

Wissenschaftliche Hausarbeit  
zur Ersten Staatsprüfung für das Lehramt an  
**Gymnasien**

im Fach: Biologie

Thema: **Untersuchungen zur Rolle von CML37 in der  
Herbivorenabwehr von *Arabidopsis thaliana***

vorgelegt von: Monika Heyer

geboren am 23.04.1988 in Pirna

Erfurt, den 8.6.2011

Gutachter: Prof. Ralf Oelmüller  
PD Dr. Thomas Pfannschmidt

erstellt im: Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie  
in der Abteilung Bioorganische Chemie  
unter der Betreuung von PD Dr. Axel Mithöfer

Für den wunderbarsten Menschen, den ich kennenlernen durfte – mein Omili.

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis .....	v
Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	ix
Formelverzeichnis .....	x
1 Einleitung.....	1
1.1. Abwehr herbivorer Insekten .....	1
1.1.1. Mechanismen der Herbivorenabwehr .....	1
1.1.2. Wahrnehmung des Insektenfraßes und Signaltransduktion.....	3
1.1.2.1. Das Erkennen des Herbivors über spezifische Verwundungsmuster und HAMPs.....	3
1.1.2.2. Signaltransduktion der Herbivorenabwehr .....	5
1.2. Calcium und Calciumsensoren in der Herbivorenabwehr .....	7
1.3. Das Modellsystem <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Spodoptera littoralis</i> .....	9
1.4. Zielsetzung der Arbeit .....	10
2 Material und Methoden.....	11
2.1. Materialien .....	11
2.1.1. Pflanzen.....	11
2.1.2. Tiere.....	11
2.1.3. Mikroorganismen .....	11
2.1.4. Vektoren .....	12
2.1.5. Oligonukleotide .....	12
2.1.5.1. Oligonukleotide für die reverse Transkription.....	12
2.1.5.2. Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR .....	12
2.1.5.3. Oligonukleotide für die quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	13
2.1.5.4. Oligonukleotide zur Herstellung eines PCR-Produktes mit <i>attB</i> -Enden .	13
2.1.5.5. Oligonukleotide für die Kolonie-PCR und Sequenzierungen.....	14
2.1.5.6. Oligonukleotide zur Überprüfung der <i>Arabidopsis</i> -Transformanten .....	14
2.1.6. Enzyme und Inhibitoren .....	14

2.1.7. Primäre und sekundäre Antikörper .....	15
2.1.8. Größenstandards .....	15
2.1.8.1. Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese .....	15
2.1.8.1. Größenstandard für SDS-PAGE .....	16
2.1.9. Kits.....	16
2.1.10. Chemikalien .....	16
2.1.10.1. Phytohormone.....	17
2.1.10.2. Interne Standards .....	17
2.1.11. Geräte.....	17
2.2. Methoden .....	20
2.2.1. Pflanzenanzucht .....	20
2.2.1.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	20
2.2.1.2. Anzucht von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	20
2.2.2. Larvenanzucht .....	21
2.2.3. RT-PCR zur Überprüfung der <i>CML37</i> -Knockout-Pflanzen.....	21
2.2.3.1. Probengewinnung .....	21
2.2.3.2. RNA-Isolation.....	21
2.2.3.3. DNA-Verdau.....	22
2.2.3.4. Reverse Transkription.....	22
2.2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.2.3.6. Agarose-Gelelektrophorese .....	23
2.2.4. Untersuchung des Fraßverhaltens von <i>Spodoptera littoralis</i> .....	24
2.2.5. Phytohormonanalyse .....	24
2.2.5.1. Sammeln des Regurgitats von <i>Spodoptera littoralis</i> .....	24
2.2.5.2. Behandlung der Pflanzen.....	25
2.2.5.3. Extraktion der Phytohormone.....	25
2.2.5.4. Phytohormonmessungen .....	26
2.2.5.5. Kalkulation des Phytohormongehalts.....	27
2.2.6. Glukosinolatanalyse .....	28
2.2.6.1. Probengewinnung .....	28
2.2.6.2. Extraktion der Glukosinolate .....	28
2.2.6.3. Messungen der Glukosinolate.....	29
2.2.6.4. Auswertung der Messungen .....	30

2.2.7. Untersuchung der Genregulation von <i>CML37</i> durch Phytohormone.....	30
2.2.7.1. Probengewinnung und -vorbereitung.....	30
2.2.7.2. Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	31
2.2.7.3. Messung der Primereffizienz.....	32
2.2.7.4. Quantifizierung der qRT-PCR .....	33
2.2.8. Lokalisationsstudie.....	34
2.2.8.1. Erstellung eines <i>CML37-GFP</i> -Konstruktes .....	34
2.2.8.1.1. PCR zum Anhängen der <i>attB</i> -Enden .....	36
2.2.8.1.2. Extraktion des <i>CML37-attB</i> -Fragments aus einem Agarosegel .....	37
2.2.8.1.3. BP-Reaktion.....	37
2.2.8.1.4. Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	37
2.2.8.1.5. Transformation des <i>Entry</i> -Vektors .....	38
2.2.8.1.6. Selektion positiver Klone.....	38
2.2.8.1.7. Plasmidisolierung.....	39
2.2.8.1.8. DNA-Sequenzierung .....	39
2.2.8.1.9. LR-Reaktion.....	39
2.2.8.1.10. Selektion positiver Klone.....	40
2.2.8.2. Transformation der Expressionsvektoren in <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	40
2.2.8.3. Transiente Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	42
2.2.8.4. Produktion stabiler Transformanten in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	42
2.2.8.4.1. <i>Floral-Dip</i> -Methode .....	42
2.2.8.4.2. Selektion positiver Transformanten der F1-Generation .....	42
2.2.8.4.3. DNA-Isolation und PCR .....	43
2.2.8.4.4. Western-Blot .....	44
2.2.8.4.5. Fluoreszenzmikroskopie .....	46
3 Ergebnisse .....	47
3.1. Überprüfung der <i>CML37</i> -Knockout-Pflanzen .....	47
3.2. Untersuchungen zum Fraßverhalten von <i>Spodoptera littoralis</i> .....	48
3.3. Einfluss von <i>CML37</i> auf die Produktion abwehrspezifischer Phytohormone...52	
3.4. Einfluss von <i>CML37</i> auf den Glukosinolathaushalt .....	57
3.5. Regulation der Expression von <i>CML37</i> durch Phytohormone.....	59
3.6. Die Lokalisation von <i>CML37</i> .....	62

4 Diskussion .....	66
4.1. CML37 als Calciumsensor der Herbivorenabwehr .....	66
4.2. CML37 reguliert die Produktion von OPDA .....	68
4.3. CML37 reguliert nicht die Glukosinolatproduktion .....	69
4.4. Coronalon, JA beeinflussen nicht die Expression von <i>CML37</i> .....	70
4.5. CML37 ist in der Zellmembran und im Zellkern lokalisiert .....	73
5 Fazit .....	74
6 Literaturverzeichnis .....	75
7 Anhang .....	82
8 Danksagung .....	86
9 Erklärung .....	88

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	<i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
<i>att</i>	<i>attachment</i>
BASTA	Glufosinat-Ammonium
CAM	Calmodulin
CML	<i>calmodulin like</i>
COI	<i>coronatine insensitive</i>
CPK	Calcium-abhängige Proteinkinase
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAC	<i>fatty acid-amino acid conjugate</i>
FAD-OXR	<i>FAD-linked oxireductase</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GST	Glutathione-S-Transferase
HAMP	<i>herbivore-associated molecular pattern</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ISTD	interner Standard
JA	<i>jasmonic acid</i>
JA-Ile	<i>jasmonoyl-isoleucin</i>
JAR	<i>jasmonate resistant</i>
LC	<i>liquid chromatography</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MeJA	<i>methyljasmonate</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MRM	<i>multiple reaction monitoring</i>
MS	Massenspektrometrie
OD	optische Dichte
OPDA	<i>12-oxophytodienoic acid</i>
OPR	OPDA-Reduktase



p.a.	<i>pro analysi</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pDEST	Destinationsvektor
pDONR	Donorvektor
PDVF	Polyvinylidenfluorid
pENTR	<i>Entry</i> -Vektor
pEXP	Expressionsvektor
PI	Protease-Inhibitoren
Poly-A	Poly-Adenin
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -PCR
rf	<i>response factor</i>
RPS	ribosomales Protein S
RT	reverse Transkriptase
SA	<i>salicylic acid</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>tris buffered saline tween 20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Triple-Quad	Triple-Quadrupole
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
ÜN	über Nacht
VOC	<i>volatile organic compounds</i>
VSP	<i>vegetative storage protein</i>
WT	Wildtyp

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die BP-Reaktion (nach dem Gateway <sup>®</sup> Technology Manual (Version E, 13.05.2010)).....	35
Abbildung 2 :	Die LR-Reaktion (nach dem Gateway <sup>®</sup> Technology Manual (Version E, 13.05.2010)).....	36
Abbildung 3 :	Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR.....	48
Abbildung 4:	Fraßexperimente mit Larven nach 2 Tagen bei 25°C (frühes erstes Larvalstadium).....	49
Abbildung 5:	Fraßexperimente mit Larven nach 3 Tagen bei 25°C (spätes erstes Larvalstadium).....	50
Abbildung 6:	Einfluss von <i>CML37</i> auf das Fraßverhalten von <i>S. littoralis</i> .....	51
Abbildung 7a:	JA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.....	53
Abbildung 7b:	Gehalt von JA-Ile nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.....	54
Abbildung 7c:	cis-OPDA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.....	55
Abbildung 7d:	SA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.....	56
Abbildung 8:	Glukosinolatgehalt in <i>A. thaliana</i> nach Insektenfraß.....	58
Abbildung 9:	Regulation der Genexpression von <i>CML37</i> durch verschiedene Phytohormone und Coronalon.....	60
Abbildung 10:	Expression der Markergene in den mit Phytohormonen und Coronalon behandelten Pflanzen.....	61
Abbildung 11:	Expression des VSP2 nach Applikation von cis-OPDA.....	62
Abbildung 12:	<i>Nicotiana benthamiana</i> nach Infiltration des C-terminalen <i>CML37-GFP</i> -Konstrukt.....	64
Abbildung 13:	Analyse der genomischen DNA der transgenen <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	64
Abbildung 14:	Ponceau S Färbung einer PDVF-Membran des Western-Blots.....	65
Abbildung 15:	Strukturformeln von abwehrspezifischen Phytohormonen und Coronalon.....	71
Abbildung 16:	Karte des Vektors pUNI51.....	82
Abbildung 17:	Karten der Vektoren pDONR <sup>TM</sup> 201 und pDONR <sup>TM</sup> 207.....	83
Abbildung 18:	Karte des Vektors pB7FWG2.....	84

Abbildung 19: Karte des Vektors pB7WGF2.....85

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Gradient zur Auftrennung der Phytohormonextrakte mittels HPLC.....	26
Tabelle 2:	Masse-Ladungsverhältnisse der MRM.....	27
Tabelle 3:	Gradient zur Auftrennung der Glukosinolate mittels HPLC.....	29
Tabelle 4:	Übersicht über die verwendeten Phytohormone und ihren entsprechenden Lösungsmittelkontrollen.....	31

## Formelverzeichnis

Formel 1:	Berechnung des Phytohormongehalts.....	27
Formel 2:	Berechnung des cis-OPDA-Gehalts.....	28
Formel 3:	Berechnung des Glukosinolatgehalts.....	30
Formel 4:	Berechnung der relativen Expression nach Pfaffl, 2001.....	34

# 1 Einleitung

## 1.1. Abwehr herbivorer Insekten

Pflanzen sind sessile Lebewesen. Werden sie mit biotischen bzw. abiotischen Stressfaktoren konfrontiert, haben sie nicht die Möglichkeit auszuweichen, sondern müssen reagieren. In Reaktion auf diverse Stimuli entwickelten sie deshalb im Verlauf der Evolution unterschiedliche Verteidigungsstrategien.

Einer der wichtigsten biotischen Stressfaktoren für Pflanzen ist der Fraß durch herbivore Insekten. Mehr als die Hälfte aller Insektenarten ernährt sich herbivor (Schoonhoven *et al.*, 1998, Van Poecke, 2007). Die Variabilität der Angriffe ist jedoch groß. So variiert der Schaden der Pflanze in Abhängigkeit von der jeweiligen Fraßstrategie des Insekts. Während einige Insekten (z.B. herbivore Insekten der Ordnungen *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Caelifera*, *Ensifera*) durch das Fressen der Blätter der Pflanze großen Schaden hinterlassen, ist der Grad der Verwundung durch Insekten mit stechend-saugenden Mundwerkzeugen (z.B. Sternorrhyncha) eher gering (Howe und Jander, 2008, Schoonhoven *et al.*, 1998, Van Poecke, 2007). Des Weiteren haben Insekten in Abhängigkeit des Grads ihrer Spezialisierung die Fähigkeit sich an verschiedene Abwehrstrategien von Pflanzen anzupassen. So ist bekannt, dass Spezialisten, welche nur auf einer oder wenigen Wirtspflanzen leben, einige Abwehrmechanismen umgehen können, wohingegen Generalisten, welche keine spezielle Wirtspflanze präferieren, nicht dazu fähig sind (siehe z.B. Kliebenstein *et al.*, 2002, Ratzka *et al.*, 2002, Stotz *et al.*, 2001). Um überleben zu können, müssen Pflanzen fähig sein, sich gegen all diese unterschiedlichen Angriffe angemessen zu verteidigen. Sie besitzen deshalb verschiedene Abwehrmechanismen.

### 1.1.1. Mechanismen der Herbivorenabwehr

Man unterteilt die verschiedenen Abwehrmechanismen grundlegend in direkte und indirekte Verteidigungsmechanismen. Zu den direkten Abwehrmechanismen zählen unter anderem mechanische Barrieren. Diese können in verschiedenen Formen

auftreten wie z.B. als Dornen, Stacheln und Trichome (Sitte *et al.*, 2002). In der Herbivorenabwehr von *Arabidopsis thaliana* spielen vor allem Trichome eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Trichome das Fraßverhalten von Insekten negativ beeinflussen (Reymond *et al.*, 2004).

Neben rein mechanischen Barrieren besitzen Pflanzen jedoch auch chemische Abwehrmechanismen. So produzieren Pflanzen diverse Sekundärmetabolite, welche auf Herbivoren toxisch wirken. Ein bekanntes Beispiel dafür ist das von Tabakpflanzen produzierte Alkaloid Nikotin. Es bindet an die Acetylcholinrezeptoren von Nervenzellen und ist somit höchst toxisch für die meisten Herbivoren (Schmeltz, 1971, Steppuhn *et al.*, 2004). Ein weiteres Beispiel dafür sind die Glukosinolate in *Brassicaceen*. Diese sind zwar nicht *per se* toxisch, jedoch können sie bei Insektenfraß in verschiedene Toxine wie z.B. Isothiocyanate, Thiocyanate und Nitrile aufgespalten werden (Fenwick *et al.*, 1983, Rask *et al.*, 2000).

Des Weiteren produzieren Pflanzen zur direkten Abwehr verschiedene Proteine, welche eine Auswirkung auf die Verdauung des Insekts haben. Ein Beispiel dafür sind die Protease-Inhibitoren (PI). Sie binden die Proteasen im Darm des Insekts, sodass Eiweiße nicht mehr gespalten werden können. Dadurch kommt es zu einer verminderten Resorption von Aminosäuren, wodurch die Entwicklung des Insekts negativ beeinflusst wird (Ryan, 1990, Zavala *et al.*, 2004).

Eine weitere Form der direkten Abwehr stellen außerdem epikutikuläre Wachsstrukturen auf der Blattoberfläche dar. Sie können sowohl als eine Form der mechanischen als auch der chemischen Abwehr angesehen werden, da sowohl ihr chemischer als auch ihr struktureller Aufbau das Fraßverhalten von Herbivoren beeinflussen können (Eigenbrode und Espelie, 1995).

Neben der direkten Abwehr von herbivoren Insekten entwickelten Pflanzen jedoch auch indirekte Verteidigungsstrategien. Dabei machen sie sich z.B. die Feinde ihrer Herbivoren zu Nutze. Sie entlassen flüchtige organische Substanzen (VOC) wie z.B. Terpene oder *green leaf volatiles* (GLV) und locken somit Prädatoren oder Parasitoide der Herbivoren an, welche den Befall der Pflanze dann reduzieren (Takabayashi und Dicke, 1996, Kessler und Baldwin, 2001).

Jedoch übernehmen VOCs auch noch eine andere Funktion. Sie werden außerdem als zwischenpflanzliches Signal genutzt. So entlassen Pflanzen, welche von Herbivoren befallen sind, VOCs, um weitere Pflanzen vor einem Angriff zu warnen. Benachbarte Pflanzen können sich somit auf den Angriff vorbereiten (Arimura *et al.*,

2000, Engelberth *et al.*, 2004, Karban *et al.*, 2000). Dieser Vorgang wird als *priming* bezeichnet.

Abgesehen von der Unterscheidung in direkte und indirekte Abwehrmechanismen unterteilt man diese auch in konstitutiv und induzierbar. Unter der konstitutiven Abwehr versteht man die grundlegende Abwehr einer Pflanze. Sie existiert auch ohne den Angriff eines Herbivoren. Bei der induzierten Abwehr handelt es sich hingegen um eine spezifische Reaktion auf den Angriff eines herbivoren Insekts. Allerdings ist diese Unterscheidung schwierig, da viele der konstitutiven Abwehrmechanismen wie z.B. die Produktion von Glukosinolaten zusätzlich auch induzierbar sind (Birch *et al.*, 1990, Koritsas *et al.*, 1989, Lammerink *et al.*, 1984). Es ist daher nicht immer eindeutig in rein induzierbare bzw. rein konstitutive Abwehrmechanismen zu unterscheiden.

### **1.1.2. Wahrnehmung des Insektenfraßes und Signaltransduktion**

Grundlage der induzierten Reaktionen ist die Wahrnehmung des herbivoren Insekts und die Umsetzung dieser Reizperzeption in die spezifische Abwehr.

#### **1.1.2.1. Das Erkennen des Herbivors über spezifische Verwundungsmuster und HAMPs**

Zwei Komponenten des Insektenfraßes spielen bei der Wahrnehmung des Insekts eine wichtige Rolle: Zum einen verwunden die Insekten durch ihr Fressen die Pflanzen und zum anderen produzieren sie Regurgitat, welches sie während des Fressens abgeben. Es wird vermutet, dass Pflanzen den Angriff des Herbivoren sowohl über spezifische Verwundungsmuster als auch über bestimmte Elicitoren des Regurgitats wahrnehmen können.

So zeigten Mithöfer *et al.*, 2005, durch Experimente mit dem MecWorm, einer Maschine, die die mechanische Verwundung durch ein Insekt simuliert, dass das spezifische Verwundungsmuster eines Insekts allein ähnliche Effekte auslöst wie der Insektenfraß selbst. Es wird angenommen, dass die Pflanzen sowohl Art als auch Geschwindigkeit und Frequenz der Verwundung wahrnehmen können (Maffei *et al.*,



2007b, Wu und Baldwin, 2010) und somit die Verwundung eines Insekts von reiner mechanischer Verwundung unterscheiden können.

Des Weiteren sind einige Substanzen aus dem Regurgitat verschiedener Insektenarten bekannt, welche Abwehrmechanismen in Pflanzen induzieren können. Angelehnt an Begriffe aus der Pathogenabwehr bezeichneten Mithöfer und Boland, 2008, diese Elicitoren als *herbivore-associated molecular patterns* (HAMPs). Es wird davon ausgegangen, dass die Pflanzen Rezeptoren besitzen, mit welchen sie die HAMPs detektieren können. Bisher ist jedoch kein Rezeptor für HAMPs identifiziert worden. In *Zea mays* konnte allerdings gezeigt werden, dass das HAMP Volicitin an ein Membranprotein mit Rezeptor-ähnlichen Eigenschaften bindet (Truitt *et al.*, 2004), was die Rezeptor-These stärkt.

In den letzten Jahren wurde eine Vielfalt von HAMPs identifiziert. Das wohl prominenteste Beispiel für die HAMPs ist das Volicitin (Mithöfer und Boland, 2008). Dieses Fettsäure-Aminosäure-Konjugat (FAC) wurde aus dem Regurgitat von *Spodoptera exigua* Larven isoliert und ist dafür bekannt, dass es z.B. die spezifische Abwehr über VOCs in *Zea mays* induzieren kann (Alborn *et al.*, 1997). Jedoch sind auch FACs aus anderen *Lepidoptera* Larven bekannt, welche Verteidigungsmechanismen der Pflanzen induzieren können (Howe und Jander, 2008, Wu und Baldwin, 2010). Für die hier verwendete Modellpflanze *A. thaliana* konnte jedoch keine Induzierbarkeit von Abwehrmechanismen durch FACs nachgewiesen werden (Schmelz *et al.*, 2009, Van Poecke, 2007).

Neben den FACs sind jedoch auch noch andere Elicitoren identifiziert worden. So zum Beispiel die Inceptine aus dem Regurgitat von *Spodoptera frugiperda*, oder das Caeliferin aus *Schistocera americana* (Howe und Jander, 2008, Mithöfer und Boland, 2008, Wu und Baldwin, 2010). Doch auch Inceptine sind in *A. thaliana* bedeutungslos (Schmelz *et al.*, 2009). Die Rolle des Caeliferin hingegen ist umstritten. So zeigten Schmelz *et al.*, 2009, dass es die Abwehr in *A. thaliana* induzieren kann, wohingegen Schäfer *et al.*, 2011, diese Ergebnisse nicht bestätigen konnten.

Andere bekannte Elicitoren sind außerdem die Glucose-Oxidase und die  $\beta$ -Glucosidase (Mithöfer und Boland, 2008). Deren Bedeutung für die Modellpflanze *A. thaliana* ist jedoch bisher unklar (Van Poecke, 2007).

### 1.1.2.2. Signaltransduktion der Herbivorenabwehr

Ausgehend von der Wahrnehmung verschiedener Verwundungsmuster und HAMPs, wird in der Pflanze eine Signalkaskade ausgelöst, welche in der Etablierung der spezifischen Abwehrreaktion gegen den Herbivoren endet. Bisher sind jedoch nur Teile der gesamten Signaltransduktion bekannt.

So wird in der frühen Reaktion auf den Insektenfraß zunächst das Membranpotential der Zellen geändert. Rund um die Fraßregion erfolgt eine Depolarisation der Zellmembran, welche sich über das gesamte Blatt ausbreitet (Maffei *et al.*, 2004). Darauf folgend ist ein Anstieg des cytosolischen Calciumgehalts zu messen (Maffei *et al.*, 2004, Schäfer *et al.*, 2011, Vadassery, nicht publiziert). Die Calciumsignale lösen wiederum die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wie z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus (Maffei *et al.*, 2006), von welchen bereits aus der Pathogenabwehr bekannt ist, dass sie als *second messenger* dienen können und direkt in die Abwehr von Phytopathogenen eingebunden sind (Maffei *et al.*, 2007a). Es wird vermutet, dass sie auch in der Herbivorenabwehr eine zentrale Rolle übernehmen.

Ein wichtiger Teil der Signaltransduktionskaskade scheinen außerdem MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinase*, MAPK) zu sein. So konnten in *Nicotiana attenuata* zwei MAP-Kinasen identifiziert werden, welche eine große Rolle in der Regulation der Reaktion auf Herbivoren spielen: die durch Salicylsäure induzierbare MAPK (SIPK) und die durch Verwundung induzierbare MAPK (WIPK). Beide werden durch Herbivorie induziert und regulieren sowohl den Gehalt an abwehrspezifischen Phytohormonen als auch die Expression abwehrspezifischer Gene (Wu *et al.*, 2007). Auch in *A. thaliana* sind MAPK für die Abwehr herbivorer Insekten von Bedeutung. So zeigten Schäfer *et al.*, 2011, dass die MPK3 und die MPK6 durch das Regurgitat von *Schistocerca gregaria* induziert werden. Dennoch ist bisher nicht geklärt, inwiefern die Signaltransduktion über MAPK mit den frühen Ereignissen des Signalwegs verknüpft werden kann (Wu und Baldwin, 2010).

Des Weiteren sind Phytohormone ein bedeutender Teil der Signalkaskade. Ihre Funktion und Einbindung in den Signalweg ist wohl am meisten untersucht.

Das wichtigste Phytohormon im Zusammenhang mit Herbivorie ist die Jasmonsäure (JA). Sie wird aus Linolensäure synthetisiert. Diese wird im Chloroplasten durch die Lipoxygenase, die Allenoxidsynthase und die Allenoxidcyclase in 12-Oxophytodiensäure (OPDA) umgewandelt (Bell *et al.*, 1995, Laudert *et al.*, 1996,

Stenzel *et al.*, 2003, Vick und Zimmerman, 1984). Das OPDA wird dann im Peroxisom durch die OPDA-Reduktase reduziert (Stintzi und Browse, 2000, Strassner *et al.*, 2002). Anschließend entsteht durch eine dreifache  $\beta$ -Oxidation JA (Li *et al.*, 2005, Vick und Zimmerman, 1984).

Jasmonsäure spielt eine zentrale Rolle in der Regulation der Herbivorenabwehr. So ist in Folge von mechanischer Verwundung und Insektenfraß innerhalb kürzester Zeit ein Anstieg des JA-Gehalts zu messen (Howe und Jander, 2008, Maffei *et al.*, 2007a). Des Weiteren ist bekannt, dass JA die Expression von Genen reguliert, die durch Herbivorie oder mechanische Verwundung induziert werden (De Vos *et al.*, 2005, Reymond *et al.*, 2000, Reymond *et al.*, 2004). Außerdem ist die Abwehr von Pflanzen, welche kein JA produzieren bzw. wahrnehmen können, reduziert (Halitschke und Baldwin, 2003, Howe *et al.*, 1996, Kessler *et al.*, 2004, McConn *et al.*, 1997, Paschold *et al.*, 2007, Stotz *et al.*, 2002).

Die eigentlich aktive Form der Jasmonsäure ist jedoch ihr Isoleucinkonjugat (Jasmonoyl-Isoleucin, JA-Ile). Es wird durch das Enzym JAR1 gebildet (Staswick und Tiryaki, 2004). Erst durch die Umwandlung zu JA-Ile kann das JA wirken. Das JA-Ile aktiviert die Transkription von JA-regulierten Genen. Durch die Bindung von JA-Ile an ein F-Box-Protein, das COI1, ein Teil des E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes, werden Transkriptionsrepressoren, die JAZ-Proteine (Jasmonat-ZIM-Domäne) abgebaut. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren wie z.B. das MYC2 freigegeben und infolge dessen können die JA-regulierten Gene transkribiert werden (Howe und Jander, 2008, Wu und Baldwin, 2010).

Ein weiteres wichtiges Jasmonat in der Signaltransduktion der Herbivorenabwehr ist Methyljasmonat (MeJA). Es wird durch die Carboxymethyltransferase aus JA gebildet (Seo *et al.*, 2001). Da es einfach durch Zellmembranen diffundieren und über das Leitgewebe der Pflanzen transportiert werden kann, wird vermutet, dass es als systemisches Signal fungiert (Seo *et al.*, 2001, Thorpe *et al.*, 2007). Auf Grund seines volatilen Charakters wird es außerdem als zwischenpflanzliches Signalmolekül diskutiert (Seo *et al.*, 2001).

Des Weiteren wirkt auch OPDA unabhängig von Jasmonaten als Phytohormon in der Reaktion auf Herbivorie. So steigt auch der OPDA-Gehalt nach Verwundung und Herbivorie an (Reymond *et al.*, 2000, Reymond *et al.*, 2004, Schäfer *et al.*, 2011). Außerdem konnte gezeigt werden, dass OPDA auch unabhängig von JA die Regulation verschiedener Gene übernimmt (Stintzi *et al.*, 2001, Taki *et al.*, 2005).

Des Weiteren hat OPDA einen direkten Einfluss auf die Entwicklung von herbivoren Insekten (Dabrowska *et al.*, 2009). OPDA fungiert demnach nicht nur als Vorläufer der Jasmonate.

Neben den Jasmonaten und dem OPDA spielen jedoch auch andere Phytohormone eine wichtige Rolle in der Regulation der Herbivorenabwehr wie z.B. die Salicylsäure (SA). Salicylsäure kann über zwei Synthesewege entstehen. Ausgangsstoff beider Synthesen ist jedoch Chorismat. Dieses kann zum einen über Phenylalanin und die Enzyme Chorismatmutase und Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) oder aber über Isochorismat und das Enzym Isochorismat-Synthase (ICS) in Salicylsäure umgewandelt werden (Wildermuth *et al.*, 2001). Obwohl Salicylsäure hauptsächlich als Phytohormon in der Pathogenabwehr bekannt ist, ist es jedoch auch für die Herbivorenabwehr von Bedeutung. So reduziert SA in vielen Fällen von JA induzierte Abwehrmechanismen und ist somit ein negativer Regulator der Herbivorenabwehr (Bostock, 2005, Cui *et al.*, 2002).

Weder über SA noch über Jasmonate und OPDA ist jedoch bekannt, wie genau sie mit anderen Signaltransduktionsprozessen zusammenhängen. Zwar konnten Wu *et al.*, 2007, eine Verbindung zu den MAPK aufweisen, jedoch bleibt weiterhin ungeklärt, wie diese mit den frühen Ereignissen der Signaltransduktion zusammenhängen.

## **1.2. Calcium und Calciumsensoren in der Herbivorenabwehr**

Calcium ist ein wichtiger Botenstoff in pflanzlichen Organismen. In der Reaktion auf viele verschiedene abiotische und biotische Stimuli übernimmt Calcium eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion. So sind Änderungen des cytosolischen Calciumgehalts unter anderem in Reaktion auf Trocken- (Knight *et al.*, 1997), Salz- (Knight *et al.*, 1997), Hitze- bzw. Kältestress (Knight *et al.*, 1991, Plieth *et al.*, 1999), Berührung (Knight *et al.*, 1991), Symbionten (Ehrhardt *et al.*, 1996, Müller *et al.*, 2000, Sieberer *et al.*, 2009, Vadassery und Oelmüller, 2009), Pathogene (Blume *et al.*, 2000, Knight *et al.*, 1991, Lecourieux *et al.*, 2002, Mithöfer *et al.*, 1999) und Herbivoren (Maffei *et al.*, 2004, Vadassery, nicht publiziert) zu messen. Jeder der verschiedenen Stimuli codiert ein spezifisches Calciumsignal, welches durch seine Dauer, Amplitude, Frequenz und Lokalisation charakterisiert ist (Sanders *et al.*, 2002).

Damit die Pflanzenzellen angemessen auf diese Stimuli reagieren können, müssen sie fähig sein die spezifische Signatur der Calciumsignale zu entschlüsseln. Dazu dienen verschiedene Calciumsensoren. Sie binden das Calcium und geben das Signal weiter. Hinsichtlich der Transduktion des Signals lassen sich zwei Typen von Calciumsensoren unterscheiden. Der erste Typ besitzt selbst keine enzymatische Aktivität. Er bindet lediglich das Calcium, was eine Konformationsänderung des Sensors hervorruft, sodass dieser an andere Proteine in der Signalkaskade binden kann. Der zweite Typ hingegen besitzt selbst eine enzymatische Aktivität, welche durch die Bindung von Calcium aktiviert wird, sodass er das Signal direkt selbst weitergeben kann (Sanders *et al.*, 2002).

In *A. thaliana* konnten ca. 250 Proteine mit mindestens einer Calcium-Bindedomäne (EF-Hand) identifiziert werden (Day *et al.*, 2002). Darunter befinden sich sowohl Calciumsensoren des ersten Typs wie z.B. die Calmoduline (CAM), die Calmodulin-ähnlichen Proteine (CML), Calcineurin B-ähnliche Proteine (CBL) als auch Calciumsensoren des zweiten Typs wie z.B. Calcium-abhängige Proteinkinasen (CPK).

In einer Microarray-Studie testete Vadassery inwiefern diese durch Herbivorie induzierbar sind. Lediglich die CMLs und die CPKs wurden durch Herbivorie reguliert (Vadassery, nicht publiziert). Die hier vorliegende Arbeit untersucht die Rolle der CMLs in der Herbivorenabwehr.

In *Arabidopsis* sind 50 CMLs bekannt (McCormack und Braam, 2003). Sie können aus bis zu 6 EF-Hands aufgebaut sein. Neben der Bindung von Calcium besitzen sie jedoch keine weitere enzymatische Funktion (McCormack und Braam, 2003). Sie gehören somit zum ersten Typ von Calciumsensoren.

Calmodulin-ähnliche Proteine übernehmen diverse Funktionen. So scheinen einige von ihnen von großer Bedeutung in der Entwicklung von *A. thaliana* zu sein (Vanderbeld und Snedden, 2007). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass einige von ihnen durch diverse biotische und abiotische Stimuli induziert werden (McCormack *et al.*, 2005, Taki *et al.*, 2005, Vanderbeld und Snedden, 2007). Die Rolle von CMLs in der Herbivorenabwehr ist bisher allerdings wenig untersucht.

### 1.3. Das Modellsystem *Arabidopsis thaliana* – *Spodoptera littoralis*

In der hier vorliegenden Arbeit werden die Mechanismen der Abwehr der Modellpflanze *A. thaliana* gegen das herbivore Insekt *S. littoralis* untersucht.

*A. thaliana* wurde bereits in vielen Kontexten als Modellorganismus verwendet. Auch für Untersuchungen zur Herbivorenabwehr ist sie geeignet. Durch ihre geringe Größe, ihre kurze Generationsdauer und die Vermehrung durch Selbstbestäubung lässt sie sich einfach in Gewächshäusern kultivieren und untersuchen. Des Weiteren ist das gesamte Genom von *A. thaliana* sequenziert und frei zugänglich. Viele Mutanten sind bereits beschrieben und verfügbar. Allerdings lässt sich *A. thaliana* auch leicht genetisch manipulieren, sodass Mutanten relativ einfach hergestellt werden können. *A. thaliana* ist somit ideal für die Untersuchung der genetischen Grundlagen der Abwehr. Durch die Vielzahl an Mutanten eignet sie sich außerdem hervorragend für Funktionsanalysen einzelner Gene. Des Weiteren sind in *A. thaliana* bereits spezifische Abwehrmechanismen bekannt, welche in Verbindung mit genetischen Veränderungen untersucht werden können.

Viele verschiedene Herbivoren befallen *Arabidopsis* Pflanzen. Darunter befinden sich sowohl Insekten, welche das Phloem (z.B. *Myzus persicae*) oder direkt den Zellinhalt ansaugen (z.B. *Frankliniella occidentalis*) als auch Insekten, welche sich vom Blattgewebe ernähren (z.B. *Pieris rapae* und *S. littoralis*) (De Vos *et al.*, 2005, Reymond *et al.*, 2004). Für die Untersuchungen der hier vorliegenden Arbeit wurde *S. littoralis* als Herbivor ausgewählt, welcher bereits in vielen Studien zur Herbivorie als Modellorganismus verwendet wurde (siehe z.B. De Vos *et al.*, 2005, Kanchiswamy *et al.*, 2010, Maffei *et al.*, 2004, Reymond *et al.*, 2004, Schlaeppli *et al.*, 2008).

*S. littoralis*, auch ägyptischer Baumwollwurm genannt, ist ein Insekt aus der *Lepidoptera*-Familie der *Noctuidae*. Während seiner Entwicklung durchläuft er sechs larvale Stadien. *S. littoralis* ist vor allem in Afrika, im südwestlichen Asien und im südlichen Europa ein weit verbreiteter Schädling, jedoch kommt er auch in Großbritannien vor. *S. littoralis* ist ein generalistisches Insekt und befällt somit viele verschiedene Pflanzenarten (Carter, 1984). Bekannt geworden ist er jedoch vor allem durch den großen wirtschaftlichen Schaden, den er auf Baumwollplantagen verursacht.

#### 1.4. Zielsetzung der Arbeit

Die frühen Ereignisse der Signaltransduktion in Reaktion auf den Angriff eines herbivoren Insekts sind bisher wenig untersucht. Man weiß allerdings, dass Calcium als *second messenger* eine Schlüsselrolle übernimmt. Bisher ist jedoch unbekannt, wie die Calciumsignale in der Pflanzenzelle wahrgenommen und in die spezifische Abwehrreaktion umgesetzt werden. Eine der Hauptaufgaben zur Aufklärung der frühen Signaltransduktionsprozesse ist deshalb die Identifikation der Calciumsensoren, welche die spezifischen Calciumsingale decodieren und die Information weiterleiten können.

Zwei Klassen von Calciumsensoren werden durch Herbivorie induziert: CPKs und CMLs (Vadassery, nicht publiziert). Vor allem die CMLs sind hierbei interessant, da sie keine weitere Funktion, außer der Bindung von Calcium besitzen und nur in Pflanzen vorkommen (DeFalco *et al.*, 2010, McCormack und Braam, 2003).

Insbesondere das CML37 scheint im Zusammenhang der Herbivorie eine wichtige Rolle zu spielen. Es wird sowohl durch Verwundung als auch durch das Regurgitat verschiedener Insektenarten induziert (McCormack *et al.*, 2005, Taki *et al.*, 2005, Vadassery, nicht publiziert). Jedoch ist bislang nichts über die Funktion des CML37 in der Abwehr herbivorer Insekten bekannt. Ziel dieser Arbeit war daher durch Untersuchungen zur Funktion des CML37 dessen mögliche Rolle in der Herbivorenabwehr von *A. thaliana* aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Pflanzen

Art	Herkunft
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) HEYNH. Ökotyp: Columbia	Gewächshaus MPI ICE Jena
<i>Arabidopsis thaliana</i> CML37-Knockout (SALK_011488.53.95x)	Wayne Snedden, Queens University, Kingston, Canada
<i>Nicotiana benthamiana</i> DOMIN	Gewächshaus MPI ICE Jena

#### 2.1.2. Tiere

Art	Herkunft
<i>Spodoptera littoralis</i> BIOSDUVAL	Syngenta Crop Protection Münchwilen AG, Stein, Schweiz

#### 2.1.3. Mikroorganismen

Stamm	Vertreiber / Referenz
<i>Escherichia coli</i> One Shot <sup>®</sup> TOP10 chemisch kompetente Zellen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Holsters <i>et al.</i> , 1980
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58C1	Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974



#### 2.1.4. Vektoren

Die Karten der Vektoren sind im Anhang (Kapitel 7) aufgeführt.

<b>Vektor</b>	<b>Vertreiber / Referenz</b>
pUni51	TAIR, Stanford, USA
pDONR™207	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pB7FWG2	Karimi <i>et al.</i> , 2002
pB7WGF2	Karimi <i>et al.</i> , 2002

#### 2.1.5. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die reverse Transkription stammen von Invitrogen GmbH, Karlsruhe. Alle anderen Oligonukleotide wurden mit Hilfe des NCBI Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entworfen und bei Eurofins MWG Operon GmbH in Ebersberg synthetisiert.

Alle Oligonukleotide, ausgenommen die der reversen Transkription, wurden mit 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 5 pmol/μl verdünnt.

##### 2.1.5.1. Oligonukleotide für die reverse Transkription

Es wurde der Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer von Invitrogen GmbH in Karlsruhe verwendet. Er wurde mit 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 10 μM verdünnt.

##### 2.1.5.2. Oligonukleotide für die Reverse-Transkriptase-PCR

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>T<sub>m</sub> [°C]</b>
Actin-LP	5´- GTTGGGATGAACCAGAAGGA - 3´	57,3

Name	Sequenz	Tm [°C]
Actin-RP	5´- GAACCACCGATCCAGACACT - 3´	59,4
CML37-F	5´- ATGACTCTCGCTAAGAACCAAA - 3´	56,5
CML37-R	5´- ACGCATCATCAAAACAAACTCG - 3´	56,5

#### 2.1.5.3. Oligonukleotide für die quantitative *Real-Time-PCR*

Name	Sequenz	Tm [°C]
RPS18RT-F	5´- GTCTCCAATGCCCTTGACAT - 3´	57,3
RPS18RT-R	5´- TCTTTCCTCTGCGACCAGTT - 3´	57,3
CML37RT-F	5´- GGTGGAGGAAGTGGTGAAGA - 3´	59,4
CML37RT-R	5´- GTAAACTCGCCGCCGTAATA - 3´	57,3
VSP2RT-F	5´- ACGACTCCAAAACCGTGTGCAA - 3´	60,3
VSP2RT-R	5´- CGGGTTCGGTCTTCTCTGTTCCGT - 3´	66,0
FAD-OXR-RT-Fwd	5´- GCGCAACACTCGGCGAAGTC - 3´	63,5
FAD-OXR-RT-Rev	5´- TCAAACGTGCGTCCACAACGTT - 3´	60,3

#### 2.1.5.4. Oligonukleotide zur Herstellung eines PCR-Produktes mit *attB*-Enden

Die *attB*-Sequenzen sind rot gekennzeichnet. Grün gekennzeichnete Nukleotide dienen der Einhaltung des Leserahmens. Die schwarz gekennzeichneten Nukleotide entsprechen der Anfangs- bzw. Endsequenz des *CML37* Gens.

Name	Sequenz	Tm [°C]
CML37F-attB1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT CATGACTCTCGCTAAGAACCAAA - 3'	57,0
CML37R-N-attB2	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT TCAACGCATCATCAAAACAAAC - 3'	57,0
CML37R-C-attB2	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT ACGCATCATCAAAACAAACTCG - 3'	57,0

#### 2.1.5.5. Oligonukleotide für die Kolonie-PCR und Sequenzierungen

Zum Überprüfen des *Entry*-Vektors und der Expressionsklone mittels PCR wurden CML37-F und CML37-R (siehe 2.1.5.2.) verwendet. CML37-F wurde außerdem für die Sequenzierung positiver Klone benutzt.

#### 2.1.5.6. Oligonukleotide zur Überprüfung der *Arabidopsis*-Transformanten

Name	Sequenz	Tm [°C]
35S-F	5'- TGCCCAGCTATCTGTCACTT - 3'	57,3

Des Weiteren wurde CML37-R (siehe 2.1.5.2.) benutzt.

#### 2.1.6. Enzyme und Inhibitoren

Name	Vertreiber
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
JumpStart™ <i>Taq</i> DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

<b>Name</b>	<b>Vertreiber</b>
Sulfatase Typ H-1 aus <i>Helix pomatia</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

### **2.1.7. Primäre und sekundäre Antikörper**

<b>Name</b>	<b>Vertreiber</b>
GFP (18A11) mouse monoclonal Antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
GFP Antibody (NB600-308) rabbit polyclonal	Novus Biologicals, Littleton USA
Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody	Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
Mouse Anti-rabbit IgG-HRP Antibody	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg

### **2.1.8. Größenstandards**

#### **2.1.8.1. Größenstandards für Agarose-Gelelektrophorese**

<b>Name</b>	<b>Vertreiber</b>
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, ready-to- use	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
100 bp DNA Ladder	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

### 2.1.8.1. Größenstandard für SDS-PAGE

Name	Vertreiber
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

### 2.1.9. Kits

Name	Vertreiber
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
TURBO DNA-free™ Kit	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Invisorb® Fragment CleanUp	STRATEC Molecular GmbH, Berlin
GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Gateway® BP Clonase® II enzyme mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gateway® LR Clonase® II enzyme mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 2.1.10. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien wurden in mindestens p.a. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth GmbH in Karlsruhe, SERVA Electrophoresis GmbH in Heidelberg, Biomol GmbH in Hamburg, Sigma-Aldrich in Taufkirchen, Merck KGaA in Darmstadt, MP Biomedicals in Illkirch (Frankreich) und Invitrogen GmbH in Karlsruhe.

### 2.1.10.1. Phytohormone

Jasmonsäure wurde durch Verseifung von Jasmonsäuremethylestern mit Kaliumhydroxid hergestellt. Coronalon wurde nach der Methode von Schüler *et al.*, 2001 synthetisiert. Die Herstellung von cis-OPDA erfolgte nach Zerbe *et al.*, 2007. Alle Phytohormone wurden von der Abteilung für Bioorganische Chemie des Max-Planck-Institutes für chemische Ökologie bereitgestellt.

### 2.1.10.2. Interne Standards

Die internen Standards für die Phytohormonanalyse stammten aus der Abteilung für Molekulare Ökologie des Max-Planck-Institutes für chemische Ökologie und der interne Standard für die Glukosinolatanalyse aus der Abteilung für Biochemie.

### 2.1.11. Geräte

	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Elektroporator	Elektroporator 2510	Eppendorf AG, Hamburg
Fluoreszenz- mikroskopie:	Axiovert 200	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
	Axiocam MRc5	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Gefriertrockner:	ALPHA 1-4 LD plus	Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz
Geldokumentation:	BioDoc Analyze Geldokumentationssystem	Biometra, Göttingen
Gelelektrophorese für Agarosegele:	Agagel Standard	Biometra, Göttingen

	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
	Elektrophoresis power supply EPS 301	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Gelelektrophorese für Polyacrylamidgele:	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
	Elektrophoresis power supply EPS 200	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Inkubatoren:	Heraeus® Function Line Trockenschrank T12	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
	CERTOMAT® BS-1	Sartorius AG, Göttingen
Konzentrator:	Eppendorf concentrator 5301	Eppendorf AG, Hamburg
HPLC:	HPLC-1100 series und HPLC-1200 series	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
PCR-Maschinen:	Thermocycler Primus 25	MWG-Biotech AG, Ebersberg
	Mastercycler® pro	Eppendorf AG, Hamburg
	MX3000P QPCR System	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
pH-Messgerät:	inoLab ph Level 2	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Reinstwasseranlage:	MilliQ Synthesis	Millipore GmbH, Schwalbach am Taunus
Schüttler:	Votex-Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

	<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
	KS 130 basic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen
	SO-10m paint shaker	Fluid management, Sassenheim, Niederlande
Spektrophotometer:	NanoVue	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
	BioPhotometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilisatoren:	Autoklav Systec VX-120	Systec GmbH, Wettengel
	Heraeus® Wärme- und Trockenschrank T 6120	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Thermoblöcke:	Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
	ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg
Triple-Quad-LC-MS- MS:	API 3200™ LC/MS/MS System	Applied Biosystems/Ambion, Darmstadt
	HPLC-1200 series	Agilent Technologies GmbH, Böblingen
Waagen:	BP 211 D	Sartorius AG, Göttingen
	BP 2100 S	Sartorius AG, Göttingen
	XS205 DualRange	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Western-Blot- Apparatur:	TE 77 semi-dry transfer unit	Hoefler Inc., Holliston, USA



## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Pflanzenanzucht**

#### **2.2.1.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana***

Pflanzen, welche für Fraßexperimente, Phytohormonanalysen, Glukosinolatanalysen bzw. Phytohormonbehandlungen genutzt wurden, wurden unter Kurztagsbedingungen kultiviert (21°C, 45-70% Luftfeuchtigkeit, 10 h Licht). Diese Pflanzen wurden einzeln, direkt im Topf (Ø 10 cm) auf dem Substrat ausgesät. Auch Pflanzen, welche transformiert werden sollten, wurden bis zum Rosettenstadium unter Kurztagsbedingungen kultiviert. Zu transformierende Pflanzen wurden zu viert in einem 10x10 cm Topf ausgesät. Um eine gleichmäßige Keimung der Samen zu garantieren, wurden sie zunächst bei 4°C gehalten. Danach wurden sie in einer Phytokammer kultiviert.

Die transformierten Pflanzen in der F1-Generation wurden unter Langtagsbedingungen (21°C tagsüber, 19°C nachts, 45-70% Luftfeuchtigkeit, 16 h Licht) angezogen. Einige hundert Samen wurden direkt auf dem Substrat in einer 40x60 cm Pflanzschale ausgesät. Um eine gleichmäßige Keimung zu erreichen, wurden sie für 2 Tage bei 4°C kultiviert. Anschließend wurden die Pflanzen in einer Phytokammer kultiviert.

Zu transformierende Pflanzen wurden in ihrem späten Rosettenstadium auch in der Langtagskammer kultiviert, sodass sich möglichst viele Blüten entwickeln konnten.

#### **2.2.1.2. Anzucht von *Nicotiana benthamiana***

Die Samen wurden einzeln auf Anzuchterde in einer 104er Multitopfpalette ausgesät und bei 18-20°C tagsüber, 16-18°C nachts, 55% Luftfeuchtigkeit und einer Lichtperiode von 14 h kultiviert. Nach 20 Tagen wurden sie in einen runden 1 l Topf umgesetzt, wöchentlich gedüngt und unter gleichen Bedingungen weiter kultiviert.

### **2.2.2. Larvenanzucht**

Die Aufzucht der *S. littoralis* Larven erfolgte auf einer künstlichen Diät (500 g Bohnenmehl, 1,2 l H<sub>2</sub>O, 9 g Ascorbinsäure, 9 g 4-Ethylbenzoesäure, 9 g Vitamin-E-Öl-Gemisch (5 g Vitamin E und 70 ml Mazola Öl), 4 ml Formaldehyd, 1 g  $\beta$ -Sitosterol, 1 g Leucin und 10 g Ain-76 Vitamin Mixture gemischt mit 200 ml einer 7,5%igen Agarlösung). Zunächst wurden die Larven eine Woche lang in einem Weinkühler bei ca. 16-18°C gehalten. Danach wuchsen sie bei ca. 25°C mit einer Lichtperiode von 14 h.

### **2.2.3. RT-PCR zur Überprüfung der CML37-Knockout-Pflanzen**

#### **2.2.3.1. Probengewinnung**

*S. littoralis* Larven im 3. Larvalstadium wurden vereinzelt und über Nacht ohne Nahrung gehalten. Jeweils 3 hungrige Larven wurden am nächsten Tag auf eine ca. 6 Wochen alte Pflanze gesetzt. Es wurden 2 Wildtyp-Pflanzen als Positivkontrolle und 5 *CML37*-Knockout-Mutanten verwendet. Die Pflanzen wurden mit gelochten Plastikbeuteln abgedeckt und für 24 h unter Kurztagsbedingungen gehalten. Für die Isolierung der RNA wurde jeweils ein großes, angefressenes Blatt pro Pflanze in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.2.3.2. RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation erfolgte mit Hilfe von TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Es wurde das Protokoll des Herstellers mit einigen Abänderungen verwendet.

Das Blattmaterial wurde in sterilen Mörsern mit flüssigem Stickstoff fein zermahlen, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit jeweils 1 ml TRIzol<sup>®</sup> überführt und mit Hilfe des Vortexers gemischt. Zur Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen wurden die Proben bei Raumtemperatur für 20 min inkubiert. Um die verschiedenen Phasen voneinander zu trennen, wurden die Proben mit 300  $\mu$ l Chloroform versetzt und ausführlich gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Proben für 15 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Zur Präzipitation der RNA wurde der Überstand mit 600  $\mu$ l Isopropanol vermischt und bei -80°C für 30 min inkubiert.

Anschließend wurden die Proben 30 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Das so entstandene RNA-Pellet wurde mit 800 µl 80%igem Ethanol gewaschen und wieder bei 4°C und 16000 g für 10 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde abgenommen und das Pellet unter der Sterilbank getrocknet. Das trockene Pellet wurde dann in 90 µl 60°C warmen 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst.

#### **2.2.3.3. DNA-Verdau**

Um eventuelle DNA-Verunreinigung aus der isolierten RNA zu entfernen, wurde ein DNA-Verdau durchgeführt. Dazu wurde der TURBO DNA-free™ Kit nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bei 260 nm mit dem NanoVue bestimmt.

#### **2.2.3.4. Reverse Transkription**

Da die isolierte mRNA auf Grund ihrer Instabilität nicht als Matrize für die PCR eingesetzt werden kann, muss sie mittels reverser Transkription in DNA umgewandelt werden. Die reverse Transkription ist ein Prozess, welcher aus Retroviren bekannt ist. Diese Viren besitzen nur RNA als genetisches Material. Um dennoch ihre genetische Information ins Wirtsgenom integrieren zu können, schreiben sie diese mit Hilfe eines Enzyms, der reversen Transkriptase, in komplementäre DNA (cDNA) um. Der Ausgangspunkt des Enzyms für die Synthese der cDNA ist in der hier verwendeten Methode ein Primer, welcher nur aus Desoxythymidinen besteht und somit an den Poly-A-Schwanz des 3'-Endes der mRNA binden kann. Von ihm ausgehend schreibt die reverse Transkriptase die mRNA in cDNA um.

Die cDNA-Synthese erfolgte mittels des Omniscript RT Kits, welchem nur noch der RiboLock™ RNase Inhibitor und der Oligo(dT)<sub>20</sub> Primer hinzugefügt wurde. Das Kit wurde nach den Angaben des Herstellers benutzt. Als Ausgangsprodukt für die Synthese der cDNA diente 1 µg mRNA. Die cDNA wurde anschließend mit 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O 1:3 verdünnt.

### 2.2.3.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Sie erfolgt in 3 Phasen: erstens der Denaturierung der DNA, zweitens der Anlagerung (*Annealing*) der Primer und drittens der Amplifikation der DNA durch die Polymerase. Diese 3 Phasen werden in mehreren Durchläufen wiederholt. Um nicht bei jedem Zyklus eine neue Polymerase hinzufügen zu müssen, verwendet man thermostabile Polymerasen. Für diese PCR wurde die *Taq* Polymerase (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet, welche ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt.

Der Ansatz für diese PCR enthält 1x *Taq*-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0.08% (v/v) Nonidet P40 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 750 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,125 U/μl *Taq* Polymerase. Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

initiale Denaturierung:	94°C	3 min	} 35x
Denaturierung:	94°C	40 sec	
<i>Annealing</i> :	57°C	50 sec	
Amplifikation:	72°C	50 sec	
finale Amplifikation:	72°C	10 min	

### 2.2.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

Die Auswertung der PCR erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode werden Nukleinsäuren innerhalb eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgt über eine Agarosegelmatrix. Diese besteht aus Agarosepolymeren, welche miteinander vernetzt sind. Die Nukleinsäuren sind auf Grund ihrer Phosphatreste negativ geladen und wandern durch die Gelmatrix zur Anode. Dabei wandern kleinere Nukleinsäuren schneller durch das Agarosepolymernetz als größere, sodass die Nukleinsäuren ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Die Visualisierung dieses Effekts erfolgte mittels Ethidiumbromid. Dieses lagert sich in den Nukleinsäuren ein und kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Auftrennung dieser PCR-Produkte erfolgte über ein 1,5%iges Agarosegel. Dazu wurde 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 40 mM Essigsäure, 1 mM EDTA) zu einem Gel aufgekocht. Dem Gel wurden 4 µl 1%ige Ethidiumbromidlösung hinzugefügt. Um später die Proben in das Gel einzufüllen, wurden mittels eines Kamms Geltaschen erzeugt. Auf das feste Gel wurden 5 µl Größenstandard und je 5 µl Probe, welche zuvor mit 1 µl Ladepuffer (6x DNA Loading Dye, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) versetzt wurde, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 135 V mit TAE-Puffer als Laufpuffer. Zur Geldokumentation wurde ein Transilluminator mit entsprechender Software genutzt.

#### **2.2.4. Untersuchung des Fraßverhaltens von *Spodoptera littoralis***

Pro Experiment wurden jeweils 10 Wildtyp-Pflanzen und 10 *CML37*-Knockout-Mutanten im Alter von 5-7 Wochen benutzt. Je 3 *S. littoralis* Larven, welche seit 2 bzw. 3 Tagen im Licht gehalten wurden, wurden auf eine Pflanze gesetzt. Diese wurde mit einem gelochten Plastikbeutel abgedeckt und für eine Woche unter Kurztagsbedingungen kultiviert. Danach wurde das Gewicht der einzelnen Larven mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt.

Die statistische Auswertung erfolgte in SPSS mittels des Mann-Whitney-U-Test.

#### **2.2.5. Phytohormonanalyse**

##### **2.2.5.1. Sammeln des Regurgitats von *Spodoptera littoralis***

Je 2 Pflanzen entweder des Wildtyps oder der *CML37*-Knockout-Mutante wurden in eine verschließbare, atmungsaktive Plastikbox gestellt und ausreichend gewässert. Anschließend wurden 8-12 *S. littoralis* Larven im 3.-4. Larvalstadium, die über Nacht vereinzelt und ohne Nahrung gehalten wurden, auf die Pflanzen verteilt. Die Pflanzen mit den Larven wurden bei ca. 25°C und einer Lichtperiode von 14 h gehalten. Nach 24 h wurde das Regurgitat der Larven gesammelt. Dazu wurden die Larven mit einer Federstahlpinzette gereizt. Als Abwehrreaktion auf die Reizung spucken die Larven ihren Vorderdarminhalt (Regurgitat) aus. Dieser wurde dann mit Mikropipetten aufgenommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Bis zur Nutzung wurde das Regurgitat bei -80°C aufbewahrt. Vor dem Auftragen auf die

Pflanzen wurde es bei 16000 g und 4°C 1 min zentrifugiert, um größere Blattreste zu entfernen. Der Überstand wurde 1:1 mit sterilem ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

#### **2.2.5.2. Behandlung der Pflanzen**

Jeweils 2-3 Blätter einer 6-7 Wochen alten Pflanze (Wildtyp oder *CML37*-Knockout-Mutante) wurden mit einem Schneidrad mit gezackter Schneide verletzt. Dies erfolgte in einem spezifischen Muster, sodass je eine Lochreihe zu beiden Seiten der Mittelrippe eines Blattes entstand. In die Löcher einer Reihe wurden jeweils 10 µl des entsprechenden Larvenregurgitats getropft. Für die Kontrollpflanzen wurde anstatt des Larvenregurgitats steriles ddH<sub>2</sub>O verwendet. Die Pflanzen wurden mit einem lichtdurchlässigen Deckel abgedeckt, um einer zu schnellen Verdunstung von dem Larvenregurgitat bzw. dem Wasser vorzubeugen. Dann wurden sie wieder für 30, 60 oder 90 min in die Kurztagskammer gestellt. Nach Ablauf der jeweiligen Zeit wurden die behandelten Blätter abgeschnitten und abgewogen. Ca. 250 g Blattmaterial pro Pflanze wurde in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Des Weiteren wurde auch Blattmaterial von unbehandelten, gleichaltrigen Pflanzen gesammelt, um den Phytohormongehalt zum Zeitpunkt 0 min zu bestimmen.

#### **2.2.5.3. Extraktion der Phytohormone**

Die Extraktion erfolgte mit Methanol in zwei Schritten. Alle Extraktionsschritte erfolgten bei 4°C. Zunächst wurde das abgewogene Blattmaterial mit Hilfe von flüssigem Stickstoff und einem sterilen Mörser fein zermahlen. Für den ersten Extraktionsschritt wurde mit internen Standard (10 ng/µl JA-d<sub>2</sub>, 10 ng/µl SA-d<sub>4</sub>, 2 ng/µl JA-Ile-6-<sup>13</sup>C) vermischtes Methanol (4 µl interner Standard auf 1 ml Methanol) benutzt. Jeweils 1,5 ml der Methanol-Standard-Lösung wurde pro Probe hinzugefügt. Anschließend wurden diese für 30 min bei 900 rpm geschüttelt. Die Proben wurden dann bei 16000 g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet wurde in einem zweiten Extraktionsschritt in Methanol ohne internen Standard gelöst. Diese Lösung wurde

für 10 min bei 900 rpm geschüttelt und anschließend für 10 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde dem vorherigen hinzugefügt.

Da die so gewonnenen Phytohormonextrakte zum Teil Verunreinigungen enthielten, wurden sie in einem Konzentrator bei 30°C eingeengt und in 0,5 ml Methanol erneut gelöst. Die Verunreinigungen wurden bei 16000 g und 4°C für 2 min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein Glas-Vial übertragen. Bis zur Messung wurden die Extrakte bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.4. Phytohormonmessungen

Die Phytohormonextrakte wurden mittels der Aligent 1200 HPLC über eine Zorbax Eclipse XBD-C18-Säule (50x4,6 mm, 1,8 µm, Aligent Technologies, Waldbronn) mit einem Methansäure-Acetonitril-Gradienten (siehe Tabelle 1) aufgetrennt.

**Tabelle 1: Gradient zur Auftrennung der Phytohormonextrakte mittels HPLC.** In der Tabelle ist der Methansäure-Acetonitril-Gradient dargestellt. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden unterschiedliche Verhältnisse beider Lösungen auf die Säule gegeben. Die Flussrate war konstant bei 0,8 ml/min.

Zeit	Methansäure (0,05%)	Acetonitril
0-0,5 min	95%	5%
0,5-9,5 min	95-58%	5-42%
9,5-9,51 min	58-0%	42-100%
9,51-12 min	0%	100%
12-15 min	95%	5%

Anschließend erfolgte die Triple-Quadrupole-Tandem-Massenspektrometrie. Die Moleküle wurden durch Elektronenspray-Ionisation im negativen Modus ionisiert und mittels MRM (*multiple reaction monitoring*) detektiert (Masse-Ladungs-Verhältnisse der Mutter- bzw. Tochterionen siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Masse-Ladungsverhältnisse der MRM.** Es sind die Masse-Ladungsverhältnisse der Mutter- bzw. Tochterionen der verschiedenen Phytohormone und ihrer internen Standards in der MRM dargestellt. *m/z* steht für das Masse-Ladungsverhältnis.

Phytohormon	<i>m/z</i> des Mutterions	<i>m/z</i> des Tochterions
SA	136,9	93
SA-d <sub>4</sub>	140,9	97
JA	209,1	59
Dihydro-JA-d <sub>2</sub>	213,1	56
JA-Ile	322,2	130,1
JA-Ile-6- <sup>13</sup> C	328,2	136,1
cis-OPDA	290,9	165,1

#### 2.2.5.5. Kalkulation des Phytohormongehalts

Der Ausgangspunkt der Berechnung des Phytohormongehalts der einzelnen Proben sind die in der Triple-Quad-LC-MS-MS gemessenen Peaks bzw. deren Peakflächen. Diese bilden die Grundlage für die Berechnung des Phytohormongehalts der einzelnen Proben. Sie werden auf die Menge an hinzugefügtem internen Standard und auf das Frischgewicht des verwendeten Blattmaterials bezogen. Für die Kalkulation wurde folgende Formel genutzt:

$$\text{Phytohormongehalt} = \frac{m_{\text{ISTD}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Probe}}}{\text{Peakfläche}_{\text{ISTD}}} \div m_{\text{Probe}}$$

**Formel 1: Berechnung des Phytohormongehalts.** ISTD steht für interner Standard.



Da für das cis-OPDA kein interner Standard hinzugefügt wurde, erfolgte die Berechnung hier über die Peakfläche des internen Standards von JA. Allerdings wird der Formel der Faktor 8 hinzugefügt (siehe Formel 2). Dieser ergibt sich aus der unterschiedlichen Ionisation von cis-OPDA und JA.

$$\text{cis-OPDA-Gehalt} = \frac{8 \cdot m_{\text{ISTD(JA)}} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Probe}}}{\text{Peakfläche}_{\text{ISTD(JA)}}} \div m_{\text{Probe}}$$

**Formel 2: Berechnung des cis-OPDA-Gehalts.** Der Faktor 8 ergibt sich aus dem Vergleich der Ionisation von JA und OPDA. ISTD steht für interner Standard.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte in SigmaStat durch eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test.

## 2.2.6. Glukosinolatanalyse

### 2.2.6.1. Probengewinnung

Die Glukosinolatuntersuchungen erfolgten an mit *S. littoralis* befallenen Wildtyp- und *CML37*-Knockout-Pflanzen. Die Sammlung der Proben erfolgte entweder nach einem eintägigen (siehe 2.2.3.1.) oder einwöchigen (siehe 2.2.4.) Fraßexperiment. Dazu wurde die gesamte Rosette einer Pflanze in einem Falcon-Tube in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Als Kontrolle wurden die Rosetten unbehandelter, gleichaltriger Pflanzen genutzt.

### 2.2.6.2. Extraktion der Glukosinolate

Die Glukosinolatextraktion erfolgte mit Abänderungen nach Burow *et al.*, 2006. Dazu wurden 96 Filter Plates (1,3 ml) von Nunc GmbH und Co. KG, Langenselbold, benutzt.

Zur Extraktion der Glukosinolate wurde das Blattmaterial gefriergetrocknet und mittels kleiner Metallkugeln in einem Farbschüttler zerkleinert. Je 25 mg zerkleinertes Blattmaterial wurde mit 1 ml Methanol-Standard-Lösung (80%iges Methanol mit

50 µM Sinalbin) vermischt. Die Proben wurden horizontal für 5 min bei 230 rpm geschüttelt und bei 16000 g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Je 800 µl Überstand wurden auf eine DEAE-Sephadex-Säule (DEAE-Sephadex A25 gequollen in 800 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O, gewaschen mit 500 µl 80%igem Methanol) geladen. Anschließend wurde die Säule einmal mit 500 µl 80%igem Methanol, zweimal mit 1 ml MilliQ-H<sub>2</sub>O und einmal mit 500 µl 0,02 M MES-Puffer (pH=5,2) gewaschen. Zur Desulfatierung der Glukosinolate wurde die Säule über Nacht mit 30 µl Sulfatase bei Raumtemperatur inkubiert. Die Desulfoglukosinolate wurden dann mit 500 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O eluiert. Die Glukosinolateextrakte wurden bis zur Messung bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.6.3. Messungen der Glukosinolate

Die Auftrennung der Glukosinolate erfolgte mittels der Aligent 1100 HPLC über eine C18-Umkehrphasensäule (Chromolith Performance RP18e, 100x4,6 mm, Merck, Darmstadt) mit einem Wasser-Acetonitril-Gradienten (siehe Tabelle 1). Anschließend wurden die Glukosinolate bei 229 nm detektiert.

**Tabelle 3: Gradient zur Auftrennung der Glukosinolate mittels HPLC.** In der Tabelle ist der Wasser-Acetonitril-Gradient abgebildet. Zu unterschiedlichen Zeiten wurden unterschiedliche Verhältnisse beider Lösungen auf die Säule gegeben. Die Flussrate war konstant bei 1,5 ml/min. Im Anschluss an den Gradienten folgte ein Waschzyklus.

Zeit	Wasser	Acetonitril
0-3 min	100-97%	0-3%
3-10 min	97-79,5%	3-20,5%
10-13 min	79,5-50%	20,5-50%

#### 2.2.6.4. Auswertung der Messungen

Die Auswertung der Messungen erfolgte in Anlehnung an Burow *et al.*, 2006. Grundlage der Formel für die Quantifizierung (Formel 3) der verschiedenen Glukosinolate waren die durch Integration der Peaks der UV-Analyse ermittelten Peakflächen. Die Peakflächen der einzelnen Glukosinolate wurden zu der des internen Standards ins Verhältnis gesetzt und auf die Konzentration des internen Standard und das Trockengewicht der Proben bezogen. Zusätzlich wurde das Verhältnis mit den relativen *response factors* der verschiedenen Glukosinolatgruppen multipliziert. Es wurden folgende *response factors* verwendet: 2 für aliphatische Glukosinolate, 0,5 für Indol-Glukosinolate, 2 für 2-Phenylethyl-Glukosinolate. Der Gesamtglukosinolatgehalt ergibt sich aus der Summe der Gehalte der einzelnen Glukosinolate.

$$\text{Glukosinolatgehalt} = \frac{\text{rf} \cdot \text{Peakfläche}_{\text{Probe}} \cdot C_{\text{ISTD}}}{\text{Peakfläche}_{\text{ISTD}}} \div m_{\text{Probe}}$$

**Formel 3: Berechnung des Glukosinolatgehalts.** Rf steht für *response factor*. ISTD steht für interner Standard.

Die Daten wurden in SigmaStat statistisch durch eine einfaktorielle ANOVA mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test ausgewertet.

#### 2.2.7. Untersuchung der Genregulation von *CML37* durch Phytohormone

##### 2.2.7.1. Probengewinnung und -vorbereitung

Wildtyp-Pflanzen, welche 5-7 Wochen alt waren, wurden mit 50 µM Lösungen verschiedener Phytohormone (JA, Coronalon und cis-OPDA) behandelt. Dabei wurden die Lösungen von JA und Coronalon auf die Pflanzen gesprüht, wohingegen die cis-OPDA-Lösung mit einem Pinsel auf den Pflanzen verteilt wurde, um diese sparsam zu verwenden. Als Kontrolle wurden die jeweiligen Lösungsmittel, in denen die Phytohormone gelöst waren, auf die Pflanzen appliziert (siehe Tab. 2). Damit die

Lösungen auf den Pflanzen nicht zu schnell verdunsteten, wurden sie mit einem lichtdurchlässigen Deckel abgedeckt. Anschließend wurden sie wieder in die Kurztagskammer gestellt. Nach 30 oder 180 min wurden die Rosetten der Pflanzen in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die RNA von je einem großen Blatt wurde mit TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), wie in Kapitel 2.2.3.2. beschrieben, isoliert. Anschließend erfolgte der DNA-Verdau (siehe Kapitel 2.2.3.3) und die cDNA-Synthese (siehe Kapitel 2.2.3.4.).

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Phytohormone und ihren entsprechenden Lösungsmittelkontrollen.** In der Tabelle sind die als Kontrolle auf die Pflanzen applizierten Lösungsmittel dargestellt.

Phytohormon	Lösungsmittelkontrolle
JA	0,015%iges Methanol
Coronalon	0,1%iges Ethanol
cis-OPDA	0,1%iges DMSO

### 2.2.7.2. Quantitative *Real-Time*-PCR

Die quantitative *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) ist eine besondere Form der PCR, welche es ermöglicht, die Menge an neu produzierten Nukleinsäuren während eines PCR-Zyklus zu bestimmen. Grundlegend verläuft diese spezielle Methode wie eine herkömmliche PCR in 3 Phasen, welche sich zyklisch wiederholen. Jedoch wird dem PCR-Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff oder eine Fluoreszenzsonde hinzugegeben, welche die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit erlauben. Für die hier durchgeführten qRT-PCRs wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I verwendet. Er kann direkt an doppelsträngiger DNA binden und fluoresziert im Komplex mit ihr. Nimmt nun die Menge an doppelsträngiger DNA während der PCR zu, kann das über eine proportionale Zunahme an Fluoreszenz gemessen werden. Somit ist eine Quantifizierung des PCR-Produktes möglich. Allerdings bindet SYBR Green I an jegliche doppelsträngige DNA, sodass auch Nebenprodukte der PCR oder Primer-

Dimere Fluoreszenzkomplexe ausbilden können. Um zu überprüfen, ob die gemessene Fluoreszenz vom PCR-Produkt ausgeht, muss deshalb am Ende der PCR eine Schmelzkurve erstellt werden.

Der Ansatz für die qRT-PCR wurde entsprechend den Angaben des Brilliant II SYBR<sup>®</sup> Green QPCR Master Mix Kits angefertigt, wobei die Primer in einer Endkonzentration von 500 nM hinzugefügt wurden. Pro Ansatz wurden 50 ng cDNA verwendet. Es wurde folgendes PCR-Programm verwendet:

initiale Denaturierung:	95°C	10 min	
Denaturierung:	95°C	30 sec	} 40x
<i>Annealing</i> :	60°C	50 sec	
Amplifikation:	72°C	1 min	
Denaturierung:	95°C	1 min	
Dissoziation:	55°C	30 sec	}
	95°C	30 sec	

Die Fluoreszenz wurde während der PCR sowohl nach jeder *Annealing*-Phase bei 60°C als auch nach jeder Amplifikationsphase bei 72°C gemessen. Da beide Werte gleich waren, wurden für die Auswertung nur die Fluoreszenzwerte der *Annealing*-Phase betrachtet. Des Weiteren wurde die Fluoreszenz während des Erhitzens der DNA von 55°C auf 95°C detektiert, um eine Schmelzkurve zu erstellen. Die Aufbereitung der Daten erfolgte mit der Software MxPro (Agilent Technologies GmbH, Böblingen).

### 2.2.7.3. Messung der Primereffizienz

Die Effizienz der Primer ist eine entscheidende Komponente der Formel zur Auswertung einer qRT-PCR. Die Effizienz von Primern verschiedener Gene kann jedoch unterschiedlich sein. Des Weiteren schwankt die Effizienz von Primern auch in Abhängigkeit vom verwendeten Gewebe (Pfaffl *et al.*, 2002). Werden diese Unterschiede in der Auswertung nicht berücksichtigt, kann es zu einer fehlerhaften Berechnung führen. Eine Bestimmung der Primereffizienz ist daher notwendig.

Für die Effizienzbestimmung wurde eine Mischung aus allen cDNA-Proben (sowohl Kontrollen als auch behandelte Pflanzen) verwendet. Dies war möglich, da alle Proben aus dem gleichen Gewebe derselben Pflanzenart stammten. Lediglich bei Primern, welche nur für die qRT-PCR mit den cis-OPDA-Proben verwendet wurden, wurde die Effizienz auch nur mit einer Mischung aller cis-OPDA-Proben bestimmt. Für die Effizienzbestimmung wurde der qRT-PCR-Ansatz aus Kapitel 2.2.7.2. genutzt. Diesem wurden je 4 µl der cDNA-Mischung in folgenden Konzentrationen hinzugefügt: 25 ng/µl, 12,5 ng/µl, 6,25 ng/µl, 2,5 ng/µl, 1,25 ng/µl, 0,625 ng/µl, 0,25 ng/µl, 0,125 ng/µl. Zur Messung der Primereffizienz wurde dasselbe Programm wie in Kapitel 2.2.7.2.2. verwendet. Die Berechnung der Primereffizienz erfolgte mit Hilfe der Software REST 2009 V 2.0.13 (<http://www.qiagen.com/Products/REST2009Software.aspx?r=8042#Tabs=t1>, Pfaffl *et al.*, 2002).

#### **2.2.7.4. Quantifizierung der qRT-PCR**

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten die Menge PCR-Produkt in qRT-PCRs zu quantifizieren: Zum einen kann die Quantifizierung relativ erfolgen und zum anderen absolut. Bei der absoluten Methode basiert die Quantifizierung auf einer zuvor erstellten Kalibrierungskurve. Allerdings ist diese Methode sehr aufwendig und schwierig, weshalb für die hier durchgeführten qRT-PCRs die relative Quantifizierungsmethode gewählt wurde. Bei dieser erfolgt die Quantifizierung der Expression des eigentlichen Zielgens im Verhältnis zu der Expression eines Referenzgens. Als Referenzgene werden sogenannte *Housekeeping*-Gene verwendet. Das sind Gene, welche konstitutiv überall im Organismus exprimiert werden, da sie grundlegend für das Überleben der Zellen sind. Allerdings werden viele *Housekeeping*-Gene in verschiedenen Kontexten doch reguliert und eignen sich deshalb nicht als Referenzgen. (Pfaffl, 2001) Vor allem im Herbivoriezusammenhang ist es schwierig geeignete Referenzgene zu finden. Für die hier durchgeführten qRT-PCRs wurde *RPS18B* als Referenzgen verwendet, da für dieses gezeigt werden konnte, dass es im Kontext der Herbivorie nicht reguliert wird (Vogel *et al.*, nicht publiziert).

Die Berechnung des Verhältnisses des Zielgens zum Referenzgen erfolgte nach folgender Formel (Pfaffl, 2001):

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta\text{CT}_{\text{Referenzgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Behandlung})}}$$

**Formel 4: Berechnung der relativen Expression nach Pfaffl, 2001.** *E* steht für die Effizienz der Primer des Ziel- bzw. Referenzgens. Als CT-Wert (*threshold cycle*) wird der Zyklus definiert, in welchem die Fluoreszenz erstmals statistisch signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

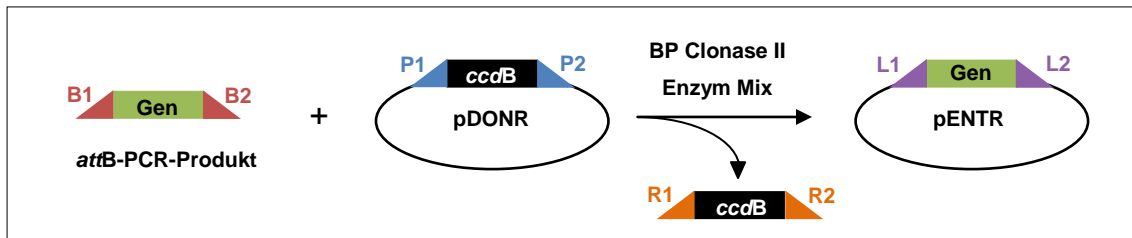
## 2.2.8. Lokalisationsstudie

### 2.2.8.1. Erstellung eines *CML37-GFP*-Konstruktes

Sowohl die Erstellung des N-terminalen als auch des C-terminalen GFP-Konstruktes erfolgte mittels Gateway® Cloning (hier aufgeführte Information entstammen Katzen, 2007, und dem Gateway® Technology Manual (Version E, 13.05.2010)). Gateway® Cloning ist eine spezielle Klonierungstechnologie, welche auf dem Integrations- und Exzisionsmechanismus des Bakteriophagen  $\lambda$  basiert. Dieser integriert während seines lysogenen Stadiums seine DNA in das Genom seines Wirtes *Escherichia coli*. Die Grundlage dieser Integration ist eine ortsspezifische Rekombination von speziellen Sequenzen des  $\lambda$ -Genoms mit speziellen Sequenzen des Wirtsgenoms. Man nennt diese Sequenzen *att*-Stellen (*attachment*-Stellen). Je nach ihrer Lage bezeichnet man sie als *attB*-Stelle (*att*-Stellen des Bakteriums) bzw. als *attP*-Stelle (*att*-Stellen des Phagen). Beide *att*-Stellen können in zwei Teilbereiche untergliedert werden: B und B' bzw. P und P'. Während der Integration werden sowohl die *attB*- als auch die *attP*-Stelle geöffnet, sodass ihre beiden Teilbereiche frei liegen. Die Bereiche B und P' bzw. B' und P werden dann miteinander verknüpft und rekombinieren zur sogenannten *attL*- (*left*) bzw. *attR*-Stelle (*right*). Zur Exzision des Phagengenoms wird dieser Prozess umgekehrt, sodass wieder *attB*- und *attP*-Stellen entstehen.

Genau diese Mechanismen werden in der Gateway® Klonierungstechnologie angewendet. Prinzipiell erfolgt die Erstellung eines Gateway®-Konstruktes in 2 Schritten. Zunächst wird durch die BP-Reaktion ein *Entry*-Klon hergestellt (Abb. 1). Dazu wird das zu klonierende Gen seitenspezifisch in einen Donorvektor eingefügt. Dieser enthält ein *ccdB*-Gen flankiert von 2 *attP*-Stellen. In der BP-Reaktion wird es mittels des BP Clonase II Enzym Mixes herausgeschnitten, sodass die beiden *attP*-

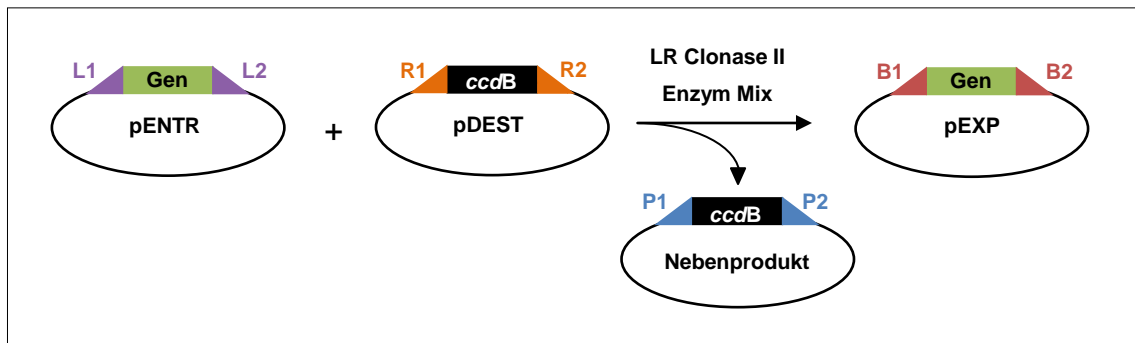
Stellen frei liegen. Sie können sich mit passenden *attB*-Sequenzen zu *attL*-Sequenzen rekombinieren. Die entsprechenden *attB*-Sequenzen werden zuvor mit einer PCR an das zu integrierende Gen angehängt, sodass dieses anstelle des *ccdB*-Gens in den Vektor eingefügt werden kann.



**Abbildung 1: Die BP-Reaktion (nach dem Gateway<sup>®</sup> Technology Manual (Version E, 13.05.2010)).** Durch Integration eines mit *attB*-Enden flankierten Gens in einen Donorvektor wird ein *Entry*-Klon erstellt.

In einem zweiten Schritt, der LR-Reaktion, erfolgt dann die Erstellung des endgültigen Gateway<sup>®</sup>-Konstruktes: des Expressionsklons (Abb. 2). Dazu wird das zu klonierende Gen mit den beiden flankierenden *attL*-Enden aus dem *Entry*-Klon herausgeschnitten und in einen Destinationsvektor integriert. Auch dieser besitzt ein *ccdB*-Gen. Es wird von *attR*-Stellen flankiert. Im Verlauf der LR-Reaktion wird dieses aus dem Vektor herausgeschnitten, sodass die *attR*-Stellen frei werden. Diese haben die Fähigkeit mit freien *attL*-Stellen zu *attB*-Stellen zu rekombinieren. Durch diesen Rekombinationsprozess wird das zu klonierende Gen anstelle des *ccdB*-Gens in den Vektor eingefügt und es entsteht der Expressions-Klon. Diese Reaktion wird vom LR Clonase II Enzym Mix katalysiert.





**Abbildung 2 : Die LR-Reaktion (nach dem Gateway® Technology Manual (Version E, 13.05.2010)).** Durch Exzision des Gens aus dem *Entry*-Klon und anschließender Integration des Gens in den Destinationsvektor entsteht der Expressionsvektor.

### 2.2.8.1.1. PCR zum Anhängen der *attB*-Enden

Um das *CML37* Gen in den Donorvektor zu integrieren, mussten ihm zunächst die *attB*-Stellen angefügt werden. Das erfolgte mittels einer PCR mit speziellen Primern (siehe Kapitel 2.1.5.4.). Sie enthielten neben der Sequenz für das *CML37* auch die *attB*-Sequenzen. Es wurde passend zu den *attP*-Sequenzen des Donorvektors (pDONR™ 207) die *attB1*-Sequenz für den Vorwärtsprimer und die *attB2*-Sequenz für den Rückwärtsprimer verwendet. Je nachdem in welches Konstrukt das PCR-Produkt später eingefügt werden sollte, wurden unterschiedliche Rückwärtsprimer benutzt. Der Rückwärtsprimer für das C-terminale GFP-Konstrukt enthielt das Stopp-Codon des Gens. Der Rückwärtsprimer für das N-terminale Konstrukt wurde ohne Stopp-Codon kreiert, damit das *CML37* ohne Unterbrechung an das GFP angefügt werden konnte.

Um Fehler während der DNA-Amplifikation zu vermeiden, wurde für die PCR eine Polymerase mit Korrekturlesefunktion (*proofreading*-Funktion) benutzt: die *Pfu* Polymerase. Sie wird aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus* isoliert.

Der PCR-Ansatz enthielt 1x *Pfu*-Polymerase-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.8), 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM KCl, 0,01% (w/v) BSA, 0,1% (v/v) Triton X-100, 2 mM MgSO<sub>4</sub> (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)), 500 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,1 U/μl *Pfu* Polymerase. Als Matrize für die PCR wurde ein *CML37*-pUNI51-Konstrukt verwendet, welches zuvor bei TAIR (Stanford, USA) bestellt wurde.

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

initiale Denaturierung:	94°C	3 min	
Denaturierung:	94°C	40 sec	} 35x
Annealing:	57°C	1 min	
Amplifikation:	72°C	1 min	
finale Amplifikation:	72°C	10 min	

#### 2.2.8.1.2. Extraktion des *CML37-attB*-Fragments aus einem Agarosegel

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Die Bande des PCR-Produkts wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem Invisorb<sup>®</sup> Fragment CleanUp Kit aus dem Gel extrahiert. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers befolgt. Allerdings erfolgte die Elution nicht wie vorgeschrieben mit dem gelieferten Puffer, sondern mit 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O (erhitzt auf 60°C). Das extrahierte PCR-Produkt wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 1%igen Agarosegels auf seine Reinheit überprüft.

#### 2.2.8.1.3. BP-Reaktion

Zur Integration des extrahierten PCR-Produktes in den Vektor pDONR<sup>™</sup> 207 wurde die BP-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde der Gateway<sup>®</sup> BP Clonase<sup>®</sup> II Enzyme Mix Kit verwendet. Die BP-Reaktion wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubationszeit für diese Reaktion betrug 3 h.

#### 2.2.8.1.4. Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Der *Entry*-Vektor sollte durch Hitzeschock in *E. coli* transformiert werden. Da *E. coli* keine natürliche Kompetenz besitzt, musste diese künstlich hergestellt werden. Die Präparation kompetenter Zellen erfolgte mittels CaCl<sub>2</sub> nach Sambrook und Russell, 2001. Dazu wurden die TOP10 Zellen zunächst über Nacht bei 37°C und 220 rpm in 5 ml LB-Medium (10 g/l Trypton, 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt) im Schüttler kultiviert.

2 ml der ÜN-Kultur wurden in 200 ml LB-Medium überimpft und bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C und 220 rpm weiter inkubiert. Nachdem die Zellen für 30 min auf Eis abgekühlt wurden, wurden sie für 25 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder bei 3000 g und 4°C für 25 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> gelöst und für 1 h bei 4°C inkubiert. Der Zelllösung wurde 50%iges Glycerol bis zu einer finalen Konzentration von 10% hinzugefügt. Bis zur Nutzung wurden die Zellen in Aliquots von 100 µl bei - 80°C aufbewahrt.

#### **2.2.8.1.5. Transformation des *Entry*-Vektors**

Der *Entry*-Vektor wurde mittels eines Hitzeschocks in chemisch kompetente *E. coli* TOP10 Zellen transformiert. Zur Transformation wurden 98 µl chemisch kompetenter *E. coli* TOP10 Zellen mit 2 µl des Ansatzes der BP-Reaktion gemischt und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend erfolgte bei 42°C ein 1,5-minütiger Hitzeschock, nach dem die Zellen sofort wieder auf Eis gekühlt wurden. Die Zellen wurden dann mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und 220 rpm im Schüttler inkubiert.

#### **2.2.8.1.6. Selektion positiver Klone**

Die Selektion positiver Klone erfolgte mittels der Antibiotika-Resistenz, welche im Donorvektor kodiert ist. Der Vektor pDONR™207 trägt eine Gentamycin- und Chloramphenicolresistenz. Letztere geht allerdings durch die Exzision des *ccdB*-Gens verloren. Die Selektion erfolgte demzufolge nur über die Gentamycinresistenz. Dazu wurden die transformierten Zellen zunächst konzentriert, indem sie bei 16000 g für 1 min abzentrifugiert wurden und 700 µl des LB-Mediums abgenommen wurden. Die Zellen wurden im verbliebenen LB-Medium resuspendiert. Je 100 µl der Zellsuspension wurden dann auf LB-Agar-Platten (15 g Agar-Agar Kobe I auf 1 l LB-Medium) mit Gentamycin (Endkonzentration: 50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nur Zellen, welche den *Entry*-Vektor tatsächlich aufgenommen hatten, konnten auf der Platte wachsen. Auch Zellen, welche den leeren pDONR™207 enthielten, starben, da das im leeren Donorvektor enthaltene *ccdB*-Gen

die Gyrase, welche essentiell für die DNA-Replikation ist, hemmt (Bernard und Couturier, 1992).

#### **2.2.8.1.7. Plasmidisolierung**

Zur Isolation des *Entry*-Vektors wurden einige der auf den Antibiotika-LB-Platten gewachsenen Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in je 5 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Gentamycin übertragen. Die Kolonien wurden dann über Nacht bei 37°C und 220 rpm schüttelnd inkubiert. Aus den ÜN-Kulturen wurde mittels des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits der *Entry*-Vektor isoliert. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Jedoch erfolgte die Elution nicht mit dem angegebenen Puffer sondern mit 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O (erhitzt auf 60°C).

Um zu überprüfen, ob das Konstrukt tatsächlich das *CML37* Gen beinhaltetete, wurde mit dem isolierten Plasmid eine PCR durchgeführt. Dazu wurde derselbe Ansatz wie in Kapitel 2.2.3.5. und dasselbe Programm wie in Kapitel 2.2.8.1.1. genutzt.

#### **2.2.8.1.8. DNA-Sequenzierung**

Um sicherzustellen, dass sowohl die Amplifikation als auch die Integration der *CML37*-Sequenz fehlerfrei verlief, wurden die isolierten *Entry*-Vektoren sequenziert. Die Sequenzierung wurde durch Eurofins MWG Operon in Ebersberg durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem NCBI Nukleotid Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

#### **2.2.8.1.9. LR-Reaktion**

Um ein GFP-Konstrukt zu erstellen, wurde mittels einer LR-Reaktion das *CML37* aus dem *Entry*-Vektor ausgeschnitten und in die entsprechenden Destinationsvektoren integriert. Für das C-terminale GFP-Konstrukt wurde der Vektor pB7FWG2 benutzt und für das N-terminale der Vektor pB7WGF2. Die LR-Reaktion erfolgte mit Hilfe des Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix Kits nach dem Protokoll des Herstellers. Die Inkubationszeit für die LR-Reaktion betrug 16 h.

Anschließend erfolgte die Hitzeschocktransformation der GFP-Konstrukte in *E. coli* TOP10 Zellen wie in Kapitel 2.2.8.1.4. beschrieben.

#### **2.2.8.1.10. Selektion positiver Klone**

Die Selektion positiver Klone erfolgte über die auf beiden Expressionsvektoren kodierte Spectinomycin-Resistenz. Sie wurde wie in Kapitel 2.2.8.1.5. beschrieben durch Ausstreichen auf Antibiotika-LB-Agar-Platten durchgeführt. Das Spectinomycin wurde dabei in einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwendet.

Anschließend wurde mit einigen der positiven Klone eine Kolonie-PCR durchgeführt, um zu prüfen, ob sie tatsächlich den Vektor mit dem integrierten *CML37* enthielten. Dazu wurden die Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in je 50 µl steriles ddH<sub>2</sub>O übertragen. Je 1,5 µl dieser Zellsuspension wurde dann zu je 8,5 µl PCR-Ansatz (siehe Kapitel 2.2.3.5.) hinzugefügt. Das verwendete PCR-Programm war dasselbe wie in Kapitel 2.2.8.1.1. Zur Auswertung wurde die DNA auf einem 1%igem Agarosegel durch Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Zellsuspension wurde des Weiteren dafür genutzt ÜN-Kulturen anzusetzen. Dazu wurde je 1 µl der Zellsuspension in 5 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Spectinomycin überimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C und schüttelnd bei 220 rpm inkubiert. Aus den ÜN-Kulturen wurden die Expressionsvektoren mittels des GeneJET™ Plasmid Miniprep Kits (Änderungen des Protokolls siehe Kapitel 2.2.8.1.6.) isoliert.

#### **2.2.8.2. Transformation der Expressionsvektoren in *Agrobacterium tumefaciens***

Die Transformation der Pflanzen erfolgte mit Hilfe des pflanzenpathogenen Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens*. Es löst bei befallenen Pflanzen die Bildung von Gallen aus, indem es die Gene zur Tumorbildung in das Genom des pflanzlichen Organismus integriert. Dazu besitzt es ein spezielles Plasmid, welches Ti-Plasmid (*tumor inducing*) genannt wird. Auf diesem sind zum einen die T-DNA (Transfer-DNA), welche in das Pflanzengenom integriert werden soll, und zum anderen Virulenzgene kodiert, welche zur Integration der T-DNA beitragen. Durch

verschiedene Sekundärmetabolite der Pflanzen werden die Virulenzgene aktiviert und die T-DNA in das Pflanzengenom integriert.

Diesen Mechanismus macht man sich für die Transformation von Pflanzen zu eigen, indem man binäre Vektoren nach dem Vorbild des Ti-Plasmids konstruiert. Die T-DNA dieser Vektoren kann dann mittels *A. tumefaciens* in die Pflanzen integriert werden.

Die beiden hier verwendeten Expressionsvektoren sind nach eben diesem Vorbild aufgebaut. Um das *CML37-GFP*-Konstrukt ins Pflanzengenom zu integrieren, mussten die Vektoren also zunächst in *A. tumefaciens* transformiert werden. Die Transformation erfolgte mittels Elektroporation. Elektrokompente *A. tumefaciens* Zellen vom Stamm GV3101 wurden zuvor nach einem abgeänderten Protokoll von Sambrook und Russell, 2001, präpariert. Dazu wurden die Zellen über Nacht bei 28°C und 150 rpm schüttelnd in 5 ml LB-Medium mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml Gentamycin und 100 µg/ml Rifampicin kultiviert. 1 ml der ÜN-Kultur wurde in 300 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika inokuliert. Diese Kultur wurde bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 28°C und 150 rpm inkubiert. Nachdem sie für 30 min auf Eis gekühlt wurden, wurden die Zellen bei 4000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Um alle Medienrückstände zu entfernen, wurde das Pellet viermal mit 150 ml eiskaltem, sterilen ddH<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 15 ml eiskaltem 10%igem Glycerol resuspendiert und erneut unter oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 18 ml 10%igem Glycerol gelöst und in Aliquots zu je 100 µl bei -80°C aufbewahrt.

Für die Elektroporation wurden 48 µl der elektrokompenten Zellen mit 2 µl Plasmid gemischt und in eine sterile, eiskalte Elektroporationsküvette mit 2 mm Spaltbreite übertragen. Die Elektroporation erfolgte bei einer Pulsspannung von 1800 V. Danach wurden die Zellen sofort mit 1 ml LB-Medium versetzt und für 4 h bei 28°C und 150 rpm im Schüttler inkubiert.

Die Selektion positiver Klone erfolgte über die Spectinomycinresistenz der Expressionsvektoren und die Gentamycin- bzw. Rifampicinresistenz der Zellen. Sie wurde auf LB-Agar-Platten wie in Kapitel 2.2.8.1.5. beschrieben durchgeführt. Die Antibiotika wurden in folgenden Endkonzentrationen verwendet: 50 µg/ml Spectinomycin und Gentamycin und 100 µg/ml Rifampicin. Zusätzlich wurden die positiven Klone durch eine Kolonie-PCR überprüft (siehe Kapitel 2.2.8.1.10.), welche

mittels Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines 1%igen Gels ausgewertet wurde.

### **2.2.8.3. Transiente Transformation von *Nicotiana benthamiana***

Die Infiltration von *Nicotiana benthamiana* erfolgte nach dem Protokoll von Schütze *et al.*, 2009. Es wurden jedoch Abänderungen vorgenommen. Anstatt des YEB-Mediums wurde LB-Medium verwendet. Die Zellen wurden mit dem AS-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1 verdünnt. Des Weiteren wurde anstatt des p19-Plasmids ein p14-Konstrukt (in *A. tumefaciens* Stamm C58C1, Merai *et al.*, 2005) benutzt.

Die transformierten Pflanzen wurden 1, 2 bzw. 3 Tage nach der Infiltration durch Mikroskopie auf Fluoreszenz überprüft. Dazu wurde ein Abzugspräparat der unteren Epidermis hergestellt und unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

### **2.2.8.4. Produktion stabiler Transformanten in *Arabidopsis thaliana***

#### **2.2.8.4.1. Floral-Dip-Methode**

Die *A. thaliana* Pflanzen wurden mittels der *Floral-Dip*-Methode nach dem Protokoll von Zhang *et al.*, 2006, transformiert.

#### **2.2.8.4.2. Selektion positiver Transformanten der F1-Generation**

Die verwendeten Expressionsvektoren tragen neben ihren Antibiotikaresistenzen auch eine Resistenz gegen das Herbizid BASTA. Diese Resistenz wird durch die Transformation auf die Pflanzen übertragen. Die Selektion positiver Transformanten in der F1-Generation erfolgte deshalb durch eine BASTA-Behandlung. Insgesamt wurden 4 BASTA-Behandlungen im Abstand von 2 Tagen durchgeführt. Die erste Behandlung erfolgte 10 Tage nach der Aussaat. Je nach Feuchtigkeit des Substrats wurden pro Pflanzschale 500-1000 ml BASTA-Lösung (15 ml BASTA-Stock (25 ml BASTA (200 g/l) auf 975 ml Wasser) gemischt mit 985 ml Wasser) auf die Pflanzen gesprüht. Lediglich erfolgreich transformierte Pflanzen enthielten die Resistenz und überlebten die Behandlungen. Sie wurden nach Abschluss der BASTA-

Behandlungen in 7x7 cm Töpfe vereinzelt und unter Kurztagsbedingungen kultiviert, damit sie eine möglichst große Rosette entwickelten.

#### 2.2.8.4.3. DNA-Isolation und PCR

Zur Überprüfung der positiven Transformanten wurde außerdem eine PCR durchgeführt. Dazu musste zunächst die genomische DNA der Pflanzen isoliert werden. Die Isolation erfolgte mit Abänderungen nach Dellaporta *et al.*, 1983. Pro Pflanze wurde ein kleines Blatt in 250 µl Extraktionspuffer mit einem Pistill zerrieben. Die Probe wurde anschließend sofort mit 17,5 µl 20%igem SDS versetzt und für 20 min bei 65°C inkubiert. Zur Fällung der Proteine wurden der Probe 65 µl 5 M Kaliumacetat hinzugefügt. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Probe bei 4°C und 16000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Präzipitation der DNA in eine Mischung aus 30 µl 3 M Natriumacetat und 320 µl Isopropanol übertragen und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 16000 g und 4°C für 20 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen und für 5 min bei 16000 g und 4°C zentrifugiert. Das Ethanol wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 40 µl 0,1%igem DEPC-ddH<sub>2</sub>O gelöst. Mit den DNA-Proben wurde dann eine PCR durchgeführt. Dazu wurde die JumpStart™ Taq DNA Polymerase benutzt. Der PCR-Ansatz enthielt 1x JumpStart™-Taq-Polymerase-Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,001% (w/v) Gelatine (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)), 750 nM Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP-Mix, 0,0625 U/µl JumpStart™ Taq Polymerase. Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

intiale Denaturierung:	94°C	3 min	
Denaturierung:	94°C	40 sec	} 30x
Annealing:	57°C	1 min	
Amplifikation:	72°C	1 min	
finale Amplifikation:	72°C	10 min	

Die PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Dazu wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet.



#### 2.2.8.4.4. Western-Blot

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu mussten zunächst die Proteine aus den pflanzlichen Zellen extrahiert werden. Dafür wurden 1-2 kleine Blätter pro Pflanze mit einem Pistill auf Eis in 150 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% (v/v) Triton X-100 (kurz vor Benutzung hinzugefügt), 1 mM DTT (kurz vor Benutzung hinzugefügt), 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail pro 50 ml Puffer (kurz vor Benutzung hinzugefügt)) zerrieben. Die Proteine wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dies ist eine spezielle Form der Polyacrylamid-Gelelektrophorese, welche von Laemmli, 1970, entwickelt wurde. Dazu wurden zunächst je 100 µl Probe mit 25 µl 4x SDS-Probenpuffer (0,125 M Tris-HCl (pH 6,8), 4% (w/v) SDS, 20% (w/v) Glycerol, 0,02% (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT) versetzt und für 10 min auf 95°C erhitzt. Durch das Erhitzen wurden die Proteinstrukturen bis zur Primärstruktur aufgelöst und das im Probenpuffer enthaltene SDS konnte an die Proteine binden. Da SDS die Eigenschaft hat die Eigenladung von Proteinen zu überdecken, entstanden durch diesen Prozess SDS-Protein-Komplexe mit konstanter negativer Ladung, was die Auftrennung der Proteine nach Größe in einem elektrischen Feld ermöglichte.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte über ein diskontinuierliches Gelsystem. Dabei wurden die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert und später in einem Trenngel aufgetrennt. Dieses besteht aus vernetzten Acrylamidpolymeren, welche wie ein Sieb wirken. Proteine kleineren Molekulargewichts wandern schneller hindurch als Proteine größeren Molekulargewichts, sodass die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Für alle Elektrophoresen wurden 12%ige Trenngele verwendet. Diese wurden aus folgenden Lösungen zusammengemischt: 3 ml Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40 (29:1), 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS), 4,5 ml steriles ddH<sub>2</sub>O, 10 µl 99%iges TEMED und 100 µl 10%iges APS. Sofort nach der Zugabe des APS und des TEMED wurden die Gele gegossen und mit Isopropanol abgedeckt. Nach 30-45 min wurde das Isopropanol durch dreimaliges Waschen mit sterilem ddH<sub>2</sub>O entfernt und das Sammelgel konnte auf das Trenngel gegossen werden. Dazu wurden 0,5 ml Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40 (29:1), 1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl (pH 6,8), 0,4% (w/v) SDS), 3,25 ml steriles ddH<sub>2</sub>O, 5 µl 99%iges TEMED und 50 µl 10%iges APS miteinander vermischt. Diese Mischung wurde sofort nach der Zugabe von APS und TEMED auf das Trenngel

gegeben und mit einem Kamm zur Erzeugung der Geltaschen versehen. Nach 20-30 min konnte der Kamm entfernt werden und die Taschen mit den Proben beladen werden. Je 20 µl Probe und 5 µl Größenstandard wurde auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet (33 g/l Tris, 144 g/l Glycin, 10 g/l SDS). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V im Sammelgel und bei 130 V im Trenngel.

Danach wurden die Proteine mittels Western-Blot auf eine Membran übertragen. Diese Technik geht sowohl auf Towbin *et al.*, 1979, als auch auf Renart *et al.*, 1979, zurück. Für den hier durchgeführten Western-Blot wurden PDVF-Membranen verwendet. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte mittels der oben genannten Western-Blot-Apparatur nach Angaben des Herstellers. Um die Proteinbindungsstellen der PDVF-Membran zu aktivieren, wurde diese kurz in Methanol eingelegt. Der verwendete Filter (Gel-Blotting-Papier, Whatman GmbH, Dassel) wurde zuvor in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol (kurz vor der Benutzung hinzugefügt)) eingelegt. Die Transferzeit des Blots betrug 1,5 h.

Die Detektion des GFP-Proteins erfolgte über Antikörperreaktionen. Dazu wurden zunächst alle freien Proteinbindungsstellen der PDVF-Membran blockiert. Dies erfolgte durch 1- bis 2-stündiges Schütteln (160 rpm) der Membran in 50 ml 5%iger Magermilchpulver-Lösung (5% Magermilchpulver (w/v) in TBST-Puffer (20 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,6 (eingestellt mit HCl), 0,1% (v/v) Tween 20)). Nach der Blockierung der Membran erfolgte die Bindung des primären Antikörpers, welcher spezifisch an GFP bindet. Dazu wurden 5-10 µl Antikörper mit 10 ml 2,5%iger Magermilchpulver-Lösung gemischt. Die Membran wurde bei 160 rpm schüttelnd und 4°C über Nacht in dieser Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBST-Puffer gewaschen. Anschließend musste die Membran erneut in einer 10%igen Magermilchpulver-Lösung blockiert werden. Sie wurde in dieser Lösung 10 min bei 160 rpm geschüttelt. Danach erfolgte die Bindung des sekundären Antikörpers. Dieser bindet an den primären Antikörper und kann zur Visualisierung des Proteins genutzt werden. 2 µl Antikörper wurden mit 10 ml 2,5%iger Magermilchpulver-Lösung gemischt. Die Membran wurde in dieser Lösung für 1 h bei Raumtemperatur und 160 rpm schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Membran wieder dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Visualisierung des Proteins mittels des Enzyms HRP (*horseradish*

*peroxidase*, Peroxidase des Meerrettichs), welches am sekundären Antikörper gebunden ist. Dieses kann Chemolumineszenz-reaktionen katalysieren. Als Substrat für diese Reaktion diente das Lumi-Light Western Blotting Substrat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Es besteht aus zwei Lösungen, welche kurz vor der Benutzung miteinander vermischt werden. Je 1 ml beider Lösungen wurden auf einer Folie gemischt. Die Membran wurde für 1 min in der Mischung inkubiert. Nur an den Stellen der Membran, wo die Antikörper gebunden hatten, konnte nun das Substrat umgesetzt werden, sodass nur dort Lumineszenz detektiert werden konnte. Das Lumineszenzmuster wurde dann auf einen Röntgenfilm (CL-XPosure Film, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) übertragen.

Zusätzlich wurden die Membranen mit Ponceau S angefärbt. Dazu wurde die Membran für 10 min auf einem Schüttler bei 160 rpm in der Färbelösung (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% (v/v) Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde der Membranhintergrund mit TBST-Puffer soweit entfärbt, dass die Proteinbanden sichtbar wurden.

#### **2.2.8.4.5. Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzuntersuchung erfolgte mit 4,5 Wochen alten Pflanzen. Je ein Blatt wurde mit durchsichtigem, doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixiert. Mit einem Skalpell wurden dann vorsichtig alle Zellschichten bis auf die untere Epidermis des Blattes abgetragen. Um diese vor Austrocknung zu schützen, wurde auf das Präparat etwas Wasser gegeben. Das Präparat wurde dann unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

## 3 Ergebnisse

### 3.1. Überprüfung der *CML37*-Knockout-Pflanzen

Ein wichtiges Mittel zur Untersuchung der Rolle von *CML37* in der Reaktion der Pflanzen auf Herbivorie waren Mutanten, in welchen das *CML37* nicht mehr exprimiert wurde. Man nennt diese Mutanten Knockouts. Sie wurden in verschiedenen Experimenten im Vergleich zum Wildtyp eingesetzt, um die Funktion des *CML37* studieren zu können.

Die Erstellung der hier genutzten Knockout-Mutanten erfolgte durch Insertion einer T-DNA. Diese wird entweder in den Promotor des Gens integriert, sodass das Gen nicht mehr abgelesen wird oder in das Exon des Gens, sodass der für das Protein codierende Teil des Gens unterbrochen wird. Bei einer T-DNA-Insertion im Promotor kann es allerdings vorkommen, dass das Gen dennoch abgelesen wird, da wichtige Teile des Promotors trotz der Insertion noch aktiv sind. Deshalb wurde eine Mutante mit der T-DNA-Insertion im Exon gewählt. Jedoch kann es auch bei einer solchen Mutation vorkommen, dass der Knockout nicht vollständig ist. Eine Überprüfung der vorliegenden homozygoten Knockout-Linie war deshalb notwendig.

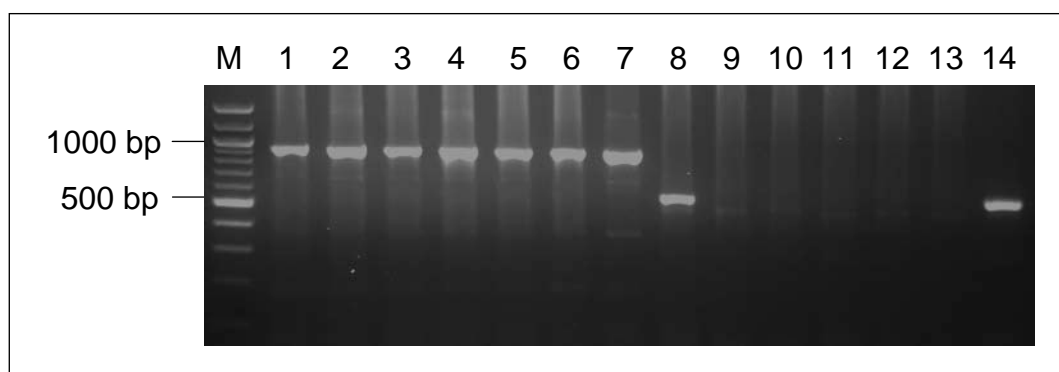
Die Überprüfung der Knockout-Mutanten erfolgte mittels RT-PCR. Da das *CML37* nicht konstitutiv in den Pflanzen exprimiert wird, musste die Genexpression zunächst angeregt werden. Wie zuvor gezeigt werden konnte, wird *CML37* unter anderem durch Raupenfraß induziert (Vadassery, nicht publiziert). Dementsprechend wurden die Pflanzen mit *S. littoralis* behandelt. Als Positivkontrolle wurden zwei Wildtyp-Pflanzen verwendet.

Neben dem *CML37* wurde bei der RT-PCR auch das *Housekeeping*-Gen *Actin 2* (*ACT2*) als Referenzgen mit aufgeführt. Damit sollte das konstitutive Genexpressionslevel innerhalb der getesteten Pflanzen bestimmt werden und somit eine Vergleichbarkeit der Proben untereinander garantiert werden.

In keiner der getesteten Mutanten konnte die Expression von *CML37* festgestellt werden (siehe Abbildung 3). Die Wildtyp-Pflanzen zeigten hingegen eine deutliche Bande bei der erwarteten Größe von ca. 500 bp (die exakte Länge des PCR-Produkts beträgt 555 bp). In allen Proben konnte die Bande für das *ACT2* knapp unter 1000 bp (die exakte PCR-Produktlänge beträgt 977 bp) detektiert werden. Die

*ACT2*-Banden aller Proben wiesen ungefähr die gleiche Dicke auf, woraus folgt, dass das Genexpressionslevel innerhalb aller Pflanzen gleich hoch und somit die Proben vergleichbar waren.

Da in den getesteten Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp keine Expression von *CML37* festgestellt werden konnte, handelte es sich tatsächlich um Knockout-Mutanten.



**Abbildung 3 : Agarose-Gelelektrophorese der RT-PCR.** M: Größenstandard 100 bp DNA Ladder; 1-7: RT-PCR-Ansatz mit *Actin*-Primern; 8-14: RT-PCR-Ansatz mit *CML37*-Primern; 1, 7, 8, 14: Wildtyp + *S. littoralis*; 2-6, 9-13: *CML37*-Knockout-Mutanten

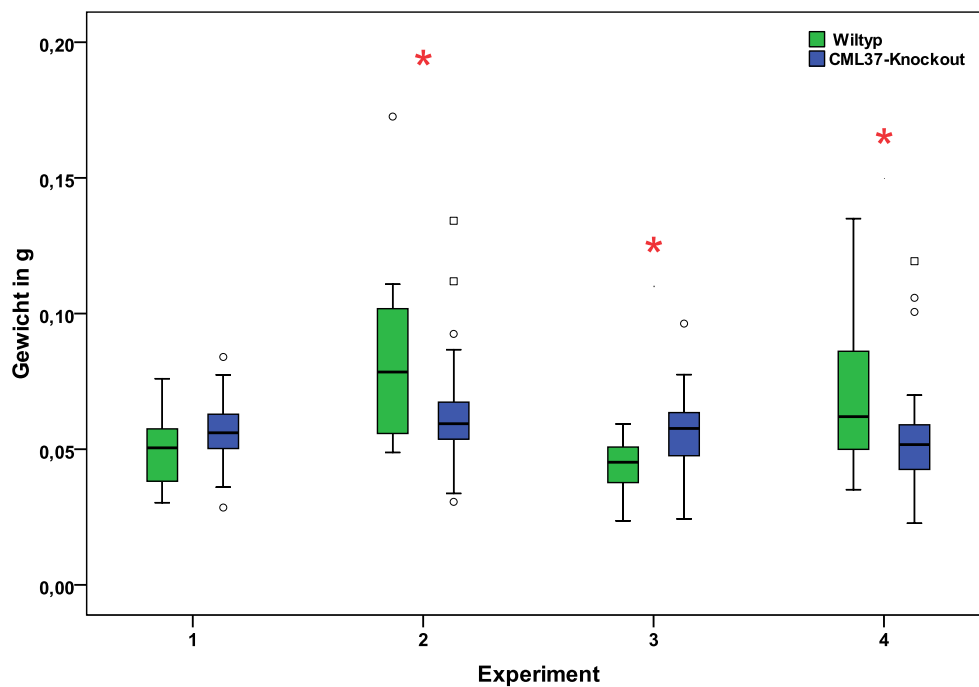
### 3.2. Untersuchungen zum Fraßverhalten von *Spodoptera littoralis*

Das Ziel dieser Arbeit war es, mögliche Verbindungen zwischen dem *CML37* und der Herbivorenabwehr von *A. thaliana* aufzuweisen. Dazu musste zunächst festgestellt werden, ob das Protein überhaupt in die Reaktion der Pflanze auf Herbivoren eingebunden ist. Zu diesem Zweck wurden vergleichende Fraßexperimente zwischen Wildtyp- und *CML37*-Knockout-Pflanzen mit dem Generalisten *S. littoralis* durchgeführt.

Hierfür musste jedoch zunächst die Methodik optimiert werden. Zwar waren aus der Literatur (Reymond *et al.*, 2004, Bodenhausen und Reymond, 2007) bereits Methoden für Fraßexperimente mit *S. littoralis* und *A. thaliana* bekannt, jedoch war eine entsprechende Durchführung nicht möglich. Diese Protokolle sahen es vor, für die Fraßexperimente frisch geschlüpfte Larven zu verwenden. In den hier durchgeführten Versuchen starben die frisch geschlüpften Larven jedoch auf den

Pflanzen. Es musste demzufolge das Alter der Larven zu Beginn des Experiments optimiert werden.

Zunächst wurden die Versuche mit 2 Tage bei 25°C kultivierten Larven durchgeführt. Es wurde angenommen, dass das anfängliche Gewicht aller Larven gleich ist. Nach 7 Tagen wurde das Frischgewicht der Larven bestimmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 4 dargestellt.



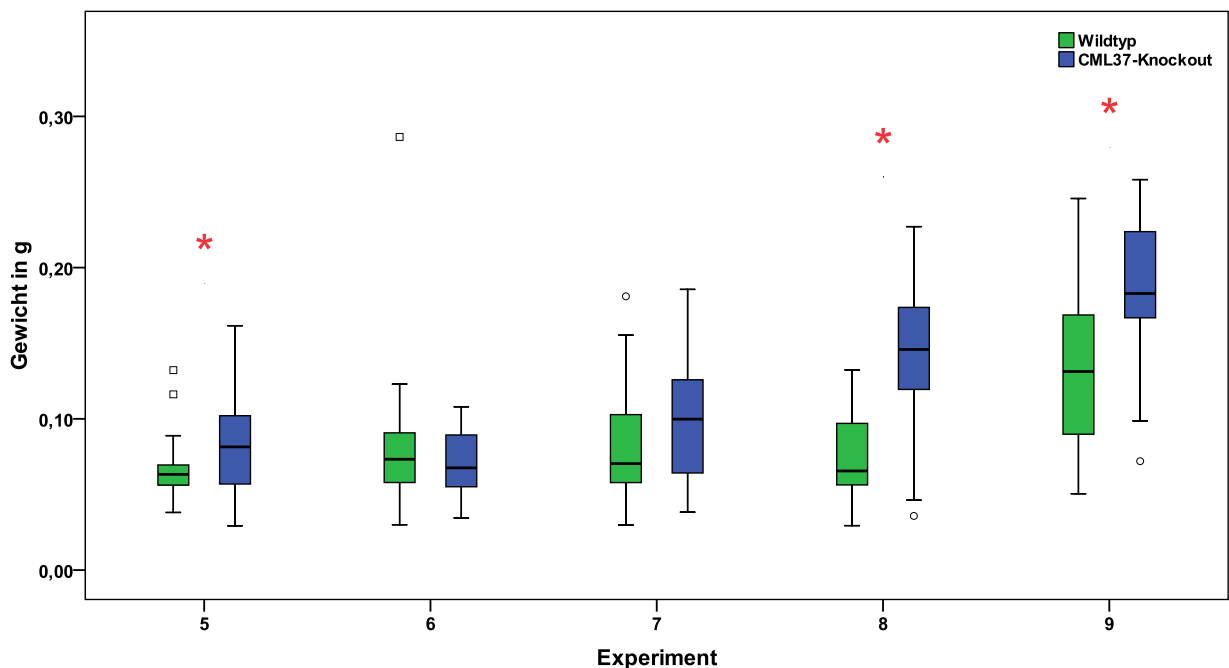
**Abbildung 4: Fraßexperimente mit Larven nach 2 Tagen bei 25°C (frühes erstes Larvalstadium).**

*S. littoralis* Larven wurden auf einer künstlichen Diät angezogen und 2 Tage bei 25°C kultiviert. Anschließend wurden sie auf *A. thaliana* Wildtyp- und *CML37*-Knockout-Pflanzen gesetzt. Nach einer Woche wurden die Larven gewogen. Dargestellt sind die Frischgewichte der Larven. Experimente, welche mit \* gekennzeichnet sind, weisen einen signifikanten Unterschied ( $P < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test) im durchschnittlichen Gewicht der Larven zwischen Wildtyp und Mutante auf.

Insgesamt wurden vier Versuche dieser Art durchgeführt. Im ersten Versuch konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem Frischgewicht der Larven, welche auf dem Wildtyp gefressen hatten und dem der Larven, welche auf der Mutante gefressen hatten, festgestellt werden. Im zweiten und vierten Versuch war das Frischgewicht der Larven auf dem Wildtyp signifikant höher als das der Larven auf der Mutante. Wohingegen im dritten Versuch das Gewicht der Larven auf der Mutante signifikant größer war als das der auf dem Wildtyp. Es wurden dementsprechend alle möglichen Ergebnisse für ein solches Fraßexperiment

erreicht. Da diese Daten widersprüchlich waren, musste das larvale Anfangsalter weiter optimiert werden.

Von nun an wurden Raupen nach einer dreitägigen Kultivierung bei 25°C genutzt. Des Weiteren wurde das anfängliche Gesamtgewicht aller Larven, welche auf einen Genotyp gesetzt wurden, bestimmt, sodass sichergestellt werden konnte, dass das anfängliche Gewicht der Larven bei beiden Genotypen gleich war. Versuche dieser Art wurden fünfmal wiederholt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5 dargestellt.

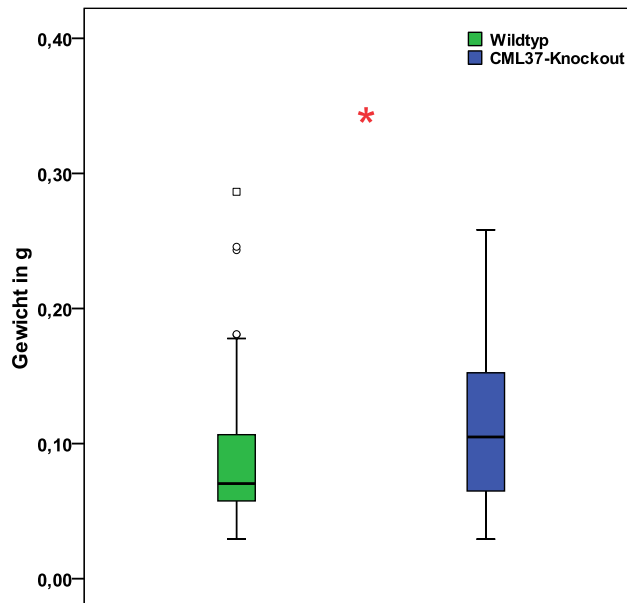


**Abbildung 5: Fraßexperimente mit Larven nach 3 Tagen bei 25°C (spätes erstes Larvalstadium).** *S.littoralis* Larven wurden auf einer künstlichen Diät angezogen. Nach 3 Tagen bei 25°C wurden sie auf *A. thaliana* Wildtyp- und *CML37*-Knockout-Pflanzen gesetzt. Dargestellt sind die Frischgewichte der Larven nach 7 Tagen. Experimente, welche mit \* gekennzeichnet sind, weisen einen signifikanten Unterschied ( $P < 0,05$ , Mann-Whitney-U-Test) im durchschnittlichen Gewicht der Larven zwischen Wildtyp und Mutante auf.

In Experiment 5, 8 und 9 konnte ein signifikanter Unterschied des Frischgewichts der Larven festgestellt werden. In diesen Experimenten war das Gewicht der Larven, welche auf dem Wildtyp gefressen hatten niedriger als das derer, welche auf der Mutante gefressen hatten. In den restlichen Experimenten bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Frischgewicht der Larven des Wildtyps und der Mutante. Allerdings zeichnet sich in Experiment 7 deutlich der Trend zu einem größeren Gewicht der Larven auf der Mutante ab.

Im Vergleich zu den ersten vier Versuchen stehen die Ergebnisse dieser Experimente nicht im Widerspruch zueinander. Das späte erste Larvalstadium ist somit das bessere Alter, um Fraßexperimente durchzuführen.

Aus der Zusammenfassung der Daten der Experimente 5-9 lässt sich ableiten, dass die Larven auf der *CML37*-Knockout-Mutante signifikant schwerer waren als die auf dem Wildtyp (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Einfluss von *CML37* auf das Fraßverhalten von *S. littoralis*.** Dargestellt ist das Frischgewicht der Larven nach einer siebentägigen Fraßperiode auf Wildtyp- bzw. *CML37*-Knockout-Pflanzen. Das Gewicht der Larven auf der Mutante ist signifikant größer als das Gewicht der Larven auf dem Wildtyp. Die Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test berechnet und betrug  $P=0,00004$ .

Der Knockout von *CML37* hat demzufolge einen direkten Einfluss auf das Fraßverhalten der Larven. *S. littoralis* nimmt beim Fressen auf der Mutante mehr zu als beim Fraß auf dem Wildtyp. Ausgehend davon wird vermutet, dass *CML37* in die Abwehrreaktion von *A. thaliana* gegen Herbivoren involviert ist.

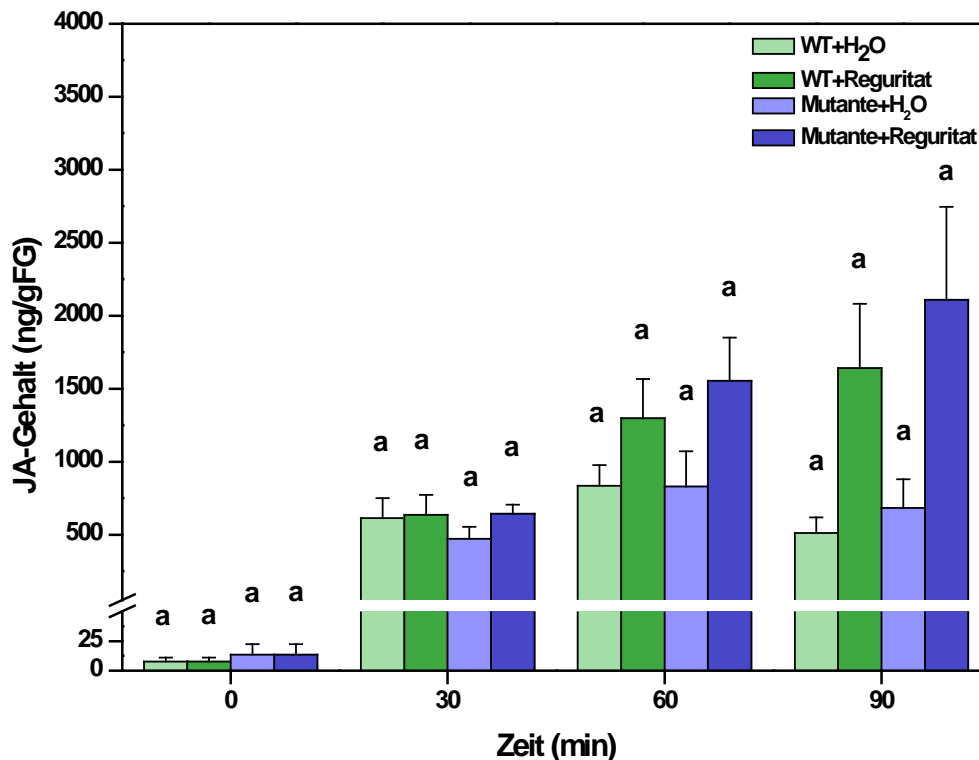


### 3.3. Einfluss von CML37 auf die Produktion abwehrspezifischer Phytohormone

In einem zweiten Schritt sollte nun geprüft werden, inwiefern eine Verbindung zwischen der Herbivorenabwehr und dem CML37 besteht. Dazu wurde zunächst der Effekt des *CML37*-Knockouts auf bereits bekannte Regulationsmechanismen der Herbivorenabwehr getestet.

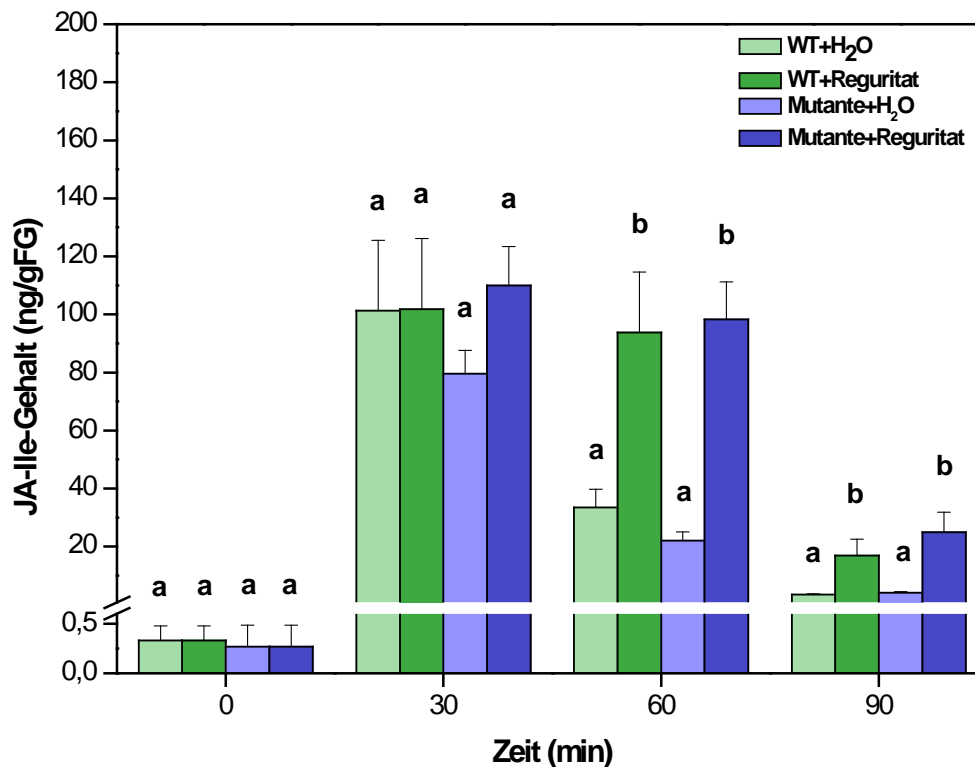
Die Abwehr herbivorer Insekten wird hauptsächlich durch Phytohormone reguliert. Dabei spielen vor allem Jasmonate wie JA, JA-Ile (aktive Form des JA) und OPDA (Vorläufer von JA) als positive Regulatoren eine große Rolle (Howe und Jander, 2008). Die Herbivorenabwehr wird allerdings auch negativ reguliert wie zum Beispiel durch SA, dem Antagonisten von JA (Bostock, 2005, Cui *et al.*, 2002).

Sowohl die positiven als auch die negativen Regulationsmechanismen wurden in den hier durchgeführten Experimenten untersucht. Dazu wurde der Insektenfraß durch Verwundung und Applikation von *S. littoralis* Regurgitat in der *CML37*-Knockout-Mutante und im Wildtyp simuliert. Zur Kontrolle wurden Pflanzen beider Genotypen verwundet und Wasser appliziert. Beide Genotypen wurden anschließend auf den Gehalt der genannten Phytohormone zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 7a-d dargestellt.



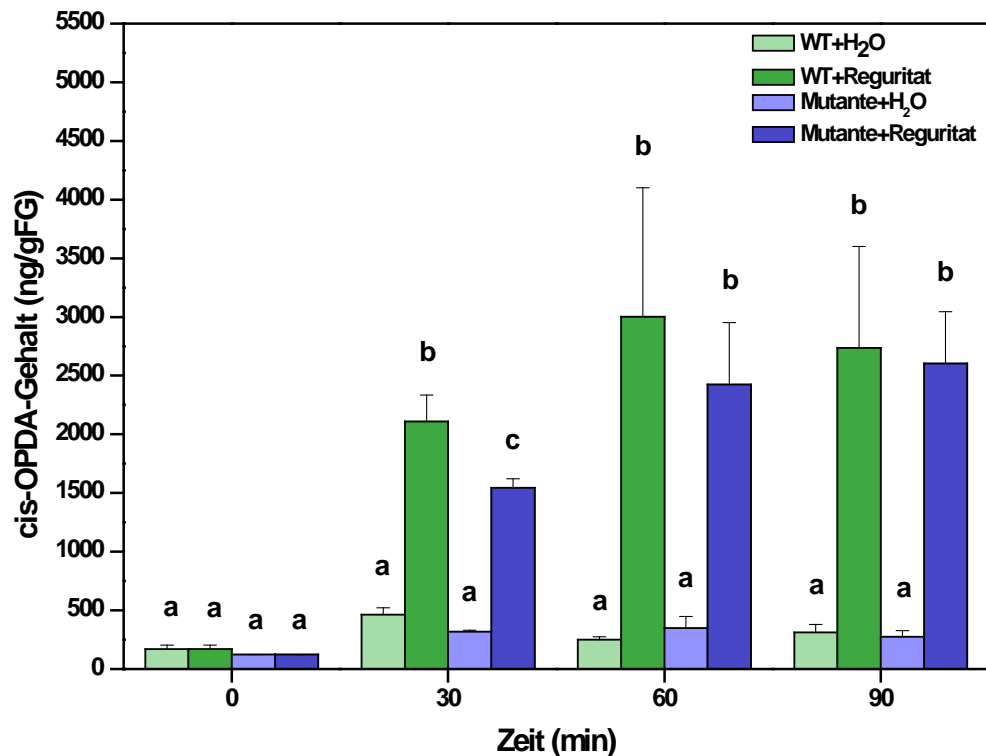
**Abbildung 7a: JA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.** Je zwei *CML37*-Knockout-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen wurden verwundet und mit *S. littoralis* Regurgitat behandelt. Als Kontrolle wurden verwundete Pflanzen beider Genotypen benutzt. Der JA-Gehalt wurde 30, 60 und 90 min nach der Behandlung bestimmt. Der anfängliche JA-Gehalt wurde in unbehandelten Pflanzen bestimmt. Der Versuch wurde zweimal wiederholt. Der statistische Vergleich der einzelnen Kontrollen und Behandlungen erfolgte innerhalb eines Zeitpunktes mittels einfaktorieller ANOVA und dem Student-Newman-Keuls-Test. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (statistische Gruppe a ( $P > 0,05$ )). Statistische Vergleich wurden nur innerhalb eines Zeitpunktes durchgeführt.

Der Knockout von *CML37* hat keinen Einfluss auf den JA-Gehalt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem JA-Gehalt der Mutante und dem Wildtyp festgestellt werden. Auch zwischen den Kontrollen und den Behandlungen der einzelnen Zeitpunkte bestand kein signifikanter Unterschied. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass sich sowohl durch Verwundung als auch durch Simulation von Insektenfraß der JA-Gehalt in allen Pflanzen nach 30 min erhöhte. In den mit Regurgitat behandelten Pflanzen zeichnete sich außerdem der Trend ab, dass der JA-Gehalt in den späteren Zeitpunkten (60 und 90 min) weiter ansteigt. In den verwundeten Kontrollen blieb der JA-Gehalt allerdings ab 30 min konstant.



**Abbildung 7b: Gehalt von JA-Ile nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.** Die Experimente und ihre statistischen Auswertungen erfolgten analog zu Abbildung 7a. Die statistischen Gruppen ergeben sich wie folgt: a – kein signifikanter Unterschied ( $P > 0,05$ ), b – signifikanter Unterschied zu Gruppe a ( $P < 0,05$ ). Die statistischen Gruppen beziehen sich nur auf den Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes.

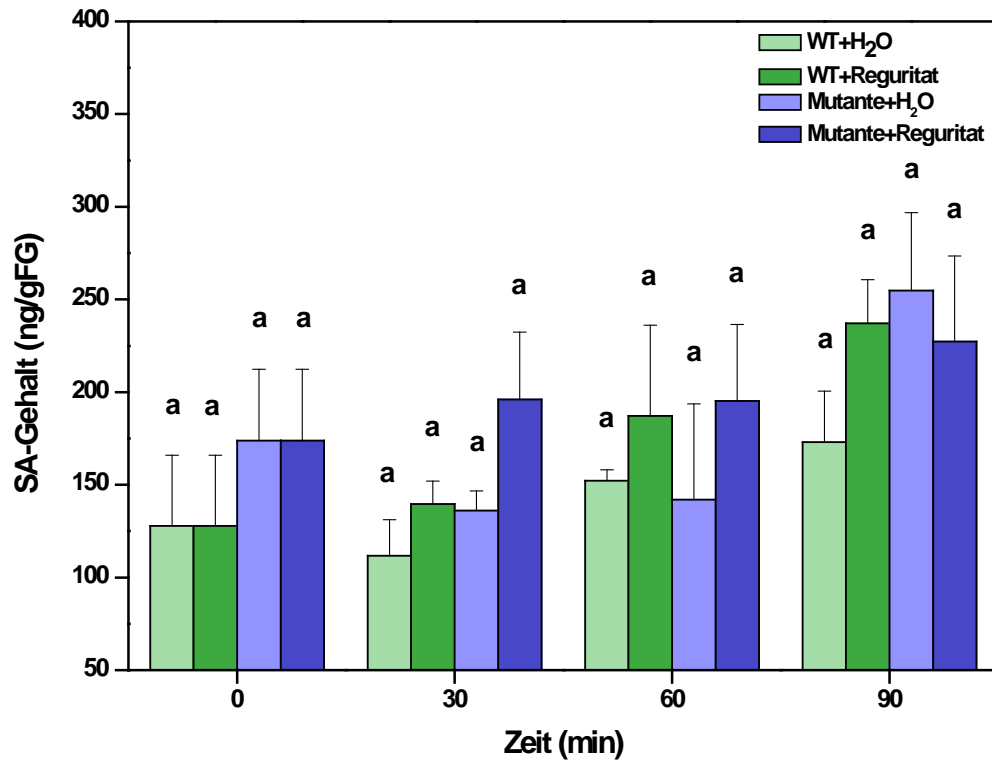
Des Weiteren konnte auch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den JA-Ile-Gehalten des Wildtyps und der Knockout-Mutante festgestellt werden. Die Abwesenheit von CML37 hatte demnach auch keine Auswirkungen auf den JA-Ile-Gehalt. Es wurde jedoch demonstriert, dass der JA-Ile-Gehalt kurz nach den Behandlungen (30 min) drastisch anstieg. Dieser Anstieg erfolgte sowohl bei einfacher Verwundung als auch bei der Simulation des Insektenfraßes im gleichen Maß. In den späteren Zeitpunkten verringerte sich der JA-Ile-Gehalt in allen Proben. Allerdings fand diese Abnahme bei den mit Regurgitat behandelten Pflanzen verzögert zu den Pflanzen, welche lediglich verwundet wurden, statt. Bei letzteren erfolgte die Reduktion des JA-Ile schon nach 60 min, wohingegen sie bei den mit Regurgitat behandelten Pflanzen erst nach 90 min einsetzte.



**Abbildung 7c: cis-OPDA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.** Die Experimente und ihre statistischen Auswertungen erfolgten analog zu Abbildung 7a. Die statistischen Gruppen ergeben sich wie folgt: a – kein signifikanter Unterschied ( $P > 0,05$ ), b – signifikanter Unterschied zu Gruppe a und c ( $P < 0,05$ ), c – signifikanter Unterschied zu Gruppe a und b ( $P < 0,05$ ). Die statistischen Gruppen beziehen sich nur auf den Vergleich innerhalb eines Zeitpunktes.

Im Unterschied zu JA und JA-Ile hatte der Knockout von *CML37* einen Einfluss auf den Gehalt von cis-OPDA. Nach 30 min war der cis-OPDA-Gehalt in der mit Regurgitat behandelten Wildtyp-Pflanze signifikant höher als in der mit Regurgitat behandelten Mutante. Allerdings glich sich dieser Unterschied in den späteren Zeitpunkten (60 und 90 min) aus, sodass Wildtyp und Mutante wieder den gleichen cis-OPDA-Gehalt hatten. Dieser Unterschied war jedoch nur in den mit Regurgitat behandelten Pflanzen sichtbar. Die verwundeten Pflanzen beider Genotypen hatten sowohl nach 30 min als auch nach 60 und 90 min ungefähr den gleichen Gehalt an cis-OPDA. Im Vergleich zum basalen cis-OPDA-Gehalt war jedoch erkennbar, dass der cis-OPDA-Gehalt aller Proben, wenngleich auch im unterschiedlichen Maß, nach 30 min anstieg.

Des Weiteren war der cis-OPDA-Gehalt nach 30, 60 und 90 min in den mit Regurgitat behandelten Pflanzen signifikant höher als in den verwundeten Pflanzen. Die Simulation des Insektenfraßes scheint demzufolge einen größeren Effekt auf den cis-OPDA-Gehalt der Pflanzen zu haben als einfache Verwundung.



**Abbildung 7d: SA-Gehalt nach Verwundung und Simulation von Insektenfraß.** Die Experimente und ihre statistischen Auswertungen erfolgten analog zu Abbildung 7a. Es konnten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (statistische Gruppe a ( $P > 0,05$ )). Statistische Vergleiche wurden nur innerhalb eines Zeitpunktes durchgeführt.

Der SA-Gehalt blieb hingegen über alle Zeitpunkte hinweg in allen Proben konstant. Weder der Knockout des *CML37* noch irgendeine Form der Behandlungen hatten einen Einfluss auf das SA.

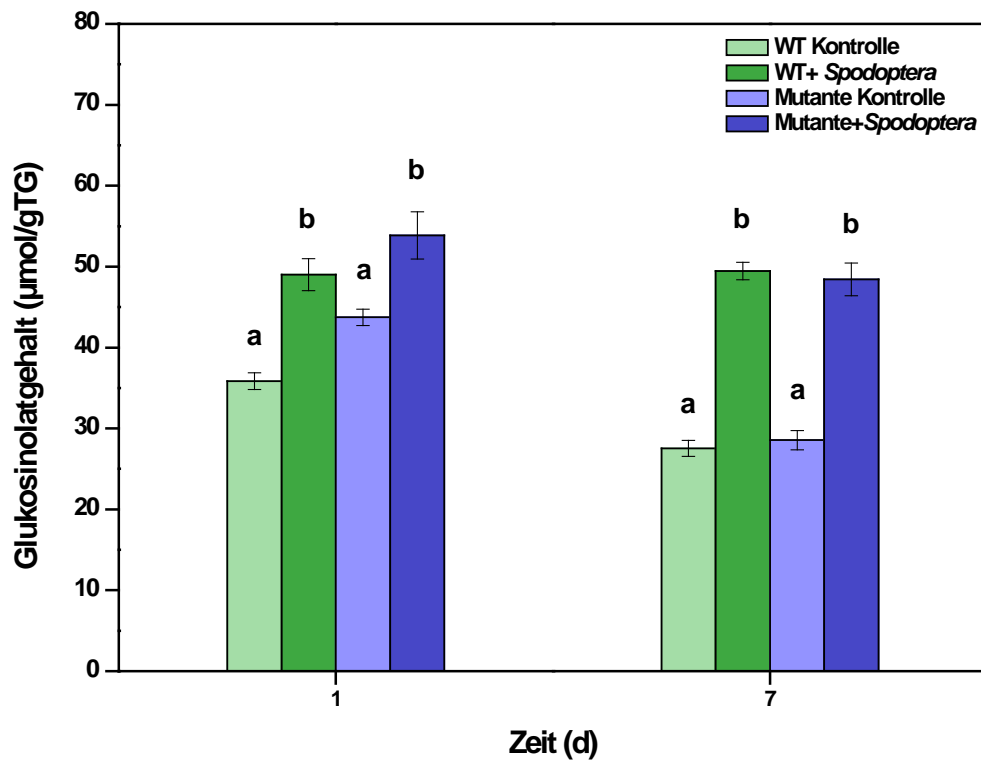
Diesen Ergebnissen folgend bestand keine Verbindung zwischen der Produktion der Phytohormone JA, JA-Ile und SA und dem *CML37*. Jedoch hatte das *CML37* einen Effekt auf die Produktion von cis-OPDA.

### 3.4. Einfluss von CML37 auf den Glukosinolathaushalt

Neben dem Effekt des Knockouts von *CML37* auf die Regulationsmechanismen der Herbivorenabwehr sollte auch untersucht werden, ob das *CML37* einen direkten Einfluss auf Abwehrmechanismen in *A. thaliana* hat.

Der bekannteste Mechanismus zur Abwehr von Generalisten wie *S. littoralis* speziell in *Brassicaceen* ist die Produktion von Glukosinolaten, welche bei Verletzungen der Pflanze durch die Myrosinase in verschiedene auf das Insekt toxisch wirkende Stoffe gespalten werden (Fenwick *et al.*, 1983, Rask *et al.*, 2000). Eine vergleichende Untersuchung des Glukosinolathaushalts in *A. thaliana* *CML37*-Knockout- und Wildtyp-Pflanzen war daher naheliegend.

Zu diesem Zweck wurde der Glukosinolatgehalt in beiden Genotypen nach verschieden langen Fraßexperimenten bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 dargestellt.



**Abbildung 8: Glukosinolatgehalt in *A. thaliana* nach Insektenfraß.** *S. littoralis* Larven wurden für einen Tag bzw. eine Woche auf CML37-Knockout-Mutanten und Wildtyp-Pflanzen gesetzt. Anschließend wurde der Glukosinolatgehalt der Pflanzen bestimmt. Zur Kontrolle wurden unbehandelte Pflanzen benutzt. Die Versuche wurden zweimal mit je 3-5 Replikaten wiederholt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einfaktorieller ANOVA und einem anschließenden Student-Newman-Keuls-Test. Die Vergleiche der Gruppen erfolgte nur innerhalb eines Zeitpunktes. Die statistischen Gruppen erklären sich wie folgt: a – kein signifikanter Unterschied ( $P > 0,05$ ), b – signifikanter Unterschied zu a ( $P < 0,05$ ).

Der Glukosinolatgehalt zwischen Wildtyp und Mutante war bei beiden Zeitpunkten weder konstitutiv noch nach Insektenfraß signifikant unterschiedlich. Der Knockout von *CML37* hatte demnach keinen Einfluss auf den Glukosinolatgehalt. Jedoch konnte für beide Zeitpunkte gezeigt werden, dass der Glukosinolatgehalt durch Herbivorie erhöht wurde. Sowohl nach einem Tag als auch nach einer Woche war der Glukosinolatgehalt in den Pflanzen, welche mit *S. littoralis* befallen waren, höher als in den Kontrollpflanzen.

Eine Verbindung zwischen *CML37* und der Herbivorenabwehr über Glukosinolate konnte demzufolge ausgeschlossen werden.

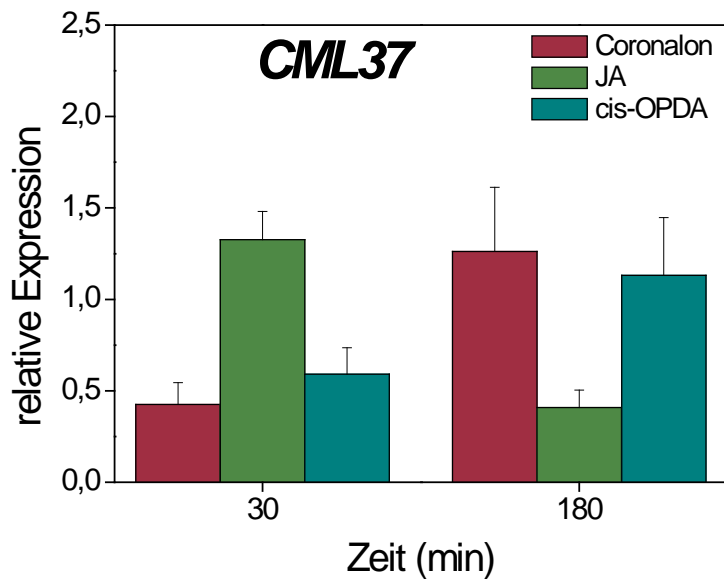
### 3.5. Regulation der Expression von *CML37* durch Phytohormone

Eine weitere wichtige Aufgabe der hier vorliegenden Arbeit war es zu klären, welche Position das *CML37* innerhalb des Signaltransduktionsweges zur Reaktion auf herbivore Insekten einnimmt. Bisher ist wenig über den genauen Ablauf der gesamten Signaltransduktion bekannt. Sicher ist jedoch, dass Phytohormone eine zentrale Stellung in diesem Signalweg einnehmen. Die Frage, die es demnach vor allem zu klären galt, war, in welchem Verhältnis das *CML37* und der Phytohormonsignalweg stehen: Ist das *CML37* diesem vorangestellt oder folgt es erst auf ihn?

Um diese Frage beantworten zu können, wurde die Induzierbarkeit der Genexpression von *CML37* durch verschiedene abwehrspezifische Phytohormone getestet. Aus der Studie von *A. thaliana* Flüssigkulturen war bereits bekannt, dass das *CML37* durch OPDA jedoch nicht durch JA induziert wird (Taki *et al.*, 2005). Die Ergebnisse dieser Studie sollten hier in einem nicht artifiziellen System überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden JA und cis-OPDA auf *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen appliziert und die Genexpression nach 30 und 180 min durch qRT-PCR quantifiziert. Die Auswahl der Zeitpunkte ergab sich aus den von Taki *et al.* bereits durchgeführten Experimenten. Des Weiteren wurde auch die Genregulation durch Coronalon getestet. Coronalon ist ein synthetischer Stoff, welcher eine ähnliche Struktur wie das Phytotoxin Coronatin aufweist (Schüler *et al.*, 2001) und die Wirkung von OPDA, JA und JA-Ile imitiert (Schüler *et al.*, 2004, Radhika *et al.*, 2010). Sowohl JA als auch cis-OPDA und Coronalon wurden in der derselben Konzentration auf die Pflanzen aufgetragen. Die Ergebnisse der qRT-PCRs sind in Abbildung 9 dargestellt.

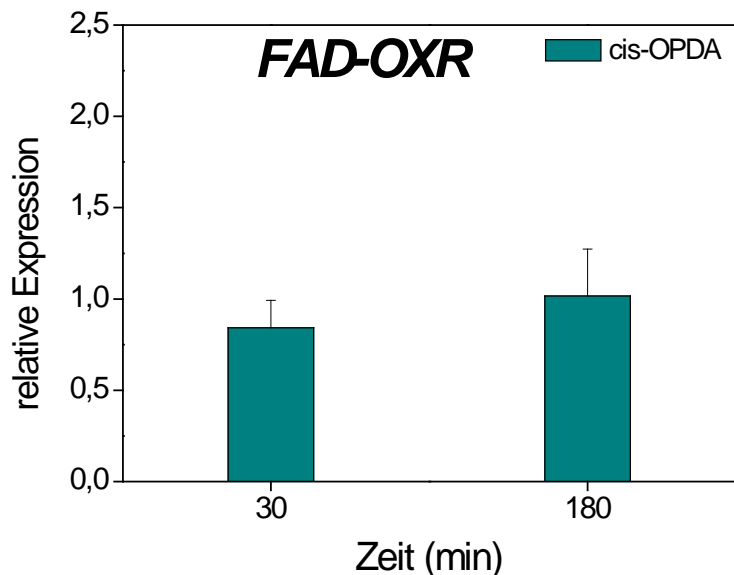
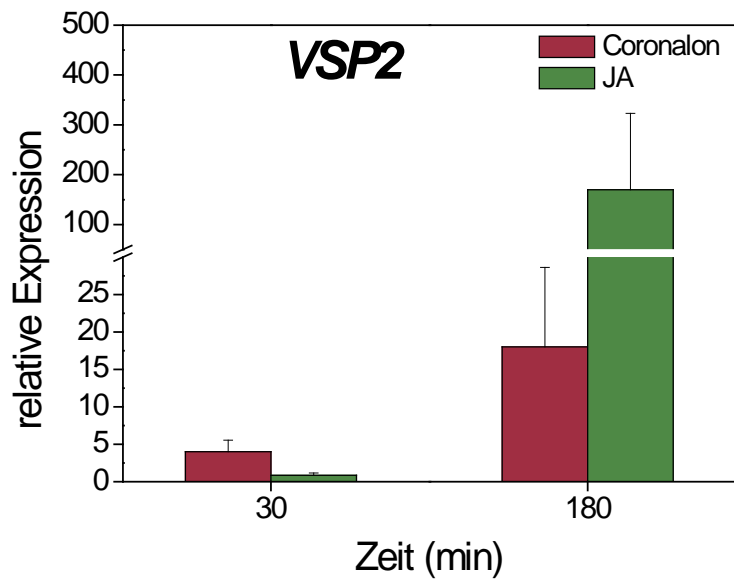




**Abbildung 9: Regulation der Genexpression von CML37 durch verschiedene Phytohormone und Coronalon.** Coronalon, JA und cis-OPDA wurden in einer Konzentration von 50  $\mu$ M auf *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen aufgetragen. Die Expressionsrate von CML37 wurde 30 bzw. 180 min nach der Behandlung durch qRT-PCR bestimmt. Eine relative Expression von 1 bedeutet keine Veränderung in der Genexpression

In allen Proben übersteigt die relative Expression nicht den kritischen Wert von 2. Die Expression von CML37 wurde demnach weder durch cis-OPDA noch durch Coronalon oder JA induziert.

Um auszuschließen, dass die Phytohormone und das Coronalon eventuell nicht von der Pflanze aufgenommen wurden, wurde zusätzlich noch die Expression verschiedener Markergene überprüft. Für JA und Coronalon wurde dafür das durch JA induzierbare *vegetative storage protein 2 (VSP2)* (Berger *et al.*, 2002) benutzt. Für cis-OPDA wurde die *FAD-linked oxireductase (FAD-OXR)* verwendet, welche von Taki *et al.*, 2005, als OPDA-Markergen identifiziert werden konnte. Die Expressionsraten dieser Gene sind in Abbildung 10 dargestellt.



**Abbildung 10: Expression der Markergene in den mit Phytohormonen und Coronalon behandelten Pflanzen.**

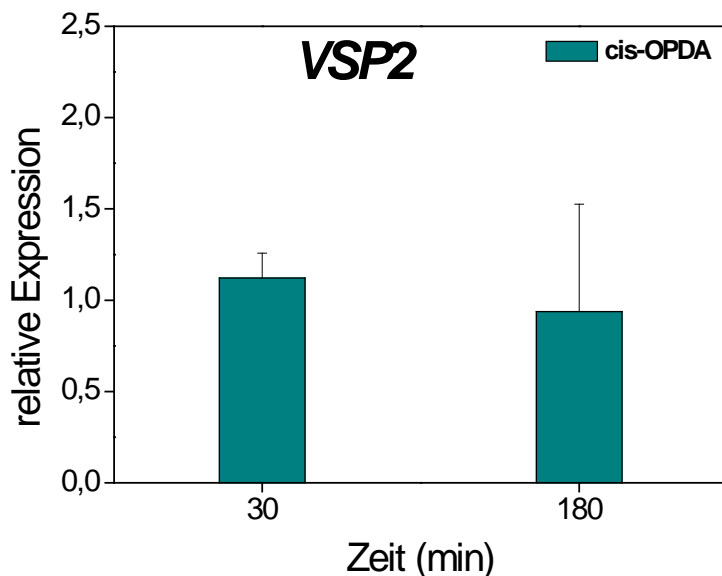
Coronalon, JA und cis-OPDA wurden als 50  $\mu$ M Lösung auf *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen aufgetragen. Die Genexpression der Markergene *VSP2* bzw. *FAD-OXR* wurde mittels qRT-PCR sowohl 30 min als auch 180 min nach der Applikation der Lösungen überprüft. Bei einer relativen Expression von 1 fand keine Veränderung der Genexpression statt.

Das *VSP2* wurde sowohl nach der Applikation von JA als auch nach der Applikation von Coronalon induziert. Bei der Behandlung mit Coronalon vervierfachte sich die relative Expression des *VSP2* schon nach 30 min. Nach 180 min stieg sie um das 18-fache an. Bei der Behandlung mit JA fand die Induktion von *VSP2* verzögert statt. Nach 30 min war noch keine Induktion erkennbar. Nach 180 min war die relative Expression des *VSP2* allerdings um das 170-fache angestiegen. Da das Markergen in beiden Fällen induziert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass sowohl das JA als auch das Coronalon in die Pflanze aufgenommen wurden.

Im Gegensatz dazu wurde die *FAD-OXR* weder 30 min noch 180 min nach der Applikation von cis-OPDA induziert. Die relative Expression dieses Gens blieb

konstant bei 1. Es blieb demnach unklar, ob das OPDA in die Pflanze aufgenommen wurde.

Um auszuschließen, dass das cis-OPDA zwar aufgenommen jedoch sofort in JA umgewandelt wurde, wurde zusätzlich für diese Proben auch die Expression des VSP2 überprüft (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Expression des VSP2 nach Applikation von cis-OPDA.** Eine 50  $\mu$ M cis-OPDA-Lösung wurde auf *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen aufgetragen. Nach 30 und 180 min wurde die Expression des VSP2 mittels qRT-PCR bestimmt. Eine relative Expression von 1 zeigt an, dass keine Veränderung der Genexpression stattgefunden hat.

Jedoch wurde das VSP2 nach Applikation von cis-OPDA nicht induziert. Zu keinem der beiden Zeitpunkte war die relative Expression größer als 2. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass das cis-OPDA nach der Aufnahme in JA umgewandelt wurde.

Auf Grund des lipophilen Charakters der Zellmembran, werden jedoch unpolare Substanzen leichter in Zellen aufgenommen als polare. Da OPDA weniger polar ist als JA und für das JA nachgewiesen werden konnte, dass es die Zellmembranen passiert hat, hätte dies auch bei OPDA der Fall sein müssen.

### 3.6. Die Lokalisation von CML37

Ein weiteres Ziel dieses Projektes war es das CML37 zu lokalisieren. Dieses Ziel ergab sich aus der möglichen Verbindung von Funktion und subzellulärer Verteilung des CML37. So wurde auf Grund eines vorhergesagten N-terminalen Signalpeptids des CML37 vermutet, dass dieses im Chloroplasten lokalisiert ist

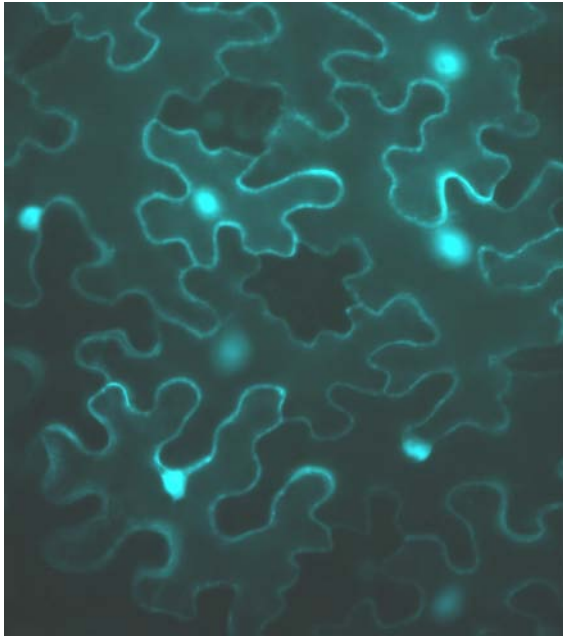
(<http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?id=133086&type=locus>). Zusätzlich wurde publiziert, dass das *CML37* durch OPDA, welches im Chloroplasten synthetisiert wird (Vick und Zimmerman, 1987, Bell *et al.*, 1995, Blee und Joyard, 1996, Laudert *et al.*, 1996, Stenzel *et al.*, 2003), induzierbar ist (Taki *et al.*, 2005). Die Lokalisation des Proteins sollte demnach dazu beitragen, ein besseres Verständnis des Zusammenhangs von *CML37* und dem Phytohormonsignalweg zu entwickeln.

Die Lokalisation des *CML37* erfolgte mittels GFP (*green fluorescent protein*). Dazu wurden zunächst via Gateway<sup>®</sup> Cloning sowohl ein N-terminales als auch ein C-terminales GFP-Konstrukt erstellt. Diese wurden in *Agrobacterium tumefaciens* kloniert, mit dessen Hilfe die Transformation der Pflanzen erfolgte.

Die Lokalisation sollte in stabilen Transformanten in *A. thaliana* erfolgen. Um jedoch die Konstrukte vorab zu testen, erfolgte zunächst eine transiente Transformation in *Nicotiana benthamiana*. Zu diesem Zweck wurden sowohl *Agrobacterium*-Kulturen mit dem C-terminalen Konstrukt als auch mit dem N-terminalen Konstrukt in die Pflanzen infiltriert. Zusätzlich wurde ein p14-Konstrukt als *Silencing*-Suppressor koinfiltriert. Ein bis drei Tage nach der Infiltration wurden die Pflanzen mittels Fluoreszenzmikroskopie auf ein GFP-Signal untersucht.

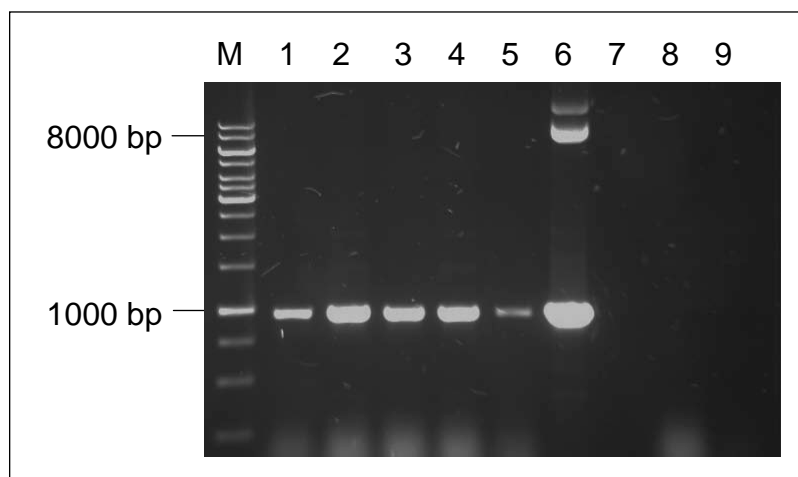
In den mit dem N-terminalen GFP-Konstrukt infiltrierten Pflanzen konnte keine Fluoreszenz detektiert werden.

Bei mit dem C-terminalen GFP-Konstrukt infiltrierten Pflanzen konnte sowohl ein Signal im Nukleus als auch in der Zellmembran der epidermalen Zellen detektiert werden (siehe Abbildung 12).



**Abbildung 12: *Nicotiana benthamiana* nach Infiltration des C-terminalen *CML37-GFP*-Konstrukt.** Abgebildet ist die untere Epidermis von *Nicotiana benthamiana* nach Koinfiltration eines C-terminalen *CML37-GFP*-Konstruktes und dem *Silencing*-Supressor p14. Die Aufnahme erfolgte 2 Tage nach der Infiltration. Es wurde eine 200-fache Vergrößerung benutzt.

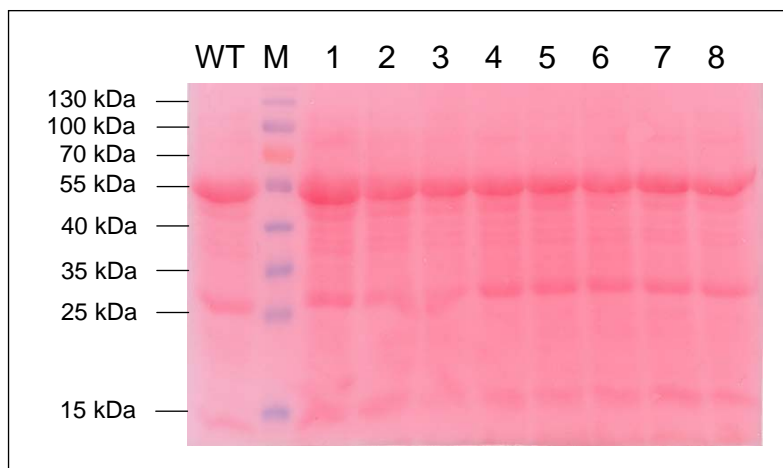
Nachdem die Wirksamkeit für das C-terminale GFP-Konstrukt gezeigt werden konnte, wurden damit die *A. thaliana* Pflanzen transformiert. Die Transformation erfolgte mittels *Floral-Dip*-Methode. Positive Transformanten der F1-Generation wurden mittels PCR auf die Integration des *CML37-GFP*-Konstruktes überprüft. Für alle getesteten Pflanzen konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt in das Genom integriert wurde (eine Auswahl der Ergebnisse ist in Abbildung 13 dargestellt).



**Abbildung 13: Analyse der genomischen DNA der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen.** Dargestellt ist die Agarose-Gelelektrophorese der PCR. Es wurde ein Teil des Promotors und des *CML37* amplifiziert. Das zu erwartende PCR-Produkt war ca. 1000 bp lang. M: Größenstandard GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, 1-5: transgene *Arabidopsis* Pflanzen, 6: Positivkontrolle (Expressionsvektor), 7: steriles Wasser, 8-9: Negativkontrolle (genomische DNA des Wildtyps)

Anschließend wurde die Proteinexpression der transgenen Pflanzen mittels Western-Blot überprüft. In keinem Fall konnte GFP detektiert werden.

Da keine Positivkontrolle vorhanden war, wurde mittels Ponceau-S-Färbungen überprüft, ob die Proteinextraktion und der Blot fehlerfrei abgelaufen waren. Auf allen PDVF-Membranen konnten Proteine detektiert werden (eine ausgewählte Färbung ist in Abbildung 14 dargestellt). Somit waren sowohl die Proteinextraktion als auch der Blot selbst erfolgreich.



**Abbildung 14: Ponceau S Färbung einer PDVF-Membran des Western-Blots.**

M: Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder, WT: Negativkontrolle (Proteinextrakt des Wildtyps), 1-8: Proteinextrakte der transgenen *Arabidopsis* Pflanzen

Um mögliche Probleme mit den primären bzw. sekundären Antikörpern auszuschließen, wurden die PDVF-Membranen mehrfach mit verschiedenen Antikörpern behandelt. Bei keiner Behandlung wurde jedoch GFP auf einer der Membranen detektiert.

Die Ergebnisse des Western-Blots wurden zusätzlich durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der Pflanzen verifiziert. In keiner der Pflanzen, war ein GFP-Signal erkennbar.

Demzufolge wurde zwar das *CML37-GFP*-Konstrukt in das Genom der Pflanze integriert, jedoch nicht exprimiert. Somit war auch keine Lokalisation von CML37 in *A. thaliana* möglich.

## 4 Diskussion

Pflanzen verfügen über die Fähigkeit Angriffe herbivorer Insekten wahrzunehmen und auf diese zu reagieren. Bisher ist jedoch wenig über den Signaltransduktionprozess in den Pflanzen, der zu dieser Reaktion führt, bekannt. Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den frühen Ereignissen dieses Signalweges.

Vor allem Calcium spielt in der frühen Signaltransduktion eine große Rolle. In *Phaseolus lunatus* konnte gezeigt werden, dass das intrazelluläre Calciumlevel nach Behandlung mit *S. littoralis* Regurgitat drastisch ansteigt (Maffei *et al.*, 2004). Ähnliches ist auch in *A. thaliana* bekannt. So steigt das cytosolische Calciumlevel in *A. thaliana* binnen weniger Sekunden nach Verwundung und anschließender Applikation des Speichel von *Schistocerca gregaria* (Schäfer *et al.*, 2011) bzw. *S. littoralis* (Vadassery, nicht publiziert) an. Es ist jedoch bisher unklar, wie diese Calciumsignale in die spezifische Reaktion auf den Herbivoren umgesetzt werden. Die Identifikation spezieller Calciumsensoren ist deshalb notwendig.

Ein möglicher Calciumsensor in diesem Zusammenhang könnte das Calmodulin-ähnliche Protein 37 (CML37) sein. Bereits aus anderen Kontexten war bekannt, dass das CML37 eine wichtige Rolle in der Reaktion von *A. thaliana* auf verschiedene Stresssituationen spielt. So konnte gezeigt werden, dass das CML37 sowohl durch Verwundung als auch Trockenstress, Salzstress, Pathogenbefall und verschiedene chemische Stimuli induziert werden kann (McCormack *et al.*, 2005, Taki *et al.*, 2005, Vanderbeld und Snedden, 2007). Doch auch im Kontext der Herbivorie schien es von Bedeutung zu sein. Microarrayanalysen und qRT-PCRs zeigten, dass das CML37 durch den Fraß und das Regurgitat von *S. littoralis* induziert werden kann (Vadassery, nicht publiziert). Bisher war jedoch nichts über die Funktion des CML37 in der Herbivorenabwehr bekannt. In dieser Arbeit sollte geklärt werden, welche Rolle das CML37 in der Abwehr herbivorer Insekten übernimmt.

### 4.1. CML37 als Calciumsensor der Herbivorenabwehr

Bislang konnte in *A. thaliana* kein Calciumsensor identifiziert werden, welcher einen direkten Einfluss auf die Abwehrreaktion herbivorer Insekten hat. Zwar versuchten

Kanchiswamy *et al.*, 2010, zu zeigen, dass die Calcium-abhängigen Proteinkinasen (CPK) 3 und 13 eine wichtige Rolle in der Abwehr der Pflanzen übernehmen, jedoch hatte der Knockout beider Gene keinen Effekt auf das Fraßverhalten des Herbivoren *S. littoralis*. CPK3 und CPK13 hatten demnach keinen direkten Effekt auf die Herbivorenabwehr.

Auch für das CML37 sollte überprüft werden, ob es die Abwehrreaktion der Pflanzen direkt beeinflusst. Deshalb wurden die Auswirkungen des CML37-Knockouts auf das Fraßverhalten des Generalisten *S. littoralis* mittels vergleichender Fraßexperimente untersucht.

Dafür musste jedoch zuvor die Methodik der Fraßexperimente optimiert werden. Es wurde vermutet, dass vor allem das larvale Alter der limitierende Faktor für das Gelingen der Fraßexperimente war. Lediglich bei der Verwendung von Larven im späten ersten Larvalstadium, konnte ein einheitliches Ergebnis erreicht werden. Jüngere Larven starben entweder auf den Pflanzen oder verhielten sich sehr unterschiedlich in den einzelnen Experimenten, sodass diese insgesamt nicht auswertbar waren. Jedoch sind diese Phänomene nicht mit dem larvalen Alter allein erklärbar, da bereits gezeigt werden konnte, dass Fraßexperimente auch mit jüngeren Larven erfolgreich sind (Bodenhausen und Reymond, 2007, Reymond *et al.*, 2004).

Als ein weiterer wichtiger Faktor konnte außerdem das larvale Ausgangsgewicht identifiziert werden. In der ersten Versuchsreihe wurde angenommen, dass das Ausgangsgewicht aller Larven gleich ist, da es auf Grund der geringen Größe der Larven unmöglich ist, diese zuvor einzeln abzuwiegen. Es wurde lediglich optisch bestimmt, ob die Larven ungefähr die gleiche Größe hatten. Diese Methode ist jedoch sehr ungenau, was auch die widersprüchlichen Ergebnisse der ersten Fraßexperimente erklärt. In der zweiten Versuchsreihe wurde hingegen das Gesamtgewicht aller Larven, welche auf einen Genotyp gesetzt wurden, vor dem Versuch bestimmt, sodass sichergestellt wurde, dass keine Unterschiede zwischen den Larven des Wildtyps und der Mutante bestanden. Zwar zeigten auch die Ergebnisse dieser Experimente Schwankungen, jedoch entstand daraus kein Widerspruch. Die Ergebnisse der zweiten Versuchsreihe konnten somit zur Auswertung genutzt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass der Knockout von CML37 einen Einfluss auf das Fraßverhalten von *S. littoralis* hat. *S. littoralis* Larven nehmen auf der Knockout-



Mutante mehr an Gewicht zu als auf dem Wildtyp. Die Abwehr der *CML37*-Knockoutpflanzen muss demnach gegenüber der Abwehr des Wildtyps reduziert und *CML37* sollte demzufolge direkt in die Herbivorenabwehr eingebunden sein. Damit konnte erstmals ein Calciumsensor in *A. thaliana* identifiziert werden, welcher mit hoher Wahrscheinlichkeit einen direkten Einfluss auf die Abwehr herbivorer Insekten hat.

#### **4.2. CML37 reguliert die Produktion von OPDA**

Jasmonate sind wichtige Regulatoren der Abwehr herbivorer Insekten (Howe und Jander, 2008). Die Jasmonate JA und JA-Ile und ihr Vorläufer OPDA wurden in der hier vorliegenden Arbeit untersucht.

Sowohl für das JA als auch für das JA-Ile konnte gezeigt werden, dass der Knockout des *CML37* keinerlei Auswirkungen hat. Zwar wurden beide sowohl durch mechanische Verwundung als auch durch die Behandlung mit *S. littoralis* Regurgitat innerhalb kürzester Zeit induziert, jedoch sowohl im Wildtyp als auch in der Mutante im selben Maß. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Knockout des *CML37* einen Einfluss auf die Produktion von OPDA, dem Vorläufer von JA, hat. Nach 30 min ist der OPDA-Gehalt in mit Regurgitat behandelten Mutanten geringer als im Wildtyp. Das *CML37* beeinflusst demnach die Produktion von OPDA, jedoch nicht die von JA oder JA-Ile.

Dieses Ergebnis ist jedoch nicht ungewöhnlich. Bereits in vielen Kontexten konnte gezeigt werden, dass das OPDA unabhängig von anderen Jasmonaten, welche aus ihm hervorgehen, eine Rolle in der Regulation der Reaktion auf herbivore Insekten spielt. So zeigten Stintzi *et al.*, 2001, dass *opr3*-Mutanten, welche nicht mehr fähig sind OPDA in JA umzuwandeln, dennoch resistent gegen den Herbivoren *Bradysia impatiens* waren. Des Weiteren ist bekannt, dass das OPDA neben Genen, welche durch JA reguliert werden, auch eine Menge Gene reguliert, welche unabhängig vom JA-Signalweg sind (Stintzi *et al.*, 2001, Taki *et al.*, 2005). Außerdem hat OPDA einen direkt negativen Effekt auf die Entwicklung von herbivoren Insekten (Dabrowska *et al.*, 2009). Es ist demnach durchaus möglich, dass der *CML37*-Knockout lediglich den Gehalt an OPDA beeinflusst, wohingegen Jasmonate nicht beeinflusst werden.

Des Weiteren unterstützen die hier dargestellten Ergebnisse die Hypothese von Schäfer *et al.*, 2011, dass die Abwehr herbivorer Insekten in *A. thaliana*

hauptsächlich über OPDA reguliert wird. Die Abwehr der *CML37*-Knockout-Mutante ist gegenüber der des Wildtyps reduziert. Gleichzeitig kann gezeigt werden, dass der OPDA-Gehalt nach Insektenfraß in der Mutante geringer ist als im Wildtyp, wohingegen Jasmonate nicht vom Knockout beeinflusst werden. OPDA könnte somit tatsächlich eine zentrale Funktion in der Signaltransduktion der Herbivorenabwehr von *A. thaliana* übernehmen. Das würde jedoch auch bedeuten, dass das *CML37* eine bedeutende Stellung einnimmt, indem es die OPDA-Produktion reguliert.

An dieser Stelle ist jedoch anzumerken, dass die Regulation des OPDA-Gehalts lediglich in einem Zeitpunkt und auch nur bei Behandlung mit Regurgitat festgestellt werden konnte. Des Weiteren wurden Versuche dieser Art nur zweimal durchgeführt. Um die hier dargestellten Ergebnisse zu sichern, müssten die Versuche nochmals wiederholt und andere Zeitpunkte eingeschlossen werden.

Neben den Jasmonaten wurde außerdem der Einfluss des *CML37* auf Salicylsäure getestet. SA ist durch seinen antagonistischen Charakter zu JA vor allem als negativer Regulator der Herbivorenabwehr bekannt (Bostock, 2005, Cui *et al.*, 2002). Jedoch zeigten bereits De Vos *et al.*, 2005, am Beispiel des Spezialisten *Pieris rapae*, dass der Fraß durch Insekten mit kauend-beißenden Mundwerkzeugen keine Auswirkungen auf den SA-Gehalt von *A. thaliana* hat. Ähnliches konnte auch in den hier durchgeführten Experimenten gezeigt werden. Der SA-Gehalt der Pflanzen blieb sowohl nach mechanischer Verwundung als auch nach der Behandlung mit dem Regurgitat von *S. littoralis* konstant auf konstitutivem Niveau. Dementsprechend wurden auch keine Unterschiede zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt. SA scheint also auch im Fall vom Generalisten *S. littoralis* kein wichtiges Signal in der Herbivorenabwehr von *A. thaliana* zu sein.

#### **4.3. *CML37* reguliert nicht die Glukosinolatproduktion**

Schlaeppi *et al.*, 2008, zeigten, dass in *A. thaliana* sowohl aliphatische als auch Indol-Glukosinolate eine entscheidende Rolle in der Abwehr des Generalisten *S. littoralis* übernehmen. Larven, welche auf Mutanten fraßen, deren Glukosinolatproduktion reduziert war, waren fast doppelt so schwer wie Larven, welche auf dem Wildtyp fraßen. Ähnliches konnten Müller *et al.*, 2010, für andere generalistische Lepidoptera-Arten zeigen

Des Weiteren ist schon lange bekannt, dass Glukosinolate über ihr konstitutives Level hinaus durch Insektenfraß induzierbar sind (Birch *et al.*, 1990, Koritsas *et al.*, 1989, Lammerink *et al.*, 1984). Allerdings ist wenig über die Regulation der Glukosinolatproduktion in der Reaktion auf Herbivoren bekannt. Levy *et al.*, 2005, zeigten jedoch, dass die Glukosinolatproduktion durch das Calmodulin-bindende Protein IQD1 gesteuert wird und deckten somit die Verbindung zwischen Calcium-Signalen und Regulationsmechanismen der Glukosinolatproduktion auf. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob auch das CML37 als Calciumsensor in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt.

Dazu wurden die Auswirkungen des CML37-Knockout auf den Glukosinolathaushalt untersucht. Allerdings konnte weder vor noch nach dem Insektenfraß Unterschiede im Glukosinolatgehalt zwischen Mutante und Wildtyp festgestellt werden. Die Produktion von Glukosinolaten blieb vom Knockout des *CML37* unbeeinflusst. Eine Verbindung zwischen dem CML37 und der Regulation der Glukosinolatproduktion wird deshalb ausgeschlossen.

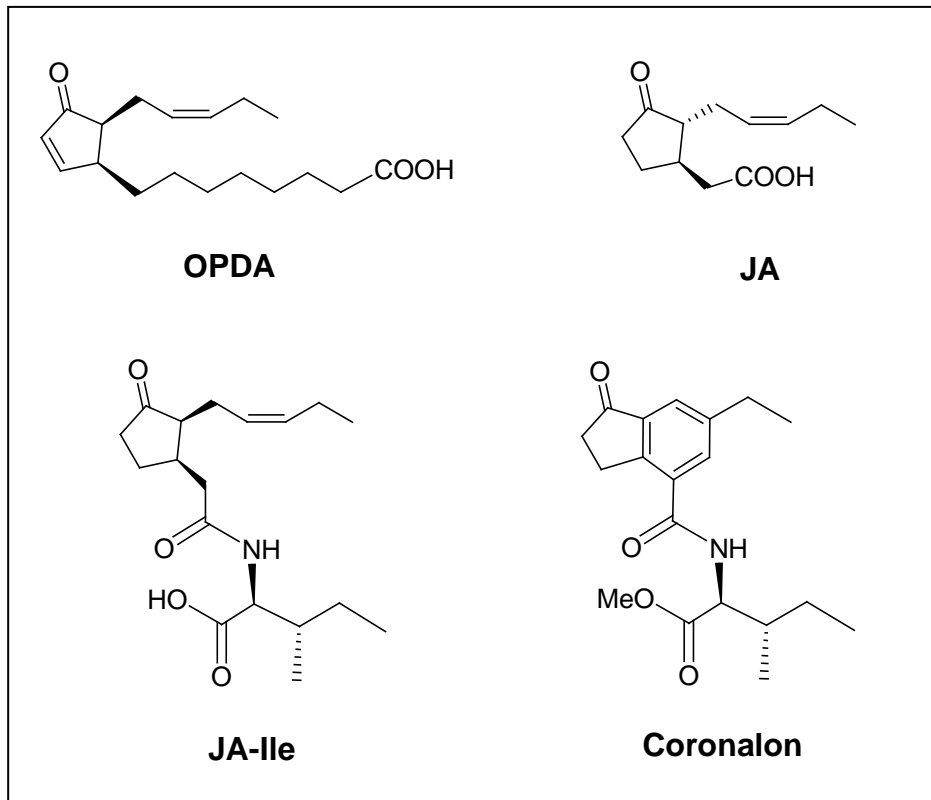
Die Unterschiede in der Gewichtszunahme der Larven zwischen Wildtyp und *CML37*-Knockout-Mutante lassen sich dementsprechend nicht auf einen unterschiedlichen Glukosinolatgehalt beider Genotypen zurückführen. Es konnte demnach nicht aufgeklärt werden durch welchen Effekt das unterschiedliche Fraßverhalten zu Stande kommt. Deshalb ist zukünftig eine Untersuchung des Einflusses des CML37-Knockouts auf andere Abwehrmechanismen notwendig.

#### **4.4. Coronalon, JA beeinflussen nicht die Expression von *CML37***

Die Ergebnisse von Taki *et al.*, 2005, ließen vermuten, dass die Expression des *CML37* durch OPDA jedoch nicht durch Jasmonate reguliert wird. In ihrer Microarray-Analyse wurde *CML37* sowohl nach 30 min als auch nach 180 min durch OPDA hochreguliert, nicht jedoch durch JA. Allerdings wurden diese Versuche in einem artifiziellen Flüssigkultur-System durchgeführt, weshalb sie in dieser Arbeit im natürlichen System überprüft werden sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des *CML37* weder durch OPDA noch durch JA und Coronalon induziert wird. Für das JA konnten demzufolge die Daten von Taki *et al.*, 2005, bestätigt werden. Auch dass das Coronalon keinerlei Auswirkungen auf die Genregulation hat, ist nicht ungewöhnlich. Coronalon ist rein

strukturell betrachtet vor allem Imitat von JA-Ile, der aktiven Form des JA (siehe Abbildung 15). Es war demnach zu erwarten, dass das Coronalon einen ähnlichen Effekt wie das JA haben muss, was die hier vorliegenden Daten auch bestätigen.



**Abbildung 15: Strukturformeln von abwehrspezifischen Phytohormonen und Coronalon.** Dargestellt sind die Strukturformeln von cis-OPDA, JA, JA-Ile und ihrem Imitat Coronalon.

Interessant ist allerdings, dass das OPDA keinerlei Auswirkungen auf die Expression des *CML37* hatte, was den Ergebnissen von Taki *et al.*, 2005, widerspricht.

Dies könnte zunächst auf die experimentellen Unterschiede beider Versuchsreihen zurückgeführt werden. So wurden in den hier durchgeführten Versuchen die Phytohormone nur anfangs appliziert, wohingegen sie bei Taki *et al.*, 2005, direkt ins Medium gegeben wurden, sodass sie den Pflanzen kontinuierlich zur Aufnahme zur Verfügung standen. Es könnte demnach sein, dass eine einmalige Applikation eventuell einfach nicht ausreichend war, um eine entsprechende Induktion der Genexpression hervorzurufen. Jedoch konnte zumindest für das JA und das Coronalon gezeigt werden, dass sie in die Pflanzen aufgenommen wurden. Anscheinend ist eine einmalige Applikation der Phytohormone ausreichend.

Auch andere Fehlerquellen konnten anhand der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Eine naheliegende Erklärung wäre auch, dass eventuell zu geringe Konzentration an Phytohormonen verwendet wurden. Jedoch zeigten die Ergebnisse des JA und des Coronalon, dass die Konzentration ausreichend gewesen sein muss. Außerdem wurden hier sogar höher konzentrierte Phytohormonlösungen benutzt als bei Taki *et al.*, 2005. Ein Problem innerhalb der Durchführung des Experiments kann demnach ausgeschlossen werden.

Dennoch ist das Ergebnis für die Applikation des OPDA fragwürdig. Es existiert kein Nachweis, dass das OPDA tatsächlich in die Pflanze aufgenommen wurde. Zwar müsste es auf Grund seiner chemischen Struktur in die Zellen aufgenommen worden sein, jedoch wurde das OPDA-Markergen *FAD-OXR* nicht induziert. Allerdings ist ein Problem mit dem Markergen selbst nicht auszuschließen. Schließlich wurde es auch in der Studie von Taki *et al.*, 2005, als OPDA-reguliertes Gen identifiziert. Die OPDA-Proben sollten deshalb noch einmal mit anderen, von Taki *et al.* unabhängigen Markergenen wie z.B. dem *OPR1* oder dem *GST1* (Schäfer *et al.*, 2011, Stintzi *et al.*, 2001) getestet werden.

Jedoch bestehen auch noch weitere Hinweise darauf, dass das OPDA wahrscheinlich nicht aufgenommen wurde. So zeigten Taki *et al.*, 2005, dass exogen appliziertes OPDA in den Pflanzen in JA umgewandelt wird. Allerdings war auch das in den hier durchgeführten Versuchen nicht der Fall. Zu keinem Zeitpunkt wurde das JA-Markergen durch das applizierte OPDA induziert. Zwar könnte dies mit den experimentellen Unterschieden begründet werden (es könnte z.B. die Menge an aufgenommenen OPDA unterschiedlich sein und somit auch der Effekt), jedoch fehlt auch dazu der Nachweis. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse bleibt somit ungeklärt.

Da somit nicht abschließend geklärt werden kann, ob das OPDA in die Pflanzen aufgenommen wurde oder nicht, kann auch nicht geschlossen werden, ob OPDA die Expression von *CML37* reguliert oder nicht. Demzufolge bleibt jedoch die Stellung des *CML37* in der Signaltransduktion weiterhin unbekannt. Eine Wiederholung der hier durchgeführten Experimente ist daher notwendig.

#### 4.5. CML37 ist in der Zellmembran und im Zellkern lokalisiert

Im Gegensatz zu den Experimenten mit *N. benthamiana* war es nicht möglich das CML37 in *A. thaliana* zu lokalisieren. Zwar wurde das *CML37-GFP*-Konstrukt in das Genom der Pflanze integriert, jedoch wurde es nicht exprimiert. Es ist demnach davon auszugehen, dass das Konstrukt durch *Silencing*-Prozesse in der Pflanze inaktiviert wurde.

Gen-*Silencing* von transgenen Pflanzen ist ein seit langem bekanntes Problem. Vor allem Konstrukte, welche durch den 35S-Promotor des *Cauliflower Mosaic Virus* reguliert werden, werden häufig inaktiviert (Elmayan und Vaucheret, 1996). Auch das hier verwendete Konstrukt war mit einem solchen 35S-Promotor versehen.

Allerdings konnte das CML37 in *Nicotiana benthamiana* sehr wohl lokalisiert werden, zum einen in der Zellmembran, zum anderen im Zellkern. Jedoch konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es ebenfalls im Chloroplasten lokalisiert ist, da epidermale Zellen bis auf die Stomata keine Chloroplasten enthalten. Jedoch konnte in den Stomata in den hier durchgeführten Versuchen kein GFP-Signal detektiert werden. Es ist demnach nicht auszuschließen, dass das CML37 zusätzlich auch im Chloroplasten lokalisiert sein könnte.

Um die Lokalisation des CML37 abzuschließen, müssten demnach weitere Lokalisationsstudien durchgeführt werden. Diese könnten sowohl in *Nicotiana benthamiana* als auch in *A. thaliana* erfolgen. Für eine Lokalisation in *A. thaliana* müsste allerdings das *CML37-GFP*-Konstrukt derart modifiziert werden, dass es nicht mehr durch *Silencing* inaktiviert wird. Eine mögliche Modifikation wäre zum Beispiel die Verwendung eines weniger starken Promotors. Des Weiteren sollten zur Überprüfung der bisherigen Lokalisation Gegenfärbungen des Kerns und der Membran mit dem GFP-Signal des Konstruktes durch konfokale Mikroskopie überlagert werden. Somit könnte exakt überprüft werden, ob das GFP-Signal tatsächlich nur vom Zellkern und der Membran ausgeht und nicht von angrenzenden Zellkompartimenten.

## 5 Fazit

Die hier vorliegende Arbeit leistet einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung der Signaltransduktionprozesse der Abwehr herbivorer Insekten in *A. thaliana*. Mit dem Calmodulin-ähnlichen Protein CML37 konnte erstmals ein Calciumsensor, welcher direkt in die Herbivorenabwehr von *A. thaliana* eingebunden ist, identifiziert werden. Es wird ausgehend von den Ergebnissen dieser Arbeit vermutet, dass CML37 abwehrspezifische Phytohormone reguliert. Um diese Hypothese zu bestätigen, bedarf es jedoch noch weiterführender Experimente, wie in der Diskussion bereits angedeutet wurde. Es konnte im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht geklärt werden, in welchem Verhältnis das CML37 zum Phytohormonsignalweg steht, was ebenfalls in zukünftigen Projekten weiter untersucht werden sollte.

Des Weiteren konnte bisher noch keine Verbindung zu spezifischen Abwehrreaktionen in *A. thaliana* hergestellt werden. Zukünftige Projekte sollten untersuchen, inwieweit das CML37 in andere direkte Abwehrmechanismen eingebunden ist. In Feldversuchen könnte außerdem die Auswirkung des CML37 auf indirekte Mechanismen der Herbivorenabwehr getestet werden.

Zum besseren Verständnis der Funktion des CML37 könnte außerdem die vollständige Lokalisation beitragen. Die wesentliche Vorarbeit dazu, wurde in der hier vorliegenden Arbeit geleistet. Allerdings müsste diese noch durch abschließende Beweise bestätigt werden.

Neben der weiteren Aufklärung der Funktion des CML37, sollte in der Zukunft außerdem der Signalweg der Abwehrreaktion weiter aufgeklärt werden. Da das CML37 selbst keine andere Funktion neben der Bindung von Calcium besitzt (McCormack und Braam, 2003), wird vermutet, dass es an andere Proteine binden muss, um zu wirken. Die Identifizierung und Charakterisierung solcher Proteine wird dazu beitragen, weitere Schritte der Signaltransduktion aufzudecken.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alborn, H. T., T. C. J. Turlings, T. H. Jones, G. Stenhagen, J. H. Loughrin, J. H. Tumlinson (1997). "An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion." Science **276**, 945-949.
- Arimura, G., R. Ozawa, T. Shimoda, T. Nishioka, W. Boland, J. Takabayashi (2000). "Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves." Nature **406**, 512-515.
- Bell, E., R. A. Creelman, J. E. Mullet (1995). "A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **92**, 8675-8679.
- Berger, S., T. Mitchell-Olds, H. U. Stotz (2002). "Local and differential control of vegetative storage protein expression in response to herbivore damage in *Arabidopsis thaliana*." Physiologia Plantarum **114**, 85-91.
- Bernard, P., M. Couturier (1992). "Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes." Journal of Molecular Biology **226**, 735-745.
- Birch, A. N. E., D. W. Griffiths, W. H. M. Smith (1990). "Changes in forage and oilseed rape (*Brassica napus*) root glucosinolates in response to attack by turnip root fly (*Delia floralis*)." Journal of the Science of Food and Agriculture **51**, 309-320.
- Blee, E., J. Joyard (1996). "Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides." Plant Physiology **110**, 445-454.
- Blume, B., T. Nürnberger, N. Nass, D. Scheel (2000). "Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley." Plant Cell **12**, 1425-1440.
- Bodenhausen, N., P. Reymond (2007). "Signaling Pathways Controlling Induced Resistance to Insect Herbivores in *Arabidopsis*." Molecular Plant-Microbe Interactions **20**, 1406-1420.
- Bostock, R. M. (2005). "Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the line between cost and benefit." Annual Review of Phytopathology **43**, 545-580.
- Burow, M., R. Müller, J. Gershenzon, U. Wittstock (2006). "Altered glucosinolate hydrolysis in genetically engineered *Arabidopsis thaliana* and its influence on the larval development of *Spodoptera littoralis*." Journal of chemical ecology **32**, 2333-2349.
- Carter, D. J. (1984). "Pest Lepidoptera of Europe with Special Reference to the British Isles." Dordrecht, Dr. W. Junk.
- Cui, J. P., G. Jander, L. R. Racki, P. D. Kim, N. E. Pierce, F. M. Ausubel (2002). "Signals involved in *Arabidopsis* resistance to *Trichoplusia ni* caterpillars induced by virulent and avirulent strains of the phytopathogen *Pseudomonas syringae*." Plant Physiology **129**, 551-564.
- Dabrowska, P., D. Freitak, H. Vogel, D. G. Heckel, W. Boland (2009). "The phytohormone precursor OPDA is isomerized in the insect gut by a single, specific glutathione transferase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**, 16304-16309.
- Day, I. S., V. S. Reddy, G. S. Ali, A. S. N. Reddy (2002). "Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*." Genome Biology **3**.



- De Vos, M., V. R. Van Oosten, R. M. P. Van Poecke, J. A. Van Pelt, M. J. Pozo, M. J. Müller, A. J. Buchala, J. P. Metraux, L. C. Van Loon, M. Dicke, C. M. J. Pieterse (2005). "Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack." Molecular Plant-Microbe Interactions **18**, 923-937.
- DeFalco, T. A., K. W. Bender, W. A. Snedden (2010). "Breaking the code: Ca<sup>2+</sup> sensors in plant signalling." Biochemical Journal **425**, 27-40.
- Dellaporta, S., J. Wood, J. Hicks (1983). "A plant DNA miniprep: Version II." Plant Molecular Biology Reporter **1**, 19-21.
- Ehrhardt, D. W., R. Wais, S. R. Long (1996). "Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals." Cell **85**, 673-681.
- Eigenbrode, S. D., K. E. Espelie (1995). "Effects of plant epicuticular lipids on insect herbivores." Annual Review of Entomology **40**, 171-194.
- Elmayan, T., H. Vaucheret (1996). "Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally." Plant Journal **9**, 787-797.
- Engelberth, J., H. T. Alborn, E. A. Schmelz, J. H. Tumlinson (2004). "Airborne signals prime plants against insect herbivore attack." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**, 1781-1785.
- Fenwick, G. R., R. K. Heaney, W. J. Mullin (1983). "Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants." Critical Reviews in Food Science and Nutrition **18**, 123-201.
- Halitschke, R., I. T. Baldwin (2003). "Antisense LOX expression increases herbivore performance by decreasing defense responses and inhibiting growth-related transcriptional reorganization in *Nicotiana attenuata*." Plant Journal **36**, 794-807.
- Holsters, M., B. Silva, F. Van Vliet, C. Genetello, M. De Block, P. Dhaese, A. Depicker, D. Inze, G. Engler, R. Villarreal, M. Van Montagu, J. Schell (1980). "The Functional Organization of the Nopaline *A. tumefaciens* Plasmid pTiC58." Plasmid **3**, 212-230.
- Howe, G. A., G. Jander (2008). "Plant immunity to insect herbivores." Annual Review of Plant Biology **59**, 41-66.
- Howe, G. A., J. Lightner, J. Browse, C. A. Ryan (1996). "An octadecanoid pathway mutant (JL5) of tomato is compromised in signaling for defense against insect attack." Plant Cell **8**, 2067-2077.
- Kanchiswamy, C. N., H. Takahashi, S. Quadro, M. E. Maffei, S. Bossi, C. Berteaux, S. A. Zebelo, A. Muroi, N. Ishihama, H. Yoshioka, W. Boland, J. Takabayashi, Y. Endo, T. Sawasaki, G. Arimura (2010). "Regulation of *Arabidopsis* defense responses against *Spodoptera littoralis* by CPK-mediated calcium signaling." BMC Plant Biology **10**.
- Karban, R., I. T. Baldwin, K. J. Baxter, G. Laue, G. W. Felton (2000). "Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush." Oecologia **125**, 66-71.
- Karimi, M., D. Inze, A. Depicker (2002). "GATEWAY<sup>TM</sup> vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." Trends in Plant Science **7**, 193-195.
- Katzen, F. (2007). "Gateway<sup>(R)</sup> recombinational cloning: a biological operating system." Expert Opinion on Drug Discovery **2**, 571-589.
- Kessler, A., I. T. Baldwin (2001). "Defensive function of herbivore-induced plant volatile emissions in nature." Science **291**, 2141-2144.
- Kessler, A., R. Halitschke, I. T. Baldwin (2004). "Silencing the jasmonate cascade: Induced plant defenses and insect populations." Science **305**, 665-668.

- Kliebenstein, D., D. Pedersen, B. Barker, T. Mitchell-Olds (2002). "Comparative analysis of quantitative trait loci controlling glucosinolates, myrosinase and insect resistance in *Arabidopsis thaliana*." Genetics **161**, 325-332.
- Knight, H., A. J. Trewavas, M. R. Knight (1997). "Calcium signalling in *Arabidopsis thaliana* responding to drought and salinity." Plant Journal **12**, 1067-1078.
- Knight, M. R., A. K. Campbell, S. M. Smith, A. J. Trewavas (1991). "Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium." Nature **352**, 524-526.
- Koritsas, V. M., J. A. Lewis, G. R. Fenwick (1989). "Accumulation of indole glucosinolates in *Psylliodes chrysocephala* L.-infested, or-damaged tissues of oilseed rape (*Brassica napus* L.)" Experientia **45**, 493-495.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**, 680-&.
- Lammerink, J., D. B. MacGibhon, A. R. Wallace (1984). "Effect of the cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) on total glucosinolate in the seed of oilseed rape (*Brassica napus*)." New Zealand Journal of Agricultural Research **27**, 89-92.
- Laudert, D., U. Pfannschmidt, F. Lottspeich, H. Holländer-Czytko, E. W. Weiler (1996). "Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates." Plant Molecular Biology **31**, 323-335.
- Lecourieux, D., C. Mazars, N. Pauly, R. Ranjeva, A. Pugin (2002). "Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells." Plant Cell **14**, 2627-2641.
- Levy, M., Q. M. Wang, R. Kaspi, M. P. Parrella, S. Abel (2005). "*Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense." Plant Journal **43**, 79-96.
- Li, C. Y., A. L. Schillmiller, G. H. Liu, G. I. Lee, S. Jayanty, C. Sageman, J. Vrebalov, J. J. Giovannoni, K. Yagi, Y. Kobayashi, G. A. Howe (2005). "Role of  $\beta$ -oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato." Plant Cell **17**, 971-986.
- Maffei, M., S. Bossi, D. Spiteller, A. Mithöfer, W. Boland (2004). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. I. Membrane potentials, intracellular calcium variations, oral secretions, and regurgitate components." Plant Physiology **134**, 1752-1762.
- Maffei, M. E., A. Mithöfer, G. I. Arimura, H. Uchtenhagen, S. Bossi, C. M. Berteau, L. S. Cucuzza, M. Novero, V. Volpe, S. Quadro, W. Boland (2006). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. III. Membrane depolarization and involvement of hydrogen peroxide." Plant Physiology **140**, 1022-1035.
- Maffei, M. E., A. Mithöfer, W. Boland (2007a). "Before gene expression: early events in plant-insect interaction." Trends in Plant Science **12**, 310-316.
- Maffei, M. E., A. Mithöfer, W. Boland (2007b). "Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release." Phytochemistry **68**, 2946-2959.
- McConn, M., R. A. Creelman, E. Bell, J. E. Mullet, J. Browse (1997). "Jasmonate is essential for insect defense *Arabidopsis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **94**, 5473-5477.
- McCormack, E., J. Braam (2003). "Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*." New Phytologist **159**, 585-598.
- McCormack, E., Y. C. Tsai, J. Braam (2005). "Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs." Trends in Plant Science **10**, 383-389.

- Merai, Z., Z. Kerenyi, A. Molnar, E. Barta, A. Valoczi, G. Bisztray, Z. Havelda, J. Burgyan, D. Silhavy (2005). "Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity." Journal of Virology **79**, 7217-7226.
- Mithöfer, A., W. Boland (2008). "Recognition of herbivory-associated molecular patterns." Plant Physiology **146**, 825-831.
- Mithöfer, A., J. Ebel, A. A. Bhagwat, T. Boller, G. Neuhaus-Url (1999). "Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with beta-glucan or chitin elicitors." Planta **207**, 566-574.
- Mithöfer, A., G. Wanner, W. Boland (2005). "Effects of feeding *Spodoptera littoralis* on lima bean leaves. II. Continuous mechanical wounding resembling insect feeding is sufficient to elicit herbivory-related volatile emission." Plant Physiology **137**, 1160-1168.
- Müller, J., C. Staehelin, Z. P. Xie, G. Neuhaus-Url, T. Boller (2000). "Nod factors and chito oligomers elicit an increase in cytosolic calcium in aequorin-expressing soybean cells." Plant Physiology **124**, 733-739.
- Müller, R., M. de Vos, J. Y. Sun, I. E. Sonderby, B. A. Halkier, U. Wittstock, G. Jander (2010). "Differential Effects of Indole and Aliphatic Glucosinolates on Lepidopteran Herbivores." Journal of Chemical Ecology **36**, 905-913.
- Paschold, A., R. Halitschke, I. T. Baldwin (2007). "Co(i)-ordinating defenses: NaCO11 mediates herbivore-induced resistance in *Nicotiana attenuata* and reveals the role of herbivore movement in avoiding defenses." Plant Journal **51**, 79-91.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Research **29**, e45.
- Pfaffl, M. W., G. W. Horgan, L. Dempfle (2002). "Relative expression software tool (REST <sup>(c)</sup>) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR." Nucleic Acids Research **30**, e36.
- Plieth, C., U. P. Hansen, H. Knight, M. R. Knight (1999). "Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response." Plant Journal **18**, 491-497.
- Radhika, V., C. Kost, W. Boland, M. Heil (2010). "The Role of Jasmonates in Floral Nectar Secretion." PLoS One **5**, e9265.
- Rask, L., E. Andreasson, B. Ekbohm, S. Eriksson, B. Pontoppidan, J. Meijer (2000). "Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*." Plant Molecular Biology **42**, 93-113.
- Ratzka, A., H. Vogel, D. J. Kliebenstein, T. Mitchell-Olds, J. Kroymann (2002). "Disarming the mustard oil bomb." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**, 11223-11228.
- Renart, J., J. Reiser, G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**, 3116-3120.
- Reymond, P., N. Bodenhausen, R. M. P. Van Poecke, V. Krishnamurthy, M. Dicke, E. E. Farmer (2004). "A Conserved Transcript Pattern in Response to a Specialist and a Generalist Herbivore." Plant Cell **16**, 3132-3147.
- Reymond, P., H. Weber, M. Damond, E. E. Farmer (2000). "Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*." Plant Cell **12**, 707-719.
- Ryan, C. A. (1990). "Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens." Annual Review of Phytopathology **28**, 425-449.

- Sambrook, J., D. W. Russell (2001). "Molecular cloning: a laboratory manual." Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanders, D., J. Pelloux, C. Brownlee, J. F. Harper (2002). "Calcium at the crossroads of signaling." Plant Cell **14**, S401-S417.
- Schäfer, M., C. Fischer, S. Meldau, E. Seebald, R. Oelmüller, I. T. Baldwin (2011). "Lipase activity in insect oral secretions mediates defense responses in *Arabidopsis thaliana*." Plant Physiology Preview, 10.1104/pp.1111.173567.
- Schlaeppli, K., N. Bodenhausen, A. Buchala, F. Mauch, P. Reymond (2008). "The glutathione-deficient mutant pad2-1 accumulates lower amounts of glucosinolates and is more susceptible to the insect herbivore *Spodoptera littoralis*." Plant Journal **55**, 774-786.
- Schmeltz, I. (1971). "Nicotine and other tobacco alkaloids" in "Naturally occurring insecticides". M. Jacobson and D. G. Crosby. New York, Marcel Dekker.
- Schmelz, E. A., J. Engelberth, H. T. Alborn, J. H. Tumlinson, P. E. A. Teal (2009). "Phytohormone-based activity mapping of insect herbivore-produced elicitors." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **106**, 653-657.
- Schoonhoven, L. M., T. Jermy, J. J. A. van Loon (1998). "Insect-Plant Biology: From physiology to evolution." London, Chapman & Hall.
- Schüler, G., H. Görls, W. Boland (2001). "6-Substituted Indanoyl Isoleucine Conjugates Mimic the Biological Activity of Coronatine." European Journal of Organic Chemistry **2001**, 1663-1668.
- Schüler, G., A. Mithöfer, I. T. Baldwin, S. Berger, J. Ebel, J. G. Santos, G. Herrmann, D. Hölscher, R. Kramell, T. M. Kutchan, H. Maucher, B. Schneider, I. Stenzel, C. Wasternack, W. Boland (2004). "Coronalon: a powerful tool in plant stress physiology." FEBS Letters **563**, 17-22.
- Schütze, K., K. Harter, C. Chaban (2009). "Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) to Study Protein-Protein Interactions in Living Plant Cells" in "Plant Signal Transduction". T. Pfannschmidt. New York, Humana Press. **479**: 189-202.
- Seo, H. S., J. T. Song, J. J. Cheong, Y. H. Lee, Y. W. Lee, I. Hwang, J. S. Lee, Y. D. Choi (2001). "Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 4788-4793.
- Sieberer, B. J., M. Chabaud, A. C. Timmers, A. Monin, J. Fournier, D. G. Barker (2009). "A Nuclear-Targeted Cameleon Demonstrates Intranuclear Ca<sup>2+</sup> Spiking in *Medicago truncatula* Root Hairs in Response to Rhizobial Nodulation Factors." Plant Physiology **151**, 1197-1206.
- Sitte, P., E. W. Weiler, J. W. Kadereit, A. Bresinsky, C. Körner (2002). "Strasburger. Lehrbuch der Botanik für Hochschulen." Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Staswick, P. E., I. Tiryaki (2004). "The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*." Plant Cell **16**, 2117-2127.
- Stenzel, I., B. Hause, O. Miersch, T. Kurz, H. Maucher, H. Weichert, J. Ziegler, I. Feussner, C. Wasternack (2003). "Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*." Plant Molecular Biology **51**, 895-911.
- Steppuhn, A., K. Gase, B. Krock, R. Halitschke, I. T. Baldwin (2004). "Nicotine's defensive function in nature." PLoS Biology **2**, 1074-1080.

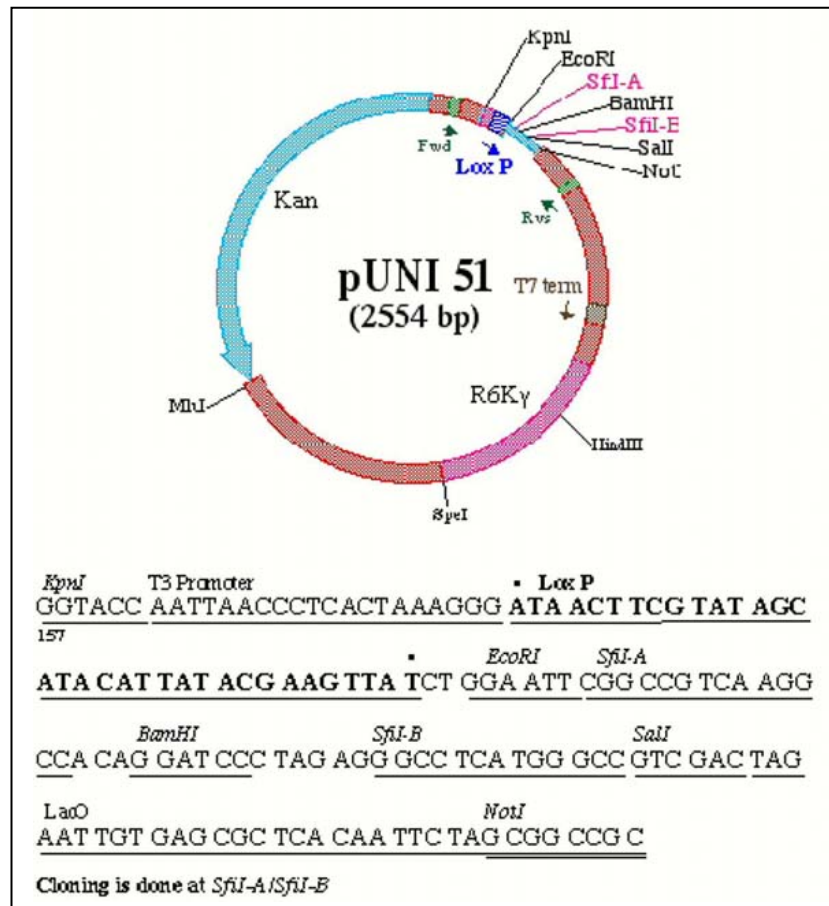
- Stintzi, A., J. Browse (2000). "The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**, 10625-10630.
- Stintzi, A., H. Weber, P. Reymond, J. Browse, E. E. Farmer (2001). "Plant defense in the absence of jasmonic acid: The role of cyclopentenones." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**, 12837-12842.
- Stotz, H. U., T. Koch, A. Biedermann, K. Weniger, W. Boland, T. Mitchell-Olds (2002). "Evidence for regulation of resistance in *Arabidopsis* to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways." Planta **214**, 648-652.
- Stotz, H. U., B. R. Pittendrigh, J. Kroymann, K. Weniger, J. Fritsche, A. Bauke, T. Mitchell-Olds (2001). "Induced Plant Defense Responses against Chewing Insects. Ethylene Signaling Reduces Resistance of *Arabidopsis* against Egyptian Cotton Worm But Not Diamondback Moth." Plant Physiology **124**, 1007–1017.
- Strassner, J., F. Schaller, U. B. Frick, G. A. Howe, E. W. Weiler, N. Amrhein, P. Macheroux, A. Schaller (2002). "Characterization and cDNA-microarray expression analysis of 12-oxophytodienoate reductases reveals differential roles for octadecanoid biosynthesis in the local versus the systemic wound response." Plant Journal **32**, 585-601.
- Takabayashi, J., M. Dicke (1996). "Plant-carnivore mutualism through herbivore-induced carnivore attractants." Trends in Plant Science **1**, 109-113.
- Taki, N., Y. Sasaki-Sekimoto, T. Obayashi, A. Kikuta, K. Kobayashi, T. Aina, K. Yagi, N. Sakurai, H. Suzuki, T. Masuda, K. Takamiya, D. Shibata, Y. Kobayashi, H. Ohta (2005). "12-Oxo-Phytodienoic Acid Triggers Expression of a Distinct Set of Genes and Plays a Role in Wound-Induced Gene Expression in *Arabidopsis*." Plant Physiology **139**, 1268-1283.
- Thorpe, M. R., A. P. Ferrieri, M. M. Herth, R. A. Ferrieri (2007). "C-11-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled." Planta **226**, 541-551.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**, 4350-4354.
- Truitt, C. L., H. X. Wei, P. W. Pare (2004). "A plasma membrane protein from *Zea mays* binds with the herbivore elicitor volicitin." Plant Cell **16**, 523-532.
- Vadassery, J. (nicht publiziert).
- Vadassery, J., R. Oelmüller (2009). "Calcium signalling in pathogenic and beneficial plant microbe interactions - What can we learn from the interaction between *Piriformospora indica* and *Arabidopsis thaliana*." Plant Signalling & Behavior **4**, 1024-1027.
- Van Larebeke, N., G. Engler, M. Holsters, S. Van Den Elsacker, I. Zaenen, R. A. Schilperoort, J. Schell (1974). "Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability." Nature **252**, 169-170.
- Van Poecke, R. M. P. (2007). "*Arabidopsis*-Insect Interactions" in "The *Arabidopsis* Book ", The American Society of Plant Biologists. **5**: e0107.

- Vanderbeld, B., W. A. Snedden (2007). "Developmental and stimulus-induced expression patterns of *Arabidopsis* calmodulin-like genes *CML37*, *CML38* and *CML39*." Plant Molecular Biology **64**, 683-697.
- Vick, B. A., D. C. Zimmerman (1984). "Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species." Plant Physiology **75**, 458-461.
- Vick, B. A., D. C. Zimmerman (1987). "Pathways of Fatty Acid Hydroperoxide Metabolism in Spinach Leaf Chloroplasts." Plant Physiology **85**, 1073-1078.
- Vogel, H., P. Dabrowska, A. Mithöfer, J. Kroymann, M. Kunert, W. Boland (nicht publiziert). "Insect Stealth feeding: A Specialist Herbivore Manipulates Plant Defense Responses."
- Wildermuth, M. C., J. Dewdney, G. Wu, F. M. Ausubel (2001). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." Nature **414**, 562-565.
- Wu, J. Q., I. T. Baldwin (2010). "New Insights into Plant Responses to the Attack from Insect Herbivores." Annual Review of Genetics **44**, 1-24.
- Wu, J. Q., C. Hettenhausen, S. Meldau, I. T. Baldwin (2007). "Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*." Plant Cell **19**, 1096-1122.
- Zavala, J. A., A. G. Patankar, K. Gase, D. Q. Hui, I. T. Baldwin (2004). "Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses." Plant Physiology **134**, 1181-1190.
- Zerbe, P., E. W. Weiler, F. Schaller (2007). "Preparative enzymatic solid phase synthesis of cis(+)-12-oxo-phytodienoic acid - physical interaction of AOS and AOC is not necessary." Phytochemistry **68**, 229-236.
- Zhang, X., R. Henriques, S.-S. Lin, Q.-W. Niu, N.-H. Chua (2006). "*Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method." Nature Protocols **1**, 641-646.

## 7 Anhang

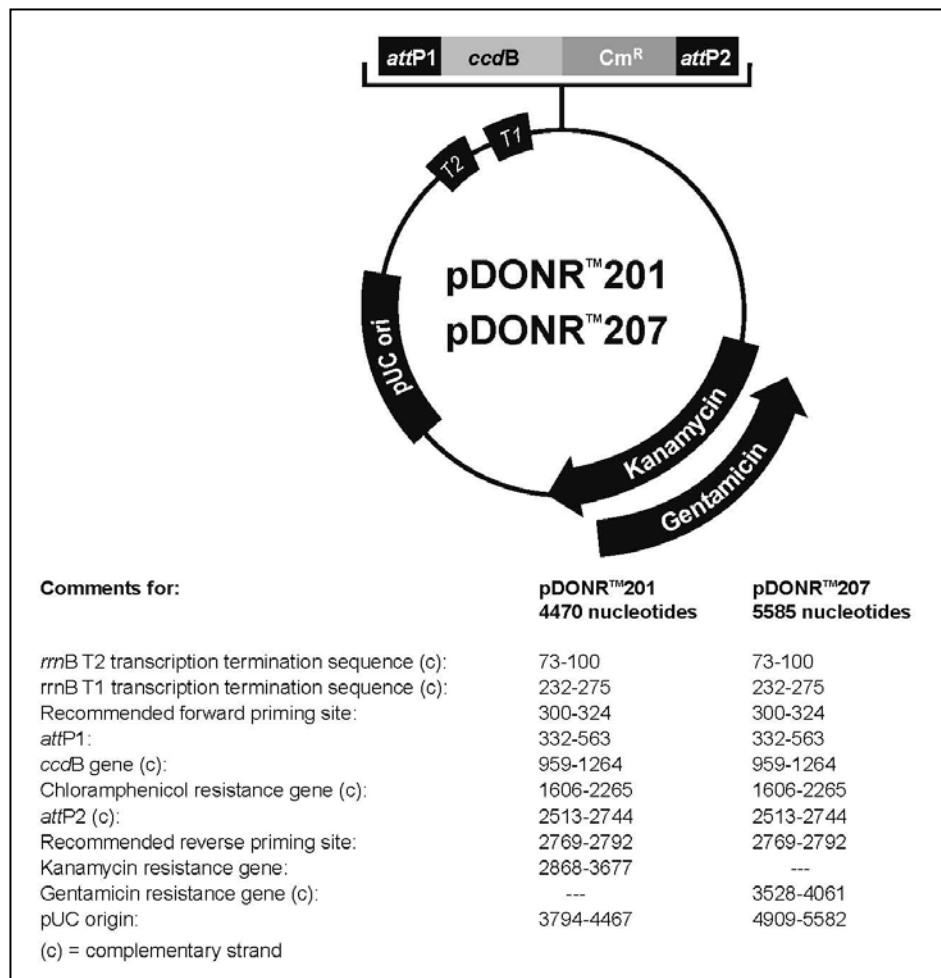
### Vektorkarten:

- pUNI51



**Abbildung 16: Karte des Vektors pUNI51.** Dargestellt ist die Karte des Vektors pUNI51 mit einer Detailansicht der Klonierungsstelle und ihrer unmittelbaren Umgebung. Der Vektor hat eine Gesamtgröße von 2554 bp und trägt eine Kanamycinresistenz. (Quelle: <http://www.arabidopsis.org/jsp/common/image.jsp?id=1635&format=jpg>)

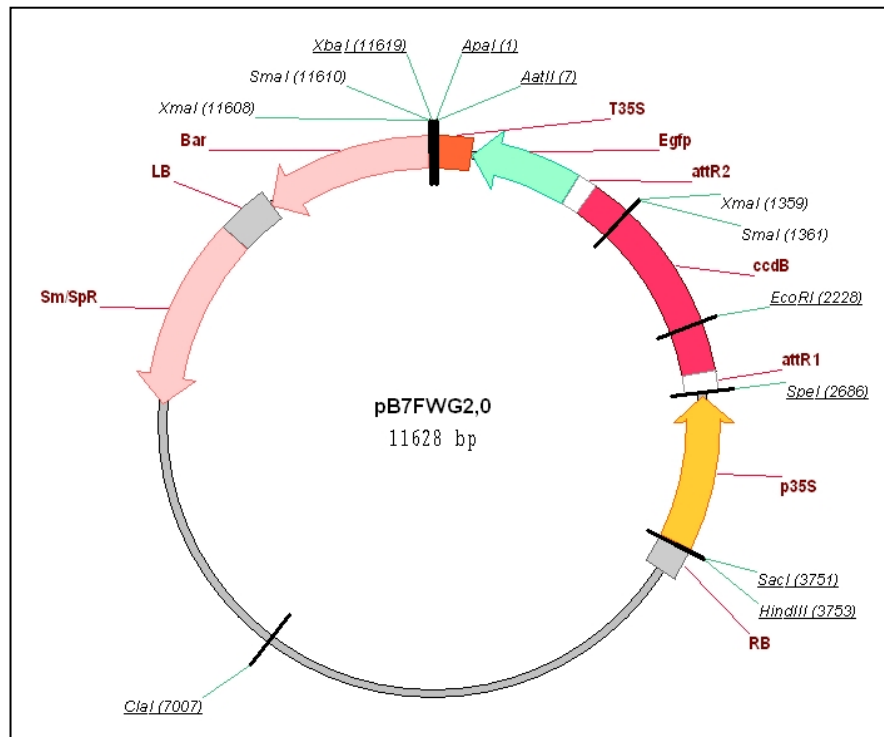
- pDONR<sup>TM</sup>207



**Abbildung 17: Karten der Vektoren pDONR<sup>TM</sup>201 und pDONR<sup>TM</sup>207.** Für die hier durchgeführten Versuche wurde lediglich der Vektor pDONR<sup>TM</sup>207 verwendet. Die Gesamtgröße dieses Vektors beträgt 5585 bp. Er besitzt eine Chloramphenicol- und eine Gentamycinresistenz. (Quelle: [http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdonr201\\_pdonr207\\_map.pdf](http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pdonr201_pdonr207_map.pdf))

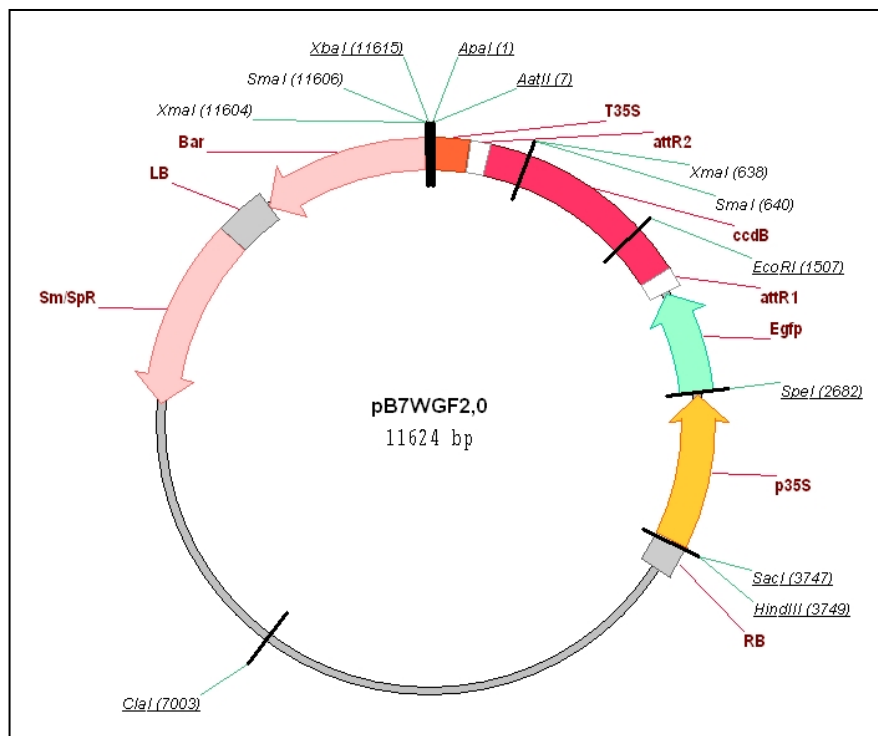


- pB7FWG2



**Abbildung 18: Karte des Vektors pB7FWG2.** Dargestellt ist die Karte des Vektors pB7FWG2. Der Vektor hat eine Gesamtgröße von 11628 bp und trägt eine Chloramphenicol-, Spenctinomycin- und BASTA-Resistenz. Das GFP wird C-terminal angefügt. (Quelle: <http://gateway.psb.ugent.be/file/show/541>)

- pB7WGF2



**Abbildung 19: Karte des Vektors pB7WGF2.** Dargestellt ist die Karte des Vektors pB7WGF2. Der Vektor hat eine Gesamtgröße von 11624 bp und trägt eine Chloramphenicol-, Spentcinomycin- und BASTA-Resistenz. Das GFP wird N-terminal angefügt. (Quelle: <http://gateway.psb.ugent.be/file/show/563>)

## 8 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung anderer nicht möglich gewesen. An dieser Stelle möchte ich mich deshalb bei all jenen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit zu Stande gekommen ist.

Ich danke Prof. Dr. Wilhelm Boland, dass ich diese Arbeit in der Abteilung für Bioorganische Chemie anfertigen durfte.

Besonderer Dank gilt vor allem PD Dr. Axel Mithöfer dafür, dass er es mir ermöglichte dieses interessante Thema zu bearbeiten und für seine stets hilfreichen Ratschläge. Ich danke ihm sehr für sein Vertrauen und all die Chancen, welche er mir in den letzten Jahren eröffnete.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Gutachtern seitens der Friedrich-Schiller-Universität Jena Prof. Dr. Ralf Oelmüller und PD Dr. Thomas Pfannschmidt.

Ein riesengroßes Dankeschön gilt außerdem Dr. Jyothilakshmi Vadassery, deren Arbeit maßgeblich zur Bereitstellung dieses Themas beigetragen hat. Ich bin sehr dankbar, dass ich die Möglichkeit hatte von ihr lernen zu dürfen. Ich danke ihr für die zahlreichen anregenden Gespräche sowohl wissenschaftlicher als auch privater Natur.

Dr. Michael Reichelt danke ich für die HPLC- bzw. Triple-Quad-LC-MS-MS-Messungen.

Dr. Wayne Snedden danke ich für die Bereitstellung der Samen der *CML37*-Knockout-Linie.

Außerdem danke ich der gesamten Abteilung für Bioorganische Chemie. Insbesondere Sandy Rottloff, welche mich während meiner Zeit als studentische Hilfskraft in das wissenschaftliche Arbeiten einführte. Des Weiteren danke ich Franziska Buch, Janine Hofmann, Anne Morgenstern und Holger Merker für die hilfreiche Kritik an den Entwürfen dieser Arbeit und den Spaß innerhalb und außerhalb des Labors. Bei Dr. Yoko Nakamura bedanke ich mich für den ChemDraw-Unterricht und bei Dr. Christian Kost für die Hilfe mit SPSS. Dank gilt auch Angelika Berg für die Aufzucht der *Spodoptera littoralis* Larven.

Des Weiteren danke ich dem Gewächshaus-Team des Max-Planck-Institutes für chemische Ökologie, insbesondere Andreas Weber und Andreas Schünzel,

für die Aufzucht der *Arabidopsis thaliana* und der *Nicotiana benthamiana* Pflanzen.

Ich möchte mich außerdem ganz besonders bei meiner Familie bedanken. Vor allem bei meinen Eltern, ohne die mein gesamtes Studium nicht möglich gewesen wäre. Sie unterstützten mich jederzeit sowohl finanziell als auch emotional. Die Dankbarkeit, welche ich für sie empfinde, lässt sich in Worten nicht ausdrücken. Auch bei meiner Schwester Silvia möchte ich mich für das ständige Aufmuntern bedanken. Meinem allerliebsten Omili danke ich für ihr Verständnis und die Kraft, die mir ihr Vorbild gegeben hat.

Abschließend möchte ich meinem Verlobten Oliver Schimratzki danken. Er war stets für mich da und machte mir neuen Mut. Er war mir während der gesamten Arbeit eine große Stütze. Ich danke ihm für alles, was er für mich getan hat und für seine bedingungslose Liebe.

## 9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der gegebenen Literatur und Hilfsmittel verfasst habe.

Sämtliche Stellen, die anderen Werken entnommen sind, wurden unter Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht.

Jena, den 8.6.2011

---

Monika Heyer