997) isoliert. Das erste isolierte rassenspezifische Resistenzgen war Pto aus Tomate (Martin *et al.*, 1993). Pto vermittelt Resistenz gegenüber spezifischen Rassen von *Pseudomonas syringae* pv *tomato*, die das Avirulenzgen *avrPto* exprimieren. Diese Interaktion folgt der Gen-für-Gen-Hypothese, die Flor (1971) anhand von Untersuchungen zum Melamssora lini-Befall (Flachsrostpilz) an Flachs entwickelt hat. In weiten Zügen ist dieses Modell im Laufe der letzten 30 Jahre bestätigt worden. Es postuliert, dass für jedes Resistenzgen auf der Pflanzenseite ein Avirulenzgen des potenziellen Pathogens vorliegt. Viele Resistenzgene entsprechen diesem Modell.

Die Bindung des Elizitors führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die über eine mehrstufige Signalkaskade ein Abwehrprogramm auslöst (Nürnberger, 1999).

Neben zytologischen Veränderungen, wie Umwandlungen des Zytoskeletts, Wanderung des Zellkerns zur Penetrationsstelle des Pilzes und verstärkten zytoplasmatischen Strömungen (Freytag *et al.*, 1994; Gross *et al.*, 1993) zählen Veränderungen von Ionenströmen sowie die Produktion reaktiver Sauerstoffverbindungen (oxidativer Stress, *oxidative burst*) zu den frühesten bisher detektierten Reaktionen auf molekularer Ebene. Diese Moleküle (O_2^- , H_2O_2 , OH^-) sind chemisch sehr reaktiv und führen zu Schädigungen von Zellstrukturen und Nukleinsäuren (zur Übersicht: Wojtaszek, 1997). Alle aerob lebenden Organismen besitzen Schutzmechanismen, um die in geringer Menge auch im nicht gestressten Zustand entstehenden reaktiven Sauerstoffverbindungen schnell abzubauen. Die reaktiven Sauerstoffverbindungen schädigen nicht nur das eindringende Pathogen sondern auch die Pflanzenzelle, so dass der Prozess des *oxidative burst* auch als Bestandteil der hypersensitiven Reaktion (HR) betrachtet wird. Darunter versteht man eine induzierbare Abwehrreaktion der Pflanze, die oft nach Infektion mit Bakterien, Viren, Nematoden oder Pilzen beobachtet wird. Nach dem Eindringen des Pathogens kommt es zum schnellen Zelltod des unmittelbar betroffenen Pflanzengewebes. Mikroskopisch ist dies in nekrotischen Läsionen des Pflanzengewebes zu erkennen. Durch den sehr schnell aktivierten Zelltod wird dem Pathogen die Nahrungsgrundlage entzogen und somit das Wachstum der Mikroorganismen inhibiert.

Die Veränderung der Ionenströme konnte innerhalb von zwei bis fünf Minuten nach Zugabe eines Elizitors zu einer Zellsuspensionskultur detektiert werden (Nürnberg *et al.*, 1994). Dies führt zu einer extrazellulären Alkalisierung (Klarzynski *et al.*, 2000). Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Ionen-Konzentration zu (Grant *et al.*, 2000). Calcium-Ionen sind wichtige Signalmoleküle bei der Pathogenabwehr und stellen eine Voraussetzung für viele Genaktivierungen dar (Blume *et al.*, 2000).

Weitere Mechanismen zur Pathogenabwehr sind die Bildung antimikrobieller Substanzen (Phytoalexine) sowie die Expression von PR-Genen.

PR-Gene (*pathogenesis related genes*) umfassen eine heterogene Gruppe von Genen, die nach Pathogenbefall induziert werden. Für viele PR-Gene konnte eine Funktion nachgewiesen werden, so sind z. B. unter ihnen viele Zellwand-degradierende Enzyme wie Glukanasen, Chitinasen und andere Hydrolasen. Entsprechend ihrer Funktion werden sie in zehn Gruppen unterteilt (van Loon and van Strien, 1999). Sowohl in Tabak als auch in *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass vor einer mRNA-Akkumulation von PR-Genen Chaperone im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) induziert werden (Jelitto-Van Dooren *et al.*, 1999). Zwei Stunden nach Zugabe von Zellwand degradierenden Enzymen erreicht die mRNA-Menge des *luminal binding* Proteins BiP das Maximum, wohingegen das am

schnellsten induzierte PR-Gen β -1,3-Glucanase erst nach 4 Stunden induziert wird. Die Induktion von BiP erfolgt lokal wie systemisch in gleicher Stärke und Zeit.

Der genaue Ablauf der verschiedenen Pathogenabwehrkaskaden ist noch nicht bekannt. So sind nur wenige Signaltransduktionswege bisher vollständig aufgeklärt. Für viele Genaktivierungen hingegen konnten sowohl die direkte Ursache als auch die Wirkung bestimmt werden. So wird die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase (MAPKKK) ANP1 aus *Arabidopsis* durch H_2O_2 in Blättern stark aktiviert. Diese Aktivierung initiiert eine Phosphorylierungskaskade, an der zwei Stress-aktivierbare MAPKs, *AtMPK3* und *AtMPK6*, beteiligt sind (Kovtun *et al.*, 2000).

Viele der nach Pathogenbefall aktivierten Gene sind nicht unmittelbar an der Pathogenabwehr beteiligt, sondern regulieren die komplexen Signaltransduktionswege und Stoffwechseländerungen. So wurden für sehr viele regulatorisch wirksame Proteine, wie z. B. Proteinkinasen, Phosphatasen und Metalloproteine, eine Aktivierung der sie kodierenden Gene nach Pathogenbefall beschrieben.

1.3 Regulationsmechanismen

Um adäquat auf biotische und abiotische Einflüsse reagieren zu können, müssen diverse Stimuli von der einzelnen Pflanzenzelle erkannt und weitergeleitet werden. Für die Erkennung liegen in der Zellmembran verankert Rezeptormoleküle vor, die nach der Bindung eines Signalmoleküls das Signal über eine Vielzahl von Strukturänderungen beteiligter Proteine in den Zellkern weiterleiten. Für die Weiterleitung extrazellulärer Signale in das Zellinnere sind Rezeptor-ähnliche Proteinkinasen (*receptor-like-kinases*, RLKs) verantwortlich (Ohtake *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 1996). Im Zellkern endet die Signalkaskade in der Aktivierung für den jeweiligen Stimulus spezifischer Gene.

Jede Zelle eines Lebewesens besitzt die gesamte genetische Information dieses Organismus. Trotzdem liegen zwischen Zellen verschiedener Gewebe und Organen Unterschiede dergestalt vor, dass in jeder Zelle nur ein Teil der genetischen Information abgelesen (transkribiert) wird. Die Transkription eines Gens ist abhängig von der Spezialisierung der Zelle, dem Entwicklungszustand des Organismus und weiteren internen sowie externen Stimuli. Zu den externen Stimuli gehören auch die von Pathogenen abgegebenen oder aufgrund des Pathogenkontaktes von der Pflanze gebildeten Elizitoren. Die Transkription eines Gens wird über den Promotor reguliert, der den stromaufwärts des

kodierenden Bereichs gelegenen Teil eines Gens darstellt, über den die Aktivität des Gens reguliert wird. An diesen Promotor, bzw. an kurze Bereiche des Promotors, die sogenannten *cis*-regulatorischen Elemente, binden hochsequenzspezifisch Transkriptionsfaktoren, die auch als *trans*-Faktoren bezeichnet werden (Mitchell and Tjian, 1989). Promotoren bestehen aus zwei Bereichen: Zumeist um die 30 bis 120 bp stromaufwärts der Transkriptionsstartstelle liegt ein Bereich, der die Basaltranskription bewirkt und die Bindungsstelle für die DNA-abhängige RNA-Polymerase sowie weitere generelle Transkriptionsfaktoren darstellt. Weiter stromaufwärts liegen in der Regel eine Vielzahl von *cis*-regulatorischen Elementen, die die eigentlichen Regulationselemente darstellen (Dyana, 1989).

Transkriptionsfaktoren können auf die Transkription aktivierend und reprimierend wirken (Schwechheimer and Bevan, 1998).

Weitere wichtige Regulationsmechanismen sind die DNA-Methylierung und die Modifizierung der Chromatinstruktur. Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit nicht behandelt und wird hier nur der Ausführlichkeit halber dargestellt. Die DNA-Methylierung hat zumeist einen reprimierenden Einfluss auf die Transkription. Methylierung eukaryotischer DNA findet in der Regel an Cytosinen der symmetrischen Basenabfolgen 5'-CpG-3' und 5'-CpNpG-3' (N für jedes der vier Nukleotide), seltener an unsymmetrischen Sequenzen, wie z. B. 5'-CpApT-3' oder 5'-CpTpT-3' statt. Je nach transkriptioneller Aktivität des genomischen Bereichs ist der Methylierungsgrad hoch oder gering ausgeprägt. Generell gilt, dass Methylierung die Transkription reprimiert. In *Arabidopsis* konnte gezeigt werden, dass eine Reduzierung der DNA-Methylierung so gravierende Auswirkungen hatte, dass eine Reihe von Phänotypunterschieden beobachtet wurden (Ronemus *et al.*, 1996). Der Methylierungsgrad bezieht sich zumeist auf einen größeren chromosomalen Bereich. Dies ist konsistent mit der Beobachtung, dass viele Gene, die ähnliche Funktionen wahrnehmen, oft geclustert vorliegen und demzufolge über den Grad der Methylierung gemeinsam reguliert werden.

Der DNA-Methylierungszustand beeinflusst auch wesentliche Bereiche der Pflanzenentwicklung (zur Übersicht: Finnegan *et al.*, 2000). Als ein Beispiel kann die Bedeutung der Demethylierung spezifischer Promotorbereiche während der Blühinduktion durch Kälte (Vernalisation) angeführt werden (Finnegan *et al.*, 1998).

Ein weiterer Regulationsmechanismus, der auf große chromosomale Bereiche einen Einfluss hat, ist die Modifizierbarkeit der Chromatinstruktur. Bereits die kompakte Struktur des Heterochromatins verhindert die Bindung der Transkriptionsfaktoren an DNA. Erst eine Auflockerung des Heterochromatins zum Euchromatin ermöglicht die Transkription der Gene. In transkriptionsaktiven DNA-Abschnitten liegt das Chromatin als lockeres Euchromatin vor. Darüber hinaus wurde in Hefe für eine Reihe von Proteinen gezeigt, dass

sie an der Inaktivierung großer Bereiche eines Chromosoms beteiligt sind (Cheng and Gartenberg, 2000).

Neben der Transkription und der Translation unterliegen auch die jeweils nachgeschalteten Modifikationen einer Regulation. Eine große Bedeutung haben hierbei die posttranslationalen Modifikationen. Hierzu zählen Phosphorylierungen, Glykosylierungen, Acetylierungen und Methylierungen. Posttranslationale Modifikationen, wie z. B. Phosphorylierungen, erfolgen oft schneller als transkriptionelle Aktivierungen (Jonak *et al.*, 1467). Ein Beispiel für eine sehr schnelle posttranslationale Modifikation ist die Aktivierung der SIPK (Salicylsäure induzierte Proteinkinase) aus Tabak. Zhang *et al.* (1998) beobachteten nach diversen Stimuli weder auf mRNA- noch auf Proteinebene eine Akkumulation. Jedoch wurde die SIPK-Kinase-Aktivität innerhalb von 5 Minuten sehr stark durch Verwundung oder eine Infiltration von Elizitor hochreguliert.

1.4 Zellkulturen und Elizitoren

Pflanzliche Zellkulturen stellen ein vielfach genutztes Modellsystem dar, dessen Hauptvorteile in der Homogenität der Zellen und der leichten Zugänglichkeit für verschiedene Stimuli bestehen. Viele Reaktionen, die in Zellkulturen beobachtet wurden, konnten in entsprechenden Analysen im Pflanzensystem bestätigt werden. Ein bewährtes System zur Untersuchung elizitor-induzierter Abwehrreaktionen ist das Petersiliezellensuspensionskultur/Elizitor-System, in dem sowohl der Pmg-Rohelizitor (Zellwandfraktion des Pilzes *Phytophthora sojae*) als auch der Peptidelizitor Pep25 (ein 25 Aminosäuren langes Peptid des 42 kDa Glykoprotein aus *Phytophthora sojae*) eingesetzt werden (Nürnberger *et al.*, 1994). Ein großer Vorteil von Zellkulturen besteht darin, dass mit relativ geringem Aufwand eine große Menge homogenen Zellmaterials zur Verfügung steht, von dem nach Ausübung eines Stimulus eine Vielzahl von Probenahmen möglich ist. Auf diese Weise kann z. B. leicht der zeitliche Verlauf einer Genexpression verfolgt werden.

Bei Experimenten mit Zellkulturen und Elizitoren muss jedoch berücksichtigt werden, dass es sich um ein Modellsystem reduzierter Komplexität handelt. Dies gilt sowohl für die Pflanze als auch für das Pathogen. Auf Seiten der Pflanze liegt lediglich ein einzelner, heterotroph wachsender Zelltyp vor, der zudem durch eine jahrelange Kultivierung gegenüber dem ursprünglichen Zelltyp verändert ist. Das Pathogen ist auf einen Extrakt (z. B. Pmg-Rohelizitor) oder sogar auf ein Molekülfragment (Peptidelizitor, z. B. Pep25 oder Flg22) reduziert (Nürnberger *et al.*, 1994). Für einige aus Zellkulturen regenerierte Pflanzenarten

wurde ein gehäuftes Auftreten somaklonaler Variationen gezeigt (Brown *et al.*, 1993; Saker *et al.*, 2000). Bereits in 6 bis 12 Monate alten Zellkulturen wurde für 4 % der Pflanzen eine Veränderung im RAPD-Profil (*r*andomly *a*mplified *p*olymorphic *D*N*A*) gezeigt. Ursachen für diese somaklonalen Variationen sind Genverdoppelungen, chromosomale Unregelmäßigkeiten, Punktmutationen und Veränderungen der DNA-Methylierung (Saker *et al.*, 2000).

1.5 Wege der Funktionsaufklärung

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Herangehensweisen bei der Analyse von Genen. Zu Beginn der Gentechnologie wurde von einem interessanten Phänotyp ausgehend nach Genen gesucht, die für die Ausprägung des Phänotyps verantwortlich sind. Diese Vorgehensweise bezeichnet man als *forward genetics*. Unter *reverse genetics* versteht man die Suche nach einem Phänotyp bei bekanntem Genotyp mit Hilfe von Linien, in denen das zu untersuchende Gen modifiziert oder ausgeschaltet ist (Bouche and Bouchez, 2001; Feldmann, 1991; Wisman *et al.*, 1998). Im Laufe der letzten Jahre wurden immer mehr Gene aus verschiedenen Organismen isoliert und funktionell charakterisiert.

Die ersten Schritte der Funktionsaufklärung sind sehr mühsam. Das Interesse an einem bestimmten Gen wird zumeist über ein für den jeweiligen Forscher interessantes Expressionsmuster geweckt. Oft sucht man –ausgehend von Genen, die zumindest teilweise charakterisiert sind- nach Genen, die ein ähnliches Expressionsmuster aufweisen. Ausgehend von diesem Expressionsverhalten wird eine ähnliche Funktion angenommen. In den meisten Fällen führt die Aufklärung spezifischer Expressionsmuster jedoch nicht zur Funktion des Gens, da die meisten Gene ein sehr vielfältiges Expressionsverhalten aufweisen.

Zu den ersten durchgeführten Analysen gehören im allgemeinen computergestützte Vergleiche mit in Datenbanken gespeicherten Informationen zu Genen und Proteinen aus verschiedenen Organismen. Neben bloßen Sequenzvergleichen sind auch Vorhersagen über bestimmte Struktur motive möglich. Relativ verlässlich sind Vorhersagen in Bezug auf subzelluläre Lokalisationen, da die Sequenz motive, die z. B. für den Transport der Proteine in den Zellkern notwendig sind, relativ konserviert sind. Glücklicherweise schätzt sich der, der eine hohe Sequenzähnlichkeit (mindestens 60 % identische Aminosäuren) des ihn interessierenden Proteins zu in Datenbanken gespeicherten und funktionell charakterisierten Proteinen findet.

Neben der Suche nach bekannten Sequenzmotiven in der kodierenden Region gibt eine Analyse des Promotors oft weitere Hinweise zur Regulation des Gens.

Über eine Veränderung des Expressionsniveaus des zu untersuchenden Gens wird oft versucht der Funktion näher zu kommen. Eine Erhöhung der Expression kann über Überexpressionslinien erreicht werden, eine Reduktion durch Antisense-Linien oder Nullmutanten. Hierbei stellen Modellorganismen eine große Hilfe dar, da sowohl viele Transformationsprotokolle vorliegen und eine Vielzahl an Mutantenpopulationen, in denen nach Nullmutanten gesucht werden kann, existieren.

1.6 Identifizierung des Petersiliegens *PcEli17*

Die Isolierung von *PcEli17*, einem pathogen-induzierbaren Petersiliegen (*Petroselinum crispum*), erfolgte bereits 1989 in einem differenziellen *screening* aus einer cDNA-Bank, die aus einer elizitor-behandelten Zellkultur hergestellt worden war (Somssich *et al.*, 1989).

Die in den folgenden Jahren durchgeführten Experimente zeigten, dass unter mehr als 40 pathogenresponsiven Petersiliegenen *PcEli17* die schnellste und vor allem transienteste mRNA-Akkumulation nach Elizitorzugabe aufwies (Batz *et al.*, 1998). Die Inokulation von Petersilieblättern mit dem Pilz *Phytophthora sojae* führte zur lokalen Akkumulation von *PcEli17*-mRNA. Auch nach einer bakteriellen Inokulation konnte eine Aktivität des *PcEli17*-Promotors in transgenen *Arabidopsis* Promotor::*GUS*-Fusionslinien nachgewiesen werden (Kirsch *et al.*, 2001). In unbehandelten Petersilie-Pflanzen ist *PcEli17* vor allem in Wurzeln sowohl steril als auch unsteril angezogener Pflanzen exprimiert. In anderen Geweben wurde keine oder nur eine sehr schwache Expression nachgewiesen. Die Analyse von transgenen *PcEli17*-Promotor::*GUS*-Fusionslinien zeigte keine Wundresponsivität der analysierten Elemente (Kirsch *et al.*, 2001).

Analysen zur subzellulären Lokalisation von *PcEli17* mittels transienter Expressionsanalysen in einer Petersilie-Zellsuspensionskultur zeigten eine partielle Kernlokalisierung (Diplomarbeit Hamberger, 1999).

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit von *PcEli17* zu RING-Finger-Proteinen und des geclusterten Vorliegens von mehreren Aminosäuren, die prinzipiell zur Komplexierung von Metallionen in der Lage sind, wurde die hypothetische Metallionenkomplexierung von *PcEli17* im Rahmen einer Diplomarbeit untersucht. Für diese Analysen wurde sowohl die gesamte kodierende Sequenz als auch ein Teilbereich dieser Sequenz translational mit der kodierenden Sequenz des Maltose-bindenden Proteins fusioniert. Diese Fusion führte zu

einer besseren Löslichkeit des *PcEli17*-Proteins. Eine Komplexierung von Metallionen konnte jedoch in keinem dieser Fusionsproteine gezeigt werden (Diplomarbeit Klebsattel, 2000).

Die sehr schnelle Pathogeninduzierbarkeit schafft ein großes Interesse, die Funktion dieses Gens aufzuklären. Für eine Funktionsaufklärung ist es sehr hilfreich, stabil transformierte Pflanzen herstellen zu können. So lassen sich z. B. Veränderungen des Expressionsniveaus oder auch Mutationen in dem Protein einführen. Bis heute gelang bei Petersilie nur die Generierung von stabil transformierten Kalli, aus denen sich jedoch keine fortpflanzungsfähigen Pflanzen herstellen ließen. Ebenso wenig ist es möglich, anhand von Nullmutanten Hinweise zur Funktion zu erhalten. Wesentlich bessere Möglichkeiten für eine Funktionsaufklärung bietet *Arabidopsis thaliana*, die im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte vor allem für molekularbiologische Fragestellungen zu einem häufig eingesetzten Modellorganismus geworden ist (Meyerowitz, 1989).

Die stabile Transformation von *Arabidopsis* über *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Gentransfer ist in den letzten Jahren immer einfacher geworden (Bent, 2000). Die *floral dip*-Methode ermöglicht eine zuverlässige Transformation mit einem minimalen methodischen Aufwand innerhalb sehr kurzer Zeit (Clough and Bent, 1998). Es wurde versucht, diese Methode auch auf andere Pflanzen zu übertragen. Jedoch erwiesen sich die meisten Pflanzen mit dieser Methode als nicht transformierbar, wobei die Ursachen hierfür weitgehend unbekannt sind. Eine im Vergleich zu *Arabidopsis* wesentlich höhere Transformationseffizienz wurde für *Medicago truncatula* festgestellt (4,7 bis 76 % transformierter Samen bei *Medicago* und ca. 1 % bei *Arabidopsis*: Trieu *et al.*, 2000).

Die oben aufgeführten Vorteile gaben den Anlass zu einer Suche nach Genen im Genom von *Arabidopsis*, die eine Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* aufweisen. Ein Funktionsnachweis dieser sequenzähnlichen Gene lässt Rückschlüsse auf die mögliche Funktion von *PcEli17* zu. Die Funktion von *PcEli17* muss jedoch entweder experimentell in Petersiliepflanzen oder über eine Komplementation eines morphologischen oder biochemischen Phänotyps in *Arabidopsis* mit dem *PcEli17*-Protein nachgewiesen werden.

Einen weiteren Hinweis zur Funktion von *PcEli17* gäbe die Charakterisierung einer Proteindomäne, die sowohl in *PcEli17* als auch in anderen Genen vorkommt und in verschiedenen Genen funktionell charakterisiert worden ist.

1.7 Ziele der Arbeit

Basierend auf der sehr schnellen und transienten Expression des Petersiliegens *PcEli17* nach bakteriellem oder pilzlichem Pathogenbefall sollten zu *PcEli17* sequenzähnliche Gene aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana* identifiziert und isoliert werden.

Neben einer ausführlichen Expressionsanalyse der identifizierten Gene sollten die Vorteile der gut charakterisierten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* für eine Funktionsaufklärung dieser Gene ausgenutzt werden. Dies sollte vor allem über Pflanzenlinien geschehen, in denen das Expressionsniveau erhöht bzw. erniedrigt ist.

Aufbauend auf der vorhandenen Promotoranalyse des Petersiliegens *PcEli17* sollten in den sequenzähnlichen *Arabidopsis*-Genen *cis*-regulatorische Elemente in den jeweiligen Promotoren identifiziert und charakterisiert werden. Weil viele pathogen-responsive Gene auch durch Verwundung oder Seneszenz induziert werden, sollte gezielt untersucht werden, ob die identifizierten Gene durch diese Stimuli induzierbar sind, und nach den entsprechenden *cis*-regulatorischen Elementen gesucht werden. Eine Differenzierung zwischen stimulus-spezifischen Promotorelementen ist am besten durch eine Fusion des zu analysierenden Promotorfragmentes mit einem Reporter-gen in stabil transformierten Pflanzen zu erhalten. Als Reporter-gen wird für derartige Analysen häufig das *uidA*-Gen genutzt, dessen Produkt, das GUS-Enzym, sowohl eine Färbung im Gewebe als auch eine quantitative Auswertung über fluorometrische Methoden ermöglicht.

Eine Charakterisierung *cis*-regulatorischer Elemente führt zu einem besseren Verständnis der komplexen regulatorischen Netzwerke sowie einer potenziellen Nutzung dieser Elemente für biotechnologische Anwendungen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Radioisotope

Alle Laborchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad verwendet. Sie wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Biorad (München), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel stammten von den Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck (Darmstadt). Die Substrate IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactosid) und X-GLUC (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure) wurden von der Firma Biomol (Hamburg) verwendet. Chemikalien für die Herstellung von Kulturmedien lieferten die Firmen Difco Lab (Detroit, USA), GibcoBRL (Paesley, GB) und Sigma (Deisenhofen).

Restriktionsendonukleasen, T4-DNA-Ligase, alkalische Phosphatase, DNA-Polymerasen, DNaseI, RNase, Mazerase, Lysozym und Zellulase sowie DNA-, RNA- und Protein-Größenmarker lieferten die Firmen Amersham (Buckinghamshire, UK), Roche (Mannheim), GibcoBRL, New England Biolabs (New England, USA) und Serva (Heidelberg). Hersteller des benutzten Radioisotops $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (3000 Ci/mmol) war die Firma Amersham (Buckinghamshire, UK). Das für die Reinigung radioaktiv-markierter Sonden verwendete Säulenmaterial Sephadex G-25 superfine wurde von Pharmacia (Freiburg) bezogen. Röntgenfilme lieferte die Firma Kodak (Rochester, NY, USA).

2.2 Kulturmedien, Puffer und Lösungen

Alle Medien, Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, nach Sambrook *et al.* (1989) hergestellt. Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Lösungen mit hoch entionisiertem Millipore-Wasser angesetzt. Die meisten Lösungen wurden autoklaviert oder steril filtriert.

2.3 Desoxyoligonukleotide

Alle verwendeten Desoxyoligonukleotide wurden von den Firmen MWG (Ebersbach) und GibcoBRL (Paesley, GB) bezogen. Die Sequenzen der Desoxyoligonukleotide sind jeweils in 5'-3'-Orientierung angegeben. Die Abkürzungen in den degenerierten Desoxyoligonukleotiden folgen der IUPAC-Nomenklatur. Die für AtCMPG1 und AtCMPG2 in der letzten Spalte angegebenen Zahlen geben die Position des Desoxyoligonukleotids innerhalb der im Anhang angefügten entsprechenden genomischen Sequenz an.

AtCMPG1-spezifische Desoxyoligonukleotide

ah21	GGA GAT AAC CAT ACC ATC	1355-1372
ah22	CCC CCG CCT AGT GAC GAC	1571-1588
ah27	GAA TGG GAC TTT CAT TGA G	1267-1285
ah45	CTG CGA TGG TAT GGT TAT CTC C	1355-1376
ah46	CTT CCT CCG AGC AAC TTG TCA CC	1331-1353
ah47	CGG AAT GAT CTC TTT CTT GCT AAC	1308-1331
ah51	ACA GAA AAA TAT AAG TAG AAG G	775-796
ah52	TAA CGG TAT TAA ACG TGA TTT G	2209-2230
ah53	TTT CCA TGG GAC TTT CAT TGA GAG TG	1269-1289
ah54	ATC AGA TCT AGA ATA AGA ACG ATC AAC AAA AC	2503-2525
ah59	ATC AGA TCT AAA TGG TTT CTT AAC ATG TTT AAA C	2537-2561
ah63	GAA CTA GTG AAG CCC AAC TCT CCA ACA ATG	6-27
ah64	GAA CTA GTT TAA GAA CTT TAA TTT TTT CC	946-968
ah65	GAA CTA GTT AAT TCA AAA ATC ATT TTT CCC G	1068-1091
ah66	TCG GAT CCT CAA TGA AAG TCC CAT TCT TTG	1263-1284
ah68	ATG AAT GGT TTT GTT GAT CGT TC	2496-2518
ah69	ATG GAT CCG TTT AAG AAC TTT AAT TTT TTC C	946-968
ah70	ATG AAT TCT GAA GGT TTA TGT CAT ATT ATT C	1045-1067
ah71	ATG GAT CCT TGT CAA TGT CAT TAA ATT CAA AC	983-1006
ah72	GAT CTT GTC AAT GTC ATT AAA TTC AAA CAT TCA ACG GTC AAT T	983-1021
ah73	AAT TAA TTG ACC GTT GAA TGT TTG AAT TTA ATG ACA TTG ACA A	983-1021
ah76	TTT CTA GAT CTC TAT ATT CAC ATC CAT AC	1191-1212
ah77	GAA ACA GAG CTC TGT GAA TAA GGT CTG	2601-2676
ah83	ACT CCA TGG CAG CAG CAA ATG GTT TCT TAA CAT GTT TAA AC	2537-2561
ah87	GGT TAT CCG CTG CTA CGC GGC G	1654-1675
ah88	TTT CTG AAT CCA CTA GCA TCT CCA CTG	2161-2187
ah89	GAT CTT GTC AAT GTC AGG CCC GGA CAA CAT TCA ACG GTC AAT T	983-1021
ah90	AAT TAA TTG ACC GTT GAA TGT TGT CCG GGC CTG ACA TTG ACA A	983-1021
ah91	GAT CTG TCA ATG TCA TTA AAT TCA AAC ATT CAA C	984-1013
ah92	AAT TGT TGA ATG TTT GAA TTT AAT GAC ATT GAC A	984-1013
ah95	GAT CTG TCA TTA AAT TCA AAC ATT CAA CGG TCA ATT	990-1021
ah96	AAT TAA TTG ACC GTT GAA TGT TTG AAT TTA ATG ACA	990-1021
ah99	GAT CTG TCA TTA AAT TCA AAC ATT CAA C	990-1013
ah100	AAT TGT TGA ATG TTT GAA TTT AAT GAC A	990-1013
ah103	GAT CTG TCA ATG TCA AAC ATT CAA C	984-1013
ah104	AAT TGT TGA ATG TTT GAC ATT GAC A	984-1013

AtCMPG2-spezifische Desoxyoligonukleotide

ah23	GAT GAT CTC TGC ATC ACT G	1761-1780
ah24	GCT CTG TAA CAG TAA CAG	2880-2897
ah25	GTA TAC CAC TAG TGA AAT CTA TTA G	275-300
ah26	TTC TGA AGG ATC CGC ATC GTC GCC	1907-1930
ah48	TCC GCC GAT TCA ACA CAA GTT C	1959-2020
ah49	GAC GAA CAG AAT CAG ACC AAA TCT C	1971-1995
ah50	TAA GAC GTT GAA GAG TCC GAT TCG	1945-1968
ah55	CGA CCA TGG AGA TTC TTC AGA ATA AAG	1908-1935
ah56	ATC GGA TCC GGT GTC GTA AGC CGA AAG G	2969-2987
ah57	AAG CCA TGG GGA AAG ATG ATC TC	1747-1769
ah58	ATC GGA TCC AAA CGG CAT GAT ATG TGT CG	2992-3011
ah60	GTA GGA CTA GTT GGT AGG ACG	67-37
ah61	AAA TCA CTA GTA TTA ACA CGC CG	1288-1310
ah62	AGG GAT CCA GAG ATC ATC TTT CCT C	1754-1779
ah67	CAA AAC GAC ACA TAT CAT GCC G	2987-3009
ah78	ACG CTC TAG AAC CAT AGA CAA ACT CTC TC	1645-1673
ah79	ATG AGC TCT GAA TTG AAT CTT CTT TTT TAG	3123-3153
ah84	ACT CCA TGG CAG CAG CAA ACG GCA TGA TAT GTG TCG	2992-3011
ah85	CTG ATG ATA ACA GAG GAT TTC TCG CCG	2137-2163
ah86	CAC CGA AAC GCT CAA CGA CGA CG	2629-2651

AtCMPG3-spezifische Desoxyoligonukleotide

ah28	GAT TTA CCA AAC GAT TTC AG
ah29	CAT TGG AAT CCC AAG TAA AG
ah30	GTA TAC AGT ATA CTA GTA AAT CG
ah31	TCG GGG ATC CGA AAT CGT TTG G

AtCMPG4-spezifische Desoxyoligonukleotide

ah32	CTT TTT TGT TCT GTT CCG AG
ah33	CCA TAT ATT TGG AGA TAA AC
ah34	CCA CTA GTC ATT GCC TAT CAA TAG CC
ah35	CGT GCA AGC TCG GAT CCT GAG G

AtCMPG5-spezifische Desoxyoligonukleotide

ah105	GAT CAT TCA ATG GTC AAA AGT TTC C
ah106	AAT TGG AAA CTT TTG ACC ATT GAA T
ah113	ACA TCA TTT CGT TGC GTG GCG GG
ah114	CCG ACG CGA TTT CAG GCT TTT GC

AtCMPG6-spezifische Desoxyoligonukleotide

MK31	TTT GTC CGG TGT CGC TTG AAC
MK32	CCG AGA GAT GAG ACT TCT GAG

sonstige Desoxyoligonukleotide

für Reverse Transkription	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TV
En1-Transposon-spez. Oligo (En205)	AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA
En1-Transposon-spez. Oligo (En8130)	GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC
SLAT-Transposon-spez. Oligo (dspml)	CTT ATT TCA GTA AGA GTG TGG GGT TTT GG
SLAT-Transposon-spez. Oligo (dspml1)	GGT GCA GCA AAA CCC ACA CTT TTA CTT C
SLAT-Transposon-spez. Oligo (dspm5)	CGG GAT CCG ACA CTC TTT AAT TAA CTG ACA CTC
SLAT-Transposon-spez. Oligo (dspm8)	GTT TTG GCC GAC ACT CCT TAC C

2.4 Bakterienstämme und Plasmide

E.coli-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
DH5 α	F ⁻ , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	(Hanahan, 1983)
GM2163	F ⁻ , <i>ara-14</i> , <i>leuB6</i> , <i>thi-1</i> , <i>fhuA31</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>galk2</i> , <i>galT22</i> , <i>supE44</i> , <i>his64</i> , <i>rpsL136 (str)</i> , <i>xyl-5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>dam13</i> : <i>Tn9(cam^r)</i> , <i>dcm-6</i> , <i>mcrB1</i> , <i>hsdR2(r_k⁻, m_k⁻)</i> , <i>mcrA</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
SG13009	<i>Nal^S</i> , <i>Str^S</i> , <i>rif^S</i> , <i>lac⁻</i> , <i>ara⁻</i> , <i>gal⁻</i> , <i>mtl⁻</i> , F ⁻ , <i>recA⁺</i> , <i>uvr⁺</i>	Firma QIAGEN
SURE	<i>e14⁻ (mcr)</i> , Δ (<i>mcrCB-hsd-SMR-mrr</i>)171, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbcC</i> , <i>umuC::Tn5(kan^r)</i> , <i>uvrC</i> , {F' <i>proAB</i> , <i>lacI^q</i> , Δ (M15Tn10, <i>Tet^R</i>)}	Firma Stratagene
Agrobacterium-Stamm	wesentliche Merkmale	Referenz
GV3101	mit pMP90-virulenz Plasmid, C59C1, Rif ^R	(Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974)
Phagemid	wesentliche Merkmale	Referenz
pBluescript SKII (+/-)	<i>f1 ori</i> , <i>colE1 ori</i> , <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^R	(Alting-Mees <i>et al.</i> , 1992)
Plasmide	wesentliche Merkmale	Referenz
pBT10-GUS	<i>colE1 ori</i> , Amp ^R , -46 bis +8 des 35S-Promotors aus CaMV, <i>uidA</i> ORF, <i>nosPA</i> , MCA, Deletion im Vektorrückgrat	(Feldbrügge <i>et al.</i> , 1994)
pQE60	T5-Promotor, 2x <i>LacOp</i> , RBSII, MCS, 6xHis, T ₀ , amp ^R	Firma QIAGEN
pGPTV	left border, <i>pAnos</i> , <i>uidA</i> -ORF, MCS, <i>Pnos</i> , <i>npII</i> , PAg7, right border, <i>RK2 ori</i> , Kan ^R	(Becker <i>et al.</i> , 1992; Koncz and Schell, 1986)
pAVA393	2x35S-CaMV-Promotor, TL von TEV, mGFP4-ORF, 35S-CaMV-polyadenylation signal,	(von Arnim <i>et al.</i> , 1998)

2.5 Zellkulturen

Petersilie-Zellsuspensionkultur

Die Kultivierung einer Petersilie-Zellsuspension (Linie Pc5/5) erfolgte wie beschrieben (Kombrink and Hahlbrock, 1986). Fünf Tage nach Subkultivierung wurden die Zellen mit Elizitor behandelt oder protoplastiert.

***Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur**

Die Kultivierung der *Arabidopsis*-Zellsuspension (Ökotyp Col-0, Linie At7) erfolgte wie beschrieben (Trezza *et al.*, 1993) unter Verwendung von modifiziertem B5- (Kombrink and Hahlbrock, 1986) und MS-Medium (Sigma, Deisenhofen). Fünf Tage nach Subkultivierung wurden die Zellen mit Elizitor behandelt oder protoplastiert.

2.6 Pflanzen und Pflanzenanzucht

Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Für alle Analysen wurde *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0 verwendet. Zuerst wurden die Samen auf ½ MS-Salz, 0,8 % Agar, 1×Vitamin-Mix, ohne Saccharose über Nacht bei 4° C inkubiert und dann unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit, 20 °C) in Phytokammern angezogen. Nach 10 - 14 Tagen wurden die Keimlinge in Erde pikiert und im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) angezogen. Die Samen wurden bei 4 °C gelagert und dadurch zur gleichmäßigeren Keimung einer Vernalisation ausgesetzt. Geerntet wurden nur gesunde Blätter, Sprossachsen, Blüten oder Schoten, die sofort nach dem Abschneiden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert wurden. Wurzeln von in Erde angezogenen Pflanzen wurden durch vorsichtiges Waschen von der Erde befreit und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Sterile Flüssigkulturen

Die Anzucht steriler *Arabidopsis*-Flüssigkulturen erfolgte unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 20 °C) in 250 ml-Erlenmeyerkolben. Für die Gewinnung von Wurzelmaterial wurden etwa 20 Oberflächen-sterilisierte Samen vier bis fünf Wochen in 40 ml flüssigem Medium (1 x MS-Medium, 3 % Saccharose, 0,1 g/l Myo-Inositol, 0,5 g/l MES, pH 5,7) kultiviert.

2.7 Elizitoren und Pathogene

Pmg-Rohelizitor: Als Rohelizitor wurde eine Zellwandfraktion des Pilzes *Phytophthora sojae* (ehemals *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinae*) verwendet (Ayers *et al.*, 1976). Im folgenden wird dieser Rohelizitor als Pmg-Rohelizitor bezeichnet.

Pep25-Elizitor (Nürnberger *et al.*, 1994) wurde synthetisch hergestellt.

Flg22-Elizitor (Felix *et al.*, 1999) wurde ebenfalls synthetisch hergestellt.

Beide Peptidelizitoren wurden freundlicherweise von T. Nürnberger zur Verfügung gestellt.

Kulturbedingungen von *Pseudomonas syringae*

Der *Pseudomonas syringae* pv *tomato* Stamm DC3000 wurde auf King's B-Medium mit 100 µg Rifampicin/ml Medium) angezogen. Der das Avirulenzgen *Rpm1* exprimierende Stamm weist zusätzlich eine Kanamycin-Resistenz auf, das Medium enthielt entsprechend 30 µg Kanamycin/ml Medium. Von einer Stammkultur wurden die *Pseudomonas*-Stämme auf King's B-Platten bei 28 °C angezogen. Von einer Flüssig-Vorkultur wurde eine Hauptkultur mit 100 bis 500 ml King's B-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angesetzt und über Nacht bei 28 °C auf einem Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (10 min, 4000 Upm, 10 °C) und zweimal in 10 mM MgCl₂ gewaschen. Nach einer letzten Zentrifugation wurde mit 10 mM MgCl₂ eine OD₆₀₀ von 0,2 eingestellt. Dies entspricht einem Titer von 10⁸ cfu/ml 10 mM MgCl₂ (Debener *et al.*, 1991). Geringere Titer wurden durch 1:10-Verdünnungen mit 10 mM MgCl₂ hergestellt.

2.8 Elizitorbehandlung einer Arabidopsis-Zellsuspensionskultur

In autoklavierte und mit einem Wattestopfen verschlossene 250 ml-Erlenmeyerkolben wurden 400 µl Pmg-Rohelizitor aus *Phytophthora sojae* (5 mg/ml; Endkonzentration: 50 µg/ml) bzw. für die Kontrollansätze die entsprechende Menge hochentionisiertes Wasser gegeben. Anschließend wurden die Kolben erneut autoklaviert.

Einzelne 40 ml-*Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen wurden gemischt, um homogenes Ausgangsmaterial zu bekommen. Jeweils 40 ml wurden in die vorbereiteten Erlenmeyerkolben zu dem Pmg-Rohelizitor gegeben. Bis zum Ernten der Zellen wurden die Kulturen wieder im Dunkeln auf einen Horizontalschüttler gestellt. Die Zellen wurden zu den

angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe zu dem Elizitor abgenutscht, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.9 Infiltration von *Arabidopsis thaliana* mit Elizitor und Pseudomonaden

Flg22-Elizitor wurde in einer Konzentration von $10\text{ }\mu\text{M}$ in Keimlinge oder Blätter infiltriert. Von *Pseudomonas syringae* pv tomato wurden verschiedene Titer eingesetzt: Ein Niedrigtiter von 10^6 cfu/ml 10 mM MgCl_2 und ein Hochtiter von 10^8 cfu/ml 10 mM MgCl_2 wurden für mRNA-Akkumulations-Kinetiken eingesetzt. Für Versuche zum Wachstum der Pseudomonaden in infiltrierten Pflanzen wurde ein Titer von 10^3 cfu/ml 10 mM MgCl_2 verwendet.

Spritzenvermittelte Infiltration: Geringe Volumina wurden mit Hilfe einer stumpfen Spritze ohne Kanüle über die Stomata der Blattunterseite infiltriert. Diese Methode wurde sowohl mit Elizitor als auch mit Pseudomonaden eingesetzt.

Vakuuminfiltration: Die gesamten oberirdischen Pflanzenteile wurden bei in Erde gewachsenen Pflanzen kopfüber in eine Pseudomonaden-Suspension getaucht, in einen Exsikkator gestellt, und über eine Membranpumpe für 20 Minuten ein Unterdruck angelegt. Bei steril in Weckgläsern auf Agar angezogenen Pflanzen wurden die Pflanzen mit der Pseudomonaden-Suspension bedeckt und die Weckgläser in den Exsikkator gestellt.

2.10 Verwundung von Blättern

Blätter transgener Promotor::GUS-Fusionslinien (*Arabidopsis* Ökotyp Col-0) wurden unter Kurztagbedingungen in Phytokammern angezogen und vollentwickelte Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen sowohl durch Quetschen mit einer Pinzettenschere als auch durch Einschneiden einer Blatthälfte verwundet.

2.11 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle verwendeten gängigen molekularbiologischen Methoden, die in Laborhandbüchern z. B. in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben sind, sind nicht näher aufgeführt.

Restriktions-Endonukleasespaltung

Die Spaltung von DNA mit Restriktions-Endonukleasen wurde mit passenden Puffern nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt.

Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden unter Zugabe von genspezifischen Primern (Endkonzentration jeweils 0,5 µM), 100 ng genomischer DNA oder 10 ng Plasmid-DNA als Matrize, 0,2 mM eines dNTP-Mixes, 1U Taq- oder 2,5 U Pwo-Polymerase in einem Gesamtvolumen von 20 - 50 µl in entsprechendem 1x PCR-Puffer angesetzt. In einem Gene-Amp 9600-PCR-Gerät (Perkin Elmer, Weiterstadt) wurde die Amplifizierung in der Regel nach folgendem Schema durchgeführt:

94°C	2 min	25-40 Wiederholungen
94°C	30 s	
55-65°C	30 s	
72°C	1 min/1kb	
72°C	5 min	

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennte DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert und aufgereinigt.

Isolierung von Plasmid-DNA

Isolierungen von Plasmiden aus Bakterien wurden im Mini-Maßstab nach der von Holmes und Quigley (1981) beschriebenen TELT-Methode durchgeführt. Plasmide, die in größeren Mengen benötigt wurden, wurden mit dem „Plasmid Maxi-Kit“ oder „Plasmid Mega-Kit“ der Firma QIAGEN (Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

Isolierung von Gesamt-RNA und mRNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der „RNeasy Plant Mini Kit“ (QIAGEN, Hilden) eingesetzt. Pflanzenmaterial wurde im gekühlten Mörser in flüssigem Stickstoff zu einem

feinen Pulver zerrieben und eine dem Pflanzenmaterial entsprechende Menge QRL-Puffer zugegeben. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß den Angaben des Herstellers.

Größere Mengen an Gesamt-RNA wurden mittels Phenol-Chloroform isoliert. Alle wässrigen Lösungen wurden zur Inaktivierung von RNasen mit DEPC (Diethylpyrocarbonat, Endkonzentration: 0,1 % (v/v)) mindestens 30 min inkubiert und anschließend autoklaviert. Zu 5 g fein zerriebenem Pflanzenmaterial wurden 10 ml Lysis-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,0, 100 mM NaCl, 20 mM EGTA, 2 % (w/v) SDS), 100 µl β-Mercaptoethanol und 10 ml gepuffertes Phenol gegeben, mindestens 20 min in einem Überkopfschüttler gemischt, 5 ml Chloroform zugegeben, erneut 15 min in einem Überkopfschüttler gemischt und 10 min mit 5000 Upm bei RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde abpipettiert und die Phenol-Chloroform-Fällung zweimal wiederholt. Wenn keine Interphase mehr vorhanden war, wurde einmal mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) extrahiert und durch Zugabe von 1/10 Volumen Na-Acetat (3M, pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol die Nukleinsäuren bei -70 °C für mindestens 30 min gefällt. Nach einer Zentrifugation (30 min, 5000 Upm, 4 °C) wurde das Sediment in 5 ml Wasser resuspendiert und erneut durch Zugabe von 5 ml LiCl (4M) über Nacht im Eisbad gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment in 1,8 ml Wasser resuspendiert und die RNA mittels Na-Acetat-Fällung (s. o.) gefällt. Das nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und die RNA in 200 – 500 µl Wasser gelöst.

Die Isolierung von mRNA erfolgte mit einem „Dynabeads[®] mRNA DIRECT Kit“ (DYNAL, Oslo, Norwegen) entsprechend den Herstellerangaben.

Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis* wurden circa 5 g Blattmaterial zu einem feinen Pulver zerrieben, 22 ml auf 65 °C vorgewärmter 2×CTAB-Puffer (2 % (w/v) Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB), 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 1 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, M_r 40000), 2 % β-Mercaptoethanol) zugeben und für mind. 1 h bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von 20 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurden die Ansätze 10 min auf einem Überkopfschüttler gemischt. Nach der Phasentrennung durch Zentrifugation (15 min, 5000 Upm, 15 °C) wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt, 0,7 Volumen Isopropanol zugegeben, gemischt und 10 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 5000 Upm, 15 °C) wurde die sedimentierte DNA in 1 – 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert, 10 µl RNase A (10 mg/ml, vorgekocht) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Chloroform/Isoamylalkohol-Fällung wurde wiederholt und nach Phasentrennung zu der wässrigen Phase 0,7 Volumen Ethanol, 0,2 Volumen 3 M Na-Acetat zugegeben, zentrifugiert und die sedimentierte DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen.

Die DNA wurde in 200–500 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0) gelöst und bei 4 °C gelagert.

Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung von $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP mit Hilfe des „Random Primed DNA Labeling Kits“ (Boeringer, Mannheim) gemäß Herstellerangaben (Feinberg and Vogelstein, 1983). Nicht eingebaute Desoxynukleotide wurden mittels einer Gelfiltration (Sephadex G25 superfine, Pharmacia, Freiburg) aus dem Reaktionsansatz entfernt.

Transfer von Nukleinsäuren auf Nylonmembranen

Für DNA-Blot-Analysen (Southern, 1975) wurden 10 µg genomische DNA mit den entsprechenden Restriktions-Endonukleasen verdaut, im 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel 15 Minuten in 0,25 N HCl und anschließend einige Minuten in 0,4 N NaOH gespült. Der Transfer erfolgte mit 0,4 N NaOH in einem *downward*-Verfahren (Koetsier *et al.*, 1993).

Für RNA-Blot-Analysen wurden 5–10 µg Gesamt-RNA eingesetzt, die vor der Elektrophorese mit 1 Volumen RNA-Auftragmix (60 % (v/v) Formamid, 22 % (v/v) Formaldehyd (37 %), 18 % (v/v) 10×MOPS-Puffer) gemischt und durch eine 15minütige Inkubation bei 60 °C denaturiert wurde. Die Auftrennung der Gesamt-RNA erfolgte in einem denaturierenden 1,3%igen Agarosegel.

Herstellung nichtradioaktiver Hybridisierungssonden

DIG-markierte Sonden wurden für die Hybridisierung des SLAT-Filters benötigt. Die Herstellung erfolgte mit Hilfe des „PCR DIG Probe synthesis Kits“ der Firma Boehringer (Mannheim) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Sonden wurden mit den Primern ah53 und ah59 (*At*CMPG1) bzw. ah57 und ah58 (*At*CMPG2) amplifiziert und umfassten die gesamten kodierenden Bereiche.

Hybridisierungsbedingungen membrangebundener Nukleinsäuren

Die Hybridisierung membrangebundener Nukleinsäuren erfolgte in verschließbaren Glasröhren über Nacht in einem Rollinkubator bei 50 - 65 °C.

Die Nylonmembran mit den fixierten Nukleinsäuren wurde zuvor für mindestens zwei Stunden ohne Sonde prähybridisiert (1 M NaCl, 1 % (w/v) SDS, 10 % (w/v) Dextransulfat). Die fünf Minuten bei 95 °C denaturierte DNA-Sonde wurde anschließend dem Ansatz hinzugefügt. Nach der Über-Nacht-Inkubation wurde die Membran zweimal 30 Minuten in 0,2×SSC, 0,5 % (w/v) SDS bei 50 - 65 °C gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonden

zu entfernen. Die Membranen wurden in Folie eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm bedeckt bei -80 °C für mehrere Stunden bis zu zwei Wochen zwischen Trimax-Verstärkerfolien exponiert.

Für eine Rehybridisierung wurde der Filter eine Stunde in 0,1 % SDS bei 80 °C gewaschen. Auf diese Weise wurden gebundene Sondenmoleküle entfernt und somit eine erneute Hybridisierung zu ermöglicht.

DNA-Sequenzierung (Sanger *et al.*, 1977)

DNA-Sequenzierungen wurden von der Servicegruppe ADIS des Max-Planck-Instituts mit Hilfe eines automatischen Verfahrens der Firma Applied Biosystems durchgeführt.

Die erhaltenen Sequenzinformationen wurden mit den Programmen Gap, BestFit, Pilup und Translate (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA) ausgewertet.

2.12 Isolierung genomischer *AtCMPG1*-Klone aus einer genomischen *Arabidopsis*-Bibliothek

Von dem später als *AtCMPG1* bezeichneten Gen war zu Beginn der Arbeit lediglich eine EST-Sequenz in Datenbanken veröffentlicht (Accession-Nr. T44966, 476 bp, Datenbank-eintrag: 07.01.1998). Die vollständige genomische Sequenz von *AtCMPG1* wurde durch Sequenzieren von Klonen bestimmt, die beim Durchmustern einer BAC-Bibliothek identifiziert wurden. Vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH wurde ein Filter mit DNA von 9216 BAC-Klonen zur Verfügung gestellt (Filter-Nr.: 79-1-150).

Hybridisierung eines BAC-Filters

Für die Hybridisierung des BAC-Filters 79-1-150 wurde die von genomischer *Arabidopsis* Col-0 DNA mit den Primern ah22 und ah27 amplifizierte Sequenz des EST-Klons T44966 als Sonde eingesetzt (321 bp; Kap. 3.1.1). Im Gegensatz zu der im Kap. 2.11 angeführten Hybridisierungslösung wurde hier sowohl für die Vorhybridisierung (zwei Stunden) als auch für die Über-Nacht-Hybridisierung folgende Lösung eingesetzt: 200 mM Na_xPO_4 pH 7,2, 1 mM EDTA, 15 % (v/v) Formamid, 1 % (w/v) BSA, 7 % (w/v) SDS. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42 °C. Am nächsten Tag wurden ungebundene Sondenmoleküle durch 30minütiges Waschen mit $2\times\text{SSC}$, 0,1 % (w/v) SDS bei 60 °C entfernt.

Die Hybridisierung des BAC-Filters mit der *AtCMPG1*-spezifischen Sonde ergab 16 Signale (in Abb. 3.2 mit einem Kreis markiert). Die Signale konnten anhand des angegebenen

Pipettier-Schemas spezifischen BAC-Klonen zugeordnet werden. Von den 16 Signalen wurde für die sieben stärksten sowie für drei schwache Signale die entsprechenden Klone bestellt (Tab. 3.2). BAC-Klone, die in der Hybridisierung schwächere Signale ergaben, enthielten mutmaßlich zu *AtCMPG1* sequenzähnliche Gene. Diese Klone wurden in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter analysiert.

Isolierung von BAC-DNA und Bestätigung der erhaltenen Klone

Die vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH zugeschickten 10 BAC-Stichkulturen wurden auf LB-Platten mit Kanamycin (50 µg/ml) ausplattiert. Von 3 ml-LB-Flüssigkulturen wurden Stammkulturen angelegt und direkt 1 µl Kultur für eine PCR mit der Primerkombination ah22/ah27 eingesetzt. Eine Bande der erwarteten Größe konnte mit den Klonen 5, 11 und 15 erzielt werden. Von diesen drei Klonen wurde BAC-DNA isoliert. Die Isolierung erfolgte mit einem Plasmid-Maxi-Kit (QIAGEN, Hilden), wobei das Protokoll leicht modifiziert wurde: Von einer 3 ml-LB-Vorkultur wurde eine 400 ml-LB-Kultur angezogen. Alle Puffer wurden in Bezug auf das QIAGEN-Standardprotokoll in einer fünffachen Menge eingesetzt und der Elutionspuffer auf 65°C vorgewärmt.

Für die Sequenzierung wurden von den BAC-Klonen Subklone angefertigt. Die in einen pSKII-Vektor ligierten Teilfragmente ermöglichten eine deutlich einfachere Sequenzierung. Hierfür wurde BAC-DNA der Klone 5, 11 und 15 mit den Restriktions-Endonukleasen *AccI*, *EcoRI*, *HindIII*, *SacI*, *Sall*, *SpeI*, *XbaI* und *XhoI* geschnitten. Die Hälfte des Restriktionsansatzes (2 µg DNA) wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Dieser genomische DNA-Blot wurde mit einer 321 bp großen *AtCMPG1*-Sonde hybridisiert. Durch einen Vergleich des Autoradiogramms mit dem Gelphoto konnten 7 bis 16 kb große Fragmente identifiziert werden, die das *AtCMPG1*-Gen enthielten. Die zweite Hälfte des Restriktionsansatzes wurde ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die charakterisierten Banden wurden aus dem Gel eluiert. Die eluierten Fragmente wurden in entsprechend vorbereitete Vektoren ligiert und in *E. coli* (Stamm DH5α) transformiert. Die Sequenzierung der verschiedenen Subklone erfolgte sowohl mit genspezifischen als auch mit vektorspezifischen Primern.

2.13 Schnelle Vervielfältigung von cDNA-Enden (RACE)

Zur Längenbestimmung der untranslatierten Regionen (UTR) wurde der „5'/3'-RACE Kit“ der Firma Boehringer, Mannheim eingesetzt. Für die Reverse Transkription wurde sowohl Gesamt-RNA als auch mRNA in verschiedenen Mengen eingesetzt. Die Durchführung der PCR-Experimente erfolgte nach Herstellerangaben. Als genspezifische Primer in der 5'-RACE wurden für *AtCMPG1* ah45, ah46 und ah47, für *AtCMPG2* ah48, ah49 und ah50 eingesetzt. In der 3'-RACE wurden für *AtCMPG1* der Primer ah68 und für *AtCMPG2* der Primer ah67 verwendet.

2.14 Transiente Expression in Protoplasten

Protoplastierung kultivierter Petersiliezellen

Die Isolierung von Protoplasten aus der Petersilie-Zellsuspensionskultur erfolgte nach Dangi *et al.* (1987): 40 ml Petersilie-Zellsuspensionskultur der Linie Pc5/5 wurden fünf Tage nach Subkultivierung zweimal in 0,24 M CaCl_2 -Lösung gewaschen, mit einer Enzymlösung (0,15 g Cellulase, 1 U/mg, Onuzuka R-10 (Merck, Darmstadt); 0,06 g Macerozym R-10 in 0,24 M CaCl_2 -Lösung) gemischt und mindestens 18 Stunden auf einem Horizontalschüttler bei 15 Upm inkubiert.

Die Gewinnung von Protoplasten aus der *Arabidopsis*- Zellsuspensionskultur erfolgte analog zu der Prozedur bei der Petersilie-Zellsuspensionskultur mit der Ausnahme, dass für 40 ml Zellsuspensionskultur 0,7 g Cellulase und 0,1625 g Macerozym R-10 für eine erfolgreiche Protoplastierung benötigt wurden. Das weitere Vorgehen bei der Protoplastierung unterschied sich nicht von dem Vorgehen bei der Petersilie-Zellsuspensionskultur.

Transfektion von Protoplasten

Die Transfektion der Protoplasten erfolgte in Anlehnung an Hain *et al.* (1985). Nach einer Trennung der protoplastierten von den nicht-protoplastierten Zellen durch Flottieren in P5-Medium (1 Tüte Gamborgs B-5 (Sigma G5893), 10 ml 2,4 D-Lösung (0,1 mg/ml), 96,9 g Saccharose, pH 5,7, ad 1 l) wurden 200 μl der Protoplasten-Suspension mit 200 μl PEG-Lösung (25 % PEG 6000 (Serva), 100 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 45 mM Mannit, mit KOH pH 9,0) und 10 μg linearisierte Plasmid-DNA des jeweiligen Promotor::GUS-Konstrukts als *dam*-DNA (Untersuchungen zum Einfluss Methylierungs-defizienter Bakterienstämme auf transiente Genexpression: Tovar *et al.*, 1993) in einem 10 ml Kunststoffröhrchen vorsichtig

gemischt und 15 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 5 ml $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ (275 mM) wurde die DNA-Aufnahme gestoppt. Nach einer Zentrifugation für 7 Minuten bei 800 Upm wurden die sedimentierten Protoplasten in 6 ml P5-Medium vorsichtig resuspendiert. Der Ansatz wurde geteilt und bei der Transfektion von Petersilie-Protoplasten zu einem Ansatz 9 μl Pep25-Elizitor (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), bei der Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten 30 μl Flg22-Elizitor (100 μM) gegeben.

Nach einer Inkubation von 6 Stunden im Dunkeln wurden die Kunststoffröhrchen mit 0,24 M CaCl_2 -Lösung aufgefüllt, für 10 Minuten bei 2500 Upm zentrifugiert und der Überstand bis auf einen Rest von circa 1 ml abgekippt. Die transfizierten Protoplasten wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, die Protoplasten 15 Sekunden in einer Tischzentrifuge bei maximaler Umdrehungszahl sedimentiert, der Überstand abgesaugt und die Protoplasten in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Fluorometrische Messung der β -Glukuronidase-Aktivität

Die Protoplasten wurden auf Eis aufgetaut, mit 200 μl Extraktionspuffer (50 mM Na_xPO_4 pH 7,0, 1 mM EDTA, 0,1 % (v/v) Triton X-100, 10 mM β -Mercaptoethanol) durch Vortexen gemischt, für 20 Minuten bei 4 °C geschüttelt und zentrifugiert (10 Minuten, 13000 Upm, 4 °C). 50 μl des Protoplastenextraktes und 50 μl 4-Methylumbelliferyl- β D-glucuronid (4-MUG) wurden gemischt. Sofort und nach 30 und 60 Minuten wurden jeweils 20 μl abgenommen und zu den in einer Multititerplatte vorgelegten 200 μl Na_2CO_3 (200 mM) gegeben (Jefferson *et al.*, 1987). Parallel zu einer Eichkurve mit dem Produkt der enzymatischen Umsetzung von 4-MUG zu 4-MU (4-Methylumbelliferon) wurde mit einer Anregungswellenlänge von 360 nm die Fluoreszenz der Proben bei 440 nm in einem FluoroCount (Packard, Meriden, USA) bestimmt. Die gemessenen Fluoreszenzwerte sind direkt proportional zu der vom GUS-Enzym umgesetzten Substratmenge.

Proteinmengenbestimmung

Von jeder Probe wurden 10 μl des Protoplastenextraktes mit 1 ml Bradfordreagenz gemischt und die erhaltenen Absorptionswerte mit den Fluoreszenzwerten verrechnet (Bradford, 1976). Die erhaltene GUS-Aktivität konnte somit auf den Gesamtproteingehalt bezogen werden.

2.15 Herstellung und Analyse transgener Pflanzen

Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Von den Plasmiden (pGPTV), die für die Transformation eingesetzt wurden, wurde die Integration von beiden Seiten aus ansequenziert. Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* (Stamm GV3101) erfolgte durch Elektroporation. Herstellung elektrokompetenter Agrobakterien: Bakterien von Platte in 100 ml YEB-Medium (5 g beef-extract, 1 g yeast-extract, 5 g Peptone 140, 5 g Saccharose, pH 7,2, ad 1 l) animpfen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 28 °C unter Schütteln inkubieren, abzentrifugieren und zweimal in 1 mM HEPES-Puffer, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5 waschen. Das Bakteriensediment in 800 µl 1 mM HEPES-Puffer, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5 resuspendieren und in 50 µl-Ansätzen bei –80 °C lagern.

Zu 50 µl elektrokompetenten Agrobakterien wurde 1 µg Plasmid-DNA gegeben, vorsichtig gemischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. In einem Elektroporationsgerät der Firma BioRad erfolgte die Transformation (2,5 kV, 25 µF, 400 Ω).

Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die stabile Transformation erfolgt mit der *Floral-Dip*-Methode (Clough and Bent, 1998). Die Anzucht der *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp Col-0, jeweils 5 Pflanzen in einem Topf, Ø 7 cm) erfolgte für drei bis fünf Wochen in Phytokammern unter Kurztagbedingungen und zur anschließenden Blühinduktion für weitere zwei bis drei Wochen unter Langtagbedingungen. Um eine vermehrte Bildung von Sekundär-Infloreszenzen anzuregen, wurde die Primär-Infloreszenz abgeschnitten. Die Transformation erfolgte, solange die Mehrzahl der Blüten noch geschlossen waren. Agrobakterien können nur innerhalb eines kurzen Zeitraums der Blütenentwicklung (bis zur Schließung des Lokulus) die Eianlagen transformieren (Bent, 2000).

Von den transformierten Agrobakterien wurde von der Platte eine Kolonie in 1 l YEB-Medium (Gentamicin: 25 µg/ml, Rifampicin: 100 µg/ml, Kanamycin: 50 µg/ml) angeimpft und über Nacht bei 28 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (20 min, 6000 Upm, 10 °C) und in einer 5%igen Saccharose-Lösung resuspendiert. Zu 400 ml dieser Bakterien-Suspension wurden 200 µl Silwet L-77 (Union Carbide) als Detergens hinzugefügt (Whalen *et al.*, 1991). Die Töpfe mit den *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in diese Suspension getaucht, so dass die Infloreszenzen vollständig eintauchten, kurz geschwenkt und zum Trocknen horizontal auf Tücher gelegt. Bis zur Samenreife wurden die Pflanzen ins Gewächshaus gestellt, wobei in den ersten zwei Tagen nach Transformation die Pflanzen mit einer Haube bedeckt wurden.

Analyse transgener Pflanzen

Die Samen der transformierten Pflanzen wurden oberflächensterilisiert (zweimal 2 min 70 % Ethanol, einmal 2 min 100 % Ethanol) und auf Selektionsplatten (0,5×MS-Salz (Sigma), 1×Vitamin-Mix, 250 µg/ml Claforan (Cefotaxim-Natrium, Hoechst AG), 70 µg/ml Kanamycin 0,8 %Agar) ausgesät. Die Kanamycin-resistenten Pflanzen wurden als Primärtransformanten bezeichnet. Die aus einer Selbstung dieser Pflanze hervorgegangenen Samen bildeten die T1-Generation. Bei einer Einfach-Integration des Transgens wurde in vielen Fällen nach Kanamycin-Selektion auch die erwartete 1:2:1-Aufspaltung näherungsweise beobachtet. Transgene Pflanzen mit einer Mehrfach-Integration können auch in der T2-Generation noch segregieren. Die *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien sowie die *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Promotor::*GUS*-Fusionslinien mit den langen Promotorfragmenten wurden über Selbstung in die T3-Generation gebracht. Die GFP-Fusionslinien sowie die *AtCMPG1*-Promotor::*GUS*-Fusionslinien mit den kurzen Promotorfragmenten wurden in der T2-Generation analysiert, wobei über Selektionsplatten die Anwesenheit des Transgens bestätigt wurde. Ein Beispiel für eine Kanamycin-Selektion ist in der Abb. 2.1 dargestellt.

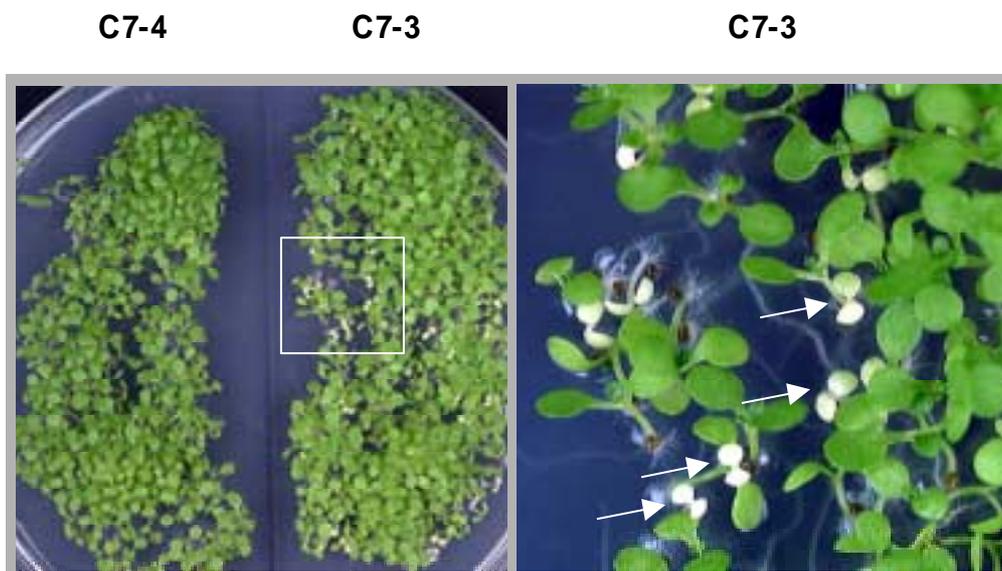


Abb. 2.1. Selektion kanamycinresistenter transgener Pflanzen.

Transgene Pflanzen (*AtCMPG1*-Überexpressionslinien C7-3 und C7-4) der T2-Generation wurden auf Kanamycin-haltigem MS-Medium (70 µg Kanamycin/ml Medium) 12 Tage unter Langtagbedingungen herangezogen. Das rechte Photo stellt eine Vergrößerung des im linken Photo markierten Bereichs dar. Mit einem Pfeil markiert sind Kanamycin-sensitive, d. h. nicht transgene Pflanzen.

2.16 Histochemischer Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität

Für den Nachweis der β -Glukuronidase-Aktivität in transgenen Pflanzen wurde das Pflanzenmaterial für 20 Minuten in einer GUS-Färbelösung (0,5 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Glucuronsäure (X-Gluc), 100 mM Natriumphosphatpuffer, 0,1 % Triton X-100, 2 mM $K_3[F_6(CN)_6]$, pH 7) vakuum-infiltriert, über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend in 70 % Ethanol entfärbt.

2.17 Isolierung von Nullmutanten

Ein von Jonathan Jones (Sainsbury Laboratory, John Innes Center, Norwich, UK) freundlicherweise zur Verfügung gestellter SLAT-Filter (Nr. MM36) mit DNA von 43200 unabhängigen Transposon-Integrationslinien wurde mit einer DIG-markierten *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-spezifischen Sonden (Kap. 2.11) hybridisiert. Eine ausführliche Beschreibung der Population und Charakterisierung der *AtCMPG1*-Integrationslinie erfolgt im Ergebnisteil (Kap. 3.4.4).

2.18 Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in *E.coli*

Herstellung der Expressionsvektoren

Die vollständigen kodierenden Bereiche der Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2* wurden translational mit den 6 \times His-tag des pQE60-Vektors der Firma QIAGEN, Hilden fusioniert. Für den 5'-Bereich wurde jeweils eine *NcoI*-Schnittstelle über das Startcodon beider Gene mittels PCR eingefügt. Für den 3'-Bereich wurde für *AtCMPG1* eine *BamHI*-Schnittstelle und für *AtCMPG2* eine *BglII*-Schnittstelle eingefügt. Für *AtCMPG1* erfolgte die PCR mit den Primern ah53 und ah59, für *AtCMPG2* mit den Primern ah57 und ah58. Nach der PCR erfolgte ein Restriktionsverdau der amplifizierten Fragmente mit den entsprechenden Enzymen. Die Fragmente mit den überhängenden Enden wurden im Agarosegel aufgetrennt und aus dem Gel eluiert. Die Ligation erfolgte bei *AtCMPG1* in den *NcoI* - *BamHI*-geöffneten, bei *AtCMPG2* in den *NcoI* - *BglII*-geöffneten pQE60-Vektor. Die Transformation erfolgte in den Bakterienstamm SURE der Firma Stratagene. Von den erhaltenen Klonen wurden die kodierenden Bereiche der Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2* sowie die Übergänge zum Vektor

sequenziert. Plasmide mit korrekt inserierten Fragmenten wurden in den Expressionsvektor SG13009 der Firma QIAGEN transformiert.

Expression der Proteine

Alle Bakterienkulturen wurden in LB-Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin zugesetzt wurden, bei 37 °C und 220 Upm inkubiert. Von entsprechenden Übernacht-Kulturen wurden im Verhältnis 1:50 Kulturen angesetzt, die bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 bis 0,8 wuchsen. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von IPTG in einer Endkonzentration von 0,01 bis 2 mM. Nach einer ein- bis vierstündigen Inkubation bei 30 bis 37 °C wurden die Bakterien durch Zentrifugation sedimentiert und je nach weiterem Vorgehen in verschiedenen Puffern resuspendiert.

Herstellung von Proteinextrakten

Rohextrakte von Bakterien wurden durch Resuspension der sedimentierten Bakterien in 1×Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,0005 % (w/v) Bromphenolblau) hergestellt (Laemmli, 1970). Für eine native Aufreinigung der Proteine wurden die sedimentierten Bakterien in einem Phosphatpuffer mit verschiedenen Detergenzien (Kap. 3.4.1) resuspendiert und im Eisbad achtmal jeweils 5 s mit Ultraschall (200 – 300 W) lysiert.

Für die Herstellung von Proteinextrakten verschiedener *Arabidopsis*-Gewebe wurde circa 2 g Pflanzenmaterial gemörsert, in 2 ml Aufschlusspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol) aufgenommen, im Eisbad 30 min gerührt, 0,2 g gespültes und gepuffertes Dowex zugegeben, wieder im Eisbad 30 min gerührt und nach Zentrifugation (10 min, 10000 Upm, 4 °C) der Überstand abgenommen und bei –20 °C gelagert.

Reinigung von *inclusion bodies* (nach Klein und Salvucci, 1992)

Nach Induktion der Expression mit IPTG (s. o. Expression der Proteine) wurden 200 ml Bakterienkultur abzentrifugiert und die sedimentierten Bakterien in 640 µl Lysis-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 % (w/v) Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert. Durch Zugabe von 160 µl Lysozym-Lösung (10 mg/ml Lysis-Puffer) und einer 30 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien lysiert, 16 µl MgCl₂-Lösung (1 M) und 20 µl DNaseI-Lösung (1 mg/ml Lysis-Puffer) zugegeben, kräftig auf dem Vortexer gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml Detergenspuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 % (w/v) Desoxycholat, 1 % (v/v) Nonidet P40) wurde erneut auf dem Vortexer gemischt und zentrifugiert (10 min 14000 Upm 4 °C). Das Sediment wurde mehrere Male in Tritonpuffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 10 mM β-Mercaptoethanol, 0,5 % Triton X-100) gewaschen, bis das Sediment eine weiße Farbe

aufwies. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment in 1 ml 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM β -Mercaptoethanol aufgenommen.

Affinitätsreinigung rekombinanter Proteine über Nickel-Agarose

Der C-terminal an AtCMPG1- und AtCMPG2-Protein fusionierte 6×His-tag ermöglichte eine Affinitätschromatographie über Nickel-NTA-Agarose. Die Affinitätschromatographie erfolgte sowohl unter nativen als auch denaturierenden Bedingungen unter Verwendung des „Nickel-NTA Spin Kits“ (QIAGEN, Hilden) gemäß Herstellerangaben.

Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem 6%igen Sammelgel (0,4 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 6 % (w/v) Polyacrylamid, 0,025 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1 % (v/v) TEMED) und einem 12%igen Trenngel (0,4 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 12 % (w/v) Polyacrylamid, 0,025 % (w/v) Ammoniumpersulfat und 0,1 % (v/v) TEMED) (Laemmli, 1970).

Die Proteine wurden vor der Elektrophorese mit einem Volumen 1×Laemmli-Probenpuffer (30 mM Tris-HCl pH 6,8, 1 % (w/v) SDS, 5 % (v/v) Glycerin, 2,5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, 0,0005 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Coomassie-Färbung

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine 10 min in Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250) unter leichtem Schwenken gefärbt und in Entfärbelösung (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bis zu einem klaren Hintergrund entfärbt.

Silber-Färbung

Im Vergleich zu einer Coomassie-Färbung ist eine Silberfärbung von Proteinbanden in SDS-Polyacrylamidgelen deutlich sensitiver. Die Färbung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Blum *et al.* (1987). Alle Schritte erfolgten unter leichtem Schwenken. Eine Fixierung der Proteine erfolgte in einer mindestens einstündigen Inkubation in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure. Danach wurde das Gel dreimal für 20 min in 50 % (v/v) Methanol gewaschen, mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,2 g/l) 1 min vorbehandelt und anschließend 20 min mit AgNO_3 (2 g/l), Formaldehyd (0,75 ml (37%ig)/l) inkubiert. Nach dreimaligem jeweils einminütigem Spülen unter destilliertem Wasser erfolgte die Entwicklung nach Augenschein in Na_2CO_3 (60 g/l), 0,5 ml/l Formaldehyd (37%ig), $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (5 mg/l). Ein Abstoppen der

Entwicklungsreaktion erfolgte durch Spülen des Gels in 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure.

Protein-Blot-Analyse

Der Elektrotransfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine in Methanol aktivierte und im Transferpuffer äquilibrierte PVDF-Membran (Millipore, Bedford, USA) erfolgte im Naßblotverfahren in einer Elektrophorese-Minikammer (Hoefer Scientific Instruments, California, USA) mit einem Transferpuffer (25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol) für mindestens zwei Stunden bei einer konstanten Spannung von 80 V.

Nach dem Transfer wurde zur Ladungskontrolle der Blot mit „SYPRO Ruby Protein Blot Stain„ (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) nach Herstellerangaben angefärbt und unter UV-Licht photographiert.

2.19 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen

Die Immunisierung und Gewinnung der Seren wurde von der Firma EUROGENTEC, Herstal, Belgien durchgeführt. Von 10 Kaninchen wurden mir vor der Immunisierung Präimmunsereen zugeschickt, die in Protein-Blot-Analysen auf mögliche Kreuzreaktionen sowohl mit bakteriellen als auch mit pflanzlichen Proteinen verschiedener Gewebe getestet wurden. Ausgewählt wurden insgesamt vier Kaninchen, deren Seren die geringsten Kreuzreaktionen aufwiesen. Für *AtCMPG1* und *AtCMPG2* wurden jeweils zwei Kaninchen am Tag 1, 14, 28 und 56 mit jeweils circa 100 µg Protein immunisiert. Die für die Immunisierung eingesetzten Proteine waren zuvor in Protein-Blot-Analysen mit einem Penta-His-Antiserum auf die Anwesenheit des 6×His-tags der Fusionsproteine analysiert worden. Aufgrund nicht löslich zu isolierenden Proteine wurden entsprechende Banden aus einem präparativen SDS-Polyacrylamidgel geschnitten (Kap. 3.4.1) und diese Gelstücke –gemischt mit Freund'schem Adjuvans- in die Kaninchen injiziert. Eine Mengenabschätzung der aus dem Gel ausgeschnittenen Proteinbanden erfolgte, indem aus einem Teil der Gelstücke das Protein in einem Electro-Eluter 422 der Firma BioRad eluiert wurde und die Proteinmenge in einer SDS-PAGE mit BSA bekannter Konzentration nach Coomassie-Färbung verglichen wurde. Die erhaltenen polyklonalen Antiseren wurden in Protein-Blot-Analysen getestet.

3 Ergebnisse

3.1 Isolierung von genomischen und cDNA-Klonen einiger Mitglieder der CMPG-Genfamilie und Bestimmung der Kopienzahl im Genom von *Arabidopsis thaliana*

Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus *Arabidopsis thaliana* erste Mitglieder einer zuvor nicht beschriebenen Genfamilie (Kap. 4.4) isoliert und charakterisiert.

Eine mit der Sequenz des Petersiliegens *PcEli17* durchgeführte Datenbankrecherche ergab, dass in *Arabidopsis* einige Gene mit einer deutlichen Sequenzähnlichkeit vorliegen. Die letzte Aktualisierung der Datenbankanalyse erfolgte im März 2001. Der Sequenzvergleich von *PcEli17* mit Sequenzen verschiedener Organismen zeigte, dass vor allem ein Bereich von 67 Aminosäuren eine große Ähnlichkeit zu vielen anderen Proteinsequenzen aufweist. Dieses Sequenzmotiv wurde nach den ersten vier strikt konservierten Aminosäuren Cystein (C), Methionin (M), Prolin (P) und Glycin (G) CMPG-Motiv genannt (Kirsch *et al.*, 2001). Eine Kolinearität konnte nur zu drei Sequenzen aus *Arabidopsis* gefunden werden. Abb. 3.1 zeigt einen Vergleich dieses 67 Aminosäuren umfassenden CMPG-Motivs von *PcEli17* mit den sechs ähnlichsten Sequenzen aus *Arabidopsis*. Ein Vergleich über die gesamte Proteinsequenz ist im Anhang 5 aufgeführt.

<i>PcEli17</i>	(30)	LPNHFRCPISLDLMKDPVTLSTGLTYDRHSIETWLEAGNKTCPTIKQMLST-LEPIPNHTIRKMIQDW
<i>AtCMPG1</i>	(33)	LPNQFQCPISYELMKDPVLIASGLTYDRENIEKWFESGYQTCPVNTVLTSL-LEQIPNHTIRRMIOGW
<i>AtCMPG2</i>	(10)	VPTFFRCPISLDVMKSPVSLCTGVTYDRASIQRWLDGNNTCPATMÖILQN-KDFIPNRTLQRLIEIW
<i>AtCMPG3</i>	(5)	LPNDFRCPISEIIMSDPVILQSCHTFDRVSIQQWLDSCNRTCPITKLPSETPYLIPNHALRSLILNF
<i>AtCMPG4</i>	(183)	LPVVFICPISLEPMQDPVTLCTGQTYERSNLIKWFNIGHCTCPITMÖELWD-DLVTIPNKTLHQLIYTW
<i>AtCMPG5</i>	(31)	LPPEFQCPISLDLMKDPVLIISGLTYDRVSIETWINSGNKTCPVNTVLTTF-FDQIPNHTIRKMIQGW
<i>AtCMPG6</i>	(247)	LPVDFLCPVSELELMKDPVIVATGQTYERAYIQRWLDGNNLTCPKIQÖKLEN-FTLTPNYVLRSLISRW

Abb. 3.1. Vergleich der CMPG-Domänen der Proteine *PcEli17* und *AtCMPG1* bis *AtCMPG6*

Dargestellt ist die 67 Aminosäuren umfassende CMPG-Domäne der Proteine *PcEli17* und *AtCMPG1* bis *AtCMPG6*. Die Aminosäuren C, M, P und G, nach denen die Genfamilie benannt wurde (Kirsch *et al.*, 2001), sind mit einem Stern (*) markiert. Erstellt wurde der Sequenzvergleich mit dem Programm Vector NTI 6.0. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Position der ersten dargestellten Aminosäure innerhalb der gesamten Proteinsequenz an. **Weiß auf schwarz:** In allen Sequenzen identische Aminosäuren; **dunkelgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen identische Aminosäuren; **hellgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen ähnliche Aminosäuren;

In der vorliegenden Arbeit erfolgte schwerpunktmäßig die Analyse des Gens *AtCMPG1*. Dieses Gen war zu Beginn der Arbeit das Gen mit der größten Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17*. Der Anteil identischer Aminosäuren dieser beiden Proteine liegt bei 45 %, der Anteil ähnlicher Aminosäuren bei 55 % (Tab. 3.1). Die Werte für die Gene *AtCMPG2* bis *AtCMPG6* sind in Tab. 3.1 aufgeführt.

Das mit *AtCMPG5* bezeichnete Gen weist über die gesamte Proteinsequenz eine etwas höhere Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* als *AtCMPG1* zu *PcEli17* auf (58 % ähnliche Aminosäuren im Vergleich zu 55 %). Die Sequenz von *AtCMPG5* wurde jedoch erst am 9. August 2000 unter der Accession-Nummer AB025630 in Datenbanken veröffentlicht, so dass eine ausführliche Bearbeitung dieses Gens im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr erfolgen konnte.

Tab. 3.1. Aminosäureidentität der Proteine *PcEli17* sowie *AtCMPG1* bis *AtCMPG6*

Dargestellt ist der prozentuale Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren zwischen den gesamten Proteinsequenzen von *PcEli17* und *AtCMPG1* bis *AtCMPG6*. Berechnet wurden die Werte mit dem Programm *Gap* (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA). (identische AS / ähnliche AS)

	<i>PcEli17</i>	<i>AtCMPG1</i>	<i>AtCMPG2</i>	<i>AtCMPG3</i>	<i>AtCMPG4</i>	<i>AtCMPG5</i>	<i>AtCMPG6</i>
<i>PcEli17</i>	100	45 / 55	30 / 42	29 / 40	30 / 40	45 / 58	28 / 39
<i>AtCMPG1</i>	45 / 55	100	30 / 41	29 / 41	26 / 36	58 / 64	26 / 37
<i>AtCMPG2</i>	30 / 42	30 / 41	100	26 / 35	30 / 41	27 / 36	29 / 38
<i>AtCMPG3</i>	29 / 40	29 / 41	26 / 35	100	26 / 34	27 / 40	34 / 44
<i>AtCMPG4</i>	30 / 40	26 / 36	30 / 41	26 / 34	100	24 / 34	26 / 35
<i>AtCMPG5</i>	45 / 58	58 / 64	27 / 36	27 / 40	24 / 34	100	26 / 39
<i>AtCMPG6</i>	28 / 39	26 / 37	29 / 38	34 / 44	26 / 35	26 / 39	100

AtCMPG1

Das später als *AtCMPG1* bezeichnete Gen war zu Beginn der vorliegenden Arbeit als eine EST-Sequenz mit einer Länge von 476 bp in Datenbanken veröffentlicht (Accession-Nr. T44966, 07.01.1998).

Die genomische Sequenz von *AtCMPG1* wurde nach Durchmusterung einer BAC-Bibliothek und Isolierung eines spezifischen Klon durch Sequenzierung erhalten. Vom Deutschen Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH wurde ein Filter mit 9216 BAC-Klonen (Filter-Nr.: 79-1-150) zur Verfügung gestellt (Mozo *et al.*, 1999). Die Hybridisierung dieses BAC-Filters mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde ergab im Autoradiogramm 16 Signale (in Abb. 3.2 mit einem Kreis markiert). Für die acht stärksten Signale sowie für zwei schwache Signale wurden BAC-Klone bestellt (Tab 3.2).

Von diesen 10 Klonen erwiesen sich in der PCR drei Klone (5, 11 und 15) als *AtCMPG1*-spezifisch. Subklone dieser drei BAC-Klone wurden mittels einer DNA-Blot-Analyse als *AtCMPG1*-spezifisch bestätigt, und mit Hilfe von Restriktionsanalysen wurden vier unabhängige Subklone identifiziert (Ergebnisse nicht in Abbildungen dargestellt). Durch die Sequenzierung dieser Subklone konnte eine 2962 bp lange genomische *AtCMPG1*-Sequenz ermittelt werden. Die Sequenz ist im Anhang 1 verzeichnet. Im Rahmen des *Arabidopsis*-Sequenzierprojektes wurde die Sequenz innerhalb eines 90 kb großen BAC-Klons unter der Accession-Nr. AC026480 am 30.10.2000 in Datenbanken veröffentlicht. Die publizierte Sequenz stimmt mit der Sequenz, die über die Sequenzierung der BAC-Subklone erhalten wurde, exakt überein.

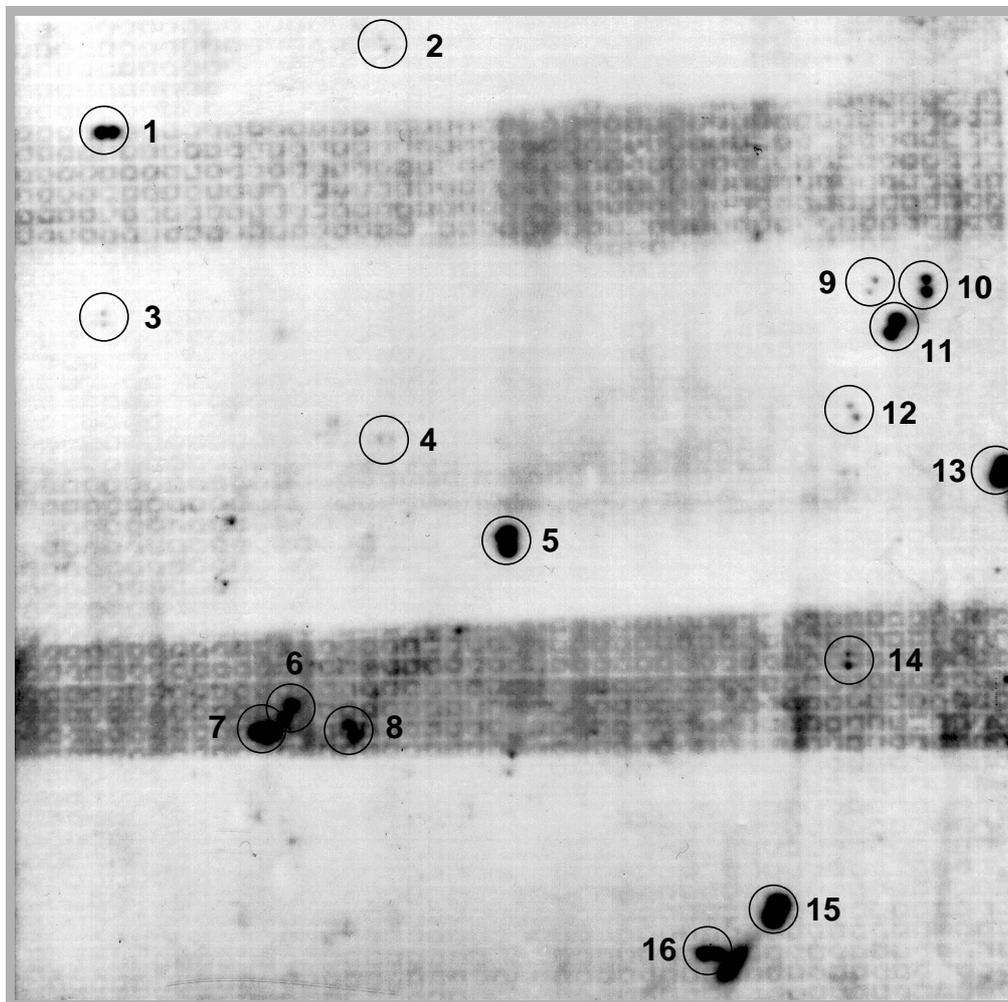


Abb. 3.2. BAC-Filter mit ca. 100 kb großen Insertionen aus *Arabidopsis thaliana*

Ein BAC-Filter (Nr.: 79-1-150, Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) wurde mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde des kodierenden Bereiches hybridisiert. BAC-Klone sind als Duplikate auf dem Filter gespottet, so dass jeweils zwei Signale in einer bestimmten Anordnung einem BAC-Klon zugeordnet werden können. Dargestellt ist das Autoradiogramm nach Hybridisierung mit der Sonde.

Tab. 3.2. BAC-Klone.

Aufgelistet sind die Namen der BAC-Klone, die aufgrund der in Abb. 3.2 dargestellten Filterhybridisierung bestellt wurden, deren Datenbankinträge und die Angabe, auf welchem Chromosom und *contig* die BAC-Klone lokalisiert sind (für weitere Informationen: <http://www.rzpd.de/cgi-bin/db/clonelInfo.pl.cgi>). Für die Signale 2, 3, 6, 9, 10 und 14 wurden keine Klone bestellt.

Signal-Nr	Name des bestellten Klons	Datenbank-eintrag	Chromosom/ <i>contig</i>	sequenzierte Subklone
1	IGF_B122K1910O3	F10K19	Chr. 5/ <i>contig</i> 6	/
2	/	/	/	/
3	/	/	/	/
4	IGF_B122L067Q3	F7L6	Chr. 1/ <i>contig</i> 3	/
5	IGF_B122G246Q3	F6G24	Chr. 1/ <i>contig</i> 4	/
6	/	/	/	/
7	IGF_B122N1211Q3	F11N12	Chr. 5/ <i>contig</i> 6	/
8	IGF_B122N0823Q3	F23N8	Chr. 3/ <i>contig</i> 4	/
9	/	/	/	/
10	/	/	/	/
11	IGF_B122A0614Q3	F14A6	Chr. 1/ <i>contig</i> 4	76
12	IGF_B122M0824Q3	F24M8	Chr. 3/ <i>contig</i> 4	/
13	IGF_B122I0118Q3	F18I1	Chr. 1/ <i>contig</i> 4	/
14	/	/	/	/
15	IGF_B122E1215Q3	F15E12	Chr. 1/ <i>contig</i> 4	14, 26, 57
16	IGF_B122C159Q3	F9C15	Chr. 5/ <i>contig</i> 6	/

Für die Untersuchung der Frage, ob es sich bei *AtCMPG1* um ein Einzelkopiegen handelt, wurden DNA-Blot-Analysen (Abb. 3.3) mit genomischer DNA von *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) mit sieben Restriktions-Endonukleasen durchgeführt. Für die Enzyme *EcoRI*, *Scal*, *XhoI*, *XbaI* und *NcoI* liegen keine Schnittstellen in der *AtCMPG1*-Sequenz vor. Für *HinDIII* und *BamHI* liegt jeweils eine Erkennungsstelle vor, so dass bei der nachfolgenden Hybridisierung demzufolge zwei Banden auftreten sollten. Als Sonde wurde der vollständige kodierende Bereich von *AtCMPG1* eingesetzt. Bei dem Verdau mit *BamHI* weist der kürzere mit der Sonde überlappende Bereich eine Länge von 140 bp auf. Dies sollte auch unter stringenten Hybridisierungsbedingungen für eine Bindung der Sonde ausreichen. Das Autoradiogramm zeigte jedoch in jeder Spur lediglich eine Bande. Eine mögliche Erklärung besteht darin, dass die entstandenen Fragmente eine sehr ähnliche Größe haben und demzufolge nur als ein Signal zu erkennen sind. Es könnte ebenfalls sein, dass das zweite Fragment sehr kurz war und nicht auf der Membran fixiert wurde. Bei dem Verdau mit *HinDIII* entstand ein Fragment mit einem Sondenüberlapp von nur 150 bp.

Diese Analysen machen es sehr wahrscheinlich, dass das Gen *AtCMPG1* im Genom von *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) als Einzelkopie vorliegt.

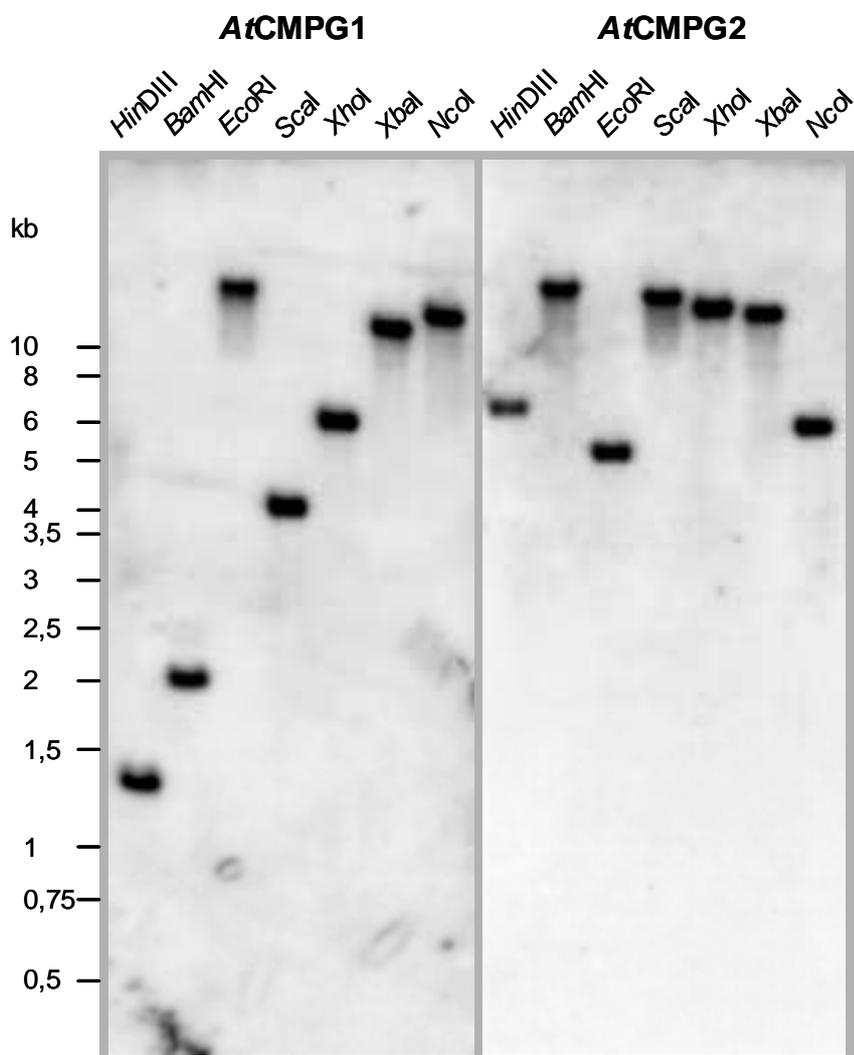


Abb. 3.3. DNA-Blot-Analyse von *AtCMPG1* und *AtCMPG2*

Es wurden 10 µg genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp Col-0) mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen verdaut, im Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Derselbe DNA-Blot wurde nacheinander mit *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonden hybridisiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach den entsprechenden Hybridisierungen.

AtCMPG2

Das Gen *AtCMPG2* ist Teil eines 82 kb großen BAC-Klons, dessen Sequenz unter der Accession-Nr. AB010076 am 08.01.1998 in Datenbanken veröffentlicht wurde.

Die genomische DNA-Blot-Analyse (Abb. 3.3) wurde analog zu *AtCMPG1* durchgeführt. Für die Enzyme *Bam*HI, *Scal*, *Xho*I, *Xba*I und *Nco*I liegen keine Schnittstellen in der *AtCMPG2*-Sequenz vor. Für *Eco*RI lag eine und für *Hin*DIII lagen zwei Erkennungsstellen vor. Bei dem Verdau mit *Eco*RI und nachfolgender Hybridisierung können demzufolge zwei Banden, bei *Hin*DIII sogar drei Banden auftreten. Im Falle von *Hin*DIII müsste eine Bande mit der Größe von 170 bp auftreten (Abstand zwischen den beiden Schnittstellen in der *AtCMPG2*-Sequenz). Im Autoradiogramm ist jedoch in jeder Spur lediglich eine Bande zu erkennen. Wie bereits für *AtCMPG1* angeführt, kann es sein, dass bei der Elektrophorese die sehr kurzen Fragmente aus dem Gel gelaufen waren und somit nicht auf die Membran übertragen wurden.

Es lässt sich also schlussfolgern, dass das Gen *AtCMPG2* ebenso wie *AtCMPG1* im Genom von *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) als Einzelkopiegen vorliegt. Die genomische Sequenz ist im Anhang 3 verzeichnet.

AtCMPG3, AtCMPG4, AtCMPG5 und AtCMPG6

Die Gene *AtCMPG3* und *AtCMPG4* wurden aufgrund ihrer schwächeren Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* mit geringerer Priorität experimentell untersucht. Die Gene *AtCMPG5* und *AtCMPG6* sind erst später in Datenbanken erschienen, so dass eine parallele Bearbeitung von Beginn an nicht möglich war. Die Genstrukturen und die Datenbankeinträge sind in Tab. 3.3 aufgelistet. Die DNA-Blot-Analysen wurden nur für *AtCMPG3* und *AtCMPG5* durchgeführt und zeigten, dass beide Gene als Einzelkopiegene im Genom vorliegen (Ergebnisse für diese vier Gene sind nicht mit Abbildungen dargestellt, sondern werden nur an entsprechenden Stellen erwähnt).

Tab. 3.3. Länge der kodierenden und untranslatierten Regionen der Gene *PcEli17* sowie *AtCMPG1* bis *AtCMPG6*

Die untranslatierten Regionen wurden mittels 5'- und 3'-RACE bestimmt. Die Experimente bezüglich *PcEli17* wurden von E. Logemann und C. Kirsch durchgeführt. n.b. = nicht bestimmt

Gen	Accession-Nr in Datenbanken	5'-UTR [bp]	kodierender Bereich [bp]	Intron [bp]	3'-UTR [bp]
<i>PcEli17</i>	AF274564	149	1326	—	40
<i>AtCMPG1</i>	AC026480	117	1293	—	105
<i>AtCMPG2</i>	AB010076	94	1260	—	188
<i>AtCMPG3</i>	AL031187	n.b.	1122	—	n.b.
<i>AtCMPG4</i>	AL021684	n.b.	1026	—	n.b.
<i>AtCMPG5</i>	AB025630	n.b.	1305	—	n.b.
<i>AtCMPG6</i>	AF000657	n.b.	1854	74+177	n.b.

Längenbestimmung der untranslatierten Regionen der Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2*

Bei der Charakterisierung von Genen ist es von generellem Interesse, die Länge der untranslatierten Regionen (5'-UTR bzw. 3'-UTR) zu kennen. Notwendig war dieses Kenntnis darüber hinaus für die Klonierung von *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionskonstrukten. Für diese wurden die kodierenden Regionen mitsamt den untranslatierten Regionen mit dem 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus fusioniert. Des Weiteren ist es auch für die Analyse der Promotoren erforderlich, den Transkriptionsstart zu bestimmen, um eindeutig zwischen Promotor und 5'-UTR differenzieren zu können. Die Längenbestimmung der UTR erfolgte mittels 5'- und 3'-RACE für die Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2* (Schaefer, 1995). Die 5'-RACE ergab für *AtCMPG1* in der 1. PCR Fragmente mit einer Länge von ca. 250 bis 500 bp. Die Sequenzierung der klonierten RACE-Produkte führte dann zu einer Länge des 5'-UTR von 117 bp. Die 3'-RACE ergab für *AtCMPG1* eine Länge des 3'-UTR von 105 bp.

Für *AtCMPG2* wurde eine Länge des 5'-UTR von 94 bp und eine Länge des 3'-UTR von 188 bp bestimmt.

In Abb. 3.4 ist eines der Gele stellvertretend für alle durchgeführten 5'-RACE dargestellt. Weitere Gele und die Ergebnisse der 3'-RACE sind nicht dargestellt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der 5'- und 3'-RACE ist in Tab. 3.3 enthalten. Der Vergleich mit dem Petersiliegen *PcEli17* verdeutlicht den sehr ähnlichen Aufbau der Gene. Die kodierenden Bereiche weisen zwischen den sequenzähnlichsten Genen *PcEli17*, *AtCMPG1*, *AtCMPG2* und *AtCMPG5* eine nur gering abweichende Länge auf (1260 bis 1326 bp), alle sind intronlos, und auch die Längen der UTR variieren nur wenig (40 bis 188 bp).

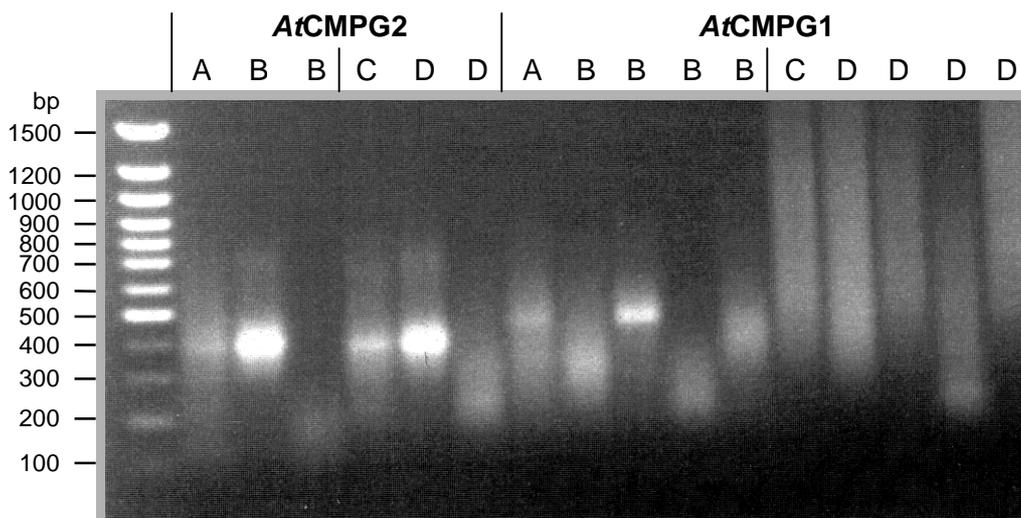


Abb. 3.4. Längenbestimmung der 5'-untranslatierten Bereiche von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* mittels 5'-RACE

Dargestellt ist ein Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung der RACE-PCR-Ansätze. Circa 100 ng DNase-behandelte mRNA wurden mit einem genspezifischen Primer revers transkribiert, mit dATP 3'-verlängert und 1/5 des Ansatzes als Matrize für die 1. PCR eingesetzt. **A:** Aus der 1. PCR wurde nach der Amplifikation 1/500 unaufgereinigt für eine Re-Amplifikation mit den gleichen Primern wie in der 1. PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. **B:** Im Unterschied zu A wurden die in der 1. PCR entstandenen Banden aus dem Gel eluiert und jeweils 1/50 des Eluats für eine Re-Amplifikation analog zu A eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei bzw. vier parallel angesetzten Reaktionen mit Eluaten jeweils verschiedener Banden aus der 1. PCR. **C:** Aus der 1. PCR wurde nach der Amplifikation 1/500 unaufgereinigt für eine 2. PCR mit *nested primern* eingesetzt. **D:** Geleluirierte DNA-Fragmente aus der 1. PCR wurden für eine 2. PCR mit *nested primern* eingesetzt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei bzw. vier parallel angesetzten Reaktionen mit Eluaten jeweils verschiedener Banden aus der 1. PCR.

3.1.1 Herstellung genspezifischer Sonden und Überprüfung ihrer Spezifität

Als genspezifische Sonden für die Gene *AtCMPG2* und *AtCMPG3* wurden cDNA-Fragmente, für *AtCMPG1*, *AtCMPG5* und *AtCMPG6* 240 bis 321 bp lange PCR-Fragmente aus den kodierenden Bereichen benutzt (Tab. 3.4). Eine Amplifikation eines *AtCMPG4*-spezifischen DNA-Fragmentes aus dem kodierenden Bereich gelang nicht. In zwei unabhängigen PCR-Ansätzen wurde ein DNA-Fragment amplifiziert, das eine starke Sequenzähnlichkeit zu einem chloroplastidären Gen aufweist. Auf eine erneute Wiederholung mit neu ausgewählten Primern wurde verzichtet. Über eine beidseitige Ansequenzierung der eingesetzten Sonden wurde sicher gestellt, dass in der PCR das gewünschte Fragment amplifiziert wurde und keine nennenswerten Nebenprodukte entstanden waren.

Tab. 3.4. Größe der für Hybridisierungen eingesetzten DNA-Fragmente

Größe der PCR-Fragmente in bp von *AtCMPG1*, *AtCMPG2*, *AtCMPG3*, *AtCMPG5* und *AtCMPG6*, die als Sonden für DNA-/RNA-Blot-Analysen eingesetzt wurden. Die in der dritten Spalte angegebenen Primer sind in Kap. 2.3 mit der Sequenz aufgeführt. Alle PCR-Produkte wurden an- bzw. durchsequenziert.

	Größe der DNA-Fragmente [bp]	in der PCR eingesetzte Primer
<i>AtCMPG1</i>	321	ah27 / ah22
<i>AtCMPG2</i>	1137	ah23 / ah24
<i>AtCMPG3</i>	1106	ah28 / ah29
<i>AtCMPG5</i>	243	ah113 / ah114
<i>AtCMPG6</i>	267	MK31 / MK32

Bei Hybridisierungsexperimenten mit Mitgliedern von Genfamilien besteht die generelle Gefahr einer Kreuzhybridisierung zwischen der eingesetzten Sonde und den auf einer Membran immobilisierten sequenzähnlichen Nukleinsäuren. Ein Sequenzvergleich des als Sonde eingesetzten DNA-Fragmentes mit den cDNAs anderer bekannter Mitglieder der CMPG-Genfamilie in *Arabidopsis* ergab, dass die Sequenzidentität maximal 75,5 % beträgt (Tab. 3.5). Dies reicht unter stringenten Hybridisierungsbedingungen nicht für eine Bindung aus. Erstellt wurden die Sequenzvergleiche mit dem Programm *BestFit* (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA). Dem Programm liegt der Homologie-Algorithmus von Smith and Waterman zu Grunde. Dieser inseriert Lücken in die zu vergleichenden Sequenzen, die eine sehr unterschiedliche Länge aufweisen können. Auf diese Weise werden auch homologe Bereiche von geringer Länge erkannt. Die *gap creation penalty* wurde so gewählt, dass der homologe Bereich der beiden zu vergleichenden Sequenzen eine Mindestlänge von 50 bp aufweist. Der Sequenzvergleich über die gesamte kodierende Sequenz (Tab. 3.1) wurde hingegen mit dem Programm *Gap* (GCG-Softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA) erstellt. Diesem Programm liegt der Algorithmus von Needleman und Wunsch zu Grunde, der die Anzahl an Lücken minimiert und die Länge der homologen Bereiche maximiert.

Experimentell wurde eine ausbleibende Kreuzhybridisierung durch einen Dot-Blot unterstützt. Hierfür wurden 10 pg bis 10 ng cDNA-Fragment der Gene *AtCMPG1*, *AtCMPG2* und *AtCMPG3* auf einer Membran fixiert. Für *AtCMPG5* stand lediglich ein 243 bp langes Fragment aus dem kodierenden Bereich zur Verfügung. Dieser Blot wurde mit den in Tab. 3.4 beschriebenen Sonden unter den gleichen stringenten Bedingungen, wie sie auch für andere DNA-/RNA-Blot-Analysen gewählt wurden, hybridisiert. Eine Kreuzhybridisierung wurde nicht beobachtet (Abb. 3.5). Das Signal aus der Hybridisierung von 1 ng *AtCMPG2*-

cDNA mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde ist höchstwahrscheinlich auf eine Kontamination mit *AtCMPG1*-cDNA bei der Herstellung des Blots zurückzuführen. Weder mit 5 ng noch mit 10 ng *AtCMPG2*-cDNA wurden Signale bei der Hybridisierung mit der *AtCMPG1*-spezifischen Sonde erzielt.

Die Möglichkeit, dass die beschriebenen *AtCMPG1*- bis *AtCMPG6*-spezifischen Sonden andere Mitglieder dieser Genfamilie detektierten, kann als sehr gering angesehen werden. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* ist nahezu 100 % sequenziert und in Datenbanken publiziert. In einer ausführlichen Datenbankanalyse wurden keine Gene gefunden, die eine größere Sequenzähnlichkeit zu *AtCMPG1* und *AtCMPG2* haben als die in diesem Experiment getesteten Gene.

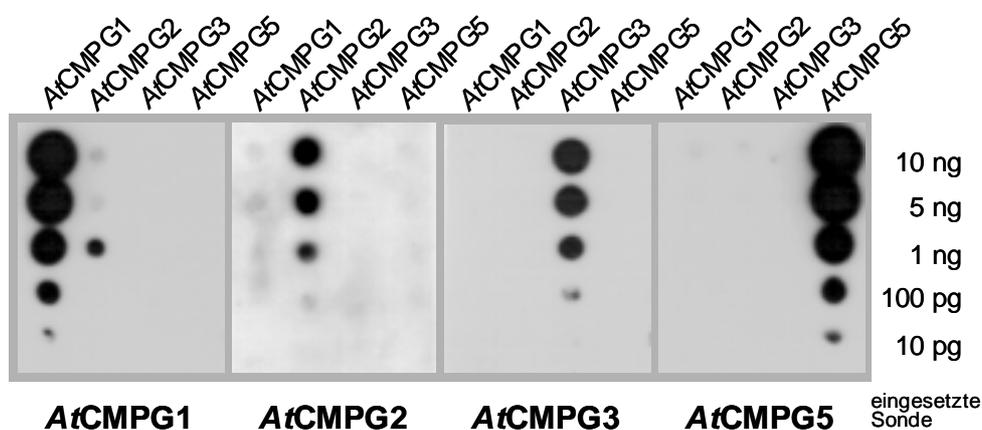


Abb. 3.5. Überprüfung der Kreuzhybridisierung der Sonden *AtCMPG1*, *AtCMPG2*, *AtCMPG3* und *AtCMPG5*

Dot-Blots mit 10 pg bis 10 ng cDNA-Fragment der Gene *AtCMPG1*, *AtCMPG2* und *AtCMPG3* sowie mit einem 243 bp langen *AtCMPG5*-Fragment des kodierenden Bereiches wurden mit *AtCMPG1*-, *AtCMPG3*- und *AtCMPG5*-spezifischen Sonden hybridisiert. Die Dot-Blots wurden parallel angefertigt und hybridisiert, wohingegen der mit einer *AtCMPG2*-spezifischen Sonde hybridisierte Dot-Blot derselbe Blot ist, der zuvor mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde.

Dot-Blots mit 10 pg bis 10 ng cDNA-Fragment der Gene *AtCMPG1*, *AtCMPG2* und *AtCMPG3* sowie mit einem 243 bp langen *AtCMPG5*-Fragment des kodierenden Bereiches wurden mit *AtCMPG1*-, *AtCMPG3*- und *AtCMPG5*-spezifischen Sonden hybridisiert. Die Dot-Blots wurden parallel angefertigt und hybridisiert, wohingegen der mit einer *AtCMPG2*-spezifischen Sonde hybridisierte Dot-Blot derselbe Blot ist, der zuvor mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde hybridisiert wurde.

Tab. 3.5. Sequenzähnlichkeit zwischen den als Hybridisierungssonden eingesetzten DNA-Fragmenten in Prozent

Berechnet wurden die Werte mit dem Programm *BestFit* (GCG-softwarepaket Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc., USA).

	AtCMPG1	AtCMPG2	AtCMPG3	AtCMPG5	AtCMPG6
AtCMPG1	100	65,3	62,7	66,7	64,3
AtCMPG2	65,3	100	62,1	73,7	58,9
AtCMPG3	62,7	62,1	100	73,6	59,3
AtCMPG5	66,7	73,7	73,6	100	75,5
AtCMPG6	64,3	58,9	59,3	75,5	100

3.2 Expressionsstudien

Expressionsstudien ermöglichen eine Aussage, ob und auf welchem Expressionsniveau Gene transkribiert werden. Untersucht wurde die Expression in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis*, die Expression nach Elizitorzugabe zu einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur und die Expression in Blättern von *Arabidopsis* nach Infiltration von virulenten und avirulenten Pseudomonaden. Dargestellt sind die Ergebnisse der Hybridisierungen mit AtCMPG1- und AtCMPG2-spezifischen Sonden. Experimente bezüglich der Expression weiterer Mitglieder der CMPG-Genfamilie in *Arabidopsis* wurden nur teilweise durchgeführt und sind in den folgenden Kapiteln nicht mit Abbildungen dargestellt.

3.2.1 Organspezifische Expression

Die Gene AtCMPG1 und AtCMPG2 waren in den verschiedenen Pflanzenorganen sehr ähnlich exprimiert. Für sämtliche Expressionsanalysen wurde *Arabidopsis* Ökotyp Col-0 verwendet. In Wurzeln von ca. vier Wochen alten, in unsteriler Erde gewachsenen Pflanzen lag für beide Gene die stärkste beobachtete Expression vor (Abb. 3.6 A). Für AtCMPG1 war jedoch in Wurzeln von in sterilen Flüssigkulturen gewachsenen Pflanzen mittels RNA-Blot-Analysen keine Expression dieses Gens nachweisbar (Abb. 3.6 B).

Ebenfalls sehr stark exprimiert waren die Gene AtCMPG1 und AtCMPG2 in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur (Ökotyp Col-0, Linie AT7). Dieses wird durch die mRNA-Akkumulationskinetik dieser Gene in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur nach Zugabe von Elizitor bestätigt, wo auch in der Kontrolle eine Genaktivität festzustellen war (Abb. 3.7).

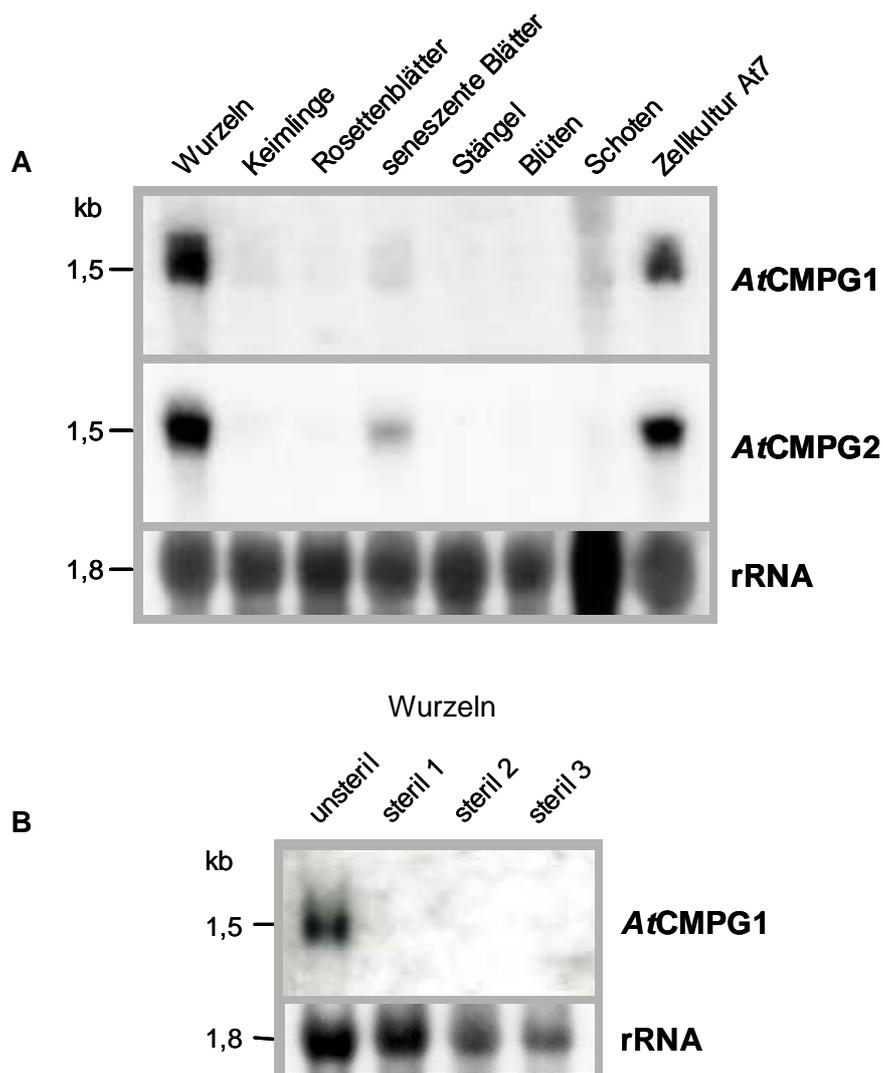


Abb. 3.6. Organspezifische Expression der Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2*

Es wurden 15 μg (A) bzw. 10 μg (B) Gesamt-RNA der angegebenen Organe im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonden hybridisiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach den entsprechenden Hybridisierungen. **A:** Pflanzenmaterial von 2 (Keimlinge), 6 (Wurzeln, Rosettenblätter, Stängel und Blüten) bzw. 10 Wochen alten (Schoten und seneszenz Blätter) Pflanzen; **B:** Wurzeln von 6 Wochen in Erde gewachsenen Pflanzen (unsteril) bzw. von drei getrennten in MS-Medium (30 Tage Schwachlicht) gewachsenen Sterilkulturen (steril 1 bis 3).

In 14 Tage alten Keimlingen, die auf MS-Medium unter Langtagbedingungen steril angezogen wurden, konnte keine Expression der Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2* festgestellt werden. In adulten Pflanzen (5 bis 7 Wochen unter Langtagbedingungen in Erde gewachsen) war in Rosettenblättern, Stengeln, Blüten und Schoten ebenfalls keine Expression dieser Gene nachzuweisen (Abb. 3.6 A).

Das Petersiliegen *PcEli17* ist wie *AtCMPG1* und *AtCMPG2* vor allem in Wurzeln exprimiert. Im Unterschied zu *AtCMPG1* wurde eine Expression von *PcEli17* jedoch auch in steril angezogenen Wurzeln beobachtet (Kirsch *et al.*, 2001).

3.2.2 Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur nach Zugabe von Elizitor

Kultivierte *Arabidopsis*-Zellen wurden zu den in Abb. 3.7 angegebenen Zeitpunkten nach Zugabe von Pmg-Rohelizitor geerntet und aus den Zellen Gesamt-RNA isoliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen sowie Ansätze, denen eine entsprechende Menge destillierten Wassers zugegeben wurde. Die mRNA-Akkumulation wurde in RNA-Blot-Analysen detektiert. Sowohl für *AtCMPG1* wie auch für *AtCMPG2* wurde eine starke Induktion der Genexpression festgestellt. Die mRNA-Mengen von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* stiegen 10 Minuten nach Zugabe des Elizitors deutlich an und erreichten für beide Gene ein Maximum nach 30 Minuten (Abb. 3.7 A und B). Die Genexpression verlief sehr transient. Bereits zwei Stunden nach Zugabe des Elizitors lag das Expressionsniveau nahezu auf dem Basisniveau. Die Quantifizierung der Blots nach den jeweiligen Hybridisierungen mit einem PhosphorImager ergab Induktionswerte von 12,5 für *AtCMPG1* und 7,5 für *AtCMPG2*. Diese Werte wurden korrigiert um die Ladungsunterschiede von Spur zu Spur. Für die Bestimmung der Ladungsdifferenz wurde der Blot mit genomischer DNA hybridisiert, quantifiziert und die Ergebnisse aus den Hybridisierungen mit *AtCMPG1* und *AtCMPG2* mit den Ladungsausgleichswerten korrigiert.

Nach dem Anstieg der mRNA-Menge von 5 zu 10 Minuten sank die mRNA-Menge wieder leicht ab (15 min nach Elizitorzugabe), um dann erneut anzusteigen. Dieser schwach ausgeprägt biphasische Verlauf war sowohl bei *AtCMPG1* als auch bei *AtCMPG2* festzustellen und trat bei *AtCMPG2* auch deutlich in der *Arabidopsis*-Pseudomonaden-Interaktion auf (Abb. 3.8). In der Zellkultur-Elizitor-Kinetik war der Effekt jedoch zu gering, um leichte Ladungsunterschiede bzw. Hybridisierungsfehler eindeutig ausschließen zu können.

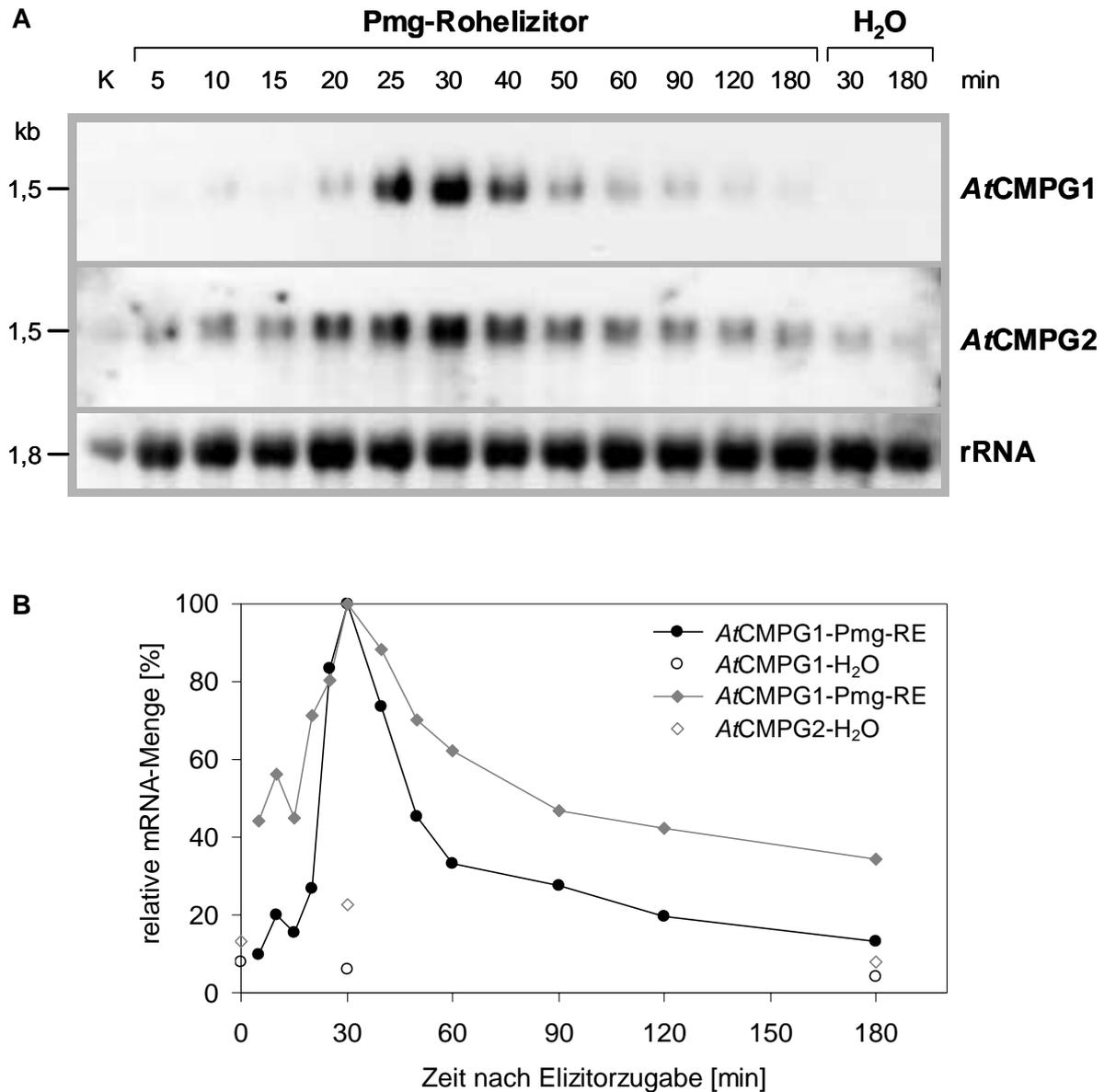


Abb. 3.7. Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur nach Zugabe von Elizitor

Eine *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur (Ökotyp Col-0, Linie AT7) wurde mit Pmg-Rohelizitor (Pmg-RE, Endkonzentration: 50 µg/ml) bzw. H₂O_{dest} als Kontrolle inokuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch Abnutschen geerntet. Aus den Zellen wurde Gesamt-RNA isoliert und je 10 µg im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und nacheinander mit einer *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonde hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurde der RNA-Blot mit genomischer DNA hybridisiert. **A:** Dargestellt sind die Autoradiogramme nach den jeweiligen Hybridisierungen. **B:** Quantitative Auswertung der in RNA-Blot-Analysen erhaltenen Signale mit einem PhosphorImager. Die Zahlenwerte der Signale aus den Hybridisierungen mit den CMPG-Sonden wurden gegen die Signalintensitäten einer Hybridisierung mit genomischer DNA zur Bestimmung der Menge aufgetragener Gesamt-RNA abgeglichen.

3.2.3 Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in der Pflanze nach Infiltration von *Pseudomonaden*

Der gesamte oberirdische Bereich von *Arabidopsis*-Pflanzen (Ökotyp Col-0), die sechs Wochen im Kurztag gewachsen waren, wurde mit einer *Pseudomonaden*-Suspension infiltriert. Eingesetzt wurde der Stamm *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (Pst DC3000) und der das Avirulenzgen *Rpm1* exprimierende Stamm *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 (*avrRpm1*) (PstDC3000 (*avrRpm1*)) mit einem Titer von 10^8 *Pseudomonaden*/ml 10 mM $MgCl_2$. Pro Zeitpunkt und Interaktionstyp wurden jeweils vier Pflanzen vakuum-infiltriert. Die Kontrollen wurden mit 10 mM $MgCl_2$ infiltriert, die Nullprobe blieb jedoch unbehandelt.

Sowohl *AtCMPG1* als auch *AtCMPG2* wurden transkriptionell durch *Pseudomonaden* stark aktiviert (Abb. 3.8). *AtCMPG1* erreichte die maximale mRNA-Menge zwischen 30 und 60 Minuten nach Infiltration der Bakterien, wobei in der inkompatiblen Interaktion das Expressionslevel etwas früher sank als in der kompatiblen Interaktion. So lag nach 1,5 Stunden in der inkompatiblen Interaktion nur noch 35 % der maximalen mRNA-Menge vor, wohingegen in der kompatiblen Interaktion noch 63 % vorliegen (Abb. 3.9 A und C). Im weiteren zeitlichen Verlauf sank die mRNA-Menge in der kompatiblen Interaktion auf einen Wert von 3 bis 8 %. In der inkompatiblen Interaktion lag ein schwach biphasischer Verlauf vor. Das Minimum war nach fünf Stunden erreicht (12 %) und stieg bis auf 21 % nach 24 Stunden an.

Die Expression von *AtCMPG2* war in beiden Interaktionen biphasisch. Wesentlich deutlicher ausgeprägt war dies in der inkompatiblen Interaktion (Abb. 3.9 B und C). Von 24 % nach 2 Stunden stieg die mRNA-Menge innerhalb der folgenden drei Stunden auf 67 % der Maximalmenge an. Die mRNA-Maxima lagen ebenso wie bei *AtCMPG1* zwischen 30 und 60 Minuten nach Infiltration von *Pseudomonaden*. Die stärkste Genexpression fand demzufolge in der ersten Stunde nach Infiltration mit *Pseudomonaden* statt.

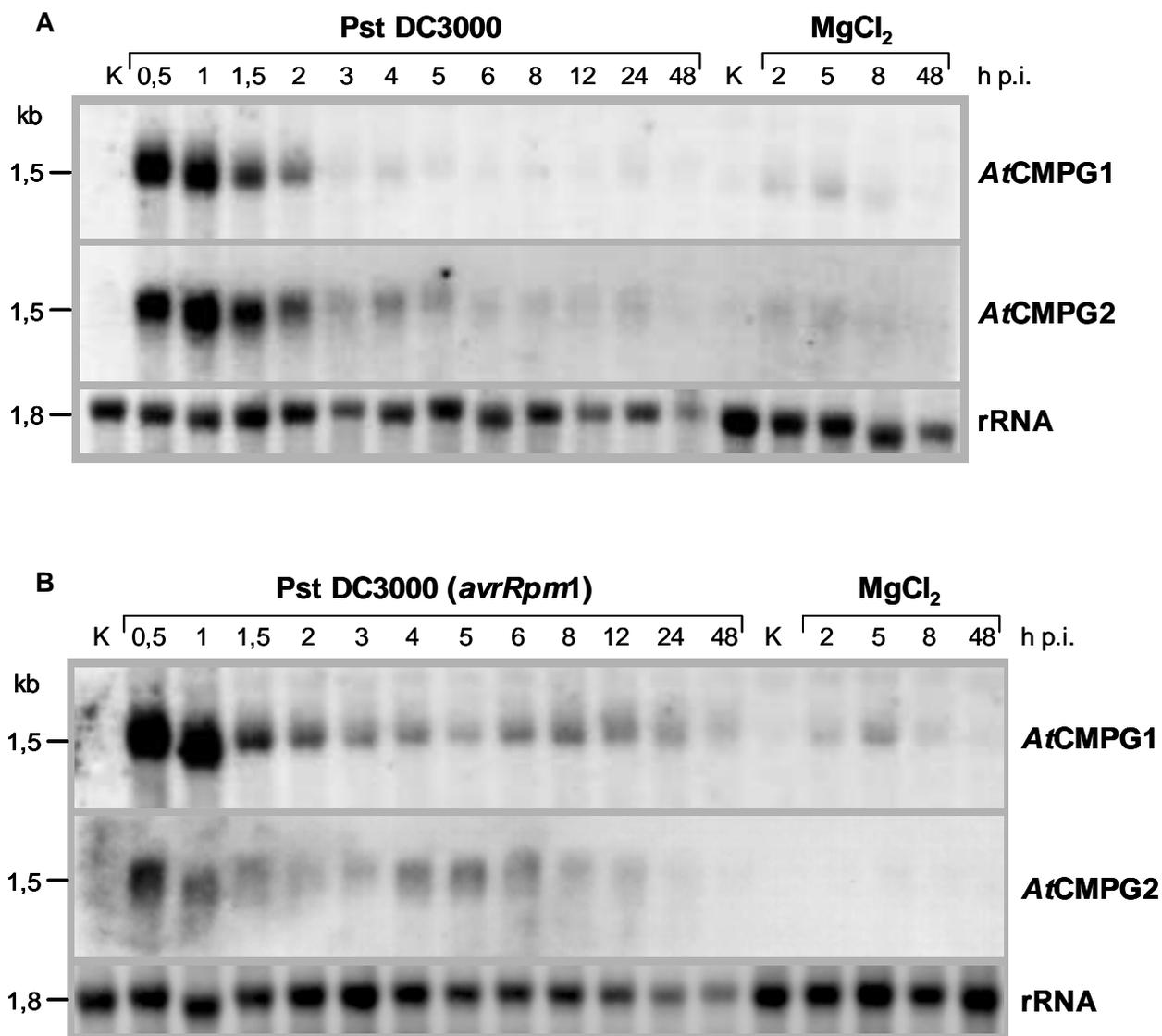


Abb. 3.8. Langzeitkinetik der Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in *Arabidopsis*-Blättern nach Infiltration von Pseudomonaden

Blätter von *Arabidopsis* wurden in **A** mit einer Suspension von Pst DC3000 (kompatible Interaktion), in **B** mit einer Suspension von Pst DC3000 (*avrRpm1*) (inkompatible Interaktion) mit jeweils einem Titer von 1×10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$ vakuum-infiltriert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infiltration wurden die Blätter abgeschnitten und Gesamt-RNA isoliert. Je 10 μ g Gesamt-RNA wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonden hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurden die RNA-Blots mit genomischer DNA hybridisiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme dieser Hybridisierungen. K: Kontrolle; h p.i.: hours post infiltration;

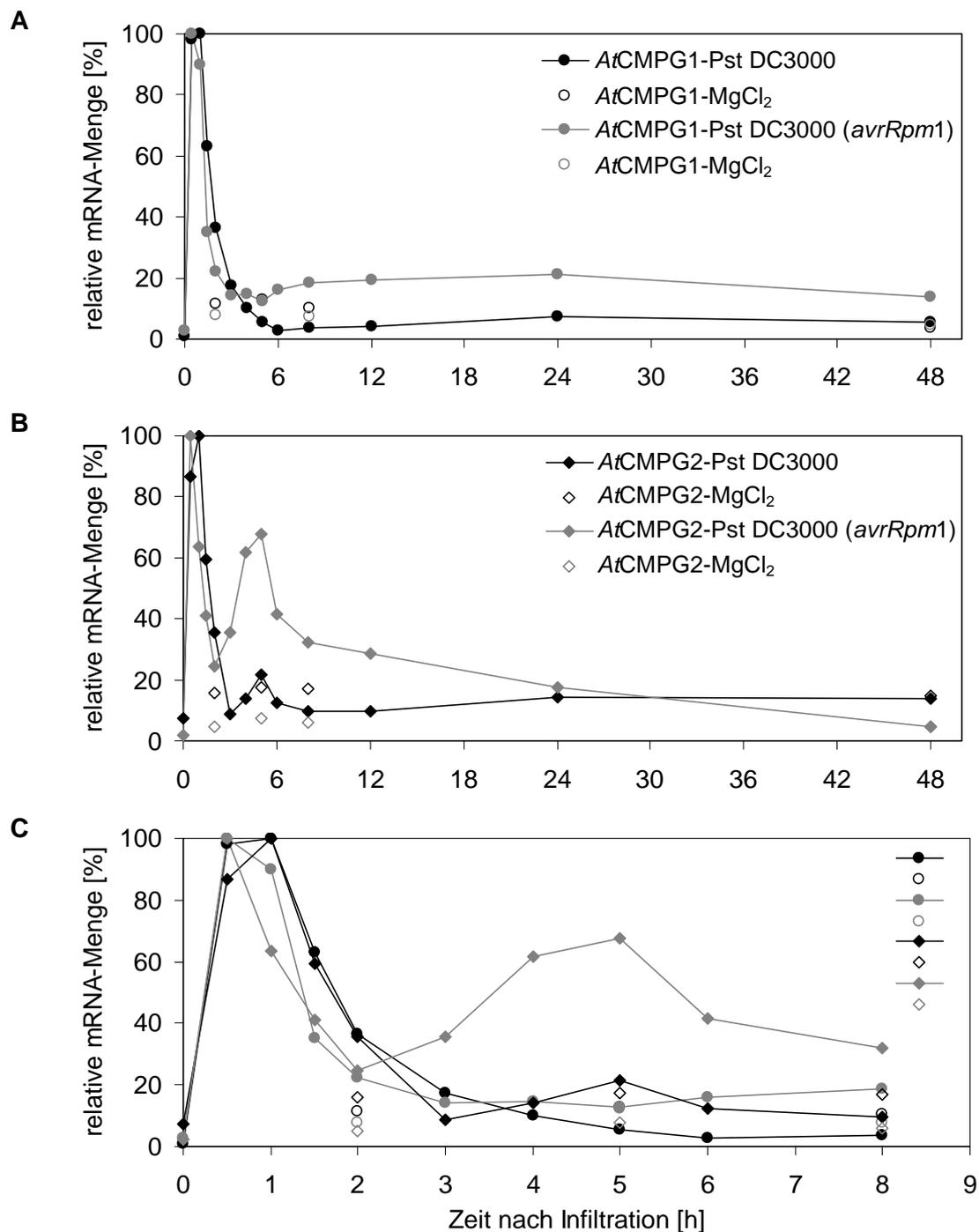


Abb. 3.9. Quantifizierung der Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in Blättern nach Infiltration von *Pseudomonaden*

A, B: Die in vorangegangener Abbildung dargestellten Signale wurden mit einem PhosphorImager quantifiziert. Die Zahlenwerte der Signale aus den Hybridisierungen mit einer *AtCMPG1*-spezifischen (**A**) bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonde (**B**) wurden gegen die Signalintensitäten einer Hybridisierung mit genomischer DNA zur Bestimmung der Menge aufgetragener Gesamt-RNA abgeglichen. **C:** Ausschnittvergrößerung des Bereiches von 0 bis 9 Stunden und Zusammenfassung beider Interaktionen. Die Symbole entsprechen den in Teil A und B beschriebenen Symbolen.

Um den Verlauf der Genexpression nach einer Infiltration von *Arabidopsis*-Blättern mit Pseudomonaden innerhalb der ersten Stunde genauer zu charakterisieren, wurde eine weitere Kinetik mit kürzeren Zeitpunkten angefertigt. Im Unterschied zu der Langzeitkinetik wurden jetzt Blätter von mindestens drei *Arabidopsis*-Pflanzen mittels einer 1ml-Spritze mit Pseudomonaden so infiltriert, dass immer ein Blatt komplett infiltriert wurde. Es wurden die gleichen Bakterienstämme wie in der Langzeitkinetik eingesetzt, jedoch ein Titer von 1×10^6 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$ als auch von 1×10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$ (Abb. 3.10 A und B).

Die Genexpression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* wurde innerhalb einer Stunde nach Infiltration einer Pseudomonaden-Suspension mit einem Titer von 1×10^6 cfu/ml $MgCl_2$ im Vergleich zur Infiltration einer $MgCl_2$ -Lösung kaum induziert (Abb. 3.10 B). Für *AtCMPG1* lagen die mRNA-Mengen in der kompatiblen Interaktion leicht über denen der $MgCl_2$ -Kontrollen, in der inkompatiblen Interaktion sogar leicht unter den Werten der entsprechenden Kontrollen. Für alle drei Behandlungen war jedoch ein starker Anstieg der *AtCMPG1*-Expression gegenüber der unbehandelten Pflanze festzustellen. Die Ursache hierfür kann in der Handinfiltration liegen. Der Druck, der lokal begrenzt auf die Blätter ausgeübt wurde, konnte eine Wundreaktion und darauf folgend eine Expression wund-induzierter Gene zur Folge haben. Die Expression von *AtCMPG2* wurde in beiden Interaktionen stärker als in der $MgCl_2$ -Kontrolle induziert. Die Induzierbarkeit war jedoch um ein Vielfaches geringer als in der Pseudomonaden-Langzeitkinetik.

Die Unterschiede zwischen den bakteriellen Infiltrationen und den Kontrollen waren für beide Gene bei einem eingesetzten Titer von 1×10^8 cfu/ml $MgCl_2$ deutlich größer als bei einem Titer von 1×10^6 cfu/ml. Beide Gene wurden in den ersten 10 Minuten gleich stark durch die $MgCl_2$ -Infiltration wie durch die Infiltration von Pseudomonaden induziert. Ab 20 Minuten nach Infiltration lagen die mRNA-Mengen in bakterieninfiltrierten Blättern jedoch deutlich über denen der Kontrollen.

Die Expression von *AtCMPG1* unterschied sich zwischen den beiden Interaktionen kaum. Die Expression von *AtCMPG2* blieb in der inkompatiblen Interaktion länger auf einem hohen Niveau. Geringe Unterschiede in der Expression können aber auch auf eine variierende Stärke der Wundreaktion zurückzuführen sein. Einige Blätter ließen sich deutlich schlechter als andere mit der Spritze infiltrieren.

Insgesamt konnte mit dieser Kurzzeitkinetik die Aussage der Langzeitkinetik, dass sowohl *AtCMPG1* als auch *AtCMPG2* durch Pseudomonaden induzierbar sind, bestätigt werden. Darüber hinaus wurde durch die Kurzzeitkinetik gezeigt, dass nicht nur Elizitor und Pseudomonaden, sondern auch eine Verwundung oder Druckbelastung durch Flüssigkeitsinfiltration eine mRNA-Akkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2*, wenn auch in geringerem Maße, verursacht.

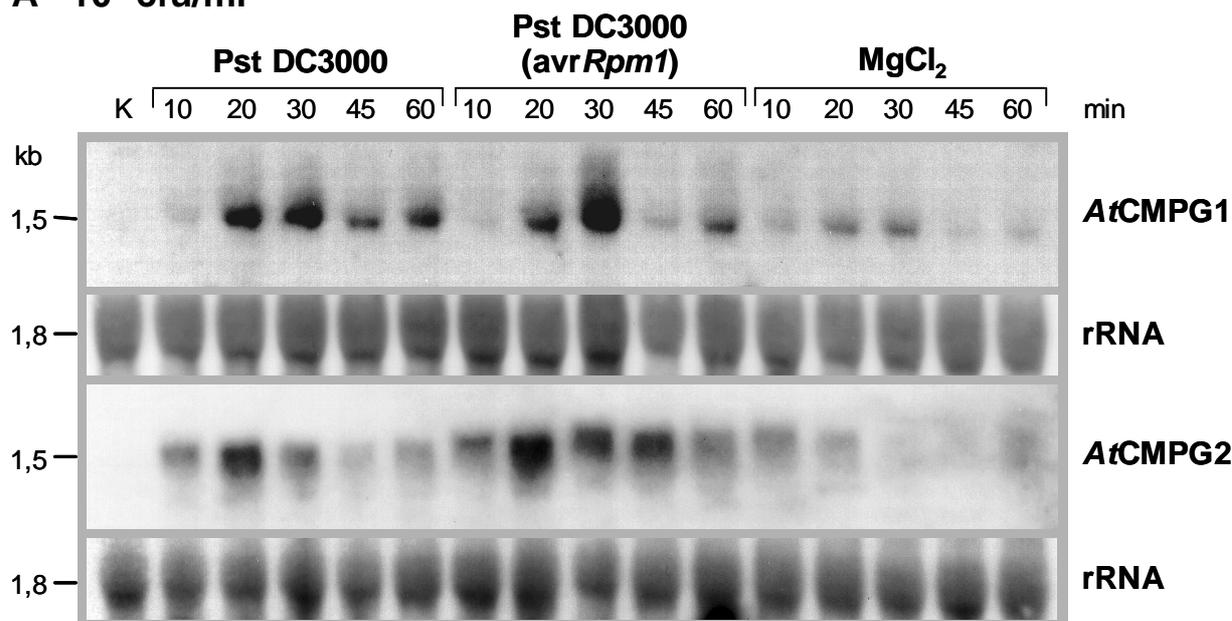
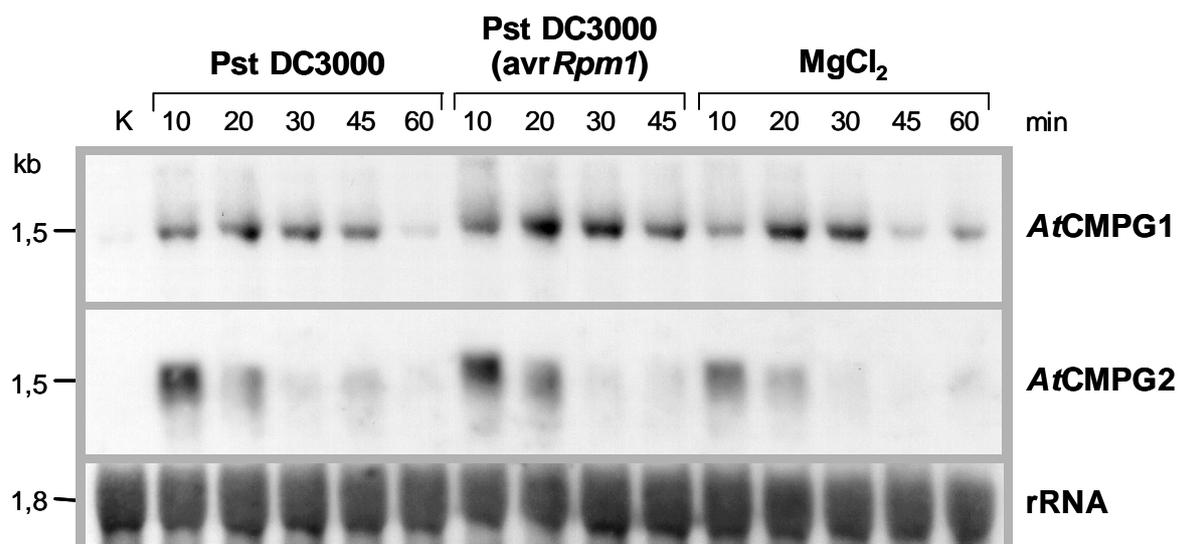
A 10^8 cfu/ml**B** 10^6 cfu/ml

Abb. 3.10. Kurzzeitkinetik der Transkriptakkumulation von AtCMPG1 und AtCMPG2 in Arabidopsis-Blättern nach Infiltration von Pseudomonaden

A: Infiltration von Pst DC3000 (kompatible Interaktion) bzw. Pst DC3000 (*avrRpm1*) (inkompatible Interaktion) mit einem Titer von jeweils 1×10^8 cfu/ml MgCl₂; **B:** Entsprechend A, jedoch mit einem Titer von jeweils 1×10^6 cfu/ml MgCl₂;

Die angeführten Bakteriensuspensionen wurden in Blätter von *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) vakuum-infiltriert. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Infiltration wurden die Blätter abgeschnitten und Gesamt-RNA isoliert. Je 10 µg Gesamt-RNA wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-spezifischen Sonden hybridisiert. Zur Ladungskontrolle wurden die RNA-Blots mit genomischer DNA hybridisiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme dieser Hybridisierungen. K: Kontrolle;

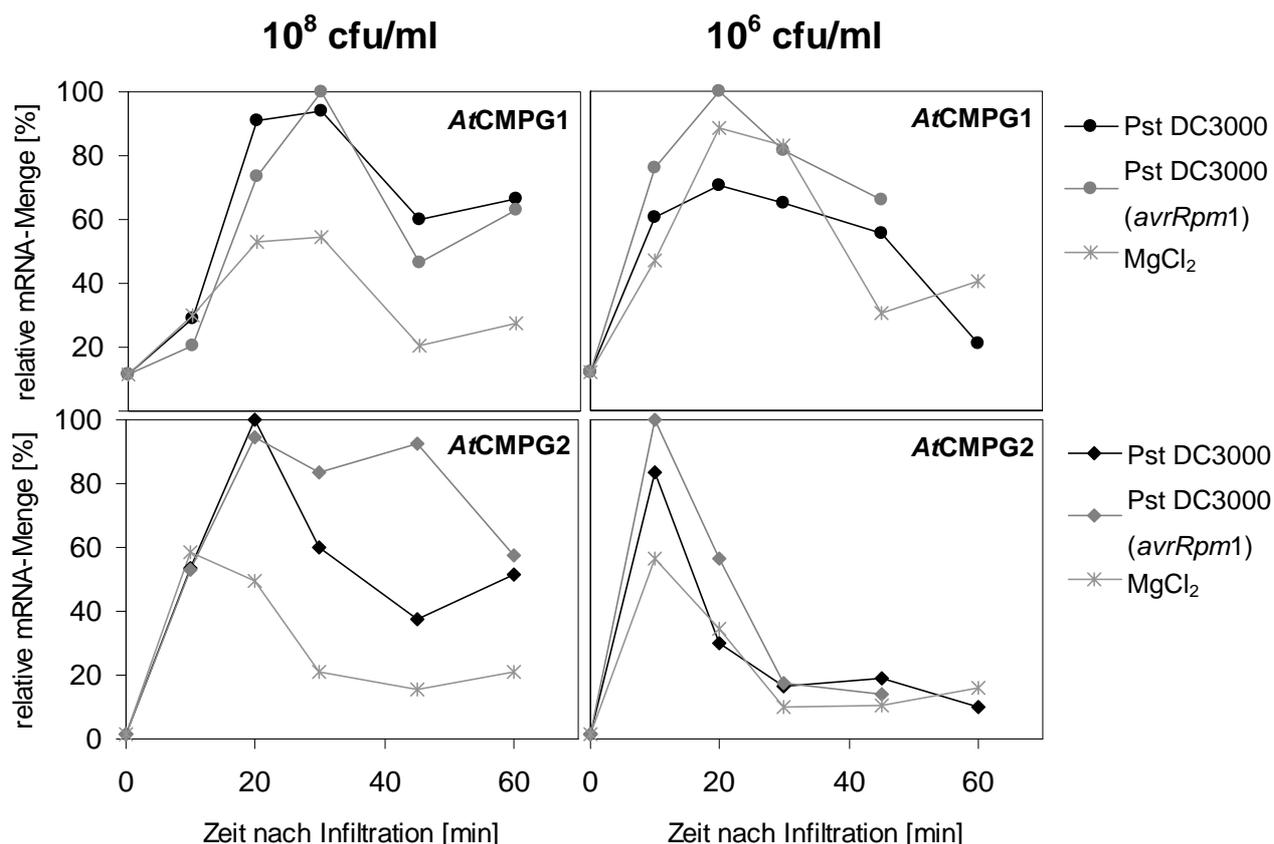


Abb. 3.11. Quantifizierung der Transkriptakkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in Blättern nach Infiltration von Pseudomonaden (Kurzzeitkinetik)

Die in vorangegangener Abbildung dargestellten Signale wurden mit einem Phosphorimager quantifiziert. Die Zahlenwerte der Signale aus den Hybridisierungen mit den CMPG-Sonden wurden gegen die Signalintensitäten einer Hybridisierung mit genomischer DNA zur Bestimmung der Menge aufgetragener Gesamt-RNA abgeglichen. Die oberen Grafiken enthalten die Ergebnisse der Hybridisierungen mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde, die unteren Grafiken die der Hybridisierungen mit einer *AtCMPG2*-spezifischen Sonde. Links sind die Ergebnisse der Infiltrationen mit einem Titer von 1×10^8 cfu/ml MgCl₂, rechts die der Infiltrationen mit einem Titer von 1×10^6 cfu/ml MgCl₂. Jede Grafik zeigt die Ergebnisse der Infiltrationen von Pst DC3000 (kompatible Interaktion), Pst DC3000 (*avrRpm1*) (inkompatible Interaktion) und die MgCl₂-Kontrollen.

Als Kontrolle, ob das Anlegen eines Unterdrucks zur Infiltration der Pseudomonaden in die Pflanzen bei der Langzeitkinetik eine Wundreaktion ausgelöst hat, wurde eine Hybridisierung der Blots mit einer *Arabidopsis* Allene-Oxid-Synthase-spezifischen Sonde (*AtAOS*) durchgeführt. Von der *AtAOS* ist bekannt, dass sie durch Verwundung induziert wird. Das maximale mRNA-Menge wurde sechs Stunden nach Verwundung von Blättern beobachtet (Laudert *et al.*, 1996). Blots mit Gesamt-RNA der Pseudomonaden-Langzeitkinetik zeigten nach Hybridisierung mit einer *AtAOS*-spezifischen Sonde in der unbehandelten Pflanze ein

ebenso starkes Signal wie in den vakuum-infiltrierten Pflanzen zu den frühen Zeitpunkten. Dieses Ergebnis unterstützt die Beobachtung einer Pseudomonaden-induzierten *AtCMPG1* und *AtCMPG2*-Expression in der Langzeitkinetik.

Für die Gene *AtCMPG3*, *AtCMPG5* und *AtCMPG6* wurden sowohl gewebespezifische RNA-Blots als auch Blots der drei verschiedenen Kinetiken mit entsprechenden Sonden hybridisiert. Wie bereits zuvor erwähnt, konnte für das Gen *AtCMPG4* keine spezifische Sonde hergestellt werden (s. Kap. 3.1.1). Die Ergebnisse für *AtCMPG3* zeigten eine sehr schwache konstitutive Expression. Für *AtCMPG5* wurde wiederholt eine Kreuzhybridisierung mit ribosomaler RNA beobachtet. Sequenzvergleiche zeigten jedoch keine Sequenzähnlichkeit. Hieraus kann gefolgert werden, dass *AtCMPG5* nicht oder zu gering exprimiert wird, um in RNA-Blot-Analysen ein Signal zu ergeben. Für *AtCMPG6* wurde ebenfalls keine eindeutige Aussage erhalten.

3.3 Identifizierung und Charakterisierung eines elizitorresponsiven Promotorelements im *AtCMPG1*-Promotor

Die Expressionsanalyse von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* zeigte eine starke Elizitor- und Pathogeninduzierbarkeit dieser beiden Gene. Vor allem die sehr schnelle und transiente Reaktion auf Pathogenbefall machte diese Gene zu überaus interessanten Kandidaten für eine Promotoranalyse. Das Ziel bestand in der Isolierung von möglichst kurzen Promotorelementen, die eine vollständige Reaktion auf Pathogenbefall vermitteln, jedoch nicht durch andere Stimuli oder bei speziellen Entwicklungsprozessen aktiviert werden.

Für diese Analysen stellen Transfektionen von in Kultur gehaltenen Zellen mit Promotor::Reportergen-Konstrukten oft ein sehr hilfreiches Werkzeug dar. Entwicklungsabhängige und gewebespezifische Promotoraktivitäten lassen sich dagegen nur mit transgenen Pflanzen untersuchen.

3.3.1 Transfektionen von Protoplasten mit Promotor::GUS-Konstrukten

Promotoranalysen wurden vor allem in dem seit vielen Jahren etablierten Petersilie-System durchgeführt (Dangl *et al.*, 1987). Protoplastierte Petersilie-Zellen wurden mit Promotor::GUS-Konstrukten transient transfiziert, Peptidelizitor Pep25 hinzugegeben und die

GUS-Expression nach sechs Stunden fluorometrisch ermittelt (Kap. 2.14).

Zu Beginn dieser Arbeit existierte noch keine vergleichbar gut ausgearbeitete Methode, Analysen dieser Art in einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur durchzuführen. Alle zuvor getesteten Elizitoren stellten sich als unwirksam heraus oder vermittelten lediglich eine sehr schwache Genexpression. Erst die Veröffentlichung der Elizitorwirkung des Proteins Flagellin aus eubakteriellen Flagellen im Mai 1999 (Felix *et al.*, 1999) ermöglichte die Analyse elizitorinduzierbarer Promotoren in einer *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur. Als Elizitor genügt ein 22 Aminosäuren langes Peptid dieses Proteins (Flg22) (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Für einige Promotor::GUS-Konstrukte, die zuvor in der Petersilie-Zellsuspensionskultur getestet worden waren, wurden dann auch in dieser Arbeit transiente Transfektionen mit anschließender Flg22-Behandlung in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur durchgeführt (Abb. 3.14).

Promotoranalyse mittels Transfektion von Petersilie-Protoplasten

Promotor-Deletionsanalysen wurden mit dem AtCMPG1- und dem AtCMPG2-Promotor durchgeführt. Von dem AtCMPG1-Promotor wurden drei Fragmente jeweils inklusive des 5'-UTR translational mit der kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens (GUS) fusioniert (Konstrukte A, B und C). Kürzere Bereiche des AtCMPG1-Promotors wurden mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus (Positionen -46 bis +8) und der kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens fusioniert (Konstrukte D bis N). Längen und relative Positionen der Promotorbereiche aller Konstrukte sind in Tab. 3.6 dargestellt. Die Promotorsequenz ist im Anhang 1 aufgeführt. Die Sequenzen der kurzen Promotorfragmente sind in Abb. 3.12 aufgelistet.

Von dem AtCMPG2-Promotor wurden zwei Fragmente translational mit dem *uidA*-Gen fusioniert. Die 1502 bp bzw. 642 bp langen Fragmente enthielten den gesamten 5'-UTR. Für beide Konstrukte konnte weder in transfizierten Petersilie- noch in *Arabidopsis*-Protoplasten eine Elizitorinduzierbarkeit nachgewiesen werden.

Ein 1263 bp langes Fragment des AtCMPG4-Promotors vermittelte in Petersilie-Protoplasten ebenfalls keine Elizitorresponsivität.

Bei der Klonierung eines AtCMPG3-Promotorfragmentes erfolgte aufgrund eines PCR-Fehlers eine Verschiebung des Leserahmens im *uidA*-Gen. Da in RNA-Blot-Analysen eine konstitutive Expression nach Elizitorzugabe zu einer *Arabidopsis*-Zellkultur festgestellt worden war, wurde auf eine Wiederholung der Klonierung verzichtet. Somit wurden für AtCMPG3 keine Promotoranalysen durchgeführt.

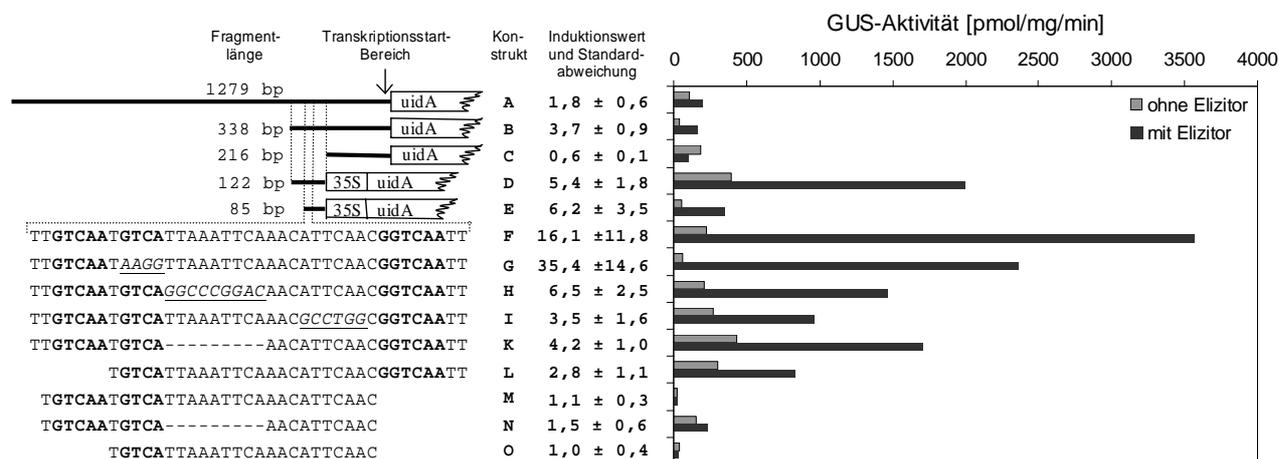
Das erst im August 2000 in Datenbanken veröffentlichte Gen *AtCMPG5* enthält eine Promotorsequenz, die eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem Konstrukt F des *AtCMPG1*-Promotors aufweist (Abb. 3.13). Diese 21 bp lange Fragment wurde zusammen mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus mit dem *uidA*-Gen fusioniert. In mit diesem Konstrukt transfizierten Petersilie-Protoplasten erwies es sich jedoch als völlig inaktiv.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Analysen des *AtCMPG1*-Promotors ausführlich dargestellt.

Tab. 3.6. Längen und Positionen der *AtCMPG1*-Promotorfragmente in den Promotor::*GUS*-Konstrukten A bis O

Die Positionen in dem *AtCMPG1*-Promotor beziehen sich auf die in Anhang 1 dargestellte genomische *AtCMPG1*-Sequenz. Der Transkriptionsstart liegt bei Position 1153, der kodierende Bereich beginnt bei Position 1269, bezogen auf die in Anhang 1 aufgeführte *AtCMPG1*-Sequenz. Oberhalb des Querstrichs: translationale Fusionen mit kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens (Konstrukte A - C); unterhalb des Querstrichs Kombinationen mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus und der kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens (Konstrukte D – O);

Konstrukt	Länge [bp]	Position in <i>AtCMPG1</i>	Mutierte Bereiche
A	1279	6-1284	—
B	338	946-1284	—
C	216	1068-1284	—
D	122	946-1067	—
E	85	983-1067	—
F	39	983-1021	—
G	39	983-1021	991-994
H	39	983-1021	995-1003
I	39	983-1021	1007-1012
K	30	983-994+1004-1021	—
L	32	990-1021	—
M	30	984-1013	—
N	21	984-994+1004-1013	—
O	24	990-1013	—



Fettdruck: **W-Box** bzw. **W-Kernsequenz**

Kursiv u. unterstrichen: *Block Mutation*

Abb. 3.12. Elizitorresponsivität von AtCMPG1-Promotorfragmenten in transfizierten Petersilie-Protoplasten.

Petersilie-Protoplasten wurden mit Promotor::GUS-Fusionskonstrukten transfiziert. Auf der linken Seite sind schematisch die eingesetzten Konstrukte dargestellt. Die oberen drei Konstrukte stellen translationale Fusionen mit dem uidA-Gen dar, die restlichen wurden mit dem 35S-Minimal-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und dem uidA-Gen fusioniert. Der Hälfte des Transfektionsansatzes wurde Pep25-Elizitor zugegeben und die GUS-Aktivität nach 6 Stunden gemessen. Die dargestellte GUS-Aktivität stellt den Mittelwert aus mindestens acht Transfektionen dar; links neben der Grafik sind die errechneten Induzierbarkeiten und die Standardabweichungen verzeichnet. Gestrichelte Linien im linken Teil der Abb. verdeutlichen die durchgeführten Deletionen und die Positionen der Fragmente in Bezug auf das 1279 bp lange Fragment und den Transkriptionsstartbereich.

Alle Promotor::GUS-Konstrukte wurden in mindestens acht separaten Transfektionen auf ihre Elizitorinduzierbarkeit untersucht. Die Transfektionen erfolgten für die Konstrukte A bis F und L bis O in mindestens fünf unabhängigen Experimenten und für die Konstrukte mit den Blockmutationen bzw. einer internen Deletion (Konstrukte G bis K) in zwei unabhängigen Experimenten. Eine schematische Übersicht der getesteten Konstrukte sowie die für sie erhaltenen Reporterogenaktivitäten ist in Abb. 3.12 dargestellt.

Das längste Promotorfragment (A, 1279 bp) wies eine geringe Elizitorinduzierbarkeit auf. Bei insgesamt niedrigen absoluten GUS-Aktivitäten wurde mit diesem Konstrukt in Anwesenheit des Elizitors eine 1,8fach höhere Reporterogenaktivität gemessen. Das mit 338 bp deutlich kürzere Promotorfragment vermittelte bei ebenso niedrigen Basis-Aktivitäten eine Elizitorinduzierbarkeit von 3,7. Nicht mehr durch Elizitor induzierbar war das Konstrukt C mit einer Länge von 216 bp, wovon 117 bp auf den 5'-UTR entfallen. Mit Hilfe dieser drei Konstrukte konnte der eine Elizitorinduktion vermittelnde Bereich auf eine Länge von 122 bp eingegrenzt werden. Diese 122 bp wurden zur exakteren Analyse mit dem 35S-Minimalpromotor und der kodierenden Sequenz des *uidA*-Gens fusioniert (Konstrukt D). Sowohl die absolute GUS-Aktivität als auch die Induzierbarkeit dieses Konstruktes war deutlich größer als die der Konstrukte A bis C. Eine weitere Deletion um 37 bp am 5'-Ende ergab ein 85 bp langes Promotorfragment (Konstrukt E), welches im Vergleich zu Konstrukt D zwar eine geringere Basis-Aktivität vermittelte, aber noch etwas stärker auf Elizitor reagierte. Eine noch weitergehende Deletion um 46 bp ergab das 39 bp lange Konstrukt F, das sowohl die größten GUS-Aktivitäten als auch die stärkste Reaktion auf Elizitor (16fache Induktion) vermittelte (Abb. 3.12). Dieses Promotorfragment enthält drei bekannte und charakterisierte Elemente in revertierter Orientierung: Zweimal eine W-Box 5'-TTGACC-3' und eine W-Kernsequenz 5'-TGAC-3'. W-Boxen sind in vielen pathogeninduzierbaren Promotoren vertreten (Maleck *et al.*, 2000) und wurden als Bindungsstellen für WRKY-Proteine charakterisiert (Eulgem *et al.*, 1999).

Das Konstrukt L, in dem die am 5'-Ende des Konstruktes F gelegene W-Kernsequenz deletiert wurde, war noch durch Elizitor induzierbar, jedoch nur dreifach im Vergleich zu der 16fachen Induzierbarkeit des Konstruktes F. Die Deletion der am 3'-Ende des Konstruktes F gelegenen W-Box führte zu einer vollständigen Inaktivierung des Promotorfragmentes (Konstrukt M). Da ohne Funktionsverlust weder am 5'- noch am 3'-Ende eine weitere Kürzung des Konstruktes F möglich war, kann somit diese Sequenz als Promotorelement bezeichnet werden. Eine Blockmutation der zweiten W-Kernsequenz am 5'-Ende (5'-GTCA-3' → 5'-AAGG-3') bewirkte im Vergleich zu dem nicht mutierten Konstrukt F eine deutliche Reduktion der absoluten GUS-Aktivität (Konstrukt G), die Induzierbarkeit war jedoch fast doppelt so hoch. Für die Konstrukte F und G wurden deutlich größere

Schwankungen in den Induzierbarkeiten experimentell festgestellt als für die restlichen Konstrukte. Um trotzdem verlässliche Aussagen zu bekommen, wurden mit dem Konstrukt F 31 Transfektionen durchgeführt, wobei Plasmide von drei verschiedenen Plasmidisolierungen eingesetzt wurden. Es wurden Induktionswerte zwischen 3,3 und 58 erzielt. Dies lässt vermuten, dass die von diesem Promotorelement vermittelte Reporterexpression durch weitere Stimuli positiv oder negativ beeinflusst wurde. Diese potenziellen Stimuli können trotz aller Bemühungen, den Versuchsablauf gleich zu halten, leicht auftreten. Zum Beispiel können geringe Temperaturdifferenzen, leicht unterschiedlich angesetzte Lösungen, Lichtvariabilitäten u.v.a.m. die Expression des Reportergens verändern. Vor allem das Konstrukt F scheint auf diesen - wie auch immer gearteten - Stimulus, sehr stark zu reagieren.

Der 19 bp umfassende Bereich zwischen den W-Boxen in Konstrukt F weist eine Sequenzübereinstimmung von 12 bp mit dem elizitorresponsiven Petersilie PR2-Promotor auf (Abb. 3.13). Der elizitorresponsive Bereich wurde in dem *PcPR2*-Promotor auf 125 bp eingegrenzt, ohne dass eine spezielle Bedeutung für diese 12 bp erkannt wurde (van de Löcht *et al.*, 1990). Eine ebenfalls recht hohe Sequenzähnlichkeit wurde zu dem β -1,3-Glukanase *gn1*-Promotor aus Tabak gefunden (Abb. 3.13). Dieser Bereich des Promotors, der die Ähnlichkeit zu dem Konstrukt F des *AtCMPG1*-Promotors aufweist, wurde als Bindungsstelle von DNA-bindenden Proteinen charakterisiert (Alonso *et al.*, 1995).

Sowohl Blockmutationen in diesem Bereich des Konstruktes F als auch die Deletion von 9 bp resultieren in einer sehr stark reduzierten Elizitorinduzierbarkeit (Konstrukte H, I und K). Dies zeigt, dass diese 19 bp für eine volle Elizitorinduzierbarkeit notwendig sind.

Abgesehen von der Sequenzähnlichkeit mit dem *PcPR2*-Promotor, dem *Ntgn1*-Promotor und den W-Boxen wurden keine weiteren bekannten Promotorelemente gefunden. Blockmutationen wurden entsprechend folgender Regel eingeführt: T \leftrightarrow G und A \leftrightarrow C. Dies entspricht einem Austausch einer Pyrimidinbase gegen die nicht basenpaarende Purinbase.

Das Konstrukt N ist bis auf bis zwei bp identisch mit dem E17-Element aus dem *PcEli17*-Promotor (Abb. 3.13). Innerhalb des *PcEli17*-Promotors konnte der elizitorresponsive Bereich auf das 21 bp umfassende E17-Element eingegrenzt werden (Kirsch *et al.*, 2001). Das E17-Element vermittelt bei Zugabe des Pep25-Elizitors eine 11fach höhere GUS-Expression im Vergleich zur Kontrolle, wohingegen das Konstrukt N mit einer nur 1,5fachen Induzierbarkeit kaum auf Elizitor reagiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit den Promotoranalysen in dem Petersilie-Protoplastensystem ein 39 bp langes Element des *AtCMPG1*-Promotors bestimmt werden konnte, welches für die in diesem System messbare Elizitorresponsivität hinreichend ist. Innerhalb dieser 39 bp konnte die im 3'-Bereich lokalisierte W-Box als absolut notwendig

charakterisiert werden. Die W-Kernsequenz im 5'-Bereich trägt zu einer starken Reaktion bei, ist aber nicht absolut notwendig. Gleiches gilt für die mittleren 19 bp, in denen weitere, noch nicht näher charakterisierte Bereiche enthalten sind.

F	TT <u>GTCAAT</u> - <u>GTCA</u> TTAAATTCAAACATTCAAC <u>GGTCAATT</u>
E17	<u>GTCAATGGTCA</u> ----- <u>ACATTCAAC</u>
N	<u>GTCAAT</u> - <u>GTCA</u> -----AACATTCAAC
E17	<u>GTCAATGGTCA</u> ----- <u>ACATTCAAC</u>
F	TT <u>GTCAATGGTCA</u> TTAAATTCAAACATTCAAC <u>GGTCAATT</u>
AtCMPG5	ATTCAAT <u>GGTCAA</u> AAGTTTCC
E17	<u>GTCAATGGTCAA</u> CATTCAAC
AtCMPG5	ATTCAAT <u>GGTCAA</u> AAGTTTCC
F	TT <u>GTCAATGGTCA</u> TTAAATTCAAACATTCAAC <u>GGTCAATT</u>
PcPR2	ATAGGGCTCCTGTACAATTCAAACATTGTTCAAACAA
F	TT <u>GTCAATGGTCA</u> TTAAATTCAAACATTCAAC <u>GGTCAATT</u>
gn1	AAAAATAATATATTTTCTCGTTCTCATT TTCAAAGA

Abb. 3.13. Vergleich einiger elizitorresponsiver Promotorfragmente

Die mit nur einem Buchstaben gekennzeichneten Fragmente (D, E, F, N) entstammen dem *AtCMPG1*-Promotor. Die Positionen dieser Fragmente sind in Tab. 3.6 aufgeführt. E17 ist ein Promotorelement des *PcEli17*-Promotors (Kirsch *et al.*, 2001). *AtCMPG5* ist ein 213 bp vom mutmaßlichen Translationsstart entferntes Promotorfragment des Gens *AtCMPG5* (Accession-Nr: AB025630). Mit *PcPR2* ist der 3'-Bereich des 125 bp großen elizitorresponsiven Elements aus dem *PcPR2*-Promotor bezeichnet (van de Löcht *et al.*, 1990). Das mit gn1 bezeichnete Element entstammt dem β -1,3-Glukanase *gn1*-Promotor (Alonso *et al.*, 1995). Grau unterlegt sind jeweils identische Nucleinsäuren. W-Boxen (5'-GGTCAA-3') und W-Kernsequenzen (5'-GTCA-3') sind fett gedruckt und unterstrichen.

Promotoranalyse mittels Transfektion von *Arabidopsis*-Protoplasten

Die drei translational fusionierten Promotorfragmente (Konstrukte A bis C in Abb. 3.12) und vier mit dem 35S-Minimalpromotor fusionierte Fragmente wurden auch in *Arabidopsis*-Protoplasten auf ihre Elizitorresponsivität getestet. Als Elizitor wurde Flg22, ein 22 Aminosäuren langes Peptid, das dem in Flagellen vorkommenden Flagellin entstammt, eingesetzt. Auch hier wurden mindestens acht Transfektionen durchgeführt, für die Konstrukte A, B und C in je vier unabhängigen Experimenten und für die Konstrukte F, G, L und M in je zwei unabhängigen Experimenten.

Die Konstrukte A, B und C reagierten tendenziell wie in den Petersilie-Protoplasten. Die absoluten GUS-Aktivitäten und die Induzierbarkeiten lagen jedoch deutlich höher (Abb. 3.14). Das mit 1279 bp längste Fragment vermittelte eine 3,4fache Elizitorinduzierbarkeit im *Arabidopsis*-System, jedoch nur eine 1,8fache im Petersilie-System. Das 338 bp lange Fragment B vermittelte im Vergleich zum Konstrukt A in beiden Systemen eine geringere absolute GUS-Aktivität. Die Elizitorinduzierbarkeit lag jedoch deutlich höher und erreichte in dem *Arabidopsis*-System einen Wert von 10,2, wohingegen im Petersilie-System eine 3,7fache Induzierbarkeit erreicht wurde. Konstrukt C war in beiden Systemen inaktiv. Die in dem Petersilie-System sehr stark induzierbaren Konstrukte F und G waren in dem *Arabidopsis*-System nur 2,7 bzw. 1,7fach induzierbar. Die Konstrukte L und M reagierten in beiden Systemen identisch.

Dieser Vergleich beider Zellkultursysteme zeigt, dass die im Petersilie-System inaktiven Konstrukte C und M im *Arabidopsis*-System ebenfalls inaktiv waren, wohingegen die anderen verglichenen Konstrukte in beiden Systemen eine deutlich messbare, aber jeweils unterschiedlich starke Elizitorinduzierbarkeit vermittelten.

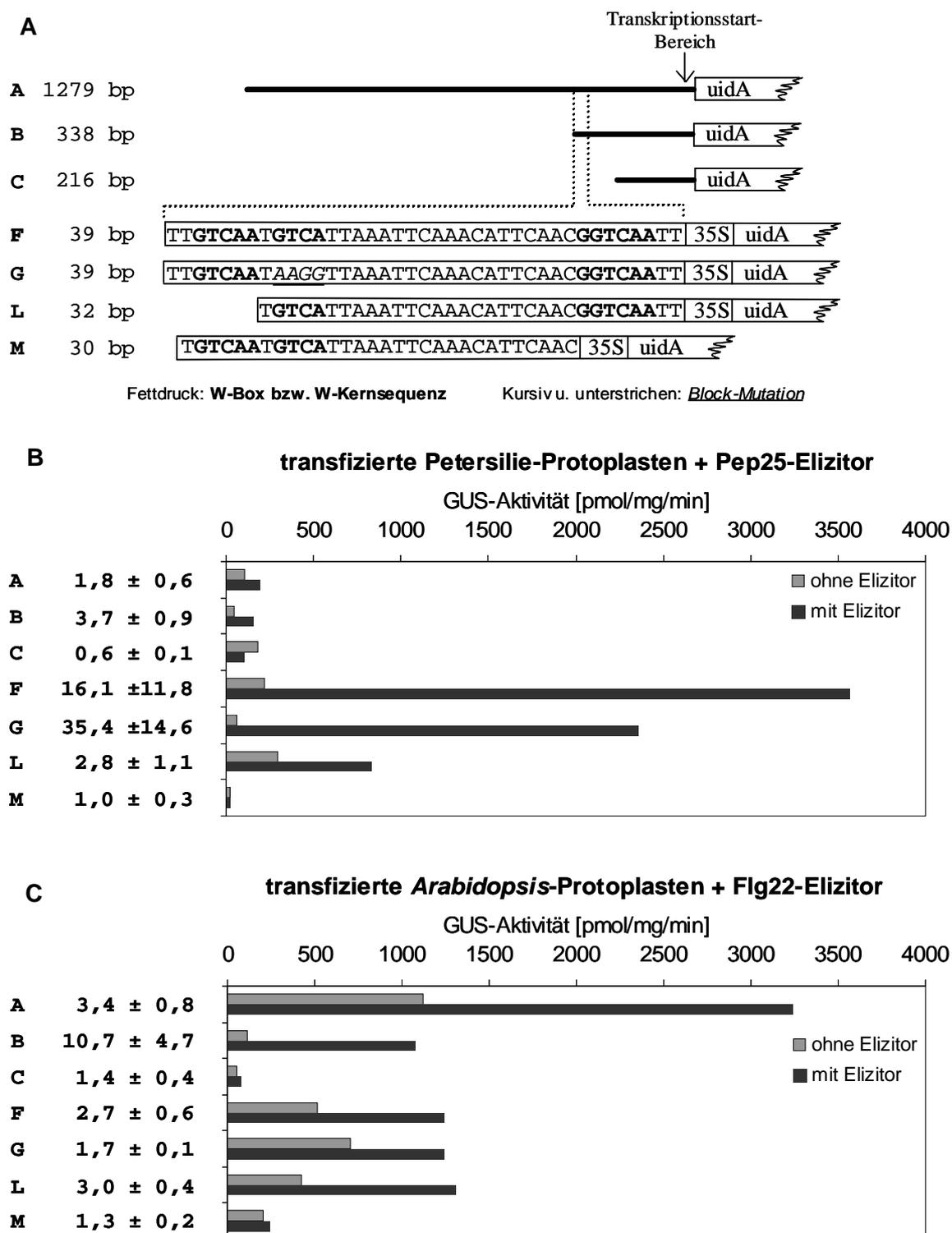


Abb. 3.14. Elizitorresponsivität von *AtCMPG1*-Promotorfragmenten in Petersilie- und *Arabidopsis*-Protoplasten

A: Länge, Sequenz und relative Position der getesteten *AtCMPG1*-Promotorfragmente (vgl. Tab. 3.6). **B:** Petersilie-Protoplasten wurden transient mit Promotor::GUS-Fusionskonstrukten transfiziert (vgl. Abb. 3.12). Der Hälfte des Transfektionsansatzes wurde Pep25-Elizitor zugegeben und die GUS-Aktivität nach 6 Stunden gemessen. Die angegebene GUS-Aktivität stellt den Mittelwert aus mindestens acht Transfektionen dar; links neben der Grafik sind die errechneten Induzierbarkeiten und die Standardabweichung verzeichnet. **C:** *Arabidopsis*-Protoplasten wurden analog zu den Petersilie-Protoplasten transfiziert und mit Flg22-Elizitor behandelt.

3.3.2 Analyse transgener Promotor::GUS-Fusionslinien

Pflanzen, die mit Promotor::GUS-Konstrukten transformiert wurden, ermöglichen im Vergleich zu RNA-Blot-Analysen eine wesentlich detailliertere Expressionsanalyse. Außerdem kann sehr schnell getestet werden, auf welche Stimuli das Promotorfragment reagiert. Des Weiteren können Signaltransduktionswege aufgeklärt werden.

Alle Promotorfragmente, die stabil in *Arabidopsis* transformiert wurden, waren zuvor in transienten Expressionsanalysen untersucht worden.

Für *AtCMPG2* wurde lediglich ein Konstrukt mit einem 1502 bp langen Promotorfragment analysiert. Für *AtCMPG1* wurden alle drei translational fusionierten Fragmente (Konstrukte A, B und C), sowie die mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus fusionierten Fragmente F, G und L (Tab. 3.6 und Abb. 3.12) stabil in *Arabidopsis* transformiert. Von den translational fusionierten Konstrukten wurden Pflanzen der T3-Generation analysiert. Die kurzen, mit dem 35S-Minimalpromotor fusionierten Fragmente wurden zu einem späteren Zeitpunkt in *Arabidopsis* transformiert, so dass nur Pflanzen der T2-Generation untersucht werden konnten. Von jeder Konstruktserie wurden mindestens fünf unabhängige Linien untersucht. Die Unabhängigkeit der Linien war zuvor in genomischen DNA-Blot-Analysen festgestellt worden. Für die Expressionsanalysen wurden Linien ausgewählt, die möglichst wenig Integrationen enthielten.

Sowohl das *AtCMPG2*-Konstrukt als auch die beiden langen Konstrukte des *AtCMPG1*-Promotors (Konstrukte A, 1279 bp und B, 338 bp) vermittelten bei Keimlingen verschiedenen Alters eine starke Blaufärbung in Wurzeln. Die Wurzeln waren von der Wurzelspitze bis zum Hypokotyl intensiv blau gefärbt. Die beiden langen Fragmente von *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* zeigten keinen Unterschied in der Wurzelexpression. Das 338 bp lange Fragment B vermittelte eine im Vergleich zu Konstrukt A etwas schwächere Expression. Linien mit dem 216 bp langen Fragment C zeigten keine Reporterexpression.

Von sechs Wochen im Langtag gewachsenen Pflanzen wurden grüne Rosettenblätter, senescente Blätter und Infloreszenzen gefärbt. Senescente und grüne Blätter zeigten lediglich an Verwundungsstellen eine Blaufärbung. Dies wurde in Verwundungsexperimenten bestätigt: Blätter von allen Linien wurden auf der linken Blattseite eingeschnitten und auf der rechten Blattseite mit einer Pinzettenschere gequetscht. Nach vier Stunden wurden die Blätter abgeschnitten und in der GUS-Färbelösung inkubiert. Das *AtCMPG2*-Fragment und die beiden langen *AtCMPG2*-Fragmente waren deutlich wundinduzierbar. Alle untersuchten Linien zeigten ein sehr ähnliches Expressionsmuster. Exemplarisch ist für jedes Konstrukt in der Abb. 3.15 B ein Blatt dargestellt. Das kürzeste translational fusionierte Konstrukt C vermittelte ebenso wie die Konstrukte F, G und L keine Expression des Reportergens. In

Infloreszenzen wurde bei den Linien mit den Konstrukten A und B des *AtCMPG1*-Promotors sowie bei dem 1502 bp langen *AtCMPG2*-Fragment eine Expression des Reportergens beobachtet. Alle drei Konstrukte zeigten eine Blaufärbung in der Übergangsregion zwischen Schote und Schotenstiel (Abb. 3.15 A). Das *AtCMPG2*-Fragment (Abb. 3.15 A, linkes Photo, Linie E) zeigte darüber hinaus auch eine Blaufärbung an der Schotenspitze. Das 338 bp lange Fragment des *AtCMPG1*-Promotors vermittelte eine wesentlich schwächere Reportergenexpression. Die Blaufärbung im Bereich des Übergangs von Schote zum Stiel war nur bei einigen Schoten zu erkennen (Abb. 3.15 A, rechtes Photo, Linie G, mit einem Pfeil markiert). Infloreszenzen von Pflanzenlinien mit dem 216 bp langen *AtCMPG1*-Fragment sowie mit den kurzen Fragmenten F, G und L zeigten keine Blaufärbung.

Alle Promotor::GUS-Linien wurden auf eine pathogen-induzierte Reportergenexpression untersucht. In Blätter von vier Wochen alten Pflanzen wurden virulente bzw. avirulente *Pseudomonaden* (jeweils mit einem Titer von 10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$) mit einer stumpfen Spritze ohne Kanüle infiltriert. Nach sechs Stunden wurden die Blätter abgeschnitten und in einer GUS-Färbelösung inkubiert. Eine Blaufärbung wurde nur bei Linien mit beiden langen Fragmenten des *AtCMPG1*-Promotors und bei Linien mit dem *AtCMPG2*-Promotorfragment beobachtet. Ebenso wie in den vorherigen Experimenten wurde weder eine Blaufärbung bei Linien, die das 216 bp lange Fragment noch bei Linien, die kurze Fragmente des *AtCMPG1*-Promotors enthielten, festgestellt. Eine klare pathogen-induzierte Reportergenexpression war zumeist nicht zu beobachten, weil alle Linien stark auf Verwundung reagierten. Selbst durch vorsichtiges Infiltrieren der *Pseudomonaden*-Suspension ließ sich eine Verwundung nicht vermeiden. So zeigten die meisten der mit einer $MgCl_2$ -Lösung (10 mM) infiltrierten Blätter eine vergleichbare Blaufärbung wie Blätter, die mit *Pseudomonaden* infiltriert worden waren. In seltenen Fällen war die Färbung nach Infiltration mit einer $MgCl_2$ -Lösung sogar intensiver als nach Infiltration mit *Pseudomonaden*.

Als Kontrolle dienten Linien, die mit einem Konstrukt transformiert worden waren, bei dem der 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus direkt mit der kodierenden Region des *uidA*-Gens fusioniert worden war. Unabhängige Linien dieser Kontrolle zeigten in keinem Fall eine Reportergenaktivität. Insgesamt wurde eine Expression des *uidA*-Gens nur mit den längeren translational fusionierten Konstrukten beobachtet. Die Promotoren für *AtCMPG1* und *AtCMPG2* sind wundinduzierbar und in der Übergangszone von Schotenstiel zur Schote aktiv. Der *AtCMPG2*-Promotor ist zudem auch an der Schotenspitze aktiv.

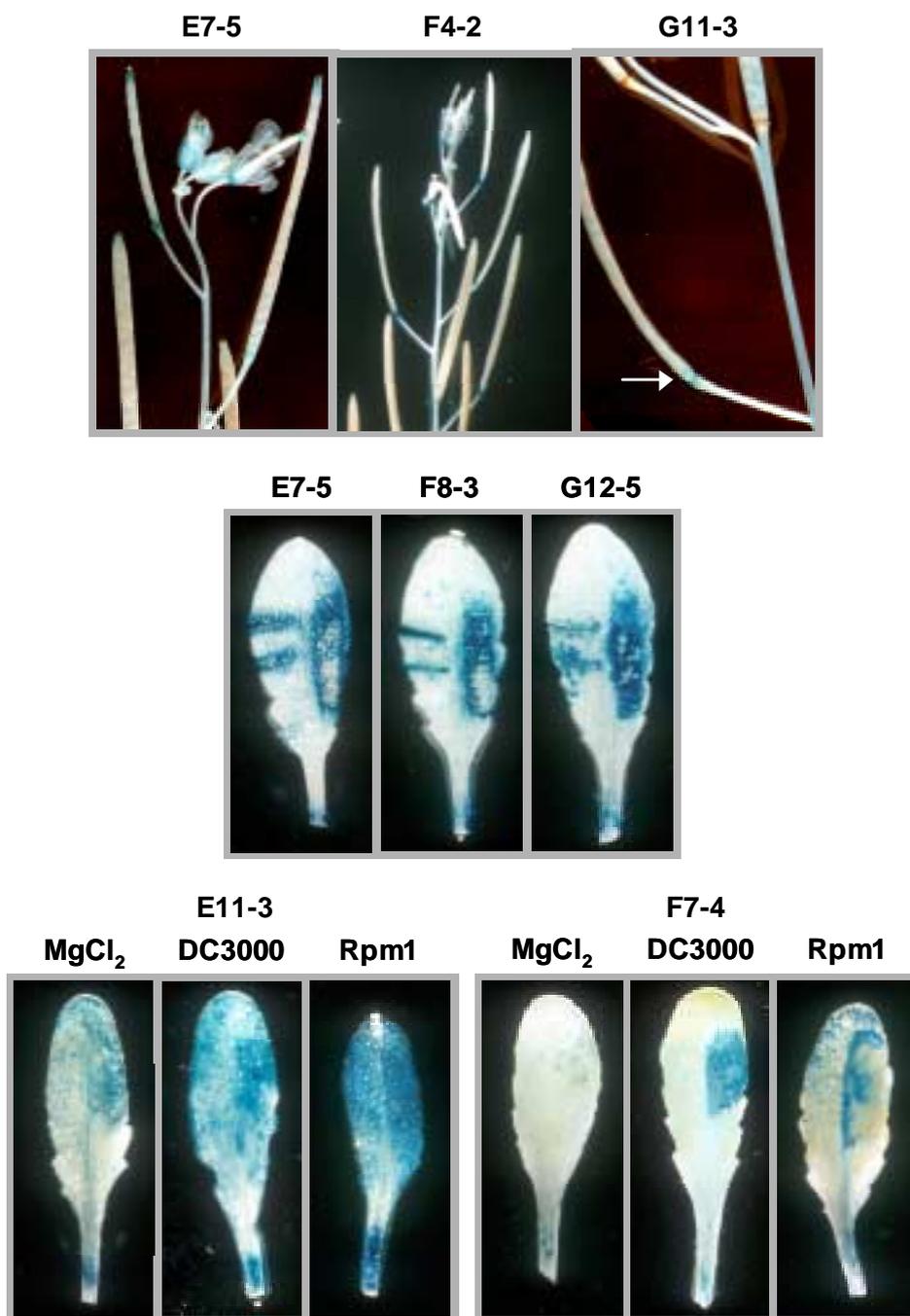


Abb. 3.15. Reporter genexpression in Promotor::GUS-Pflanzen

Blätter und Infloreszenzen transgener Promotor::GUS-Pflanzen wurden nach verschiedenen Behandlungen in einer GUS-Färbelösung über Nacht bei 37 °C inkubiert und in 70 %igem Ethanol entfärbt. **A:** Infloreszenzen von sechs Wochen im Langtag gewachsenen Pflanzen wurden direkt in der Färbelösung inkubiert. **B:** Grüne Rosettenblätter von fünf Wochen im Kurztag gewachsenen Pflanzen wurden auf der linken Blattseite mit einer Schere zweimal eingeschnitten und auf der rechten Blattseite mit einer Pinzettenschere gequetscht. Nach vier Stunden wurden die Blätter abgeschnitten und gefärbt. **C:** Infiltration von Blättern (fünf Wochen Kurztag) mit Pst DC3000 bzw. Pst DC3000 (*avrRpm1*) jeweils mit einem Titer von 10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$ -Lösung infiltriert; **Linie E:** 1502 bp langes Fragment des *AtCMPG2*-Promotors; **Linie F:** 1279 bp langes Fragment des *AtCMPG1*-Promotors; **Linie G:** 338 bp langes Fragment des *AtCMPG1*-Promotors; **DC3000:** Pst DC3000; **Rpm1:** Pst DC3000 (*avrRpm1*);

3.4 Untersuchungen zur Funktion von AtCMPG1 und AtCMPG2

3.4.1 Expression von AtCMPG1 und AtCMPG2 in *Escherichia coli* und Herstellung spezifischer Antiseren

Mit spezifischen und sensitiven Antiseren könnte gezeigt werden, ob sich die nach Pathogenbefall sehr transiente mRNA-Akkumulation von AtCMPG1 und AtCMPG2 auch auf Proteinebene widerspiegelt. Des Weiteren ermöglichte die Verfügbarkeit spezifischer Antiseren sowie von nativ gereinigtem Protein eine Vielzahl von Experimenten zur Funktionsaufklärung. So wären z. B. Bindungsstudien durchführbar, mit denen gezeigt werden könnte, ob AtCMPG1 bzw. AtCMPG2 an Protein-DNA- oder Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist.

Um größere Mengen von möglichst nativ gereinigtem AtCMPG1- und AtCMPG2-Protein zu erhalten, wurden die Proteine in *E. coli* exprimiert. Mit diesen heterolog exprimierten Proteinen wurden dann Kaninchen immunisiert, um so polyklonale Antiseren gegen AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Protein zu bekommen.

Für die Proteinexpression wurde das pQE-Expressionssystem (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Die kodierenden Sequenzen von AtCMPG1 und AtCMPG2 wurden in dem Expressionsvektor pQE60 C-terminal mit einer Abfolge von sechs Histidinresten (6×His-tag) fusioniert (Kap. 2.18). Die Affinität des His-tags zu Nickel-Agarose ermöglicht eine Aufreinigung der exprimierten Proteine sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen. Der His-tag selber wirkt kaum immunogen.

Nach Behandlung der Bakterienkulturen mit IPTG konnten im Vergleich zu unbehandelten Ansätzen zusätzliche Banden in Bakterien-Rohextrakten nachgewiesen werden. In mit AtCMPG1-cDNA transformierten Bakterien traten zwei zusätzliche Banden mit einer Größe von ca. 10 und 45 kDa auf. Die mit AtCMPG2-cDNA transformierten Bakterien (Abb. 3.17) bildeten ein zusätzliches ca. 47 kDa großes Protein.

Mit Hilfe verschiedener Protokolle wurde versucht, die Proteine unter nativen Bedingungen aus den Bakterien zu isolieren. Um die massive Synthese der heterolog exprimierten Proteine zu reduzieren, wurden IPTG-Konzentrationen zwischen 0,01 mM und 2 mM IPTG getestet. Pelletiert wurden die Bakterien zwischen einer und vier Stunden nach IPTG-Induktion. Als Wachstumstemperaturen der Bakterienkulturen wurden 30 und 37 °C getestet. Unter sämtlichen getesteten Bedingungen wurden die Proteine jedoch ausschließlich in den unlöslichen Fraktionen gefunden. Selbst unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff bzw. 6 M Guanidinium-Hydrochlorid) war das heterolog exprimierte AtCMPG2-Protein nicht

löslich. AtCMPG1-Protein war zum Teil in 8 M Harnstoff löslich, jedoch auch nur nach einer mehrstündigen Inkubation bei RT auf einem Schüttler mit zwischenzeitlichem starkem Mischen auf einem Vortexer.

Des Weiteren wurde versucht, durch eine Vorbehandlung der Zellen mit verschiedenen Detergenzien die Proteine in Lösung zu bekommen. Getestet wurden die Detergenzien Triton X-100, Nonidet P40, CHAPS, Desoxycholat und Tween 20 in Endkonzentrationen von 0,5 bis zu 2,5 %. AtCMPG2-Protein war nicht oder nur zu einem geringen Teil in Desoxycholat löslich. AtCMPG1-Protein war löslich, wenn nach einem Zellaufschluss mittels einer *French Press*-Behandlung und anschließender Zentrifugation das Pellet direkt in einem mindestens 1,5%igen Desoxycholat-Puffer resuspendiert wurde. In einer anschließenden Affinitätsreinigung des gelösten AtCMPG1-Proteins über Nickel-Agarose fand keine reversible Bindung des Proteins an Nickel-Agarose statt. Das Protein wurde nur in geringen Mengen im Durchfluss und in den Waschlösungen nachgewiesen. Nur nach Silberfärbung des denaturierenden Polyacrylamidgels wurde eine schwache Bande auch im Eluat nachgewiesen. Dies kann ursächlich dadurch bedingt sein, dass das Protein nicht an die Matrix gebunden wurde, oder es aggregierte in Anwesenheit der Nickel-Agarose, so dass keine Elution möglich war. Das Vorliegen von Desoxycholat kann ebenfalls die Affinitätsreinigung der Proteine über Nickel-Agarose behindert haben. Eine Entfernung des Desoxycholats mittels Dialyse oder Umpufferung wurde nicht durchgeführt, weil ein erneutes Aggregieren und Ausfallen der Proteine zu erwarten war.

Aufgrund der sehr starken Expression der heterolog exprimierten Proteine liegen diese wahrscheinlich als unlösliche Proteinkörper (*inclusion bodies*) in den Bakterien vor. Eine mikroskopische Betrachtung der Bakterien zeigte, dass die AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-exprimierenden Bakterien zwei- bis viermal größer waren als die mit einem leeren pQE60-Vektor transformierten Bakterien (Abb. 3.16). Das Vorliegen von *inclusion bodies* war im lichtmikroskopischen Bild jedoch nicht zu erkennen.

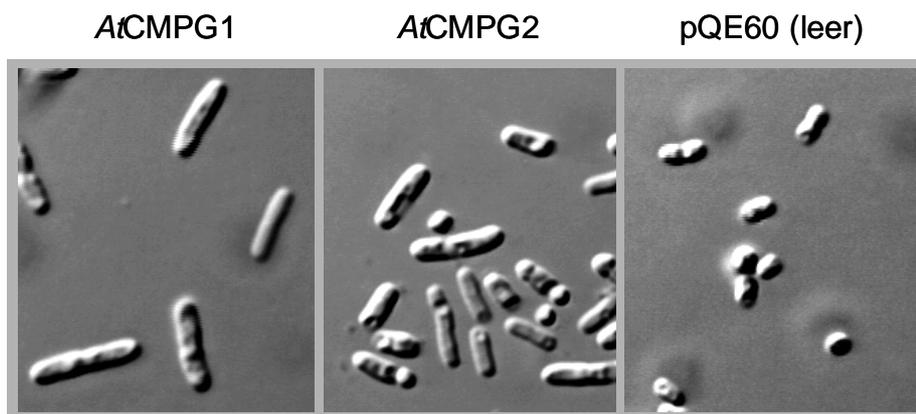


Abb. 3.16. Mikroskopische Betrachtung der *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* exprimierenden Bakterien.

E. coli (Stamm SG13009) wurde mit pQE60-Vektoren (Qiagen, Hilden) transformiert. Das rechte Foto zeigt die Kontrolle, in der Bakterien mit dem leeren pQE60-Vektor transformiert wurden. Die beiden linken Fotos zeigen Bakterien, die die kodierende Sequenz von *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* in dem pQE60-Vektor enthalten. Die Expression von *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien nach vier Stunden mit einem Axiophot-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) mit einer ca. 1000fachen Vergrößerung (100× Objektiv und 10× Okular) mikroskopiert.

Nach einer Reinigung der *inclusion bodies* (Kap. 2.18) und anschließender Extraktion mit 8 M Harnstoff konnten beide Proteine nur in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abb. 3.17). Wie bereits zuvor erwähnt, war *AtCMPG1*-Protein direkt nach einem Zellaufschluss mittels einer *French-Press*-Behandlung zu einem geringen Teil in 8 M Harnstoff löslich. Die Vorbehandlung mit den Detergenzien Desoxycholat, Nonidet P40 und Triton X-100 während der Aufreinigung der *inclusion bodies* reduzierte demzufolge sogar noch die Löslichkeit von *AtCMPG1*-Protein.

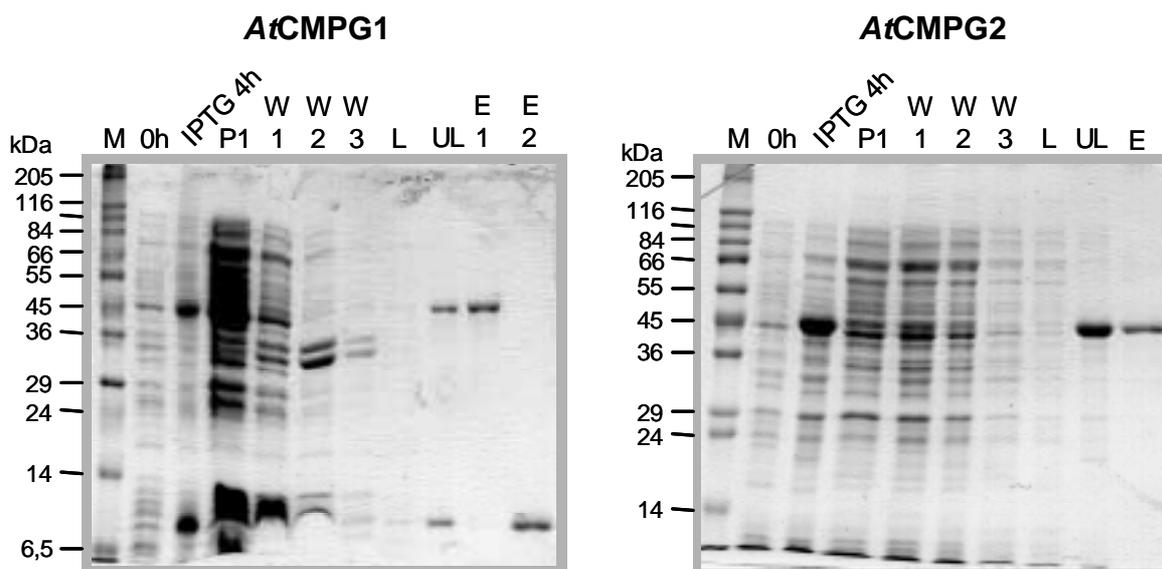


Abb. 3.17. Proteinfraktionen von heterolog exprimiertem AtCMPG1- und AtCMPG2-Protein

Dargestellt sind zwei Coomassie-gefärbte Polyacrylamidgele nach gelelektrophoretischer Auftrennung diverser *E. coli*-Extrakte vor und nach IPTG-Induktion, während und nach der Aufreinigung von *inclusion bodies* sowie die Eluate der aus dem präparativen Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Banden. **M**: Proteinmarker; **0h**: *E. coli*-Rohextrakt vor Induktion mit IPTG; **IPTG 4h**: *E. coli*-Rohextrakt nach vierstündiger Induktion mit IPTG; **P1**: in Detergenspuffer lösliche Proteine; **W1**, **W2**, **W3**: lösliche Fraktionen nach 1, 2 und 3 Waschschritten; **L**: lösliche Fraktion nach Aufnahme des Sediments in 8 M Harnstoff; **UL**: unlösliche Fraktion nach Aufnahme des Sediments in 8 M Harnstoff; **E**: Eluat der aus dem präparativen Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Banden; **E1**, **E2**: Eluat des 45 kDa bzw. 10 kDa großen AtCMPG1-Proteins;

Um für die vierfache Immunisierung von Kaninchen genügend Material von beiden Proteinen (je Protein insgesamt 400 µg) zu erhalten, wurden die Fraktionen nach der Aufreinigung der *inclusion bodies* in einem präparativen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch die Verwendung von vorgereinigten Proteinen wurde der Großteil der *E. coli*-Proteine zuvor abgetrennt (Abb. 3.17). Die Coomassie-gefärbten Proteinbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten. Kleine Teile der ausgeschnittenen Banden wurden in einem Electro-Eluter 422 (Bio-Rad, München) eluiert und im Polyacrylamidgel mit BSA-Proben bekannter Konzentration verglichen. Dies ermöglichte eine grobe Abschätzung der Proteinkonzentrationen in den Gelstücken. Vor der Immunisierung wurden die eluierten Fraktionen in einer Protein-Blot-Analyse mit einem Penta-His-Antikörper auf das Vorliegen des His-tags untersucht. Es zeigte sich, dass das isolierte AtCMPG2-Protein einen His-tag besitzt, wohingegen von den zwei AtCMPG1-Proteinen lediglich das 45 kDa große Protein mit einem His-tag versehen ist. In der Protein-Blot-Analyse wurde kein Signal für das 10 kDa

große Protein erhalten (Daten nicht gezeigt). Für die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen wurden die aus dem Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel ausgeschnittenen Proteinbanden eingesetzt. Für AtCMPG1 wurde die Bande mit dem 45 kDa großen Protein gewählt. Die Immunisierung der Tiere und die Gewinnung der Seren wurde von der Firma Eurogentec (Herstal, Belgien) durchgeführt.

Vor der finalen Blutung der Kaninchen wurden die Immunsereen der großen Blutung in Protein-Blot-Analysen mit *Arabidopsis*-Extrakten sowie mit Extrakten der Bakterien, die je einen der drei unterschiedlichen pQE60-Vektoren (leerer pQE60-Vektor, AtCMPG1-pQE60, AtCMPG2-pQE60) enthielten, getestet. Beide Seren gegen AtCMPG2 detektierten das in *E. coli* exprimierte AtCMPG2-Protein und zeigten keine Kreuzreaktivität mit AtCMPG1. Eines dieser beiden Seren detektierte neben AtCMPG2-Protein ein *E. coli*-Protein.

Beide AtCMPG1-spezifischen Seren zeigten eine starke Kreuzreaktivität mit AtCMPG2-Protein. Aus diesem Grund erfolgte eine erneute Injektion von AtCMPG1-Protein in beide Kaninchen. Die Seren der finalen Blutung unterschieden sich in ihrer Sensitivität und Spezifität kaum von den Seren der großen Blutung. Lediglich ein AtCMPG1-spezifisches Serum wies eine reduzierte, wenn auch noch detektierbare Kreuzreaktivität mit AtCMPG2-Protein auf.

In diversen Protein-Blot-Analysen gelang es nicht, AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Protein in Pflanzenrohextrakten nachzuweisen. Getestet wurden gewebespezifische Proben sowie Extrakte aus Pflanzenmaterial der Pseudomonaden-Langzeitkinetik, in der in RNA-Blot-Analysen eine starke mRNA-Akkumulation nachgewiesen wurde (Kap. 3.2.3).

Die Sensitivität der Antiseren wurde über einen Mengenvergleich der AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Bande im *E. coli*-Rohextrakt mit BSA-Proben bekannter Konzentration im silbergefärbten Polyacrylamidgel abgeschätzt. Eine ca. 80 ng entsprechende AtCMPG1-Bande erzeugte in Protein-Blot-Analysen mit dem AtCMPG1-spezifischen Antiserum eine gut zu detektierende Bande. Das AtCMPG2-spezifische Antiserum detektierte ca. 40 ng AtCMPG2-Protein. Aus diesen Mengenabschätzungen ergibt sich, dass in 20 bis 30 µg Gesamtproteinextrakt aus Pseudomonaden-infiltrierten Blättern die AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Proteinmenge unterhalb von 80 ng bzw. 40 ng liegen musste.

Die Schwierigkeiten, AtCMPG1- und AtCMPG2-Protein in Lösung zu bekommen, legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Proteine starke Interaktionen bzw. Komplexe ausbilden. Die erhaltenen Antiseren waren offenbar nicht sensitiv genug, um CMPG-Protein in Pflanzenextrakten nachzuweisen. Aufgrund dieser Ergebnisse war es jedoch sehr wahrscheinlich, dass selbst unter induzierten Bedingungen die AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Proteinmengen unterhalb von 0,25 % des Gesamtproteingehaltes lagen. Weitere Experimente, wie z. B. Bindungsstudien wurden aufgrund der geringen Sensitivität der Antiseren nicht durchgeführt.

3.4.2 Analyse zur intrazellulären Lokalisation von AtCMPG1 und AtCMPG2

Kenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen können sehr gute Hinweise zur Funktion liefern. So sind Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Regulatoren häufig im Zellkern lokalisiert.

Die Fusion eines zu untersuchenden Proteins mit dem fluoreszenztechnisch nachweisbaren Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) hat bereits in vielen Fällen Rückschlüsse auf die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen ermöglicht (Chytilova *et al.*, 1999; Eulgem *et al.*, 1999; Hara *et al.*, 2000; Kinkema *et al.*, 2000; Siemering *et al.*, 1996).

Transfektionen von Petersilie-Protoplasten mit PcEli17::GFP-Konstrukten zeigten insgesamt nur eine sehr schwache Fluoreszenz, die aber sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma zu beobachten war. Fusionskonstrukte, in denen die zwei mutmaßlichen Kernlokalisations-signale des PcEli17-Proteins deletiert wurden, zeigten eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation (Diplomarbeit Hamberger, 1999). Mit Hilfe von stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen sollte diese Aussage konkretisiert bzw. bestätigt werden. Für PcEli17 wurden vier GFP-Fusionskonstrukte hergestellt. Die Fusionen erfolgten sowohl N- als auch C-terminal und für jede Variante ohne und mit einer Brückensequenz (*linker*) von drei Aminosäuren Gly-Gly-Ala bzw. Gly-Gly-Gly (Untersuchungen zum Einfluss von Brückensequenzen bei GFP-Fusionen: Prescott *et al.*, 1999). Als Promotorkassette wurde bei allen Konstrukten ein Dimer des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus zusammen mit einem Translationsverstärker des *tobacco etch virus* benutzt. Die transgenen Linien mit den PcEli17::GFP-Konstrukten wurden von Björn Hamberger erstellt.

Für die Gene AtCMPG1 und AtCMPG2 wurde jeweils ein GFP-Fusionskonstrukt erstellt. Die Fusion erfolgte N-terminal, d. h. AtCMPG1 wurde an das N-terminale Ende des GFPs fusioniert, wobei zwischen die kodierenden Regionen der zu fusionierenden Proteine ein *linker* von drei Alaninresten eingefügt wurde. Die Konstrukte wurden stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Transgene Keimlinge der T2-Generation im Alter von 6 bis 16 Tagen wurden mit Hilfe eines Binokulars (Zeiss, Oberkochen) unter UV-Anregung auf GFP-Fluoreszenz untersucht. Die Positivkontrollen (35S-Promotor::GFP) zeigten eine sehr starke Fluoreszenz in der Wurzel und im Hypokotyl. In Blättern war nur bei wenigen Linien eine deutliche Fluoreszenz zu beobachten, die generell schwächer war als die GFP-Fluoreszenz der Wurzeln. In allen untersuchten Linien der Fusionskonstrukte (PcEli17, AtCMPG1 und AtCMPG2) konnte keine GFP-Fluoreszenz in Blättern beobachtet werden. Eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz trat bei einigen Linien in Wurzeln auf. Auf Photos war dies jedoch nicht darstellbar, so dass keine Abbildungen gezeigt werden.

Ein Nachweis des Transkripts gelang nur für die *AtCMPG1::GFP*- und *AtCMPG2::GFP*-Fusionslinien. Für RNA-Blot-Analysen wurden fünf unabhängige *AtCMPG1::GFP*-Fusionslinien, vier unabhängige *AtCMPG2::GFP*-Fusionslinien und jeweils zwei *PcEli17::GFP*-Fusionslinien (N- und C-terminale Fusion, jeweils mit und ohne *linker*) ausgewählt. Es wurden die Linien ausgewählt, die die deutlichste GFP-Fluoreszenz zeigten. Mit einer GFP-spezifischen Sonde konnte bei allen *PcEli17::GFP*-Fusionslinien kein Transkript nachgewiesen werden. Für die *AtCMPG1::GFP*- und *AtCMPG2::GFP*-Fusionslinien wurden Banden der erwarteten Größe in unterschiedlicher Intensität erhalten. Kein Signal ergab die Hybridisierung der Linie *AtCMPG1::GFP*-4. Die nachfolgende Protein-Blot-Analyse bestätigte die Ergebnisse der RNA-Blot-Analysen, so dass nur die Ergebnisse der Protein-Blot-Analysen mit Abbildungen dargestellt sind.

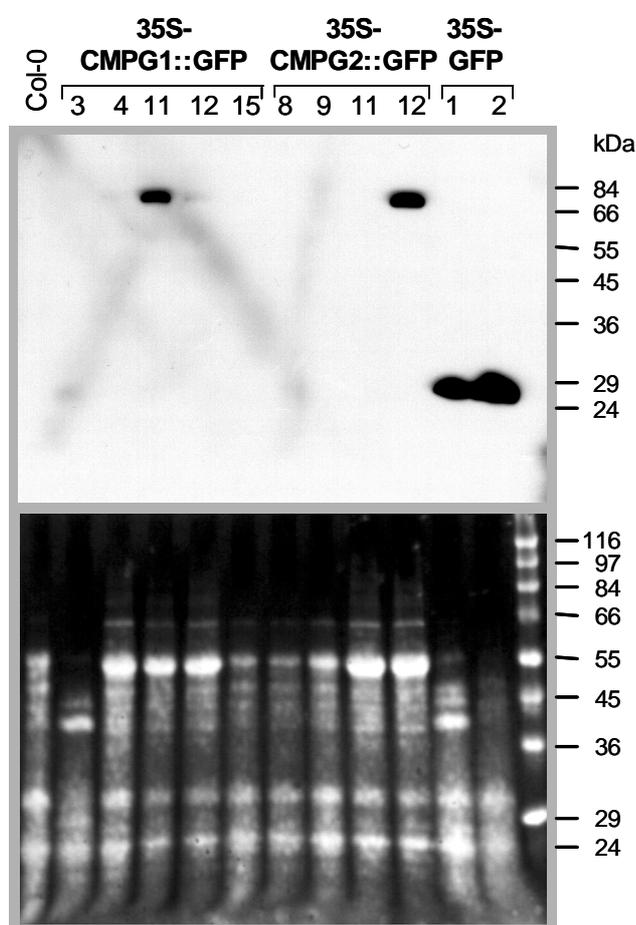


Abb. 3.18. Protein-Blot-Analyse der transgenen CMPG::GFP-Fusionslinien

Proteinrohextrakte von *Arabidopsis* WT (Ökotyp Col-0), fünf *AtCMPG1::GFP*-Fusionslinien, vier *AtCMPG2::GFP*-Fusionslinien und zwei 35S-GFP-Linien wurden im denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit einem GFP-spezifischem Antiserum hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm nach der Hybridisierung mit dem Antiserum. Der untere Teil der Abb. zeigt als Kontrolle gleichmäßiger Beladung des Blots die Membran vor der Hybridisierung. Hierfür wurde der Blot mit dem SYPRO Ruby protein gel stain (Molecular Probes, Eugene, OR) gefärbt und auf einem UV-Transilluminator photographiert.

Als Nachweis, dass die Fusionsproteine synthetisiert werden, wurden Protein-Blot-Analysen mit Proteinextrakten von allen in RNA-Blot-Analysen getesteten transgenen Linien durchgeführt. Die Hybridisierung mit einem GFP-spezifischen Antiserum ergab für alle *PcEli17::GFP*-Fusionslinien keine Bande (nicht gezeigt). Von den fünf *AtCMPG1::GFP*-Fusionslinien konnte für die Linie 11 eine sehr starke und für die Linie 12 eine schwache Bande der erwarteten Größe nachgewiesen werden. Für die *AtCMPG2::GFP*-Fusion ergab die Linie 12 eine sehr starke Bande. Die beiden Positivkontrollen ($2\times 35S$ -GFP) zeigten eine sehr starke Bande in der Größe von 26 bis 28 kDa (Abb. 3.18).

Aufgrund der sehr schwachen GFP-Fluoreszenz der *PcEli17::GFP*-, *AtCMPG1::GFP*- und *AtCMPG2::GFP*-Linien war somit keine eindeutige cytosolische oder Kernlokalisation nachweisbar.

3.4.3 Analyse transgener *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien

Pflanzen, die das zu untersuchende Gen in einem verstärkten Maße exprimieren, zeigen oft einen Phänotyp, der Hinweise zur Funktion des Proteins liefern kann. Zu diesem Zweck wurden *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-Überexpressionspflanzen hergestellt.

Die Überexpressionskonstrukte enthielten neben den kodierenden Sequenzen von *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* noch große Bereiche der untranslatierten Regionen. Als Promotor wurde der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus eingesetzt. Dieser Promotor vermittelt in den meisten Pflanzengeweben eine konstitutive und starke Expression und wird für Überexpressionskonstrukte häufig verwendet (Benfey and Chua, 1990). Die Länge der in den Überexpressionskonstrukten enthaltenen untranslatierten Regionen betrug für *AtCMPG1* 78 bp bzw. 112 bp (5'-UTR bzw. 3'-UTR), für *AtCMPG2* 107 bp bzw. 130 bp (5'-UTR bzw. 3'-UTR). Diese in pGPTV ligierten Fragmente wurden stabil in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert.

Pflanzen der T3-Generation wurden in genomischen DNA-Blot-Analysen auf die Anzahl der Integrationen hin überprüft. Gleichzeitig konnte damit festgestellt werden, ob es sich um unabhängige Linien handelte. Das Vorliegen von Homo- oder Heterozygotie in Bezug auf die Integration wurde über eine Segregationsanalyse auf Kanamycin-haltigen Selektionsplatten bestimmt. Die genomische DNA-Blot-Analyse wurde mit 15 *AtCMPG1*- und 12 *AtCMPG2*-Überexpressionslinien durchgeführt. Die Hybridisierung der Blots mit einer nptII-spezifischen Sonde (Kanamycin-Resistenzgen) zeigte, dass zwischen einer und sechs Integrationen pro Linie vorlagen. Ausgewählt für die Feststellung des Expressionsniveaus wurden Linien, die zum einen möglichst wenig Integrationen enthielten und zum anderen unabhängige Linien darstellten. Zu diesem Zweck durchgeführte RNA-Blot-Analysen (Abb. 3.19) zeigten die sehr

unterschiedliche Expressionsstärke in den einzelnen Linien. Für *AtCMPG1* wurde gezeigt, dass die Linie C2-3, die zwei Integrationen enthält, der stärkste Überexprimierer ist. Vier weitere Linien, die sich in genomischen DNA-Blot-Analysen als unabhängige Linien erwiesen, besitzen alle jeweils nur eine Integration. Die Expressionsstärke ist in drei dieser Linien sehr ähnlich. Die vierte Linie zeigt eine geringere Expression, die aber noch deutlich über der Expression im Wildtyp liegt.

AtCMPG2-überexprimierende Linien, die drei bzw. drei bis vier Integrationen enthielten, zeigten eine wesentlich schwächere *AtCMPG2*-Expression als Linien mit nur einer bzw. ein bis zwei Integrationen. Vor allem die kaum detektierbare Expression in der Linie A9-5 kann auf einen *silencing*-Effekt zurückzuführen sein (Abb. 3.19).

Die für Phänotypanalysen herangezogenen Linien sind in der Abb. 3.19 mit einem Stern markiert. Alle sechs Linien sind in Bezug auf die Integration homozygot. Die Beschreibung der Phänotypanalyse erfolgt parallel zu der Analyse der *AtCMPG1*-Nullmutante in Kap. 3.4.4.

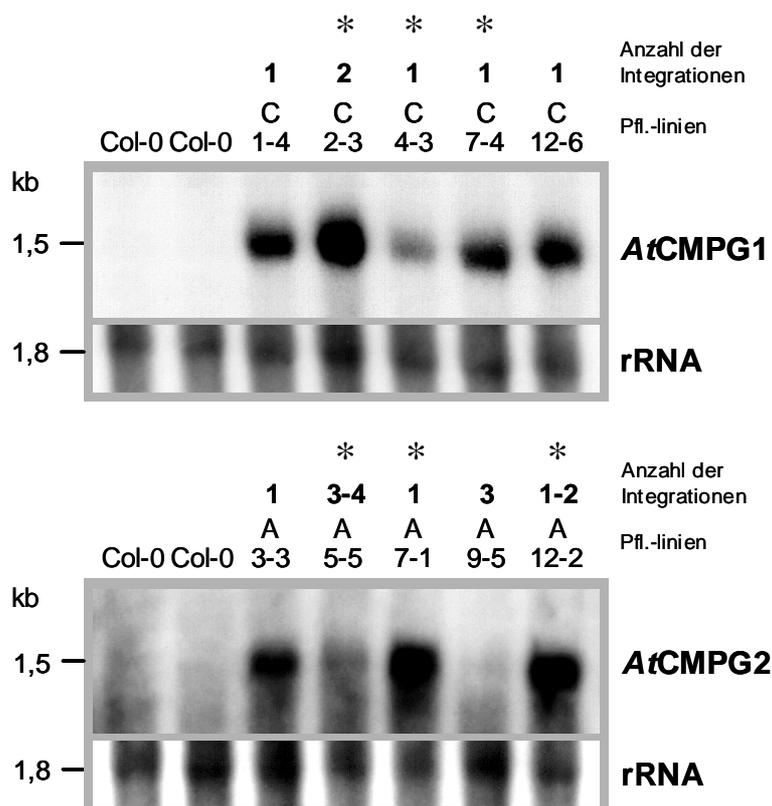


Abb. 3.19. mRNA-Expressionsstärke in *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp

Gesamt-RNA aus Wildtyppflanzen und jeweils fünf *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-Überexpressionslinien wurde aus Blättern isoliert und jeweils 10 µg Gesamt-RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Blots wurden mit *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonden hybridisiert. Dargestellt sind die Autoradiogramme nach den jeweiligen Hybridisierungen.

* für Phänotypanalysen herangezogene Linien;

3.4.4 Isolierung einer *AtCMPG1*-Nullmutante

Neben einer Phänotypanalyse von Pflanzen, die das zu untersuchende Gen in einem stärkeren Maße exprimieren als der Wildtyp, ist es sehr interessant, Nullmutanten zu analysieren, in denen die Expression nicht feststellbar ist. Ein eventuell zu beobachtender Phänotyp kann, v. a. im Vergleich zu Überexpressionslinien, einen Hinweis auf die Funktion des Gens geben. Um Pflanzen zu finden, in denen *AtCMPG1* bzw. *AtCMPG2* nicht exprimiert werden, wurden zwei Mutantenpopulationen durchmustert. Beide Populationen basieren auf *Arabidopsis*-Pflanzen, die mit Transposons mutagenisiert wurden.

Die Population von Ellen Wisman

Die *Arabidopsis*-Population von Ellen Wisman (Ökotyp Col-0) besteht aus 8000 Linien, die mit dem *En-1*-Transposon aus *Zea mays* mutagenisiert worden waren. In jeder Pflanze sind mehrere Transposons integriert, so dass in der Population insgesamt ca. 48000 unabhängige Transposon-Integrationen vorliegen (Wisman *et al.*, 1998).

Die Durchmusterung der Population erfolgte in PCR-Ansätzen mit DNA, die aus Mutantepools isoliert worden war. In der PCR wurden genspezifische und Transposon-spezifische Primer eingesetzt und auf diese Weise die Transposon-flankierenden Bereiche amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einer DNA-Blot-Analyse mit *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-spezifischen Sonden hybridisiert. Das PCR-*screening* und die DNA-Blot-Analyse wurde von ZIGIA (Zentrum zur Identifikation von Genfunktionen durch Insertionsmutagenese bei *Arabidopsis thaliana*) am hiesigen Institut durchgeführt.

Für keines der beiden Gene wurden spezifische PCR-Produkte erhalten. In dieser Population sind demzufolge höchstwahrscheinlich keine Transposons in den kodierenden Sequenzen von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* inseriert.

Die SLAT-Population

Die auf *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0) basierende SLAT-Population (Sainsbury Laboratoy Arabidopsis thaliana dSpm Transposants) wurde in der Gruppe von Jonathan Jones (Sainsbury Laboratory, John Innes Center, Norwich, UK) hergestellt. Die Population wurde mit dem Spm-dSpm-System erstellt (Tissier *et al.*, 1999). Bereits in der ersten Generation nach Mutagenisierung erfolgte eine Deletion der Transposase. Dies verhindert die autonome Exzision und Re-Insertion des Transposons, so dass in der Regel in jeder Mutantenlinie lediglich eine Kopie des Transposons vorliegt. Dies stellt einen überaus großen Vorteil gegenüber der Population von Ellen Wisman dar, in der neben bis zu 25 Transposons (durchschnittlich 10) zahllose *footprints* in jeder Pflanzenlinie vorliegen können, die von Exzisionsvorgängen der Transposons in früheren Generationen stammen.

Die SLAT-Population besteht aus 43200 unabhängigen Linien, die zu *subpools* mit je 50 Linien zusammengefasst wurden. Jeweils 48 *subpools* wurden zu insgesamt 18 *superpools* zusammengefasst. Dies entspricht 43200 (18×48×50) Linien.

Die Hybridisierung eines SLAT-Filters (Nr. MM36) mit einer DIG-markierten *AtCMPG1*-cDNA ergab zwei schwache Signale, die dem aufgetragenen Schema zufolge einem *pool* zugeordnet werden konnten (Abb. 3.20). Der Filter wurde vor der Hybridisierung mindestens viermal mit diversen Sonden hybridisiert. Dies erklärt die schwachen *AtCMPG1*-spezifischen Signale und den starken Hintergrund. Die auf dem Filter fixierten Marker waren von vorangegangenen Hybridisierungen noch ausreichend zu erkennen. Mit Hilfe dieser Marker war eine eindeutige Zuordnung der erhaltenen Signale zu dem DNA-*pool* 03/36 (*superpool/subpool*) möglich.

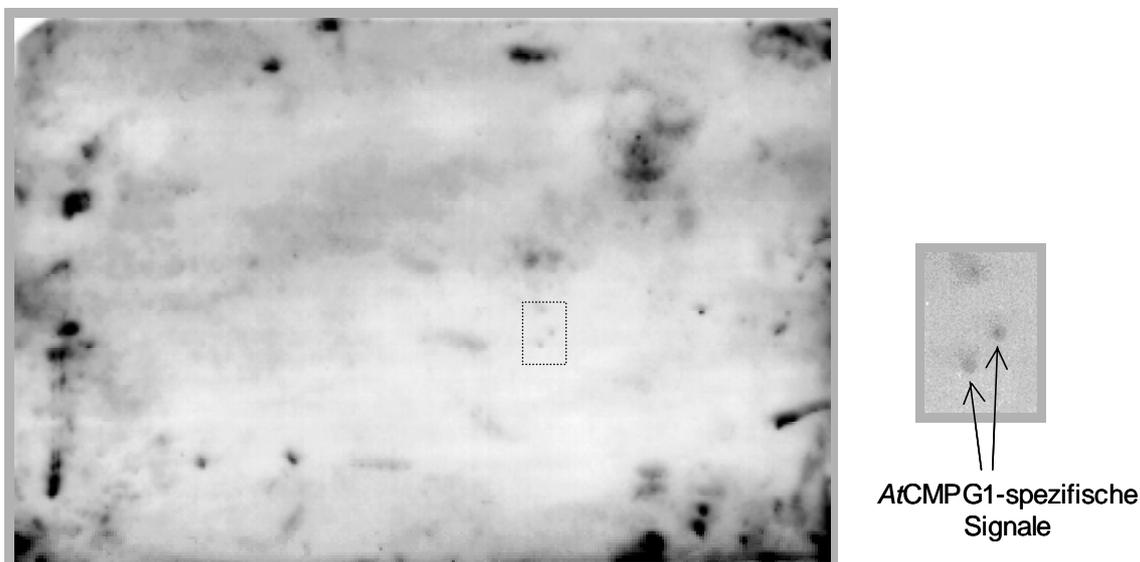


Abb. 3.20. SLAT-Filter zur Isolierung einer *AtCMPG1*-Nullmutante

Ein SLAT-Filter (Nr. MM86) wurde mit einer DIG-markierten *AtCMPG1*-cDNA hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm nach der Hybridisierung. Das rechte Bild stellt eine Vergrößerung des im linken Bild markierten Bereichs dar.

DNA und Samen dieses 50 unabhängige Linien umfassenden *pools* wurden bei dem Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.nott.ac.uk/>) bestellt. PCR-Reaktionen mit vier Transposon-spezifischen und vier genspezifischen Primern in allen möglichen Kombinationen auf dieser *pool*-DNA ergaben deutliche Banden und zeigten, dass das Transposon in revertierter Orientierung im vorderen Drittel der kodierenden Sequenz inseriert ist (Daten nicht gezeigt). Dieses Wissen ermöglichte ein deutlich einfacheres PCR-*screening* der Pflanzen.

Circa die Hälfte der Samen (719) wurde in Erde ausgesät. Nach acht Tagen erfolgte eine BASTA-Selektion (Wirkstoff: Glufosinat; Gebrauchslösung: 250 mg Glufosinat/l, 0,1 % Tween 20), die nach zwei weiteren Tagen wiederholt wurde. Die Selektion überlebten 643 Pflanzen (10,6 % Nichtüberlebende, d. h. keine Insertion tragende Pflanzen). Von diesen 643 Pflanzen wurde Blattmaterial für PCR-Reaktionen und Samen geerntet. Mit genomischer DNA dieser Pflanzen wurden PCR-Reaktionen durchgeführt. Nach 324 gesichteten Pflanzen wurde eine Pflanze identifiziert, in der in dem *AtCMPG1*-Gen ein Transposon inseriert ist. Samen dieser Pflanze wurden erneut ausgesät und genomische DNA aus Blättern isoliert. Die Sequenzierung von PCR-Produkten bestätigte die Insertion des Transposons 430 bp stromabwärts von Startcodon, dies entspricht der Position 1700 bezogen auf die in Anhang 1 aufgeführte genomische Sequenz.

Die in dem PCR-screen detektierte Pflanze war heterozygot in Bezug auf die Transposoninsertion, so dass neben homo- und heterozygoten Insertionslinien auch Pflanzen ohne Transposoninsertion erhalten wurden. Da der genetische Hintergrund der SLAT-Population Columbia-0 ist und bei der Generierung der Insertionslinien keine footprints entstanden sein sollten, sollte der genetische Hintergrund der *AtCMPG1*-Nullmutante dem der Überexpressionslinien entsprechen. Dennoch wurde für Phänotypanalysen sowohl Wildtyppflanzen als auch Linien, die aus der Aufspaltung der heterozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante erhalten wurden, parallel angezogen. Die aus der SLAT-Population entstandene Wildtyplinie wird im folgenden als SLAT-WT bezeichnet.

Zur Bestimmung der Insertionszahl des Transposons wurde eine genomische DNA-Blot-Analyse durchgeführt. Genomische DNA von drei aus der Aufspaltung einer heterozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante erhaltene homozygote Nullmutanten (Linien 5, 14 und 20) wurde parallel zum SLAT-WT mit den Restriktions-Endonukleasen *Bam*HI und *Eco*RI verdaut. Die Hybridisierung des Blots mit einer *En-1*-spezifischen Sonde ergab für die Nullmutanten jeweils nur ein Signal, wohingegen in den WT-Pflanzen kein Signal detektiert wurde (Abb. 3.21). Demzufolge liegt in der Mutante lediglich eine Insertion des Transposons vor.

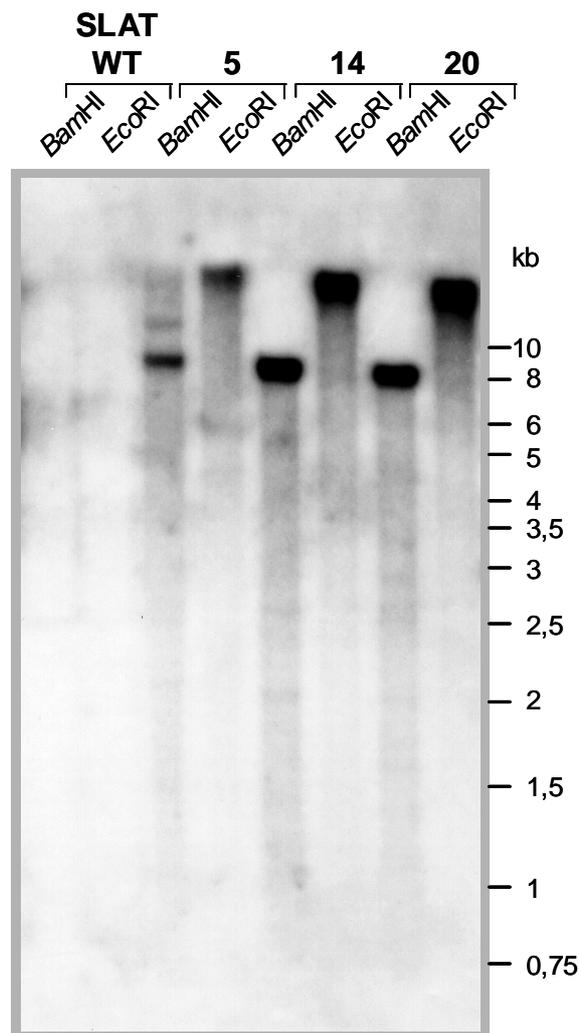


Abb. 3.21. DNA-Blot-Analyse von homozygoten *AtCMPG1*-Nullmutanten

Es wurden 9 µg genomische DNA von drei homozygoten *AtCMPG1*-Nullmutanten (Linien 5, 14 und 20) sowie von Wildtyppflanzen mit den angegebenen Restriktions-Endonukleasen verdaut, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung des Blots erfolgte mit einer *En-1*-spezifischen Sonde. Dargestellt ist das Autoradiogramm nach der Hybridisierung. SLAT-WT: Die nach Aufspaltung der heterozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante erhaltene Wildtyplinie aus der SLAT-Population.

Um zu untersuchen, ob es sich bei der *AtCMPG1*-Insertionslinie wirklich um eine Nullmutante handelt, wurden in Blätter der *AtCMPG1*-Insertionslinie sowie in beide Wildtypllinien (Wildtyppflanzen und SLAT-WT, vgl. vorherige Seite) virulente *Pseudomonaden* (*Pst* DC3000) mit einem Titer von 10^8 cfu/ml $MgCl_2$ per Spritze infiltriert. Nach 45 min wurde aus diesen Blättern sowie aus unbehandelten Blättern Gesamt-RNA isoliert und in einer RNA-Blot-Analyse die *AtCMPG1*-Expression untersucht (Abb. 3.22). Zum

Vergleich der Expressionsstärke wurde auf den gleichen Blot Gesamt-RNA von drei *AtCMPG1*-Überexpressionslinien sowie aus unsteril angezogenen Wurzeln aufgetragen (vgl. Abb. 3.19 und Abb. 3.6). In beiden Wildtyplinien war eine deutliche mRNA-Akkumulation nach Infiltration von *Pseudomonaden* festzustellen. In den Spuren der nicht induzierten und induzierten *AtCMPG1*-Nullmutante war hingegen kein Signal detektierbar. Somit ist das Expressionsniveau zumindest sehr stark reduziert und es liegt sehr wahrscheinlich eine wirkliche Nullmutante vor.

Die Expressionsstärke im Wildtyp lag nach Pathogenbefall auf einem ähnlichen Niveau wie die Expression in unsteril gewachsenen Wurzeln, wohingegen die Überexpression in allen drei Linien zu einer wesentlich stärkeren *AtCMPG1*-Expression führte als in Wildtyppflanzen nach Pathogenbefall.

Die Hybridisierung des SLAT-Filters mit einer *AtCMPG2*-cDNA ergab keine spezifischen Signale, so dass für *AtCMPG2* auch in dieser Population keine Nullmutante gefunden werden konnte.

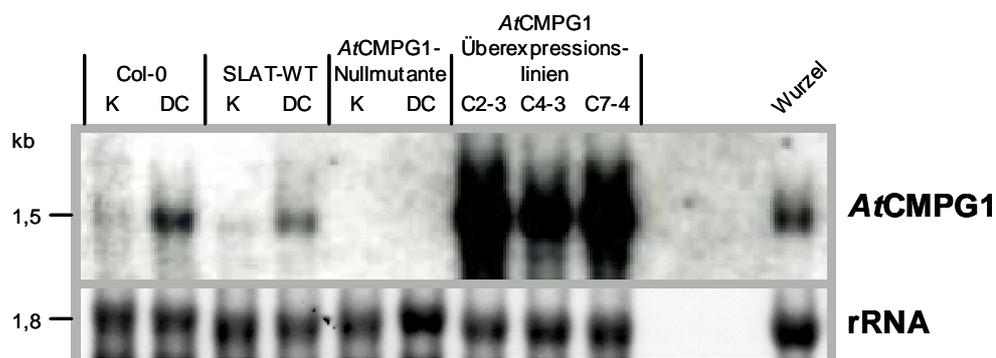


Abb. 3.22. Vergleich der *AtCMPG1*-Expression in Wurzeln, pathogen-induzierten Blättern, *AtCMPG1*-Überexpressionslinien und in der *AtCMPG1*-Nullmutante

Arabidopsis-Blätter von WT-Linien und der *AtCMPG1*-Nullmutante wurden mit *Pst* DC3000 (10^8 cfu/ml $MgCl_2$) infiltriert. Die Blätter wurden nach 45 min abgeschnitten und Gesamt-RNA isoliert. Jeweils 10 μ g Gesamt-RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer *AtCMPG1*-spezifischen Sonde hybridisiert. Dargestellt ist das Autoradiogramm nach der Hybridisierung. K: Kontrolle, unbehandelte Pflanzen; DC: Infiltration mit *Pst* DC3000; Col-0: *Arabidopsis* (Ökotyp Col-0); SLAT-WT: die nach Aufspaltung der heterozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante erhaltene WT-Linie aus der SLAT-Population;

3.4.5 Phänotypanalyse der *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien und der *AtCMPG1*-Nullmutante

Die in den vorherigen Kapiteln beschriebenen *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien und die *AtCMPG1*-Nullmutante wurden im Vergleich zu dem entsprechenden Wildtyp auf Phänotypunterschiede hin untersucht. Die Samen der einzelnen Linien stammten von Pflanzen, die parallel angezogen wurden. Das Alter der Samen, welches einen großen Einfluss auf die Keimrate und Keimdauer hat, unterschied sich also nicht.

Anzucht der Linien unter verschiedenen Lichtlängen und Lichtintensitäten

Die Samen der in Tabelle 3.7 beschriebenen Linien wurden direkt in unbehandelte Minitray-Erde gesät. Pro Pflanztopf (5×5×7 cm) wurden zwei Samen ausgesät. Für jede Linie wurden 15 Töpfe angefertigt, von denen jeweils fünf unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Folgende Bedingungen wurden getestet::

Kurztag (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 250 μ Einstein

Kurztag (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 500 μ Einstein

Langtag (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) mit einer Lichtintensität von 500 μ Einstein

Die meisten Pflanzen gedeihen gut, so dass pro Lichtbedingung und Pflanzenlinie mindestens sieben Pflanzen analysiert wurden. Neben Beobachtung der Keimrate, Keimdauer und Samenmenge wurden die Pflanzen mit bloßem Auge miteinander verglichen. Des Weiteren wurden unter einem Binokular die Blütenmorphologie, Art und Dichte der Trichome und die sich entwickelnden Schoten angeschaut.

Nach diesen Kriterien wurden Unterschiede im Phänotyp nicht festgestellt.

Tab. 3.7. Für Phänotypanalysen eingesetzte Pflanzenlinien

Beschreibung der Linien	Bezeichnung der Linien
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ökotyp Col-0)	Col-0
Die nach Aufspaltung einer heterozygoten <i>AtCMPG1</i> -Nullmutante erhaltenen Wildtyppflanzen	SLAT-WT
<i>AtCMPG1</i> -Überexpressionslinien	C2-3
	C4-3
	C7-4
<i>AtCMPG2</i> -Überexpressionslinien	A5-5
	A7-1
	A12-2
homozygote <i>AtCMPG1</i> -Nullmutante (SLAT)	KO-CMPG1-homoz
heterozygote <i>AtCMPG1</i> -Nullmutante (SLAT)	KO-CMPG1-heteroz

Wurzelwachstumsbeobachtung auf senkrecht stehenden Medienplatten

Aufgrund der starken Wurzelexpression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* wurde das Wurzelwachstum beobachtet. Hierzu wurden oberflächensterilisierte Samen der drei *AtCMPG1*-Überexpressionslinien (vgl. Tab. 3.7), der homozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante, vom SLAT-Wildtyp und von *Arabidopsis* Ökotyp Col-0 in quadratische Schalen der Größe 1,5×23×23 cm (Höhe/Breite/Tiefe) auf MS-Agar unter sterilen Bedingungen ausgesät. In diese Schalen wurden von diesen sechs Linien je zwei Samen 5 cm unterhalb des Schalenrandes auf dem Agar positioniert. Um das Eindringen der Wurzeln in den Agar zu erschweren, wurde anstelle des normalerweise 0,65 bis 0,8%igen Agars ein 1%iger Agar eingesetzt. Die insgesamt sechs Schalen wurden senkrecht an die Seiten der Kulturschränke gestellt. Es wurden die gleichen Lichtbedingungen gewählt wie zuvor beschrieben (Langtag, 500 μ Einstein, Kurztag 250 und 500 μ Einstein). Nach 3 ½ Wochen schwankte die Wurzellänge zwischen 8 und 18 cm. Die Schwankungen waren jedoch bei allen Linien ähnlich. Auch unter einem Binokular wurden keine Unterschiede zwischen den einzelnen Linien festgestellt.

Verfolgung des Wachstums von Pseudomonaden im Columbia 0-Wildtyp, *AtCMPG1*-Überexpressionslinien und in der *AtCMPG1*-Nullmutante in der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion mit Pseudomonaden

Die Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen angezogen, um bei der Plattierung der aus den Pflanzen isolierten Bakterien möglichst wenig pilzliche und bakterielle Kontaminationen zu haben, die eine Auszählung der Kolonien erschweren.

Samen der drei *AtCMPG1*-Überexpressionslinien (Tab. 3.7), der homozygoten *AtCMPG1*-Nullmutante und vom Wildtyp wurden in Weckgläser auf 0,8%igem MS-Agar ausgesät. Pro Weckglas wurden sieben Samen einer Linie auf den Agar gelegt. Nach einer Wachstumszeit von 25 Tagen unter Langtagbedingungen bei 500 μ Einstein wurden die Pflanzen mit einer Pseudomonaden-Suspension, die auf einen Titer von 1×10^3 cfu/ml verdünnt worden war, vakuum-infiltriert. Zur Titerkontrolle wurden sechs verschiedene Volumina von beiden Bakterienstämmen auf Kings B-Medium plattiert und nach einer Inkubation bei 30°C die Kolonien ausgezählt. Die Abweichungen vom theoretischen Wert betragen bis zu 40 %, wobei sowohl weniger als auch mehr Kolonien gezählt wurden als theoretisch erwartet.

Als Nullwert wurden je Pseudomonaden-Stamm zwei Weckgläser mit Wildtyppflanzen infiltriert und die Pseudomonaden sofort nach der Infiltration aus den Blättern isoliert (Kap. 2.9). Die Plattierung der isolierten Pseudomonaden ergab, dass pro cm² Blattfläche zehn Pseudomonaden infiltriert wurden. Aus den infiltrierten Pflanzen wurden nach 12, 24, 48 und 72 Stunden die Pseudomonaden isoliert, in fünf verschiedenen Verdünnungen

plattiert und die Kolonien von mindestens zwei Verdünnungsstufen gezählt. Sowohl in der kompatiblen als auch in der inkompatiblen Interaktion war ein schnelles und sehr starkes Bakterienwachstum zu beobachten. In Abb. 3.23 ist das Bakterienwachstum in halblogarithmischer Auftragung dargestellt. Nach 72 Stunden wurde ein Titer von 10^7 bis 10^8 cfu/cm² Blattfläche erreicht und die Phase exponentiellen Wachstums noch nicht verlassen. Das Bakterienwachstum in den verschiedenen Linien war in beiden Interaktionen nahezu identisch. Zum Teil lagen Unterschiede bis zur Größenordnung von einer Zehnerpotenz vor, diese Unterschiede waren jedoch sehr wahrscheinlich experimentell bedingt, da sich die drei unabhängigen AtCMPG1-Überexpressionslinien nicht konsistent verhielten (Abb. 3.23 A, kompatible Interaktion, 48 h). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Linien waren in der inkompatiblen Interaktion deutlich geringer als in der kompatiblen Interaktion (Abb. 3.23 A und B). Der Vergleich beider Interaktionen (Abb. 3.23 C) zeigt, dass die virulenten Bakterien in den ersten zwei Tagen deutlich schneller wuchsen als die avirulenten Bakterien. Der Unterschied betrug ein bis zwei Zehnerpotenzen. Nach drei Tagen war der Unterschied zwischen den beiden Interaktionen jedoch nur noch gering.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen weder die stark vermehrte noch die fehlende AtCMPG1-Expression einen Einfluss auf das Wachstum von Pseudomonaden zu haben scheint.

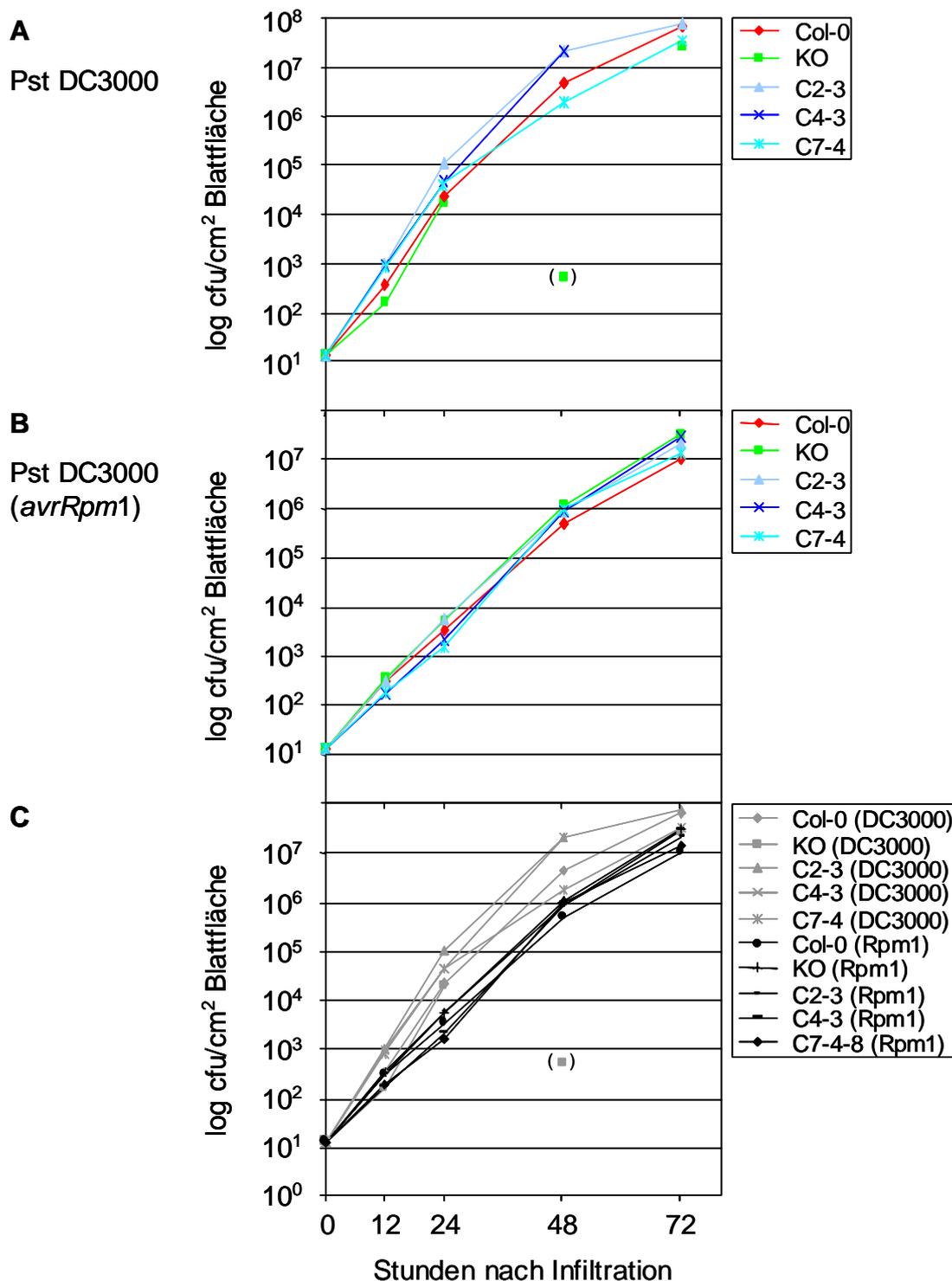


Abb. 3.23. Wachstum von virulenten und avirulenten Pseudomonaden in Wildtyppflanzen, AtCMPG1-Überexpressionslinien und in der AtCMPG1-Nullmutante

Steril angezogene Pflanzen verschiedener Linien (Tab. 3.7) wurden 25 Tage nach Aussaat mit virulenten oder avirulenten Pseudomonaden mit einem Titer von 10^3 cfu/ml vakuum-infiltriert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Bakterien aus den Blättern isoliert und auf Kings B-Medium plattiert. Dargestellt sind in halblogarithmischer Auftragung die Wachstumskurven der Bakterien in den einzelnen Pflanzenlinien. **A:** Infiltration mit Pst DC3000; **B:** Infiltration mit PstDC3000 (*avrRpm1*); **C:** gemeinsame Darstellung beider Interaktionen; DC3000: Infiltration der jeweiligen Linien mit Pst DC3000; Rpm1: Infiltration der jeweiligen Linien mit PstDC3000 (*avrRpm1*)

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Mitglieder aus dem Genom von *Arabidopsis thaliana* einer zuvor nicht beschriebenen Genfamilie bezüglich ihrer Expression und Regulation untersucht. Als Ausgangspunkt der Arbeit diente das Petersiliegen *PcEli17*, das nach Pathogenbefall sehr schnell und transient induziert wird (Kirsch *et al.*, 2001). Wegen dieses bemerkenswerten Expressionsverhaltens besteht großes Interesse, sowohl die Regulation als auch die Funktion dieses Gens aufzuklären. Petersilie bietet für derartige Untersuchungen jedoch nur einen begrenzten experimentellen Zugriff. Das Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist hingegen sequenziert, und neben den existierenden Mutantenpopulationen stellt auch die leichte Transformierbarkeit einen großen Vorteil gegenüber Petersilie dar (Bent, 2000; Bevan *et al.*, 2001; Initiative, 2000; Rhee, 2000). Die genannten Aspekte gaben Anlass, in dem Genom von *Arabidopsis thaliana* nach Genen zu suchen, die eine Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* aufweisen, einer ähnlichen Regulation unterliegen und eine ähnliche, möglichst sogar die gleiche Funktion ausüben.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Analyse von *AtCMPG1* und *AtCMPG2*, die zu Beginn der Arbeit die in den Datenbanken ganz oder teilweise verfügbaren Gene mit der größten Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* waren. Die genomische Sequenz von *AtCMPG1* wurde durch das Durchmustern einer BAC-Bibliothek mit einer publizierten EST-Sequenz als Sonde und Sequenzierung der erhaltenen Klone gewonnen. Die Sequenz von *AtCMPG2* war bereits vollständig in Datenbanken veröffentlicht. Neben Promotor- und Expressionsanalysen stellten Versuche zur Funktionsaufklärung einen wichtigen Aspekt dar. Letzteres geschah durch die Herstellung und Analyse transgener Pflanzen, die Promotor::Reportergenkonstrukte enthielten oder in denen das ursprüngliche Expressionsniveau erhöht bzw. erniedrigt war.

Nach einer phylogenetischen Einordnung der CMPG-Genfamilie wird die Frage diskutiert, ob Mitglieder dieser Genfamilie als transkriptionelle Regulatoren wirken können.

4.1 **AtCMPG1 und AtCMPG2 werden nach Pathogenbefall schnell und transient induziert**

Expression in einer elizitierten Zellkultur

Die Zugabe eines geeigneten Elizitors zu einer Zellkultur und eine nachfolgende RNA-Blot-Analyse ermöglichten bereits in vielen Fällen eine schnell zu erhaltende Aussage bezüglich der Pathogeninduzierbarkeit einzelner Gene (Durrant *et al.*, 2000; Hahlbrock *et al.*, 1995; Takezawa, 1999; Takezawa, 2000).

Sowohl für *AtCMPG1* als auch für *AtCMPG2* wurde in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur nach Zugabe eines aus Zellwänden des Pilzes *Phytophthora sojae* isolierten Rohextraktes (Pmg-Rohelizitor), eine sehr schnelle Transkriptakkumulation festgestellt. Die maximale *AtCMPG1*-mRNA-Menge wurde bereits 30 Minuten nach Zugabe des Elizitors erreicht. Nach einer Stunde lagen nur noch 33 % und nach zwei Stunden lediglich 20 % der maximalen mRNA-Menge vor. Das Maximum der *AtCMPG2*-mRNA-Akkumulation lag ebenfalls bei 30 Minuten, jedoch bei einer im Vergleich zu *AtCMPG1* erhöhten Grundaktivität (Abb. 3.7). Die maximale *PcEli17*-mRNA-Menge wurde in einer Petersilie-Zellsuspensionskultur nach Zugabe des Peptidelizitors Pep25 - eines 25 Aminosäuren langen Peptids eines 42 kDa Glykoproteins aus dem Pilz *Phytophthora sojae* - erst nach einer Stunde erreicht (Kirsch *et al.*, 2001). Nach zwei Stunden waren noch 80 % der maximalen mRNA-Menge nachweisbar, im Vergleich zu 20 % bei *AtCMPG1*. Für die Petersilie-Zellkultur wurde der Peptidelizitor Pep25, für die *Arabidopsis*-Zellkultur der Pmg-Rohelizitor eingesetzt. Die drei Gene *PcEli17*, *AtCMPG1* und *AtCMPG2* werden in den entsprechenden Untersuchungssystemen offensichtlich nicht nur sehr schnell durch Elizitor induziert, sondern alsbald auch wieder herunterreguliert.

Um auszuschließen, dass die in der Zellkultur beobachtete Elizitorinduzierbarkeit von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* durch Besonderheiten in der Zellkultur bedingt ist (Kap. 1.4), wurden beide Gene darüber hinaus in dem Pathosystem *Arabidopsis* / *Pseudomonas syringae* auf eine Pathogeninduzierbarkeit hin überprüft.

Expression in dem Pathosystem *Arabidopsis* / *Pseudomonas syringae*

Die in dem Zellkultursystem aufgezeigte sehr schnelle und transiente Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* konnte analog auch in einer komplexen Pflanze-Pathogen-Interaktion nachgewiesen werden. Aus den Analysen der mit einem pilzlichen Elizitor

behandelten Zellkultur kann gefolgert werden, dass auch in der Interaktion von pflanzenpathogenen Pilzen mit *Arabidopsis*-Pflanzen die Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* induziert wird. Aus diesem Grund wurde ein bakterielles Pathosystem eingesetzt, um so - neben einer bloßen Bestätigung der Zellkulturergebnisse - eine Aussage darüber zu erhalten, ob *AtCMPG1* und *AtCMPG2* an einer eher allgemeinen Pathogenabwehr oder an spezifischeren Abwehrfunktionen beteiligt sind.

Darüber hinaus stellt die Nutzung eines bakteriellen Pathogens im Vergleich zu pilzlichen bzw. viralen Pathogenen einen praktischen Vorteil dar. Bakterien lassen sich sehr leicht langfristig bei -80°C lagern und jederzeit schnell vermehren. Einige obligat biotrophe Pilze können hingegen nur sehr mühsam kultiviert werden und verlangen in vielen Fällen eine ständige Aufrechterhaltung der Kulturen. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass Bakterien in einem definierten Wachstumsstadium und mit einem definierten Titer über die Stomata in Blätter infiltriert werden können und die Experimente somit leicht reproduzierbar sind.

Für die Expressionsanalyse von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* wurde das Pathosystem *Arabidopsis* / *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 gewählt (Debener *et al.*, 1991; Grant *et al.*, 2000; Ritter and Dangl, 1995; Whalen *et al.*, 1991). Der natürliche Wirt von *Pseudomonas syringae* pv tomato sind Tomatenpflanzen, in denen die über Stomata oder Wunden in die Pflanzen eindringenden Pseudomonaden die Bakterienblatfleckenkrankheit verursachen (Salmeron *et al.*, 1994). Eine Infektion von *Arabidopsis* mit dem Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 (Pst DC3000) bedingt ebenfalls die Blatfleckenkrankheit. *Arabidopsis*-Pflanzen, die in eine Suspension von virulenten Pseudomonaden mit einem Titer von 2×10^8 cfu/ml 10 mM MgCl_2 getaucht oder mit dieser Suspension besprüht wurden, zeigten Symptome, die denen einer natürlichen Feld-Infektion von Tomaten mit Pst sehr ähnlich sind (Whalen *et al.*, 1991). Die Interaktion von Pst DC3000 mit *Arabidopsis* Ökotyp Columbia-0 ist kompatibel, die Bakterien sind virulent. Der das Avirulenzgen *Rpm1* exprimierende Bakterienstamm Pst DC3000 (*avrRpm1*) ist auf Columbia-0 avirulent, diese Interaktion demzufolge inkompatibel (Ritter and Dangl, 1995; Whalen *et al.*, 1991).

Die Expressionsanalyse nach Infiltration von virulenten oder avirulenten Bakterien in die Pflanze ermöglicht eine Aussage, ob für die untersuchten Gene Expressionsunterschiede zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion vorliegen. Die Kenntnis darüber kann bereits Hinweise auf die Beteiligung an einem oder Regulation durch einen Resistenzgen-abhängigen Signaltransduktionsweg geben.

Es wurden zwei unabhängige Kinetiken angefertigt, in denen jeweils beide Interaktionen untersucht wurden. In der ersten Kinetik wurde die Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in *Arabidopsis*-Blättern zwischen einer halben Stunde und 48 Stunden nach Vakuum-infiltration von Pseudomonaden mittels RNA-Blot-Analysen untersucht. Für diese Kinetik

wurde ein hoher Bakterientiter eingesetzt (Hochtiter: 10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$). Whalen et al. (1991) beschreibt, dass viele Krankheitssymptome erst ab einem Pseudomonaden-Titer von mehr als 5×10^7 cfu/ml beobachtet werden konnten. Für viele in der Literatur beschriebene Expressionsanalysen wurde ein Hochtiter eingesetzt (Gopalan et al., 1996; Grant et al., 2000; Jakobek et al., 1999). In beiden Interaktionen und für beide Gene wurde eine starke mRNA-Akkumulation detektiert. Zwischen der kompatiblen und der inkompatiblen Interaktion konnten nur geringe Expressionsunterschiede nachgewiesen werden (Abb. 3.9). Die mRNA-Maxima beider Gene lagen in der inkompatiblen Interaktion bei 30 Minuten und in der kompatiblen Interaktion bei 60 Minuten nach Pseudomonaden-Infiltration. Für *AtCMPG2* wurde ein stark biphasischer Verlauf festgestellt, der in der inkompatiblen Interaktion deutlicher ausgeprägt ist. Neben dem Hauptmaximum bei 30 bis 60 Minuten lag ein zweites Maximum bei fünf Stunden nach Infiltration. Eine biphasische Expression wurde für *AtCMPG1* nur in der inkompatiblen Interaktion beobachtet und war zudem nur sehr schwach ausgeprägt. Viele Reaktionen auf Pathogenbefall oder Verwundung zeigen einen biphasischen Verlauf. Dies wurde sowohl auf mRNA-Ebene (Batz et al., 1998; Dong et al., 1991; Kirsch et al., 1997a) als auch für Signalmoleküle, wie z. B. Ca^{2+} (Blume et al., 2000), H_2O_2 (Dorey et al., 1999; Jabs et al., 1997) und Jasmonsäure (Laudert and Weiler, 1998) beschrieben.

Für die zweite Kinetik wurden sowohl virulente als auch avirulente Pseudomonaden jeweils mit einem Niedrigtiter (10^6 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$) und einem Hochtiter (10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$) in Blätter infiltriert und die Blätter zwischen 10 und 60 Minuten nach Infiltration geerntet. Die Infiltration erfolgte mit einer stumpfen Spritze, wobei die Pflanzen zuvor gut gewässert und mit Wasser besprüht waren. Trotz dieser Maßnahmen, die eine leichtere Infiltration über die geöffneten Stomata ermöglichen sollten, stellte sich heraus, dass diese Art der Infiltration eine stärkere Verwundung verursachte als die Vakuum-Infiltration bei der Langzeitkinetik. Es konnte zwar eine mRNA-Akkumulation und eine Pathogenresponsivität sowohl für *AtCMPG1* als auch für *AtCMPG2* nachgewiesen werden, jedoch stiegen auch die mRNA-Mengen in den mit einer 10 mM $MgCl_2$ -Lösung infiltrierten Pflanzen deutlich an. Mit der Hochtiter-Infiltration konnte in den mit Pseudomonaden infiltrierten Pflanzen eine deutlich stärkere mRNA-Akkumulation von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* im Vergleich zu den Kontrollen gezeigt werden. Die mRNA-Maxima beider Gene lagen bei 20 bis 30 Minuten nach Infiltration. Die Pseudomonaden-Infiltration mit dem niedrigen Titer ergab im Vergleich zur Kontrolle keine signifikant stärkeren Signale. Dies zeigte, dass ein hoher Pseudomonadentiter für eine starke Induzierbarkeit von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* notwendig war. Unterschiede zwischen der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion wurden in der Kurzzeitkinetik nicht beobachtet. Titerbedingte Expressionsunterschiede wurden ebenfalls

von Dong *et al.* (1991) beobachtet. Sie zeigten, dass die Responsivitäten auf einen hohen (10^7) bzw. niedrigen Pseudomonaden-Titer (10^6 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$) von Gen zu Gen deutlich variierten. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) aus *Arabidopsis* wurde stark durch eine Hochtiter-Infiltration, hingegen nur sehr schwach durch eine Niedrigtiter-Infiltration induziert. Der Unterschied bei zwei verschiedenen β -1,3-Glucanasen aus *Arabidopsis* war dagegen kaum signifikant (Dong *et al.*, 1991).

Die Annahme, dass eine Infiltration mit einer Spritze eine wundinduzierte Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* zur Folge hat, wurde mit den Promotor::GUS-Pflanzen bestätigt. Eine Spritzen-vermittelte Infiltration virulenter und avirulenter Pseudomonaden mit einem Titer von 10^8 cfu/ml 10 mM $MgCl_2$ führte sowohl mit beiden Pseudomonaden-Stämmen als auch mit der $MgCl_2$ -Infiltration zu einer starken Reportergenaktivität. Nur selten wurde eine stärkere GUS-Aktivität in Pseudomonaden-infiltrierten Blättern beobachtet.

Die starke Wundresponsivität von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* erschwert weitere Experimente mit den Promotor::GUS-Linien. Eine Infiltration diverser Elizitoren und Signalmoleküle ermöglichte eine Aussage über Beteiligungen von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* an Signalkaskaden. Eine einfache Blätterinfiltration dieser Substanzen mit einer Spritze erscheint jedoch nicht sinnvoll, da die Verwundungseffekte zu stark variieren. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit Experimente dieser Art nicht durchgeführt.

Ein Vergleich zu weiteren elizitor-induzierbaren Genen verdeutlicht die sehr schnelle und transiente Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2*. Expressionsmuster vieler Gene werden in der Literatur als transient beschrieben. Der Bezeichnung transient sagt jedoch nur wenig über die Zeitdauer der Expression aus. Von allen induzierbaren Genen wird irgendwann die Transkriptmenge wieder reduziert, so dass die Bezeichnung transient nur für Gene benutzt werden sollte, deren mRNA-Mengen relativ schnell reduziert werden. Als Bezugspunkt können Expressionen herangezogen werden, die durch einen vergleichbaren Stimulus aktiviert wurden. Es macht wenig Sinn, eine für Pathogenreaktionen mäßig transiente Expression in Vergleich zu setzen mit einer Expression, die zwar später als diese, dafür aber für diesen spezifischen Stimulus ungewöhnlich früh herunterreguliert wird.

Die in Publikationen als transient induziert beschriebenen Gene zeigen eine beginnende Transkriptmengenreduktion nach 15 Minuten (Arteca and Arteca, 1999; Salinas-Mondragon *et al.*, 1999) bis mehreren Stunden (Durrant *et al.*, 2000; Kirsch *et al.*, 1997b; Laudert *et al.*, 1996; Somssich *et al.*, 1989), wobei die Gene, die den transientesten Expressionsverlauf zeigen, wundinduzierbare Gene sind.

Es wurden in der Literatur keine Beschreibungen von pathogen-induzierbaren Genen gefunden, deren mRNA-Mengen vergleichbar schnell und transient akkumulieren wie *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-mRNA.

Viele Gene, die sehr schnell transkriptionell aktiviert werden, werden als *immediate-early*-Gene bezeichnet. Im strengen Sinne gilt diese Bezeichnung nur für Gene, die auch in Anwesenheit von Proteinsynthese-Inhibitoren (z. B. Cycloheximid) eine Transkript-Akkumulation aufweisen (Durrant *et al.*, 2000). Oft werden jedoch auch Gene als *immediate-early* charakterisiert, ohne den Einfluss von Proteinsynthese-Inhibitoren analysiert zu haben. Als Kriterium wird dann eine Genaktivierung innerhalb einer Stunde nach Ausübung des Stimulus herangezogen (Hara *et al.*, 2000). Auch wenn für *AtCMPG1* und *AtCMPG2* keine Expressionsanalysen in Anwesenheit von Proteinsynthese-Inhibitoren durchgeführt wurden, könnten diese beiden Gene aufgrund ihrer ungewöhnlich schnellen mRNA-Akkumulation als *immediate-early* bezeichnet werden.

Die Aktivierung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* ist in der untersuchten Pflanze-Pathogen-Interaktion vergleichbar schnell wie in der elizitierten Zellkultur. Der für die Aktivierung beider Gene notwendige hohe Pseudomonadentiter, die Schnelligkeit der Genaktivierung und der nur sehr geringe Expressionsunterschied zwischen der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion lassen den Schluss zu, dass für die Genaktivierung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* allein die Anwesenheit der Bakterien und der damit einhergehende Stress hinreichend sind und die über das Hrp Typ III Sekretionssystem in die Pflanzenzelle übertragenen Pathogenitätsfaktoren keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen (Collmer *et al.*, 2000; Gopalan *et al.*, 1996; Guttman and Greenberg, 2001).

Eine Genaktivierung kann eventuell bereits durch die in der Bakterienmembran verankerten Geißeln ausgelöst werden. Das Hauptprotein der Geißelfilamente ist Flagellin (Schlegel, 1992). Ein 22 Aminosäuren langes Peptid dieses Proteins (Flg22) wurde von Felix *et al.* als ein starker Elizitor charakterisiert (Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Eine Aktivierung von *AtCMPG1* durch Flg22 wurde in den mit *AtCMPG1*-Promotor::*GUS*-Fusionskonstrukten transfizierten *Arabidopsis*-Protoplasten gezeigt.

Zu den schnellsten nachweisbaren Reaktionen der Pflanze auf einen Pathogenbefall oder eine Infiltration von Elizitoren gehört die Veränderung von Ionenströmen, die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (*oxidative burst*) (Lamb and Dixon Richard, 1997) sowie ein Anstieg von freiem Calcium (Ca^{2+}) im Cytosol (Blumwald *et al.*, 1998). Diese Reaktionen wurden für die ersten 30 Minuten nach Stimulierung nachgewiesen. Viele Modelle postulieren, dass diese Reaktionen eine Voraussetzung für Genaktivierungen darstellen (Blume *et al.*, 2000; Blumwald *et al.*, 1998; Hahlbrock *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997; Nürnberger *et al.*, 1994). Die Aktivierung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* erfolgte ebenso schnell wie die zuvor beschriebenen Reaktionen. Sofern eine Beteiligung von *AtCMPG1* und

AtCMPG2 an einem Signaltransduktionsweg vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass sie auf einer sehr frühen Ebene innerhalb der Signaltransduktionskaskade mitwirken.

Gewebespezifische Expression

Die stärkste Expression wurde für *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in Wurzeln und in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur beobachtet. In oberirdischen Pflanzenteilen war eine Expression beider Gene in gesunden, nicht infizierten Pflanzen mittels RNA-Blot-Analysen nicht nachweisbar. Lediglich in seneszenten Blättern konnte eine schwache Expression beider Gene detektiert werden. Für beide Gene wurde in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur eine ähnlich starke Expression wie in Wurzeln festgestellt (Abb. 3.6). Die Wurzeln, in denen die sehr starke *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Expression beobachtet wurde, stammten von in unsteriler Erde angezogenen Pflanzen. Um auszuschließen, dass die Expression von den Wachstumsbedingungen oder durch das Auswaschen der Wurzeln von der sie umgebenden Erde verursacht wurde, wurden sterile Flüssigkulturen angelegt. Von diesen Kulturen konnten Wurzeln innerhalb von 20 bis 30 Sekunden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Diese Zeit reicht für eine in RNA-Blot-Analysen detektierbare Transkriptakkumulation nicht aus. Die eukaryotische RNA-Polymerase I hat eine Syntheserate von 30 Nukleotiden pro Sekunde (Knippers, 1995). Eine ähnliche Syntheserate für die RNA-Polymerase II angenommen, werden für die Synthese der ungefähr 1500 bp langen *AtCMPG1*-mRNA demzufolge 50 Sekunden benötigt. Da das Gen *AtCMPG1* in nur einer Kopie im *Arabidopsis*-Genom vorliegt und die im Abstand von circa 100 bp folgenden RNA-Polymerasen entsprechend zeitversetzt die Synthese beenden, können innerhalb von 20 bis 30 Sekunden keine oder nur einige wenige mRNA-Moleküle gebildet werden. Unter diesen Umständen kann ausgeschlossen werden, dass bei der Ernte von Wurzeln aus sterilen Flüssigkulturen entstandene mRNA-Akkumulationen durch RNA-Blot-Analysen nachweisbar sind.

Die für *AtCMPG1* durchgeführte RNA-Blot-Analyse zeigte, dass in Wurzeln von sterilen Flüssigkulturen keine Expression zu detektieren war, wohingegen das Petersiliegen *PcEli17* in Wurzeln unsteril als auch steril angezogener Pflanzen exprimiert ist (Kirsch *et al.*, 2001). Eine Ursache für die starke *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Expression in den unter unsterilen Bedingungen gewachsenen Wurzeln kann ein Kontakt zu potenziellen Wurzelpathogenen sein. Eine andere Ursache kann in dem gründlichen Waschen der Wurzeln vor der RNA-Isolierung liegen. Die unvermeidbare Verwundung der sehr feinen Wurzeln kann bereits innerhalb weniger Minuten eine sehr starke Genexpression verursachen. Für viele wundinduzierte Gene wurde gezeigt, dass bereits wenige Minuten nach Verwundung ein

deutlicher Anstieg der Genexpression festzustellen ist (Arteca and Arteca, 1999; Hara *et al.*, 2000; Reymond *et al.*, 2000). Das am schnellsten transkriptionell aktivierte Gen ist *wipk* (wundinduzierte Protein-Kinase), ein zu MAP-Kinasen homologes Gen aus Tabak, für das bereits eine Minute nach Verwundung eine mRNA-Akkumulation mittels RNA-Blot-Analysen nachgewiesen werden konnte (Seo *et al.*, 1995). Die Gene, für die die schnellsten Transkriptmengenreduktionen beschrieben wurden, sind ebenfalls wundinduzierte Gene. Einige Gene waren bereits 30 Minuten nach Verwundung wieder auf dem Basis-Level (Salinas-Mondragon *et al.*, 1999) bzw. nach 60 Minuten in RNA-Blot-Analysen nicht mehr detektierbar (Arteca and Arteca, 1999). In einer ausführlichen Literaturrecherche wurden keine Beschreibungen pathogen-induzierter Gene gefunden, die derart schnell reagieren. Es scheint also, dass eine Verwundung eine deutlich schnellere transkriptionelle Aktivierung verursacht, als dies bei Pathogenkontakt der Fall ist.

Verwundungsexperimente transgener Promotor::*GUS*-Linien zeigten, dass sowohl *AtCMPG1* als auch *AtCMPG2* stark wundinduzierbar sind (Abb. 3.15 B). Dies stützt die Annahme, dass die beobachtete Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in den in Erde gewachsenen Wurzeln wahrscheinlich durch eine Verwundung der Wurzeln bei der Ernte bedingt ist.

In Wurzeln der Promotor::*GUS*-Fusionslinien wurde ebenfalls eine starke Reporter-genaktivität festgestellt. Für *AtCMPG1* vermittelten die beiden mit dem *uidA*-Gen translational fusionierten 1279 bp bzw. 338 bp lange Promotorfragmente eine starke *GUS*-Aktivität in Wurzeln. Entsprechendes wurde für das 1502 bp lange Promotorfragment des *AtCMPG2*-Promotors gezeigt. Die *GUS*-Färbung wurde sowohl mit 7 als auch 14 Tage alten Keimlingen, die auf MS-Selektionsplatten angezogen wurden, durchgeführt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei dem Herausziehen der Keimlinge aus dem Agar eine Verwundung der Wurzeln stattgefunden hat. Trotz der sofort folgenden Vakuum-Infiltration mit der *GUS*-Färbelösung kann die beobachtete Blaufärbung der Wurzeln auf diese Verwundung zurückzuführen sein.

Wie bereits erwähnt, war die Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur annähernd so stark wie in Wurzeln von in unsteriler Erde gewachsenen Pflanzen (Abb. 3.6). Ein Zusammenhang besteht möglicherweise in dem oft festgestellten Wurzelcharakter dieser Zellkultur (I. Somssich, pers. Mitteilung). Wobei aus den Ergebnissen der RNA-Blot-Analysen die Schlussfolgerung gezogen wurde, dass die beobachtete Wurzelexpression auf eine Verwundung zurückzuführen war. Die Kultivierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen, so dass – vorausgesetzt die Zellkultur reagiert in dieser Hinsicht ähnlich wie Wurzeln - keine oder nur eine schwache Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* zu erwarten war. Andere Stimuli, die die starke Expression von

AtCMPG1 und *AtCMPG2* in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur bedingen, können z. B. Schwankungen in der Osmolarität der Nährlösung sein. Für eine Soja-Zellsuspensionskultur wurde gezeigt, dass eine Änderung der Osmolarität die Synthese von reaktiven Sauerstoffverbindungen zur Folge hat. So wurde nach Verringerung der Osmolarität durch Zugabe von 0,33 Volumen destillierten Wassers die Synthese von H₂O₂ nachgewiesen. Dies erfolgte in ähnlicher Stärke wie bei einem mechanisch ausgeübtem Druck (Yahraus *et al.*, 1995). Derart große Osmolaritätsschwankungen traten bei der kontinuierlichen Kultivierung der in dieser Arbeit eingesetzten *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur sicher nicht auf. In der Publikation von Yahraus *et al.* wurde jedoch nicht beschrieben, ob geringere Osmolaritätsänderungen nicht auch die Synthese von reaktiven Sauerstoffverbindungen verursachen können. So kann es sein, dass *AtCMPG1* und *AtCMPG2* sehr sensibel auf Änderungen dieser Art reagieren. Eine andere Ursache für die *AtCMPG*-Expression in der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur kann in der mechanischen Stimulierung während des Wachstums der Zellkultur auf dem Rotationsschüttler liegen. Das kontinuierliche Schütteln der Zellkultur bei 110 Upm kann eine Expression wundinduzierbarer Gene zur Folge haben.

Für viele pathogen-responsive Gene wurde gezeigt, dass sie auch durch Verwundung induziert werden (Jakobek *et al.*, 1999; Odonnell *et al.*, 1998; Orozco-Cardenas *et al.*, 2001). Diese Genaktivierung und eine eventuell daraus resultierende Synthese pathogen-inhibierender Substanzen kann als ein Schutzschildeffekt verstanden werden, durch den die entstandene Wunde vor einer Besiedlung mit Pathogenen geschützt ist (Reymond *et al.*, 2000). Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Verwundung und mechanischem Druck besteht darin, dass viele auskeimende pflanzenpathogene Pilze mittels Appressorien in Pflanzenzellen eindringen und Haustorien ausbilden. Hierbei wird auf die Pflanzenzelle ein sehr starker physikalischer Druck ausgeübt (Kahmann and Basse, 1997), auf den die Pflanzenzelle mit der Aktivierung pathogen-relevanter Antworten reagiert. Dies erklärt die oft beobachtete Kopplung der Pflanzenreaktionen auf Verwundung und Pathogenbefall.

Von Gus-Mayer *et al.* (1998) wurde der Druck einer auskeimenden Pilzspore simuliert, indem Petersiliezellen einer Suspensionskultur mit einer feinen Nadel berührt, aber nicht gestochen wurden. Neben verstärkten zytoplasmatischen Strömungen und einer zur Nadel orientierten Wanderung des Zellkerns wurde auch fünf bis zehn Minuten nach mechanischer Stimulierung eine Synthese reaktiver Sauerstoffverbindungen festgestellt. Nach mechanisch ausgeübtem Druck durch Auflegen eines Deckgläschens auf kultivierte Petersiliezellen wurde am Beispiel von *PcWRKY1* eine Genaktivierung in vergleichbarer Stärke wie nach Zugabe eines Elizitors nachgewiesen (Gus-Mayer *et al.*, 1998).

In seneszenten Blättern wurde mittels RNA-Blot-Analysen eine schwache Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* beobachtet (Abb. 3.6). Mit den transgenen Promotor::*GUS*-Linien konnte dies hingegen nicht gezeigt werden. Sämtliche untersuchte Promotor::*GUS*-Linien zeigten weder bei einer beginnenden noch bei einer deutlich ausgeprägten Seneszenz [Stadium S1 bzw. S2; Lohman, 1994 #525] eine Reporterogenaktivität.

Die in RNA-Blot-Analysen beobachtete Expression in seneszenten Blättern könnte jedoch auch auf eine Verwundung der älteren Blätter zurückzuführen sein. Eine Differenzierung dieser Expressionen war nicht möglich, da das erhaltene Signal die mittlere Expression der gesamten für die Isolierung der RNA eingesetzten Blattfläche darstellt.

Eine wundinduzierte Expression kann hingegen in Promotor::*GUS*-Linien leicht von einer Seneszenz-induzierten Expression durch typische Anfärbemuster unterschieden werden. So zeigt sich bei der wundinduzierten Expression die Blaufärbung an den Verwundungsstellen, bei einer Seneszenz-induzierten Expression werden je nach Stadium der Seneszenz größere Blattbereiche relativ gleichmäßig gefärbt.

Für einige pathogen-induzierbare Gene wurde beschrieben, dass diese einer Seneszenz-bedingten Aktivierung unterliegen. So zeigte eine differenzielle Expressionsanalyse von Genen, die an der Seneszenz beteiligt sind, dass von sieben Genen fünf ebenfalls pathogen-induzierbar waren (Quirino *et al.*, 1999). Das am stärksten in seneszenten Blättern induzierte Gen war *AtEli3*. Dieses Gen akkumulierte ebenfalls stark nach Infiltration von *Pst* DC3000 (Kiedrowski *et al.*, 1992). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass auch in steril angezogenen Pflanzen pathogen-induzierbare Gene in seneszenten Blättern aktiviert wurden (Quirino *et al.*, 1999). Für das Metallthionin-Gen *LSC54* aus *Arabidopsis* wurde eine erhöhte Expression in der Seneszenz, bei Verwundung und bei Pathogenbefall nachgewiesen (Butt *et al.*, 1998). Dieses Expressionsmuster ist vergleichbar mit dem von *AtCMPG1* und *AtCMPG2*.

Eine *GUS*-Färbung verschiedener Gewebe der Promotor::*GUS*-Pflanzen zeigte neben einer wundinduzierten Expression eine Expression von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* in der Übergangszone von Stängel zu Schote (Abb. 3.15 A). Dieser Bereich stellt die Abscissionszone der Schoten dar. *AtCMPG2* wird zusätzlich im Bereich der Schotenspitze exprimiert. Die Expression in diesem lokal eng begrenzten Bereich wurde in den durchgeführten RNA-Blot-Analysen mit verschiedenen Pflanzengeweben nicht detektiert, weil hierfür Schoten mitsamt dem Schotenstängel eingesetzt wurden. In dieser Probe stellen die Übergangszonen zwischen Stängel und Schote bzw. die Schotenspitze einen zu geringen Anteil der gesamten Schoten dar, so dass kein Signal erhalten wurde. Die in der Schotenabscissionszone beobachtete *GUS*-Färbung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* ähnelt sehr dem Expressionsmuster von *HAESA*, einer Leucin-reichen Rezeptor-Kinase aus

Arabidopsis (ehemals als RLK5 bezeichnet). HAESA, deren Funktion mittels *antisense* Pflanzen nachgewiesen wurde, kontrolliert die Abscission von Blütenorganen (Jinn *et al.*, 2000). Das Polygalacturonasegen TAPG1 aus Tomate wird ebenfalls in den Abscissionszonen der Blüten und in der Narbe exprimiert (Hong *et al.*, 2000). Weitere Gene, die in den Abscissionszonen der Schoten eine Expression aufweisen, sind z. B. das wund- und pathogen-induzierbare Gen *pyk20* aus *Arabidopsis* (Puzio *et al.*, 2000) sowie verschiedene an der Seneszenz beteiligte Gene (Bleecker and Patterson, 1997). In einem differenziellen *screening* von Abscissionszonen Ethylen-behandelter *Sambucus nigra*-Pflanzen konnten 20 Genen isoliert werden, die Abscissionszonen-spezifisch exprimiert wurden. Die Mehrzahl dieser Gene waren *pathogenesis-related-genes* (PR-Gene) (Coupe *et al.*, 1997). Ähnliches wurde von Del Campillo *et al.* (1992) für *Phaseolus vulgaris* beschrieben. Sechs von sieben Genen, die nach einer Behandlung mit Ethylen in Abscissionszonen akkumulierten, wurden als PR-Gene charakterisiert. Eine Expression von PR-Genen kann einen schützenden Effekt vor Infektionen nach Organabwurf haben. Die an der Pflanze verbleibenden Zellen an der Abscissionszone stellen durch den Verlust der sie schützenden Zellwand eine deutlich einfachere Eintrittspforte für Pathogene dar (Del Campillo and Lewis, 1992; Gonzalez-Carranza *et al.*, 1998). Auch die Schotenspitze als der Bereich der ehemaligen Narbe stellt eine bevorzugte Eintrittspforte dar. Eine präformierte Basisresistenz (Kap. 1.2) in diesen Geweben stellt also eine Schutzeinrichtung dar, um bei einem potenziellen Eindringen von Pathogenen gewappnet zu sein.

Hashim *et al.* (1997) zeigten an *Vicia faba*, dass Pilzbefall zu einem frühzeitigem Blattabwurf führt. Dieser direkte Zusammenhang zwischen Abscission von Pflanzenorganen und Pathogenbefall konnte für *Arabidopsis* bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Jinn *et al.*, 2000).

Die Expressionsmuster von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* lassen darauf schließen, dass diesen Genen eine wichtige Funktion in der allgemeinen Abwehr von Pathogenen zukommt. Sie sind mutmaßlich an der Ausbildung einer präformierten Basisresistenz und nicht an spezifischen Abwehrreaktionen beteiligt. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass keine signifikanten Expressionsunterschiede nach einem Befall von virulenten bzw. avirulenten Pseudomonaden beobachtet wurden.

4.2 Identifizierung eines elizitorresponsiven Promotorelements

Promotoren sind die Hauptregulationsbereiche von Genen und meist modular aufgebaut (Bodeau and Walbot, 1996; Bussemaker *et al.*, 2001; Grimmig and Matern, 1997; Puente *et al.*, 1996; Seki *et al.*, 1997). Das bedeutet, dass mehrere sogenannte *cis*-regulatorische Elemente innerhalb eines Promotors vorliegen. An diese *cis*-regulatorischen Elemente binden *trans*-aktive Faktoren, die die Transkription des Gens regulieren (Dyanan, 1989). Erst eine Interaktion von mindestens einem *trans*-aktiven Faktor mit dem Multiproteinkomplex der Transkriptionsmaschinerie ermöglicht die Initiierung der Transkription.

In der *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur wurde eine sehr schnelle Elizitorinduzierbarkeit von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* festgestellt, wobei *AtCMPG1* stärker induzierbar war als *AtCMPG2*. Die Expressionsanalysen und vor allem die Analyse der mit Promotor::GUS-Fusionskonstrukten stabil transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen zeigten darüber hinaus eine starke Wundinduzierbarkeit beider Gene. Von diesen Ergebnissen ausgehend bestand das Ziel der Promotoranalyse in der Identifizierung *cis*-regulatorischer Elemente sowie der Charakterisierung der identifizierten Elemente in Bezug auf eine Elizitor- bzw. Wundresponsivität.

Eine Differenzierung zwischen pathogen- und wundresponsiven Promotorelementen ist vor allem für biotechnologische Anwendungen interessant. So ist es von pflanzenzüchterischem Interesse, durch möglichst spezifisch reagierende Promotorelemente Abwehrmechanismen zu regulieren (Strittmatter *et al.*, 1995). Sowohl das Expressionsniveau als auch die Gewebespezifität und die Responsivität auf diverse Stimuli könnte durch gut charakterisierte Promotorelemente moduliert werden. Solcherart gentechnisch veränderte Nutzpflanzen entsprächen besser den jeweiligen Anforderungen als dies mit einem starken und annähernd konstitutiv reagierenden Promotor möglich wäre.

Für die Identifizierung elizitor-responsiver Promotorelemente innerhalb des *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Promotors wurden verschieden lange Promotorfragmente mit dem *uidA*-Reporter gen fusioniert, die erhaltenen Konstrukte in Petersilie- und *Arabidopsis*-Protoplasten transfiziert und die Reporter genaktivität bestimmt (Jefferson *et al.*, 1987).

Petersilie-Protoplasten stellen ein gut charakterisiertes System dar, mit dessen Hilfe die Responsivität vieler Promotoren auf diverse Stimuli (z. B. Elizitor und UV-Licht) getestet wurde (Dangl *et al.*, 1987; Eulgem *et al.*, 1999; Hahlbrock *et al.*, 1995; Somssich *et al.*, 1989).

Ein geeigneter Elizitor für Analysen elizitor-responsiver Promotorelemente in transfizierten *Arabidopsis*-Protoplasten wurde erst im Mai 1999 identifiziert (Felix *et al.*, 1999). Deshalb

wurde in dieser Arbeit die Deletionsreihe des *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Promotors hauptsächlich in dem Petersilie-Protoplastensystem durchgeführt. Durch translationale Fusionen mit dem *uidA*-Reporter gen konnte der eine Elizitorresponsivität vermittelnde Bereich des *AtCMPG1*-Promotors auf 122 bp eingegrenzt werden. Diese 122 bp wurden mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus und dem *uidA*-Reporter gen fusioniert und sowohl am 5'-Ende als auch am 3'-Ende weiter deletiert. Diese Deletionen führten zu der Identifizierung eines 39 bp langen Promotorfragmentes (Element F, Tab. 3.6 und Abb. 3.12), das in Petersilie-Protoplasten zu einer 16fachen Steigerung der Reporter genaktivität nach Elizitorzugabe führte. Kürzere Fragmente und die meisten Blockmutationen innerhalb dieser 39 bp hatten eine starke Reduktion der Elizitorinduzierbarkeit zur Folge. Das Element F enthält eine W-Box (5'-GGTCAA-3') am 3'-Ende und zwei W-Kernsequenzen (5'-GTCA-3') am 5'-Ende des Elementes. W-Boxen wurden als Bindungsstellen von WRKY-Transkriptionsfaktoren charakterisiert (Rushton *et al.*, 1996) und sind ein häufiges Sequenzmotiv in pathogen-induzierbaren Promotoren (Maleck *et al.*, 2000). Auch viele Gene, die an der Ausprägung systemisch erworbener Resistenz beteiligt sind, enthalten in ihren Promotoren W-Boxen (Ohtake *et al.*, 2000).

Eine Deletion der am 3'-Ende des Elementes F gelegenen W-Box führte zu einer kompletten Inaktivierung des Elementes, wohingegen eine Deletion der am 5'-Ende gelegenen W-Kernsequenz die Basisaktivität kaum veränderte, die Elizitorinduzierbarkeit aber stark reduzierte. Der Einfluss des mittleren Bereichs von Element F wurde mit drei Blockmutationen in jeweils unabhängigen Konstrukten getestet. Die Mutation der zweiten W-Kernsequenz (5'-GTCA-3' → 5'-AAGG-3') bedingte eine leichte Reduktion der Basisaktivität, wobei aber die Induzierbarkeit im Vergleich zu der unmutierten Version noch erhöht wurde. Diese Blockmutation führte zu keiner bekannten Promotorbox. Die erhöhte Induzierbarkeit des Elementes nach Einführung dieser Blockmutation lässt sich entweder dadurch erklären, dass eine neue, bisher unbekannte Box kreiert wurde, oder dadurch, dass die am 5'-Ende gelegene W-Kernsequenz wegen des Wegfalls einer direkt benachbarten W-Kernsequenz leichter für *trans*-aktive Faktoren zugänglich wurde.

Die Mutationen in dem Bereich, der eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem *PcPR2*-Promotor aufweist (Abb. 3.13), führten beide zu einer starken Reduktion der Elizitorinduzierbarkeit. Dieser zu dem Element F eine Sequenzähnlichkeit aufweisende Bereich liegt innerhalb des 125 bp langen *PcPR2*-Promotorfragmentes, das für eine elizitor-bedingte Genaktivierung als hinreichend beschrieben wurde (van de Löcht *et al.*, 1990). Diese eingeführten Blockmutationen zeigten, dass in den mittleren 19 bp des Elementes F mutmaßlich zwei Bereiche enthalten sind, die für eine volle Elizitorinduzierbarkeit notwendig sind. Inwiefern diese Bereiche unabhängige Bindungsstellen für *trans*-aktive Faktoren darstellen oder ob ein *trans*-

aktiver Faktor an die gesamten 19 bp bindet, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

Abgesehen von den W-Boxen wurden keine weiteren bereits bekannten Boxen innerhalb des Elementes F gefunden.

Eine große Sequenzähnlichkeit besteht zwischen dem Element F und dem E17-Element des *PcEli17*-Promotors (Abb. 3.13). Das 21 bp lange E17-Element wurde als der Pathogenresponsivitäts-vermittelnde Bereich innerhalb des *PcEli17*-Promotors charakterisiert (Kirsch *et al.*, 2001). Das E17-Element enthält eine W-Box und eine W-Kernsequenz, sowie am 5'-Ende einen Bereich von acht Basen, der exakt mit dem mittleren Bereich des Elementes F übereinstimmt. Zusätzlich zu den Basen des E17-Elementes enthält das Element F noch zehn Basen, die nicht in dem E17-Element enthalten sind. Beide Elemente, das Element F und das E17-Element vermitteln in Kombination mit dem 35S-Minimalpromotor eine starke Elizitorinduzierbarkeit. Ob identische *trans*-aktive Faktoren an diese Elemente binden und sie somit als funktionshomolog anzusehen sind, bleibt zu klären.

Eine ebenfalls hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Element F weist ein 21 bp langes Fragment des *AtCMPG5*-Promotors auf (Abb. 3.13). Dieses Fragment enthält jedoch lediglich eine W-Box und vermittelte in *Petersilie*-Protoplasten keine Elizitorinduzierbarkeit.

Weitere Mitglieder der CMPG-Genfamilie aus *Arabidopsis* enthalten in ihren Promotoren keine Bereiche mit einer deutlichen Sequenzähnlichkeit zu dem Element F des *AtCMPG1*-Promotors. Ausführliche Sequenzvergleiche des Elementes F mit den in Datenbanken gespeicherten Sequenzen zeigten keine weiteren Promotorfragmente mit einer deutlichen über W-Boxen hinausgehenden Sequenzähnlichkeit auf.

Der *AtCMPG2*-Promotor vermittelte im Gegensatz zum *AtCMPG1*-Promotor weder in *Petersilie*- noch in *Arabidopsis*-Protoplasten eine Elizitorresponsivität. Getestet wurden ein 1502 bp und ein 642 bp langes Promotorfragment.

Die Tatsache, dass weder der *AtCMPG2*-Promotor noch das 21 bp lange Fragment des *AtCMPG5*-Promotors in transfizierten Protoplasten eine Elizitorinduzierbarkeit vermittelten, zeigt, dass neben dem Vorliegen von W-Boxen noch weitere Sequenzmotive bzw. ein anderer Abstand zwischen der W-Box und dem Transkriptionsstart vorliegen müssen.

Ein notwendiges Kriterium für ein elizitor-responsives Promotorelement kann demzufolge darin bestehen, dass neben einer W-Box noch mindestens eine W-Kernsequenz in unmittelbarer Nähe vorhanden sein muss. Eine derartige Anordnung liegt sowohl bei dem Element F, dem E17-Element als auch bei einigen weiteren beschriebenen Elementen vor (Eulgem *et al.*, 1999).

Die Elizitorinduzierbarkeit von *At*CMPG1-Promotor::*GUS*-Fusionskonstrukten wurde ausführlich im Petersilie-Protoplastensystem getestet. Es besteht aufgrund der guten Induzierbarkeit in diesem heterologen System Grund zu der Annahme, dass der Promotor bzw. das eingegrenzte Element auch in anderen Pflanzen eine Pathogeninduzierbarkeit vermittelt. Anschließend wurden auch im homologen System (*Arabidopsis*-Promotoren in einem *Arabidopsis*-Protoplastensystem) ausgewählte Konstrukte bezüglich ihrer Induzierbarkeit durch den Peptidelizitor Flagellin 22 untersucht. Die beiden langen translational fusionierten Fragmente des *At*CMPG1-Promotors (1279 und 338 bp) vermittelten eine stärkere Induzierbarkeit als in den Petersilieprotoplasten. Die Deletion des 338 bp langen Fragmentes B zu dem 39 bp langen Element F führte zu einem deutlichen Verlust der Induzierbarkeit. Die in Petersilie-Protoplasten stärksten Fragmente F und G vermittelten in *Arabidopsis*-Protoplasten eine nur schwache Reaktion auf Elizitor. In Petersilie-Protoplasten scheint das Element F hingegen hinreichend für eine Responsivität auf den getesteten Elizitor zu sein.

Diese Unterschiede sind ein Hinweis dafür, dass in *Arabidopsis*-Protoplasten auch außerhalb des 39 bp langen Promotorfragmentes noch andere Promotorelemente für eine volle Elizitorresponsivität notwendig sind, da längere Fragmente dieses Promotors eine sehr starke Elizitorresponsivität vermittelten (Abb. 3.14). Eine weitere Ursache für die unterschiedliche Aktivität des Elementes F in beiden Systemen ist in unterschiedlichen *trans*-aktiven Faktoren in beiden Zellkulturen zu sehen.

Die Ergebnisse der Analysen der stabil transformierten *At*CMPG1-Promotor::*GUS*-Linien zeigten, dass die eine Wundresponsivität vermittelnden Elemente stromaufwärts von -323 bp liegen. Die Promotorfragmente A und B vermittelten nach Verwundung der Pflanzen eine starke Reporterogenaktivität (Übersicht der Konstrukte in Tab. 3.6 und Abb. 3.12). Das 216 bp lange Fragment C und die kurzen Promotorfragmente F, G und L vermittelten weder eine Responsivität auf Verwundung noch auf Elizitor oder Pseudomonaden. Aus den Ergebnissen der Promotor::*GUS*-Linien lässt sich demzufolge nicht ableiten, ob die Pathogen- und Wundresponsivität gekoppelt ist oder ob unabhängige Promotorelemente vorliegen. Mit Hilfe weiterer Promotor::*GUS*-Linien wären die wundresponsiven Elemente zwar wahrscheinlich weiter eingrenzbar, der Arbeitsaufwand jedoch auch sehr hoch. Wesentlich schneller wären Aussagen mittels transienter Expressionsanalysen zu erhalten. Hierfür müsste ein neues System etabliert werden, um mit transfizierten Protoplasten eine Verwundung simulieren zu können. Denkbar ist z. B. eine Veränderung der Osmolarität. Es wurde bereits mehrfach beschrieben, dass bei hyperosmotischem Stress sowohl reaktive Sauerstoffverbindungen gebildet als auch Gene aktiviert werden (Blomberg, 1997; Dove *et al.*, 1997; Ishitani *et al.*, 1997; Yahraus *et al.*, 1995). Eine andere Möglichkeit, die jedoch experimentell aufwendiger

ist, stellt das Auflegen eines Gewichtes, z. B. eines Deckgläschens auf die transfizierten Protoplasten dar (Gus-Mayer *et al.*, 1998).

Eine Multimerisierung des Elementes F könnte zu einer deutlich stärkeren Elizitorresponsivität führen, so dass auch in den stabil transformierten Promotor::GUS-Linien eine Aktivität dieses Elementes messbar wird. Für viele Promotorelemente wurde der große Einfluss einer Multimerisierung von Promotorelementen gezeigt (Eulgem *et al.*, 1999; Kirsch *et al.*, 2001). Einige Arbeitsgruppen arbeiten sogar von Beginn an nur mit multimerisierten Elementen. Allerdings entspricht dies nicht der natürlichen Situation, so dass der tatsächliche Einfluss einer Di- oder Multimerisierung von Elementen weitgehend unbekannt ist.

4.3 Stellen Überexpressionspflanzen und Nullmutanten geeignete Werkzeuge für eine Funktionsaufklärung dar?

Ein gängiger Weg für die Funktionsaufklärung von Genen ist die Analyse von Überexpressionslinien und Nullmutanten. In dieser Arbeit wurde für die Herstellung der *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien der 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus gewählt. Dieser konstitutive Promotor ist gut charakterisiert und vermittelt in den meisten Pflanzengeweben eine starke Grundexpression (Benfey and Chua, 1990). Die in Blättern von jeweils fünf unabhängigen Überexpressionslinien detektierten mRNA-Mengen lagen auch deutlich über dem Expressionsniveau von Wildtyp-Pflanzen (Abb. 3.19). Lediglich eine *AtCMPG2*-Überexpressionslinie mit drei Integrationen zeigte eine sehr niedrige Expression. Es handelt sich hierbei höchstwahrscheinlich um den Effekt des *gene silencing* (Reddy *et al.*, 2000). Dieses Phänomen ist seit vielen Jahren bekannt. Modelle, die dieses erstaunliche Phänomen auf molekularer Ebene erklären, wurden jedoch erst in den letzten drei Jahren entwickelt. Gänzlich verstanden ist *gene silencing* jedoch bis heute noch nicht (Hamilton and Baulcombe, 1999; Marx, 2000; Plasterk and Ketting, 2000).

Parallel zu der Herstellung der Überexpressionslinien wurde nach Nullmutanten gesucht. Aus der Mutantenpopulation von Ellen Wisman konnte weder für *AtCMPG1* noch für *AtCMPG2* eine Mutante isoliert werden (Wisman *et al.*, 1998). Erfolgreicher war das *screening* der SLAT-Population von Jonathan Jones, Norwich, UK (Tissier *et al.*, 1999). Aus dieser Population konnte eine Pflanzenlinie isoliert werden, in der im ersten Drittel der kodierenden Sequenz des *AtCMPG1*-Gens ein Transposon inseriert ist. In dieser *AtCMPG1*-Mutante konnte durch RNA-Blot-Analysen weder in unbehandelten noch in mit Pseudomonaden infiltrierten Blättern eine Transkription nachgewiesen werden. Somit wurde diese *Arabidopsis*-Mutante als eine Nullmutante (*knockout*) charakterisiert. Für *AtCMPG2*

wurde auch in dieser Population keine Mutante gefunden.

Ein offensichtlicher morphologischer Phänotyp wurde weder in den *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien noch in der *AtCMPG1*-Nullmutante beobachtet. Parallel zu Wildtyp-Pflanzen wurden diese Linien unter verschiedenen Lichtintensitäten und Tageslängen angezogen. Unter den gewählten Bedingungen wurden keine Veränderungen im Phänotyp zwischen den einzelnen Linien festgestellt. Auch Wachstum, Länge und Verzweigung der Wurzeln der auf senkrecht stehenden Medienplatten gewachsenen Pflanzen war unverändert. Sowohl die Samenmenge als auch die Keimrate unterschieden sich nicht zwischen transgenen Linien und WT-Pflanzen.

Aufgrund der starken Induktion von *AtCMPG1* nach Infiltration von *Pseudomonaden* (Abb. 3.8) wurde kontrolliert, ob sich eine verstärkte bzw. fehlende *AtCMPG1*-Expression auf das Wachstum von virulenten oder avirulenten *Pseudomonaden* auswirkt. Hierzu wurde das Wachstum beider *Pseudomonaden*stämme in der Pflanze verfolgt. Über einen Zeitraum von 12 bis 72 Stunden nach Infiltration wurden keine signifikanten Unterschiede im Bakterienwachstum zwischen den verschiedenen Linien festgestellt. Eindeutig war jedoch das schnellere Wachstum der virulenten im Vergleich zu den avirulenten Bakterien. Die mit $1\frac{1}{2}$ Zehnerpotenzen größte Wachstumsdifferenz war nach 24 und 48 Stunden zu beobachten. Dieser Unterschied liegt in der gleichen Größenordnung wie der von Whalen *et al.* festgestellte Unterschied zwischen Pst DC3000 und Pst DC3000 (*avrRpt2*) (Whalen *et al.*, 1991).

Beispiele aus Veröffentlichungen zeigen, dass in einer Vielzahl von Untersuchungen ebenfalls keine signifikanten Wachstumsunterschiede von *Pseudomonaden* in verschiedenen Pflanzenlinien festgestellt wurden (Dörmann *et al.*, 2000). Ein unterschiedliches Wachstum von *Pseudomonaden* wurde überwiegend in Mutantenlinien gefunden, die einen unmittelbaren Bezug zu einem Resistenzgen-abhängigen Signaltransduktionsweg aufweisen (Cao *et al.*, 1998; McNellis *et al.*, 1998; Mur Luis *et al.*, 2000; Oldroyd and Staskawicz, 1998; Salmeron *et al.*, 1996; van Wees *et al.*, 2000).

Erste Analysen zum Sekundärstoffmuster in WT-Pflanzen, *AtCMPG1*-Überexprimierer und der *AtCMPG1*-Nullmutante zeigten hingegen einige Veränderungen im Sekundärstoffmuster zwischen diesen Linien. In den von Herrn Dr. Pawel Bednarek durchgeführten HPLC-Analysen (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wurden Pflanzen der verschiedenen Linien im unbehandelten Zustand untereinander und nach Infiltration mit dem Peptidelizitor Flg22, virulenten oder avirulenten *Pseudomonaden* untereinander verglichen. Die Analysen müssen in einem unabhängigen Experiment noch wiederholt werden, weswegen auf eine Darstellung der Ergebnisse in dieser Arbeit verzichtet wurde.

Die bisher durchgeführten Analysen zeigten keine Phänotypunterschiede zwischen Wildtyp, Überexpressionslinien und der *AtCMPG1*-Nullmutante. Somit stellt sich die Frage, ob der Einsatz von Überexpressionslinien und Nullmutanten ein geeignetes Mittel für eine Funktionsaufklärung darstellt.

Diese Art der Funktionsaufklärung ist ein zur Zeit sehr häufig gewählter Weg. Es gibt zahllose Beispiele für die Generierung von Nullmutanten und Überexpressionslinien (Amsterdam *et al.*, 1999; Meissner *et al.*, 1999; Winkler *et al.*, 1998). Trotz Charakterisierung vieler *Arabidopsis*-Nullmutanten wurden nur für wenige von ihnen ein informativer Phänotyp erhalten, der einen direkten Hinweis auf die Funktion liefert. Bouche *et al.* analysierten circa 200 Nullmutanten. Von diesen zeigten weniger als 2 % einen signifikanten Phänotyp (Bouche and Bouchez, 2001).

Ähnliches berichtet das aus Arbeitsgruppen mehrerer Nationen zusammengesetzte MYB-Konsortium. Diese Gruppen versuchen, die Funktion von Mitgliedern der in *Arabidopsis* mindestens 92 Gene umfassenden R2R3-MYB-Subfamilie aufzuzeigen (Kranz *et al.*, 1998; Meissner *et al.*, 1999; Rabinowicz and Grotewold, 2000). Für 26 Gene wurden homozygote Insertionslinien gefunden, die reduzierte oder nicht detektierbare Transkriptionslevel aufwiesen. Selbst unter 20 verschiedenen Wachstumsbedingungen wurden keine sichtbaren Phänotypunterschiede detektiert. Hinweise auf einen biochemischen Phänotyp wurden jedoch für zwei MYB-Gene mittels HPLC-Analysen erhalten (Meissner *et al.*, 1999).

Einzelmutanten von MADS-Box Genen SHP1 und SHP2 zeigten keinen Phänotyp. In einer Doppelmutante, in der beide Gene in ihrer Expression reduziert sind, konnte hingegen ein Phänotyp festgestellt werden. (Liljegren *et al.*, 2000).

Nullmutanten der MADS-Box Gene SEP1, SEP2 und SEP3 zeigten weder als Einzel-, noch als Doppelmutanten einen Phänotyp. Erst in einer Tripelmutante wurde ein starker Phänotyp beobachtet. In dieser Mutante waren alle Blütenorgane zu Sepalen ausgebildet (Pelaz *et al.*, 2000; Riechmann and Ratcliffe, 2000). Diese beiden Beispiele können mit einer funktionellen Redundanz dieser Proteine erklärt werden.

Auch in Hefe, deren Genom schon länger sequenziert ist, konnte für viele Gene keine Funktion ermittelt werden. Goebel und Petes (1986) zeigten, dass für 80 % zufällig ausgewählter Insertionsmutanten kein Phänotyp beobachtet werden konnte. Bezogen darauf, dass circa 75 % des Hefegenoms transkribiert wird, bedeutet dies, dass circa 60 % aller exprimierten Gene nicht essenziell sind. Thatcher *et al.* (1998) analysierten 34 Mutantenstämme über 75 bis 150 Generationen und verglichen das Wachstum jeder Mutante mit dem Wildtyp. Von diesen Mutantenstämmen zeigten 70 % keinen offensichtlichen Phänotyp. Nach 75 bis 150 Generationen wurde für 74 % aller Stämme

jedoch ein reduziertes Vorkommen gegenüber dem Wildtyp beobachtet. Dies bedeutet, dass Gene, die für das einzelne Individuum keine essenzielle Funktion haben, dennoch eine wichtige Funktion für die Fitness der Population haben können (*marginal fitness*-Hypothese). Experimente, die die Bedeutung eines Gens für die Fitness der Population beantworten sollen, sind mit Pflanzen wegen der langen Generationsdauer und des großen Raumbedarfs kaum realisierbar. Es ist jedoch anzunehmen, dass die bei Hefe festgestellten Effekte auch bei höheren Organismen zum Tragen kommen.

Diese Beschreibungen verdeutlichen, dass ein offensichtlicher Phänotyp selten festzustellen ist. Sofern Hinweise zur Funktion des zu analysierenden Gens vorliegen, kann gezielt bei spezifischen Wachstumsbedingungen, Stresssituationen oder Entwicklungsstadien die Nullmutante mit dem entsprechenden Wildtyp verglichen werden. Gründe für einen nicht zu beobachtenden Phänotyp bei Überexprimierern und Nullmutanten können in redundanten Funktionen bestehen oder die Proteine sind an feinen Modulationen und nicht an Hauptschaltwegen beteiligt.

Eine überraschendes Ergebnis aus der Sequenzierung des *Arabidopsis*-Genoms war, dass viele Gene doppelt vorkommen. Zu klären bleibt, ob diese duplizierten Gene identische Funktionen übernehmen, also funktionell redundant sind oder trotz einer sehr hohen Sequenzähnlichkeit nur überlappende oder ganz verschiedene Funktionen wahrnehmen, wie es z. B. für Pto und Fen gezeigt wurde (Jia *et al.*, 1997; Martin *et al.*, 1994).

Eine mögliche Alternative zu dem Ausschalten einzelner Gene besteht darin, komplette Genfamilien auszuschalten. Dieser Familien-*knockout* ist z. B. mittels Virus-induziertem *gene silencing* zu erreichen. Jedoch muss die Nukleinsäureidentität der Familienmitglieder bei 80 bis 90 % liegen (Baulcombe, 1999). Eine derart hohe Sequenzähnlichkeit liegt bei der CMPG-Genfamilie nicht vor, so dass Versuche dieser Art nicht durchgeführt werden können. Ein Ausschalten einer gesamten Genfamilie bzw. vieler Mitglieder einer Genfamilie bedingt sicherlich in sehr vielen Fällen einen starken Phänotyp. Viele Pflanzen mit einem multiplen *knockout* sind jedoch wahrscheinlich nicht lebensfähig. Des Weiteren kann der Phänotyp auch so viele Faktoren betreffen, dass keine Aussage über die Funktion, weder der Genfamilie noch einzelner Mitglieder, möglich ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Insertionsmutagenese ein oft gewähltes Werkzeug darstellt, um Hinweise zur Funktion von Proteinen zu erhalten. Dies ist umso sinnvoller, wenn nicht für ein Gen, sondern gleich für mehrere Mitglieder einer Genfamilie Nullmutanten gesucht werden. Zum einen erhöht dies die Wahrscheinlichkeit, Linien mit

einem offensichtlichen Phänotyp zu bekommen und es besteht die Möglichkeit, Nullmutanten einzelner Gene einer Genfamilie miteinander zu kreuzen, um auf diese Weise Doppel- und Triple-Mutanten zu erhalten. Der Ausfall von zwei oder mehr sehr nah verwandten Genen oder von Genen, die ein sehr ähnliches Expressionsmuster aufweisen, kann zu stärkeren Störungen in der Pflanze führen, was dann wiederum die Wahrscheinlichkeit für einen beobachtbaren Phänotyp erhöht.

Ein nicht zu beobachtender Phänotyp bedeutet jedoch keinesfalls, dass keine Unterschiede zum Wildtyp vorliegen, sondern es beruht vielmehr auf dem derzeitigen Unvermögen, alle komplexen Umweltbedingungen zu analysieren und subtile Unterschiede zu detektieren, die möglicherweise für die Fitness einer Population eine größere Bedeutung haben als für einzelne Mitglieder.

4.4 Suche nach Genen mit Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* und Charakterisierung der CMPG-Genfamilie

Seit vielen Jahren werden Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen in Datenbanken gespeichert und ermöglichen so Wissenschaftlern weltweit Sequenzvergleiche von den sie interessierenden Genen mit den gespeicherten Sequenzen. Die aufgezeigten Sequenzähnlichkeiten können Hinweise zur Funktion des Proteins geben, sofern einige der sequenzähnlichen Proteine funktionell bereits charakterisiert sind. Diese Hinweise müssen jedoch experimentell bestätigt werden und stellen somit lediglich eine Hilfe dar, geeignete Experimente zu planen.

Wie bereits in Kap. 3.1 dargestellt, waren zu Beginn dieser Arbeit in Datenbanken keine Sequenzen veröffentlicht, die eine größere Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* aufwiesen als die Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2*. Die Datenbankanalyse wurde zuletzt Ende März 2001 aktualisiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Abb. 4.1 bis 4.4 dargestellt.

Die Proteinsequenzen von *PcEli17* und *AtCMPG1* wurden für diese Untersuchungen in verschiedene Datenbanken eingegeben und unter Anwendung des *blastp*-Algorithmus mit gespeicherten Sequenzen verglichen (Altschul *et al.*, 1990; Flanders *et al.*, 1998). Aufgenommen in den phylogenetischen Baum sind aufgrund des gewählten *blastp*-Algorithmus nur Aminosäuresequenzen, die vor der Datenbankeingabe von automatisch durchgeführten Sequenzauswertungsprogrammen als Proteine charakterisiert wurden. Eine Kolinearität mit *PcEli17* über die gesamte Proteinsequenz wurde lediglich für sechs Proteine aus *Arabidopsis* gefunden (Sequenzvergleich in Anhang 5).

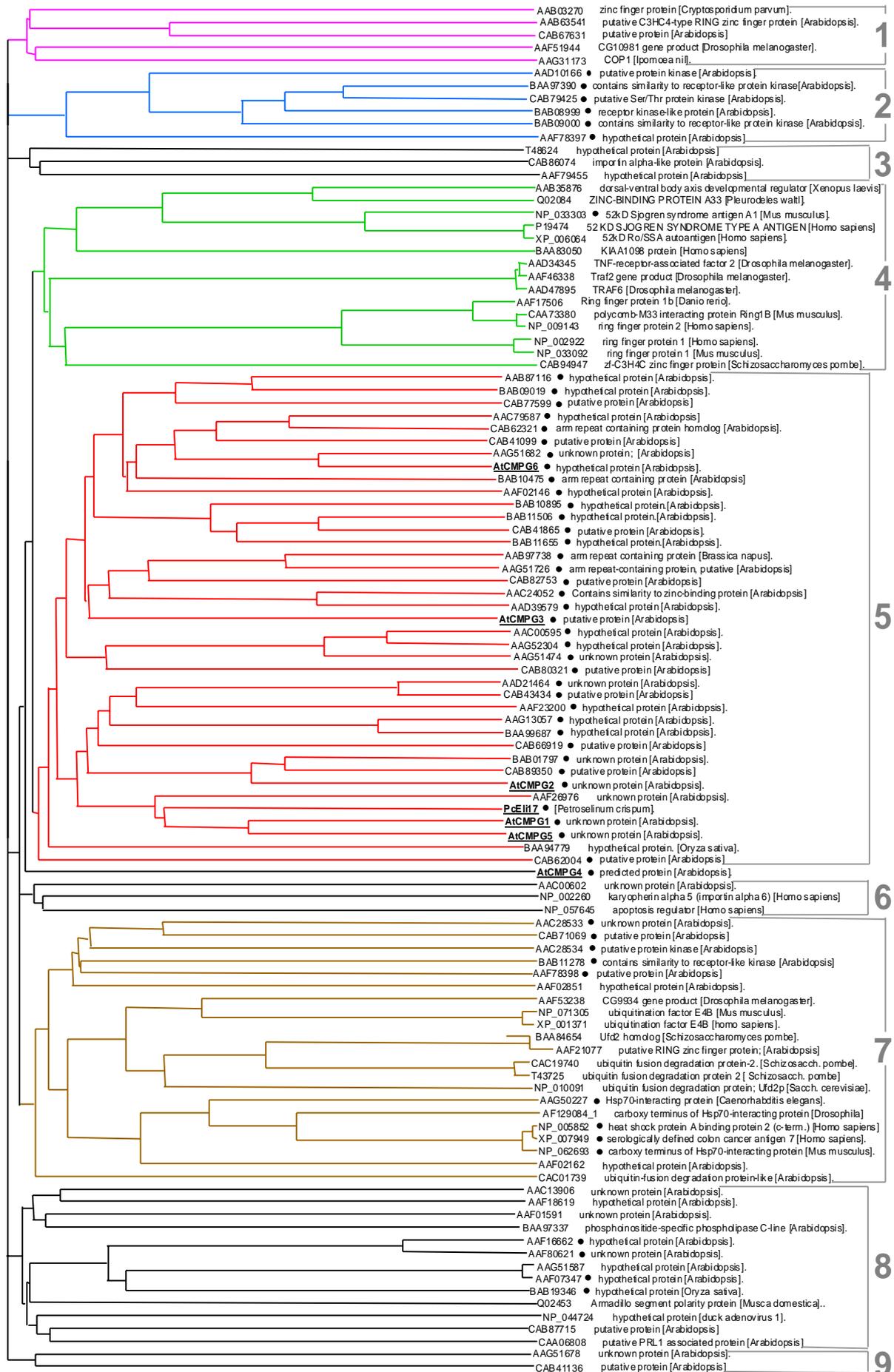
In Abb. 4.1 ist ein Stammbaum mit insgesamt 108 Proteinen aus verschiedenen Organismen dargestellt (Tab. 4.1). In diese Analyse wurden alle in Datenbanken gefundenen Proteinsequenzen aufgenommen, die zu *AtCMPG1* bzw. *PcEli17* eine Sequenzidentität von mindestens 35 % über einen Bereich von mindestens 50 Aminosäuren aufwiesen. Aus dem Genom von *Arabidopsis* sind 70 Proteinsequenzen in Datenbanken enthalten, die diese Bedingungen erfüllen. Von diesen 70 Proteinen weisen 50 das Sequenzmotiv CMPG auf. Das Sequenzmotiv CMPG wurde in einer zu Beginn dieser Arbeit durchgeführten Datenbankanalyse und einem anschließenden Sequenzvergleich entdeckt. Der Vergleich der zu *PcEli17* sequenzähnlichsten Gene zeigte einen Bereich von 67 Aminosäuren auf, in dem eine deutlich höhere Sequenzähnlichkeit vorlag als im restlichen Bereich der Proteine. Innerhalb dieses 67 Aminosäuren umfassenden Bereichs waren die ersten strikt konservierten Aminosäuren die Aminosäuren Cystein (C), Methionin (M), Prolin (P) und Glycin (G). Dies veranlasste uns zu der Namensgebung CMPG sowohl für diesen Sequenzbereich (CMPG-Motiv) als auch für die Gene, die dieses Sequenzmotiv aufweisen (CMPG-Genfamilie) (Kirsch *et al.*, 2001). Zum damaligen Zeitpunkt wurde dieses Motiv nur in pflanzlichen Sequenzen gefunden, so dass wir von einer pflanzenspezifischen Genfamilie ausgegangen sind. Die aktuelle Datenbankanalyse zeigte jedoch, dass neben verschiedenen Pflanzen auch in Mensch, Maus und *Caenorhabditis* dieses Sequenzmotiv vorkommt (Tab. 4.2).

Es ist jedoch erstaunlich, dass nur eine geringe Anzahl das CMPG-Motiv enthaltender Proteine in anderen Organismen gefunden wurden. Von den 108 Proteinsequenzen aus Abb. 4.1 enthalten 58 das Sequenzmotiv CMPG. Von diesen 58 CMPG-Proteinen stammen 50 Proteine aus *Arabidopsis* und jeweils ein Protein aus Raps, Reis und Petersilie. Die restlichen 5 Proteine wurden im Genom von Mensch, Maus und *Caenorhabditis* gefunden. Von den 50 Proteinen ohne CMPG-Motiv, jedoch mit einer Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* bzw. *AtCMPG1*, stammen immerhin noch 20 aus *Arabidopsis*. Obgleich die Annahme einer gattungsspezifischen Genfamilie nahe liegt, scheint die CMPG-Genfamilie auch keine pflanzenspezifische Familie zu sein. Schwer zu erklären ist jedoch das überwiegende Vorliegen dieses Sequenzmotivs in *Arabidopsis*. Selbst im Reis-Genom, von dem bereits große Bereiche sequenziert sind, wurden nur zwei Gene mit Sequenzähnlichkeit zu *PcEli17* bzw. *AtCMPG1* gefunden. Andere Genfamilien weisen eine deutlich gleichmäßigere Verteilung im Pflanzenreich auf. So liegt z. B. in der Genfamilie der MYB-Transkriptionsfaktoren eine wesentlich größere Heterogenität vor. In verschiedenen Pflanzen wurden Mitglieder dieser Familie gefunden, z. B. in *Arabidopsis* circa 180 und in Mais circa 200 Gene (Martin and Paz-Ares, 1997; Riechmann and Ratcliffe, 2000).

Die phylogenetische Rekonstruktion der *AtCMPG1-/PcEli17*-ähnlichen Proteine zeigt mehrere eindeutig separierte Gruppen. Die Festlegung der Gruppen 1 bis 9 in dem phylogenetischen Baum erfolgte aufgrund der Trennung dieser Gruppen bis in Basisliniennähe (Abb. 4.1). Abgesehen von *AtCMPG4* finden sich alle untersuchten *Arabidopsis*-CMPGs sowie *PcEli17* in der rein pflanzenspezifischen Gruppe 5, die auch die größte Gruppe des Baums darstellt. Das einzige Protein dieser Gruppe, für das eine Funktion nachgewiesen wurde, ist das *arm repeat containing* Protein ARC1 aus *Brassica napus* (Raps) (Gu *et al.*, 1998). *Arm repeats*, kurze 42 Aminosäuren umfassende hydrophobe Sequenzmotive, wurden ursprünglich im *Drosophila* Armadillo-Protein identifiziert und sind an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. *BnARC1* ist an der Verhinderung der Selbstinkompatibilität beteiligt und interagiert mit der Kinase-Domäne zweier verschiedener S-locus Rezeptor-Kinasen (Gu *et al.*, 1998). In *Arabidopsis* wurde bisher kein zu *BnARC1* sequenzähnliches Gen gefunden (Bi *et al.*, 2000).

Abb. 4.1. Phylogenetische Analyse aller in Datenbanken annotierten Proteine, die eine Sequenzähnlichkeit zu *AtCMPG1* bzw. *PcEli17* aufweisen [folgende Seite]

In diesem phylogenetischen Baum sind alle in Datenbanken annotierten Proteine (letzte Aktualisierung der Datenbankanalyse: März 2001) aus verschiedenen Organismen enthalten, die zu *AtCMPG1* bzw. *PcEli17* eine Aminosäure-Identität von mindestens 35 % über eine Länge von mindestens 50 Aminosäuren aufweisen. Für die Erstellung des Sequenzvergleichs mit dem Programm Vector NTI 6 auf der Basis des Clustal W-Algorithmus wurde von allen Sequenzen die gesamte Proteinsequenz eingesetzt (Thompson *et al.*, 1994). Die Berechnung des phylogenetischen Baums erfolgte mit dem *Neighbor Joining*-Algorithmus von Saitou und Nei (Kumar and Gadagkar Sudhindra, 2000; Saitou and Nei, 1987). Die Festlegung der Gruppen 1 bis 9 erfolgte aufgrund einer eindeutigen Trennung bis Basisliniennähe. Zur übersichtlicheren Darstellung wurden die einzelnen Gruppen farbig dargestellt. Fett gedruckt und unterstrichen sind die Gene *PcEli17* und *AtCMPG1* bis 6. Mit einem Punkt markiert sind das CMPG-Motiv enthaltende Proteine. Rechts neben den Protein-ID-Nummern sind die aus den Datenbankeinträgen unverändert entnommenen Angaben zur Funktion notiert.



Tab. 4.1. Organismen, in denen Gene mit Sequenzähnlichkeit zu PcEli17 und AtCMPG1 gefunden wurden

In alphabetischer Reihenfolge sind alle Organismen, die in dem phylogenetischen Baum (Abb. 4.1) vertreten sind, aufgelistet.

wissenschaftlicher Name	deutscher Name
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ackerschmalwand
<i>Brassica napus</i>	Raps
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fadenwurm
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Sporozoen
<i>Danio rerio</i>	Zebrafisch
<i>Drosophila melanogaster</i>	Fruchtfliege
duck adenovirus 1	Enten-Adenovirus
<i>Homo sapiens</i>	Mensch
<i>Ipomoea nil</i>	Japanische Kaiserglocke
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus
<i>Musca domestica</i>	Stubenfliege
<i>Oryza sativa</i>	Reis
<i>Petroselinum crispum</i>	Petersilie
<i>Pleurodeles waltlii</i>	Salamander
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Hefepilz
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Spalthefepilz
<i>Xenopus laevis</i>	Krallenfrosch

Tab. 4.2. Organismen, in denen Gene mit dem CMPG-Sequenzmotiv gefunden wurden

wissenschaftlicher Name	deutscher Name
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Ackerschmalwand
<i>Brassica napus</i>	Raps
<i>Petroselinum crispum</i>	Petersilie
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Fadenwurm
<i>Homo sapiens</i>	Mensch
<i>Oryza sativa</i>	Reis
<i>Mus musculus</i>	Hausmaus

Die der Gruppe 5 phylogenetisch am nächsten stehende Gruppe ist die Gruppe 4. Alle Mitglieder dieser Gruppe enthalten eine Zink-Finger-Domäne und/oder eine RING-Finger-Domäne. RING- und RING-H2-Domänen sind häufig an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt oder vermitteln diese. Funktionelle Unterschiede zwischen diesen beiden Domänen wurden bisher nicht beschrieben (Freemont, 2000; Salinas-Mondragon *et al.*, 1999; Saurin *et al.*, 1996). Ein Sequenzvergleich der CMPG-Domäne von *AtCMPG1* mit allen Mitgliedern der Gruppe 4 ist in Abb. 4.4 A dargestellt. Der Bereich der CMPG-Domäne stellt den einzigen Bereich mit einer deutlichen Sequenzähnlichkeit zwischen der Proteinsequenz von *AtCMPG1* und den Proteinsequenzen der in dieser Gruppe zusammengefassten RING-Finger- und Zink-Finger-Proteine dar. Aufgrund dieser Sequenzähnlichkeit zwischen der CMPG-Domäne und dem RING-Konsensus sowie dem Vorliegen einiger potenziell Metallionen-komplexierender Aminosäuren innerhalb der CMPG-Domäne erfolgten mit *PcEli17* Experimente zur Metallionenkomplexierung (Diplomarbeit Klebsattel, 2000). In Fusion mit dem Maltose-bindenden Protein konnte jedoch weder für die gesamte Proteinsequenz noch für den Bereich der Domäne von *PcEli17* eine Komplexierung von Metallionen nachgewiesen werden.

Die Gruppe 2 umfasst Rezeptor-ähnliche Protein-Kinasen (RLK), die eine vielfältige Gruppe von Proteinen darstellen. RLKs durchspannen die Zellmembran und reagieren auf eine Vielzahl von extrazellulären Signalen. Die Aufgabe der RLKs besteht in der Perzeption und Weiterleitung der Signale in das Zellinnere, wo in den meisten Fällen eine Signalkaskade angeschaltet wird, die in Genaktivierungen im Zellkern endet (zur Übersicht: Lease *et al.*, 1998). Die größte und bestuntersuchte Untergruppe der RLK sind die LRR-RLK (*Leucine-rich repeats* enthaltende RLK), die Protein-Protein-Interaktionen ausbilden (Ohtake *et al.*, 2000). In Pflanzen sind LRR-RLK an so verschiedenen Prozessen wie Hormon-Perzeption, Pathogenabwehr, Verhinderung von Selbstbestäubung und Pflanzenentwicklung beteiligt. Die exakte Funktion der meisten RLKs aus *Arabidopsis* ist noch ungeklärt (Du and Chen, 2000). Sehr interessant ist die Sequenzähnlichkeit zu Mitgliedern der Gruppe 7. In dieser Gruppe befinden sich am Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau beteiligte Faktoren aus Mensch, Maus und Hefe. Diese an dem gezielten Proteinabbau beteiligten Proteine enthalten oft das RING-Sequenzmotiv. Paul Freemont postuliert sogar, dass alle RING-Finger-Proteine als E3 Ubiquitin Protein-Ligasen wirken (Freemont, 2000). Die Sequenzähnlichkeit von *AtCMPG1* zu Mitgliedern dieser Gruppe ist in Abb. 4.4 dargestellt. Auch zu diesen Proteinen ist die CMPG-Domäne von *AtCMPG1* der Bereich mit der größten Ähnlichkeit. Außerhalb dieser Domäne liegt hingegen nur eine geringe Sequenzähnlichkeit vor.

Diese Vergleiche zeigen, dass Sequenzähnlichkeiten zu diversen Proteinfamilien vorliegen. Auffällig ist die Häufung von Proteinen, die an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Dies, sowie das Fehlen typischer DNA-bindenden Sequenzmotive, legt den Schluss nahe, dass *AtCMPG1*, *AtCMPG2* und *PcELi17* ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen ausbilden. Mutmaßlich ist das CMPG-Motiv an diesen Interaktionen beteiligt. Dies wird unterstrichen durch die Tatsache, dass exakt dieser Bereich die größte Sequenzähnlichkeit zu den anderen erwähnten an Protein-Protein-Interaktionen beteiligten Proteinen aufweist.

Einen weiteren Hinweis auf Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen geben die Ergebnisse der *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Expression in *E. coli*. Unter vielen getesteten Bedingungen konnten die heterolog exprimierten Proteine fast nur in unlöslicher Form aus den Bakterien isoliert werden. Mutmaßlich aggregieren die heterolog exprimierten Proteine und verhindern so eine Isolierung in löslicher Form. Ähnliches wurde auch für *PcELi17* gezeigt. Nur in Fusion mit dem großen, gut löslichen Maltose-bindenden Protein konnte größtenteils lösliches Protein isoliert werden (Diplomarbeit Klebsattel, 2000). Auch die nur sehr schwache Fluoreszenz der stabil transformierten *AtCMPG*-GFP-Fusionslinien lässt sich durch sehr starke Protein-Protein-Interaktionen erklären. Entweder liegen diese Interaktionen zwischen den CMPG-Proteinen (Ausbildung von Homodi- oder Homomultimeren) vor oder es kommt zu einer Interaktion von CMPG-Protein mit dem GFP-Proteinanteil. Beide Varianten können ein *quenchen* der Fluoreszenz zur Folge haben. Eine Aussage über die zelluläre Lokalisation von *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Protein war mit den GFP-Fusionslinien wegen der nicht zu beobachtenden Fluoreszenz nicht zu erhalten.

AAB87116 (309)	ILADFFCPLSLEVMTPVIVSSG	-----QTYEKAFIKRWIDLGLK----	VCPKTRQTL-THTTLPNYPVKALIANW
BAB09019 (236)	VPSDFRCSLSLELMDPVIVASG	-----QTFERVFIQKWIDMGLM----	VCPKTRQAL-SHTTLPNFIVRAFLASW
CAB77599 (202)	IPPYFRCPSTELMLDPVIVASG	-----QTFDRTSIKKWLIDNG-LA----	VCPTRRQVL-THQELIPNYPVKAMIASW
AAC00595 (213)	PPEELRCPISLQLMYDPVVIASG	-----QTYERVCTEKWFSDG-HN----	SCPKTQQQL-PHLSLTPNYCVKGLIASW
AAG52304 (272)	PPEELRCPISLQLMCDPVVIASG	-----QTYERVCTEKWFSDG-HN----	TCPKTQQQL-PHISLTPNNCVKGLIASW
AAG51474 (279)	PPEELRCPISLQLMYDPVVIASG	-----QTYERICTEKWFSDG-HN----	TCPKTHQQL-SHLC LTPNYCVKALISSW
AAF02146 (74)	CPEEFRCPISLNLMLDPVVLASG	-----QTYDKLFIQKWLSSG-NR----	TCPKTQQVL-PHTALTPNLLIREMISKW
AAC79587 (256)	PPEEFRCPISLLELMDPVIVSSG	-----QTYERECTKKWLEGG-HL----	TCPKTQETL-TSDIMTPNYPVLRSLIAQW
CAB62321 (256)	IPDDFRCPISLEMMRDPVIVSSG	-----QTYERTCTEKWLEGG-HS----	TCPKTQQAL-TSTTLPNYPVLRSLIAQW
CAB41099 (248)	IPYFRCPISLELMKDPVIVSTG	QLNFSSTLQTYERSIQKWLIDAG-HK----	TCPKSQETL-LHAGLTPNYPV-----
AAG51682 (243)	IPEDFLCPISLELMKDPVIVSTG	-----QTYERSFIQKWLIDCG-NL----	SCPKTQQKL-ENFTLTPNYPVLRSLISQW
AtCMPG6 (247)	IPVDFLCPVSLLELMKDPVIVATG	-----QTYERAYIQRWIDCG-NL----	TCPKTQQKL-ENFTLTPNYPVLRSLISRW
AAG51726 (305)	VPKDFVCPISLDLMDPVIIISTG	-----QTYDRNSTIARWIEEG-HC----	TCPKTGQML-MDSRLVPNRALKNLITVQW
CAB82753 (274)	IPADFRCPITLLELMDPVVVATG	-----QTYDRESIDLWIQSG-HN----	TCPKTGQVL-KHTSLVPNRALKNLIVLW
BAB10475 (286)	IPHEFLCPITLLEMLDPVVIATG	-----QTYERKSIQKWLIDCG-NL----	TCPKTRQVL-THQELIPNYPVKAMIASW
AAC28533 (250)	APQYFICPISLEVMKDPQLAADG	-----FTYEAEAISTWLQGGHE-----	TSPMTNKLHHT-KLVPNLALRSALQEW
CAB71069 (344)	PPQYFICPITHDIMDPHVAADG	-----FTYEGEALSRWFERGHE-----	TSPMTNKRLLPHT-SLVPNLALRSALQEW
AAF78397 (881)	PPSYFICPISQEVMRPFRVAADG	-----FTYEAESLREWLIDNGHE-----	TSPMTNLKLAHN-NLVPNHALRSALQEW
AAC28534 (728)	APYFICPIFQEVMDPHVAADG	-----FTYERKSIQKWLIDCG-NL----	TSPMTNKRLLHHT-SLVPNLALRSALQEW
CAB62004 (661)	PPSHYLCPIFQEVMDPLIAADG	-----FTYEAEAIREWLANCHD-----	TSPMTNLKMEDC-NLIPNHALHLAIQDW
BAB11278 (689)	IPSVFMCPIIQEVMDKPHVAADG	-----FSYELEAIQEWLSMCHD-----	TSPMTNLRIDYQ-MLTPNHTLRSLIQDW
AAD10166 (725)	APSHYFCPIILREIMEEPIAADG	-----FTYERKALAWLEKHN-----	ISPVTQKLDHF-KLTPNHTLRSAIRDW
AV565864 (1)	-PTHYFICPITLKEIMEDPQIAADG	-----FTYERKAIKWLQKHQD-----	VSPVTKHRLVSH-SLVPNHALRSALQEW
BAA97390 (749)	PPSHFFCPLLKDVMEPCIAADG	-----YTYDRRAIEEWMENHR-----	TSPVINSPLQNV-NLLPNHTLYAAIVEW
BAB08999 (775)	PPSHFICPILLKGVMDPCVAADG	-----YTYDREAIEEWLKQKD-----	TSPVNLPLPNK-NLIPNHTLYAAIVEW
CAB79425 (745)	PTTHFICPILLKDVMEPCVAADG	-----YTYDRHAIEEWLKQHN-----	TSPMTDSPHLSK-NLLPNHTLYAAIMEW
AL035523 (1)	-----CGIMQDVMNEPCVAADG	-----YTYDRHAIEEWLKQHN-----	TSPMTDSPHLSK-NLLPNHTLYAAIMEW
BAB09000 (692)	ADTHYFCPITKDVMEPCVADG	-----YTYEKRALKEWLQKNH-----	KSPMTDLPPFSD-SLLPNHSLLSALKEW
AAF78398 (233)	RLEDFKCPISEIMRDPHVAADG	-----FTYEAEEFRKWLRSGLGR----	TSPKLNKPLLENH-NLVPNHTLRILIKDW
BAB11506 (31)	TPPEFLCPIITGFLMSDPVVVSSG	-----QTFERLSVQVCRNLGYIP----	DLLDGTQ--PDLSTVIPNLAMKSTLFSW
CAB41865 (10)	TPTEFLCPIITGFLMSDPVVVSSG	-----QTFERLSVQVCRNLGFAP----	KLHDGTQ--PDLSTVIPNLAMKSTLFSW
BAB11655 (33)	PPVEFLCPIISKVMSDPVVVSSG	-----QTFERVCVQVCRDLNFIIP----	KLNDDEESLPDFSNIPNLNMKSTLID--
BAB10895 (48)	IPAEFLCPIISGLMADPVIIVSSG	-----HSYERACVIACKTLGFT-----	-----PTPPPDPFSTVIPNLALKSALHSW
CAB80321 (181)	LPEKFKCTLRTVMYDPVVIISG	-----NTFERMQIQKWFDEG-ND----	SCPISKRKL-DDFTLKNVLEKSLQISEW
AAF07347 (246)	PYQAFICPLTKIEMEDPVTTETG	-----VTCERQAVIEFDSFGNS-DEINCPVTGQKL--	TTEL SANVVKLTIQEW
AAF16662 (25)	IYEAFLCPLTKQVMHNPVTTLENG	-----QTFEREAEKWFQCRENGQPLSCPITSKEL	SIT-DLSPSIALRNTIEEW
AAF80621 (23)	IYEAFLCPLTKQVMHNPVTTLENG	-----RTFEREAIEKWFKECRDGRPPSCPILTSQEL	TST-DVSASIALRNTIEEW
AAD39579 (288)	KVEDLLCPISLEIMTDPVVIETG	-----HTYDRSSITKWFSG-NI----	TCPITGKILTST-ELVDNVSVRQVIRKH
AAC24052 (278)	NVDDFLCPISLEIMSDPVVLESG	-----HTYDRSSITKWFASG-NI----	TCPKTKGKL-VSTVLVDFSVKQVTSQY
AtCMPG3 (5)	LPNDFRCPISLEIMSDPVILQSG	-----HTFDRVSIQKWIDSG-NR----	TCPITKPLPSETPYLIPNHALRSLILNF
AAF23200 (10)	IPNYFICPISLEIMKDPVTTVSG	-----ITYDRQNLVWLEKVP-----	SCPVTQKPLPLDSDLTPNHMLRRLIQHW
CAB43434 (7)	IPSFFLCPIISLDIMKDPVIVSTG	-----ITYDRESIEKWLFSCKKN-----	SCPVTQKVI-TETDLPNHTLRRLIQS-
AAD21464 (7)	IPPFFLCPIISLEIMKDPVIVSTG	-----ITYDRESIEKWLFSCKKN-----	SCPVTQKVI-TETDLPNHTLRRLIQS-
AtCMPG1 (33)	IPSQFQCPISYELMKDPVVIASG	-----ITYDRENLEKWFESG-YQ----	TCPVINTVL-TSLEQIPNHTIRRMIQGW
AtCMPG5 (31)	IPPEFQCPISIDLMDPVIIISTG	-----ITYDRESIETWINSGLNK----	TCPVINTVL-TTFDQIPNHTIRKMIQGW
AAG13057 (14)	IPYHFRCPISLDLMDPVVTISTG	-----QTYDRSISDSWIAMG-NT----	TCPVTRVAL-SDFTLIPNHTLRRLIQEW
BAA99687 (14)	IPYHFRCPISLELMQDPVTVCTG	-----QTYDRASIESVVSIGNNT----	TCPVTRAPL-SDFTLIPNHTLRRLIQEW
AtCMPG2 (10)	VPTFFRCPISLDVMKSPVSLCTG	-----VTYDRASIQRWLDGG-NN----	TCPATMQIL-QNKDFIPNRTLQRLIEIW
BAB01797 (12)	VPSFFKCPISLDVMRSPVSLCTG	-----VTYDRASIQRWLDGG-NN----	TCPATMQLL-KTKDFVPNLTLQRLINIW
CAB89350 (11)	VPFFKCPISLDVMKSPVSLCTG	-----VTYDRASIQRWLDGG-NN----	TCPATMQIL-QNKEFVPNLTLHRLIDHW
AtCMPG4 (183)	IPSVFICPISLEPMQDPVTLCTG	-----QTYERSNLKWFNIG-HC----	TCPATMQEL-WDDLTPNKTLLHQLTYTW
CAB66919 (64)	IPSVFICPISLEPMQDPVTLCTG	-----QTYERLNLHKWFNLG-HL----	TCPTIMQEL-WDDTVTPNKTLHHLTYTW

Abb. 4.2. Vergleich der CMPG-Domäne aller bisher veröffentlichten *Arabidopsis* CMPG-Sequenzen

Die in dem phylogenetischen Baum der Abb. 4.1 notierten *Arabidopsis*-Sequenzen sind hier als Sequenzvergleich dargestellt. Zusätzlich sind zwei EST-Sequenzen (AV565864 und AL035523) enthalten, von denen keine Protein-Sequenzen in Datenbanken vorliegen. Erstellung des Sequenzvergleichs wie in Abb. 4.1 beschrieben. Die in Klammern angegebenen Zahlen geben die Positionen der ersten dargestellten Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenzen an. Grau unterlegt sind die in dieser Arbeit analysierten Proteine AtCMPG1-6. Die Aminosäuren C, M, P und G der CMPG-Domäne sind mit einem Stern (*) markiert. **Weiß auf schwarz:** In allen Sequenzen identische Aminosäuren; **dunkelgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen identische Aminosäuren; **hellgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen ähnliche Aminosäuren;

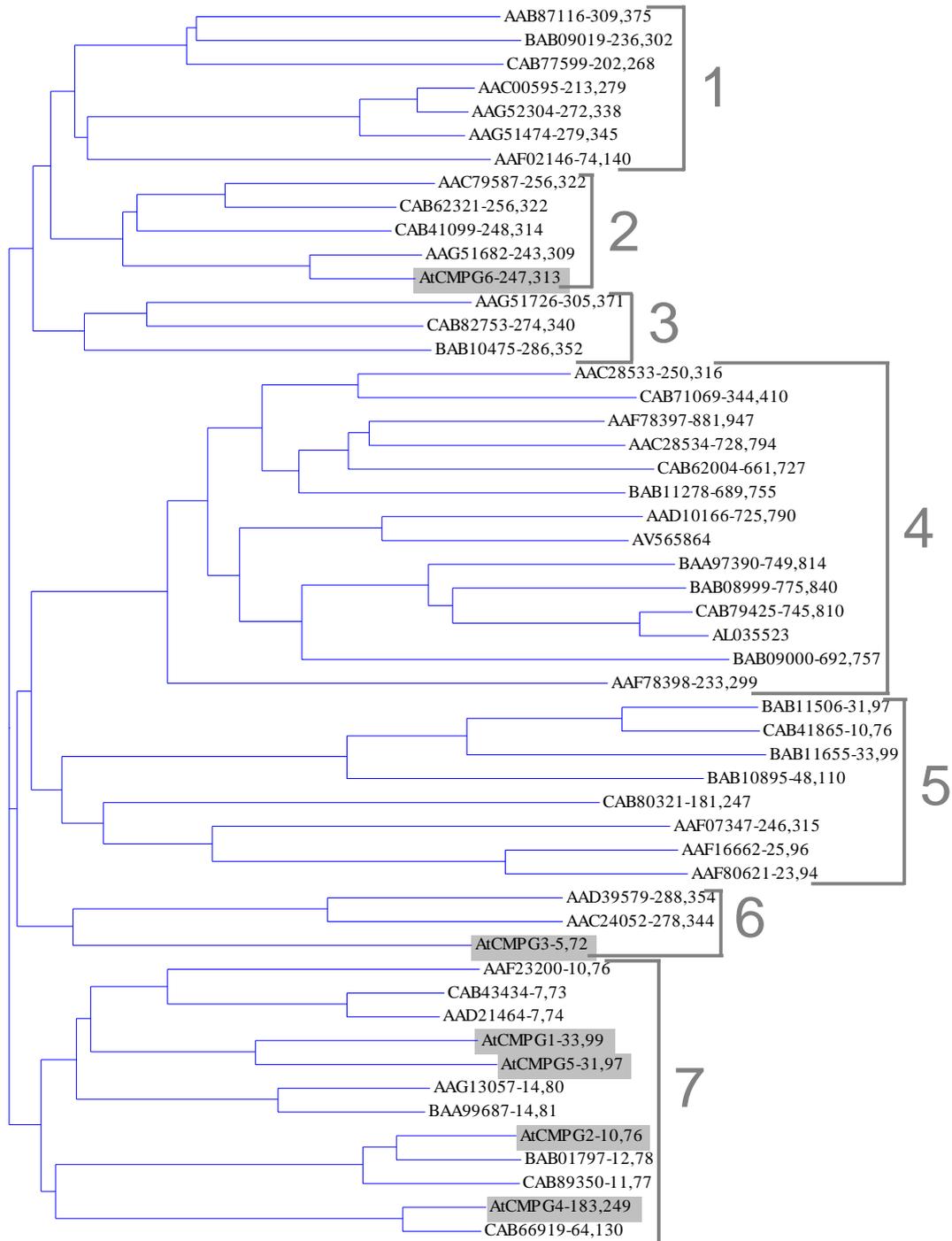


Abb. 4.3. Phylogenetische Analyse aller bisher veröffentlichten *Arabidopsis* CMPG-Sequenzen

In diesem phylogenetischen Baum sind alle in Datenbanken veröffentlichten Sequenzen aus *Arabidopsis* enthalten, die das CMPG-Motiv enthalten und zu AtCMPG1 eine Aminosäure-Identität von mindestens 35 % aufweisen. Für die Erstellung des Sequenzvergleichs wurde von allen Sequenzen nur der Bereich des CMPG-Domäne eingesetzt. Erstellung des phylogenetischen Baums wie in Abb. 4.1 beschrieben. Grau unterlegt sind die Proteine, die in dieser Arbeit analysiert wurden (AtCMPG1 bis AtCMPG6). Die Gruppen 1 bis 7 wurden aufgrund einer Trennung dieser Gruppen bis in Basisliniennähe festgelegt.

Genfamilien

Es gibt keine einheitliche Definition für Genfamilien, auch keine konsistenten Angaben, ab welcher Sequenzähnlichkeit ein Gen einer Genfamilie zugeordnet werden kann. Auch die Größe von Genfamilien variiert stark. So gehören z. B. die Oberflächen-Glykoproteine aus Trypanosomen zu einer Multigenfamilie mit mehr als 1000 Mitgliedern. Diese hohe Anzahl an Proteinen verursacht die antigenische Variabilität dieser humanpathogenen Organismen (Song *et al.*, 1997).

Neben der Familiengröße ist auch die Höhe der Sequenzähnlichkeit zwischen Mitgliedern einer Genfamilie äußerst variabel. Eine sehr hohe Sequenzähnlichkeit liegt bei der Pto-Genfamilie vor. Die Proteine FEN und PTO aus Tomate bestehen zu 87 % aus identischen Aminosäuren. Trotz der sehr hohen Sequenzähnlichkeit haben diese beiden Proteine unterschiedliche Funktionen: FEN vermittelt Sensitivität gegenüber dem Insektizid Fenthion, PTO hingegen vermittelt Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* pv *tomato* (Song *et al.*, 1997).

Unter der Annahme, dass das CMPG-Sequenzmotiv auch eine funktionelle Proteindomäne repräsentiert, umfasst die CMPG-Genfamilie in *Arabidopsis* demnach mindestens 52 Mitglieder (50 Proteine aus dem Stammbaum der Abb. 4.1 sowie zwei zusätzliche EST-Sequenzen, für die keine Proteinsequenz in Datenbanken enthalten war). Von diesen Proteinsequenzen sind die Bereiche der CMPG-Domänen als ein Sequenzvergleich in Abb. 4.2 dargestellt. Die Abb. 4.3 stellt eine Phylogenie-Rekonstruktion dieser Sequenzen dar. Für 20 Mitglieder der CMPG-Genfamilie aus *Arabidopsis* erfolgten erste Expressionsanalysen. Mittels RT-PCR mit einem *real-time*-PCR-Gerät (GeneAmp 5700, PE Applied Biosystems) konnte für 19 von 20 Genen eine Expression in unterschiedlichen Geweben festgestellt werden. Vorläufige Ergebnisse zeigten lediglich für drei dieser Gene eine Elizitorresponsivität. Weil das PCR-Gerät nur probeweise zugänglich war, konnten die Ergebnisse weder bestätigt noch erweitert werden (Diplomarbeit Klebsattel, 2000).

Die Annahme, dass es sich bei dem CMPG-Motiv um eine funktionelle Proteindomäne handelt, wird durch das Protein mit der Accession-Nummer AAF26976 unterstützt. Der in der Abb. 4.5 dargestellte Sequenzvergleich der Proteine AtCMPG1 und AAF26976 zeigt, dass zwischen ihnen eine hohe Sequenzähnlichkeit (52 % identische und 64 % ähnliche Aminosäuren) besteht. Diese Sequenzähnlichkeit ist etwas geringer als die zwischen AtCMPG1 und AtCMPG5 (58 bzw. 64 %). Auch in dem phylogenetischen Baum (Abb. 4.1) gruppiert die Aminosäuresequenz AAF26976 direkt mit AtCMPG1 und AtCMPG5. Interessanterweise fehlt in der Sequenz AAF26976 ziemlich genau der Bereich der CMPG-

Domäne (unterschlängelter Bereich in Abb. 4.5). Die Aminosäuresequenz AAF26976 wurde von Computerprogrammen aus dem 100 kb großen BAC-Klon (Accession-Nr.: AC018363, Datenbankeintrag: 21.01.01) erstellt und in Datenbanken publiziert. Inwieweit es sich bei der Sequenz AAF26976 um ein tatsächlich exprimiertes Protein handelt, muss jedoch erst in Expressionsanalysen geklärt werden.

Eine Übertragung aller sechs möglichen Leserahmen der Nukleinsäuresequenz in eine Aminosäuresequenz mit dem Programm *translate* aus dem GCG-Software-Paket zeigte, dass die vorhergesagte und in Datenbanken publizierte Sequenz korrekt übersetzt wurde und keine eventuelle Intronsequenz deletiert wurde. Der Bereich der CMPG-Domäne ist demzufolge auch in der genomischen Sequenz AC018363 nicht vorhanden.

Dies kann mit dem oft beobachteten Phänomen des *domain shuffling* erklärt werden (Morgenstern and Atchley, 1999; Riechmann *et al.*, 2000; Wulff *et al.*, 2001). Diese Theorie besagt, dass aus bereits vorhandenen Proteindomänen neue Gene zusammengesetzt werden oder auch funktionelle Proteindomänen aus Proteinsequenzen deletiert werden. Es scheint naheliegend, dass ausgehend von einer eventuellen Genduplikation die Vorläufer der Gene *AtCMPG1* und AC018363 (Proteinsequenz AAF26976) in der Evolution weiter verändert wurden und aus dem Vorläufer vom heutigen Protein AAF26976 die mutmaßlich funktionelle CMPG-Domäne aus der Aminosäuresequenz deletiert wurde. Somit wäre es sehr interessant zu wissen, ob die Proteine *AtCMPG1* und AAF26976 verschiedene oder nur teilweise überlappende Funktionen wahrnehmen.

		1		60
AAF26976	(1)	--MVLPRRSRGG-VAKRRNQLISGDISVVEKTLFVQLRSPS-----		
AtCMPG1	(1)	MGLSLRVRRRRGGSVSKKEIIPVTISCSEVEITLPSQFQCPISEYELMKDPVIIASGITYDR		
			* * * *	
		61		120
AAF26976	(39)	-----RIERIQSPRVLLTP		
AtCMPG1	(61)	ENIEKWFESGYQTCPVNTVLTSLQIPNHTIRRMIQGWCSSLGGGIERIPTPRVPVTS		
		121		180
AAF26976	(53)	RDAVEISRRLLQNAAREEYAECLLEIVSKIKNLGRGDTNKKCLVQNGSVLALSSCFERFA		
AtCMPG1	(121)	HQVSEICERLSAATRRGDYACMEMVTKMTRLCKEESERNRKCVKENGAGLVLCVCFDAFS		
		181		240
AAF26976	(113)	AARDGHMRLLEEILFVLSWLPINRSECFNKMGSTASLNCLVRFINGKDAKTRQNAAFCTI		
AtCMPG1	(181)	ENAN-ASLLEETVSVLTMWLPFG-LEGQSKLTTSSFNRLVELLR----NGDQNAAFLI		
		241		300
AAF26976	(173)	REVIADVDRYVYALTDVEGACPLVKKIIRDSVSTSTKASLMVITYRAISSNDKITEKFFVK		
AtCMPG1	(235)	KELLELNVTVHALTKINGVQAFMKISINR---DSTCVNSLISLTHMILTINQETVSRFLE		
		301		360
AAF26976	(233)	LGLVELITEMVYNAEKSVCERSLVVLNATCDNEQCKEDVLRNALIVPLLKILRVSDL		
AtCMPG1	(292)	LDLVNITVEMLVDS-ENSVCALIVLNVICETKEGREKVRNKLIVIPILVKKILKISEK		
		361		420
AAF26976	(293)	ATQCSVSILWKLWKNKKGDCDRLLVEALQVGAFAKLLVLLQVGCEDKTKKASELLRN		
AtCMPG1	(351)	K--DLVSVMKVCKSG-----DGSEVEEALRLGAFKKLVVMLQVGC GEGTKKVTLLKM		
		421		448
AAF26976	(353)	LNRCRNEIEKTN-CVDSSMHLKKNVKKSF		
AtCMPG1	(404)	MNKVMKMNGFVDRSYSSSIEFKHEVKKPF		

Abb. 4.5. Sequenzvergleich der Proteine AtCMPG1 und AAF26976

Erstellt wurde der Sequenzvergleich mit dem Programm Vector NTI 6. Der Bereich der CMPG-Domäne ist unterstrichen. Die Aminosäuren C, M, P und G der CMPG-Domäne sind mit einem Stern (*) markiert. **Weiß auf schwarz:** Identische Aminosäuren; **Grau unterlegt:** Ähnliche Aminosäuren;

Die phylogenetische Analyse der in Abb. 4.2 aufgeführten *Arabidopsis* CMPG-Proteine zeigt, dass die Position der CMPG-Domäne innerhalb des jeweiligen Proteins deutlich variiert. Interessanterweise korreliert dies in sehr vielen Fällen mit der Gruppierung der Proteine in dem phylogenetischen Baum in Abb. 4.3. So befindet sich die CMPG-Domäne bei allen zwölf Proteinen der Gruppe 5 in Abb. 4.3 im ersten Drittel des jeweiligen Proteins. Gleiches gilt für die acht Proteine der Gruppe 4. Bei der Mehrzahl der Proteine der Gruppen 1 bis 3 befindet sich die CMPG-Domäne in der Mitte oder am Ende der jeweiligen Proteine. Eine derartig variable Position der Domäne ist für einige Proteinfamilien beschrieben (Morgenstern and Atchley, 1999).

Die deutliche Sequenzähnlichkeit innerhalb der CMPG-Domäne bei den verschiedensten Proteinen aus diversen Organismen, die fehlende Domäne in dem mutmaßlichen Protein AAF26976 und die variable Position der Domäne, die jedoch bei evolutionär nahestehenden Proteinen konserviert zu sein scheint, lassen es als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei der CMPG-Domäne um eine funktionelle Proteindomäne handelt. Demzufolge können die das CMPG-Motiv enthaltenden Gene als Mitglieder der CMPG-Genfamilie angesehen werden.

4.5 CMPGs als transkriptionelle Regulatoren?

Transkriptionelle Regulatoren sind Proteine, die transkriptionsaktivierend bzw. -reprimierend wirken. Hierzu gehören DNA-bindende und Protein-Protein-Interaktionen ausbildende Proteine. Die sequenz-spezifisch DNA-bindenden transkriptionellen Regulatoren werden als Transkriptionsfaktoren bezeichnet. (Riechmann *et al.*, 2000). Die Eingruppierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt über die DNA-Bindungsdomäne. In dem Genom von *Arabidopsis* liegen mindestens 1533 Transkriptionsfaktoren vor, dies entspricht circa 5,9 % aller Gene. Im Vergleich zu den ebenfalls sequenzierten Genomen von *Drosophila*, *Caenorhabditis* und Hefe, bei denen der Anteil an Transkriptionsfaktoren 4,5, 3,5 bzw. 3,5 % beträgt, ist der Anteil in *Arabidopsis* 1,3 mal höher als in *Drosophila* und 1,7 mal höher als in *Caenorhabditis* und Hefe. Der Anteil zink-komplexierender Transkriptionsfaktoren beträgt weniger als 22 %, in *Drosophila* hingegen 51 %, in *Caenorhabditis* 64 % und in Hefe 56 %. Einzelne Familien von Transkriptionsfaktoren sind in *Arabidopsis* deutlich weniger dominierend als in den drei anderen Organismen. In *Arabidopsis* bildet jede Familie maximal 9 % aller Transkriptionsfaktoren. Die größten Familien in *Arabidopsis* sind die AP2/EREBP-Familie und die MYB-Familie.

In *Arabidopsis* sind erst circa 7 % aller Transkriptionsfaktoren genetisch und funktionell charakterisiert (Riechmann and Ratcliffe, 2000). Erst ein genauere Kenntnis der Transkriptionsfaktoren wird es ermöglichen, die komplexen Regulationsmechanismen von Pflanzen annäherungsweise zu verstehen. Dies verdeutlicht den enormen Forschungsbedarf in diesem Teilgebiet der pflanzlichen Molekularbiologie.

Mit dem jetzigen Kenntnisstand aus den durchgeführten Experimenten und den Sequenz-ähnlichkeiten zu anderen Proteinen ist eine Interaktion von AtCMPG1 bzw. AtCMPG2 mit anderen Proteinen oder eine Ausbildung von Homodi- oder -multimeren am wahrscheinlichsten. Aufgrund der nicht vorhandenen DNA-Bindungs-Domäne in AtCMPG1 und AtCMPG2 ist es jedoch unwahrscheinlich, dass diese Proteine Transkriptionsfaktoren sind. Die mutmaßliche Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen und die Schnelligkeit der mRNA-Akkumulation legt jedoch die Möglichkeit nahe, dass sie als transkriptionelle Regulatoren wirken.

4.6 Ausblick

In dieser Arbeit erfolgten erste Experimente mit Mitgliedern einer neu beschriebenen Genfamilie in *Arabidopsis thaliana*. Eine Vielzahl von Experimenten waren möglich und notwendig, um konkretere Hinweise zur Funktion von AtCMPG1 und AtCMPG2 zu erhalten. Eine weitergehende Expressionsanalyse von Mitgliedern der *Arabidopsis* CMPG-Genfamilie kann Hinweise liefern, ob sich hinter der Sequenzähnlichkeit auch ähnliche Expressionsmuster und damit möglicherweise auch ähnliche Funktionen verbergen. Hierfür sind v. a. Gene interessant, die eine große Sequenzähnlichkeiten zu AtCMPG1 aufweisen (Gruppe 7 in Abb. 4.3 mit 12 Sequenzen) sowie Gene, die mit einer mutmaßlichen Kinasefunktion annotiert wurden (sechs Gene aus Gruppe 2 und fünf aus Gruppe 7, Abb. 4.1).

Um einer Funktion von AtCMPG1 und AtCMPG2 näher zu kommen, ist es wichtig, die subzelluläre Lokalisation beider Proteine aufzuzeigen. Möglicherweise ist die Proteinmenge in Extrakten verschiedener Zellbestandteile (z. B. Kernextrakten, zytosolische Fraktionen und Membranfraktionen) groß genug, um mit den verfügbaren Antiseren entsprechende Signale zu erhalten. Parallel zur Extrakterstellung von Wildtyp-Pflanzen sollten jedoch auch Extrakte der Überexpressionslinien hergestellt werden. In Proteinextrakten dieser Linien ist die Proteinmenge von AtCMPG1 bzw. AtCMPG2 sicherlich ausreichend, um mit den Antiseren Signale zu erhalten.

Falls diese Analysen mit den vorhandenen Antiseren dennoch keine Aussage zur subzellulären Lokalisation der Proteine ermöglichen, können Peptid-Antikörper hergestellt werden, die gegen einen Teilbereich des AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Proteins gerichtet sind. Die Verfügbarkeit spezifischer und vor allem sensitiver Antiseren ermöglicht eine Vielzahl von Experimenten zur Funktionsaufklärung, wie z. B. Bindungsstudien, die Aufschluss darüber geben können, ob AtCMPG1- bzw. AtCMPG2-Protein an Protein-DNA- oder Protein-Protein-Interaktionen beteiligt ist. Falls konkretere Hinweise auf eine Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen erhalten werden, besteht die nächste Aufgabe in der Identifizierung der Bindungspartner. Dies ist sowohl mit *yeast-two-hybrid*- als auch mit Immunopräzipitations-Experimenten möglich.

Des Weiteren ist die Frage, ob AtCMPG1 und AtCMPG2 an Signalkaskaden beteiligt sind, ungeklärt. Vor allem mit den in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten AtCMPG1- und AtCMPG2-Überexpressionslinien sowie der AtCMPG1-Nullmutante erscheinen DNA-*microarray*-Analysen als ein vielversprechender Weg, Gene zu finden, deren Expressionsniveaus durch AtCMPG1- bzw. AtCMPG2 beeinflusst werden (Desprez *et al.*, 1998; Schenk *et al.*, 2000). Mit Hybridisierungen von Filtern mit einer möglichst vollständigen

Arabidopsis cDNA-Kollektion oder –im kleineren Maßstab- von Filtern mit ausgewählten Klonen mit RNA der Überexpressionslinien oder der *AtCMPG1*-Nullmutante im Vergleich zum Wildtyp können Gene aufgezeigt werden, die in ihrer Expression von der *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-Expression moduliert werden. Diese Analysen sowie eine Expressionsanalyse von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* nach diversen Stimuli (z. B. Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen, H₂O₂, ZnCl₂, GABA und BABA (Zimmerli *et al.*, 1292), Abscisinsäure) können wertvolle Hinweise auf einen eventuellen Signaltransduktionsweg geben, an dem *AtCMPG1* und *AtCMPG2* beteiligt sind.

Einen Schritt weiter - posttranslationale Regulationen einbezogen - führt eine Analyse von *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien, *AtCMPG1*-Nullmutante und Wildtyp auf eine Veränderung der Proteinmuster. Hierzu wären 2D-Proteingele mit einer nachfolgenden massenspektroskopischen Analyse der differenziellen Signale notwendig (Proteom-Analyse Shevchenko *et al.*, 1996).

Sowohl die DNA-*microarray*-Analysen als auch die Analysen veränderter Proteinmuster sind als Vergleich von Wildtyppflanzen mit Linien veränderter *AtCMPG1*- bzw. *AtCMPG2*-Expression sinnvoll. Vergleichende Analysen unbehandelter Pflanzen mit Pflanzen nach *Pseudomonaden*-Infiltration der einzelnen Linien ergeben weitergehende Aussagen in Bezug auf die Bedeutung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* bei der Pathogenabwehr.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Isolierung und Charakterisierung ausgewählter Gene aus *Arabidopsis thaliana*, die Mitglieder einer bisher noch nicht beschriebenen Genfamilie sind und nach Pathogenbefall teilweise sehr schnell und transient induziert werden.

Die Genfamilie zeichnet sich durch einen 67 Aminosäuren umfassenden Sequenzbereich aus, der mit einer hohen Sequenzähnlichkeit in mindestens 52 *Arabidopsis*-Sequenzen vorliegt. Nach den ersten vier in diesem Sequenzbereich strikt konservierten Aminosäuren Cystein, Methionin, Prolin und Glycin wurde sowohl dieser Sequenzbereich (CMPG-Motiv) als auch die Genfamilie (CMPG-Genfamilie) benannt. Die CMPG-Genfamilie ist hauptsächlich in Pflanzen vertreten. Nur einige wenige das CMPG-Motiv enthaltende Sequenzen wurden in anderen Reichen gefunden. Die CMPG-Domäne weist Sequenzähnlichkeiten zu diversen an Protein-Protein-Interaktionen beteiligten Proteinen auf (RING-Finger-Proteine, Proteinkinasen und am Ubiquitin-vermittelten Proteinabbau beteiligte Faktoren).

Die beiden in dieser Arbeit schwerpunktmäßig untersuchten Gene *AtCMPG1* und *AtCMPG2* zeigten in einer mit Elizitor behandelten *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur sowie in mit *Pseudomonas syringae* pv *tomato* infiltrierten *Arabidopsis*-Blättern eine sehr schnelle mRNA-Akkumulation. Für beide Gene und in beiden Systemen lag die maximale mRNA-Menge 30 Minuten nach Zugabe des Elizitors bzw. nach Infiltration der Pseudomonaden vor. Bereits zwei Stunden nach Behandlung wurden nur noch zwischen 20 und 40 % der maximalen mRNA-Menge nachgewiesen, wobei *AtCMPG1* eine wesentlich geringere Basisaktivität als *AtCMPG2* aufwies. Unterschiede zwischen der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion waren nur insofern festzustellen, als in der inkompatiblen Interaktion ein biphasischer Expressionsverlauf vorlag.

Die Analyse von stabil transformierten Promotor::GUS-Fusionslinien zeigte eine starke Wundinduzierbarkeit beider Gene. Dies ist sehr wahrscheinlich auch die Ursache der starken *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Expression in Wurzeln von in unsteriler Erde angezogenen Pflanzen. Die Ernte und das Auswaschen der Wurzeln von der sie umgebenden Erde wird eine Verwundung der Wurzeln und die nachfolgende *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Expression ausgelöst haben. In Wurzeln von sterilen Flüssigkulturen konnte in RNA-Blot-Analysen keine Expression von *AtCMPG1* nachgewiesen werden. Abgesehen von der wundinduzierten Expression wurde mit den Promotor::GUS-Fusionslinien für beide Gene außer einer

Expression in den Abscissionszonen der Schoten sowie für *AtCMPG2* einer Expression an der Schotenspitze keine endogen regulierte Expression beobachtet.

Diese Expressionsmuster beider Gene deuten darauf hin, dass *AtCMPG1* und *AtCMPG2* eine wichtige Funktion bei der allgemeinen Pathogenabwehr sowie bei der Ausbildung von Schutzbarrieren vor einer potenziellen Besiedlung mit pathogenen Organismen übernehmen.

In einer Deletionsanalyse konnte der elizitor-responsive Bereich des *AtCMPG1*-Promotors auf ein 39 bp langes Promotorelement eingegrenzt werden. Dieses Element vermittelt in Fusion mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus sowohl eine 16fache Elizitorinduzierbarkeit in transfizierten *Petersilie*-Protoplasten als auch eine deutliche, obgleich schwächere Elizitorinduzierbarkeit in transfizierten *Arabidopsis*-Protoplasten. Das Promotorelement enthält neben einer in pathogen-responsiven Promotoren sehr häufig enthaltenen W-Box sowie zwei W-Kernsequenzen einen weiteren 19 bp umfassenden Sequenzbereich, der für eine volle Elizitorresponsivität dieses Elementes offenbar notwendig ist, jedoch keine bisher charakterisierten *cis*-regulatorischen Elemente enthält. Eine große Sequenzähnlichkeit dieses 39 bp langen Elementes besteht zu dem E17-Element des *PcEli17*-Promotors mit jedoch einigen interessanten Unterschieden (Kirsch *et al.*, 2001). *PcEli17* ist ein zu *AtCMPG1* mutmaßlich funktionshomologes Gen aus *Petroselinum crispum* und stellte den Ausgangspunkt dieser Arbeit dar.

Für *AtCMPG1* konnte eine Nullmutante isoliert werden. Diese *AtCMPG1*-Nullmutante sowie transgene *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien zeigten unter verschiedenen getesteten Wachstumsbedingungen keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp. Es liegen jedoch Hinweise auf einen biochemischen Phänotyp vor. In HPLC-Analysen wurde nach *Pseudomonaden*-Infiltration ein verändertes Sekundärstoffmuster beobachtet, das jedoch nicht näher untersucht wurde.

Mit dem jetzigen Wissen aus den durchgeführten Experimenten sowie den Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen ist eine Beteiligung von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* an Protein-Protein-Interaktionen sowie eine Funktion als transkriptionelle Regulatoren sehr wahrscheinlich.

6 Literaturverzeichnis

- Alonso, E., De Carvalho Niebel, F., Obregon, P., Gheysen, G., Inze, D., Van Montagu, M. and Castresana, C. (1995) Differential in vitro DNA binding activity to a promoter element of the gn1 beta-1,3-glucanase gene in hypersensitively reacting tobacco plants. *Plant J.*, **7**, 309-320.
- Alting-Mees, M.A., Sorge, J.A. and Short, J.M. (1992) pBluescriptII: Multifunctional cloning and mapping vectors. *Methods in Enzymology*, **216**, 483-508.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Amsterdam, A., Burgess, S., Golling, G., Chen, W., Sun, Z., Townsend, K., Farrington, S., Haldi, M. and Hopkins, N. (1999) A large-scale insertional mutagenesis screen in zebrafish. *Genes & Development*, **13**, 2713-2724.
- Arteca, J.M. and Arteca, R.N. (1999) A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 209-219.
- Ayers, A.R., Ebel, J., Valente, B. and Albersheim, P. (1976) Host-pathogen interactions. X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.*, **57**, 760-765.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S. and Hahlbrock, K. (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in Parsley cells. *Biological Chemistry*, **379**, 1127-1135.
- Baulcombe, D.C. (1999) Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 109-13.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. and Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol. Biol.*, **20**, 1195-1197.
- Benfey, P.N. and Chua, N.H. (1990) The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, **250**, 959-966.
- Benhamou, N. (1996) Elicitor-Induced Plant Defence Pathways. *TIPS.*, **1**, 233-240.
- Bent, A.F. (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.*, **124**, 1540-1547.
- Bevan, M., Mayer, K., White, O., Eisen, J.A., Preuss, D., Bureau, T., Salzberg, S.L. and Mewes, H.W. (2001) Sequence and analysis of the *Arabidopsis* genome. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 105-110.
- Bi, Y.M., Brugiére, N., Cui, Y., Goring, D.R. and Rothstein, S.J. (2000) Transformation of *Arabidopsis* with a Brassica SLG/SRK region and ARC1 gene is not sufficient to transfer the self-incompatibility phenotype. *Molecular & General Genetics*, **263**, 648-654.
- Bleecker, A.B. and Patterson, S.E. (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **9**, 1169-79.
- Blomberg, A. (1997) Osmoresponsive proteins and functional assessment strategies in *Saccharomyces cerevisiae*. *Electrophoresis*, **18**, 1429-1440.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**, 93-99.

- Blume, B., Nuernberger, T., Nass, N. and Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, **12**, 1425-1440.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. and Lam, B.C.-H.** (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interaction. *TIPS*, **3**, 342-346.
- Bodeau, J.P. and Walbot, V.** (1996) Structure and regulation of the maize Bronze2 promoter. *Plant Mol. Biol.*, **32**, 599-609.
- Bouche, N. and Bouchez, D.** (2001) Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted. *Current Opinion in Plant Biology*, **4**, 111-117.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- Brandis, H., Köhler, W., Eggers, H.J. and Gulverer, G.** (1994) *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*, 7.Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart - Jena - New York.
- Brown, P.T.H., Lange, F.D., Kranz, E. and Loerz, H.** (1993) Analysis of single protoplast and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Molecular & General Genetics*, **237**, 311-317.
- Bussemaker, H.J., Li, H. and Siggia, E.D.** (2001) Regulatory element detection using correlation with expression. *Nature Genetics*, **27**, 167-171.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg Jean, T. and Buchanan-Wollaston, V.** (1998) Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in Arabidopsis in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant J.*, **16**, 209-221.
- Cai, D., Kleine, M., Kifle, S., Harloff, H.J., Sandal, N.N., Marcker, K.A., Klein Lankhorst, R.M., Salentijn, E.M.J., Lange, W., Stiekema, W.J., Wyss, U., Grundler, F.M.W. and Jung, C.** (1997) Positional cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, **275**, 832-834.
- Cao, H., Li, X. and 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.
- Cheng, T.-H. and Gartenberg, M.R.** (2000) Yeast heterochromatin is a dynamic structure that requires silencers continuously. *Genes & Development*, **14**, 452-463.
- Chytilova, E., Macas, J. and Galbraith David, W.** (1999) Green fluorescent protein targeted to the nucleus, a transgenic phenotype useful for studies in plant biology. *Annals of Botany*, **83**, 645-654.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 735-743.
- Collmer, A., Badel Jorge, L., Charkowski Amy, O., Deng, W.-L., Fouts Derrick, E., Ramos Adela, R., Rehm Amos, H., Anderson Deborah, M., Schneewind, O., van Dijk, K. and Alfano James, R.** (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8770-8777.
- Coupe, S.A., Taylor, J.E. and Roberts, J.A.** (1997) Temporal and Spatial Expression of mRNAs Encoding Pathogenesis-Related Proteins During Ethylene-Promoted Leaflet Abscission in *Sambucus Nigra*. *Plant, Cell & Environment*, **20**, 1517-1524.
- Dangl, J.L., Haufler, K.-D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J.*, **6**, 2551-2556.

- Debener, T., Lehnacker, H., Arnold, M. and Dangl, J.L.** (1991) Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J.*, **1**, 289-302.
- Del Campillo, E. and Lewis, L.N.** (1992) Identification and Kinetics of Accumulation of Proteins Induced By Ethylene in Bean Abscission Zones. *Plant Physiol.*, **98**, 955-961.
- Desprez, T., Amselem, J., Caboche, M. and Höfte, H.** (1998) Differential gene expression in *Arabidopsis* monitored using cDNA arrays. *Plant J.*, **14**, 643-652.
- Dong, X., Mindrinos, M., Davis, K.R. and Ausubel, F.M.** (1991) Induction of *Arabidopsis* Defense Genes By Virulent and Avirulent *Pseudomonas-Syringae* Strains and By a Cloned Avirulence Gene. *Plant Cell*, **3**, 61-72.
- Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. and Kauffmann, S.** (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.*, **121**, 163-171.
- Dörmann, P., Gopalan, S., He, S.Y. and Benning, C.** (2000) A gene family in *Arabidopsis thaliana* with sequence similarity to NDR1 and HIN1. *Plant Physiology & Biochemistry*, **38**, 789-796.
- Dove, S.K., Cooke, F.T., Douglas, M.R., Sayers, L.G., Parker, P.J. and Michell, R.H.** (1997) Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. *Nature*, **390**, 187-192.
- Du, L. and Chen, Z.** (2000) Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **24**, 837-847.
- Durner, J., Shah, J. and Klessig, D.F.** (1997) Salicylic Acid and Disease Resistance in Plants. *TIPS*, **2**, 266-274.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*, **12**, 963-977.
- Dynan, W.S.** (1989) Modularity in Promoters and Enhancers. *Cell*, **58**, 1-4.
- Ebel, J. and Cosio, E.G.** (1994) Elicitors of plant defense responses. *International Review of Cytology*, **148**, 1-36.
- Eulgem, T., Rushton Paul, J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and Somssich Imre, E.** (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: Rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.*, **18**, 4689-4699.
- Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, **132**, 6-13.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K. and Weisshaar, B.** (1994) Functional analysis of a light-responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell*, **6**, 1607-1621.
- Feldmann, K.A.** (1991) T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*: Mutational spectrum. *Plant J.*, **1**, 71-82.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.*, **18**, 265-276.
- Finnegan, E.J., Genger, R.K., Kovac, K., Peacock, W.J. and Dennis, E.S.** (1998) DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5824-5829.

- Finnegan, E.J., Peacock, W.J. and Dennis Elizabeth, S.** (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**, 217-223.
- Flanders, D.J., Weng, S., Petel, F.X. and Cherry, J.M.** (1998) AtDB, the Arabidopsis thaliana Database, and graphical-web-display of progress by the progress by the Arabidopsis Genome Initiative. *Nucl. Acids. Res.*, **26**, 80-84
- Freemont, P.S.** (2000) Ubiquitination: RING for destruction? *Current Biology*, **10**, R84-R87.
- Freytag, S., Arabatzis, N., Hahlbrock, K. and Schmelzer, E.** (1994) Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions. *Planta*, **194**, 123-135.
- Goebel, M.G. and Petes, T.D.** (1986) Most of the Yeast *Saccharomyces-Cerevisiae* Genomic Sequences Are Not Essential For Cell Growth and Division. *Cell*, **46**, 983-992.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **18**, 277-284.
- Gonzalez-Carranza, Z.H., Lozoyagloria, E. and Roberts, J.A.** (1998) Recent Developments in Abscission - Shedding Light On the Shedding Process. *TIPS*, **3**, 10-14.
- Gopalan, S., Wei, W. and He, S.Y.** (1996) Hrp Gene-dependent induction of hin1: A plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant J.*, **10**, 591-600.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. and Mansfield, J.** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.*, **23**, 441-450.
- Grimmig, B. and Matern, U.** (1997) Structure of the parsley caffeoyl-CoA O-methyltransferase gene, harbouring a novel elicitor responsive cis-acting element. *Plant Mol. Biol.*, **33**, 323-341.
- Gross, P., Julius, C., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K.** (1993) Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected, cultured parsley cells. *EMBO J.*, **12**.
- Gu, T., Mazzurco, M., Sulaman, W., Matias, D.D. and Goring, D.R.** (1998) Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the S-locus receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 382-387.
- Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K. and Schmelzer, E.** (1998) Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8398-8403.
- Guttman, D.S. and Greenberg, J.T.** (2001) Functional analysis of the type III effectors AvrRpt2 and AvrRpm1 of *Pseudomonas syringae* with the use of a single-copy genomic integration system. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **14**, 145-155.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nuernberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. and Schmelzer, E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 4150-4157.
- Hain, R., Stabel, P., Czernilofsky, A.P., Steinbiß, H.H., Herrera-Estrella, L. and Schell, J.** (1985) Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimaeric gene in plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.*, **199**, 161-168.
- Hamberger, B.** (1999) Versuche zur intrazellulären Lokalisation eines mutmaßlich an der Regulation der pflanzlichen Pathogenabwehr beteiligten Proteins. *Diplomarbeit, Universität zu Köln*.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C.** (1999) A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, **286**, 950-952.

- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 575-607.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, **166**, 557-580.
- Hara, K., Yagi, M., Kusano, T. and Sano, H.** (2000) Rapid systemic accumulation of transcripts encoding a tobacco WRKY transcription factor upon wounding. *Molecular & General Genetics*, **263**, 30-37.
- Hashim, M., Roberts, J.A., Rossall, S. and Dickinson, M.J.** (1997) Leaflet Abscission and Phytoalexin Production During the Response of Two Faba Bean Breeding Lines to Botrytis Infection. *Plant Pathology.*, **46**, 989-996.
- Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 315-319.
- Hoffmann, G.M., Nienhaus, F., Poelin, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H.C. and Wilbert, H.** (1994) *Lehrbuch der Phytomedizin*. Paul Parey Verlag, Berlin - Hamburg.
- Holmes, D.S. and Quigley, M.** (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, **114**, 193-197.
- Hong, S.B., Sexton, R. and Tucker, M.L.** (2000) Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. *Plant Physiol.*, **123**, 869-881.
- Initiative, A.G.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796-815.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B. and Zhu, J.-K.** (1997) Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in *Arabidopsis*: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent pathways. *Plant Cell*, **9**, 1935-1949.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4800-4805.
- Jakobek, J.L., Smith-Becker, J.A. and Lindgren, P.B.** (1999) A bean cDNA expressed during a hypersensitive reaction encodes a putative calcium-binding protein. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **12**, 712-719.
- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W.** (1987) GUS fusions: β -glucuronidase a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, **6**, 3901-3907.
- Jelitto-Van Dooren, E., Vidal, S. and Denecke, J.** (1999) Anticipating endoplasmic reticulum stress: A novel early response before pathogenesis-related gene induction. .
- Jia, Y., Loh, Y.T., Zhou, J. and Martin, G.B.** (1997) Alleles of Pto and Fen occur in bacterial speck-susceptible and fenthion-insensitive tomato cultivars and encode active protein kinases. *Plant Cell*, **9**, 61-73.
- Jinn, T.-L., Stone Julie, M. and Walker John, C.** (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes & Development*, **14**, 108-117.
- Jonak, C., Beisteiner, D., Beyerly, J. and Hirt, H.** (1997) Wound-induced expression and activation of WIG, a novel glycogen synthase kinase 3. *Plant Cell*, **12**, 1467-1475.

- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D.G.** (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, **266**, 789-793.
- Jurzitza, G.** (1987) *Anatomie der Samenpflanzen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart - New York.
- Kahmann, R. and Basse, C.** (1997) Signaling and Development in Pathogenic Fungi - New Strategies For Plant Protection. *TIPS*, **2**, 366-368.
- Kempken, F. and Kempken, R.** (2000) *Gentechnik bei Pflanzen: Chancen und Risiken*, Berlin-Heidelberg-New York.
- Kiedrowski, S., Kawallek, P., Hahlbrock, K., Somssich, I.E. and Dangl, J.L.** (1992) Rapid activation of a novel plant defense gene is strictly dependent on the *Arabidopsis RPM1* disease resistance locus. *EMBO J.*, **11**, 4677-4684.
- Kinkema, M., Fan, W. and Dong, X.** (2000) Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell*, **12**, 2339-2350.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1997a) Rapid and transient induction of a parsley (*Petroselinum crispum*) microsomal D-12 fatty acid desaturase by fungal elicitor. *Plant Physiol.*, **115**, 283-289.
- Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K.** (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. *Plant J., im Druck*.
- Kirsch, C., Takamiya Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1997b) Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial omega-3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2079-2084.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.-M., Yvin, J.-C., Kopp, M., Kloareg, B. and Fritig, B.** (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in Tobacco. *Plant Physiol.*, **124**, 1027-1037.
- Klebsattel, M.** (2000) Analyse von Metallbindeeigenschaften eines CMPG-Proteins und Expressionsmuster der CMPG-Multigenfamilie in *Arabidopsis thaliana*. *Diplomarbeit, Universität Fridericiana Karlsruhe*.
- Klein, R.R. and Salvucci, M.W.** (1992) Photoaffinity Labeling of Mature and Precursor Forms of the Small Subunit of Ribulose-1 5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase After Expression in *Escherichia-Coli*. *Plant Physiol.*, **98**, 546-553.
- Knippers, R.** (1995) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 6. Auflage.
- Koetsier, P.A., Schorr, J. and Doerfler, W.** (1993) A rapid optimized protocol for downward alkaline Southern blotting of DNA. *Biotechniques*, **15**, 262.
- Kombrink, E. and Hahlbrock, K.** (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.*, **81**, 216-221.
- Koncz, C. and Schell, J.** (1986) The promotor of T-L DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular General Genetics*, **204**, 383-396.
- Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G. and Sheen, J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2940-2945.

- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J. and Weisshaar, B. (1998) Towards functional characterisation of the members of the *R2R3-MYB* gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **16**, 263-276.
- Kumar, S. and Gadagkar Sudhindra, R. (2000) Efficiency of the neighbor-joining method in reconstructing deep and shallow evolutionary relationships in large phylogenies. *Journal of Molecular Evolution*, **51**, 544-553.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamb, C. and Dixon Richard, A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*. Jones, R. L.: Ed. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**1997, 251-275.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollaender-Czytko, H. and Weiler, E.W. (1996) Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 323-335.
- Laudert, D. and Weiler, E.W. (1998) Allene oxide synthase: A major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J.*, **15**, 675-684.
- Lease, K., Ingham, E. and Walker, J.C. (1998) Challenges in Understanding Rlk Function. *Current Opinion in Plant Biology.*, **1**, 388-392.
- Liljegren, S.J., Ditta, G.S., Eshed, Y., Savidge, B., Bowman, J.L. and Yanofsky, M.F. (2000) SHATTERPROOF MADS-box genes control seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, **404**, 766-770.
- Maleck, K., Levine, A., Eulgem, T., Morgan, A., Schmid, J., Lawton Kay, A., Dangl Jeffery, L. and Dietrich Robert, A. (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nature Genetics*, **26**, 403-410.
- Martin, C. and Paz-Ares, J. (1997) MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics*, **13**, 67-73.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. (1993) Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, **262**, 1432-1436.
- Martin, G.B., Frary, A., Wu, T., Brommonschenkel, S., Chunwongse, J., Earle, E.D. and Tanksley, S.D. (1994) A Member of the Tomato Pto Gene Family Confers Sensitivity to Fenthion Resulting in Rapid Cell Death. *Plant Cell*, **6**, 1543-1552.
- Marx, J. (2000) Interfering with gene expression. *Science*, **288**, 1370-1372.
- McNellis, T.W., Mudgett, M.B., Li, K., Aoyama, T., Horvath, D., Chua, N.H. and Staskawicz, B.J. (1998) Glucocorticoid-inducible expression of a bacterial avirulence gene in transgenic *Arabidopsis* induces hypersensitive cell death. *Plant J.*, **14**, 247-257.
- Meissner, R.C., Jin, H., Cominelli, E., Denekamp, M., Fuertes, A., Greco, R., Kranz, H.D., Penfield, S., Petroni, K., Urzainqui, A., Martin, C., Paz-Ares, J., Smeekens, S., Tonelli, C., Weisshaar, B., Baumann, E., Klimyuk, V., Marillonnet, S., Patel, K., Speulman, E., Tissier, A.F., Bouchez, D., Jones, J.J.D., Pereira, A., Wisman, E. and Bevan, M. (1999) Function search in a large transcription factor gene family in *Arabidopsis*: Assessing the potential of reverse genetics to identify insertional mutations in R2R3 MYB genes. *Plant Cell*, **11**, 1827-1840.

- Meyerowitz, E.M.** (1989) *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*, **56**, 263-269.
- Mitchell, P.J. and Tjian, R.** (1989) Transcriptional Regulation in Mammalian Cells By Sequence-Specific Dna Binding Proteins. *Science*, **245**, 371-378.
- Morgenstern, B. and Atchley, W.R.** (1999) Evolution of bHLH transcription factors: Modular evolution by domain shuffling? *Molecular Biology & Evolution*, **16**, 1654-1663.
- Mozo, T., Dewar, K., Dunn, P., Ecker Joseph, R., Fischer, S., Kloska, S., Lehrach, H., Marra, M., Martienssen, R., Meier-Ewert, S. and Altmann, T.** (1999) A complete BAC-based physical map of the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nature Genetics*, **22**, 271-275.
- Müller, E. and Loeffler, W.** (1992) Mykologie- Grundriß für Naturwissenschaftler und Mediziner. *Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York*, 5. Auflage.
- Mur Luis, A.J., Brown Ian, R., Darby Robert, M., Bestwick Charles, S., Bi, Y.-M., Mansfield John, W. and Draper, J.** (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J.*, **23**, 609-621.
- Nürnberger, T.** (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cellular & Molecular Life Sciences*, **55**, 167-182.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**, 449-460.
- Odonnell, P.J., Truesdale, M.R., Calvert, C.M., Dorans, A., Roberts, M.R. and Bowles, D.J.** (1998) A Novel Tomato Gene That Rapidly Responds to Wound- and Pathogen-Related Signals. *Plant J.*, **14**, 137-142.
- Ohtake, Y., Takahashi, T. and Komeda, Y.** (2000) Salicylic acid induces the expression of a number of receptor-like kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, **41**, 1038-1044.
- Oldroyd, G.E.D. and Staskawicz, B.J.** (1998) Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 10300-10305.
- Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J. and Ryan, C.A.** (2001) Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **13**, 179-191.
- Osborn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Parniske, M.** (2000) Intracellular accommodation of microbes by plants: A common developmental program for symbiosis and disease? *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 320-328.
- Paxton, J.D.** (1981) Phytoalexins - a working redefinition. *Phytopath. Z.*, **101**, 106-109.
- Pelaz, S., Ditta Gary, S., Baumann, E., Wisman, E. and Yanofsky Martin, F.** (2000) B and C floral organ identity functions require SEPALLATA MADS-box genes. *Nature*, **405**, 200-203.
- Plasterk, R.H.A. and Ketting, R.F.** (2000) The silence of the genes. *Current Opinion in Genetics & Development. [print]*, **10**, 562-567.
- Prescott, M., Nowakowski, S., Nagley, P. and Devenish, R.J.** (1999) The length of polypeptide linker affects the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Analytical Biochemistry.*, **273**, 305-307.
- Puente, P., Wei, N. and Deng Xing, W.** (1996) Combinatorial interplay of promoter elements constitutes the minimal determinants for light and developmental control of gene expression in *Arabidopsis*. *EMBO J.*, **15**, 3732-3743.

- Puzio, P.S., Lausen, J., Heinen, P. and Grundler, F.M.W.** (2000) Promoter analysis of *pyk20*, a gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, **157**, 245-255.
- Quirino, B.F., Normanly, J. and Amasino, R.M.** (1999) Diverse range of gene activity during *Arabidopsis thaliana* leaf senescence includes pathogen-independent induction of defense-related genes. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 267-278.
- Rabinowicz, P.D. and Grotewold, E.** (2000) A novel reverse-genetic approach (SIMF) identifies Mutator insertions in new Myb genes. *Planta*, **211**, 887-893.
- Reddy, J.T., Korth, K.L., Wesley, S.V., Howles, P.A., Rasmussen, S., Lamb, C. and Dixon, R.A.** (2000) Post-transcriptional regulation of phenylalanine ammonia-lyase expression in tobacco following recovery from gene silencing. *Biological Chemistry*, **381**, 655-665.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. and Farmer Edward, E.** (2000) Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **12**, 707-719.
- Rhee, S.Y.** (2000) Bioinformatic resources, challenges, and opportunities using *Arabidopsis* as a model organism in a post-genomic era. *Plant Physiol.*, **124**, 1460-1464.
- Riechmann, J.L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C.Z., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O.J., Samaha, R.R., Creelman, R., Pilgrim, M., Broun, P., Zhang, J.Z., Ghandehari, D., Sherman, B.K. and Yu, G.L.** (2000) *Arabidopsis* transcription factors: Genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*, **290**, 2105-2110.
- Riechmann, J.L. and Ratcliffe, O.J.** (2000) A genomic perspective on plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 423-434.
- Ritter, C. and Dangl, J.L.** (1995) The *avrRpm1* gene of *Pseudomonas syringae* pv *maculicola* is required for virulence on *arabidopsis*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, **8**, 444-453.
- Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, C., Chen, J. and Dellaporta, S.L.** (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in *Arabidopsis*. *Science*, **273**, 654-657.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. and 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.
- Saitou, N. and Nei, M.** (1987) The Neighbor-Joining Method a New Method For Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology & Evolution*, **4**, 406-425.
- Saker, M.M., Bekheet, S.A., Taha, H.S., Fahmy, A.S. and Moursy, H.A.** (2000) Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints. *Biologia Plantarum*, **43**, 347-351.
- Salinas-Mondragon, R.E., Garciduenas-Pina, C. and Guzman, P.** (1999) Early elicitor induction in members of a novel multigene family coding for highly related RING-H2 proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 579-590.
- Salmeron, J.M., Barker, S.J., Carland, F.M., Mehta, A.Y. and Staskawicz, B.J.** (1994) Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell*, **6**, 511-520.
- Salmeron, J.M., Oldroyd, G.E.D., Rommens, C.M.T., Scofield, S.R., Kim, H.S., Lavelle, D.T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J.** (1996) Tomato *prf* is a member of the leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes and lies embedded within the *Pto* kinase gene cluster. *Cell*, **86**, 123-133.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Saurin, A.J., Borden, K.L.B., Boddy, M.N. and Freemont, P.S.** (1996) Does This Have a Familiar Ring. *TIBS*, **21**, 208-214.
- Schaefer, B.C.** (1995) Revolutions in Rapid Amplification of cDNA Ends: New Strategies for Polymerase Chain Reaction Cloning of Full-Length cDNA Ends. *Analytical Biochemistry*, **227**, 255-273.
- Scheel, D., Hauffe, K.-D., Jahnen, W. and Hahlbrock, K.** (1986) Stimulation of phytoalexin formation in fungus-infected plants and elicitor treated cell cultures of parsley. In Lugtenberg, B. (ed.) *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. Springer-Verlag, Berlin, p. 325.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. and Manners, J.M.** (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11655-11660.
- Schlegel, H.G.** (1992) Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York*, 7. Auflage.
- Schwechheimer, C. and Bevan, M.** (1998) The Regulation of Transcription Factor Activity in Plants. *TIPS.*, **3**, 378-383.
- Seki, H., Ichinose, Y., Ito, M., Shiraishi, T. and Yamada, T.** (1997) Combined effects of multiple cis-acting elements in elicitor-mediated activation of PCHS1 gene. *Plant & Cell Physiology*, **38**, 96-100.
- Seo, S., Okamoto, N., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H. and Ohashi, Y.** (1995) Tobacco Map Kinase - a Possible Mediator in Wound Signal Transduction Pathways. *Science.*, **270**, 1988-1992.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H. and Mann, M.** (1996) Linking Genome and Proteome By Mass Spectrometry - Large-Scale Identification of Yeast Proteins From Two Dimensional Gels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 14440-14445.
- Siemering, K.R., Golbik, R., Sever, R. and Haseloff, J.** (1996) Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Current Biology*, **6**, 1653-1663.
- Smith, C.J.** (1996) Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol.*, **132**, 1-45.
- Somssich, I.E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. and Schulz, W.** (1989) Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol. Biol.*, **12**, 227-234.
- Song, W.-Y., Pi, L.-Y., Wang, G.-L., Gardner, J., Holsten, T. and Ronald Pamela, C.** (1997) Evolution of the rice Xa21 disease resistance gene family. *Plant Cell*, **9**, 1279-1287.
- Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C. and Ronald, P.** (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, **270**, 1804-1806.
- Southern, E.M.** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, **98**, 503-517.
- Strittmatter, G., Janssens, J., Opsomer, C. and Botterman, J.** (1995) Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio Technology*, **13**, 1085-1089.

- Takezawa, D.** (1999) Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol. Biol.*, **40**, 921-933.
- Takezawa, D.** (2000) A rapid induction by elicitors of the mRNA encoding CCD-1, a 14 kDa Ca²⁺-binding protein in wheat cultured cells. *Plant Mol. Biol.*, **42**, 807-817.
- Thatcher, J.W., Shaw, J.M. and Dickinson, W.J.** (1998) Marginal Fitness Contributions of Nonessential Genes in Yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 253-257.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.
- Tissier, A.F., Marillonnet, S., Klimyuk, V., Patel, K., Torres, M.A., Murphy, G. and Jones, J.D.G.** (1999) Multiple independent defective Suppressor-mutator transposon insertions in Arabidopsis: A tool for functional genomics. *Plant Cell.*, **11**, 1841-1852.
- Tovar, T.J., Block, A., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1993) Influence of bacterial strain genotype on transient expression of plasmid DNA in plant protoplasts. *Plant J.*, **4**, 587-592.
- Trezzini, G.F., Horrichs, A. and Somssich, I.E.** (1993) Isolation of putative defense-related genes from Arabidopsis thaliana and expression in fungal elicitor-treated cells. *Plant Mol. Biol.*, **21**, 385-389.
- Trieu, A.T., Burleigh, S.H., Kardailsky, I.V., Maldonado-Mendoza, I.E., Versaw, W.K., Blaylock, L.A., Shin, H.S., Chiou, T.J., Katagi, H., Dewbre, G.R., Weigel, D. and Harrison, M.J.** (2000) Transformation of Medicago truncatula via infiltration of seedlings or flowering plants with Agrobacterium. *Plant J.*, **22**, 531-541.
- van de Löcht, U., Meier, I., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1990) A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. *EMBO J.*, **9**, 2945-2950.
- van Larebeke, N., Engler, G., Holsters, M., Van den Elsacker, S., Zaenen, I., Schilperoort, R.A. and Schell, J.** (1974) Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens essential for crown gall-inducing ability. *Nature*, **252**, 169-70.
- 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. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.
- van Wees, S.C.M., de Swart, E.A.M., van Pelt, J.A., van Loon, L.C. and Pieterse, C.M.J.** (2000) Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8711-8716.
- von Arnim, A.G., Deng, X.W. and Stacey, M.G.** (1998) Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic plants. *Gene*, **221**, 35-43.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M. and Lawton, M.** (1996) The PR5K receptor protein kinase from Arabidopsis thaliana is structurally related to a family of plant proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(6), 2598-2602.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F. and Staskawicz, B.J.** (1991) Identification of Pseudomonas-Syringae Pathogens of Arabidopsis and a Bacterial Locus Determining Avirulence On Both Arabidopsis and Soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-60.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S.P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. and Baker, B.** (1994) The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 receptor. *Cell*, **78**, 1101-1115.

- Winkler, R.G., Frank, M.R., Galbraith, D.W., Feyereisen, R. and Feldmann, K.A.** (1998) Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of Arabidopsis: Isolation of mutations in the cytochrome P450 gene superfamily. *Plant Physiol.*, **118**, 743-750.
- Wisman, E., Hartmann, U., Sagasser, M., Baumann, E., Palme, K., Hahlbrock, K., Saedler, H. and Weisshaar, B.** (1998) Knock-out mutants from an En-1 mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate new phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 12432-12437.
- Wojtaszek, P.** (1997) Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. [Review] [144 refs]. *Biochemical Journal*, **322**, 681-92.
- Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z. and Graham, M.W.** (1989) Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3469-3478.
- Wulff, B.B.H., Thomas, C.M., Smoker, M., Grant, M. and Jones, J.D.G.** (2001) Domain swapping and gene shuffling identify sequences required for induction of an Avr-dependent hypersensitive response by the tomato Cf-4 and Cf-9 proteins. *Plant Cell*, **13**, 255-272.
- Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L. and Low, P.S.** (1995) Evidence For a Mechanically Induced Oxidative Burst. *Plant Physiol.*, **109**, 1259-1266.
- Zhang, S.Q. and Klessig, D.F.** (1998) The Tobacco Wounding-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Is Encoded By Sipk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7225-7230.
- Zimmerli, L., Jakab, C., Metraux, J.P. and Mauch-Mani, B.** (1992) Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by beta-aminobutyric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 12920-12925.

7 Anhang

Anhang 1: AtCMPG1-Nukleinsäuresequenz

Dargestellt ist die AtCMPG1-Nukleinsäuresequenz einschließlich Promotorsequenz, 5'-UTR, kodierender Sequenz und 3'-UTR; gesamte Länge: 2962 bp

Die Sequenz wurde aus der Sequenzierung der BAC-Subfragmente (Kap. 3.1) erhalten. Start- und Stopcodon sind in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil markiert (▣→).

```

1 AAATTGAAGC CCAACTCTCC AACAATGAAG CCCATTCCAT TCGATTTCGA
51 ACCTAAAGTT ATTATGTAGA AATGAAGCAA GTTGTGTAAT ATAGTTTGCC
101 TAAGATGCTG GTGGACACAA AGATAGCTGG AAACACAATA TCAAGGATGG
151 TTCACATAAT CACATTATGA GTTGGAGATA GGTGTTGCCG TGTTTCTTAC
201 TAATATTATC TTTTCCTTTT CTAAAGAAG GATATATGTA GTGGGAGAAA
251 TATGGACAGA CTCATAAAAT CTCAAGCGAA TTATCAAAAC AGGTAAGAAC
301 GTTACGTAAT GTCCATATGC GCATGGTAGC GTTTTCATGC ACCGACTCTT
351 GACCACTGAC TTAGTCAATC TCTAGCCGAT TTCACATCAT TCTTCATTTC
401 AATATTATTT TTTATAGCAA AGACAAAAT ACTCTCCAAT TGTAGACTAA
451 AAATACTCTC TAATTTGTAT GGTTCCTCAC TACGATTAAA CCAAATAAAA
501 TTGTAGACCG ATTTGGTTTC GGGGTATAAA GAAAAATCTT ATCAACATAA
551 TTTTCTACAT CTATATTTGT CTAATATTTT TTATGCATAA TCGATCTTAC
601 CAAAACATAC CAAAAGGCA CAAACTCTTT AAAATCACAA ATATTTGATG
651 TTCGCGGTTT GGAATCGGTG TTTCTTACCG GAAGTCAACT TGTTGGATTT
701 TTGCTTATGG CTTTTTGTTG TTTATGTTGT AGTCTGTTAT AGTTTTTGTT
751 ATTTTCTTCT GCTTTCGATT TTTTCTTCT ACTTATATTT TTCTGTAATT
801 TTTTCAAAA GCTTGCAAAA AAATATAAAT ATTTAACATT GATATAAAAA
851 AAAAGTTTTA CAGTTGATTT CTTTTTGTGA AAAAAAACA TCAATCCTCA
901 AGACCAAAAA AGAAGAGCGA AACAAAAAAA ACAACCCAAG AATAGGTTTA
951 AGAACTTTAA TTTTTTCTTA TTTCTGGATT AGTTGTCAAT GTCATTAAAT
1001 TCAAACATTC AACGGTCAAT TTTTACGCTT CTTTAAACAGC TAGCGAATAA
1051 TATGACATAA ACCTTCATTA ATTCAAAAAT CTTTTTTCCC GTGATATGTT
1101 TTTTTTTTCT TTTACCTAAA AATTAACTTT GACCACTCG CGTTCGAGAA
1151 GCGTATGATA ACGACTAATT TAAAATGCAT ACATTTTATT ATCTCTATAT
1201 TCACATCCAT ACATATATAA ATCTCTCATC CCCACTTGTG TTCTCCATTA
1251 GTAATAAACG GTCAAAGAAAT GGGACTTTCA TTGAGAGTGA GACGTCGTGG
1301 AGGAAGTGTT AGCAAGAAAG AGATCATTCC GGTGACAAGT TGCTCGGAGG
1351 AAGTGGAGAT AACCATACCA TCGCAGTTTC AATGTCCGAT ATCTTACGAG
1401 CTAATGAAGG ATCCGGTGAT TATTGCCTCG GGGATCACTT ACGATCGCGA
1451 AAACATCGAG AAGTGGTTTC AGTCCGGGTA CCAAACCTTGT CCCGTTACAA
1501 ACACGGTTTT GACAAGTTTG GAACAGATTC CGAACCATAC GATTCGGAGG
1551 ATGATTCAAG GTTGGTGC GGTCGCTACTA GGCGGCGGGA TTGAACGAAT
1601 CCCGACGCCT CGTGTACCCG TGACCAGTCA TCAAGTCTCC GAGATTTGTG
1651 AGAGGTTATC CGCTGCTACG CGGCGTGGAG ACTACGCCGC GTGCATGGAG
1701 ATGGTTACGA AGATGACGAG ACTAGGAAAA GAGAGCGAGA GGAATCGAAA
1751 ATGCGTTAAG GAAAACGGCG CGGGATTGGT TCTTTGCGTT TGCTTCGACG
1801 CGTTTTCCGA AAACGCAAAT GCGTCATTAT TATTGGAGGA GACTGTGTCT
1851 GTGCTGACGT GGATGCTTCC CATTGGTTTA GAAGGTCAAT CCAAATCAC
1901 CACGACGTCG TCGTTTAATC GTTTAGTGGA ACTGTTGAGA AATGGTGATC
1951 AAAACGCTGC GTTTTTGATA AAAGAGCTTC TTGAGCTTAA CGTAACTCAC
2001 GTTCACGCGT TAACAAAGAT CAATGGCGTC CAAGAAGCGT TCATGAAATC
2051 GATTAATCGC GATTCTACAT GCGTCAACTC GTTAATATCA ATCCACCATA
2101 TGATCTTGAC AAATCAAGAA ACCGTATCAA GGTTCCTTGA ATTGGATCTT
2151 GTGAATATAA CAGTGGAGAT GCTAGTGGAT TCAGAAAACA GCGTTTGCGA
2201 GAAAGCGTTA ACGGTATTAA ACGTGATTTC TGAAACTAAA GAAGGAAGAG
2251 AGAAAGTGAG AAGAAACAAG CTGGTGATAC CGATTTTGGT GAAGAAGATT
2301 TTGAAGATTT CTGAGAAGAA AGATTTGGTT TCTGTGATGT GGAAGGTTTG
2351 TAAAAGTGGT GATGGGTCTG AAGTTGAAGA AGCGTTGAGA TTAGGTGCGT
2401 TTAAGAAGCT TGTTGTCATG TTACAAGTTG GATGTGGTGA AGGAACTAAG

```

```

2451 GAGAAAGTTA CAGAGTTGTT GAAGATGATG AATAAAGTTA TGAAGATGAA
2501 TGGTTTTGTT GATCGTTCTT ATTCTTCTTC AATTGAGTTT AAACATGTTA
2551 AGAAACCATT TTTAAATACATT TTGTATAGAG GAAACACCAC AATTTTTTTC
2601 AAATCATCAA TGTTTTCCAAA AACCGGATTG GACCGACGGT TTGATAAACC
2651 AGACCTTATT CACAAAGCTC TGTTTCTTAT TTCCTCTGTT TTTAAAAACC
2701 TCTCTTTGTA AACAGTGTCT CTTAACCAAC TTGTAAACCA CAAAGCCAAA
2751 CTCATTTATA TTGAGGCAAA CAAATCACAT ATACAATTTG GTTTTGTTTA
2801 CAAAAGAATT GATTATCTAC AAAGTTTGAT CAAAAAATG ACTTTACAAA
2851 AGATAGTTTT CTTCAGGAAA AATCATACCA AGACATCTCT GATCTCCAAA
2901 GAAATCATCT GCAGATTCOA GCAAAACACA TTCTCTGAAC TTGAAAATC
2951 ATACTTTGGG CT

```

Anhang 2: Aminosäuresequenz des Proteins AfCMPG1

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Proteins AfCMPG1, die ausgehend von der genomischen Sequenz aus Anhang 1 translatiert wurde. Die Aminosäuren C, M, P und G der CMPG-Domäne sind weiß auf schwarzem Untergrund dargestellt.

```

1 MGLSLRVRRR GGSVSKKEII PVTSCSEEEV ITIPSPFQCP ISYELMKDEIV
51 IIASGITYDR ENIEKWFESG YQTCPVTNTV LTSLEQIPNH TIRRMIOGWC
101 GSSLGGGIER IPTPRVPVTS HQVSEICERL SAATRRGDYA ACMEMVTKMT
151 RLGKESERNR KCVKENGAGL VLCVCFDAFS ENANASLLE ETVSVLWML
201 PIGLEGQSKL TTTSSFNRLV ELLRNGDQNA AFLIKELLEL NVTHVHALTK
251 INGVQEAQMK SINRDSTCVN SLISIHMMIL TNQETVSRFL ELDLVNITVE
301 MLVDSSENSVC EKALTVLNV I CETKEGREKV RRNKLVIPIL VKKILKISEK
351 KDLVSVMWKV CKSGDGSEVE EALRLGAFKK LVVMLQVCGG EGTKEKVTEL
401 LKMMNKVMKM NGFVDRSYSS SIEFKHVKKP F

```

Anhang 3: AfCMPG2-Nukleinsäuresequenz

Dargestellt ist die AfCMPG1-Nukleinsäuresequenz einschließlich Promotorsequenz, 5'-UTR, kodierender Sequenz und 3'-UTR; gesamte dargestellte Länge: 3500 bp

Die Sequenz ist Teil des in Datenbanken veröffentlichten BAC-Klons AB010076, in revertierter und komplementärer Orientierung (Kap. 3.1). Start- und Stopcodon sind in weißer Schrift auf schwarzem Hintergrund dargestellt. Der Transkriptionsstart ist mit einem Pfeil markiert ().

```

1 ATAAATCTTT TAATAAAAAT ATTATTAATA AAAATAAAAA TTAATTTTAC
51 TGAACATGAT TAGATAGTAG GACTAGATGG TAGGACGTGT TTATAATATT
101 ATAATATATA AATTTTACAA CAATTAATA ACCATTTGAA AGAAAATTTT
151 TAAATTGATT TGAATTAAT ACTTTTAAAA TTAAAGTATA TTAACAACAA
201 AATAACAAAA TAATATATAA TTTTACTGAA CGGAGTTAGT GGTAGGACGG
251 GTTTGGTCGA TAGTATTACG AGACGGTATA CCACAAGTGA AATCTATTAG
301 ATATGTTTAA TTTCACTGTG CAGGATTAGA TAGTATGATG GGTTTGGATC
351 GATAGTAATA CGAAACGATA TAATACGGGT GAAATCCTAG ATATAACAAT
401 TAAAATCTAT ATATACATTA TCTTAAACAC TAAACAAAAC AAACAATATT
451 AACAAAATAA ATATCTACAT ATACATTTTA TATAACTAAT TTTATTAATA
501 AACTAACTCC GCGGTATAAC GCGGGTCAAA ATCTAATGGT ACTTAATTTT
551 AAAAGGTAAT ATTAGCGGAA GGTATAAAC TTGAGAGGGT GAACTTGTA
601 TGAACATAAG TAGACAAATC TAAAATAAGC GTGGAAGAAG AAAACAAGTG
651 TCACGTCATG TGTTGCTAGT TGCCGACATA AAACAAACAG AAGTGGAGGA
701 GCAACAAAAG ATGCAATTGC AGCCCATAGA ATCTGTCCCG TCAATTGAAC
751 AATTTTGTTT ATTTATTCTT CTTTTTTCCT TTTCTACGTA ATATCTTTTC
801 CATTTGTTAT AGATATTATT GATTTGTGCC TACATTTTAT AAAATTTACA
851 GAAGTATACA TCATATGGGT AAATCGTTAA ATATAATTTT AATTAATAAT
901 TAACAGAATA GAAGTCAATC TTTTGCAATA TTTGAAGCTA ATTCGATTAA

```

951 TTGAACAACG CGTTACAAAT TTTGAAAAAC AAGGACGGAA AACTAAGAAA
 1001 TAAGATAATC AGGACATATT ATAAAAATAC TAAATTAAAG GGTTCGTCAAA
 1051 AAATAATAAA AAAGTTCCCA AATTTCCACT TCAAATCTCA AACGTGCAAT
 1101 TTCACACCTC AACCCGAAAC TCGGTGCGTT CTTAAGACGT TTAAGTGGAC
 1151 CCAAAATCTC AAACGGTGGA GCGTGGACCC CACTCTCCTC TTATATCTGC
 1201 ATCCACTTTC CGCAAATCCT CACCGTCCAT TTCCAACACG TTAGACCTTA
 1251 AAAAATCAAA ATCAACGGTT GTGATATACT CTAAGTAAAA TCTCTAATAT
 1301 TAACACGCCG AAAGAAGACT TCTTCTTTGA CCAAACGACC TAAAAATAAA
 1351 TAGATTTTAA TATATCAGAT TTTATTTTAA CGTTTAAATA AGAATATATA
 1401 GTTTTTCAAC TTTGGAGTGT GCTGAAATAT TATTCTAATT TTGTAGTAGA
 1451 GTTATTTTAT AATAGCATAA AGAGAAGAGA AAAAAAAGT TATTTCGATTT
 1501 ATGTTAAAAG AAAAAGTTTT ATTTCGATTTA GTCATTAAAA TAGTATTTAA
 1551 AGATATTTAA ACACAAAAAT TCTCGTCAAA AAAGTGAAAT TTGACGTCAC
 1601 CAAAGTTTGA CTCTTTTTCT CTTTCATCTT TTAAACCAAA CCCACGCAC
 1651 TAAAACATA GACAACTCT CTCTCTTCTC TCTCTCTCCC ACACACACGC
 1701 TTTTATTTAT TTTGGAGCTA ATCGGAAAAC AAAAAAGCAA CGGCCAAAAGC
 1751 AATCAGGAAA GATGATCTCT GCATCACTGT TCCTACCTTC TTCCGATGTC
 1801 CTATATCTCT CGACGTTATG AAATCTCCGG TGAGTCTTTG CACCGGCGTT
 1851 ACCTACGATC GAGCTAGTAT CCAACGGTGG CTTGACGGCG GGAATAACAC
 1901 TTGTCCGGCG ACGATGCAGA TTCTTCAGAA TAAAGATTTT ATACCGAATC
 1951 GGAATCTTCA ACGTCTTATC GAGATTTGGT CTGATTCTGT TCGTCGTCGA
 2001 ACTTGTGTTG AATCGGCGGA ATTAGCTGCT CCGACGAGAG ACGAGATCGC
 2051 CGATGCGATC GATAGAGTGA AGATCGAGAA AGAAGAAAAGA GATGATCGCG
 2101 AGGTTTTGTC GAAGATTGTT CGATTCCGGA GAGAATCTGA TGATAACAGA
 2151 GGATTTCTCG CCGGAAAAGA TGATTTCTGT AAACCTCTCG TGGATCTGAT
 2201 TAATCAGGTG GATTTTCGAA CCACCTCCGC CGCGAAATCT CTGGTTGTTT
 2251 AAGAAGCGTG GAAGATTCTG AGTACGATTG GAAGCAAAGT CTCAGATCGG
 2301 AGACGGTTTT CGAATCTGAT TTTAACCAAC GGTTCGAGATC GGTATTCGGT
 2351 GATCGTCTAC TTGTTTAAAA CCGGGAATGT CGAATTGAAA ATTGATTGCG
 2401 CCGGTTTACT TGAGTTCATC GCCGTGACG CTGAATCAAA GCTGTTAATC
 2451 GCCGAGAGAG ATGGATTAAT CACGGAGCTA ATGAAATCGA TTAGTAAAAGA
 2501 TTCTGATTTA AGTTTAAATCG AATCGAGTTT ATCGTGCTTG ATCGCGATTA
 2551 GCTCACCGAA ACGTGTGAAA CTCAATCTCC TCCGAGAGAA ACTCATCGGA
 2601 GATGTTACGA AACTGTTATC AGATTCAACG TCGTCTGTTA GCGTTTCGGT
 2651 GACGGAGAAA TGCTTGAAGC TTCTGGAGAT TTTAGCATCT ACAAAGGAAG
 2701 GGAGATCGGA AATTTGCGGC GGAGATGGCG AGTGTTTGAA GACGGTGGTT
 2751 AAGAAGCTGA TGAAAGTGTC AACGGCGGCG ACGGAGCACG CCGTGACGGT
 2801 GCTGTGGAGT GTTTCTTATC TATTCAAAGA AGATAAAGCT TTGGAAGCTG
 2851 TTACAAGTGT TAACGGAGTT ACGAAAATTC TGTTACTGTT ACAGAGCAAT
 2901 TGCTCTCCCG CCGTTAGACG TATGTTAACG GATCTTCTTA AGGTCTTCAA
 2951 GGTGAATTCA AGATCTTGCC TTTCCGGCTTA CGACACCAAA ACGACACATA
 3001 TCATGCCGTT TTTAATCAAT TCTTTTACTA CTTACTAGGG TTCGTTTTTA
 3051 GGATTTGTTT CTTGGGAAAG AGGTAAGAAC AATTGTAAAA CTAAAATGAA
 3101 ATTTTGAAT AGTGAATATA AACTAAAAAA GAAGATTCAA TTCATTGCTC
 3151 ATTGAATGTG TAGTCTATTA TTCTCTTATT AATGTAAAGT AAAATCAATT
 3201 AATGATGTTT TTGAATTTCC AATCATATTG TTTTCGTATCA TTGATATGAA
 3251 ATTGCTTTTT TCTAAATACG AATTTTGAAT ATATTCTGTT GGTAAAACAGG
 3301 TCCAGAATTG TCAAAAAGAT GAATACGTCA TATAGTTCCG ATCGACCCAC
 3351 AATTTGTAAC GATGTTACAT GTGATTTTTT AATATGTCTT TAGAAGATTC
 3401 GAATACATCA TAGACGACAT AGACATAAGC CTATATAAGT CATAATCATC
 3451 TTTATCTTTT CCCTCATCTT GTGGTGTAT TTCTGTGTCA AAAGTCCATA

Anhang 4:

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz des Proteins AtCMPG2, die ausgehend von der genomischen Sequenz aus Anhang 2 translatiert wurde. Die Aminosäuren C, M, P und G der CMPG-Domäne sind weiß auf schwarzem Untergrund dargestellt.

```

1  MRKDDLCTIV PTFFRCPISL DVMKSPVSLC TCVTYDRASI QRWLDGGNNT
51  CPATMQILQN KDFIPNRTLQ RLIEIWSDSV RRRTCVESAE LAAPTRDEIA
101 DAIDRVKIEK EERDDREVLS KIVRFGRES DNRGFLAGKD DFKVLLVDLI
151 NQVDFETTS AAKSLVVQEA V KILSTIRSKV SDRRRFSNLI LTNGRDRLSV
201 IVYLFKTGNV ELKIDCAGLL EFLAVDAESK LLIAERDGLI TELMKSISKD
251 SDLSLIESSL SCLIAISSPK RVKLNLLREK LIGDVTKLLS DSTSSLSVSV
301 TEKCLKLLEI LASTKEGRSE ICGGDGECLK TVVKKLMKVS TAATEHAVTV
351 LWSVSYLFKE DKALEAVTSV NGVTKILLLL QSNCSPAVRR MLTDLLKVKF
401 VNSRSCLSAY DTKTTHIMPF

```

Anhang 5: Sequenzvergleich der Proteine PcEli17 und AtCMPG1 bis 6

Erstellt wurde der Sequenzvergleich mit dem Programm Vector NTI 6. Der Bereich der CMPG-Domäne ist unterschlängelt dargestellt. Die Aminosäuren C, M, P und G der CMPG-Domäne sind mit einem Stern (*) markiert. **Weiß auf schwarz:** In allen Sequenzen identische Aminosäuren; **dunkelgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen identische Aminosäuren; **hellgrau unterlegt:** In mehr als 50 % der Sequenzen ähnliche Aminosäuren;

```

1 121 60
PcEli17 (1) -----
AtCMPG1 (1) -----
AtCMPG2 (1) -----
AtCMPG3 (1) -----
AtCMPG4 (1) -----
AtCMPG5 (1) -----
AtCMPG6 (1) MIGDGVMAAGGIVSPASLLDLIADIVEIPLNTGMFKKCADLTRRVCLLTHLLEEIRDSTP

61 120
PcEli17 (1) -----
AtCMPG1 (1) -----
AtCMPG2 (1) -----
AtCMPG3 (1) -----
AtCMPG4 (1) ---MGTYGSSQGGQNGYLTSGSELARVAHGSRDELITGYSLKKSEKEKIFGPNQKKRSLF
AtCMPG5 (1) -----
AtCMPG6 (61) IDSAASSSENWSDLVVGLQAARKLLSTARFQARDSSDGAARKRISFQFCVTTWKLEKA

121 180
PcEli17 (1) -----
AtCMPG1 (1) -----
AtCMPG2 (1) -----
AtCMPG3 (1) -----
AtCMPG4 (57) LICLFALIIISFSPKHTPQPIILFSFFLFHKFVIWVFLNFSQIHLHFCSVPRFQGGREALIMK
AtCMPG5 (1) -----
AtCMPG6 (121) LSNLPYDLYDISDEVGQEVELARSQLRRAMQRYGSLNSNKFSSALSEPNERDGFNSVIKI

181 240
PcEli17 (1) -----MISSWRKIRASRHANKRNLDDLSN-----
AtCMPG1 (1) -----MGLSLRVRRRRGGSVSKKEIIPVTSCS-----
AtCMPG2 (1) -----MRK
AtCMPG3 (1) -----
AtCMPG4 (117) KKDFVFKMPMFQPSKNGGFDGHILDLSAVKDGVLGGDGKFLVVVTDEKKKLDLKEMIS
AtCMPG5 (1) -----MGFLWRTR---S---NEKKITPVLSWPES-----E
AtCMPG6 (181) KAEKLESVSETLHFGEEEKQSSPPLRRSSSISLAYYLSKDADTDRLDKMVKNTDESK

```

```

                241          *      *      *      *      300
PcEli17   (26)  --MEVSIIPNHFRCPISLDLMDKDPVTLSTGITVDYDRHSETWLEAGNKTCPIITKQ-MLSTLE
AtCMPG1   (27)  EEVEITIPSPQFCQPISEYELMKDPVLIASGITVDRENTEKWFESGYOTCPVINT-VLTSLE
AtCMPG2   (4)   DDLCITVPTFRCPISLDVMSDPVSLCTGVTYDRASIQRWLDGGNNTCPATMQ-ILQNKD
AtCMPG3   (1)   --MAFDLPNDFRCPISLEIMSDPVLQSGHTFDRVSIQWLDSDGNRCPITKLPLETPY
AtCMPG4   (177) ELELPEIIPSVFICPISLEPMQDPVTLCTGQTYERSNLLKWFNIGHCTCPTMQ-EWDDL
AtCMPG5   (25)  PESEITIPPEFCQPISELDLMDKDPVLIISGITVDYDRVSETWLNNSGNKTCPIINT-VLITFD
AtCMPG6   (241) KSDKLTIPVDLFCPVSELELMDKDPVIVATGQTYERAYIQRWLDGNNLTCPIKQ-KLENFT

                301          360
PcEli17   (83)  PIPNHTIRKMTQDWCVDNNSYGIERTPTPRIPVSSHQVTEMLSKVVAACRREASACREL
AtCMPG1   (86)  QIPNHTIRRMTOGWCGSSLGGGIERIPTPRVPVTSHQVSEICERLSAATRGRDYAACMEM
AtCMPG2   (63)  FIPNRTLQRLTEIWSDS----VRRRTCVESAELAAPTDEIADAI DRVKIEKBERDDREV
AtCMPG3   (59)  LIPNHALRSLILNFAHVS----LKSSRPRTQQEHSQSQUALISTLVSQSSSNLAKLES
AtCMPG4   (236) VTPNKTILHQLIYTFWSQKYVLMKKRS----E----DVQGRAIEILGLTRKAKGKAKVHA
AtCMPG5   (84)  QIPNHTIRKMTQGWCVKESPLIQRIPTPRVPLMPCEVYETSRKLS SATRRGDYKCGVIT
AtCMPG6   (300) LTPNVLRSLSRWCAEHNIEQPAGYINGRTKNS--GDMSVIRALVQRLSSRSTEDRRNA

                361          420
PcEli17   (143) VGIKRLVKENERNKRCFV--ANGTVGVLASTFEAFSKLSFDKNVAVLEEILSCLSLMTP
AtCMPG1   (146) VTKMTRLGKESERNRKCvk--ENGAGLVLCVCFDAFSEN--ANASLLEETVSVLWMLP
AtCMPG2   (119) LSKIVRFGRESDDNRGFLAGKDDFVKLLVDLINOVDFTTSAAKSLVVQEAVKILSTIRS
AtCMPG3   (115) LTRLVRLTKRDSSIRKVT--ESGAVRAALDCVDSNCVQLQ----E--KSLSLILNLSL
AtCMPG4   (287) LSELKQVVMAHAIKKTIV--DEGGVFVISLSPFTSH-----AVGSEAIAILVNLLEL
AtCMPG5   (144) IEKIKKLGDESEKNRKCVN--ENSVGWVLCDFDKFSGD--EKLTFMLNEILSLLTWMFIP
AtCMPG6   (358) VSEIRLSKRSSTDNRILIA--BAGAPVVLNLLTSEDVAT-----Q-ENAITCVLNLISI

                421          480
PcEli17   (201) LD-----GEAKAFVLSNSSLNMCVWFLKSGDL SARANSVLVVKHVLSTQKKMEEFSMIE
AtCMPG1   (202) IG-----LEGQSKLTTTSSFNRLVELLRNGD---QNAAFILKELLELVNTHVHALTKIN
AtCMPG2   (179) KVSDFRRFNSLILTNGRDRLSVIVYLFKTNVELKIDCAGLEFIADV-DAESKLLIAERD
AtCMPG3   (166) ED-----DNKVGVLVADGVIIRIVTVLRVSGPDCKAIAATLTLAV-VEVNKATIGSYP
AtCMPG4   (339) DS-----DSKAGLMQPARVSLMVDMLNDCSIEETKINCARLIGRLVE-EKGFRAELVSSH
AtCMPG5   (200) IG-----LEGISKLASATSFRVAGLLKSTDDSVRQNAAFIMKEILSDETRVHSPFAVEN
AtCMPG6   (409) YE-----NNKELIMFAGAVTSIVQVLRAGTMEARENAATAIFSLSL--ADENKIIIGGS

                481          540
PcEli17   (256) GSLEALVKVTKPEVSPITTKASLLIVYVMVSTSSSRVDDKIIARFIDMGLIERLLEMLV
AtCMPG1   (253) GVQEA FMKSNR---DSTCVNLSLIIHMLTNO-----ETVSRFLELDLVNITVEMLV
AtCMPG2   (238) GLITELMKSISKSDSLIESSLSCLIATISSPKR----VKLNLLREKLIQDVTKLLSDST
AtCMPG3   (219) DAISALVSLLRVGNDRERKESATAYALCSFPDN-----RKRVDVDCGSPILVEAAD
AtCMPG4   (392) SLLVGLMRLVKDRRRRNGVSPALTLKSVSVHKQVR-----NLLVRIQAVPOLVDVLP
AtCMPG5   (255) GVAEALVKLRDSVSSSSTKSSLIATYQMVLPKQ-----ETASEFLEIGLVSITVEMIV
AtCMPG6   (461) GAIPALVDLLENGTPRGKDAATALFNLCIYHGN-----KGRAVRAGIYVATLVKMLIS

                541          600
PcEli17   (316) D-CDKSIKALGVLDGLCLINEGR-EKAYANALTMPEVLVKKILRVSDLATEFSVSVIWK
AtCMPG1   (304) D-SENSVCEKALTVLNVICETKEGR-EKVRNKLVIPIILVKKILKISEKK--DLVSVMWK
AtCMPG2   (294) SLSVSVTEKCKLEILASKEGRSEICGGDGECLKTVVKKLMKVSTAAATEHAVTVLWS
AtCMPG3   (271) S-----GLERAVEVLLGLVKCRGGR-EEMSKVSGFVEVLVNLVLRNGLKGIQYSLFLINC
AtCMPG4   (445) C-LDVECLESAFLVLDLSELEGR-IALKDSVNTIPIHTVRLMKVSEKCTNYAISILWS
AtCMPG5   (309) D-AENSVCEKALAVDAICEIEHGR-EVVRKNALVMPLLVKKIAKVSELAIRSSMSMLK
AtCMPG6   (513) DSTRHRMVDEALTIISVLIANNQDAK--SAIVKANTLEALIGILQTDQTRNRENAATLILS

                601          660
PcEli17   (374) LSKNDKSEGGVIVEALRVGAFQKLLLLQFCNEKIKDKATELLKLLNLHRDK-----L
AtCMPG1   (360) VCK---SGDGEVEEALRLGAFKLLVVMLOVGCGETKEKVTPELLKMMNKVMKMGFVDR
AtCMPG2   (354) VSY--LFKEDKALEAVTSVNGVTIKLLLLQSNCSPAVRRMLTDLKVKVNSRS-----
AtCMPG3   (325) LCCC---SGEIVDEVKREGVVEICFGFEDNESEKIRR NATILVHTLLGIPMS-----
AtCMPG4   (503) VCK---LASECCSLAVEVGLAAKLLLVISGCDPALKQRSABELLKLCSLHYSDSMFISK
AtCMPG5   (367) LWK---TGNTVAVEDAVRLGAFQKVLVLOVGYGETKEKATELLKMMNTQMKL---MSD
AtCMPG6   (571) LCKR---DTEKLITIGRLGAVVPLMDLSKNCTERGKR-KAISLLELLRKACQ-----

                661          720
PcEli17   (429) ECIDSMDFKNLKR-----
AtCMPG1   (417) SYSSSIEFKHVKKPF-----
AtCMPG2   (406) CLSAYDTKTTHIMPF-----
AtCMPG3   (375) -----
AtCMPG4   (560) YMAWLARSIANSLKLEDEEEDDDKHLNQPPSESVSDSQSPRGVKEDI SELTKTLRTQFWG
AtCMPG5   (421) CVDSLKEFKYIKKPF-----
AtCMPG6   (619) -----

                721          780
PcEli17   (443) -----
AtCMPG1   (432) -----
AtCMPG2   (421) -----
AtCMPG3   (375) -----
AtCMPG4   (620) VASFLSQPSSPDLQERNQTPDHPEEDEDLIAGIKNDFAEIGGRFRGTGISKLSGNLPVSE
AtCMPG5   (436) -----
AtCMPG6   (619) -----

                781          840
PcEli17   (443) -----
AtCMPG1   (432) -----
AtCMPG2   (421) -----
AtCMPG3   (375) -----
AtCMPG4   (680) FTKIASNFLQLSSEVDPKDYDVIGVTEELVAFVKDLAMHPETWLDPLPDDDDSFVVKF
AtCMPG5   (436) -----
AtCMPG6   (619) -----

```

		841		900
PcEli17	(443)	-----	-----	
AtCMPG1	(432)	-----	-----	
AtCMPG2	(421)	-----	-----	
AtCMPG3	(375)	-----	-----	
AtCMPG4	(740)	KFDFVFSLYAFMIGVLGVSVILNCLFLNQFSDFELADAQYEHALAVERLAPSLASLRIEL		
AtCMPG5	(436)	-----	-----	
AtCMPG6	(619)	-----	-----	
		901		960
PcEli17	(443)	-----	-----	
AtCMPG1	(432)	-----	-----	
AtCMPG2	(421)	-----	-----	
AtCMPG3	(375)	-----	-----	
AtCMPG4	(800)	CPEYMTENCFWRIYFVLVHPKLSKDHALLLSTPQVLEARSMLSQELQKRSLPVEAGSSE		
AtCMPG5	(436)	-----	-----	
AtCMPG6	(619)	-----	-----	
		961		1020
PcEli17	(443)	-----	-----	
AtCMPG1	(432)	-----	-----	
AtCMPG2	(421)	-----	-----	
AtCMPG3	(375)	-----	-----	
AtCMPG4	(860)	ANTVIVEPLTVPPSPETAAVKIVNPVSSDVETDKHPIESKEIQIVDKSVIEERSTSTAS		
AtCMPG5	(436)	-----	-----	
AtCMPG6	(619)	-----	-----	
		1021		1080
PcEli17	(443)	-----	-----	
AtCMPG1	(432)	-----	-----	
AtCMPG2	(421)	-----	-----	
AtCMPG3	(375)	-----	-----	
AtCMPG4	(920)	SSRFINVQVDEDDDDADDWLNDEETSSVSAIGGRSTTNHPFGEDEEDVSFSDLEEEDDN		
AtCMPG5	(436)	-----	-----	
AtCMPG6	(619)	-----	-----	
		1081		1127
PcEli17	(443)	-----	-----	
AtCMPG1	(432)	-----	-----	
AtCMPG2	(421)	-----	-----	
AtCMPG3	(375)	-----	-----	
AtCMPG4	(980)	EGDVKVSYKNLTNSGSDSSDKKSPDWVQLKEVKEKKKSNWLDVDAV		
AtCMPG5	(436)	-----	-----	
AtCMPG6	(619)	-----	-----	

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von März 1998 bis Februar 2001 am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Biochemie unter der wissenschaftlichen Anleitung von Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Klaus Hahlbrock danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für die sehr guten Arbeitsbedingungen. Seine Persönlichkeit und der sehr interessierte und persönliche Umgang mit seinen Mitarbeitern schafft den Boden für eine sehr freie und anregende Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. Martin Hülskamp möchte ich für die Übernahme des Koreferates und sein Interesse an dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christoph Kirsch für die optimale Betreuung dieser Arbeit. Durch lebhaftes Diskussionen, wertvolle Anregungen und ein ständig offenes Ohr für Probleme hat er mir während der ganzen Zeit bei kleinen und großen Schwierigkeiten zur Seite gestanden.

Herrn Dr. Pawel Bednarek danke ich für die Durchführung der HPLC-Analysen.

Im besonderen möchte ich Elke Logemann für viele sehr gute Tips und Ratschläge und eine besonders gute Zusammenarbeit danken sowie für einige Vorexperimente vor Beginn meiner Arbeit, die wertvolle Hinweise für dieses Projekt darstellten.

Auch Björn Hamberger gilt mein Dank für gute Zusammenarbeit, viele Diskussionen und ein besonders freundschaftliches Laborklima.

Außerdem möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für eine außerordentlich freundliche Arbeitsatmosphäre und für die ständige Hilfsbereitschaft danken.

Ein ganz lieber Dank meiner Frau Kathrin, die mich die ganze Zeit über unterstützte, lange Arbeitsperioden recht klaglos tolerierte und mich –zumeist erfolgreich- motivierte, wenn mal wieder so einiges schief gelaufen ist. Und für so vieles andere mehr....

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Fall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde.

Die Bestimmungen der gültigen Promotionsordnung sind mir bekannt.

Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Klaus. Hahlbrock betreut worden.

Kurzzusammenfassung

AtCMPG1 und *AtCMPG2* sind die ersten charakterisierten Mitglieder aus *Arabidopsis thaliana* einer kürzlich identifizierten Genfamilie. Diese Familie wurde, entsprechend den ersten vier strikt konservierten Aminosäuren Cystein, Methionin, Prolin und Glycin, CMPG-Genfamilie benannt. Die CMPG-Genfamilie ist hauptsächlich in Pflanzen vertreten. Nur einige wenige das CMPG-Motiv enthaltende Sequenzen wurden in anderen Reichen gefunden.

Es konnte gezeigt werden, dass *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-mRNA in einer mit Elizitor behandelten *Arabidopsis*-Zellsuspensionskultur sowie in mit *Pseudomonas syringae* pv *tomato* infizierten *Arabidopsis*-Blättern sehr schnell und transient akkumulierten.

Die Analyse von stabil transformierten Promotor::GUS-Fusionslinien zeigte eine starke Wundinduzierbarkeit beider Gene. Darüber hinaus wurde für beide Gene eine Expression in den Abscissionszonen der Schoten sowie für *AtCMPG2* eine Expression an der Schotenspitze beobachtet. Diese Expressionsmuster deuten darauf hin, dass *AtCMPG1* und *AtCMPG2* eine wichtige Funktion bei der allgemeinen Pathogenabwehr sowie bei der Ausbildung von Schutzbarrieren vor einer potenziellen Besiedlung mit pathogenen Organismen übernehmen.

Ein 39 bp langes Promotorelement des *AtCMPG1*-Promotors vermittelt in Fusion mit dem 35S-Minimalpromotor des Blumenkohlmosaikvirus sowohl eine starke Elizitorinduzierbarkeit in transfizierten Petersilie-Protoplasten als auch eine deutliche, obgleich schwächere Elizitorinduzierbarkeit in transfizierten *Arabidopsis*-Protoplasten. Dieses Promotorelement enthält neben einer in pathogen-responsiven Promotoren sehr häufig enthaltenen W-Box sowie zwei W-Kernsequenzen einen weiteren 19 bp umfassenden Sequenzbereich, der für eine volle Elizitorresponsivität dieses Elementes notwendig ist, jedoch keine bisher charakterisierten *cis*-regulatorischen Elemente enthält.

Eine für *AtCMPG1* isolierte Nullmutante sowie transgene *AtCMPG1*- und *AtCMPG2*-Überexpressionslinien zeigten unter verschiedenen getesteten Wachstumsbedingungen keinen offensichtlichen morphologischen Phänotyp. Die schnelle mRNA-Akkumulation, erste Hinweise zu einer Beteiligung an Protein-Protein-Interaktionen sowie Sequenzähnlichkeiten zu anderen funktionell charakterisierten Proteinen lassen eine Funktion von *AtCMPG1* und *AtCMPG2* als transkriptionelle Regulatoren vermuten.

Abstract

Two *Arabidopsis* genes, *AtCMPG1* and *AtCMPG2*, are the first characterized members of a newly identified gene family. This family, which was named the CMPG gene family according to the first four strictly conserved amino acids (cysteine, methionine, proline and glycine) is most abundant in plants with only a few members occurring in other kingdoms.

It was shown that *AtCMPG1* and *AtCMPG2* mRNA accumulates very rapidly and transiently in elicitor-treated cell cultures as well as in *Pseudomonas syringae* pv *tomato* infected *Arabidopsis* leaves. Using stably transformed promoter::GUS lines, a strong wound induction of these genes was observed.

A 39-bp fragment of the *AtCMPG1* promoter in combination with the 35S minimal promoter of the cauliflower mosaic virus was demonstrated to be sufficient to mediate strong elicitor responsiveness in cultured parsley as well as *Arabidopsis* cells.

For the *AtCMPG1* gene a knock-out line was isolated. When comparing this as well as over-expressing *AtCMPG1* and *AtCMPG2* lines to wildtype plants, no obvious morphological phenotype could be observed. The fast mRNA-accumulation, first hints to protein-protein-interactions and some sequence similarities to other characterized proteins suggests a possible function for *AtCMPG1* and *AtCMPG2* as transcriptional regulators.

Lebenslauf

9. März 1969 geboren in Oldenburg als Sohn von Heinz und Sabine Schulz, geb. Kusnierski
- 1975-1976 Besuch der Grundschule Osterscheps
- 1976-1979 Besuch der Grundschule Staakenweg in Oldenburg
- 1979-1981 Besuch der Orientierungsschule im Schulzentrum Marschweg
- 1981-1988 Besuch des Alten Gymnasiums Oldenburg
17. Mai 1988 Erlangen der Allgemeinen Hochschulreife
- 1989-1990 Zivildienst auf Langeoog beim Staatlichen Amt für Insel- und Küstenschutz, Norden
- 1991 Immatrikulation an der Philipps-Universität Marburg
5. Oktober 1993 Diplomvorprüfung (Botanik, Zoologie, Chemie, Physik)
- 1993 Immatrikulation an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
- 1996 Diplomprüfung (Botanik, Mikrobiologie, Biochemie, Phytopathologie)
- 1997 Diplomarbeit mit dem Titel: *Analyse Wildrüben-spezifischer cDNAs aus einer Beta procumbens-Translocation* am Lehrstuhl für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bei Prof. Dr. C. Jung
- März 1998 Beginn der Promotion am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln, Abt. Biochemie bei Prof. Dr. K. Hahlbrock