Inhaltverzeichnis

Danksagung ..... **III**

Zusammenfassung ..... **IV**

Abkürzungsverzeichnis ..... **V**

Abbildungsverzeichnis ..... **VII**

Tabellenverzeichnis ..... **VIII**

1. Einleitung **1**

1.1. Arabidopsis *thaliana* 1

1.2. Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) und drei wichtige NMD-Proteine 2

1.3. Anwendungen transgener Pflanzen 5

1.4. (Induzierbare) Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Herbivoren und Pathogene 7

1.5. Wirkung der UV-Strahlung auf Pflanzen 9

1.6. Ziel dieser Arbeit 10

2. Material und Methoden **11**

2.1. Materialien 11

2.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide 11

2.1.2. Medien zur Kultivierung von Pflanzen 12

2.1.3. Medien zur Kultivierung von Bakterien 13

2.1.4. Vektoren 13

2.1.5. Pflanzen 13

2.2. Methoden 14

2.2.1. Extraktion pflanzlicher Genom-DNA 14

2.2.2. Extraktion pflanzlicher RNA und Reverse Transkriptionsreaktion 14

2.2.3. Extraktion der Plasmide 16

2.2.4. Restriktionsreaktion und Ligation 16

2.2.5. Real Time quantitative PCR mit interkalierendem Farbstoff SYBR® Green I 17

2.2.6. Anzucht der Pflanzen 18

2.2.7. Kreuzung von *Arabidopsis thaliana* 19

2.2.8. Transformation von *Arabidopsis thaliana* 19

2.2.9. Transformation von Bakterien 20

2.2.10. Behandlung der Pflanzen 20

2.2.11. Extraktion der Phytohormone 21

2.2.12. Histochemische Methoden - DAPI-Färbung 22

3. Ergebnisse 23

3.1. Die essenzielle Rolle der AtUPF2 im pflanzlichen NMD-Prozess 23

3.2. Anormale Wachstumsphänotypen der *upf1-5*, ir*UPF2* und *upf3-1* 25

3.3. Stressantwort gegen Pathogeninfektion 28

3.4. Stressantwort gegen mechanische Verwundung 30

3.5. Methyl-Jasmonate ausgelöste transkriptionelle Veränderung 32

3.6. Stressreaktion gegen UV-B Strahlung 34

4. Diskussion 37

4.1. Die Bedeutung der Wachstumsbedingung des UPF2 vermittelten NMD-Prozesses in *Arabidopsis thaliana* 37

4.2. UPF Proteine und Pflanzenentwicklung 38

4.3. Die Funktion der UPF-Proteine in induzierbaren Stressantworten 40

4.4. NMD-Proteine und abiotischer Stress – UV-B Strahlung 42

5. Literaturverzeichnis 47

Anhang 52

Selbstständigkeitserklärung 55

Danksagung

Allen voran möchte ich mich bei meinen Eltern für die finanzielle Unterstützung meines Studiums in Deutschland bedanken.

Ich danke Dr. Jianqiang Wu und Prof. Dr. Ian Thomas Baldwin für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmittel.

Besonders Dank geht hierbei nochmals an Dr. Jianqiang Wu für die ausführliche Belehrung zu molekularbiologischen Techniken für Pflanzen und verantwortungsvolle Betreuung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Thomas Munder danke ich für die bereitwillige Übernahme der Betreuung meiner Masterarbeit seitens der Fachhochschule Jena und den Einsatz für die Bewältigung organisatorischer Angelegenheiten.

Ebenfalls Dank gebührt Dr. Dahai Yang für die freundliche Übergabe des NMD-Projekts und die hilfreichen Diskussionen über dieses Projekt.

Katharina Friedrich, Cindy Schumacher, Sophie Neugebauer, Henriette Undeutsch, Karsten Burkert und Daniel Schisnowski, meine lieben Kommilitonen, danke ich für die sorgfältige Korrektur meiner Arbeit und für eine gemeinsame unvergessliche Studienzeit in Jena.

Christian Hettenhausen, Martin Schäfer, Stefan Meldau, Maria Heinrich und Stefan Schuck, meine freundlichen Labkollegen, danke ich für die unkomplizierte und hilfreiche Dikussionsbereitschaft.

Danke auch an Sven Henning für das erste freiwillige Durchlesen meiner Arbeit und die Organisation der letzten Korrekturmaßnahmen.

Zum Schluss möchte ich mich an dieser Stelle bei allen anderen bedanken, die mich bei der Anfertigung meiner Masterarbeit stets unterstützt haben.

Zusammenfassung

Nonsense mediated mRNA Decay ist ein mRNA Kontrollmechanismus zum Abbau der PTC (*engl. premature termination codons*) enthaltenden mRNAs, deren kodierte verkürzte Proteine zu schädlichen Effekten auf eukaryotische Organismen führen. UPF1, UPF2 und UPF3 (*engl. Up-Frameshift Protein*) sind 3 wichtige Proteine zur Gewährleistung der normalen Funktion des NMD-Prozesses, aber sie spielen auch in der Pflanzenentwicklung und bei Stressantworten gegen biotischen und abiotischen Stress eine wichtige Rolle.

In dieser Arbeit wurden unter Verwendung der Mutanten *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* aus *Arabidopsis thaliana* folgendes gezeigt. UPF1, UPF2 und UPF3 sind an der Pflanzenentwicklung, den Stressantworten gegen biotischen Stress aufgrund einer Infektion durch *Pseudomonas syringae pv. tomato strain DC3000* (*Pst DC3000*), Stressantworten gegen abiotische Stresse aufgrund einer mechanischen Verwundung und der Exposition mittels UV-B Strahlung beteiligt. Unter Langtagbedingung (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) führten diese Proteine zu morphologischen Veränderungen in den verschiedenen Organen der Pflanzen, wie den Blättern, den Stielen, den Blüten und den Samen. Es wurde gezeigt, dass die 3 Proteine wichtig für die Aufrechthaltung des Haushalts der durch Verwundung induzierten Akkumulation der Jasmonsäure und der durch pathogene Infektionen induzierten Akkumulation der Salizylsäure sind. Sie spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle in der transkriptionellen Regulation der Gene LOX2 (*engl. lipoxygenase 2*) und VSP2 (*engl. vegetative storage protein 2*) nach mechanischer Verwundung und Behandlung mit Methyljasmonaten. Auffallender Weise waren diese Entdeckungen bzw. neuen Funktionen der NMD-Proteine einigermaßen von den Wachstumsbedingungen (also Photoperiode) der Pflanzen abhängig. Unter Kurztagbedingung (12 h Licht und 12 h Dunkelheit) kultivierte Pflanzen zeigten relativ verminderte Phänotypen gegen diese Stresse im Vergleich zu Langtagpflanzen. Überraschender Weise zeigten ir*UPF2* und *upf3-1* eine Sensitivität gegen UV-B Strahlung, sowohl in normalen Zellen als auch in sich teilenden Zellen. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man sagen, dass UPF2 und UPF3 eine entscheidende Rolle bei der Überwindung der durch UV-B Strahlung induzierten Schädigungen in *Arabidopsis* spielen.

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
At	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
Bar	Barsta
Bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre DNA
cfu	colony Forming Unit
Col-0	Columbia-0
CTAB	Cethyltrimethyl-Ammoniumbromid
ddH2O	doppeltdestilliertes Wasser
DEPC	Diethypyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	Desoxy-Nukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
engl.	English
EDTA	Ethylendiamintetraengl.essigsäure
FCKW	Fluor-Chlor-Kohlen-Wasserstoff
FM	Frischgewicht
HPLC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaar
LB	Luria Bertani
LB	Left Border
MS	Murashige und Skoog
Mb	Megabasenpaaren

NMD	nonsense-mediated mRNA Decay
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PTC	premature termination codon
RB	Right Border
RNA	Ribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang RNA
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
siRNA	small interfering RNA
Rif	Rifampicin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOC	Super Optimal Broth
Spec	Spectinomycin
Strep	Streptomycin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
T-DNA	Transfer-DNA
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tetra	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UPF	Up-Frameshift Protein
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolet
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Mechanismus der RNA Interferenz Technik 6

Abbildung 3-1: Transkriptmenge von UPF2 in ir*UPF2* und Col-0 23

Abbildung 3-2: Wachstumsphänotypen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1* unter Langtagbedingung 25

Abbildung 3-3: Anormaler Phänotyp der Blüte 26

Abbildung 3-4: Wachstumsphänotypen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1* unter Kurztagbedingung 26

Abbildung 3-5: Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1* 27

Abbildung 3-6: Akkumulation der Salizylsäure nach *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 Infektion 28

Abbildung 3-7: Pathogenwachstumstest 29

Abbildung 3-8: Akkumulation der Jasmonsäure nach Verwundung 30

Abbildung 3-9: Transkriptionelle Änderung der LOX2 und VSP2 nach Verwundung 31

Abbildung 3-10: Transkriptionelle Veränderungen der LOX2 und VSP2 nach der MeJA Behandlung 32

Abbildung 3-11: Wurzelwachstumstest nach UV-B Bestrahlung 34

Abbildung 3-12: DAPI Färbung der mit UV-B behandelten Wurzeln 35

Abbildung 3-13: Behandlung der Pflanzen durch UV-B Strahlung 36

Abbildung 4-1: Hypothese: die Beteiligung der NMD Fakoren am DNA Reparatur System 45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1 Informationen zu den verwendeten Oligonukeotiden (Primer) 11

Tabelle 2-2 Rezeptur der Pflanzen kultivierenden Medien 12

Tabelle 2-3 Verwendete Vektoren 13

Tabelle 2-4 Zusammensetzung des 2% CTAB-Extraktionspuffers 14

Tabelle 2-5 Rezeptur für die Herstellung der RNA Extraktionslösung (2,6 l) – Trizol-Reagenz 15

Tabelle 2-6 Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkriptionsreaktion 16

Tabelle 2-7 Programm der Real Time quantitative PCR 18

Tabelle 3-1 Verhältnis der Transkriptmenge der PTC enthaltenden Gene zwischen ir*UPF2* (ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6*) und Wildtyp-Pflanzen 24

1. Einleitung

1.1. Arabidopsis *thaliana*

Bei Ara*bidopsis thaliana* handelt es sich um eine Wildpflanze aus der Familien der Kreuzblütler. Zur Familie der Kreuzblütengewächse zählen viele wichtige Kulturpflanzen, wie z. B. die vom Menschen entwickelten Kulturformen des Gemüsekohls, Senfs, Steckrübe, Raps, Radieschens. *Arabidopsis thaliana* ist eine unscheinbare, einjährige, krautige Pflanze mit niedrigem Wuchs. Sie kann bei natürlichen Wachstumsbedingungen eine Größe von bis zu 30 cm erreichen. Die Grundblätter sind rosettenförmig angeordnet und ihr Stängel ist rund. Die Blätter am Grund sind meist gezähnt (Ökotypen-abhängig), die Stängelblätter dagegen meist ganzrandig. Ihre Blüten sind weiß und zwei bis vier Millimeter groß. Die Verbreitungsregion der *Arabidopsis* beschränkt sich vorwiegend auf die Nordhalbkugel, insbesondere auf Europa, Asien und Nordafrika. Die Nutzung von *Arabidopsis thaliana* in der Landwirtschaft ist von geringer Bedeutung, aber als Modellpflanze der Molekular- und Entwicklungsbiologie übernimmt sie seit 10 Jahren innerhalb der Angiospermen eine herausragende Rolle. *Arabidopsis thaliana* hat mit 125 Mb ein relativ kleines Genom, dessen Sequenzierung im Jahr 2000 abgeschlossen wurde. Besonders vorteilhaft für die Grundlagenforschung sind Eigenschaften wie fünf Chromosomenpaare, ein kurzer Generationszyklus von achten Wochen, eine einfache Kultivierung, eine Samenbank vielfältiger Mutanten und die Möglichkeit der einfachen Transformation durch Agrobakterien. Dadurch ist *Arabidopsis thaliana* heute eine der wichtigsten Modellpflanzen.

1.2. Nonsense-mediated mRNA Decay (NMD) und drei wichtige NMD-Proteine

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) ist ein mRNA Kontrollmechanismus, der in allen eukaryotischen Zellen vorkommt. Dieser Mechanismus erkennt nonsense Mutationen in der mRNA und verhindert deren Expression als kurze Proteine (Hentze und Kulozik, 1999). Auslöser des NMD-Prozesses sind vorzeitige Stopcodons im Leserrahmen der mutierten mRNA, welche durch Genmutationen (nonsense Mutation), Fehler beim alternativen Spleißen oder Fehler bei der Transkription auftreten können.

In menschlichen Zellen ist der NMD-Kontrollmechanismus schon lange Zeit bekannt. Dieser Mechanismus ist im Vergleich zu anderen Organismen wie Bierhefe (*Saccharomyces cerevisiae)*, Fadenwurm (*Caenorhabditis elegans)* und Taufliege (*Drosophila melanogaster*), sowie einigen Säugetieren (z.B. *Mus musculus*) der im Menschen am ausführlichsten beschriebene Prozess. Über den Ablauf dieses Prozesses in Pflanzen wurde bereits mehrfach berichtet, jedoch konnte die genaue Funktionsweise des pflanzlichen NMD bisher noch nicht entschlüsselt werden.

Da die Sequenzen, der im NMD-Prozess beteiligten Proteine, in allen Eukaryoten sehr konserviert geblieben sind, sollte die Funktionsweise des NMD-Prozesses in allen Eukaryoten relativ ähnlich ablaufen. Der Mechanismus wird in Säugern folgendermaßen beschrieben: Bei der Transkription wird die Information der DNA auf die mRNA übertragen, welche jedoch zunächst als prä-mRNA, also als eine Vorstufe der mRNA vorliegt, die noch prozessiert werden muss. Beim Spleißen werden die Introns entfernt und die Exons zusammengefügt. Dabei bleiben die Exon-Exon-Grenzen innerhalb der mRNA durch Proteinkomplexe markiert (Exon-Junction-Komplex). Diese Proteinkomplexe werden im Normalfall während der ersten Translationsrunde entfernt. Erst dann kommt die Translation am regulären Stopcodon zum Stillstand und die Terminationsfaktoren werden aktiviert. Falls ein vorzeitiges Stopcodon im offenen Leserahmen der mRNA vorkommt, hört der Translationsvorgang schon in diesem Bereich auf. In diesem Fall werden auch die Terminationsfaktoren aktiviert. Da es sich jedoch um ein vorzeitiges Stopcodon handelt, an dem die Translation zum Stehen gekommen ist, befindet sich in der Regel (in 5’-3’-Richtung) dahinter noch ein Exon-Junction-Komplex, mit dem die Terminationsfaktoren interagieren können. Das hat zur Folge, dass Decapping-Enzyme aktiviert werden, welche die 5’-Kappe der mRNA entfernen, was zu einem schnellen Abbau der mRNA durch 5’-3’-Exonukleasen führt.

Die Voraussetzung für eine Interaktion der Terminationsfaktoren mit den Exon-Junction-Komplexen ist jedoch, dass sich das vorzeitige Stopcodon mindestens 50-55 Basenpaare (in 5'-3'-Richtung betrachtet) vor der letzten Exon-Exon-Bindung befindet. Daher findet der Mechanismus des NMD nicht bei intronloser prä-mRNA und bei mRNAs statt, in denen das PTC (engl. *premature termination codon*) 50 bp vor dem letzten Exon liegt (Maquat, 2004).

Es wurden bisher viele am NMD-Prozess beteiligte Proteine in verschiedenen Organismen identifiziert, wie z. B. die drei Proteine, UPF1, UPF2 und UPF3, welche in allen eukaryotischen Zellen im Verlauf der Evolution beibehalten wurden. Im Gegensatz zu UPF1 einer RNA-abhängigen ATPase und 5'-3' Helikase, konnten in UPF2 und UPF3 kein katalytisches Zentrum gefunden werden (Isken et al., 2008). Beim Vergleich der normalen Funktion der NMD-Proteine zum Abbau der PTC enthaltenden mRNAs spielen diese Faktoren bei der Regulation der Transkriptmenge der normalen mRNA eine erhebliche Rolle, sowohl in niedrigen eukaryotischen Zellen wie Hefe (Culbertson, 1999; He et al., 2003; Lelivelt und Culbertson, 1999), als auch in höheren eukaryotischen Zellen und Pflanzen (Kurihara et al., 2009), Fliegen (Metzstein und Krasnow, 2006; Rehwinkel et al., 2005) oder sogar Säugetieren (Chang et al., 2007; Mendell et al., 2004). In einigen Publikationen wurde berichtet, dass 1-10 % aller mRNA-Arten des gesamten Transkriptoms einer Spezies direkt oder indirekt durch NMD reguliert werden (He et al., 2003; Lelivelt und Culbertson, 1999; Mendell et al., 2004). Demzufolge ist NMD ein wichtiger Prozess, der nicht nur anormale mRNAs eliminiert, sondern auch viele normale zelluläre Routineprozesse reguliert.

In den letzten zehn Jahren wurden die NMD-Proteine intensiv erforscht und unter einigen physiologischen Aspekten analysiert. Die Mutationen in UPF3B (eine der beiden Homologien des UPF3 im Menschen) führen zu einer geistigen Behinderung der Patienten (Tarpey et al., 2007). Ein Knock-out des UPF1 Proteins im Säuger ist letal für den Embryo (Medghalchi et al., 2001). In *Arabidopsis upf1* kommt es zur Hemmung der Entwicklung in der Keimlingsphase (Yoine et al., 2006a). UPF1 und UPF2 sind notwendig für das Wachstum und die Lebensfähigkeit der Larven von *Drosophila* (Metzstein und Krasnow, 2006). UPF1, UPF2 und UPF3 in *Drosophila*, wie auch UPF1 im Menschen sind notwendig für den normalen Ablauf des Zellzyklus (Azzalin und Lingner, 2006; Rehwinkel et al., 2005). Außerdem scheinen diese NMD-Proteine auch an der Stressantwort in Säugetierzelllinien und Hefen beteiligt zu sein (Isken und

Maquat, 2008). Eine Microarray-Studie zeigte, dass die NMD-Proteine bei der Selbstregulation des Aminosäurehaushaltes in Hefe und Säugetierzellen eine große Bedeutung haben (He et al., 2003; Mendell et al., 2004). UPF1 (NMD-Prozess unabhängig) ist wichtig für die Stabilität des Genoms der Säugetierzellen unter genotoxischen Bedingungen (Azzalin und Lingner, 2006). *Schizosaccharomyces pombe,* eine upf1Δ Mutante ist hypersensitiv gegenüber Wasserstoffperoxid, was auf die Bedeutung von UPF1 bei der Resistenz gegenüber oxidativem Stress hindeuten könnte (Rodriguez-Gabriel et al., 2006). Aber ob diese NMD-Proteine eine Resistenzfunktion gegen Umweltstress in multizellulären Organismen haben, ist noch unbekannt.

1.3. Anwendungen transgener Pflanzen

Transgene Pflanzen sind seit vielen Jahren von großer Bedeutung in der Grundlagenforschung. Sie haben in den letzten Jahren darüber hinaus zunehmend Anwendung in der Landwirtschaft gefunden, nachdem transgene Nutzpflanzen erstmals im Jahre 1995 in den USA in den Handel gebracht wurden. Einige Anwendungsgebiete transgener Pflanzen umfassen unter anderem:

1.) Die Erhöhung der Expressionsstärke arteigener Gene, z. B. durch Verwendung von verschiedenen Promotoren, insbesondere des Blumenkohlmosaikvirus 35S Promotors.

2.) Die Reduzierung der Expressionsstärke arteigener Gene, z. B. durch die „RNA Interferenz Technik“ (Abb. 1-1). Dabei wird eine Kopie des zu untersuchenden Gens (bzw. dessen cDNA) in umgekehrter Richtung mit einem geeigneten Promotor (z. B. dem Blumenkohlmosaikvirus-35S-Promotor) verbunden und dieses Konstrukt, wie beschrieben, in das Genom integriert, so dass bei der Transkription des Gens von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase II der codierende Strang und nicht der Matrizenstrang abgelesen wird Dadurch wird eine haarnadelförmige dsRNA gebildet. Die komplementären mRNA-Moleküle bilden wahrscheinlich RNA-Doppelstrangmoleküle. Diese sind das Substrat für RNase-III-ähnliche Enzyme (DICER), die die doppelsträngige RNA in kleine (21-26 Nucleotide lange) siRNAs (engl. *small interfering RNAs*) spalten. Die doppelsträngigen siRNAs führen zur Initiierung des ‚*RNA induced silencing complex*‘ (RISC). Die Aktivierung des RISC-Komplexes erfolgt in zwei Stufen. Zuerst wird die doppelsträngige siRNA durch Helikasen unter ATP-Verbrauch entwunden. Anschließend leitet die Endonukleaseaktivität des Komplexes den Abbau der mRNA ein, die komplementär zur entstandenen siRNA ist. Dieser im Englischen als ‚*gene Silencing*‘ bezeichnete Prozess ist ein natürlicher Abwehrmechanismus der Pflanze gegen Virusbefall. Durch Expression einer ‚*Inverse Repeat Sequence*‘ eines Gens in der Pflanze wird die Bildung eines gezielten Proteins bzw. Enzyms stark vermindert und dadurch die Folgeneffekte in der transgenen Pflanze ausgelöst. Ausgelöst wird das Silencing durch die Anwesenheit doppelsträngiger RNA.

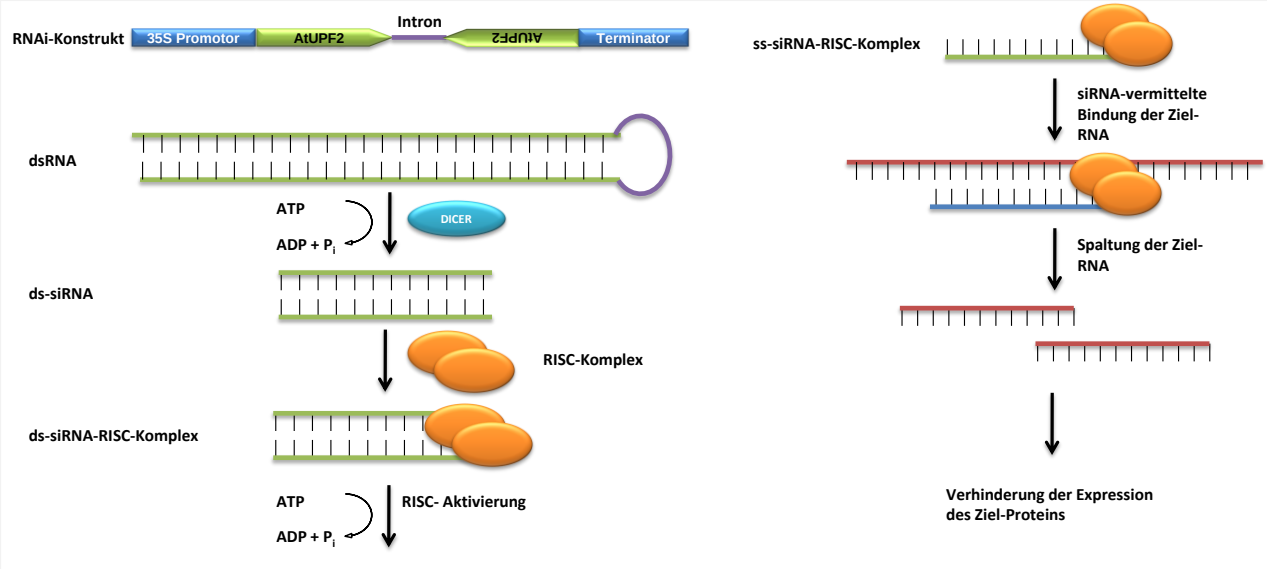


Abbildung 1-1: Mechanismus der RNA Interferenz Technik

3) Die Expression artfremder Gene in der Pflanze, z. B. zur Einführung einer Krankheitsresistenz in die Pflanze.

4) Die Untersuchung der Transkriptionskontrolle pflanzlicher Gene. Dazu wird der zu untersuchende Promotor mit einem leicht nachzuweisenden Indikator, auch Reportergen genannt (bzw. mit einer cDNA, die den codierenden Bereich eines solchen Gens umfasst), verbunden und dieses Genkonstrukt in das Genom der zu untersuchenden Pflanze integriert. Die Aktivität des Promotors und seine Regulation in der transgenen Pflanze können dann analysiert werden, indem das gebildete Genprodukt nachgewiesen wird.

1.4. (Induzierbare) Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Herbivoren und Pathogene

In der Natur müssen sich Pflanzen vor Herbivoren schützen. Dafür haben viele von ihnen im Laufe der Zeit Abwehrmechanismen entwickelt, um für diese Fraßfeinde ungenießbar zu werden. Die Herbivoren wiederum müssen Strategien entwickeln, um solche Pflanzenabwehrmechanismen zu überwinden. Infolgedessen haben Pflanzen ein breites Spektrum an Schutzmechanismen entwickelt und Herbivoren unterschiedlichste Strategien zu deren Überwindung.

In Pflanzen wird die Herbivorabwehr in zwei Arten gegliedert, die konstitutive Insektenabwehr und die induzierbare Herbivorabwehr. Die konstitutive Insektenabwehr ist ein wirksamer Abwehrmechanismus, welcher nach der ersten Beschädigung der Pflanze durch Herbivoren erfolgt. In Tomaten wird nach einer solchen Schädigung eine klebrige Flüssigkeit gebildet (Ave et al, 1987). Diese führt zu einem Verkleben der Mundwerkzeuge und Tarsen der Herbivoren. Die induzierte Herbivorabwehr ist besonders wirksam gegen kleine Herbivoren mit begrenzter Nahrungsaufnahme, also insbesondere gegen Insekten. Einige der an der Herbivorabwehr beteiligten Prozesse sind seit langer Zeit bekannt, und wurden vor allem an Blättern der Tomate erforscht. Bei Verletzung eines Blattes, z. B. durch eine Insektenlarve wird im Verwundungsbereich durch Hydrolasen und Lipasen die dreifach ungesättigte α-Linolensäure freigesetzt, welche als Ausgangsstoff für die Synthese der Jasmonsäure dient. Deren Akkumulation kann bereits nach einigen Minuten nachgewiesen werden. Jasmonsäure, die allein keine Aktivität besitzt, wird durch Konjugation mit Isoleucin funktionsfähig (JA-Ile). Diese Konjugate binden an den Rezeptor COI1 und lösen dann die Jasmonsäure induzierte Abwehrreaktion aus, d.h. die Gene, die bei der Verteidigung relevant sind, werden exprimiert. Die Aktivierung der Abwehrgene, die für mehrere Protease-Inhibitoren kodieren, kann nach der Verwundung für mehrere Stunden nachgewiesen werden und die so kodierten und letztendlich produzierten Protease-Inhibitoren erreichen im verwundeten Blatt eine hohe Konzentration. Der Herbivor nimmt mit der Zeit eine steigende Menge dieser Inhibitoren auf, was zu einer starken Behinderung der Verdauung von Nahrung und so zu geringerem Wachstum oder sogar zum Tod des Herbivoren führt. In der Pflanze laufen nach dem Befall durch Herbivoren weitere Abwehrmechanismen ab. Im Rahmen dieser Arbeit soll jedoch

ausschließlich die Wundantwort der Jasmonsäure und deren Derivate thematisiert werden.

Im Vergleich zur Herbivorabwehr ist die Pathogenabwehr der Pflanze bereits genauestens erforscht. Ähnlich wie bei der Herbivorabwehr kann sich die Pflanze vor Mirkroorganismen schützen. Neben konstitutiven Mechanismen zur Abwehr von Mikroorganismen (z. B. Cuticula, Zellwände, insbesondere, wenn sie verholzt sind, und bei Einlagerung toxischer Substanzen in Zellwände und Vakuolen) stehen der Pflanze auch zahlreiche induzierbare Abwehrreaktionen gegen Mikroorganismen zur Verfügung. So findet die induzierbare Biosynthese der Phytoalexine, die eine sehr effektive antimikrobielle Wirkung haben, nach Pathogenbefall statt. Die Bildung der Callose, ein Bestandteil der Zellwand erfolgt spezifisch am Eindringungsort des Pathogens, um eine Verstärkung des Vernetzungsgrades der Zellwand zu erreichen. Die hypersensitive Stressantwort der Pflanze gegen eine Pathogeninfektion ist die Synthese von Toxinen (vor allem Phenole) und hoch reaktiven Sauerstoffradikalen bzw. H_2O_2, was auf lokaler Ebene zu einem programmierten Zelltod führt.

Bei der Abwehr von Pathogenen kommt es zu einer Akkumulation der Salizylsäure. Der Pathogenbefall ruft eine verstärkte Biosynthese der Salizylsäure über isochorismate Stoffwechselwege hervor, was zu einer Anreicherung der Salizylsäure führt. Die ansteigende Konzentration der Salizylsäure führt wiederum zu einem Ungleichgewicht des Redox-Zustandes im Zytoplasma. NPR1 (engl. *nonexpresser of pathogenesis related Gens 1*) ist normalerweise in oligomer Form im Zytoplasma vorhanden, aber nach pathogeninduzierter Änderung des Redox-Zustandes kommt es zu einer Translokation des NPR1 als monomere Form in den Zellkern und einer Aktivierung pathogenreponsiver Gene (PR engl. *pathogenesis related*) durch Interaktion mit Transkriptionsproteine (z. B. TGAs oder OBF Familien, in deren Struktur die Leucin-Zipper-Domäne existieren). Diese kodieren vermutlich für spezifische Enzyme und Peptide, die selbst oder in Form ihrer katalysierten Produkte bei der Pathogenabwehr eine bedeutende Rolle spielen könnten.

1.5. Wirkung der UV-Strahlung auf Pflanzen

Unter UV-Strahlung versteht man den Bereich des Sonnenspektrums zwischen einer Wellenlänge von 100 - 400 nm, also zwischen der Röntgenstrahlung und dem sichtbaren Licht. Die UV-Strahlung kann wiederum in die drei Teilbereiche UV-A (320 - 400 nm), UV-B (280 - 320 nm) und UV-C (100 - 280 nm) aufgeteilt werden. Die UV-C Strahlung besitzt dabei die höchste Energie und birgt potentiell die größte Gefahr für die Biosphäre, da sie mit Proteinen und dem Erbgut (DNA) in Zellen in Wechselwirkung treten kann. UV-C hat aber nur eine untergeordnete Bedeutung für die Umwelt, da sie vollständig von der Atmosphäre absorbiert wird und damit die Erdoberfläche nicht erreichen kann. UV-B Strahlung stellt eine potentielle Gefahr für lebende Systeme dar, da ein geringer Teil bis zur Erdoberfläche durchdringt. Die energieärmere UV-A Strahlung wird nur zu einem geringen Teil durch die Atmosphäre gefiltert und erreicht fast vollständig die Erdoberfläche.

Das in den letzten Jahren viel diskutierte Ozonloch verursacht einen mäßigen Durchlass der UV-B Strahlung auf die Erdoberfläche (Caldwell et al., 1989). Aufgrund ihrer lichtabhängigen, unbeweglichen Lebensweise werden Pflanzen durch UV-B Strahlung besonders gefährdet. Durch die UV-B Strahlung wird vor allem das Erbgut der Pflanze geschädigt, aber auch Enzyme, Membranlipide, das Zytoskelett sowie die Photosynthese werden negative beeinflusst. Dagegen haben Pflanzen aber auch eigene Schutzmechanismen um diesen Stress zu überwinden, wie z. B. die Biosynthese von Schirmpigmenten gegen UV-B Strahlung (Rozema et al., 2002), eigene Reparatursysteme des UV-B geschädigten Erbgutes (Britt, 2004) sowie die Reflexion der UV-B Strahlung mit Hilfe von Wachsen auf der Blattoberfläche (Liakopoulos, 2006). Weiterhin ungeklärt sind die Leistungsfähigkeit der Schutzreaktion sowie die molekularen Mechanismen hinter diesen Reaktionen.

1.6. Ziel dieser Arbeit

Über die Funktionsweise des pflanzlichen NMD-Prozesses hat man bisher sehr begrenzte Kenntnisse. Einige NMD-Proteine wurden aus Pflanzen isoliert, und deren konservierte Funktion bei der Unterdrückung der anormalen mRNAs und *mRNA-like nonprotein coding RNAs* in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana attenuata*, *und N. benthamiana* konnten nachgewiesen werden (Arciga-Reyes et al., 2006; Hori und Watanabe, 2005; Kerenyi et al., 2008; Wu et al., 2007). UPF1 und UPF3 spielen außer im NMD-Prozess auch bei der Pflanzenentwicklung eine wichtige Rolle (Arciga-Reyes et al., 2006; Yoine et al., 2006a). *Iba1* (Aminosäureaustauschmutation in UPF1) zeigte eine Hypersensitivität gegen Glukose und Abscisinsäure (Yoine et al., 2006b). Studien zeigten, dass zwischen dem zirkadianen Rhythmus (engl. *Circadian rhythm*) und dem NMD-Prozess ein enger Zusammenhäng besteht (Schoning et al., 2008; Schoning et al., 2007; Song et al., 2009).

In dieser Arbeit werden die Funktionen pflanzlicher NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 unter molekularen ökologischen Aspekten untersucht. Die Entdeckung neuer Funktionen der NMD-Proteine im NMD unabhängigen Prozessen soll ebenfalls Ziel dieser Arbeit sein.

Folgende Themen werden in dieser Arbeit betrachtet:

1) Untersuchung der Wichtigkeit des UPF2 bei der Beteiligung am pflanzlichen NMD-Prozess in *Arabidopsis thaliana*
2) Untersuchung der Funktion der NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 während der Pflanzenentwicklung
3) Klärung der Frage, ob die NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 am pflanzlichen Abwehrsystem gegen primären Fressschaden durch Schädlinge, vor allem Insekten, beteiligt sind.
4) Untersuchung der NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 bei der Pathogenbesiedlung durch einen Bakterienstamm *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000.
5) Untersuchung, ob die NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 am zellulären Abwehrsystem bzw. Reparatursystem nach Bestrahlung der UV-B Strahlung beteiligt sind.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien, Lösungsmittel, Enzyme und Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karsruhe), Fluka (Buchs, Schweitz) bezogen. Organische Lösungsmittel wurden von Roth (Karsruhe), Merck (Darmstadt) und VWR International (Darmstadt) geliefert. Die Enzyme, die zur Restriktion, T4-DNA-Ligation, DNA Amplifikation, RNA Reverse Transkription und zum Abbau der DNA und RNA verwendet wurden, wurden von Fermentas (Sankt Leon-Rot), Invitrogen (Darmstadt) und BioLabs (Frankfurt a.M.) bezogen. Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich (Hamburg) synthetisiert. Eine Liste der verwendeten Oligonukleotide befindet sich in nachfolgender Tabelle 2-1.

Tabelle 2-1 Informationen zu den verwendeten Oligonukeotiden (Primer)

Name der Primer	Primersequenz (5'---3')	Anwendungszweck
Salk_LBb1.3	ATTTTGCCGATTTCGGAAC	Identifizierung der Homozygoten *upf1-5* und upf3-1
AtUPF1-LP	ATTATGCCACACAAGGAGCAC	Identifizierung der Homozygoten *upf1-5*
AtUPF1-RP	AGGGACAACAAAATCATGTCG	Identifizierung der Homozygoten *upf1-5*
AtUPF3-LP	CGGTCGAGAGTCATTTCTCA	Identifizierung der Homozygoten *upf3-1*
AtUPF3-RP	GAGCAGTCTGGTTCGTGTTTC	Identifizierung der Homozygoten *upf3-1*
hptII-1	GCGAGAGCCTGACCTATTG	Identifizierung des Hygromycin Resistenz Gens
hptII-2	GTCTGCTGCTCCATACAAGC	
hptII-3	TGCTCGACGTTGTCACTGAAG	Herstellung der Sonde für Southern Blot, zur Identifizierung des Hygromycin Resistenz Gens
hptII-4	TACCGTAAAGCACGAGGAAGC	
AtUPF2-Seq-1	GGAGCTCTACTATGTTGGAGTA	AtUPF2 Sequenzierungsprimer
AtUPF2-Seq-2	GACGACGAAGACACCAAGAC	
AtUPF2-Seq-3	CGCGTATGGTTGCAACACTAG	
AtUPF2-Seq-4	GCCTGAAGTAAGGCCTTCAG	
AtUPF2-Seq-5	CAAAGTAGTGCCCACAGGTTT	
pJET1.2-Seq-For	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	Sequenzierungsprimer in pJet1.2
pJET1.2-Seq-Rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	
AtUPF2-1	ATCTCTTTCTCCGGGAACACAC	UPF2 Klonierungsprimer mit 5´und 3´ UTR
AtUPF2-2	TTTTCCCCCTAAACCGGATGA	
IRAtUPF2-XhoI	AGTCCTCGAGATCTCTTTCTCCGGGAAC	Primer zur Konstruktion 35S: *RNAiAtUPF2* mit Restriktionsschnittstellen
IRAtUPF2-KpnI	GCTAGGTACCACGAAGAGTCAGTTTAGCT	

IRAtUPF2-ClaI	ACGTATCGATACGAAGAGTCAGTTTAGCT	
IRAtUPF2-BamHI	ACTGGGATCCATCTCTTTCTCCGGGAAC	
AtUPF2-SYBR-1	AGGTCAATGCCGCTATACTTC AG	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge von AtUPF2
AtUPF2-SYBR-2	AGACGACTTGTTTGAAGGCTT TG	
AT1G01060-SYBR-1	CGCAAATCTTCAAGCTACAACAG	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge von At1G01060
AT1G01060-SYBR-2	CTGGAGAAACGAACGGTAATCAT	
At3g53240-SYBR-1	AGGATCTCCAACAACCGTCTACA	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge von At3G53240
At3g53240-SYBR-2	AAGCTACCCGACAAGAAGTTTCC	
At3g53400-SYBR-1	TAGTTTCCGCTTGGATCAAACTC	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen At3G53340
At3g53400-SYBR-2	CAGAAGAGGCTCCAATAATCCAA	
At5G45430-SYBR-1	GCTCCTTTTAGCAATGGTGTCAA	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen At5G45430
At5G45430-SYBR-2	GGAGCATTCGTCTTTGCAGTAAC	
At1g69252-SYBR-1	GCGTAGTTCGGTTTTCTTTTCCT	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen At1G69252
At1g69252-SYBR-2	CACCAACACACATACCCAATGAA	
AtLOX2-SYBR-1	GAGCTTATTAGCGCCAAGACTGA	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen AtLOX2
AtLOX2-SYBR-2	CAAACTCGCACTCGTACTTCTCA	
AtVSP2-SYBR-1	GCTCATCGAACTCGTCGATTC	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen AtVSP2
AtVSP2-SYBR-2	CAACACCAAGGTGCCAGCTTC	
AteIF4A1-SYBR-1	CCAGATCTATGACATATTCCAGC	qRT-PCR Primer zur Untersuchung der Transkriptmenge der Gen AteIF4A1
AteIF4A1-SYBR-2	TCTCACTGGCTTGCTCATGAACT	
Gateway-Adaptor-1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	Adaptor Primer für Gateway Cloning
Gateway-Adaptor-2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	

2.1.2. Medien zur Kultivierung von Pflanzen

Tabelle 2-2 Rezeptur der Pflanzen kultivierenden Medien

Komponenten	Medium A	Medium B	Medium C
Phytagel	7 g	-	-
Plant Agar	-	10 g	10 g
MS	2,2 g	2,2 g	2,2 g
100X MES	10 ml	10 ml	10 ml
Saccharose	-	-	10 g
Di. Wasser	auf 1 L	auf 1 L	auf 1 L

Medium A wurde bei der Durchführung des UV-B Bestrahlungstests bzw. Wurzelwachstumstests verwendet. Medium B wurde bei Auskeimung der Samen von *Arabidopsis thaliana* (bis zu 6 Tage alte Keimlinge) als Grundmedium eingesetzt.

Medium C wurden als Selektionsmedium bei Zusatz verschiedener Antibiotika, oder als Grundmedium für das Pflanzenwachstum benutzt.

2.1.3. Medien zur Kultivierung von Bakterien

Für die Anzucht der Bakterienstämme von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens* wurde LB Medium eingesetzt. Die Selektion der erhaltenen Klone erfolgte durch Zusatz eines entsprechenden Antibiotikums.

2.1.4. Vektoren

Tabelle 2-3 Verwendete Vektoren

Vektoren	Resistenz in Bakterien	Resistenz in Pflanzen	Verwendungszweck	Firmen und Webseite
pJet1.2	Amp	-	Sequenzierungsvektor	Fermentas
pCAMBIA1301	Kan	Hyg	Pflanzentransformations vektor	www.cambia.org
pDONR221	Kan	-	Vektor für Gateway-Cloning	Invitrogen
pKANNIBAL	Kan	-		www.pi.csiro.au
pBGWFS7	Spec	Bar		Universität Gent
pART27	Strep, Spec	Kan	Pflanzentransformations vektor	www.pi.csiro.au

2.1.5. Pflanzen

Verwendet wurden der *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Col-0, Insertionsmutante *upf1-5 (*SALK_112922*), upf3-1 (*SALK_025175*) aus www.arabidopsis.org* und eigene Inzuchtlinien ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6* durch RNA Interferenz Technik mit Col-0 genetischem Hintergrund.

2.2. Methoden

2.2.1. Extraktion pflanzlicher Genom-DNA

Zur Präparation wurden 2-3 Blätter in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff eingefroren, mit Hilfe eines vorgekühlten Plastikstäbchen fein zermörsert und in 1 ml 2%igem vorher bei 65°C gewärmtem ETAB-Extraktionspuffer aufgenommen. Nach starkem Schütteln wurde die Suspension 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 12000 U/min. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und jeweils 1 µl RNase A (Fermentas) zugegeben. Danach wurde die Suspension 10 min bei 37 °C inkubiert und mit 750 µl Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (24:1) extrahiert. Nach der Trennung der Phasen durch Zentrifugation für 10 min bei 12000 U/min wurde die DNA aus der oberen wässrigen Phase mit 700 µl Isopropanol in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gefällt. Danach erfolgte eine Sedimentation der DNA durch 15 min Zentrifugation bei 4°C unter 12000 U/min. Das entstandene DNA-Pellet wurde 2-mal mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und mit 20 bis 150 µl dd Wasser gelöst. Diese DNA Lösung konnte für 2 Monate bei 4°C und eine längere Periode bei -20°C aufbewahrt werden.

Tabelle 2-4 Zusammensetzung des 2% CTAB-Extraktionspuffers

Komponenten	Konzentration
CTAB	2%
Tris/HCl	100 mM, pH 8,0
NaCl	1,4 M
PVP-40	1% (w/v)
EDTA	20 mM

2.2.2. Extraktion pflanzlicher RNA und Reverse Transkriptionsreaktion

Die mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Pflanzengewebe wurden mit einem Plastikstäbchen zerkleinert. Ca. 100 bis 150 mg Pflanzengewebe wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß aliquotiert und dazu 1 ml Trizol–Reagenz zugegeben. Nach starkem Schütteln wurden die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit eine Zelllyse stattfinden konnte und alle Proteine denaturierten. Um alle Proteine in der Suspension zu entfernen, wurden zu jeder Probe 200 µl Chloroform zugegeben, 3 Minuten kräftig geschüttelt, 10 Minuten bei 12000 U/min und 4°C zentrifugiert. Es

entstand ein 3 Phasen System (oben: wässrige Phase; mitte: Proteinschicht; unten: organische Phase). Die wässerige Phase (ca. 500 µl) wurde in ein frisches 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und das gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben. Nach einer Zentrifugation entstand am Boden des Reagenzgefäßes ein RNA Pellet. Der Überstand wurde mit Hilfe einer Pipette entfernt und das Pellet 3-mal mit 70%igem Ethanol (in DEPC-Wasser) gewaschen. Das Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet und in 30µl DEPC-Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte durch eine Messung der Probe im NanoDrop® (ND-1000, Peqlab) bei einer Wellenlänge von 260 nm.

Tabelle 2-5 Rezeptur für die Herstellung der RNA Extraktionslösung (2,6 l) – Trizol-Reagenz

Komponenten	Endkonzentration	Menge
Ammoniumthiocyanat	0,4 M	79,2 g
Guanidiniumthiocyanat	0,8 M	245,8 g
Natriumacetat-Trihydrat	0,1 M	35,4 g
Glycerol	5% (v/v)	130 ml
Essigsäure	0,73% (v/v)	19 ml
Phenol	38% (v/v)	1000 g
Di-Wasser	-	auf 2,6 l

5 µl der originalen RNA-Lösung wurden in ein RNase-freies Reagenzgefäß überführt und durch Zugabe eines entsprechenden Volumens des DEPC-Wassers auf eine Endkonzentration von 500 ng/µl verdünnt. Um die Qualität und Konzentration der verdünnten RNA-Lösung zu kontrollieren, wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden 1 µl der 500 ng/µl RNA-Lösung mit 2xRNA-Loadingdye auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Die Trennungszeit betrug 25 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt. Zur Prüfung der Qualität und Quantität der RNA-Lösung wurde ein Scanvorgang unter UV-Licht durchgeführt. Nachdem die RNA-Lösungen den qualitativen und quantitativen Anforderungen entsprachen, konnten sie zur Reverse-Transkriptionsreaktion verwendet werden.

Die Reverse-Transkriptionsreaktion fand auf einer Platte mit 96 Vertiefungen statt. 1 µl der verdünnten RNA-Lösung (500 ng/µl) wurde eingesetzt. Der Mastermix bestand aus Denaturierungsmix und Reaktionsmix.

Tabelle 2-6 Zusammensetzung des Mastermix für die Reverse Transkriptionsreaktion

Denaturierungsmix	Volumen [µl]	Reaktionsmix	Volumen [µl]
RNA-Lösung	1	**5X Reaktionspuffer**	2
Oligo dT	0,5	**RiboLock RNase Inhibitor**	0,25
dNTP	0,5	**Reverse Trankriptase**	0,075
DEPC-Wasser	3	**DEPC-Wasser**	2,75
Summe	5	**Summe**	5,025

Das gesamte Volumen einer Reverse-Transkriptionsreaktion betrug 10µl pro Reaktion. 4 µl Denaturierungsmix wurden zuerst in das Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurde die Platte mit einem Sealmat® (Gummi-Deckel) bedecket und zentrifugiert. Danach war eine 5 minütige Inkubation der Platte bei 65°C erforderlich. Nachfolgend musste die Platte gleich auf einer eiskalten Aluminium-Platte 1 min abgekühlt werden. Anschließend an diesen Denaturierungsschritt wurden 5 µl Reaktionsmix zugegeben und die Reverse-Transkriptionsreaktion wurde in einem PCR-Gerät mit entsprechendem Programm durchgeführt. Nach der Reverse-Transkriptionsreaktion wurden zu jede Probe noch 15 µl Mili-Q Wasser pipettiert. Diese cDNA-Lösung wurde später für Real Time quantitative PCR eingesetzt.

2.2.3. Extraktion der Plasmide

Zur Isolierung der Plasmide aus Bakterien wurde das Kit *NucleoSpin® Plasmid* (Macherey-Nagel) genutzt.

2.2.4. Restriktionsreaktion und Ligation

Zur Gewinnung der zu klonierenden DNA Fragmente wurden die Techniken der PCR und die Restriktion von Plasmiden angewendet. Die Restriktionsreaktion wurde unter Beachtung der vom jeweiligen Hersteller empfohlenen Puffer-, Temperaturbedingungen und Zusatzstoffen (z. B. BSA) durchgeführt. Die eingesetzte Enzymemenge betrug 0,4 bis 2 Unit pro Reaktion und die Inkubationsdauer variierte je nach Menge der zu spaltenden DNA und eingesetzter Enzymmenge von 2 bis 15 h. Die Trennung und Isolierung der abgespaltenen DNA-Fragmente oder zur Ligation verwendeten Vektoren

erfolgte durch Gelelektrophorese. Anschließend wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus dem Gel herausgeschnitten und mit dem *illstra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) aufgereinigt. Danach wurde die Konzentration der isolierten DNA-Fragmente im Nanotrop® (ND-1000, PeqLab) gemessen.

Die durch Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente (von Vektoren oder PCR-Produkten) wurden durch Ligation in entsprechende Vektoren kloniert. Um die Erfolgchance der Ligation zu verbessern, betrug der Ligationsansatz in einem molaren Verhältnis 1:3 bis 1:5 zwischen DNA Fragment und Vektoren.

Um die PCR-Fehler bei der Amplifizierung der zu klonierenden DNA-Produkten zu verringern, wurde die Phusion® DNA Polymerase (Finnzymes) eingesetzt. Im Anschluss wurden an diese PCR-Produkte bei 72°C mit Hilfe einer Tag-DNA-Polymerase die entsprechenden Restriktionsschnittstellen an das 5´-, 3´-Ende oder an beide Enden angehängt. Diese Fragmente wurden entweder zur Sequenzierung oder zur Klonierung in entsprechende Vektoren durch A-T-Klonierung oder mit Hilfe von einer T4-DNA-Ligase (Invitrogen) verwendet.

Die Sequenzierung der klonierten PCR-Produkte erfolgte (internes Protokolls: *Sequencing with BigDye*) mit dem 3100 Genetic Analyzer (ABI). Die Sequenzdaten wurden mittels DNA-STAR Software (Lasergene; Madison, USA) analysiert.

2.2.5. Real Time quantitative PCR mit interkalierendem Farbstoff SYBR® Green I

Die Real Time quantitative PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von Nukleinsäuren, die prinzipiell auf einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht und zusätzlich eine quantitative Bestimmung der gewonnenen DNA ermöglicht. Der interkalierende Farbstoff SYBR® Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der während der PCR in die doppelsträngige DNA eingelagert wird. Der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei 488 nm und emittiert grünes Licht bei 522 nm. Mit Hilfe der Fluoreszenz-Messung nach jedem Zyklus der PCR wird die Intensität der Fluoreszenz des jeweiligen Zyklus gemessen. Das Verhältnis zwischen gemessener Intensität und eine vorher definierten Fluoreszenz-Intensität, auch als Ct-Wert (*engl. Cycle Threshold*) bezeichnet, wird automatisch durch die Software (MxPro 3000, Stratagene) berechnet. Zur

Berechnung der Transkriptmenge eines zu untersuchenden Gens wird eine Standardkurve (Ct gegen $\log_{10}$[Konzentration]) genutzt. Die relative Genexpression des zu untersuchenden Gens wird durch die Transkriptmenge eines Haushaltsgens (in dieser Arbeit wurde das Gen des eukaryotischen Initiationsfaktors 4 *elF4* genutzt) normiert.

Tabelle 2-7 Programm der Real Time quantitative PCR

Programm	Temperatur	Zeit und Detektion
1	95 °C	10 min,
2	60 °C	60 s, Detektion der Floreszenz nach Elongation
3	95 °C	15 s, gehen zu Schritt 2 zurück, 40 Zyklen
4.	95 °C	15 s, letzte Detektion der Floreszenz, dann abkühlen

2.2.6. Anzucht der Pflanzen

Die Anzucht der *Arabidopsis thaliana* auf Erde erfolgte in einer Anzuchtkammer (Firma YORK) unter Kurztagbedingungen mit 10 h Licht bei 23°C und 14 h Dunkelheit bei 20°C sowie einer Luftfeuchtigkeit von 60% oder unter Langtagbedingung mit 16 h Licht bei 23 °C und 8 h Dunkelheit bei 20°C sowie einer Luftfeuchtigkeit von 40-60%.

Die axenischen Ganzpflanzenkulturen von *Arabidopsis thaliana* wurden durch Aussaat oberflächensterilisierter Samen auf Medium B bzw. Medium A unter Langtagbedingungen in Petrischalen erzeugt. Zur Sterilisation wurden die Samen 2 min in 70%igem Ethanol, 4 min in 1:3 bis 1:2 verdünnter Bleach®-Lösung (Natriumhypochlorid-Lösung) inkubiert und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen.

Die Anzucht der Pflanzen für die Untersuchung des Wurzelwachstums nach Bestrahlung durch UV-B Strahlung wurde auf 2 verschiedenen Medien durchgeführt. Aussaat der Samen und ein 4-Tages-Wachstum der Keimlinge erfolgte auf Medium B und danach wurden die vier Tage alten Keimlinge auf Medium A mit einer Pinzette transportiert. Am nächsten Tag wurden die Keimlinge mit einer definierter Dosis der UV-B Strahlung bestrahlt. Für die Untersuchung des Pflanzenwachstums wurde die Pflanze direkt auf Medium C 10 Tage angezüchtet, und dann mit einer definierten Stärke der UV-B Strahlung bestrahlt. Die behandelten Pflanzen wurden gleich in die Kulturkammer zurückgesetzt.

2.2.7. Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zum Kreuzen wurden von ungeöffneten Knospen die als weiblicher Kreuzungspartner vorgesehenen Pflanze mit Hilfe einer Pinzette alle Blütenorgane mit Ausnahme des Stempels entfernt. Im Anschluss wurde eine geöffnete Blüte des männlichen Kreuzungspartners mit der Pinzette so am Blütengrund gefasst, dass sich die Blüte beim Zusammendrücken der Pinzette weit öffnete. Dadurch standen die Staubgefäße frei nach außen, so dass damit der Stempel des weiblichen Kreuzungspartners bestäubt werden konnte.

2.2.8. Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Die von Agrobakterien vermittelte Transformation in *Arabidopsis thalina* erfolgte nach der Blütentauchmethode (Clough und Bent, 1998). Die Agrobakterien wurden in 3-5 ml flüssigem LB Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 25 mg/l Rifampicin und 50 mg/l Gentamycin über Nacht kultiviert. Diese Übernachtkultur wurde mit einem Volumenverhältnis von 1 zu 100 bis 500 in entsprechendes flüssiges LB Medium mit 50 mg/l Kanamycin, 25 mg/l Rifampicin und 50 mg/l Gentamycin gegeben. Nach einer Kultivierung bei 28 °C und 200 U/min über Nacht erfolgte eine Zentrifugation bei 4000 g für 10 min. Anschließend wurde das Bakterienpellet in Infiltrationsmedium (50 g/l Saccharose, 500µl/l Silwet L-77) bis zu einer OD_{600} 0,8 resuspendiert. In diese Suspension wurden dann die Blütenstände und Blattrosetten von gerade mit dem Blühen beginnenden Pflanzen für einige Sekunden eingetaucht. Die infiltrierten bzw. eingetauchten Pflanzen wurden für 24 h dunkel gestellt und dann bis zum Reifen der Samen unter Langtag- oder Kurztagbedingungen kultiviert. Um transgene Pflanzen zu gewinnen, wurden die Selektionsmarker Kanamycin- oder Hygromycin-Resistenz eingesetzt. Durch Aussaat der nach Blütentauchmethode gewonnenen Samen auf Medium C mit 50 µg/l des entsprechenden Antibiotikums wurden die transgenen Pflanzen von den nicht transgenen Pflanzen getrennt. Die Kultivierung der Keimlinge erfolgte unter Langtagbedingung. Nach ca. 2 Wochen wurden die überlebenden Pflanzen auf Erde umsetzt.

2.2.9. Transformation von Bakterien

Um kompetente Zellen herzustellen, wurden 2-4 ml einer Übernachtkultur von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 in 100 ml LB-Flüssigmedium mit 50 mg/l Gentamycin und 25 mg/l Rifampicin gegeben und für 6-10 h im Schüttelinkubator bei 28°C und 160 U/min kultiviert. Nach dem Abkühlen der Kultur im Eisbad wurden die Zellen für 10 min bei 3000g sedimentiert. Anschließend wurden die kompetenten Zellen in 50ml LB-Medium resuspendiert, zu jeweils 80 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Zur Transformation wurde ein 80 µl Aliquot kompetenter Zellen ca. 11 min im Eisbad aufgetaut, 1-5 µg Plasmid-DNA zugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in die vorher im Eisbad gekühlte Küvette (spezifisch für Elektroporator mit Aluminium-Elektroden) überführt. Nach der Elektroporation wurde die Zellen durch Zugabe von 600 µl SOC-Medium für ca. 30 min bei 28°C und 160 U/min im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Selektion wurden 100 µl des Ansatzes auf eine Selektionsplatte ausplattiert und ca. 48 h bei 28°C bebrütet.

2.2.10. Behandlung der Pflanzen

2.2.10.1. Verwundungstest auf pflanzlichen Blättern

Um dieses Experiment durchzuführen, wurden 4 Wochen alte Pflanzen (Wachstum unter Langtagbedingung) eingesetzt. Die Blätter wurden mit Hilfe eines dünnen Drehrades verwundet und nach bestimmter Zeitdauer wurden die verwundeten Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die nicht verwundeten Blätter wurden als negative Kontrolle verwendet.

2.2.10.2. Pathogenwachstumstest in pflanzlichen Blättern

P. syringae ist ein sehr beliebtes Bakterium für die Untersuchung der Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen. In dieser Arbeit wurde der Stamm von *P. syringae pathovar tomato DC 3000* (Pst DC3000) eingesetzt. *Pst DC3000* wurde in (Rif, tetra, Gen) flüssigem LB-Medium über Nacht bis zu einer OD_{600} 1,0 kultiviert.

Anschließend wurde mit 0,05 M $MgCl_2$ auf eine OD_{600} von 0,001 verdünnt. Diese Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer 1 ml Spritze in die untere Seite der Blätter eingespritzt. Nach 2 und 4 Tagen wurden eine ca. 4 cm^2 Fläche der infizierten Blätter geerntet und in 300 µl sterilen Wasser mit einem Plastikstäbchen zermörsert. Von der Suspension wurden dann verschiedene Verdünnungen hergestellt und 30 µl Suspension der jeweiligen Verdünnung wurden auf LB-Agar Medium aufgetragen. Die Platten wurden 36 h bei 26 °C inkubiert und die Kolonien auf den Platten ausgezählt.

2.2.10.3. Bestrahlung der Pflanzen mittels UV-B Strahlung

Durchgeführt wurde dieses Experiments in einer Arbeitssicherheitsbank. Eine UV-B Lampe (Ultraviolett-B TL40W/12RS, Philips) wurde als Stressquelle eingesetzt. Die pflanzlichen Materialien wurden unter bestimmten Anzuchtbedingungen kultiviert und in Kontakt mit der UV-B Strahlung gebracht. Die Intensität der UV-B Strahlung wurde in allen Versuchen auf 200 µW/cm² konstant gehalten. Die Bestrahlungsdauer wurde beim Wurzelwachstumstest bis zu 150 min und beim Pflanzenwachstumstest nach UV-B Bestrahlung auf 150 min festgelegt.

2.2.11. Extraktion der Phytohormone

Die behandelten Pflanzengewebe wurden erst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann zermörsert. Das zerkleinerte Pflanzengewebe wurde zu ca. 150 mg in 2,0 ml Reagenzgefäßen aliquotiert und zu jedem Reagenzgefäßen 2 Stahlkügelchen (5 mm Durchmesser) hinzugegeben. Die Extraktionslösung bestand aus Ethylacetat und interner Standardlösung, das Volumenverhältnis der beiden Komponenten betrug 250:1. Beim Extraktionsvorgang wurden zu jedem Reagenzgefäß 1ml Extraktionslösung zugegeben und danach in einem Homogenisator (200 Stocke/min, 60 Sekunden) behandelt. Nach der Homogenisation wurden die Proben 10 Minuten bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reagenzgefäß überführt. Um die Ethylacetat zu entfernen, wurden ein *Eppendorf-Concentrator* (Vakuum, 35 min, 30°C) verwendet. Nach der Evaporation befanden sich alle trocken Rückstände am Boden des Reagenzgefäßes. Es wurden 580 µl 70%iges Methanol in

das Reagenzgefäß zugegeben, dann 10 min gemischt und gleich danach zentrifugiert (10 min, 13000 U/min, 4°C). 550 µl des Überstands wurden in ein 1 ml Glasgefäß überführt und mit einem Flüssig-Chromatographie–Massenspektrometer (LC–MS) der Überstand quantitativ nach Jasmonsäure, Salizylsäure, (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine und Abscisinsäure analysiert.

2.2.12. Histochemische Methoden - DAPI-Färbung

Unter DAPI versteht man *4',6-Diamidin-2-phenylindol*, ein Fluoreszenzfarbstoff, der in der Fluoreszenzmikroskopie zur Markierung von DNA verwendet wird. Bei DAPI in Verbindung mit doppelsträngiger DNA liegt das Absorptionsmaximum bei 358 nm und das Emissionsmaximum bei 461 nm. Da dieser Stoff in lebende Zelle eindringen kann, wird DAPI häufig zur Detektion der lebenden Zellen benutzt.

In dieser Arbeit wird mit dieser Methode nur die Pflanzenwurzel angefärbt. Die Stabilisierung der Wurzel fand in einer Lösung (1 Teil Essigsäure und 3 Teil Ethanol) statt, nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Wurzel gründlich mit PBS-Puffer gewaschen. Als Färbelösung wurden die kommerziellen Kits von Invertrogen genutzt. Die optimierte Einwirkungszeit wurde auf 5 min festgegelegt, und die Bilder der angefärbten Wurzel mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops (Leica DM6000B) bei der Anregungswellenlänge 358 nm und Detektionswellenlänge 460 nm aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1. Die essenzielle Rolle der AtUPF2 im pflanzlichen NMD-Prozess

Obwohl einige SALK T-DNA Mutanten im UPF1 und UPF3 Gen schon berichtet wurden (Arciga-Reyes et al., 2006; Hori und Watanabe, 2005; Yoine et al., 2006a), war die SALK T-DNA Mutante von UPF2 (At2G39260) in der SALK-Samenbank noch nicht enthalten. Demzufolge wurde eine stabile Linie des UPF2 mittels RNAi-Technologie konstruiert. Mit Real Time quantitativer PCR (qRT-PCR) wurden die Transkriptionslevel der UPF2 in 8 verschiedenen Pflanzen der T1-Generation getestet. Eine ca. 70%ige Reduktion der Transkriptionsmenge des UPF2 in den 8 Mutanten im Vergleich zur Col-0 wurde gemessen.

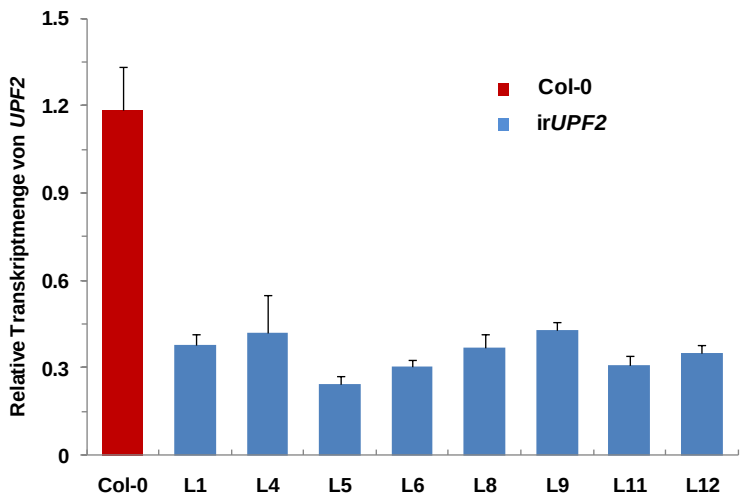


Abbildung 3-1: Transkriptmenge von UPF2 in ir*UPF2* und Col-0

In 5 der 8 Mutanten wurden mittels Southern-Blot die einfache T-DNA Insertion des Konstrukts *35S:RNAiUPF2 (Anhang 2)* ermittelt. 2 Linien ir*UPF2*-1 (L1) und ir*UPF2*-6 (L6) wurden als Versuchskandidaten willkürlich ausgewählt. Die Nachkommen (UPF2 Homozygoten) der beiden ir*UPF2*-Linien wurden als Versuchspflanzen in dieser Arbeit eingesetzt. *upf1-5* (SALK_112922) und *upf3-1* (SALK_025175) Mutanten, deren fehlende Funktion in UPF1 und UPF3 im NMD in 2005 und 2006 schon identifiziert wurden, wurden auch in dieser Arbeit als Versuchspflanzen eingesetzt (Arciga-Reyes et al., 2006; Hori und Watanabe, 2005).

Es wurde zunächst untersucht, ob die UPF2 für den NMD-Prozess in *Arabidopsis* notwendig ist. Wildtyp-Pflanzen (Col-0), ir*UPF2*-1 und ir*UPF2*-6 wurden unter Kurztag- und Langtagbedingungen angezüchtet. Die Transkriptmenge der PTC enthaltenden

Gene wurden mittels qRT-PCR in Col-0, *irUPF2*-1 und *irUPF2*-6 Pflanzen, deren Wachstumsphase sich in der Rosetten-Phase befand, getestet. Im Vergleich zu den Transkriptmengen der PTC enthaltenden Gene in Col-0 zeigte sich in ir*UPF2* Pflanzen eine signifikante Erhöhung unter beiden Wachstumsbedingungen an. (Tabelle 3-1)

Tabelle 3-1 Verhältnis der Transkriptmenge der PTC enthaltenden Gene zwischen ir*UPF2* (ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6*) und Wildtyp-Pflanzen

PTC-enthaltende Gene	Langtagbedingung		Kurztagbedingung	
	ir*UPF2-1/WT*	ir*UPF2-6/WT*	ir*UPF2-1/WT*	ir*UPF2-6/WT*
At1G01060 [a]	3.01*	2.70**	2.26**	1.92**
At3g53240 [b]	2.31***	4.08***	3.22***	4.31***
At3g53400 [b]	2.51***	3.97***	4.31**	5.20**
At5G45430 [b]	2.90***	4.53***	3.92***	4.23**
At1G69252 [b]	2.32***	4.82***	4.58***	6.65***
At2G13970 [b]	3.38***	6.68***	4.10***	6.29**

[a] Arciga-Reyes 2006; [b] Kurihara 2009; Statistische Auswertung nach t-Test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; n= 5

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass UPF2 (kodiert von At2G39260) eine effiziente Wirkung auf den NMD-Prozess zum Abbau der Transkripte PTC enthaltender Gene in *Arabidopsis thaliana* hat. Die Photoperiode hat keinen starken Einfluss auf diesen Prozess.

3.2. Anormale Wachstumsphänotypen der *upf1-5*, ir*UPF2* und *upf3-1*

Über beide *UPF1* und *UPF3* wurde schon 2006 berichtet, dass sie in der Pflanzenentwicklung eine wichtige Rolle spielen (Arciga-Reyes et al., 2006). Um zu testen, ob UPF2 auch an der Pflanzenentwicklung beteiligt, ist oder ob alle 3 NMD-Proteine ähnliche anormale Phänotypen verursachen, wurden die Mutanten und die Col-0 unter Langtag- und Kurztagbedingungen kultiviert, die morphologischen Änderungen wurden registriert. (Abb. 3-2)

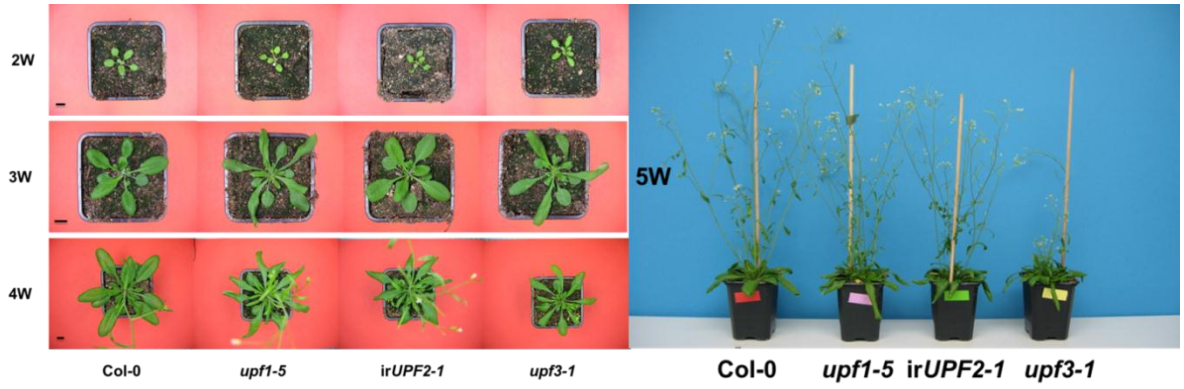


Abbildung 3-2: Wachstumsphänotypen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1* unter Langtagbedingung

Die Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden gleichzeitig ausgesät und unter Langtagbedingung (16 h Licht) kultiviert. Die Pflanzen wurden wöchentlich nach dem Aussäen fotografiert. (W = Woche). Balken = 1 cm

Im Vergleich mit der Col-0 unter Langtagbedingung hatten *upf1-5* und *upf3-1* schmale und epinastische Blätter. ir*UPF2* zeigte auch die epinastische Krümmung der Blätter im Verlauf der Entwicklung. Beide *upf1-5* und *upf3-1* hatten breite Blattstiele, aber nicht ir*UPF2*. Außerdem hatten allen Mutanten kleine Rosetten und kurze Stiele. Vor allem UPF3 zeigte ein gehemmtes Wachstum, ähnlich wie *upf1-5* (Arciga-Reyes et al., 2006). Trotz der Normalität der Morphologie der Blüte wurde auch einen sehr kleiner Anteil anormaler Blüte in ir*UPF2*-1 und ir*UPF2*-6 gefunden. (Abb. 3-3)

Abbildung 3-3: Anormaler Phänotyp der Blüte

Col-0 und ir*UPF2* wurden unter Langtagbedingung (16 h Licht) kultiviert. Ein kleiner Anteil der Blüte der ir*UPF2* zeigte einen anormalen Phänotyp.

Unter Kurztagbedingung zeigten die Pflanzen keinen großen Unterschied bevor sie in die reproduktive Phase übergingen. Die Blätter aller Pflanzen sahen ähnlich aus, obwohl die Rosettengröße ein bisschen größer in *upf1-5* und kleiner in ir*UPF2* war. Im Vergleich der Stiele aller Mutanten fällt der kurze, wachstums gehemmte Stiel der *upf2* Mutanten auf. (Abb. 3-4)

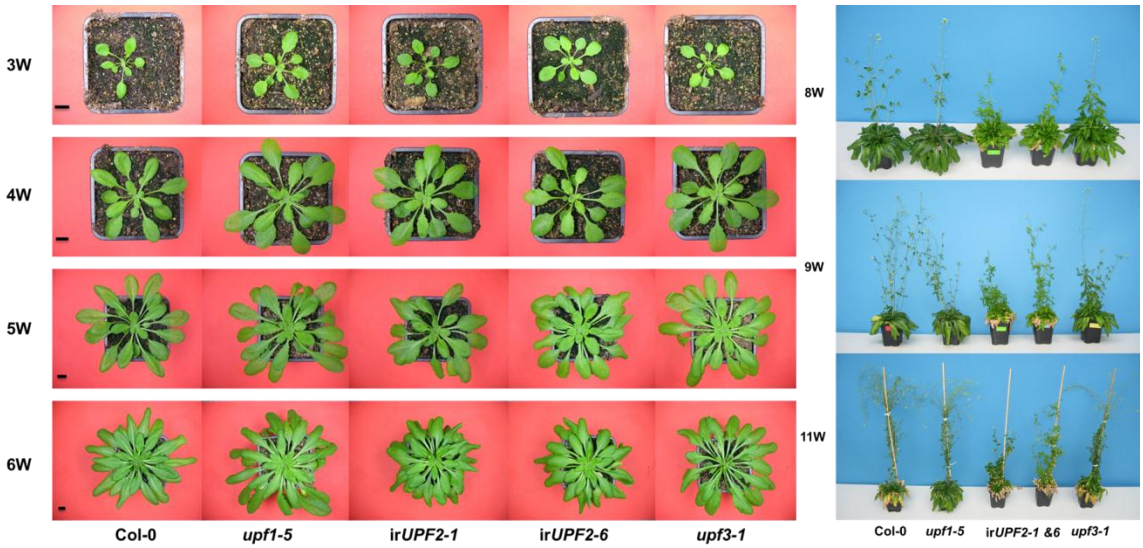


Abbildung 3-4: Wachstumsphänotypen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1* unter Kurztagbedingung

Die Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden gleichzeitig ausgesät und unter Kurztagbedingung (10 h Licht) kultiviert. Die Pflanzen wurden wöchentlich nach dem Aussäen fotografiert. (W = Woche). Balken = 1 cm

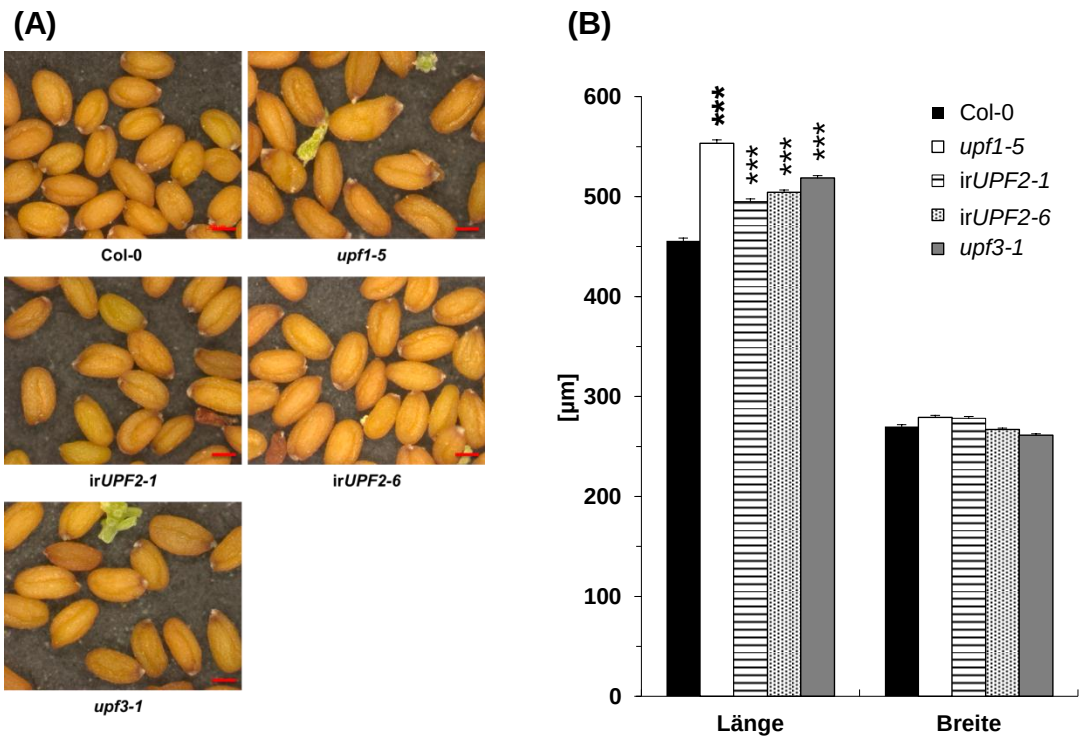


Abbildung 3-5: Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1/6* und *upf3-1*

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1,* ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden unter Langtagbedingung kultiviert.
(A) Fotos der trockenen Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1,* ir*UPF2-6* und *upf3-1*, Balken = 200 µm;
(B) Mittelwert der Samengröße und Samenbreite
Statistische Auswertung nach T-test: ***, p<0,001; n>150.

Samen, die aus einer anderen Homozygoten der UPF1 Mutanten *Iba1* gewonnen wurden, waren länger als die aus Col-0 (Yoine et al., 2006a). Die Samen, die in (Abb.3-5) dargestellt wurden, wurden aus unter Kurztagbedingung kultivierten Col-0, *upf1-5*, *upf3-1*, und ir*UPF2* Pflanzen geerntet und ihre Länge und Breite gemessen. Ähnlich wie *Iba1* waren die Samen von *upf1-5* ca. 22% länger Samen als Col-0. Die Samen von *upf3-1* und ir*UPF2* waren auch länger als die Samen von Col-0, aber nicht so signifikant wie die Samen von *upf1-5* (10% länger in *irUPF2* und 14% länger in *upf3-1*). Überraschenderweise blieb die Breite der Samen fast unverändert.

3.3. Stressantwort gegen Pathogeninfektion

Um zu testen, ob NMD-Proteine bei der pathogeninduzierten Stressantwort in *Arabidopsis* eine Rolle spielen, wurde der *Pseudomonas syringae pv. tomato* Stamm DC3000 (*Pst* DC3000), ein häufig verwendetes Pflanzenpathogen ausgewählt. Eine Suspension dieser Bakterien (OD_{600}=0,001) wurde mit Hilfe einer Spritze in die Blätter von Col-0, *upf1-5*, *upf3-1*, und UPF2-silenced Pflanzen eingespritzt. Nach einem vorher definierten Zeitintervall wurden die behandelten Blätter geerntet und der Salizylsäuregehalt in den Blättern wurde mittels HPLC-MS/MS ermittelt (Abb. 3-6).

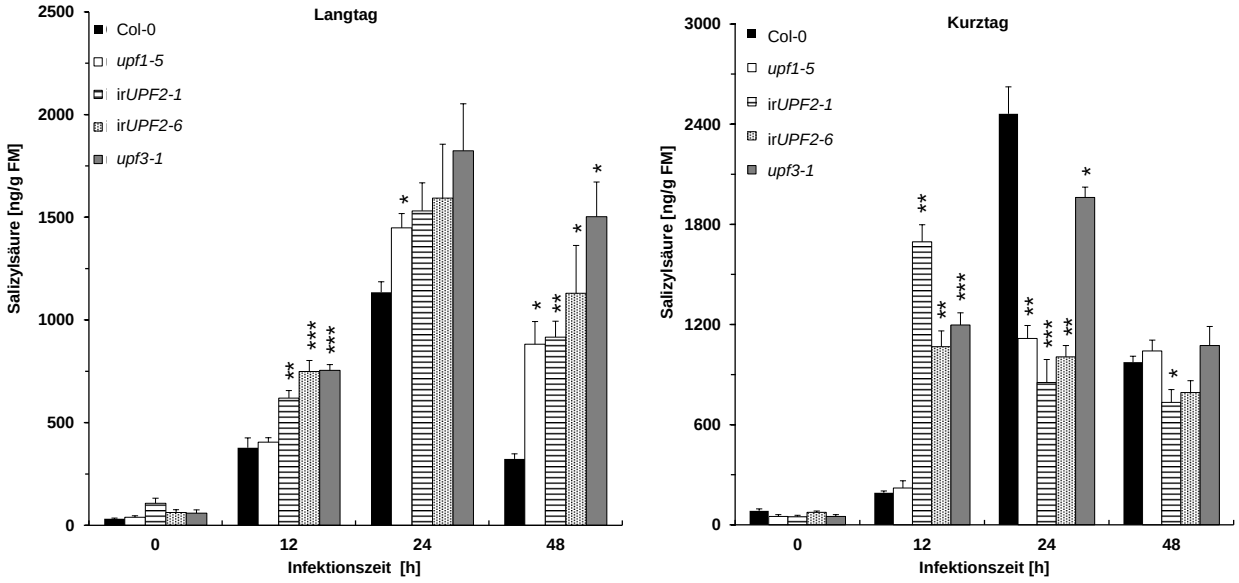


Abbildung 3-6: Akkumulation der Salizylsäure nach *Pseudomonas syringae pv. tomato* DC3000 Infektion

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden mit *Pseudomonas syringae pv. Tomato* DC3000 infiziert. Der Salizylsäuregehalt unter Langtagbedingungen (rechts) und Kurztagbedingungen (links) wurde gemessen.
Statistische Auswertung nach t-Test: *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001, n=5

Nach Infektion mit den Pflanzenpathogen war der Salizylsäuregehalt wesentlich höher in den Mutanten als in Col-0. 12 h nach der Infektion war der Salizylsäuregehalt unter Langtagbedingungen in ir*UPF2* um 81% und in *upf3-1* um 100% höher als in Col-0. Auch nach 48 h Infektion war der Salizylsäuregehalt in Mutanten um ein Mehrfaches erhöht gegenüber Col-0 (1,7-fach in *upf1-5*; 2,2-fach in ir*UPF2* und 3,6-fach *upf3-1*).

Unter Kurztagbedingung war der Salizylsäuregehalt in Col-0 nach 12 h Pathogenindektion nur geringfügig erhöht. Dagegen wurde in ir*UPF2* und *upf3-1* eine mit Col-0 verglichen um das fünf-fache erhöhte Salizylsäureakkumulation festgestellt,

allerdings nicht in *upf1-5*. Nach 24 h Infektion zeigte Col-0 den höchsten Salizylsäuregehalt im Vergleich zu den Mutanten. 48 h nach der Infektion war kein Unterschied des Salizylsäuregehaltes zwischen den Mutanten und Col-0 mehr vorhanden. Um zu testen, ob die verschiedenen Salizylsäuregehalte mit entsprechenden Hemmwirkungen auf das Pathogenwachstum korrelieren, wurde ein Pathogenwachstumstest (mit *Pst DC3000*) in *upf1-5*, ir*UPF2*, *upf3-1* und Col-0 unter Lang- und Kurztagbedingung durchgeführt.

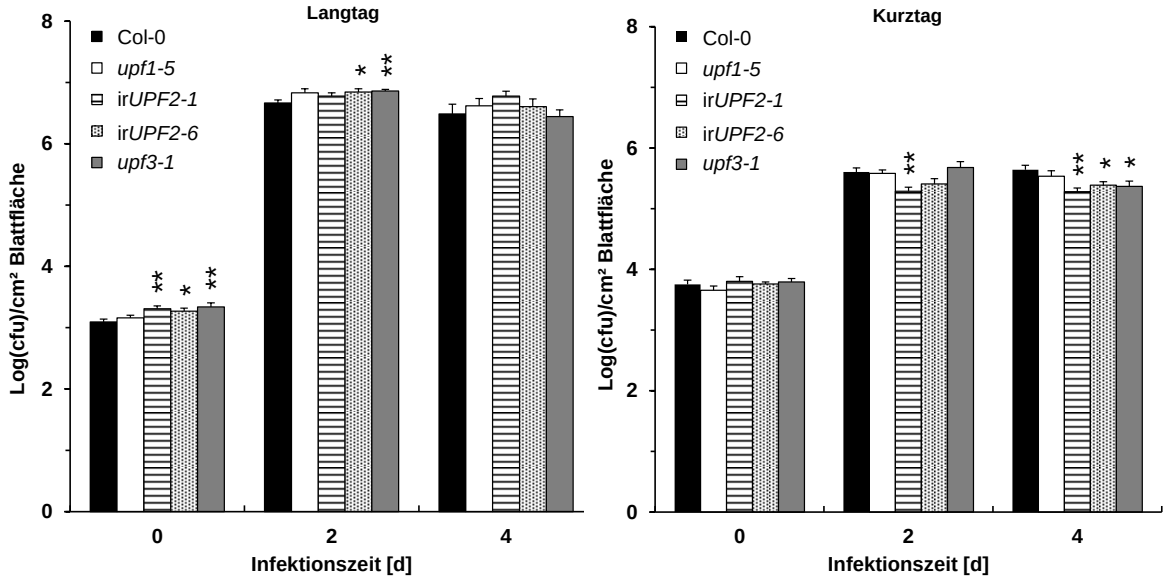


Abbildung 3-7: Pathogenwachstumstest

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2* (ir*UPF2-1* und ir*UPF2-6*), und *upf3-1* wurden mit Pst DC3000 infiziert und die Population des Pathogens nach 2 und 4 Tagen ermittelt. Als negative Kontrolle wurde die cfu direkt nach der Infektion gemessen.
Statistische Auswertung nach t-Test: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; $n=10$

Unter beiden Wachstumsbedingungen wurde kein großer Unterschied bakteriellen Populationen in den Mutanten und der Wildtyp-Pflanze gefunden. Demzufolge hängt das Pathogenwachstum nicht von Salizylsäuregehalten in den Mutanten und Col-0 ab. Aber die NMD-Proteine haben wahrscheinlich nicht direkt Einfluss auf den Salizylsäuregehalt, sondern spielen bei der Gleichgewichtsregulation des Salizylsäuregehalts nach der Pathogeninfektion eine Rolle.

3.4. Stressantwort gegen mechanische Verwundung

Jasmonsäure spielt eine entscheidende Rolle in der Stressantwort der Pflanzen nach mechanischer Verwundung. Abb. 3-8 zeigt den durch Verwundung induzierten Jasmonsäuregehalt in den Blättern.

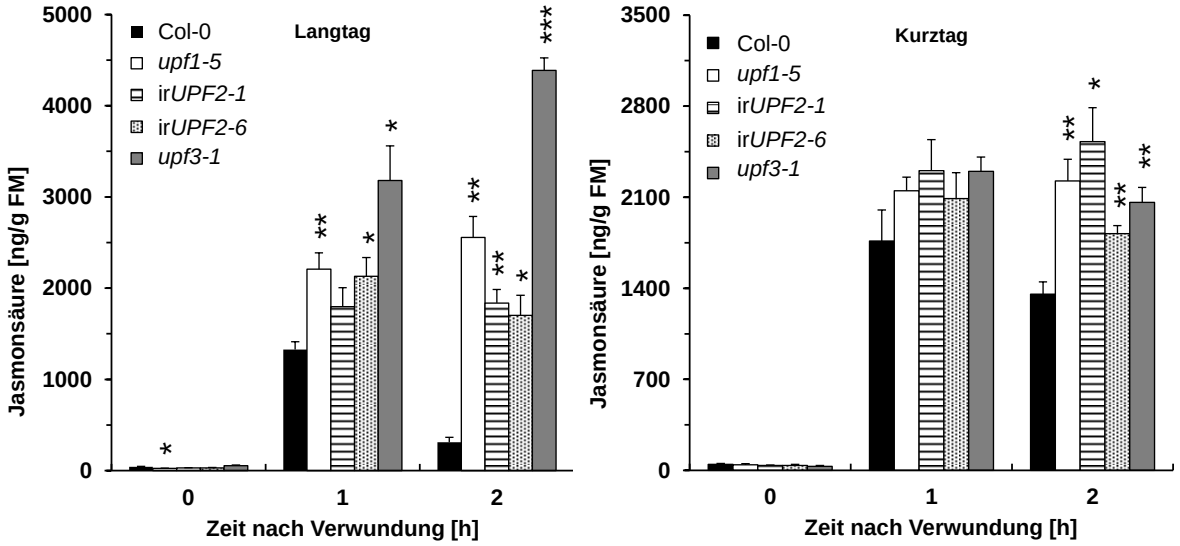


Abbildung 3-8: Akkumulation der Jasmonsäure nach Verwundung

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1,* ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden mit Hilfe eines Drehrades verwundet. Der Jasmonsäuregehalt in den verwundeten Blättern der Langtagpflanzen (rechts) und der Kurztagpflanzen (links) wurde gemessen.
Statistische Auswertung nach t-Test: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$, n=5

Unter Langtagbedingung wurde in Col-0 eine Stunde nach der Verwundung ein hoher Jasmonsäuregehalt in den behandelten Blättern gefunden. In den Mutanten zeigte sich aber eine höhere Akkumulation der Jasmonsäure in Blättern. Auffallende Weise war das Absinken des Jasmonsäuregehaltes in Col-0 2 h nach Behandlung, der Jasmonsäuregehalt in ir*UPF2* blieb jedoch fast gleich und in *upf3-1* erhöhte er sich sogar. Unter Kurztagbedingung blieben die Jasmonsäuregehalte fast unveränderlich in allen Pflanzen, es zeigte nur eine kleine Erhöhung (34%) des Jasmonsäuregehaltes bei 2 h nach der Behandlung in den Mutanten im Vergleich zu Col-0.

Die Gene, die Downstream des Stoffwechselweges der Jasmonsäure bzw. Signaltransduktionsweges der Jasmonsäure liegen, wurden als Marker-Gen zur Untersuchung der Jasmonsäure induzierter Stressantwort verwendet. Zwei wichtige Gene wurden in dieser Arbeit genutzt, LOX2 (*lipoxygenase 2*) und VSP2 (*vegetative storage protein 2*). Die Pflanzen wurden mit einem Drehrad verwundet und die Proben 8

h nach der Verwundung geerntet. Die Transkriptmenge von LOX2 in den Pflanzen, die unter Langtagbedingung kultiviert worden sind, waren niedriger in den Mutanten als in Wildtyp-Pflanzen. Zum Vergleich der Transkriptmenge von LOX2 in den Mutanten unter Kurztagbedingung war nur wenig höher als die Wildtyp-Pflanzen

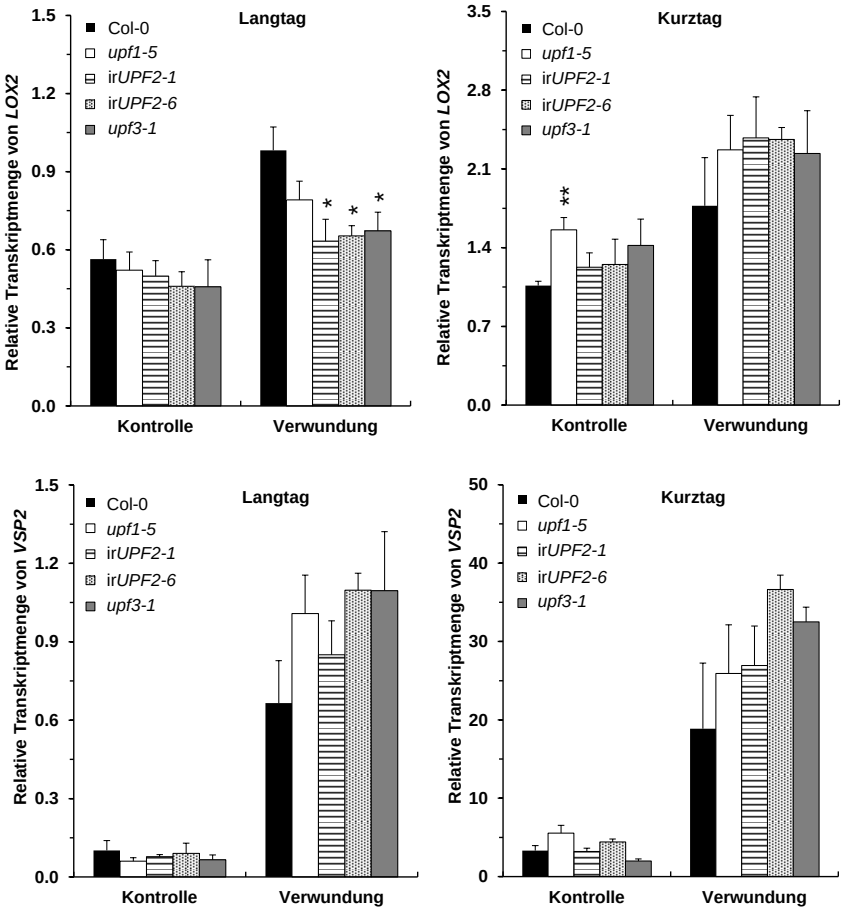


Abbildung 3-9: Transkriptionelle Änderung der LOX2 und VSP2 nach Verwundung

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden unter Langtagbedingung und Kurztagbedingung gezüchtet. Die Pflanzen wurden mit Hilfe eines Drehrades verwundet. 8 h nach der Verwundung wurden die Proben geerntet. Als Kontrolle wurden die nicht verwundeten Pflanzen genommen. Die Menge der Transkripte von *LOX2* und *VSP2* wurde mittels qRT-PCR analysiert.
Statistische Auswertung nach t-Test: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; n=5

Ein anderes Marker-Gen war VSP2, dessen Transkriptmenge in Mutanten höher als in Wildtyp-Pflanzen, sowohl unter Langtagbedingung also auch unter Kurztagbedingung. Zusammenfassend sind die NMD-Proteine bei der Verwundung induzierten Akkumulation der Jasmonsäure abhängig von den Wachstumsbedingungen. Weiterhin sind der NMD-Proteine an der trankriptionellen Regulation der durch Verwundung induzierten Gene beteiligt.

3.5. Methyl-Jasmonate ausgelöste transkriptionelle Veränderung

Trotz eines stark induzierten Jasmonsäuregehaltes nach der Verwundung in Mutanten und Wildtyp Pflanzen zeigten sich keine Änderungen der Transkriptmenge von LOX2 was normalerweise von Jasmonsäure induziert sein müsste. Deshalb wird angenommen, dass ein Knock-down oder Knock-out der NMD-Proteine zu einer Verringerung Sensitivität der Jasnomsöure führte und die normale Funktion der Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 in der Reaktion der Jasmonsäure gestört wurde. Zum Testen dieser Hypothese wurden Methyljasmonate (MeJA) in Lanolin gelöst und auf die Blätter gestrichen. Als negative Kontrolle wurden die mit reinem Lanolin bestrichenen Blätter genutzt.

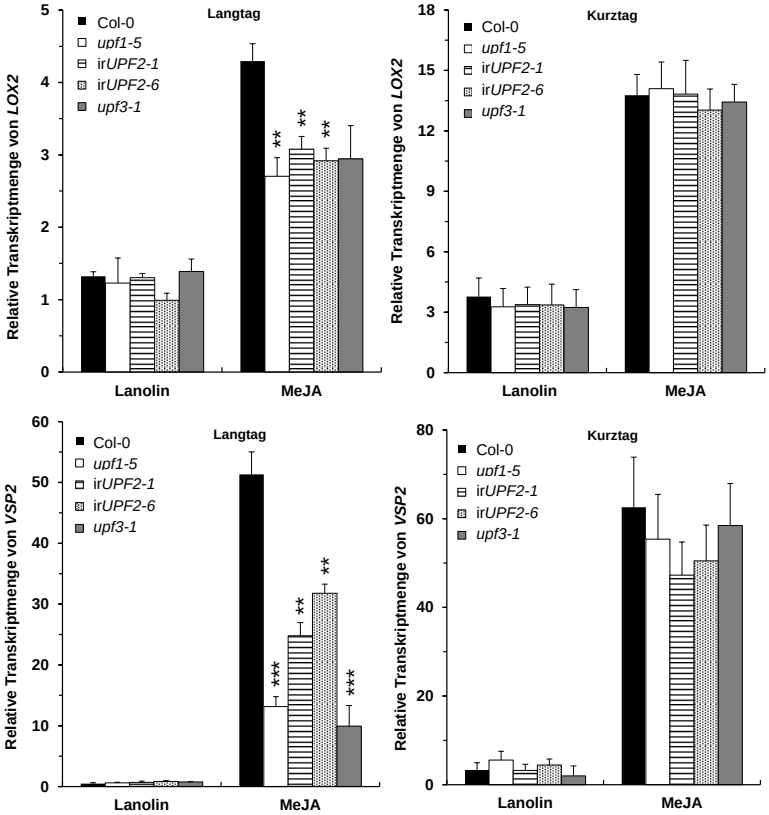


Abbildung 3-10: Transkriptionelle Veränderungen der LOX2 und VSP2 nach der MeJA Behandlung

Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* wuchsen unter Langtagbedingung und unter Kurztagbedingung. Die Blätter wurden mit 10 µl Lanolin (100 µg MeJA) bestrichen. Als negative Kontrolle wurde 10 µl reines Lanolin benutzt. 8 h nach der Behandlung wurden die Proben geerntet. Die Transkriptmenge von *LOX2* und *VSP2* wurde mittels qRT-PCR analysiert. Statistische Auswertung nach t-Test: *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; n=5

Die Transkriptmenge von LOX2 und VSP2 nach der MeJA Behandlung unter Langtagbedingungen kultivierten Wildtyp-Pflanzen erhöhte sich um das 2,1-fach bzw.

27-fache im Vergleich zu den Werten der Wildtyp-Pflanzen. Aber verglichen mit den Transkriptmengen der beiden Gene in den Wildtyp-Pflanzen, zeigte sich in den Mutanten eine ca. 32% niedrigere Transkriptmenge von LOX2 und sogar eine noch viel stärker reduzierte Transkriptmenge von VSP2 (74% in *upf1-5*, 55% (Mittelwert beider Linien) in *irUPF2*, und 81% in *upf3-1)*. Diese Daten bestätigten die oben genannte Hypothese, dass die NMD-Proteine die Sensitivität der Jasmonsäure beeinflussen. Im Gegensatz dazu wurden ähnliche Transkriptmengen beider Gene in den Wildtyp-Pflanzen und in den Mutanten gemessen, wenn die Pflanzen unter Kurztagbedingungen kultiviert wurden. Demzufolge könnte man sagen, dass die NMD-Proteine bei der Jasmonate induzierten transkriptionellen Regulation unter Langtagbedingung notwendig sind, aber nicht unter Kurztagbedingung.

3.6. Stressreaktion gegen UV-B Strahlung

Um zu testen, ob die NMD-Proteine wichtig für die Reparatur der durch UV-B Strahlung verursachten DNA-Schädigungen sind, wurde ein Wurzelwachstumstest der Keimlinge von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2* und *upf3-1* durchgeführt. Die Bestrahlungsstärke wurde nach einigen Vorexperimenten optimiert und auf 2 $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ (UV-B Intensität an definierter Oberfläche) festgelegt. Nach 10,8 $kJ \cdot m^{-2}$ (90 min) Bestrahlung wurden die Keimlinge zurück in die Kulturkammer transportiert. Abb. 3-11 zeigt die Wurzellänge der Pflanzen 5, 7 und 10 Tage nach der Bestrahlung.

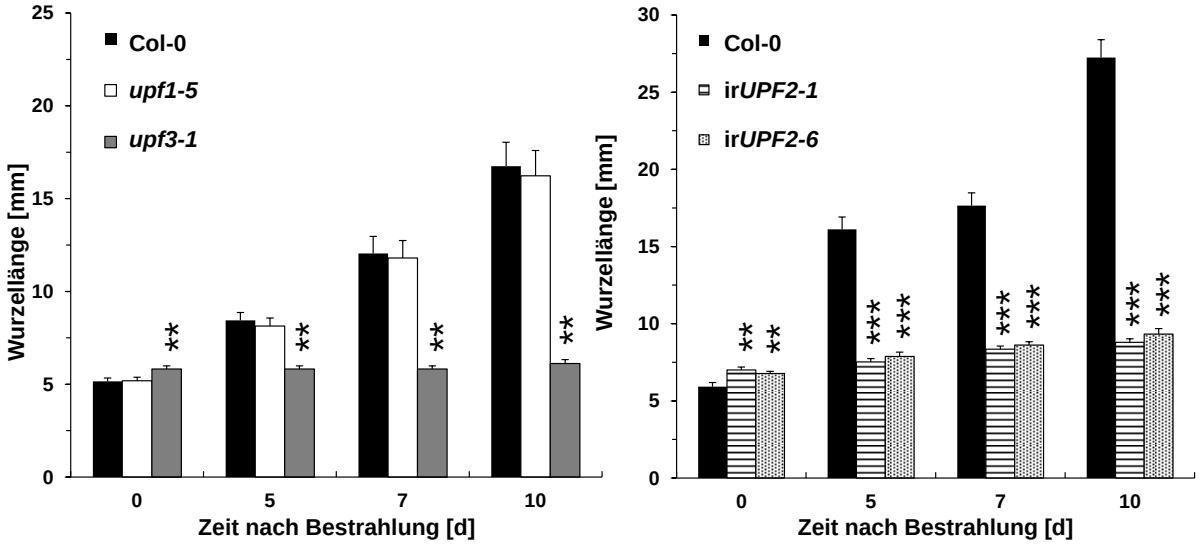


Abbildung 3-11: Wurzelwachstumstest nach UV-B Bestrahlung

Die Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden gleichzeitig auf Medium B ausgesät. Nach fünf Tagen Wachstum wurden die Keimlinge auf Medium A übertragen und einen Tag nach dem Transfer mittels UV-B Strahlung (mit einer Intensität von 2 $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) 90 min bestrahlt. Die Wurzellänge der Keimlinge wurde jeweils nach fünf, sieben und zehn Tagen mit *UTHSCSA ImageTool* ermittelt. Statistische Auswertung nach t-Test: *, $P<0,05$; **, $P<0,01$; $n \geq 20$

Das Wachstum der Keimlinge von *upf3-1* wurde nach Behandlung mittels UV-B Strahlung beinahe gestoppt, ein sehr geringes Wachstum zeigten die irUPF2 Pflanzen nach 5 Tagen und überraschender Weise wiesen die Wurzeln von *upf1-5* kein gehemmtes Wachstum durch den Einfluss von UV-B Strahlung auf. Auch bei einem anderen Experiment, in dem die Wurzel aller Mutanten und Wildtyppflanzen durch kontinuierliche Bestrahlung von 60 min bis 150 min mittels UV-B Strahlung mit gleicher Stärke 2 $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$ behandelt wurden, zeigte *upf1-5* durch DAPI-Färbung (der lebenden Zellen) aller bestrahlten Wurzel nach 90 min eine eindeutige Resistenz gegen UV-B

Strahlung, da ein intensiveres Lichtsignal in der Wurzel von *upf1-5* gefunden wurde. Auf der einen Seite heißt das, dass die Anzahl der lebenden Zelle in den Wurzeln von *upf1-5* und Col-0 höher war als in *upf3-1* und ir*UPF2*. Auf der anderen Seite könnte es bedeuten, dass die fehlende Funktion von UPF2 und UPF3 in ir*UPF2* und *upf3-1* zu einer Fehlfunktion des aktiven Abwehrsystems gegen UV-B Strahlung oder zu einer Fehlfunktion des passiven Abwehrsystems (z. B. DNA Reparatur System) oder zu Fehlfunktionen aller Abwehrsysteme führt. Besonders wurde dieses Phänomen von einem NMD unabhängigen Prozess aber in Abhängigkeit der UPF2 und UPF3 verursacht.

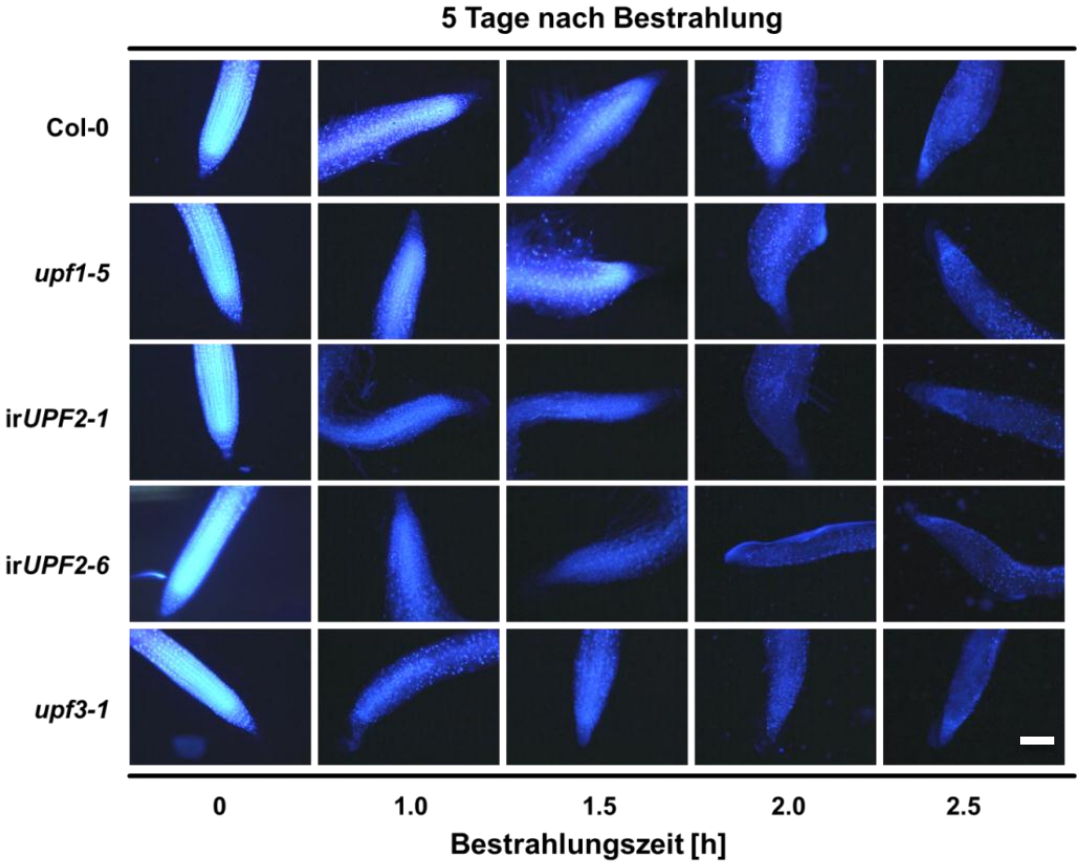


Abbildung 3-12: DAPI Färbung der mit UV-B behandelten Wurzeln

Die Samen von Col-0 und den Mutanten wurden gleichzeitig auf Medium B ausgesät. Nach fünf Tagen Wachstum wurden die Keimlinge auf Medium A übertragen, und einen Tag nach dem Transfer wurden die Keimlinge für 1 h, 1,5 h, 2,0 h und 2,5 h mit UV-B Strahlung (mit einer Intensität von 2 $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) behandelt. Nach der Bestrahlung wuchsen die Keimlinge fünf Tage auf Medium. Anschließend wurden die Wurzeln mit DAPI gefärbt. Die Fotos wurden mit einem Fluoreszenz-Mikroskop aufgenommen. weißer Balken = 100 µm

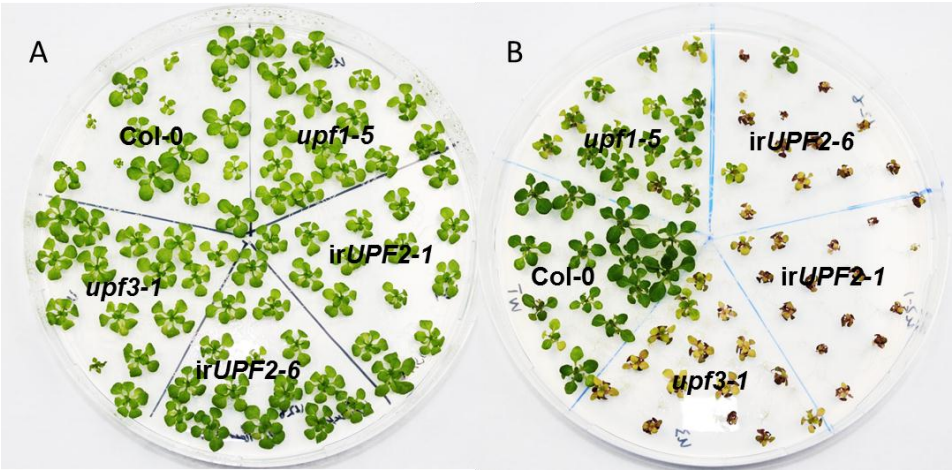


Abbildung 3-13: Behandlung der Pflanzen durch UV-B Strahlung

Die Samen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1,* ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden gleichzeitig auf Medium B ausgesät. Nach acht Tagen Wachstum auf Medium C wurden die Keimlinge für 2,5 h mit UV-B Strahlung (mit einer Intensität von 2 $J \cdot s^{-1} \cdot m^{-2}$) behandelt. Die behandelten Pflanzen wuchsen sieben Tage unter Langtagbedingungen und die Fotos wurden mit einer digitalen Kamera dokumentiert.

Dieses Phänomen wurde sowohl in den Wurzeln als auch in der ganzen Pflanze gefunden. 10-Tage alte Pflanzen von Col-0, *upf1-5*, ir*UPF2-1*, ir*UPF2-6* und *upf3-1* wurden mit einer Dosis von $30 KJ \cdot m^{-2}$ an UV-B Strahlung behandelt. Die Reihenfolge der Resistenz der Pflanzen gegen UV-B Strahlung zeigte Col-0 > *upf1-5* > irUPF2 und *upf3-1*. (Abb. 3-13)

Zusammenfassend zeigten ir*UPF2* und *upf3-1* in allen 3 Experimenten eine Sensitivität gegen UV-B Strahlung. *upf1-5* hatte eine ähnliche Resistenz wie die Wildtyp-Pflanze Col-0. Dies bedeutet, UPF2 und UPF3 in *Arabidopsis thaliana* spielen eine bedeutende Rolle bei der Überwindung des durch UV-B Strahlung induzierten Stress.

4. Diskussion

Die Funktion der NMD-Proteine zur Eliminierung der anormalen mRNA wurde intensiv erforscht (Maquat, 2004; Chang et al., 2007; Isken und Maquat, 2008). Diese Proteine sind auch an der Regulation der fehlerfreien „Wildtyp“-mRNA und den Stressantworten in Säugetier-Zellkultur und *Schizosaccharomyces pombe* beteiligt (He et al., 2003; Mendell et al., 2004; Azzalin und Lingner, 2006; Rodriguez-Gabriel et al., 2006). Aber ob die UPF Proteine bei der Kontrolle und Regulierung der durch Stress ausgelösten Antworten in multizellulären Organismen eine Rolle spielen, ist noch unbekannt. Unter Verwendung von *Arabidopsis thaliana* als Model wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass UPF1, UPF2 und UPF3 an der Pflanzenentwicklung, der Stressantwort bei mechanischer Verwundung, Bestrahlung mittels UV-B Strahlung und Pathogeninfektionen beteiligt sind.

4.1. Die Bedeutung der Wachstumsbedingung des UPF2 vermittelten NMD-Prozesses in *Arabidopsis thaliana*

UPF2 ist schon seit langer Zeit bekannt in verschiedenen Organismen (Conti und Izaurralde, 2005). In Pflanzen wurde die Beteiligung von UPF2 an der Eliminierung der PTC enthaltenden Gene in *N. attenuata* und *N. benthamiana* berichtet (Wu et al., 2007). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass nicht nur UPF1 und UPF3, sondern auch UPF2 an dem NMD-Prozess in *Arabidopsis* beteiligt ist.

Um dies zu beweisen, wurden die Transkriptmengen einiger PTC enthaltenden Gene in ir*UPF2* und Wildtyp-Pflanzen gemessen. Überraschender Weise waren alle Transkriptmengen der PTC-enthaltenden Gene in ir*UPF2* Pflanzen 2-fach höher als die in den Wildtyp-Pflanzen. Außerdem wurde eine ähnliche Erhöhung der Transkriptmenge der PTC enthaltenden Gene in ir*UPF2* Pflanzen, die unter Kurztag- und Langtagbedingung gewachsen sind, beobachtet. Aus diesem Grund erscheinen die Wachstumsbedingungen nicht so wichtig für den NMD-Prozess in Pflanzen im Gegensatz zur Pflanzenentwicklung und Stressantwort gegen Verwundung und Pathogeninfektion.

In *Nicotiana* haben PTC enthaltende Gene eine höhere Transkriptmenge in UPF1 oder UPF2 silenced Pflanzen als die in UPF3. Aus diesem Grund scheinen UPF1 und UPF2 eine wichtigere Rolle im NMD-Prozess zu spielen (Wu et al., 2007; Kerenyi et al., 2008). In Anbetracht ihrer Funktionsüberlappung in NMD oder in einigen anderen zellulären Prozessen ist es vorstellbar, dass die Wachstumsbedingungen (vor allem die Photoperiode) die Effizienz der UPF1 und UPF3 vermittelte Eliminierung der anormalen mRNA gelegentlich beeinflussen.

4.2. UPF Proteine und Pflanzenentwicklung

In dieser Arbeit wurde die Entwicklung der Wildtyp-Pflanze, *upf1-5*, *irUPF2*-1, *irUPF2*- und UPFP3-1 Pflanzen geprüft. Unter Langtagbedingung zeigten die Blätter der *upf1-5* und *upf3-1* eine sehr ähnliche Form im Vergleich zu der Wildtyp-Pflanze. Sie wiesen breite Blattstiele, schmale Blätter und Epinastie auf. Obwohl die Blätter der ir*UPF2* eine ähnliche Form wie die Wildtyp-Pflanze zeigten, wenn die Pflanzen sich in der Rosetten Phasen befanden, veränderten sich die Blättern der ir*UPF2* während der Entwicklung stark zu Epinastie (verstärktes Wachstum der Blatt- oder Blattstiel-Oberseite). Der Phänotyp der epinastischen Blätter wurde vermutlich durch eine Fehlfunktion des NMD-Prozesses verursacht. UPF1 und UPF3, aber nicht UPF2 sind bei der Kontrolle der Entwicklung des Blattstiels beteiligt. Außerdem vermutet man, dass der NMD-Prozess bei der Blumenentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Arciga-Reyes et al., 2006). In allen Mutanten Pflanzen zeigte ein kleiner Anteil der Blüten eine Fehlmorphologie (wie z. B. verdoppelte Narben Abb. 3-3). Die vergrößerten Samen wurden in allen Mutanten gefunden (Abb. 3-5).

Ein stark gehemmtes Wachstum zeigte der *upf3-1* unter Langtagbedingung. Die Erscheinung in *N. attenuata* und *N. benthamiana* deutet an, dass UPF3 eine weniger wichtige Rolle im NMD-Prozess spielt, als UPF1 und UPF2 (Wu et al., 2007; Kerenyi et al., 2008). Deshalb könnte man sagen, dass die Beteiligung von UPF3 bei der Pflanzenentwicklung ein grundlegender NMD unabhängiger Prozess ist. In ähnlicher Weise zeigten die *irUPF2* Pflanzen ein stärker gehemmtes Wachstum als die anderen Mutanten. Der Phänotyp deutet darauf hin, dass UPF2 bei normaler

Pflanzenentwicklung unter Kurztagbedingung notwendig ist und dieser Prozess auch NMD-Prozess unabhängig ist.

Es ist zu vermuten, dass nach den genetischen Veränderungen der NMD-Proteine kodierender Gene die Transkripte einer oder mehrerer Gene, die bei der Kontrolle der Pflanzenentwicklung eine wichtige Rolle spielen, zu diesen anormalen morphologischen Änderungen in *upf1-5*, ir*UPF2*, und *upf3-1* führen. In diesen Genen würden sehr wahrscheinlich ähnliche Strukturen existieren, deren mRNAs als anormalen mRNA erkannt (die Anwesenheit eines offenen Leserasters in 5‘ UTR, oder PTC in Protein-kodierendem Gen), die Transkriptmengen von den NMD-Proteinen kontrolliert und reguliert, oder ihre RNAs als nonprotein-kodierende RNA bezeichnet werden. Die fehlende Funktion der NMD-Proteine führt zu einer Akkumulation dieser RNAs, deren Transkriptmenge eine spezifische regulierende Funktion bei der Pflanzenentwicklung haben könnte. Aber wie diese Proteine spezifisch in der Entwicklung funktionieren, ist noch unbekannt.

Die Funktion der NMD-Proteine bei der Kontrolle und Regulierung der Pflanzenentwicklung ist wahrscheinlich sehr von den Wachstumsbedingungen abhängig, vor allem die Länge der Photoperiode. Die Licht-abhängigen Entwicklungsphänotypen wurden schon in einer anderen Mutante von UPF1 berichtet, UPF1:*Iba1*, bei der eine missense Mutation in der Gensequenz vorhanden ist. In *Iba1* lag ein stark gehemmtes bzw. anormales Wachstum unter Kurztagbedingung vor, *Iba* konnte unter kontinuierlichem Licht relativ besser wachsen (Yoine et al., 2006b). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Abweichung zu den veröffentlichten Daten von Yoine. *Iba1* besitzt eine missense Mutation, wodurch eine einzige Aminosäure ist in UPF1. *upf1-5* wurde hingegen durch eine T-DNA Insertion gewonnen. Durch dieses mehrere tausend Basenpaare lange DNA-Fragment wird die Transkriptmenge von UPF1 in *upf1-5* sehr stark unterdrückt. Es könnte sein, dass durch die Transkriptmenge von UPF1 bzw. die Expression von UPF1 die Abweichung der Ergebnisse in den beiden UPF1 Mutanten verursacht wurde.

Wie die Photoperiode bei der NMD-abhängiger Pflanzenentwicklung beeinflusst wird, ist noch unbekannt. Die Entwicklungsveränderung der mutierten Pflanzen unter beiden Wachstumsbedingungen deuten an, dass die NMD-Proteine bei der Regulierung der an der Pflanzenentwicklung beteiligten Gene sehr stark von den Wachstumsbedingungen

abhängig sind. Der NMD-Prozess unterdrückt die durch alternatives Spleißen entstehenden Produkte der beiden Gene - *GRP7* und *GPR8* (engl. *Glycine-rich RNA binding protein*), die den Tagesrhythmus der Arabidopsis kontrollieren (Schoning et al., 2008; Schoning et al., 2007). Ein anderes Gen *CCA1* (engl. *circadian clock associated 1*) spielt auch eine wichtige Rolle bei der Modulation des Tagesrhythmus und sehr wahrscheinlich eliminiert der NMD-Prozess dessen alternativ gespleißtes Produkt (Filichkin et al., 2010). Abschließend wurde kürzlich berichtet, dass NMD bei der Regulation der Transkriptmenge des Gens *SOC1 (engl. Suppressor of overexpression of CO1)* sowohl in normal gespleißte Form, als auch in alternativ gespleißter, also PTC enthaltenden Form essenziell ist (Song et al., 2009). Mit diesen Studien und den Ergebnissen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, hauptsächlich der Tagesrhythmus, einen eindeutigen Einfluss auf den Phänotypen der NMD-Mutanten haben.

4.3. Die Funktion der UPF-Proteine in induzierbaren Stressantworten

In den Säugetierzellen ist UPF1 wichtig für die Resistenz gegen genotoxischen Stress (Azzalin und Lingner, 2006) und es ist auch an der transkriptionellen Regulierung des Aminosäurehaushaltes beteiligt (Mendell et al., 2004). UPF1 spielt in *Schizosaccharomyces pombe* bei der systematischen Antwort gegen oxidativen Stress eine Rolle. In *Arabidopsis* ist UPF1 bei der durch Zucker ausgelösten transkriptionellen Regulation sehr wichtig (Yoine et al., 2006b).

Es wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass UPF1, UPF2 und UPF3 die durch Verwundung induzierte Stressantwort (inklusive Jasmonsäurehaushalt und transkriptionellen Veränderungen) besonders unter Langtagbedingung beeinflussten. Die Akkumulation der Jasmonsäure ist von der Biosynthese der Jasmonsäure und dem Metabolismus der Jasmonsäure abhängig (Delker et al., 2006). Zwei Gründe könnten die erhöhten Jasmonsäuregehalte in den Mutanten ausschließen: 1) die erhöhte Enzymaktivität in der Biosynthese der Jasmonsäure, 2) die gehemmte Enzymaktivität des Metabolismus der Jasmonsäure.

NMD-Proteine waren auch an der Regulation des durch Pathogene induzierten Salizylsäuregehaltes beteiligt. Es wird vermutet, dass eine Veränderung der

Transkriptmenge der Pathogen-Resistenz Gene mittels NMD-Proteine besteht, obwohl die Änderungen der Transkripte keinen eindeutigen Resistenzeffekt gegen Pathogene auslösen.

In der Regel kontrolliert der NMD-Prozess die Expression einer Vielzahl von Genen. Die transkriptionelle Analyse der Jasmonsäure induzierten Gene nach einer Behandlung mit MeJA zeigte, dass die NMD-Proteine bei der normalen Regulation von LOX2 und VSP2 beteiligt sind, obwohl diese Gene keine anormale kodierende Struktur haben. Aber vor allem zeigten sich in alle Mutanten die folgenden Erscheinungen, die Fehlregulation der Phytohormone, die Änderung der Transkriptmenge der induzierten Gene nach Verwundungs-, Jasmonate- und Pathogenbehandlung. Deswegen ist zu vermuten, dass in Pflanzen sowohl die Regulation der Phytohormone als auch die Regulation der Transkripte, durch den NMD-Prozess kontrolliert wird.

Die Forschungen in verschiedenen Organismen zeigten, dass eine Abhängigkeit zwischen dem NMD-Prozess und dem alternativen Spleißen besteht. Alternatives Spleißen ist ein Prozess, in dem ein Gen in verschiedenen Transkripten prozessiert wird, anschließend wird eine Vielfalt von Proteinen produziert. Beim alternativen Spleißen können auch PTC-enthaltende Transkripte entstehen, ohne dass diese durch den NMD-Prozess abgebaut werden. Dies führt zu einer schädlichen bzw. lebensbedrohlichen Wirkung auf den Organismus (Lewis et al., 2003; Mendell et al., 2004; Baek und Green, 2005; Filichkin et al., 2010). Der abiotische bzw. biotische Stress hat einen bedeutenden Einfluss auf das alternative Spleißen der prä-mRNA, deren Produkte wichtig für Regulation des spezifischen durch stress-induzierten Transkriptoms sind (Reddy, 2007). Einige PTC-enthaltende Transkripte sollen auch biologische Funktionen besitzen, sie werden zu Proteinen translatiert oder haben regulatorische Effekte auf ihre vollständig gespleißte Form (Sureau et al., 2001; Lewis et al., 2003). Demzufolge wäre es nicht überraschend, wenn die Änderungen der Pflanzentwicklung und eine induzierbare Stressantwort der Pflanze vom NMD-Prozess kontrolliert würden. Es wäre auch möglich, dass eine Ausschaltung der NMD-Proteine in Pflanzen zur Akkumulation der Transkripte führt, welche den Entwicklungsprozess und die induzierbaren Stressantworten der Pflanze regulieren. Die transkriptionellen Veränderungen, also die Akkumulation der spezifischen Transkripte verursachte die morphologischen, stress-induzierten phytohormonalen und transkriptionellen Veränderungen in *upf1-5*, ir*UPF2* und *upf3-1*. Diese Gene besitzen wahrscheinlich

ähnliche Strukturen, wie die mRNA-Strukturen in anormalen mRNAs (wie z. B. die Anwesenheit eines offenen Leserahms im 5‘-untranslatierten Bereich, oder PTC enthaltende Protein kodierenden Gene) (Kurihara et al., 2009; Nyiko et al., 2009), sie sind normale mRNAs, deren Transkriptmenge stark von NMD-Faktoren beeinflusst werden (Sureau et al., 2001; Song et al., 2009), oder sie sind wahrscheinlich nicht Protein kodierende mRNAs, die in NMD-Mutanten stabilisiert sind und eine regulatorische Funktion in der Pflanzenentwicklung und gegen Stressreaktionen aufweisen (Kurihara et al., 2009).

4.4. NMD-Proteine und abiotischer Stress – UV-B Strahlung

Im Vergleich mit Menschen sind die Pflanzen aufgrund ihrer natürlichen Lebensweise (Unbeweglichkeit, Photosynthese) lebenslang unvermeidbar unter Exposition der Sonnenstrahlung. Auch die stratosphärische Ozonschicht, die der natürliche Schutzschirm der auf Erde lebenden Organismen vor UV-Strahlung ist, wird durch Freisetzung künstlich hergestellter FCKWs (Fluorchlorkohlenwasserstoff) ständig reduziert. In einigen Regionen der Ozonschicht der Erde treten zu bestimmten Jahreszeiten die Ozonlöcher auf, wodurch die in der darunter liegenden Region lebenden Organismen, besonders die Pflanzen, stark gefährdet sind. In den 90er Jahren wurden die Auswirkungen der UV-B Strahlung auf landwirtschaftliche Ergebnisse intensiv untersucht. Die zunehmende UV-B Strahlung auf der Erde wird ein ernsthaftes Problem durch die Reduktion des Wachstums und der Ausbeute der Nutzpflanzen in der Zukunft sein (Hidema und Kumagai, 2006). Deswegen wird die Forschung auf dem Gebiet, wie sich die Pflanzen vor der UV-B Strahlung schützen, wie sich die Pflanze gegen diesen unvermeidbaren Stress verteidigen oder welche molekulare Mechanismen dahinter ablaufen, wahrscheinlich in der Zukunft mehr an Bedeutung gewinnen.

UV-B Strahlung hat den höchsten Energiebetrag aller Tagessonnenspektren. Sie hat das höchste Potential zur Schädigung der Makromoleküle (inkl. DNA), zur Induktion der Herstellung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und zur Störung zellulärer Prozesse. Natürlich haben Pflanzen während der Evolution ein eigenes Abwehrsystem gegen UV-B Strahlung und ein Reparatursystem entwickelt. Eines der wichtigsten Abwehrsysteme

in höheren Pflanzen ist die Verhinderung des Eindringens der UV-B Strahlung in das Gewebe durch Absorption der UV-B Strahlung durch Flavonoide und phenolische Komponenten (Stapleton and Walbot, 1994; Rozema et al., 2002; Schmitz-Hoerner und Weissenbock, 2003). Ein anderer Mechanismus ist die Reflektion der UV-B Strahlung durch induziertes Wachstum der pflanzlichen Wachse und Haare auf epidermalem Gewebe, um das Eindringen zu vermindern (Liakopoulos, 2006). Falls die UV-B Strahlung durch verschiedene Umwelteinflüsse (wie z. B. Jahreszeit, Tageszeit, Bewölkung) oder künstlicher Einflüsse (wie die Freisetzung von FCKW) bis in die Zelle eindringt, hat die Pflanze ebenfalls ein Reparatursystem entwickelt, um die geschädigten Zellkomponenten zu reparieren oder durch Aktivierung des programmierten Zelltods die nicht mehr reparierbaren Zellen zu eliminieren. Die Reparaturmechanismen der durch UV-B Strahlung induzierten DNA-Schädigung sind schon lange Zeit bekannt. Die Absorption der UV-B Strahlung induziert die Dimerisierung nebeneinander stehender Baustein der DNA – den Pyrimidinen. Diese Missbildung der Bausteine führt zur Blockierung der Replikation und Transkription von DNA (Britt, 2004). Bei Akkumulation dieser Fehler könnten DNA Einzelstrang-Brüche, im schlimmsten Fall Doppelstrang-Brüche erfolgen. Demzufolge ist eine Instabilität des Genoms oder Apoptose der Zelle zu erwarten.

Die Photoreaktivierung ist ein Reparaturmechanismus für die Reparatur UV-B induzierter DNA Einzelstrang-Brüche, hierbei wird das Pyrimidin-Dimer durch die Photolyase unter blauem Licht über photochemische Reaktionen zu zwei Monomeren abgespalten. Außer licht-abhängigen Prozessen besitzt die Pflanze auch licht unabhängige Reparaturmechanismen um den abnormalen Baustein oder daraus folgende Fehler zu reparieren, wie BER (Basenexzisionsreparatur), NER (Nukleotidexzisionsreparatur), und MMR (Mismatch-Reparatur), in denen eine Zusammenarbeit verschiedener Enzyme wie DNA-Polymerase, DNA-Ligase, Endonuklease, Topoisomerase und andere unbekannten Komponenten abläuft. Für die DNA Doppelstrang-Brüche existieren auch eigene Reparaturmechanismen wie z. B. homologe Rekombination, in Pflanzen wurde dies von Puchta 2005 und Schuermann 2005 ausführlich beschrieben. Durch verschiedene DNA Schädigungen können die sich teilenden Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus durch Aktivierung der Kontrollpunkte gestoppt werden (Culligan und Britt, 2008). Die drei Proteine ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) und

WEE1 sind die drei Proteine, die wichtig sind bei der Aktivierung der Kontrollpunkte in Säugetierzellen und Hefen. Sie wurden als Homologe in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und es wurden ähnliche Funktionen wie in Säugetierzellen nachgewiesen (Culligan et al., 2004; De Schutter et al., 2007; Ricaud et al., 2007). Die bisher veröffentlichten Publikationen über UV-B Strahlung sensitiver bzw. resistenter Pflanze behandelten lediglich Punktmutationen bzw. Aminosäureaustauschmutationen in entsprechenden Genen, deren kodierte Enzyme eine entscheidende Rolle in Stoffwechselwegen der phenolischen Komponenten (Zhao et al., 2007) bei Licht abhängigen und unabhängigen DNA-Reparatur Prozessen (Caldwell et al., 1989; Ueda et al., 2005; Hidema und Kumagai, 2006; Zhao et al., 2007), oder bei der Aktivierung der Kontrollpunkte in teilenden Zellen nach UV-B Bestrahlung (Sakamoto et al., 2009) spielen. Die direkte bzw. indirekte Beteiligung der NMD-Proteine an NMD-abhängigen bzw. NMD-unabhängigen Prozessen an einer durch UV-B Strahlung induzierten Stressantwort wurde leider noch nicht beschrieben.

Anhand der Ergebnisse in dieser Arbeit könnte man sagen, dass die Sensitivität der ir*UPF2* und *upf3-1* gegen UV-B Strahlung ein NMD unabhängiger Prozess sein müsste, da *upf1-5* eine ähnliche Resistenz wie Col-0 gegen UV-B Strahlung hatte. Falls die Sensitivität der Pflanze gegen UV-B Strahlung durch den NMD-Prozess kontrolliert würde, müssten alle 3 Mutanten einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Der Wurzelwachstumstest und mit UV-B Strahlung behandelte Pflanzen zeigten für ir*UPF2* und *upf3-1* sowohl eine Sensitivität der Blätter als auch der Wurzel gegenüber der UV-B Strahlung. Das heißt, die beiden Proteine UPF2 und UPF3 sind notwendig zur Überwindung des durch UV-B Strahlung induzierten Stress im Vergleich zu Col-0, sowohl in normalen Zellen als auch in teilenden Zellen. Im Zusammenhang der bisher publizierten Veröffentlichungen über UV-B Strahlung induzierten Stress in Pflanzen wurden 2 Vermutungen über die Beteiligung der NMD-Proteine UPF1, UPF2 und UPF3 bei UV-B induzierten Stressantworten erstellt. UPF2 und UPF3 sind wahrscheinlich direkt an einem UV-B induzierten DNA-Reparatursystem beteiligt. Folgende Gründe gibt es für diese Vermutung: erstens befindet sich das meiste UPF3 im Zellkern, im Gegensatz dazu ist UPF1 vor allem im Zytoplasma vorhanden, UPF2 kann man in beiden Teilen der Zelle finden (Kim et al., 2009). Die Reparatur der DNA der Eukaryoten findet vor allem im Zellkern statt.

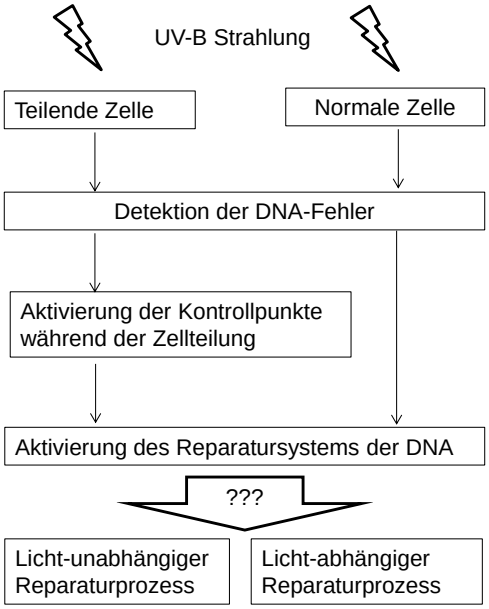


Abbildung 4-1: Hypothese: die Beteiligung der NMD Fakoren am DNA Reparatur System

Zweitens, obwohl der Detektionsmechanismus der durch UV-B induzierte DNA-Fehler noch unbekannt ist, muss dieser Vorgang in teilenden Zellen upstream von Kontrollpunkten liegen, damit eine Aktivierung der Kontrollpunkte stattfindet um die geschädigte DNA zu reparieren. In normalen Zellen wird dieser Schritt über Kontrollpunkte das Reparatursystem zu aktivieren möglicherweise weggelassen und es erfolgt nach der Detektion der DNA-Fehler eine direkte Reparatur der DNA über Reparatursysteme. Beim Wurzelwachstumstest zeigten UPF2 und UPF3 in teilenden Zellen den gleichen Effekt wie in UV-B behandelten Keimlingen vor allem in normalen Zellen ohne Teilungsfähigkeit. Mit diesen Ergebnissen lässt sich vermuten, dass UPF2 und UPF3 einen direkten Effekt auf das DNA-Reparatursystem haben. Aber ob die UPF2 und UPF3 bzw. UPF1 bei der Aktivierung der Kontrollpunkte in teilenden Zellen eine Rolle spielen, kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, da beide Aussagen möglich wären. Die Schutzpigmente vor UV-Strahlung wie phenolische Komponenten und Flavonoide, die das Eindringen der UV-B Strahlung ins Erbgut vermeiden, befinden sich vor allem im Fotosynthesestandort, den Blättern. Trotzdem kann man Licht-unabhängige Reparaturprozesse während der Nacht nicht ausschließen und das Wurzelwachstum läuft normalerweise im Dunkeln in der Erde ab, daher entstand die zweite Vermutung, dass sehr wahrscheinlich UPF2 und UPF3 an Licht-unabhängigen DNA Reparaturprozess beteiligt sind.

Die wahrscheinlichste Vermutung wäre, dass UPF2 und UPF3 als Transportproteine beim Transport von mRNA dienen, die für wichtige Enzyme der DNA Reparatur kodieren. Da UPF2 und UPF3 keine katalytisch funktionelle Domäne besitzen, binden sie an mRNA und interagieren mit anderen Proteinen z. B. im NMD-Prozess. Allein UPF2 besitzt eine MIF4G Domäne. Diese Domäne könnte an die mit eukaryotischen Initiationsfaktoren eIF4A und eIF3 (Beteiligung an der Translation von mRNA in Proteine) binden.

Die Anwesenheit von UPF2 und seine Interaktion mit den Initiationsfaktoren würde wahrscheinlich die Translationsgeschwindigkeit bestimmter Gene, deren kodierte Enzyme relevant für die DNA Reparatursystem sind, beeinflussen. Im Vergleich mit UPF2 hat UPF3 nur eine RNA-Binde-Domäne in sich. Die Zusammenarbeit mit UPF2 als Proteinkomplex durch Protein-Protein Interaktion beim mRNA Transport und Translation von DNA Reparatur relevanten Enzymen wäre ein Grund, wieso ir*UPF2* und *upf3-1* eine UV-B Sensitivität in beiden Experimenten zeigten. Die Wahrscheinlichkeit, dass UPF3 allein an der UV-B induzierten DNA Reparatur beteiligt ist, ist wegen seiner Lokalisation im Zellkern durch die Interaktion mit bestimmten Proteinen (DNA-Polymerase, Enzyme in DNA-Baustein Stoffwechselwege und Reparaturweg usw.) recht hoch.

5. Literaturverzeichnis

Veröffentlichung::

Arciga-Reyes, L., Wootton, L., Kieffer, M. and Davies, B. (2006). UPF1 is required for nonsense-mediated mRNA decay (NMD) and RNAi in Arabidopsis. *Plant J* **47**, 480-9.

Azzalin, C. M. and Lingner, J. (2006). The human RNA surveillance factor UPF1 is required for S phase progression and genome stability. *Curr Biol* **16**, 433-9.

Baek, D. and Green, P. (2005). Sequence conservation, relative isoform frequencies, and nonsense-mediated decay in evolutionarily conserved alternative splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12813-8.

Britt, A. B. (2004). Repair of DNA damage induced by solar UV. *Photosynthesis Research* **81**, 105-112.

Caldwell, M. M., Teramura, A. H. and Tevini, M. (1989). The changing solar ultraviolet climate and the ecological consequences for higher plants. *Trends Ecol Evol* **4**, 363-7.

Chang, Y. F., Imam, J. S. and Wilkinson, M. F. (2007). The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem* **76**, 51-74.

Clough, S. J. and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *Plant J* **16**, 735-43.

Conti, E. and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 316-25.

Culbertson, M. R. (1999). RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer. *Trends Genet* **15**, 74-80.

Culligan, K., Tissier, A. and Britt, A. (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**, 1091-104.

Culligan, K. M. and Britt, A. B. (2008). Both ATM and ATR promote the efficient and accurate processing of programmed meiotic double-strand breaks. *Plant Journal* **55**, 629-638.

De Schutter, K., Joubes, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inze, D. et al. (2007). Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *Plant Cell* **19**, 211-225.

Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O., Feussner, I. and Wasternack, C. (2006). Jasmonate biosynthesis in Arabidopsis thaliana--enzymes, products, regulation. *Plant Biol (Stuttg)* **8**, 297-306.

Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W. K. and Mockler, T. C. (2010). Genome-wide mapping of alternative splicing in Arabidopsis thaliana. *Genome Res* **20**, 45-58.

He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S. and Jacobson, A. (2003). Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell* **12**, 1439-52.

Hentze, M. W. and Kulozik, A. E. (1999). A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. *Cell* **96**, 307-10.

Hidema, J. and Kumagai, T. (2006). Sensitivity of rice to ultraviolet-B radiation. *Ann Bot* **97**, 933-42.

Hori, K. and Watanabe, Y. (2005). UPF3 suppresses aberrant spliced mRNA in Arabidopsis. *Plant J* **43**, 530-40.

Isken, O., Kim, Y. K., Hosoda, N., Mayeur, G. L., Hershey, J. W. and Maquat, L. E. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell* **133**, 314-27.

Isken, O. and Maquat, L. E. (2008). The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet*.

Kerenyi, Z., Merai, Z., Hiripi, L., Benkovics, A., Gyula, P., Lacomme, C., Barta, E., Nagy, F. and Silhavy, D. (2008). Inter-kingdom conservation of mechanism of nonsense-mediated mRNA decay. *Embo J* **27**, 1585-95.

Kim, S. H., Koroleva, O. A., Lewandowska, D., Pendle, A. F., Clark, G. P., Simpson, C. G., Shaw, P. J. and Brown, J. W. (2009). Aberrant mRNA transcripts and the nonsense-mediated decay proteins UPF2 and UPF3 are enriched in the Arabidopsis nucleolus. *Plant Cell* **21**, 2045-57.

Kurihara, Y., Matsui, A., Hanada, K., Kawashima, M., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Kaminuma, E., Mochizuki, Y., Matsushima, A. et al. (2009). Genome-wide suppression of aberrant mRNA-like noncoding RNAs by NMD in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 2453-8.

Lelivelt, M. J. and Culbertson, M. R. (1999). Yeast Upf proteins required for RNA surveillance affect global expression of the yeast transcriptome. *Mol Cell Biol* **19**, 6710-9.

Lewis, B. P., Green, R. E. and Brenner, S. E. (2003). Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 189-92.

Liakopoulos, G. (2006). Trichome layers versus dehaired lamina of Olea europaea leaves: differences in flavonoid distribution,UV-absorbing capacity, and wax yield. *Environmental and Experimental Botany*.

Maquat, L. E. (2004). Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89-99.

Medghalchi, S. M., Frischmeyer, P. A., Mendell, J. T., Kelly, A. G., Lawler, A. M. and Dietz, H. C. (2001). Rent1, a trans-effector of nonsense-mediated mRNA decay, is essential for mammalian embryonic viability. *Hum Mol Genet* **10**, 99-105.

Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F. and Dietz, H. C. (2004). Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet* **36**, 1073-8.

Metzstein, M. M. and Krasnow, M. A. (2006). Functions of the nonsense-mediated mRNA decay pathway in Drosophila development. *PLoS Genet* **2**, e180.

Nyiko, T., Sonkoly, B., Merai, Z., Benkovics, A. H. and Silhavy, D. (2009). Plant upstream ORFs can trigger nonsense-mediated mRNA decay in a size-dependent manner. *Plant Mol Biol* **71**, 367-78.

Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 267-94.

Rehwinkel, J., Letunic, I., Raes, J., Bork, P. and Izaurralde, E. (2005). Nonsense-mediated mRNA decay factors act in concert to regulate common mRNA targets. *Rna* **11**, 1530-44.

Ricaud, L., Proux, C., Renou, J. P., Pichon, O., Fochesato, S., Ortet, P. and Montane, M. H. (2007). ATM-Mediated Transcriptional and Developmental Responses to gamma-rays in Arabidopsis. *Plos One* **2**.

Rodriguez-Gabriel, M. A., Watt, S., Bahler, J. and Russell, P. (2006). Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol Cell Biol* **26**, 6347-56.

Rozema, J., Bjorn, L. O., Bornman, J. F., Gaberscik, A., Hader, D. P., Trost, T., Germ, M., Klisch, M., Groniger, A., Sinha, R. P. et al. (2002). The role of UV-B radiation in aquatic and terrestrial ecosystems--an experimental and functional analysis of the evolution of UV-absorbing compounds. *J Photochem Photobiol B* **66**, 2-12.

Sakamoto, A. N., Lan, V. T. T., Puripunyavanich, V., Hase, Y., Yokota, Y., Shikazono, N., Nakagawa, M., Narumi, I. and Tanaka, A. (2009). A UVB-hypersensitive mutant in Arabidopsis thaliana is defective in the DNA damage response. *Plant Journal* **60**, 509-517.

Schmitz-Hoerner, R. and Weissenbock, G. (2003). Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry* **64**, 243-55.

Schoning, J. C., Streitner, C., Meyer, I. M., Gao, Y. and Staiger, D. (2008). Reciprocal regulation of glycine-rich RNA-binding proteins via an interlocked feedback loop coupling alternative splicing to nonsense-mediated decay in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* **36**, 6977-87.

Schoning, J. C., Streitner, C., Page, D. R., Hennig, S., Uchida, K., Wolf, E., Furuya, M. and Staiger, D. (2007). Auto-regulation of the circadian slave oscillator component AtGRP7 and regulation of its targets is impaired by a single RNA recognition motif point mutation. *Plant J* **52**, 1119-30.

Song, H. R., Song, J. D., Cho, J. N., Amasino, R. M., Noh, B. and Noh, Y. S. (2009). The RNA binding protein ELF9 directly reduces SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 transcript levels in arabidopsis, possibly via nonsense-mediated mRNA decay. *Plant Cell* **21**, 1195-211.

Stapleton, A. E. and Walbot, V. (1994). Flavonoids can protect maize DNA from the induction of ultraviolet radiation damage. *Plant Physiol* **105**, 881-9.

Sureau, A., Gattoni, R., Dooghe, Y., Stevenin, J. and Soret, J. (2001). SC35 autoregulates its expression by promoting splicing events that destabilize its mRNAs. *Embo J* **20**, 1785-96.

Tarpey, P. S., Lucy Raymond, F., Nguyen, L. S., Rodriguez, J., Hackett, A., Vandeleur, L., Smith, R., Shoubridge, C., Edkins, S., Stevens, C. et al. (2007). Mutations in UPF3B, a member of the nonsense-mediated mRNA decay complex, cause syndromic and nonsyndromic mental retardation. *Nat Genet* **39**, 1127-33.

Ueda, T., Sato, T., Hidema, J., Hirouchi, T., Yamamoto, K., Kumagai, T. and Yano, M. (2005). qUVR-10, a major quantitative trait locus for ultraviolet-B resistance in rice, encodes cyclobutane pyrimidine dimer photolyase. *Genetics* **171**, 1941-50.

Wu, J., Kang, J. H., Hettenhausen, C. and Baldwin, I. T. (2007). Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) silences the accumulation of aberrant trypsin proteinase inhibitor mRNA in Nicotiana attenuata. *Plant J* **51**, 693-706.

Yoine, M., Nishii, T. and Nakamura, K. (2006a). Arabidopsis UPF1 RNA helicase for nonsense-mediated mRNA decay is involved in seed size control and is essential for growth. *Plant and Cell Physiology* **47**, 572-80.

Yoine, M., Ohto, M. A., Onai, K., Mita, S. and Nakamura, K. (2006b). The lba1 mutation of UPF1 RNA helicase involved in nonsense-mediated mRNA decay causes pleiotropic phenotypic changes and altered sugar signalling in Arabidopsis. *Plant J* **47**, 49-62.

Zhao, J., Zhang, W., Zhao, Y., Gong, X., Guo, L., Zhu, G., Wang, X., Gong, Z., Schumaker, K. S. and Guo, Y. (2007). SAD2, an importin -like protein, is required for UV-B response in Arabidopsis by mediating MYB4 nuclear trafficking. *Plant Cell* **19**, 3805-18.

Bücher:

A. Bresinsky, Ch. Körner, J. W. Kadereit, G. Neuhaus und U. Sonnewald, Strasburger Lehrbuch der Botanik, 36. Auflage, Sprektrum Akademischer Verlag 2008, Heidelberg

F. Kempken und R. Kempken, Gentechnik bei Pflanzen, 3 Auflag, Springer Verlag Berlin Heidelberg 2004

H. W. Heldt, B. Piechulla, Pflanzenbiochemie, 4. Auflag, Sprektrum Akademischer Verlag 2008, Heidelberg

Webseiten:

www. arabidopsis.org

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.brc.riken.go.jp/lab/epd/catalog/cdnaclone.html

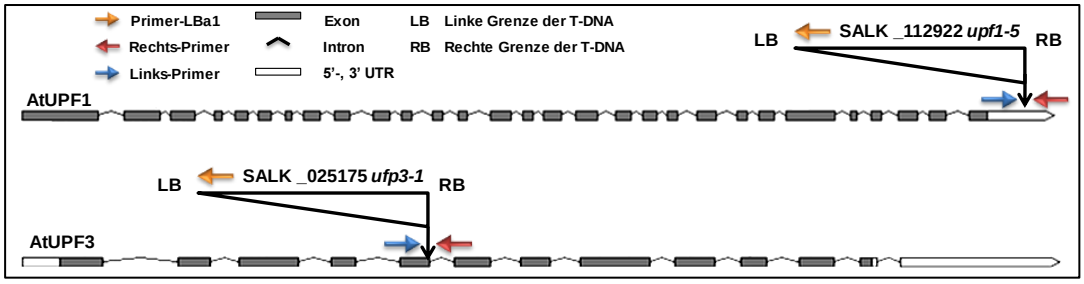
www.arabidopsis.info

www.wikipedia.org

Anhang

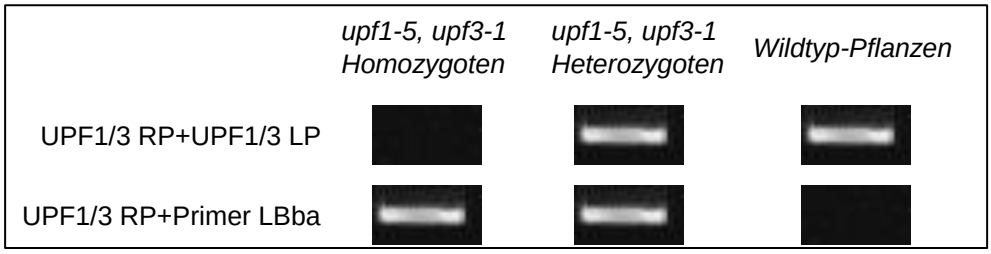
1. *Identifizierung der Homogozyten von upf1-5 und upf3-1*

Anhang Abb. 1 Die Lokation der T-DNA und entsprechende Primer in *upf1-5* und *upf3-1*



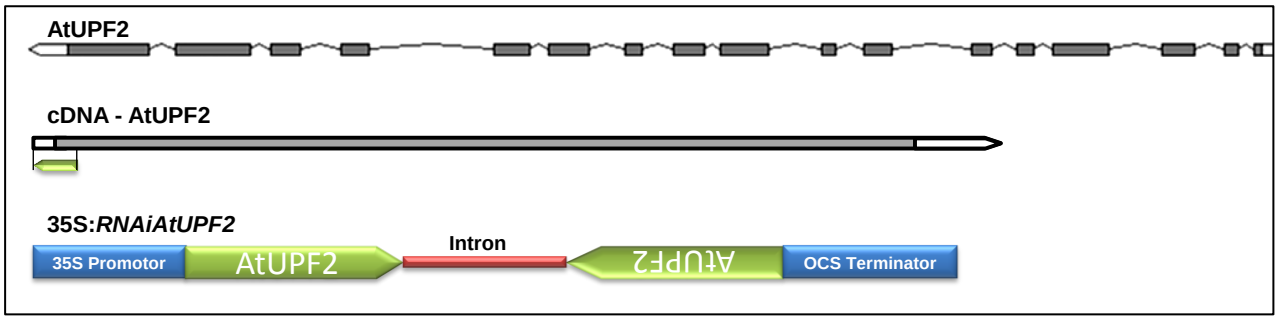
Die von TAIR (The Arabidopsis Information Resource) gekauften Samen von *upf1-5* (SALK_112922) und *upf3-1* (SALK_025175) sind Heterozygoten. Nach Mendelschen Regeln sollten ein Viertel der Samen in der F2 Generation *UPF1* und *UPF3* Homozygoten sein. Durch PCR wurden die Pflanzen der F2 Generation von UPF1 und UPF3 Homozygoten identifiziert, deren Nachkommen wurde als Versuchspflanzen in dieser Arbeit verwendet.

Anhang Abb. 2 Beispiel Ergebnisse zur Identifizierung der Homogozyten upf1-5 und upf3-1 durch PCR

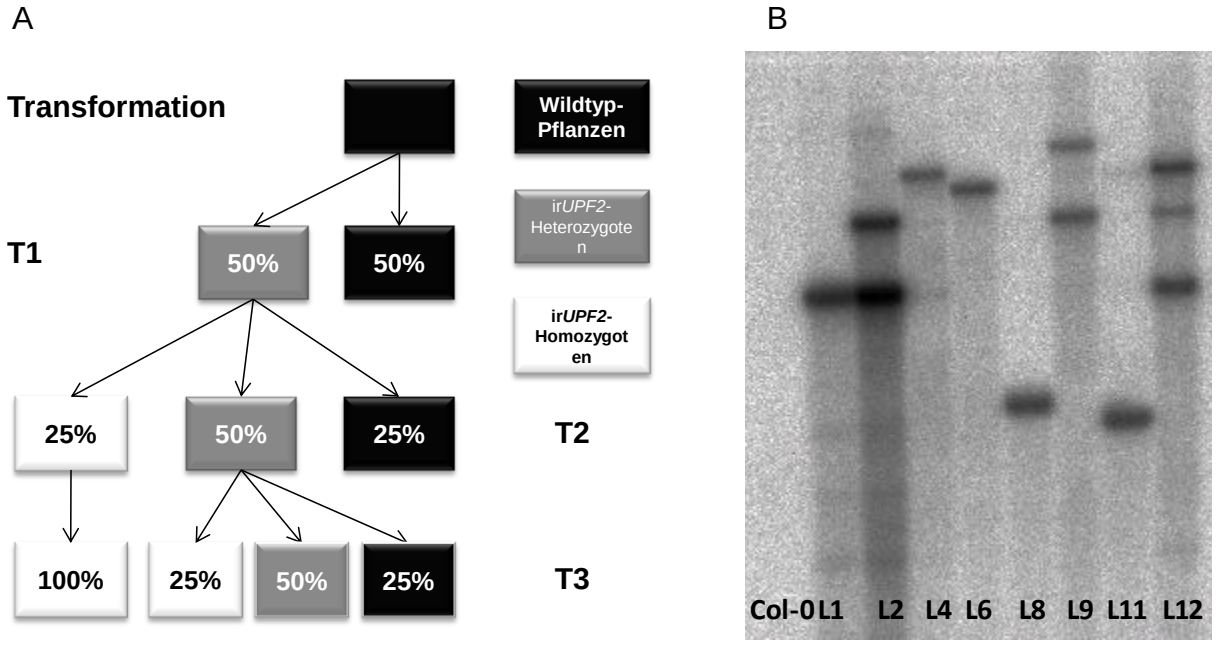


2. *Identifizierung der Homozygoten von irUPF2*

Anhang Abb. 3 Genstruktur von UPF2 und Konstrukt von *35S:RNAiAtUPF2*



Anhang Abb. 4 Spaltungsregel im dominant rezessiven Erbgang und Southern Blot



Die Identifizierung erfolgte durch ein Screening der T1, T2 und T3 Generation von ir*UPF2* auf Hygromycin enthaltendes Medium C. Die einfache Insertion des Konstrukts 35S:*RNAiAtUPF2* wurde mittels Southern Blot in T1 Pflanzen getestet, um ein einfacheres Screening der T2 Pflanzen durchzuführen. Falls alle Nachkommen (T3) einer T2 Pflanze auf Hygromycin enthaltendes Medium leben können, wurde diese T2 Pflanze als Homozygote von ir*UPF2* festgelegt, und deren Nachkommen wurden als Versuchspflanze in dieser Arbeit eingesetzt.

3. *Liste des verwendeten Equipments*

Equipment	Modell und Firmen
1,5/2 ml Reaktionsgefäß	Roth
50 ml Tubes	bd-Bioscience Falcon tubes
Crimp vials + caps	Macherey-Nagel
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie2TM
Zentrifuge	Eppendorf Centrifuge 5415 R
Vakuum Evaporator	Eppendorf Concentrator 5301
Inkubator 28°C/ 37°C	Heraeus Instuments
Inkubation Schüttler	New Brunswick Scientific, innovaTM 4000
Homogenisator	Bio101 Thermo Savant
Elektroporator	Bio-Rad MicroPulser™
HPLC-MS/MS	Varian ProStar 410
Biophotometer	Eppendorf
Heizblock	Eppendorf ThermoStat plus
Spektrophotometer	PeqLab NanoDrop
Elektrophorese-System	Labnet MUPID21
Gel Imaging System	Syngene
PCR Gerät	Eppendorf Mastercycler gradient
qRT-PCR Gerät	Stratagene Mx3005P
Pipette	pipetman
Multi-Pipette	Eppendorf
Pipette Spitze	Roth
Petri Schale (Plastik)	greiner bio-one
Spritze 1 ml	Omnifix
UV-B Lampe	Philips, Ultraviolett-B TL40W/12RS
Mikroskop	Zeiss Stereomicroscope SV11
Fluoreszenzmikroskops	Leica DM6000B

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter der Verwendung der aufgeführten Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Jena, den 20.05.2011

_____

Chuan Shi